

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Amanda Dias Braga

**PARTICIPAÇÃO DE VIAS NOCICEPTIVAS NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO
AGUDA NEUTROFÍLICA**

Belo Horizonte

2024

Amanda Dias Braga

**PARTICIPAÇÃO DE VIAS NOCICEPTIVAS NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO
AGUDA NEUTROFÍLICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva

Belo Horizonte

2024

043

Braga, Amanda Dias.

Participação de vias nociceptivas no controle da inflamação aguda neutrofílica [manuscrito] / Amanda Dias Braga. – 2024.

96 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral. Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Inflamação. 3. Membrana Sinovial. 4. Nociceptividade. 5. Peptídeo Relacionado com Gene de Calcitonina. I. Amaral, Flávio Almeida. II. Silva, Vanessa Pinho da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE TESE

AMANDA DIAS BRAGA

Às oito horas e trinta minutos do dia **16 de setembro de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**PARTICIPAÇÃO DE VIAS NOCICEPTIVAS NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO AGUDA NEUTROFÍLICA**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Flávio Almeida Amaral**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Flávio Almeida Amaral	UFMG	
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	UFMG	
Dra. Thiago Roberto Lima Romero	UFMG	
Dra. Luciana Pádua Tavares	Instructor of Medicine - Harvard Medical School	
Dra. Prof ^o Giselle Santos Magalhães	Universidade Autônoma de Madrid- Espanha	

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 16 de setembro de 2024.**

Dr. Flávio Almeida Amaral

Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa

Thiago Roberto Lima Romero

Dra. Luciana Pádua Tavares

Prof^o Dra. Giselle Santos Magalhães

Belo Horizonte, 20 de setembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Padua Tavares, Usuário Externo**, em 20/09/2024, às 13:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 24/09/2024, às 12:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 27/09/2024, às 14:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giselle Santos Magalhaes, Usuário Externo**, em 27/09/2024, às 15:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Roberto Lima Romero, Subchefe de departamento**, em 28/09/2024, às 08:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3570272** e o código CRC **396924C8**.

Referência: Processo nº 23072.205385/2024-37

SEI nº 3570272

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Flávio Amaral pela orientação, direcionamento e aprendizado durante o desenvolvimento desse projeto. Obrigado pela disponibilidade.

A minha coorientadora, Dra. Vanessa Pinho pela orientação, auxílio e ideias no desenvolvimento desse projeto. Obrigada pela receptividade.

Ao Mauro, Flávio e Vanessa pela oportunidade de desenvolver esse projeto no Laboratório de Imunofarmacologia e por oferecerem todo o suporte necessário.

Aos colegas e professores do grupo Imunofarmacologia pelo companheirismo, convivência e discussões. Agradeço em especial a Anna Clara, Daiane, Eliza, Fernando, Franciel, Gabrielly, Izabela, Paula e Vívian, pela amizade, ajuda nos experimentos, discussões, análises, conversas, risadas, cafés e almoços.

A Ilma, pelo auxílio, paciência, conversas e cuidado.

A Frank por toda disponibilidade e ajuda nas citometrias.

Ao Domênico e ao Celso pela colaboração nas histologias.

A Rose, Hermes e Letícia pelo apoio técnico.

A Luana por acreditar no meu potencial e ter me mostrado esse caminho.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular, a CAPES, CNPq e Fapemig pelo suporte financeiro.

A minha família, aos meus pais por serem minha base, por terem me apoiado em cada decisão, pelo amor incondicional, pela relação de amizade que sempre existiu, pelas longas conversas ao celular, pelo incentivo e orgulho que sentem por mim. A minha mãe por todas as orações. As minhas irmãs, Cibelly e Isabelly, pelo carinho e apoio.

Ao Reinaldo, por ter vivido mais essa etapa ao meu lado, pelo apoio incondicional, por todo amor, paciência, amizade, compreensão e por me ouvir sempre.

A Deus principalmente, por tudo que foi a mim concedido.

A todos que de alguma forma contribuíram nas conquistas que me trouxeram a esse momento.

Obrigada por torcerem por mim!

RESUMO

A migração e o acúmulo excessivo de neutrófilos no tecido inflamado causam danos e perda da função do tecido. Na artrite, os neutrófilos também participam da dor articular secretando moléculas que ativam diretamente os nociceptores periféricos, que conduzem os estímulos dolorosos por meio da secreção de neurotransmissores. Por outro lado, a morte dos neutrófilos por apoptose é um gatilho para o fim da inflamação, uma vez que a eferocitose de células apoptóticas pelos macrófagos estimula a diferenciação de macrófagos com propriedades anti-inflamatórias e pró-resolutivas, situações associadas à resolução da inflamação e ao reparo tecidual. Considerando a estreita relação entre inflamação e dor na artrite, é pertinente investigar mais a fundo o envolvimento dos nociceptores e de seus neurotransmissores envolvidos na atividade dos leucócitos presentes no tecido articular inflamado. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o papel dos nociceptores e do neurotransmissor “Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina” (CGRP) na atividade dos neutrófilos e na resolução da resposta inflamatória aguda da articulação utilizando um modelo auto-resolutivo de artrite induzida por antígeno. Os resultados mostram uma grande concentração de CGRP no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no tecido sinovial em um momento associado com a resolução da inflamação articular neste modelo, corroborada pelo aumento concomitante do número de neutrófilos apoptóticos e da eferocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos. *In vitro*, o CGRP induziu, de forma dependente de concentração, a apoptose dos neutrófilos de maneira concentração dependente. No entanto, a neutralização do CGRP utilizando um anticorpo monoclonal apresentou uma discreta redução da apoptose e eferocitose. Por outro lado, animais que tiveram as fibras nociceptivas TRPV1⁺ dessensibilizadas apresentaram maior número de neutrófilos na cavidade articular, porém com reduzida presença de células apoptóticas, de eferocitose e de macrófagos com perfil anti-inflamatório (CD206⁺) em relação aos animais com as fibras preservadas. De maneira similar, o tratamento com Buprenorfina, um agonista opioide parcial do receptor μ , aumentou o número de neutrófilos, mas reduziu a presença de neutrófilos apoptóticos e eferocitose. Assim, esses achados indicam que os nociceptores e seus neurotransmissores liberados no sítio inflamatório podem atuar em leucócitos prejudicando a resolução do processo inflamatório.

Palavras-chave: Inflamação, resolução da inflamação, tecido sinovial, nocicepção, CGRP.

ABSTRACT

The migration and excessive accumulation of neutrophils in inflamed tissue cause damage and loss of tissue function. In arthritis, neutrophils also participate in joint pain by secreting molecules that directly activate peripheral nociceptors, which conduct painful stimuli through the secretion of neurotransmitters. On the other hand, the death of neutrophils by apoptosis is a trigger for the end of inflammation, since the efferocytosis of apoptotic cells by macrophages stimulates the differentiation of macrophages with anti-inflammatory and pro-resolution properties, situations associated with the resolution of inflammation and tissue repair. Considering the close relationship between inflammation and pain in arthritis, it is pertinent to investigate further the involvement of nociceptors and their neurotransmitters in the activity of leukocytes present in inflamed joint tissue. Thus, this study aimed to investigate the role of nociceptors and the neurotransmitter calcitonin gene-related peptide (CGRP) in neutrophil activity and resolution of acute joint inflammatory response using a self-resolving model of antigen-induced arthritis. The results show a high concentration of CGRP in the dorsal root ganglion (DRG) and synovial tissue at a time point associated with the resolution of joint inflammation in this model, corroborated by the concomitant increase in the number of apoptotic neutrophils and efferocytosis of apoptotic bodies by macrophages. In vitro, CGRP induced neutrophil apoptosis in a concentration-dependent manner. However, neutralization of CGRP using a monoclonal antibody showed a slight reduction in apoptosis and efferocytosis. On the other hand, animals that had their TRPV1⁺ nociceptive fibers desensitized had a higher number of neutrophils in the joint cavity, but with a reduced presence of apoptotic cells, efferocytosis and macrophages with an anti-inflammatory profile (CD206⁺) compared to animals with preserved fibers. Similarly, treatment with Buprenorphine, a partial opioid agonist of the μ receptor, increased the number of neutrophils but reduced the presence of apoptotic neutrophils and efferocytosis. Thus, these findings indicate that nociceptors and their neurotransmitters released at the inflammatory site can act on leukocytes, impairing the resolution of the inflammatory process.

Keywords: Inflammation, inflammation resolution, synovial tissue, nociception, CGRP

LISTA DE ABREVIÇÕES

AIA: artrite induzida por antígeno

AINES: anti-inflamatórios não esteroides

ANOVA: análise de variância

BSA: Bovine Serum Albumin – Soro Albumina Bovina

cAMP: adenosina 3,5'-monofosfato cíclica

C57/BL6: linhagem de camundongos

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

CFA: adjuvante completo de Freund

CGRP: Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

CLR: receptor tipo receptor de calcitonina

CRLR: receptor de CGRP (combinação de CLR e RAMP1)

COX: ciclooxigenases

CREB: proteína de ligação do elemento responsivo ao cAMP

DAMP: Padrões moleculares associado ao dano

DMSO: Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

DNA: ácido desoxirribonucleico

DRG: gânglio da raiz dorsal

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Imunoensaio enzimático

Epac1/2: proteína de troca 1/2 ativada pelo cAMP

GPCRs: receptores acoplados a proteínas G

HOCl: peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso

IFN- γ : interferon-gama

IL: interleucina

LPS: lipopolissacarídeo

mBSA: albumina sérica bovina metilada

MPO: mieloperoxidase

NETs: Neutrophil extracellular traps – armadilhas extracelulares de neutrófilos

NFκB: Nuclear Factor kappa B – Fator nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

OPD: ophenylenediamine dihidrochloride

PAMP: Padrões moleculares associados ao patógeno

PBS: phosphate buffered saline - tampão salina fosfato

PGE₂: prostaglandina E2

PKA: Proteína quinase A

PRRs: receptores de reconhecimento de padrão

RAMP: proteína modificadora da atividade do receptor

RCP: proteína componente do receptor CGRP

ROS: espécies reativas de oxigênio

RTX: resinferatoxina

SNC: sistema nervoso central

TLRs: receptores semelhantes ao Toll

TNFα: fator de necrose tumoral-α

TRP: potencial receptor transitório

TRPA1: anquirina potencial receptor transitório 1

TRPV1: potencial receptor transitório vanilóide 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os neutrófilos apoptóticos liberam sinais de “find-me” e “eat-me”	24
Figura 2: Sinalização nociceptiva na inflamação articular.	29
Figura 3: O complexo do receptor CGRP.....	31
Figura 4: Perfil histológico da inflamação articular no modelo de AIA.....	47
Figura 5: Perfil celular da cinética inflamatória articular no modelo de AIA.....	48
Figura 6: Parâmetros resolutivos no modelo de AIA.	50
Figura 7: A dor permanece ao longo da inflamação.....	51
Figura 8: O CGRP está aumentado no tecido sinovial dois dias após o desafio intra-articular.....	52
Figura 9: O CGRP está aumentado no DRG dois dias após o desafio intra-articular.	53
Figura 10: O CGRP induz a apoptose de neutrófilos.	54
Figura 11: O CGRP induz a apoptose de neutrófilos estimulados em concentração maiores.....	55
Figura 12: Efeito do tratamento com Fremanezumab na resposta inflamatória articular.....	57
Figura 13: Efeito do tratamento com Fremanezumab nos parâmetros de resolução.	58
Figura 14: A dessensibilização dos nociceptores TRPV1 ⁺ com RTX inibiu a sensibilidade a dor.	60
Figura 15: A dessensibilização por RTX não causou alteração na resposta imunológica.	61
Figura 16: O tratamento com RTX não levou a diferenças no perfil celular do lavado articular 2 dias após o desafio.....	62
Figura 17: O tratamento com RTX não levou a diferenças nos parâmetros resolutivos 2 dias após o desafio.	63
Figura 18: O protocolo de dessensibilização por RTX levou a menor nocicepção....	64
Figura 19: A dessensibilização por RTX levou ao aumento de neutrófilos 3 dias após o desafio.....	65
Figura 20: A dessensibilização por RTX levou ao aumento dos parâmetros resolutivos 3 dias após o desafio.	66
Figura 21: A dessensibilização por RTX levou a diminuição de macrófagos CD206 ⁺	67

Figura 22: O tratamento com Buprenorfina reduziu a nocicepção.	68
Figura 23: A buprenorfina não alterou o perfil celular no lavado articular 2 dias após o desafio.....	69
Figura 24: O tratamento com Buprenorfina não interferiu nos parâmetros de resolução dois dias após o desafio.	70
Figura 25: A buprenorfina não alterou o perfil celular no lavado articular 3 dias após o desafio.....	71
Figura 26: O tratamento com Buprenorfina reduziu parâmetros de resolução três dias após o desafio.....	72
Figura 27: Resumo gráfico.	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Aspectos gerais da resposta inflamatória	15
1.2. Visão geral do papel dos neutrófilos na artrite	19
1.3. Controle da resposta inflamatória	21
1.4. A relação entre o sistema nervoso e a inflamação	27
1.5. Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP)	30
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVO	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. METODOLOGIA	36
4.1. Estudos <i>in vivo</i>	36
4.1.1. Animais	36
4.1.2. Modelo experimental de Artrite induzida por Antígeno (AIA)	36
4.1.3. Depleção química de nociceptores	36
4.1.4. Tratamentos	37
4.1.5. Medida de Nocicepção	37
4.1.6. Teste de dor por capsaicina	37
4.1.7. Recuperação de células da cavidade articular	38
4.1.8. Contagem total dos leucócitos	38
4.1.9. Contagem diferencial dos leucócitos	38
4.2. Estudos <i>in vitro</i>	39
4.2.1. Isolamento de Neutrófilos Humanos	39
4.2.2. Cultura de Neutrófilos Humanos	39
4.2.3. Análise da apoptose de leucócitos	40
4.3. Ensaio biológicos	40
4.3.1. Processamento do tecido periarticular para dosagem de citocinas	40
4.3.2. Dosagem de Citocinas: Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	40
4.3.3. Quantificação de anticorpos anti-mBSA	41
4.3.4. Western Blot	41
4.3.5. Análise histológica	42

4.3.6. Análise de imunohistoquímica.....	43
4.3.7. Análise de imunofluorescência.....	43
4.3.8. Citometria de fluxo	44
4.4. Análises estatísticas	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Cinética da resposta inflamatória articular.....	46
5.2 Relação entre o neurotransmissor CGRP e artrite induzida por antígeno	51
5.3. Investigação do efeito do Fremanezumab na resolução da inflamação articular	55
5.4. Efeito da depleção de nociceptores TRPV1 ⁺ na resposta inflamatória articular	58
5.5. Avaliação da resposta inflamatória articular após o tratamento com o analgésico Buprenorfina	67
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO.....	81
8. REFERÊNCIAS	82
ANEXO I.....	95
ANEXO II.....	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da resposta inflamatória

A inflamação é um processo fisiológico complexo de defesa do organismo a patógenos e lesões teciduais que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de biomoléculas¹. Sua principal ação consiste em remover os agentes nocivos e reparar o dano tecidual para restabelecer um estado de homeostase². Porém, a inflamação precisa ser muito bem regulada para impedir que ela mesma não seja um problema adicional para o tecido ou sistema. A produção de mediadores pró-inflamatórios precisa ser balanceada com moléculas anti-inflamatórias e pró-resolutivas, um equilíbrio dependente de uma escala temporal e que leva em consideração a persistência do estímulo desencadeador desta resposta, a intensidade da inflamação e o funcionamento coordenado de células residentes e de leucócitos que migram para o tecido³.

Em uma resposta inflamatória eficiente, a inflamação é resolvida, removendo os agentes iniciadores da resposta, controlando o excesso de leucócitos acumulados e restaurando a arquitetura e funções normais do tecido ou promovendo uma adaptação do tecido para uma nova homeostase tecidual². Por outro lado, a persistência da resposta inflamatória ou mesmo a resposta exacerbada está diretamente associada com danos nos tecidos, os quais podem ser permanentes e causar modificações profundas no funcionamento do tecido e dar origem a doenças inflamatórias crônicas, desenvolvimento de doenças autoimunes e cânceres⁴.

O processo inflamatório agudo é clinicamente reconhecido por 5 sinais cardinais: calor, rubor, edema, dor e perda de função, sendo os quatro primeiros já descritos no século I por Cornelius Celsus e a perda de função incluída em 1858 por Rudolf Virchow⁵. Esses sinais são resultantes de alterações que ocorrem a nível tecidual no local do estímulo, como: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular com extravasamento local de exsudato para o tecido, infiltração de leucócitos, principalmente polimorfonucleares e, subsequentemente, monócitos inflamatórios para o tecido que vão produzir mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, que irão atuar na remoção do agente nocivo⁶.

De forma geral, a resposta inflamatória aguda se inicia quando células residentes reconhecem diferentes tipos de sinais, produzindo uma gama enorme e variada de mediadores que participam ativamente de alterações vasculares e recrutamento de

leucócitos circulantes para o tecido. Estes estímulos podem ser provenientes de moléculas derivadas de patógenos invasores (Padrões moleculares associados ao patógeno – PAMP) ou moléculas derivadas de um dano celular (Padrões moleculares associado ao dano – DAMP), as quais são liberadas no meio extracelular, resultantes de agentes tóxicos de um determinado patógeno ou provocado pelo por outros estímulos, como irradiação e isquemia⁷. A presença de PAMPs e DAMPs num determinado tecido levam à ativação de variados tipos de receptores, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), incluindo os receptores semelhantes ao Toll (TLRs), nas células residentes no tecido⁷⁻⁹. A ativação desses receptores induz cascatas de sinalização que resultam na secreção de mediadores inflamatórios, entre eles quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, como TNF, interleucina-6 (IL-6) e IL-1 β , radicais livres, aminas vasoativas e eicosanóides (como prostaglandinas) que induzem a resposta inflamatória e amplificação da resposta imune⁸.

As células endoteliais vasculares adjacentes ao tecido afetado reconhecem precocemente esses mediadores inflamatórios e passam por profundas modificações estruturais, como vasodilatação, processo diretamente associado com o aumento do fluxo sanguíneo local, e aumento da permeabilidade vascular, processo associado com o extravasamento local de exsudato para o tecido, promovendo os sinais e sintomas característicos da fase inicial da resposta inflamatória^{10,11}. Além disso, essas células endoteliais também aumentam sua produção de mediadores, como moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, etapas fundamentais para que haja o recrutamento de leucócitos da circulação para o tecido inflamado^{1,12}.

Os neutrófilos são o tipo de leucócito mais abundante no sangue humano e desempenham um papel proeminente na imunidade, especialmente no sistema imune inato, sendo os primeiros a chegar no tecido após os estímulos iniciais¹³⁻¹⁵. Os neutrófilos contêm, pelo menos, quatro tipos diferentes de grânulos: grânulos primários, também conhecidos como grânulos azurófilos; grânulos secundários, também conhecidos como grânulos específicos; grânulos terciários ou gelatinases; e vesículas secretoras. Esses grânulos e vesículas secretoras dos neutrófilos armazenam proteínas específicas relevantes para suas funções¹⁶. Os grânulos primários são constituídos, principalmente, de proteinases e peptídeos antimicrobianos como defensinas, mieloperoxidase (MPO, responsável pela conversão do peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso (HOCl)), elastase e

catepsina G)¹⁷. Grânulos secundários têm, em sua constituição, principalmente fosfatase alcalina, lactoferrina, lisozima, o complexo enzimático da NADPH oxidase e colagenase. A lactoferrina sequestra ferro livre, inibindo o crescimento bacteriano e aumentando a permeabilidade à lisozima, levando a ruptura da parede celular bacteriana¹⁸. Já os grânulos terciários são compostos principalmente de catepsina e gelatinase, enzimas capazes de degradar colágeno, fibronectina e proteoglicano, componentes da matriz extracelular, o que facilita o processo de migração dos neutrófilos do vaso ao sítio inflamatório^{19,20}. As vesículas secretórias são constituídas de receptores de membrana e outras proteínas funcionais, tais como receptores para lipopolissacarídeos (CD14), receptores de complemento, receptores para IgG (FcγR), integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18)^{20,21}.

O extravasamento de neutrófilos para o tecido é dependente do contato desses leucócitos com células endoteliais nos capilares sanguíneos adjacentes, fazendo com que ocorra o rolamento celular ao longo da parede do vaso^{12,22}. Esse processo é mediado pelas P- e E-selectinas expressas nas células endoteliais que interagem com ligantes presentes nos leucócitos (L-selectina), fazendo com que essas células trafeguem em menor velocidade e rolem sobre o endotélio²³. O rolamento dos neutrófilos propicia a interação com quimiocinas presentes na camada superficial do endotélio através da ligação aos seus receptores nos neutrófilos, especialmente os ligantes do receptor CXCR2 (quimiocinas que compartilham um motivo ELR – ácido glutâmico-leucina-arginina), importantes no contexto da migração desses leucócitos²⁴. A sinalização desencadeada por essa ligação aos receptores acoplados à proteína G resulta na ativação de integrinas²⁵. As integrinas ativadas entram em contato com seus ligantes expressos no endotélio, o que ocasiona a interrupção da rolagem desses leucócitos, propiciando uma interação de alta afinidade entre neutrófilo e endotélio, resultando na adesão firme e estável entre esses dois tipos celulares^{12,22,26}. A partir desse ponto, os neutrófilos têm mais possibilidades de extravasarem para os tecidos pelo processo de transmigração através da barreira celular endotelial^{12,27}. Em muitos eventos inflamatórios, os neutrófilos geralmente exibem um comportamento de enxame, onde ocorre a quimiotaxia amplificada de neutrófilos de regiões intersticiais mais distantes, levando ao agrupamento de neutrófilos no tecido inflamado^{28,29}.

Os neutrófilos circulantes são quiescentes e sua ativação é um processo de várias etapas que pode começar pelo contato com células epiteliais durante as fases da migração sendo que se tornam completamente ativados pelo contato direto com

patógenos ou pela ação de citocinas inflamatórias secretadas pelas células residentes no tecido^{30,31}. Após a ativação, os neutrófilos usam diferentes mecanismos para a eliminação do estímulo inflamatório que incluem: fagocitose, degranulação e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs)³².

A fagocitose dos agentes nocivos pelos neutrófilos é causada pela ligação de seus receptores para opsoninas, como o fragmento C3b do sistema de complemento e de região Fc de anticorpos, que aprisionam o agente nocivo dentro de um vacúolo, o fagossomo³³. A fagocitose é seguida pela digestão através da união ao fagossomo de grânulos citoplasmáticos contendo enzimas proteolíticas e proteínas antimicrobianas. Simultaneamente, espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas pelo complexo NADPH oxidase na membrana do fagossomo e liberadas em seu lúmen³⁴.

Outro mecanismo utilizado pelo neutrófilo no ataque ao agente nocivo é a degranulação, quando esses grânulos contendo proteinases e peptídeos antimicrobianos se fundem com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo para o meio extracelular^{30,35}. Em contato com os patógenos, o conteúdo liberado pode destruir sua parede celular e contribuir para sua eliminação³⁰. A mobilização de grânulos terciários e secundários durante a transmigração pode facilitar a degradação do colágeno na membrana basal e, portanto, a remoção de uma barreira física à saída de neutrófilos³⁰. Os neutrófilos podem também secretar NETs, estruturas compostas por proteínas de grânulos azurofílicos (elastase de neutrófilos, catepsina G e mieloperoxidase), grânulos específicos e grânulos terciários de neutrófilos, além de DNA³⁶. As NETs degradam fatores de virulência e matam bactérias no ambiente extracelular. Além disso, atuam como barreiras que impedem a propagação de bactérias^{36,37}.

Os neutrófilos recrutados ainda contribuem para o influxo de monócitos nos locais de inflamação através da secreção de quimiocinas (como CCL2, CCL3, CCL19, CCL20) e proteínas granulares (como S100A e vários peptídeos antimicrobianos), fazendo com que a chegada de neutrófilos no sítio inflamatório seja seguido pela chegada de monócitos³⁰. As proteínas dos grânulos primários de neutrófilos também aumentam a atividade antimicrobiana dos macrófagos, aumentando sua capacidade de fagocitar patógeno e secretar citocinas³⁴. Os macrófagos que chegam ao sítio inflamatório também utilizam mecanismos para a eliminação do agente nocivo, como

fagocitose e produção de citocinas pro-inflamatórias (como TNF, IL-1 β , IL-12 e IL-23) que vão impulsionar o processo inflamatório³⁸.

Os mecanismos que os neutrófilos utilizam para eliminar estímulos inflamatórios também podem causar danos nos tecidos³⁹. Os produtos da ativação dos neutrófilos, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases (elastase neutrofilica, metaloproteinases e catepsina G), promovem lesão tecidual pela clivagem de proteínas da matriz extracelular como elastina, fibronectina, laminina e colágeno IV^{13,40}. Além disso, o repertório de citocinas e quimiocinas produzido pelos neutrófilos no tecido inflamado contribuem para recrutar mais neutrófilos e outros leucócitos, para o tecido intensificando a inflamação⁴¹. Ainda, NETs atuam como DAMPs, promovendo respostas inflamatórias e podem causar danos ao tecido com a exposição de complexos de histonas para o meio extracelular, que podem participar do desenvolvimento de doenças autoimunes³⁶.

1.2. Visão geral do papel dos neutrófilos na artrite

Em artrites, a presença de neutrófilos no ambiente articular está diretamente ligada a inflamação. Os neutrófilos são as células mais abundantes no líquido sinovial e estão presentes também na interface pannus/cartilagem em pacientes com artrite reumatóide^{42,43}. A chegada desses leucócitos no tecido sinovial envolve mediadores quimioatraentes, como CXCL1, endotelina (ET)-1 e leucotrieno B₄, liberados principalmente por macrófagos residentes^{44,45}. De fato, estudos preliminares não publicados mostram que a viabilidade de neutrófilos na cavidade articular é diferente daquela encontrada nos tecidos/sinóvia. Em modelos de AIA aguda e prolongada, neutrófilos foram encontrados em grandes quantidades no tecido sinovial em tempos que já haviam diminuído significativamente no lavado recuperado da cavidade articular, indicando uma diferença na viabilidade dessas células dependente de localização na articulação.

Os neutrófilos de pacientes com artrite reumatoide podem modular outras células imunes. Estudos mostraram que neutrófilos coletados da cavidade sinovial contêm altos níveis de expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e estimulam a proliferação de células T *in vitro*⁴⁶. Em relação aos linfócitos B, neutrófilos do sangue periférico estimulados pelo líquido sinovial de pacientes com artrite podem liberar o estimulador de linfócitos B (também conhecido

como BlyS ou BAFF), de forma dependente de TNF- α , que regula vários aspectos da fisiologia das células B, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação⁴⁷. Além disso, a interação dos neutrófilos com outras células induz a secreção de um repertório de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-12, IL-18, IL-23 e TNF) e quimiocinas (CCL2, CCL4, CCL5 e CXCL8), que amplificam a resposta inflamatória^{48,49}.

A degranulação e liberação de ROS, tanto no fluido sinovial como diretamente na superfície da articulação mediam os danos ao tecido. A deposição de complexos imunes na superfície da articulação resulta na formação incompleta de um fagossomo (denominado fagocitose frustrada) e fornece um microambiente no qual o neutrófilo libera altas concentrações de oxidantes e agentes citotóxicos diretamente na superfície da cartilagem articular⁴⁹. As proteínas presentes nos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos estão presentes em altas concentrações no líquido sinovial na artrite reumatoide e podem promover danos na cartilagem e tecido sinovial enquanto inibem a proliferação de condrócitos e promovem a proliferação e invasão de sinoviócitos⁵⁰⁻⁵⁶. Ainda, os neutrófilos expressam RANKL, podendo ativar a reabsorção óssea por meio de interações neutrófilo-osteoclasto⁵⁷.

Nas artrites bacterianas, os neutrófilos desempenham um papel duplo, inicialmente são fundamentais no combate dos patógenos atuando como primeira linha de defesa do organismo nos estágios iniciais na doença⁵⁸. Assim como descrito anteriormente, os neutrófilos podem fagocitar os patógenos, secretar o conteúdo de seus grânulos, produzir ROS e peptídeos antimicrobianos e ainda liberar NETs⁵⁹. Na eliminação do patógeno, NETs podem contribuir tanto na eliminação direta, como também evitando a disseminação, aprisionando o microrganismo e aumentando a concentração local de agentes microbicidas⁶⁰. Por outro lado, assim como nas artrites estéreis, a liberação de ROS, NETs e de proteínas granulares por neutrófilos na articulação, podem levar ao dano tecidual⁵⁸.

De forma interessante, na gota, NETs foram descritas não só promovendo a inflamação e dano tecidual, onde as estruturas liberadas no meio celular funcionam como DAMPs, mas também como moduladoras da inflamação⁶¹. A liberação de NETs induzidas por cristais de urato monossódico, formam agregados densos que degradam citocinas e quimiocinas inflamatórias reduzindo o recrutamento de neutrófilos e a inflamação⁶². Portanto, os neutrófilos parecem exercer função dual também na inflamação gotosa, atuando na fase inicial como amplificador da

inflamação, mas reduzindo essa inflamação em tempos tardios, contribuindo para a resolução da inflamação⁶³.

De fato, o controle da inflamação e do dano articular na artrite está diretamente relacionado a redução do influxo de neutrófilos nas articulações. Experimentalmente, o tratamento com um peptídeo que interfere na interação entre quimiocinas e glicosaminoglicanos reduz o acúmulo de neutrófilos, os níveis das quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL6 e da citocina IL-6, melhora a inflamação articular e reduz os danos teciduais no modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)⁶⁴. O bloqueio de receptores de quimiocinas por inibidores alostéricos de CXCR1/CXCR2 diminuem o influxo de neutrófilos e a produção de TNF na AIA, ainda, melhora significativamente os parâmetros inflamatórios da artrite induzida por colágeno^{65,66}. Nos dois modelos, a diminuição do influxo de neutrófilos está diretamente relacionada a diminuição da nocicepção^{65,66}. Portanto, os neutrófilos estão diretamente relacionados a dor articular na artrite.

1.3. Controle da resposta inflamatória

De forma ampla, a resposta inflamatória, embora protetora, pode causar sérios prejuízos ao organismo se for persistente ou exacerbada, levando ao aparecimento de inflamações crônicas, dano tecidual permanente e desenvolvimento de doenças autoimunes⁴. Portanto, o controle da inflamação precisa ser muito bem regulado para obter o equilíbrio necessário para uma resposta eficiente, com controle eficaz da sua qualidade, intensidade e duração. Fatores anti-inflamatórios e pró-resolutivos são fundamentais para essa regulação fina frente aos estímulos pró-inflamatórios, atuando para o término da inflamação e reestabelecimento da homeostase tecidual⁶⁷.

O uso de medicamentos anti-inflamatórios é amplamente difundido para o tratamento dos mais variados tipos de doenças inflamatórias, abrangendo doenças agudas, crônicas, alérgicas, autoimunes, infecciosas⁶⁸. Os exemplos de fármacos anti-inflamatórios são muito diversificados. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINES), por exemplo, possuem como principal mecanismo de ação a inibição das isoenzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) com vários graus de especificidade para a isoforma COX-2, bloqueando a produção de prostanoídes (ex: prostaglandinas) através do bloqueio do metabolismo do ácido araquidônico^{68,69}. Por outro lado, os fármacos anti-inflamatórios esteroidais (AIES), também conhecidos como glicocorticoides, mimetizam as ações do hormônio cortisol e possuem, como

mecanismo de ação, o controle da síntese proteica ao se ligarem em seus receptores no citoplasma das células, seja inibindo a síntese de moléculas que causam inflamação, como a própria COX-2, ou induzindo a produção de moléculas pró-resolutivas, como a Anexina A1⁷⁰. Porém, os AIES possuem conhecida ação imunossupressora, diferente dos AINES^{71,72}.

Enquanto a anti-inflamação controla a inflamação através da inibição das ações de moléculas pró-inflamatórias, a resolução da resposta inflamatória é um processo ativo, muito bem coordenado e que tem início ainda nas fases iniciais da inflamação com a biossíntese de mediadores que atuam em diferentes frentes no tecido inflamado^{73,74}. A transição da inflamação aguda para a resolução da inflamação é dependente de uma série de acontecimentos: remoção do estímulo nocivo; mudança na produção de mediadores pró-inflamatórios para pro-resolutivos; limitação ou interrupção do extravasamento de neutrófilos para o tecido; indução da apoptose de neutrófilos presentes no tecido; recrutamento de monócitos não flogísticos; eliminação de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (eferocitose); reprogramação de macrófagos para fenótipos promotores de resolução (com maior capacidade de eferocitose e produção de mediadores anti-inflamatórios e pró-resolutivos); remoção do infiltrado celular através das circulações sanguíneas e linfáticas; reparo e regeneração tecidual^{75,76}.

A redução da quantidade de neutrófilos no sítio inflamatório é muito importante para o controle da resposta inflamatória, a qual é resultado do somatório de diferentes fatores, como a redução da produção de fatores quimioatraentes, drenagem linfática, transmigração reversa e redução da viabilidade dessas células. A apoptose dos neutrófilos é um ponto chave para a resolução da inflamação, com consequência direta na redução do número e atividade dessas células no sítio inflamatório⁷⁴. Morfologicamente, a apoptose ocorre com o arredondamento da célula, retração dos pseudópodes, redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação nuclear) e fragmentação de célula em corpos menores (corpos apoptóticos)^{77,78}.

A sinalização para a apoptose pode ser disparada por duas vias principais: intrínsecas e extrínsecas. A via intrínseca é iniciada quando membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (Bax e Bak) se oligomerizam e formam poros na membrana mitocondrial externa, alteram o potencial da membrana e permitem o efluxo de proteínas do espaço intermembranar, como o citocromo c, para o citosol⁷⁹. Ao ser

liberado da mitocôndria, o citocromo c pode iniciar a montagem do apoptossomo que ativa a caspase-9 e, por consequência, a caspase-3⁷⁹. Por outro lado, a via extrínseca envolve a ligação de ligantes de morte extracelular (como FasL ou TNF) a receptores de morte transmembrana, formando um complexo indutor de morte associado ao receptor, recrutando e ativando caspase-8 e caspase-3^{80,81}. Independente de qual das duas vias de apoptose é ativada, diferentes caspases, família de proteases de cisteína, participam do processo de morte celular⁷⁹. As caspase-8 e caspase-9 são as caspases iniciadoras das vias de apoptose extrínseca e intrínseca, respectivamente, que por sua vez medeiam a ativação da caspase-3 que leva a muitas das mudanças bioquímicas e biofísicas que ocorrem durante a apoptose⁷⁹.

Os neutrófilos apoptóticos mantêm a membrana celular íntegra enquanto os constituintes do núcleo e citoplasma são degradados. A integridade da membrana garante que possíveis danos às células vizinhas sejam minimizadas, pois evitam que o conteúdo intracelular da célula apoptótica atinja o meio extracelular, o que contribuiria para a ativação de células residentes e amplificação da resposta inflamatória⁷⁷. Embora íntegra, durante a apoptose, a membrana plasmática passa por algumas modificações que facilitam o engolfamento da célula apoptótica por fagócitos, evento conhecido como eferocitose. Por exemplo, o fosfolípido fosfatidilserina, encontrado com exclusividade na porção interna da membrana celular de neutrófilos viáveis, é exposto na superfície extracelular da membrana após a indução de apoptose⁸²⁻⁸⁴. Assim, a externalização da fosfatidilserina é considerada um marcador de células apoptóticas e o seu reconhecimento por receptores presentes em macrófagos são importantes para a eferocitose⁸⁰.

A eferocitose de neutrófilos apoptóticos é um dos passos importantes para a resolução da inflamação⁸⁵. Esse evento é muito bem regulado por diferentes fatores. Os próprios neutrófilos apoptóticos auxiliam nessa etapa liberando sinais quimiotáticos que induzem a atração de células mononucleares, conhecidos como sinais de “*find-me*”⁸⁶. Neutrófilos apoptóticos também emitem os sinais de “*eat-me*” que são reconhecidos pelos fagócitos, causando a eferocitose e degradação dos corpos apoptóticos dentro dos fagolisossomos (Figura 1)^{84,87}. De maneira oposta, as células saudáveis e viáveis emitem sinais “*don't eat me*” em suas membranas impedindo que a eferocitose aconteça. Dessa forma, os sinais “*eat-me*” e “*don't eat me*” são importantes reguladores da depuração das células mortas pelos fagócitos (Figura 1).

Assim, falhas nessa sinalização podem gerar uma remoção defeituosa nas células apoptóticas, resultando em inflamação crônicas⁸⁸.

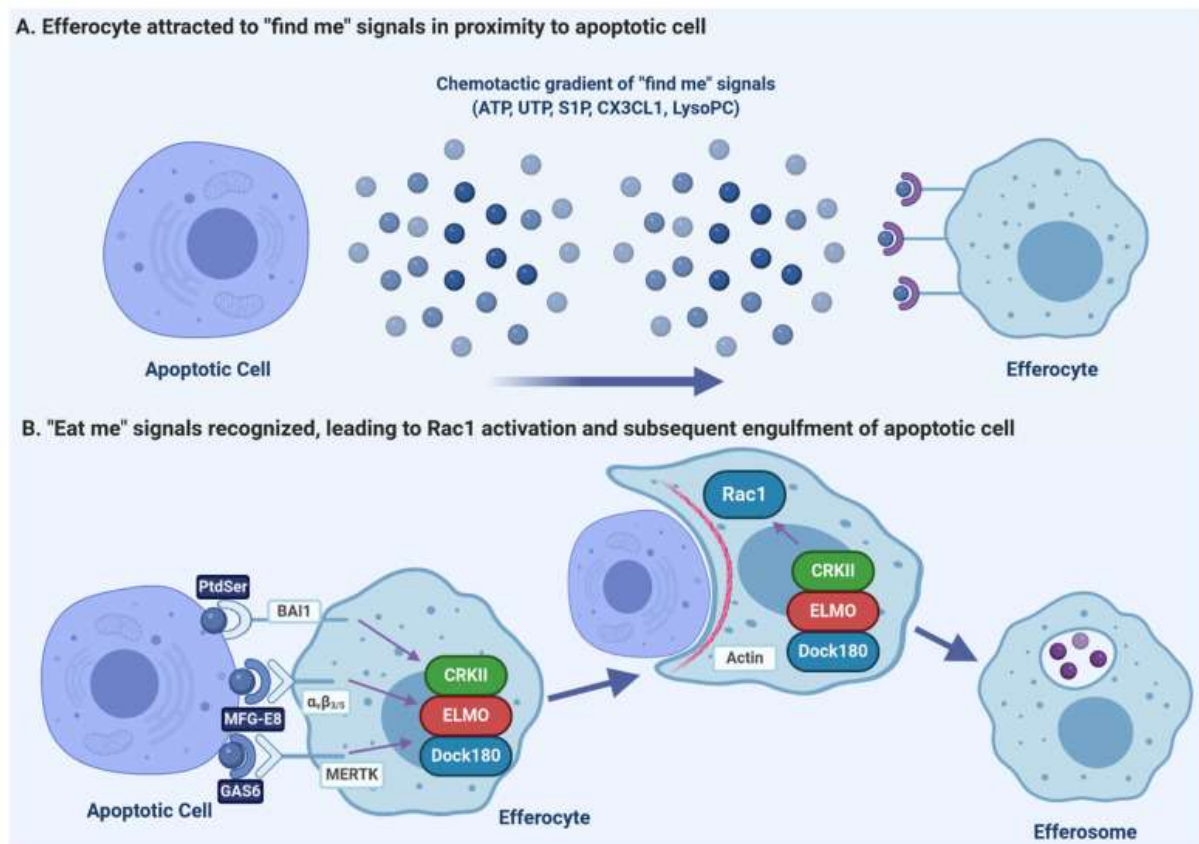


Figura 1: Os neutrófilos apoptóticos liberam sinais de "find-me" e "eat-me". (A) As células apoptóticas liberam múltiplos quimioatraentes que recrutam eferócitos. Estes incluem nucleotídeos-trifosfatos (ATP, UTP), lipídios (S1P, LysoPC) e quimiocinas (CX3CL1). (B) O engolfamento de células apoptóticas é impulsionado principalmente pelo reconhecimento de fosfatidilserina (PtdSer) na célula apoptótica, seja diretamente por receptores como BAI1, ou via opsoninas (MFG-E8 e Gas6) que fazem a ponte entre o PtdSer e os receptores eferocíticos como $\alpha_v \beta_3$ integrina ou MERTK. Esses receptores eferocíticos então ativam a cascata de sinalização do receptor fagocítico canônico, ativando um complexo de CRKII, ELMO e DOCK180 que então ativa a GTPase Rac1. Rac1 conduz a reorganização do citoesqueleto de actina do eferócito de tal forma que o eferócito engloba a célula apoptótica em um vacúolo derivado da membrana plasmática chamado de "efferossoma". Figura preparada com BioRender (biorender.com)²⁰².

A eferocitose pode contribuir para a resolução da inflamação de duas formas: a remoção de neutrófilos apoptóticos impede que eles sofram necrose secundária, o que liberaria moléculas intracelulares imunoestimulatórias com capacidade de manter e exacerbar a resposta inflamatória e aumentar o dano tecidual⁸⁹. Além disso, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos desencadeia uma mudança no

fenótipo dos macrófagos, desenvolvendo macrófagos com propriedades anti-inflamatórias e pró-resolutivas⁹⁰.

De maneira geral, macrófagos são células plásticas e moduláveis quanto às suas atividades quando entram em contato com diferentes estímulos durante as diferentes fases da resposta inflamatória. Os macrófagos ativados são geralmente classificados em fenótipos diferentes relacionados a diferentes estímulos: classicamente ativados (M1), alternativamente ativados (M2) e resolutivos (Mres)⁹¹. Presentes principalmente nas fases iniciais da resposta inflamatória, os macrófagos M1 são pró-inflamatórios e se diferenciam pelo reconhecimento de algumas citocinas, como o interferon-gama (IFN- γ), e de padrões moleculares endógenos (DAMPs) e exógenos (PAMPs). Essa população de macrófagos favorece a inflamação pela produção de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, ROS e óxido nítrico (NO) e é eficiente para a eliminação de microrganismos e células opsonizadas, embora possui baixa capacidade de eferocitose⁹². A alternância para o perfil M2 pode ser desencadeada pela própria eferocitose ou por mediadores presentes no ambiente inflamatório, como moléculas pró-resolutivas. Esses macrófagos (M2) são classificados como anti-inflamatórios, pois suprimem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-12, IL-1 β e IL-6) e de fatores quimiotáticos para neutrófilos, enquanto secretam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , e também mediadores pró-resolutivos. Ainda, são importantes para o recrutamento de monócitos, como através da produção da quimiocina CCL2, os quais se diferenciam em macrófagos com perfil M2 neste contexto, melhorando a eficiência do processo de eferocitose e colaborando para o estabelecimento de uma nova homeostase tecidual^{90,93,94}.

Em fases posteriores ao processo de remoção dos neutrófilos apoptóticos no sítio inflamatório, ocorre uma nova mudança de fenótipo dessas células, agora para um perfil de macrófagos promotores de resolução (Mres) que regula o reparo tecidual, impedindo a fibrose desregulada, uma vez que está envolvido no aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios, pró-resolutivos e anti-fibróticos⁹⁵. Posteriormente, os macrófagos Mres são drenados pelos vasos linfáticos para os gânglios linfáticos, promovendo propriedades reguladoras de macrófagos em locais remotos⁹⁵.

Ao longo da cinética da resposta inflamatória, que é algo muito variável em diferentes respostas inflamatórias, há mudança de classe dos mediadores

encontrados no sítio inflamatório. Como mencionado, moléculas pró-resolutivas participam ativamente na diferenciação de células (ex: macrófagos M1 para M2) e para o término da inflamação⁹⁶. Os mediadores pró-resolutivos podem ser de diferentes classes, como são lipídios (mediadores especializados pró-resolução e ácidos graxos de cadeia curta), peptídeos ou proteínas e moléculas gasosas, os quais coordenam a resolução da inflamação (No Quadro 1 estão listadas algumas moléculas com funções pró-resolutivas e seus receptores)⁹⁶.

Classe	Pro-resolutivo	Receptor
Proteínas/ peptídeos	Anexina A1 e Ac2-26	FPR2/ALX
	Angiotensina-(1-7)	Mas
Lipídeos	Lipoxinas A 4 e B 4	FPR2 e GPR32
	Resolvina D1	FPR2 e GPR32
	Resolvina D2	GPR18
	Resolvina E1	BLT1 e CMKLR1
	Maresina 1	LGR6
Gasosos	CO	-
	H ₂ S	-

Quadro 1: Moléculas pró-resolutivas e seus receptores. (Adaptado de FULLERTON; GILROY, 2016).

O mecanismo de ação de moléculas pro-resolutivas envolve a ligação aos seus receptores seletivos, que desencadeia uma cascata de eventos que vão culminar na resolução da inflamação. Muitas dessas cascatas envolvem a ativação da adenosina 3,5'-monofosfato cíclica (cAMP)⁷⁵. A ligação de mediadores pró-resolutivos em receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) leva a liberação da subunidade G α s, que estimula a atividade da adenilato ciclase (enzima que catalisa a hidrólise de ATP em cAMP). O cAMP ativa, então, a proteína quinase A (PKA), a proteína de troca 1/2 ativada pelo cAMP (Epac1/2) e os canais iônicos controlados pelo cAMP. A ativação da PKA leva à fosforilação da proteína de ligação do elemento responsivo ao cAMP (CREB) que se transloca para o núcleo onde promove a transcrição de mediadores pró-resolutivos e citocinas anti-inflamatórias que vão levar à polarização de

macrófagos, apoptose de neutrófilos e eferocitose. A PKA também medeia a produção de CCL2, quimiocina que vai atuar no recrutamento não flogístico de macrófagos e contribuir para a polarização dessas células para fenótipos pró- resolutivos. Ainda, a PKA pode bloquear a expressão de moléculas pro-inflamatórias através da inibição da atividade transcricional do NF- κ B e também pela ativação de Epac1/2 que vai inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias^{96,97}. Sendo assim, o cAMP participa ativamente da resolução coordenando as principais etapas desse processo.

1.4. A relação entre o sistema nervoso e a inflamação

Atualmente, vários trabalhos mostram a estreita relação entre a resposta inflamatória e o sistema nervoso, interação associada com a extensão e a intensidade da inflamação, bem como com a regulação da produção de neurotransmissores e vias hormonais^{98,99}. Os neurônios, assim como as células do sistema imune, expressam PRRs, incluindo TLRs e receptores de citocinas, proporcionando a modulação simultânea de funções imunes e neuronais por PAMPs, citocinas e outras moléculas imunes destacando a integração entre os sistemas imune e nervoso na regulação da inflamação e na resposta a infecções¹⁰⁰⁻¹⁰³. Por outro lado, macrófagos, células dendríticas, células T e outras células imunes expressam receptores para neurotransmissores, incluindo receptores de acetilcolina e adrenérgicos, o que facilita a regulação neural das respostas imunes^{104,105}. Além disso, as células imunes são capazes de sintetizar e liberar neurotransmissores e neuromoduladores, como acetilcolina e dopamina, que desempenham papéis importantes na regulação local da imunidade e em circuitos neuroimunomoduladores mais complexos^{106,107}. O compartilhamento de receptores e neurotransmissores que integram os dois sistemas permite que haja uma comunicação onde o ambiente inflamatório consegue acionar o sistema neural levando a uma função moduladora no sistema imune¹⁰⁴.

Os neurônios sensoriais transmitem informações sobre alterações no ambiente para o sistema nervoso central (SNC). Os neurônios somatossensoriais inervam a pele, os músculos e as articulações, enquanto os neurônios sensoriais viscerais inervam virtualmente todos os órgãos internos. No tecido inflamado, o acúmulo de leucócitos, associado a secreção de citocinas e outros mediadores pro-inflamatórios, pode desencadear ou alterar a sinalização sensorial¹⁰⁸. Dentre os neurônios sensoriais, os nociceptores, transmitem as informações associadas à dor, uma das principais características da resposta inflamatória¹⁰⁴.

Os nociceptores são representados pelas fibras aferentes primárias do tipo C, A β e A δ . Os nociceptores de fibra C são neurônios não mielinizados, de condução lenta, geralmente são associados à sensibilidade à dor térmica e são sensíveis à capsaicina¹⁰⁴. Enquanto os neurônios nociceptores A β são neurônios de condução mais rápida, mielinizados, mediadores de estímulos mecânicos, resultando em nocicepção¹⁰⁸. O corpo celular dos nociceptores se aglomeram no gânglio da raiz dorsal, o DRG, de onde emitem um único axônio bidirecional. O prolongamento axonal central segue envolvido pela raiz dorsal até que o seu terminal alcance as lâminas 2 e 5 do corno dorsal da medula espinhal, quando ativará regiões mais centrais do sistema nervoso central¹⁰⁹. Por outro lado, o prolongamento axonal periférico diverge do DRG pelo nervo que o envolve até regiões periféricas, onde inervam os órgãos e tecidos, incluindo a membrana das articulações sinoviais¹⁰⁹. Tanto nos prolongamentos axonais periféricos quanto no corpo celular existem canais de sódio dependentes de voltagem, incluindo Na_v 1.7, Na_v 1.8 e Na_v 1.9, que desempenham um papel importante na despolarização e na geração de potenciais de ação iniciados por estímulos nocivos¹⁰⁴. Outra classe de moléculas proteicas importantes que mediam a dor térmica e mecânica é a família de canais iônicos de potencial receptor transitório (TRP). O TRPV1 é sensível à capsaicina e desempenha um papel crítico na indução de hipersensibilidade ao calor e a sensibilidade química e mecânica à dor¹⁰⁸.

O sistema imune desempenha um papel crítico na dor ao liberar mediadores moleculares que sensibilizam os nociceptores. Na periferia, os terminais axonais periféricos dos nociceptores estão localizados próximos a macrófagos, neutrófilos, mastócitos e outras células imunes e podem detectar a inflamação diretamente por meio da expressão de receptores para citocinas pró-inflamatórias, lipídios, fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização imune¹¹⁰. Especialmente os neutrófilos infiltrados contribuem para a nocicepção através da produção de citocinas, mas principalmente pela síntese de mediadores de ação direta, como aminas simpáticas, além de outros mecanismos como a produção de ROS¹¹¹⁻¹¹⁴. Em modelos de dor inflamatória, estratégias de depleção ou bloqueio do influxo de neutrófilos e inibidores de citocinas como IL-1 β e TNF α diminuem a nocicepção inflamatória^{115,116}. Em particular, IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-17A e IL-5 demonstraram atuar diretamente nos neurônios nociceptores, embora as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α também atuem por meio de cascatas de sinalização para induzir a síntese de

prostaglandina e noradrenalina ou potencializar a ativação dos canais dependentes de ligantes (como TRPV1 e TRPA1) ou modificação de canais de sódio dependentes de voltagem (como $Na_v 1.7$, $Na_v 1.8$ e $Na_v 1.9$), causando à rápida sensibilização dos neurônios nociceptores^{108,117}.

Finalmente, a ativação de nociceptores no tecido inflamado, regulam positivamente sua capacidade de resposta gerando potenciais de ação que desencadeiam que desencadeiam o transporte de neurotransmissores como a substância P e o CGRP para a medula espinhal, através do corno dorsal¹¹². Na medula espinhal, terminais axonais centrais desses neurônios fazem contatos sinápticos com interneurônios e neurônios de retransmissão transmitindo os sinais para o tronco cerebral e outras áreas do cérebro^{112,118}. Os neurotransmissores transmitem impulsos nociceptivos para a medula espinhal, mas também são transportados de volta para as articulações por meio do transporte antidrômico e liberados no nociceptor (Figura 2)^{110,118}.

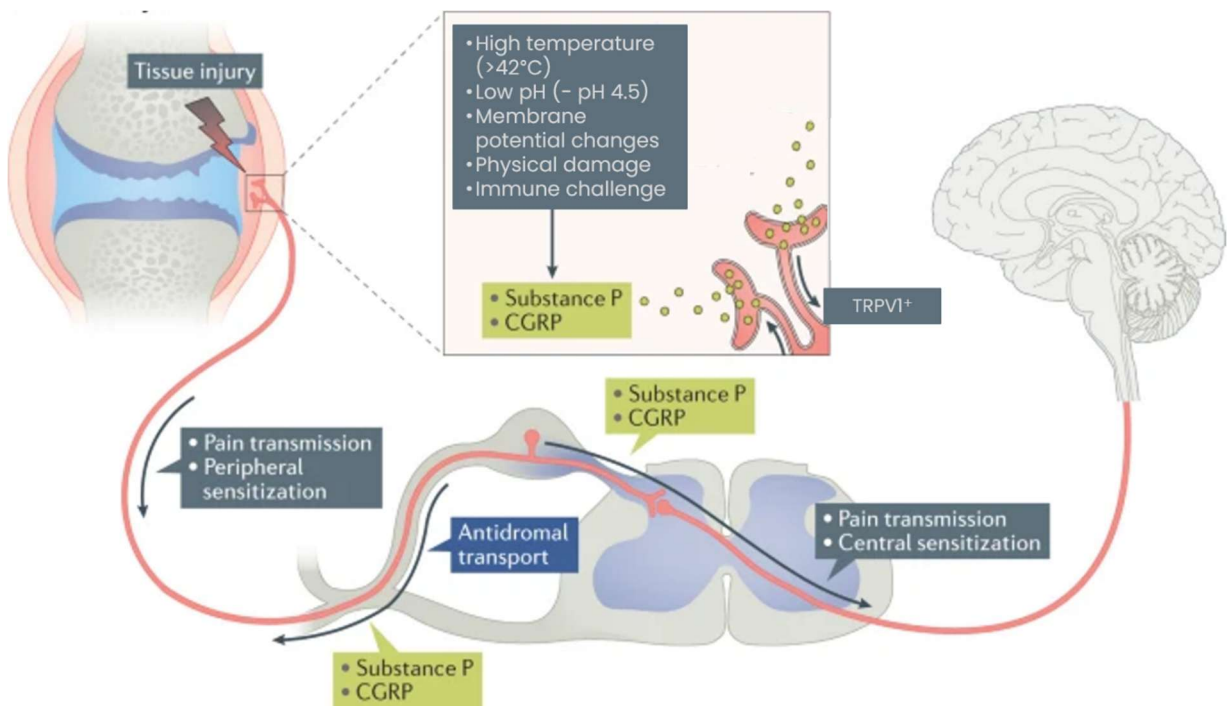


Figura 2: Sinalização nociceptiva na inflamação articular. Os neurotransmissores transmitem sinais de dor para a medula espinhal, mas também são transportados de volta para as articulações por meio do transporte antidrômico e liberados no nociceptor. Nas articulações, a substância P e o CGRP funcionam como fortes indutores de inflamação local. (Adaptado de Barton L. Wise, et al., 2020).

1.5. Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP)

O CGRP é um neuropeptídeo composto por 37 aminoácidos, pertencente a uma família de peptídeos incluindo calcitonina, adrenomedulina e amilina. Foi descoberto em 1982, quando foi detectado um processamento alternativo do RNA transcrito do gene da calcitonina, codificando, então, o CGRP¹¹⁹. O CGRP existe em duas isoformas: α -CGRP e β -CGRP. O α -CGRP é liberado pelos sistemas nervoso central e periférico, enquanto o β -CGRP é produzido principalmente no sistema nervoso entérico. Porém, as atividades biológicas de ambos parecem ser amplamente similares¹²⁰.

A síntese de GGRP ocorre principalmente no DRG, onde o pró-peptídeo é então clivado na forma ativa e armazenado em vesículas nos terminais nervosos sensoriais do tipo C e A δ , onde está frequentemente colocalizado com um outro neuropeptídeo, a Substância P (SP)¹²¹. A excitação que leva à liberação é mediada por vias dependentes de cálcio após a despolarização do nociceptor¹²¹. De particular importância para os neurônios sensoriais são os canais TRPV1 (potencial receptor transitório vanilóide 1) e TRPA1 (anquirina potencial receptor transitório 1), que são altamente co-expressos em fibras CGRP-positivas^{122,123}.

Diferentes estudos mostram que o controle das ações do CGRP é eficaz para a redução da resposta nociceptiva^{124–126}. De maneira interessante, moléculas pró-resolutivas também podem controlar a produção de CGRP, como demonstrado num modelo de artrite induzida por cristais de ácido úrico, no qual animais tratados com a molécula resolvina D1 apresentaram redução da nocicepção mecânica articular por reduzir a expressão de CGRP no DRG desses camudongos¹²⁷.

O CGRP atua através da sua ligação a um complexo de receptores, cuja a principal subunidade é um receptor tipo receptor de calcitonina (CLR) da família B de receptores acoplados a proteína G (Figura 3)¹²⁸. Entretanto, o CLR tem atividade apenas quando ligado a uma proteína transmembrana, a proteína modificadora da atividade do receptor (RAMP), que possui três isoformas diferentes: a RAMP1, RAMP2 e RAMP3¹²⁸. Destas, a principal isoforma que interage com o CLR em resposta ao acoplamento com o CGRP é a RAMP1, que auxilia o movimento de CLR para a membrana celular e fornece um sítio de ligação para ligantes através da interação com CLR¹²⁸. Portanto, enquanto o complexo CLR/RAMP1 é um receptor para CGRP, a heteromerização de CLR com qualquer um dos outros tipos de RAMP

(RAMP2 ou RAMP3) resulta na formação de receptores de adrenomedulina¹²⁸. Ainda, uma proteína de membrana periférica intracelular, a proteína componente do receptor CGRP (RCP), interage com o receptor CGRP, o CRLR ('receptor CGRP', combinação de CLR e RAMP1) e facilita a sinalização mediada por CGRP¹²⁹.

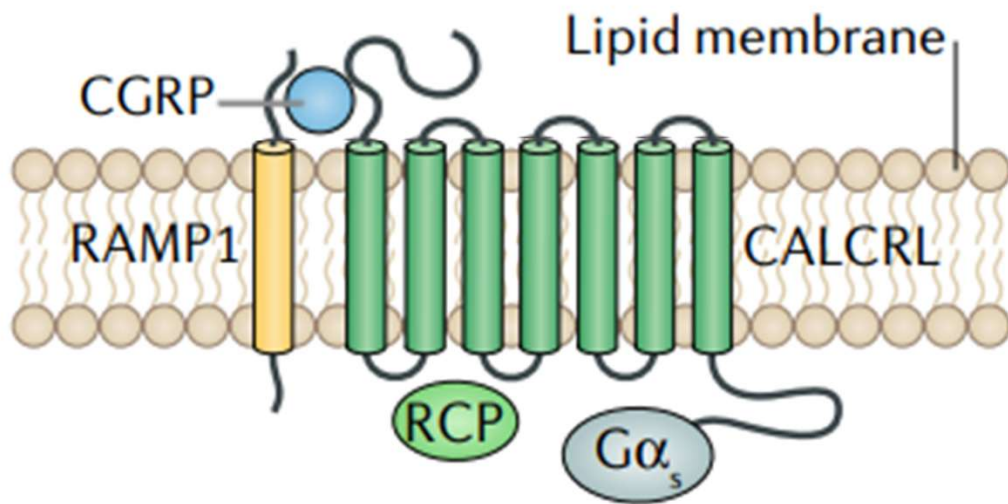


Figura 3: O complexo do receptor CGRP. O complexo do receptor CGRP consiste em duas proteínas integrais de membrana, o receptor semelhante ao receptor de calcitonina (CALCRL) e a proteína modificadora da atividade do receptor 1 (RAMP1) e duas proteínas citoplasmáticas, a proteína de acoplamento do receptor (RCP) e a subunidade α da proteína GS ($G\alpha_s$). (Adaptado de EDVINSSON *et al.*, 2018)¹³⁰.

De maneira interessante, um peptídeo CGRP truncado, o CGRP₈₋₃₇, tem ação antagonista no receptor de CGRP, o que auxiliou na investigação e elucidação das ações do CGRP¹³¹. Assim como o CGRP, o CGRP₈₋₃₇, apresenta afinidade por receptores relacionados¹³¹. Outros antagonistas foram posteriormente desenvolvidos visando como alvo CLR e RAMP1, sendo, portanto, mais seletivos ao receptor de CGRP do que aos receptores da adrenomedulina e amilina, membros integrantes da mesma família do CGRP¹³².

A sinalização de CRLR é iniciada pela ativação de proteínas G heterotriméricas associadas ao receptor. Na maioria dos sistemas, o receptor CGRP é acoplado a proteínas $G\alpha_s$, levando à ativação induzida por ligante de adenilato ciclase, à elevação dos níveis celulares de cAMP¹³³. O cAMP tem como efetor clássico a PKA (proteína quinase dependente de cAMP), cuja ativação se dá através da ligação do cAMP às subunidades regulatórias desta quinase, promovendo assim a liberação das

subunidades catalíticas, que agora, livres, podem promover a fosforilação de diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares, como CREB (proteína ligante do elemento responsivo ao cAMP)¹³⁴. Alternativamente, o receptor CGRP pode ativar a fosfolipase C- β 1 via proteínas G α q/11, causando mobilização de cálcio¹³⁵.

Além dos efeitos neuronais, como um importante contribuinte para as respostas nociceptivas, o CGRP possui um potente efeito vasodilatador, um evento muito importante em processos inflamatórios, pois aumenta o aporte sanguíneo nos tecidos, favorecendo a inflamação¹³⁶. Essa ação neurovascular também faz com o que o CGRP esteja diretamente relacionado com episódios de enxaqueca, pois, uma vez secretado pelo nervo trigêmeo, relaxa os vasos sanguíneos cerebrais, os quais ativam outros neurônios sensoriais^{137,138}. Por esta razão, a inibição da ação do CGRP é comumente utilizada para o controle das crises de enxaqueca. Os antagonistas não peptídicos mais reconhecidos, que apresentam eficácia no tratamento da enxaqueca, são o telcagepant e olcegepant^{139,140}. Mais recentemente, também estão sendo utilizados anticorpos monoclonais anti-CGRP para o tratamento da enxaqueca, com destaque para Eptinezumab, Fremanezumab e Galcanezumab e também o anticorpo monoclonal contra o receptor do CGRP, o Erenumab¹⁴¹.

Além de sua conhecida ação nos vasos sanguíneos, o CGRP também atua em leucócitos. Alguns trabalhos mostram que a atividade dos nociceptores periféricos, sobretudo a partir da liberação do CGRP pelas fibras C e A δ , interfere na atividade dessas células e, conseqüentemente, na resposta imunoinflamatória¹²¹. Em modelo de peritonite induzida por lipopolissacarídeo, o CGRP reduz o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, principalmente devido à redução da produção de CXCL1 através de sua ligação a seu receptor. Ainda, o CGRP reduz a produção da citocina TNF por macrófagos peritoneais enquanto aumenta a produção de IL-10, resultando, em conjunto, na menor letalidade em relação aos animais não tratados¹⁴². Essa capacidade em reduzir a atividade de leucócitos pode estar relacionada também com quadros de imunossupressão. Por exemplo, em um modelo de infecção pulmonar induzida por *Staphylococcus aureus*, a ativação de nociceptores que expressam o canal iônico TRPV1 libera CGRP no tecido inflamado, reduzindo a produção da citocina TNF e da quimiocina CXCL1, levando ao menor acúmulo de neutrófilos. Juntamente com a menor ativação de células T $\gamma\delta$, os animais ficam mais susceptíveis à infecção, ocasionando em aumento da taxa de letalidade pelo menor controle bacteriano por essas células¹⁴³. Em estudo similar, a injeção subcutânea de

Streptococcus pyogenes causa intensa dor local devido à ligação da molécula estreptolisina S nos nociceptores periféricos. Por sua vez, essas fibras aferentes secretam o CGRP no tecido infectado, reduzindo o recrutamento de neutrófilos, o controle bacteriano e o tempo de recuperação das lesões cutâneas¹⁴⁴. O silenciamento de nociceptores secretores de CGRP ou o tratamento dos animais com antagonistas dos receptores de CGRP revertem a imunossupressão provocadas por essas infecções^{143,144}. Essas informações evidenciam a importante relação neuro imune envolvendo os nociceptores, com papel evidente do CGPR liberado nos tecidos e sua influência no controle da atividade de leucócitos. Porém, não há trabalhos que associem funções do CGRP no contexto da resolução da inflamação neutrofílica.

2. JUSTIFICATIVA

As respostas inflamatórias precisam ser finamente reguladas para que sejam eficientes na eliminação do estímulo original e promoção do reparo tecidual, através do controle da sua intensidade, qualidade e duração. É necessário haver um equilíbrio da produção de agentes pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e pró-resolutivos, pois falhas no controle da inflamação podem torná-la persistente, podendo resultar em inflamação e dor crônicas, dano tecidual permanente e desenvolvimento de doenças autoimunes². A resolução da inflamação é uma etapa essencial para atingir esse equilíbrio e promover o retorno da homeostasia tecidual.

Em situações onde a inflamação está intimamente relacionada a dor, como nas artrites, a liberação de neurotransmissores originários de nociceptores podem contribuir modular a resposta inflamatória. Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a resolução da inflamação articular precede o fim da nocicepção articular, o que pode sugerir que a persistência da dor, caracterizada por atividade contínua de nociceptores, poderia liberar fatores, como o neurotransmissor CGRP, que atuam controlando a atividades dos leucócitos¹⁴⁵. A presença de agentes neuroestimulatórios leva ao processamento da dor periférica e central e alteração estrutural da articulação¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Considerando a relação íntima entre a inflamação e a dor nas artrites, é pertinente aprofundar nas investigações sobre o envolvimento de nociceptores e de seus neurotransmissores na atividade de leucócitos presentes no tecido articular inflamado. Ainda, a sinalização intracelular do CGRP compartilha importantes cascatas demonstradas por moléculas pró-resolutivas, como a ativação do cAMP^{96,133}. Assim, a hipótese deste trabalho é de que os nociceptores e, particularmente, o neurotransmissor CGRP possam ter papel relevante na resolução da resposta inflamatória neutrofílica ao reduzir a atividade e viabilidade de leucócitos teciduais e participar do reparo tecidual.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Investigar o papel de nociceptores e do neurotransmissor CGRP na atividade de neutrófilos e na resolução da resposta inflamatória articular.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a cinética da resposta inflamatória e dor articulares no modelo AIA.
- Determinar a produção de CGRP no tecido articular e DRG em diferentes momentos da resposta inflamatória articular.
- Avaliar se o CGRP controla a atividade e a viabilidade de neutrófilos em estudos *in vitro*.
- Avaliar se o bloqueio do CGRP por Fremanezumab interfere na inflamação articular.
- Avaliar se o silenciamento de nociceptores TRPV1⁺ interfere nas fases produtivas e resolutivas da inflamação articular.
- Avaliar se a analgesia induzida por Buprenorfina interfere nas fases produtivas e resolutivas da inflamação articular.

4. METODOLOGIA

4.1. Estudos *in vivo*

4.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6, tipo selvagem, machos, entre 4-10 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais. Todos os animais foram mantidos no ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia - UFMG. Comissão de ética no uso de animais (CEUA) sob o protocolo de pesquisa número 5/2023.

4.1.2. Modelo experimental de Artrite induzida por Antígeno (AIA)

O modelo de AIA é adequado por permitir avaliar a nocicepção articular simultaneamente a hiperplasia sinovial, significativo infiltrado de leucócitos, produção de citocinas pró-inflamatórias e dano articular^{115,149}. Os animais com 8 semanas foram anestesiados com solução de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) diluído em solução salina, administrados via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram imunizados por via intradérmica na base da cauda com 500 µg de albumina sérica bovina metilada (mBSA; Sigma) diluída em 100 µl de uma emulsão de solução salina e volume equivalente de adjuvante completo de Freund (CFA; Sigma). O desafio com antígeno foi realizado 14 dias após a imunização, sendo que cada animal recebeu uma injeção de mBSA (10µg mBSA em 10 µL solução salina estéril) na articulação fêmur-tibial traseira. Os animais do grupo controle receberam a injeção intra-articular com o veículo (solução salina). As análises foram realizadas entre 1 e 4 dias após o desafio intra-articular.

4.1.3. Depleção química de nociceptores

Animais com 4 semanas foram anestesiados com solução de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg) diluída em solução salina, administrados via intraperitoneal. Em seguida, os animais receberam uma injeção subcutânea no flanco de resiniferatoxina (RTX), um agonista de TRPV1, por 3 dias consecutivos (30 µg/kg no dia 1, 70 µg/kg no dia 2 e 100 µg/kg no dia 3) dissolvida em uma solução de DMSO (2 %) e Tween 80 (0,15 %) em PBS¹⁵⁰. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle (desafio com salina) sem RTX; controle RTX; AIA (desafio com mBSA) sem RTX; e AIA RTX.

4.1.4. Tratamentos

4.1.4.1. Fremanezumab

O tratamento com Fremanezumab foi realizado por injeção subcutânea de 100 µL (50 ng/animal) 6 horas antes do desafio intra-articular com mBSA (10 µg mBSA em 10 µL solução salina estéril). Os animais do grupo não tratado receberam apenas veículo (solução salina) ^{151,152}.

4.1.4.2. Buprenorfina

O tratamento com Buprenorfina foi realizado por injeção intraperitoneal de 100 µL contendo 2 mg/kg de Buprenorfina a cada 8 horas sendo o primeiro tratamento realizado duas horas antes do desafio intrarticular antes do desafio intra-articular com mBSA (10 µg mBSA em 10 µL solução salina estéril). Os animais do grupo não tratado receberam apenas veículo (solução salina) ¹⁵³.

4.1.5. Medida de Nocicepção

Para esta avaliação utilizou-se o teste de pressão crescente na pata, conhecido como método de von Frey eletrônico^{115,154}. Os animais foram distribuídos em caixas de acrílico acomodadas sobre uma estante cujo assoalho é composto por uma rede de malha que permite a utilização de um espelho acoplado 25 cm abaixo das caixas com inclinação de aproximadamente 35 graus possibilitando a visualização das patas dos animais. Para a leitura da pressão realizada, foi utilizado um analgesímetro digital Insight®, modelo EFF302, que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g), com precisão de 0,1g. Para o contato do transdutor de pressão com a pata dos animais, foi adaptada uma ponteira descartável de polipropileno com aproximadamente 4,5 mm de diâmetro. Antes da realização do teste, os animais foram acomodados nas caixas de acrílico para se ambientarem por 30 minutos e permitirem a medida correta da nocicepção. Estes foram, então, submetidos a uma pressão manual e crescente, realizada na região plantar da pata, de maneira a produzir uma resposta característica de retirada da pata estimulada.

4.1.6. Teste de dor por capsaicina

Para avaliar se o tratamento com RTX foi eficaz na depleção dos nociceptores, os animais receberam uma injeção 1,6 µg/20 µl de capsaicina no coxim plantar após 4 semanas. Em seguida, os animais permaneceram em observação por 5 minutos e foi registrado o tempo em que eles passaram lambendo a pata que receberam a

injeção de capsaicina. O resultado foi plotado considerando o tempo total em que os animais lamberam a pata durante 5 minutos.

4.1.7. Recuperação de células da cavidade articular

Para avaliar o acúmulo de leucócitos para a cavidade articular, foi realizado um lavado intra-articular após a eutanásia dos animais. A cavidade articular foi exposta após a ruptura do tendão patelar e com a utilização utilizando uma pinça para remover o tecido sobre o espaço sinovial. Em seguida, foi realizada uma lavagem da cavidade utilizando uma solução de albumina bovina (BSA) 3 % diluída em solução salina, lavando-a três vezes (3,3 μ L cada) para que uma amostra das células presentes no interior da cavidade fosse coletada juntamente com a solução de albumina recapturada com uma pipeta. Este lavado de células da articulação foi diluído em 90 μ L de albumina bovina 3 % para a posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

4.1.8. Contagem total dos leucócitos

Alíquotas do lavado articular foram diluídas em solução Turk (RenyLab), sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. O número total de leucócitos foi utilizado para o cálculo da percentagem dos diferentes leucócitos encontrados no lavado articular a partir da contagem/discriminação por visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação utilizando o microscópio óptico.

4.1.9. Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 90 μ L do lavado articular (citospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas utilizando o Kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) e examinadas sob microscópio óptico, objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x), utilizando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Foi feita uma análise da porcentagem de células polimorfonucleares e mononucleares de cada amostra e os resultados foram expressos como número de leucócitos $\times 10^4$ ou 10^5 /cavidade articular, baseando-se na contagem total de leucócitos.

4.2. Estudos *in vitro*

4.2.1. Isolamento de Neutrófilos Humanos

Foram retirados 10 mL do sangue periférico de 3 doadores saudáveis (CEP: 12743219.6.0000.5149). Os neutrófilos humanos do sangue total periférico foram isolados através de centrifugação por gradiente de densidade de acordo com as instruções do fabricante (*Histopaque 1077* e *Histopaque 1119* - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Resumidamente, 6 mL de sangue total foram cuidadosamente adicionados em tubos de 15 mL contendo gradiente duplo de separação formado pela adição sequencial de 3 mL de *Histopaque 1119* e 3 mL de *Histopaque 1077* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os tubos foram centrifugados a 1800 RPM com aceleração e desaceleração mínima por 30 minutos e em temperatura ambiente. A camada inferior de células polimorfonucleares foi coletada com o auxílio de pipeta Pasteur. As células foram lavadas e os eritrócitos remanescentes foram removidos por lise hipotônica e as células ressuspensas em PBS. Em seguida, uma alíquota de células foi diluída em Turk para contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico. A pureza foi determinada através de visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação (Citospin, Shandon Lipshaw Inc, Pittsburg, Pennsylvania, USA) e posteriormente coradas de acordo com o kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) e examinadas sob microscópio óptico (objetiva de 1000x em óleo de imersão) usando os critérios morfológicos padrões para diferenciar os tipos celulares. Apenas amostras com pureza e viabilidade acima de 90% foram consideradas nos ensaios.

4.2.2. Cultura de Neutrófilos Humanos

Os neutrófilos do sangue periférico humano foram isolados como descritos anteriormente. Em seguida, eles foram plaqueados em meio RPMI (Cultilab) em placas de 96 poços, sendo 1×10^5 células por poço e estimulados com CGRP (1, 3, e 10 μ M) na presença ou não de CXCL8 (10 ng/ml) ou lipopolissacarídeos (LPS) (1 μ g/ml) e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 6 horas de incubação, as células foram coletadas para montagem de lâminas por citocentrifugação (Citospin, Shandon Lipshaw Inc, Pittsburg, Pennsylvania, USA) e processadas para quantificação de proteína por Western Blot.

4.2.3. Análise da apoptose de leucócitos

A apoptose dos neutrófilos em cultura foi avaliada morfológicamente. As células foram citocentrifugadas, fixadas e coradas com Kit panótico rápido (LB Laborclin®) e contadas (300 células por lâmina) utilizando microscópio ótico para determinar a porcentagem de células com morfologia apoptótica. As células apoptóticas foram identificadas por alterações morfológicas características como, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos. O lisado celular dos neutrófilos foi utilizado para análise da expressão de caspase-3, conforme descrito adiante.

4.3. Ensaios biológicos

4.3.1. Processamento do tecido periarticular para dosagem de citocinas

O tecido periarticular foi coletado das articulações após a recuperação de células, esse material foi pesado e processado com o homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) com solução de extração de citocinas (Sigma) na proporção de 1 mL por 100 mg de tecido. Após homogeneização e centrifugação (10.000RPM 15 minutos a 4 °C), o sobrenadante foi coletado e estocado a -20 °C para quantificação de citocinas.

4.3.2. Dosagem de Citocinas: Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A dosagem de citocinas foi feita pelo método de ELISA através do kit R&D system. Foi adicionado anticorpo de captura de interesse diluído em PBS a placa de 96 poços. Essa placa foi incubada a 4 °C por 12 a 18 horas. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 µL/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas (Bio-Tek Instruments, INC). Foi adicionado 100 µL/poço de tampão de bloqueio (PBS/BSA 1 %) e a placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 µL/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas. Foi adicionado 100 µL/poço dos padrões e amostras à placa. A placa foi incubada por 2 horas e mantida temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e os poços lavados 4 vezes (300 µL/mL) com o tampão de lavagem (PBS/Tween 0,5 %) utilizando um lavador de placas. Foram adicionados 100 µL/poço de anticorpo de detecção e a placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. O conteúdo foi retirado e a placa lavada 4 vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL/poço de estreptavidina – HRP 1:200 à placa que foi incubada por 30 minutos a

temperatura ambiente ao abrigo da luz. O conteúdo foi retirado e a placa lavada 4 vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados 100 µL/poço do substrato OPD (ophenylenediamine dihidrochloride - Sigma) com 0.006% peróxido de hidrogênio (Grupo Química) à placa que foi incubada por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Para parar a reação, foram adicionados 25 µL/poço de solução de H₂SO₄ 1 M. A leitura foi realizada em leitor de ELISA em densidade ótica de 490 nm com o espectrofotômetro SpectraMax Plus Microplate Reader (Molecular Devices), e os resultados expressos com base na concentração da curva padrão.

4.3.3. Quantificação de anticorpos anti-mBSA

Os níveis totais de IgG do soro de camundongos imunizados foram quantificados por ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços foram incubadas durante a noite a 4 °C com 2 µg/ml de mBSA. As placas foram lavadas com PBS/0,05% Tween, utilizando um lavador de placas (Bio-Tek Instruments, INC), em seguida foi realizado o bloqueio com leite em pó 5%, por 1 hora em temperatura ambiente, a placa foi então lavada. O soro obtido dos animais foi diluído de maneira seriada (1:2–1:100) e incubados por 1 hora a 37 °C. Em seguida a placa foi lavada e incubada por 1 hora a 37 °C com 100 µl de IgG de cabra anti-camundongo biotinizada (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, EUA). Após a lavagem, 100 µl/poço de estreptavidina-HRP foram adicionados e incubados em temperatura ambiente por 20 min. Os poços foram lavados e foram adicionados 100 µl/poço de tampão de substrato (dicloridrato de ofenilenodiamina; Sigma, St. Louis, MO, EUA) e a placa foi incubada por mais 20 min em temperatura ambiente. A reação enzimática foi interrompida por 1 M H₂SO₄ e a absorbância foi medida a 492 nm. Resultados foram expressos como densidade ótica (OD).

4.3.4. Western Blot

A técnica de Western blot foi aplicada para o *pellet* do cultivo de neutrófilos humanos. O *pellet* foi homogeneizado com 100 µL de solução de lise (Triton X100 1,0%, Tris/HCl 100 mM, Glicerol 20% e EDTA 0,2 mM) por poço para retirar as células da placa. Para utilizar a mesma quantidade de proteína por amostra, procedeu-se à quantificação por ensaio de Bradford (Bio-Rad®). Amostras com 30 µg de proteína contendo o *loading buffer* (Tris-HCl 0,5 mM, Glicerol 10 %, SDS 2 %, βmercaptoetanol 5% e bromofenol 1 %) foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de 10 % poliacrilamida-SDS e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose.

As membranas foram incubadas com anticorpo primário específico overnight (anti-caspase 3, Santa Cruz®) e então incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado à enzima HRP (anticorpo antimouse, Santa Cruz®). As bandas imunorreativas foram visualizadas por revelação com ECL, segundo as instruções do fabricante (GE Healthcare®). Como controle, as bandas de β actina (Sigma®) foram utilizadas.

4.3.5. Análise histológica

As articulações tíbio femorais dos animais foram coletadas após eutanásia e acondicionadas em cassetes para histologia, onde permaneceram por 48 horas em solução de formol tamponado 10 %. Em seguida, os cassetes foram transferidos para solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) a 14% para descalcificação óssea por 30 dias. Neste período foi feita a troca da solução de EDTA a cada 48 horas. O processamento da amostra foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da UFMG onde os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação em etanol com diferentes concentrações (80 %, 90 %, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada) e diafinização em xilol (1 e 2 – 20 a 30 minutos cada). As amostras incluídas em parafina foram cortadas em micrótomo (5 μ m de espessura) e fixadas em lâminas histológicas. Em seguida, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio óptico com aumento de 40 e 400 vezes para avaliação dos parâmetros inflamatórios através de um score articular. Para refletir melhor o grau de inflamação e as alterações histopatológicas observadas no tecido o score utilizou os seguintes critérios: intensidade de infiltrado inflamatório ((0) ausente, (1) infiltrado mínimo, (2) infiltrado leve, (3) infiltrado moderado (4) infiltrado intenso, (5) infiltrado muito intenso); hiperplasia da membrana sinovial ((0) sem alterações, (1) hiperplasia mínima, (2) hiperplasia leve, (3) hiperplasia moderada, (4) hiperplasia extensa, (5) hiperplasia generalizada/perda); reabsorção óssea ((0) sem alterações (1), escassas lacunas de reabsorção, (2) área significativa de perda óssea/cartilagem. Esses critérios somados são representados em um score total que podem totalizar até 12 pontos (0 a 1: ausente, 2 a 4: leve, 5 a 7 moderado, 8 a 10: intenso, 11 a 12: severo). Este escore foi realizado por um patologista especializado e de forma cega.

4.3.6. Análise de imunohistoquímica

Após a realização do processamento histológico descrito no tópico anterior, amostras de articulação tíbio femoral foram cortadas em espessura de 5 µm e fixadas em lâmina polarizadas. Em seguida, foram processadas em soluções de xilol e etanol para desparafinização e hidratação (respectivamente) dos tecidos. Os cortes foram colocados em soluções de tampão citrato 0,1mol/L em banho maria a 96°C por 20 minutos. Após esse período as lâminas foram lavadas 5 vezes em PBS1x e incubadas por 2 vezes, por 15 minutos, em solução de H₂O₂ 10% para bloqueio da peroxidase endógena. Outro bloqueio para ligações inespecíficas foi realizado, usando Protein Block (ABCAM, Boston, USA), durante 5 minutos. Os cortes foram cobertos com anticorpo primário (Anti-CGRP, C8198, Sigma). foram incubadas *overnight* a 4°C, em câmara úmida. Depois, as lâminas foram lavadas com TBS 1x e os cortes ficaram cobertos durante 30 minutos com anticorpo secundário. Seguido de outra lavagem com PBS 1X e uma incubação de 30 minutos em estreptavidina-biotina-peroxidase. Após uma nova lavagem com TBS 1X, foi feita a revelação, usando uma solução de 3,3 – Diaminobenzidine (DAKO, Glostrup, Dinamarca), uma lavagem em água corrente e a contra-coloração, em hematoxilina de Harris (NewPro, Paraná, Brasil). Por fim, as lâminas foram desidratadas em banhos com concentrações decrescentes de etanol, diafanizadas em banhos de xilol e montadas com Entelan® (Pró - análise, Porto Alegre, Brasil). As células com coloração marrom foram contadas no tecido sinovial da articulação tíbio femoral. A contagem foi expressa como número de células positivas por área de análise.

4.3.7. Análise de imunofluorescência

Após perfusão intracardíaca, os DRGs (L5) foram coletados e mantidos em solução de paraformaldeído (PFA) 4 % por 24 horas e, em seguida transferidos para uma solução contendo 30 % de sacarose durante 48 horas. Em seguida, os tecidos foram incluídos em meio para congelamento Tissue- Tek® O.C.T.TM (Sakura Finetek), rapidamente congelados em gelo seco e estocados a -80 °C. Os cortes (secções com 30 µm de espessura) foram realizados no criostato (Leica CM1850, Alemanha) e colocadas em lâminas polarizadas. As secções contidas nessas lâminas foram bloqueadas durante 1 hora (1% de BSA e 0,1% Triton-X) e em seguida incubadas com os anticorpos anti-CGRP (C8198, Sigma). Depois, elas foram incubadas com o anticorpo secundário (IgG mouse anti-rabbit, 4414S, Cell Signalling) durante 2 horas em temperatura ambiente e, finalmente, as lâminas foram montadas

utilizando o meio FluormountTM (Southern Biotech, Birmingham, EUA). Posteriormente, as amostras aderidas na lâmina foram visualizadas e fotografadas em microscópio confocal (SP5, Leica, Wetzlar, Alemanha).

4.3.8. Citometria de fluxo

Animais com AIA pré-tratados com RTX foram eutanasiados 2 e 3 dias após o desafio e o tecido sinovial da articulação tibiofemoral de foi coletado e incubado em 100 µL de 10 mg/ L de colagenase VIII (Sigma-Aldrich) em meio DMEM por 1 hora a 37 °C em agitação constante, para digestão enzimática do tecido. As células foram, então, isoladas com auxílio de um filtro Cell Strainer 70 µm, em seguida foram centrifugadas (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C) e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspenso em 100 µL de BSA 1 % em Phosphate-Buffered Saline (PBS), sendo 10 µL dessa suspensão diluído em solução Turk (RenyLab) para contagem do número de células totais por amostra em câmara de Neubauer e os 90 mL restante transferido para placa de 96 poços de fundo em V. Para a preparação das células para marcação, inicialmente as células na placa foram centrifugadas (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C), o sobrenadante descartado e, então, foi bloqueada com Fc-block 10 µL/poço por 30 min ao abrigo da luz e temperatura a 4 °C. Em sequência, a placa foi lavada com 200 µL de BSA 1 % em PBS por poço, centrifugada (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C), o sobrenadante descartado e adicionado mix de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para marcação de subpopulações celulares (10 µL/poço), conforme descrito: anti- CD45 em Percpcy5.5; anti-F4/80 em Pcy7; anti-CD11b em APC; anti-CX3CR1 em Alexa 488; anti- CD206 em APC. Todos os anticorpos usados foram adquiridos da BD Biosciences e preparados seguindo recomendações do fabricante. Adicionado mix, a placa foi incubada por 30 min ao abrigo da luz e temperatura a 4 °C, lavada com 200 µL de BSA 1 % em PBS por poço, centrifugada (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C), o sobrenadante foi descartado e as amostras fixadas por 30 min com 100 µL / poço de formaldeído 4 % em PBS 1X. Por fim, a placa foi novamente centrifugada (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C), o sobrenadante descartado e foi adicionado 200 µL/poço de BSA 1 % em PBS para ressusensão das células e, então, passagem dessas amostras para tubos de fundo redondo específicos para citômetro. A leitura foi realizada em um citômetro de fluxo (FACScanto II, BD Biosciences, USA) no dia seguinte à marcação e os dados adquiridos foram avaliados no programa FlowJo v10.7.1 (Tree Star Company).

4.4. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com o software Prisma, versão 8.0.2. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A análise da diferença entre dois grupos foi realizada pelo teste t-student. A análise da diferença entre dois ou mais grupos quando as amostras obedeciam a distribuição normal foi realizado ANOVA seguida do pós-teste Tukey. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Cinética da resposta inflamatória articular

Inicialmente foi avaliada a cinética da resposta inflamatória articular após o desafio com o antígeno. Na análise histopatológica (Figura 4A), foi possível observar a presença de infiltrado celular significativo no ambiente articular em todos os tempos analisados (1 a 4 dias) quando comparados ao grupo controle (Figura 4B). Em relação ao tecido sinovial, uma hiperplasia leve a moderada foi observada 3 e 4 dias após o desafio (Figura 4C). Quanto ao dano articular, áreas de perda óssea e de cartilagem foram observadas a partir do segundo dia após o desafio (Figura 4D). Em conjunto, um escore total moderado foi no primeiro dia pós desafio, mas tornado mais intenso a partir do segundo até o quarto dia das análises dia (Figura 4E).

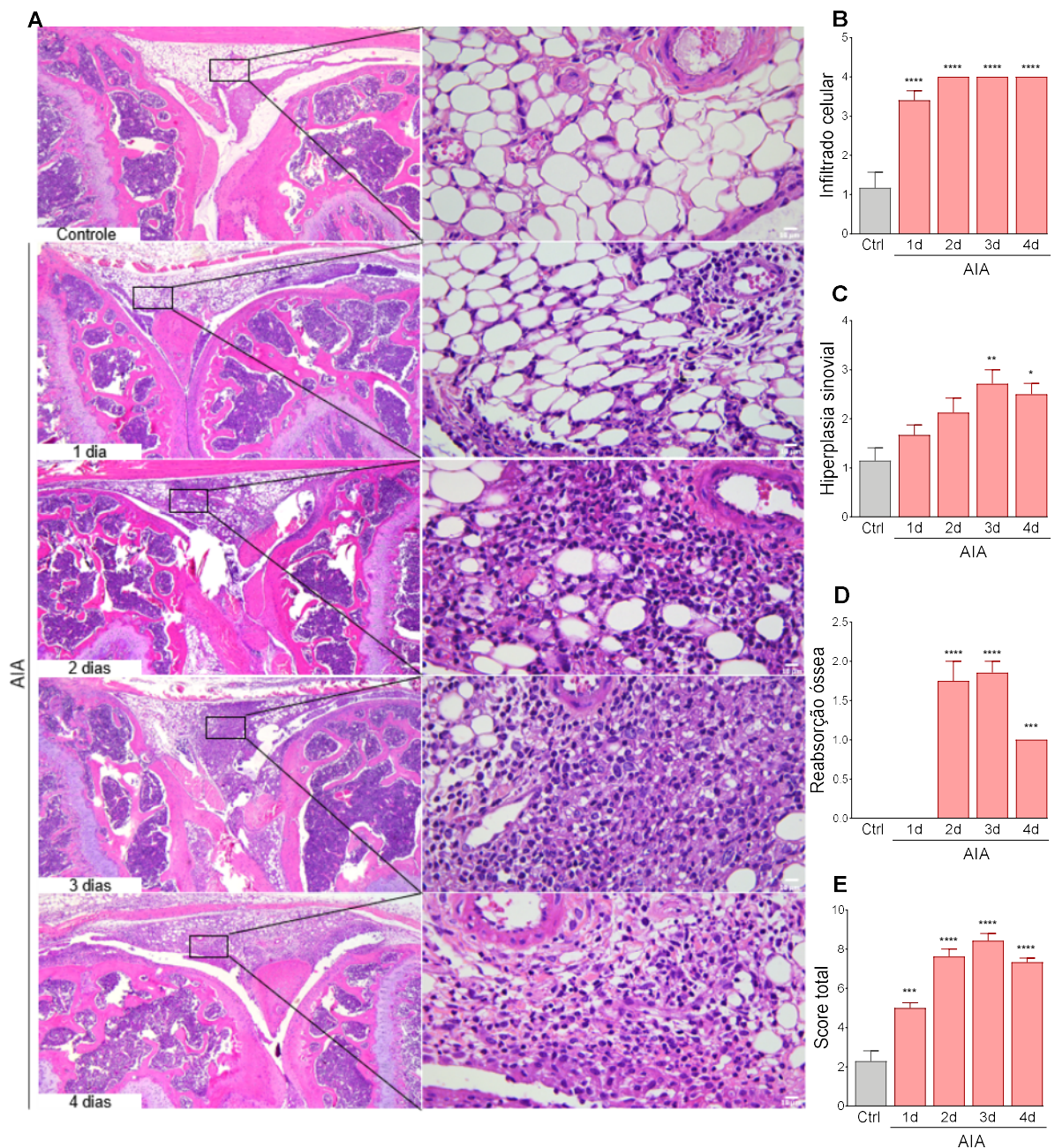


Figura 4: Perfil histológico da inflamação articular no modelo de AIA. Os animais previamente imunizados foram desafiados com injeção intra-articular de mBSA, 2,3 e 4 dias depois, os animais foram eutanasiados e para a coleta da região da articulação tíbio-femoral para análise histopatológica. Coloração em hematoxilina e eosina (A), *infiltrado* celular (B), *hiperplasia* sinovial (C), *reabsorção* óssea (D) e *score total* (E). As barras representam a média \pm desvio padrão de 7 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

A partir deste momento em diante, não consideramos o tempo de 1 dia após o desafio, pois o pico da resposta inflamatória foi atingido no segundo dia. Em seguida, foi analisado o perfil celular das células recuperadas da cavidade articular. O desafio intra-articular com mBSA levou a um acúmulo de células no lavado articular 2 dias após o desafio que diminuiu significativamente a partir do terceiro dia (Figura 5A). Através da contagem diferencial das células por análise morfológica, foi possível observar que no segundo dia havia um aumento significativo de neutrófilos em comparação com o grupo controle, o que reduziu a partir do terceiro dia após o desafio (Figura 5B). Em relação as células mononucleares, um aumento significativo foi observado 2 e 3 dias após o desafio (Figura 5C). Ainda, considerando a porcentagem desses 2 tipos de leucócitos analisados, os neutrófilos são mais abundantes no segundo dia e diminuem no terceiro dia, enquanto as células mononucleares aumentaram no terceiro dia (Figuras 5D e 5E).

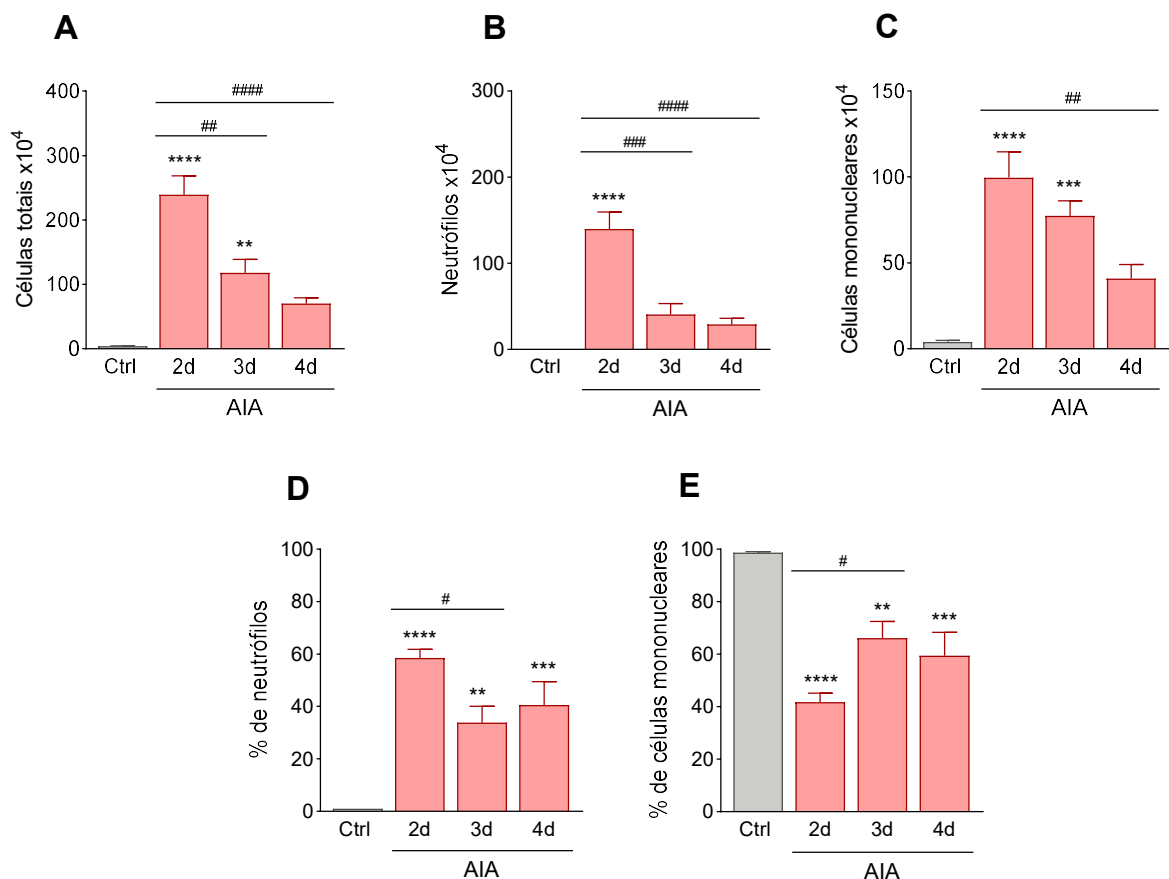


Figura 5: Perfil celular da cinética inflamatória articular no modelo de AIA. Os animais previamente imunizados foram desafiados com injeção intra-articular de mBSA, 2,3 e 4 dias depois, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos (B) células mononucleares (C), porcentagem de

neutrófilos (D) e de células mononucleares (E). As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado a média dos outros grupos com AIA (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Em modelos de respostas agudas neutrofílica e auto-resolutivas, como neste modelo de artrite induzida por antígeno, dois importantes parâmetros que caracterizam as fases de resolução da inflamação são a apoptose de neutrófilos e a eferocitose desses corpos celulares por células macrófagos, facilmente identificados através de lâminas citocentrifugadas¹⁵⁵. A apoptose de neutrófilos (Figuras 6A e 6B) e a eferocitose (Figuras 6C e 6D) foram observadas principalmente nos dias 2 e 3 após o desafio, o que coincidiu com a diminuição do número neutrófilos e o aumento da porcentagem de células mononucleares. Em conjunto, esses resultados sugerem o estabelecimento da fase de resolução do processo inflamatório entre dois e três dias após o desafio intra-articular com o antígeno, pelo menos nos parâmetros observados na cavidade articular.

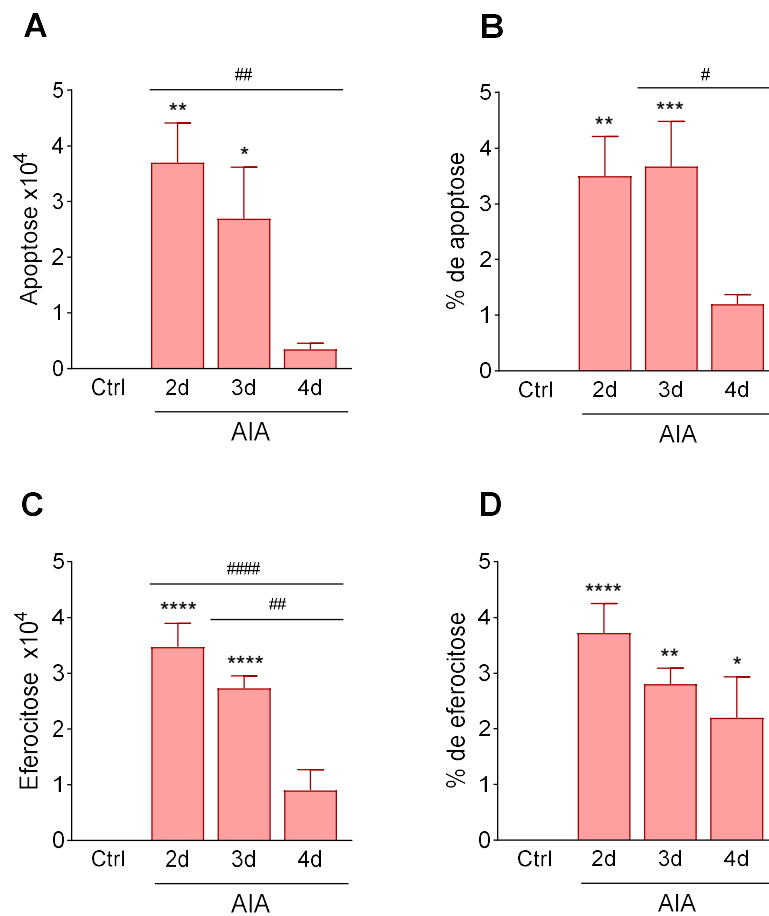


Figura 6: Parâmetros resolutivos no modelo de AIA. Os animais previamente imunizados foram desafiados com injeção intra-articular de mBSA, 2,3 e 4 dias depois, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de neutrófilos apoptóticos total (A), porcentagem de neutrófilos apoptóticos (B), eferocitose total (C), porcentagem de eferocitose (D). As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (#) para $p < 0,05$ quando comparado a média dos outros grupos com AIA (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

A nocicepção mecânica articular é um parâmetro marcante neste modelo de artrite induzida por antígeno e tem seu início rapidamente após o desafio intra-articular, embora possa perdurar por alguns dias após a resolução da inflamação desencadeada no local do desafio¹¹⁵. Corroborando estas propriedades deste modelo, não houve diferença em relação ao limiar de retirada da pata dos animais que receberam o desafio com o antígeno ao longo dos tempos analisados, mesmo com a detecção dos parâmetros de resolução da inflamação articular entre os dias 2 e 4 após o desafio, como a apoptose de neutrófilos e sua eferocitose (Figura 7).

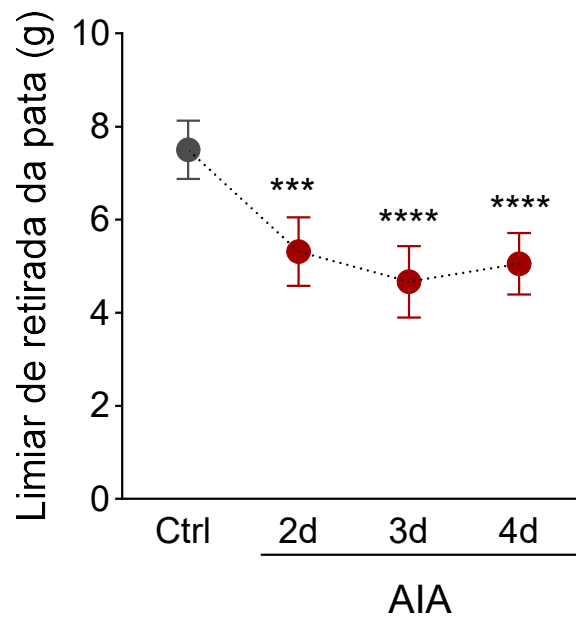


Figura 7: A dor permanece ao longo da inflamação. Os animais previamente imunizados foram desafiados com injeção intra-articular de mBSA. O limiar de retirada da pata foi analisado 2,3 e 4 dias depois do desafio. Representação da média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

5.2 Relação entre o neurotransmissor CGRP e artrite induzida por antígeno

Essa persistência da nocicepção mesmo após a resolução da inflamação periférica no modelo de AIA já havia sido observada em outros trabalhos ^{115,145}, o que levou a questionamentos sobre a participação de moléculas relacionadas à nocicepção, como neurotransmissores, no processo inflamatório. Nesse sentido, dados recentes na literatura indicam que o neurotransmissor CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) tem um efeito direto em leucócitos, principalmente neutrófilos, reduzindo a atividade e migração destas células no sítio inflamatório. Considerando que este modelo de AIA utilizado tem sua resposta inflamatória dependente da presença e atividade de neutrófilos, o próximo passo foi analisar a presença do CGRP no tecido articular ao longo dos tempos avaliados. Como pode ser visto na Figura 8, foi detectada uma grande quantidade de CGRP após 2 dias do desafio intra-articular em relação ao grupo controle, com redução aos níveis basais no 3º e 4º dias do desafio intra-articular (Figura 8A e 8B).

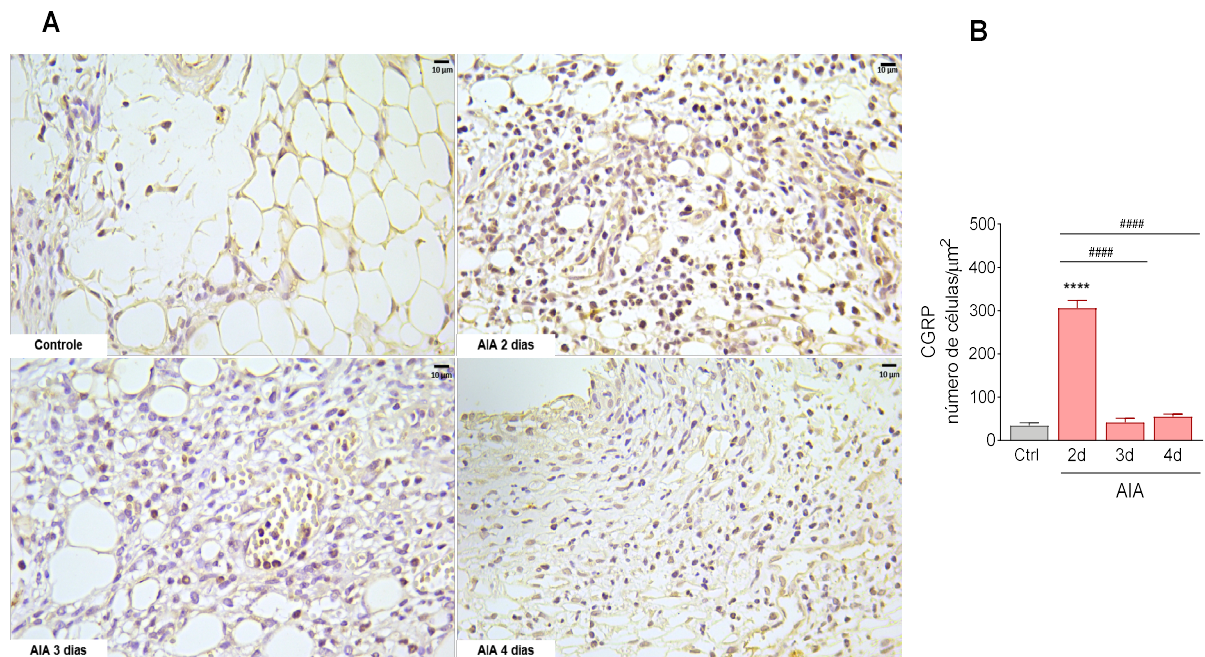


Figura 8: O CGRP está aumentado no tecido sinovial dois dias após o desafio intra-articular. Os animais previamente imunizados foram desafiados com injeção intra-articular de mBSA, 2,3 e 4 dias depois, os animais foram eutanasiados e para a coleta da região da articulação tíbio-femoral para quantificação do CGRP imuno-histoquímica. Marcação de CGRP (A), quantificação das células positivas para CGRP (B). As barras representam a média \pm desvio padrão de 7 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (#) para $p < 0,05$ quando comparado a média dos outros grupos com AIA (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

A principal fonte de CGRP são as fibras nociceptivas do tipo C e A δ , que liberam nos terminais nervosos o CGRP produzido nos corpos celulares, localizados no DRG¹²¹. De maneira interessante, assim como no tecido articular, o aumento de CGRP no DRG foi observado apenas no segundo dia após o desafio, retornando aos níveis basais no 3º e 4º dias após o desafio intra-articular (Figura 9).

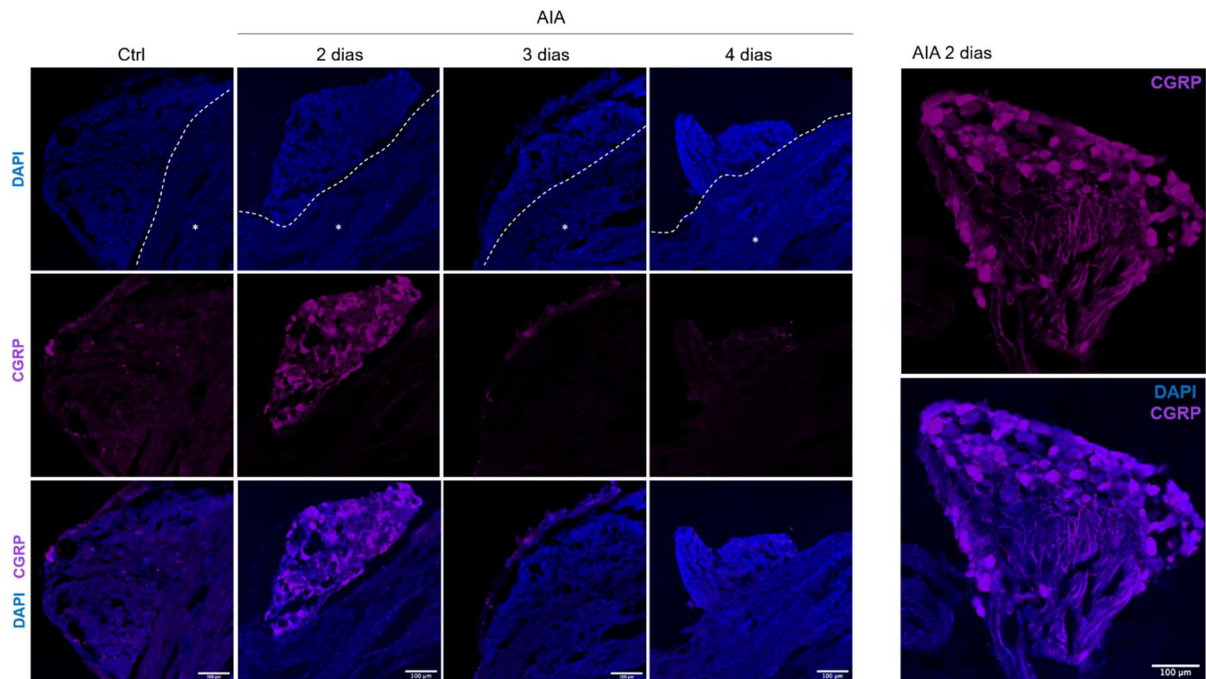


Figura 9: O CGRP está aumentado no DRG dois dias após o desafio intra-articular. Os animais previamente imunizados foram desafiados com injeção intra-articular de mBSA, 2,3 e 4 dias depois, os animais foram eutanasiados e para a coleta do DRG (L5) para marcação de CGRP por imunofluorescência.

De acordo com os dados anteriores, a presença do CGRP no tecido articular coincidiu, pelo menos no dia 2 após o desafio intra-articular, com um aumento do número de neutrófilos apoptóticos presentes na cavidade articular. Para compreender se o CGRP teria um efeito direto nos neutrófilos ao induzir sua apoptose, neutrófilos periféricos humanos de doadores saudáveis foram mantidos em cultura por 6 horas com diferentes concentrações de CGRP recombinante. Através da análise morfológica, foi possível visualizar que o CGRP recombinante, principalmente na concentração de 1 uM induziu a apoptose dessas células (Figuras 10A e 10B). Corroborando com esse dado, foi detectado um elevado nível de caspase-3 clivada, molécula envolvida nas duas vias de sinalização de morte por apoptose, grupo tratado com 1 uM de CGRP recombinante⁷⁹ (Figuras 10C e 10D).

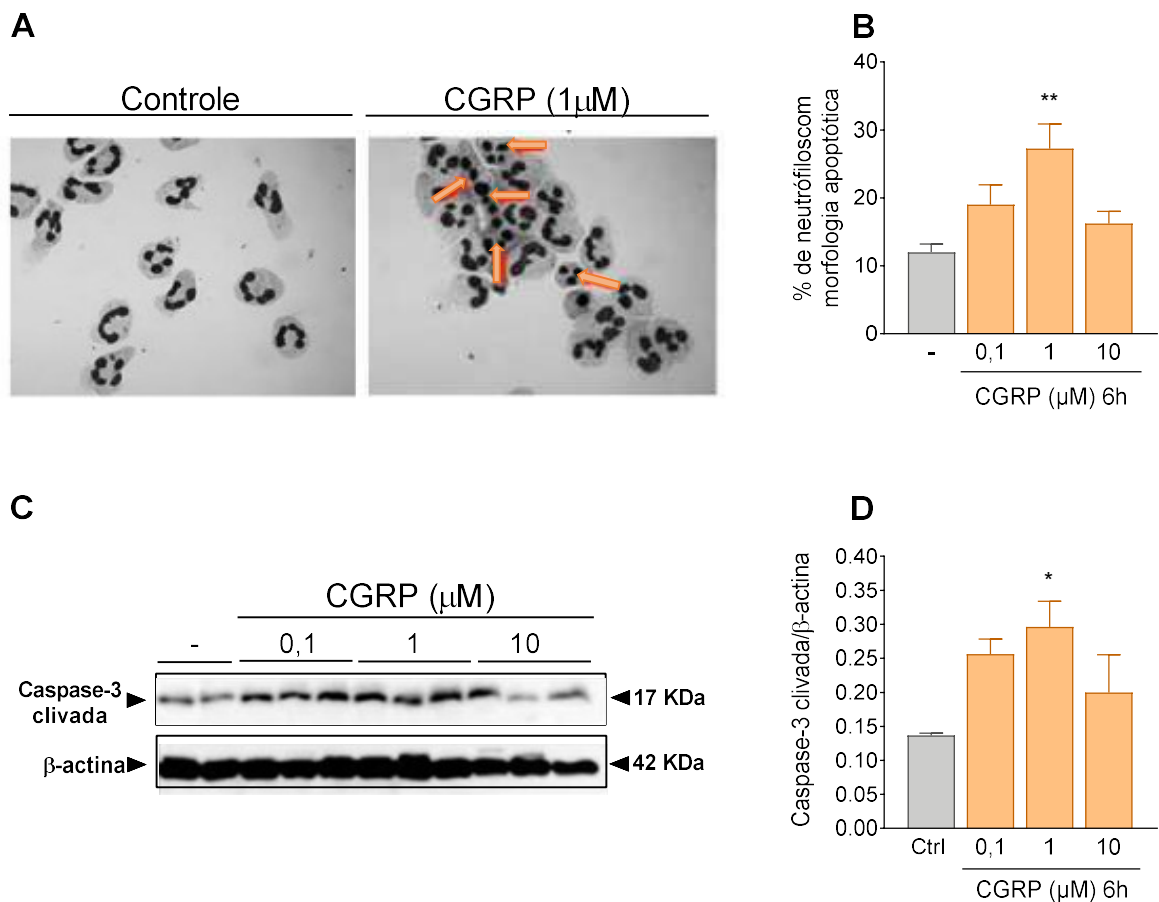


Figura 10: O CGRP induz a apoptose de neutrófilos. Neutrófilos humanos foram incubados com CGRP (0,1, 1, e 10 μM) por 6 horas. A apoptose foi avaliada através de análise morfológica (A) e quantificada (B), as células foram usadas para a quantificação de caspase 3 por western blot (C e D). As barras representam a média \pm desvio padrão de 3 poços por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

O próximo passo foi avaliar se a apoptose dos neutrófilos induzida por CGRP recombinante também aconteceria na presença de moléculas inflamatórias. Para isso, neutrófilos foram incubados com LPS ou com a quimiocina CXCL8. Essas moléculas foram para ativar os neutrófilos de modo a mimetizar, embora de maneira muito simplificada, uma condição que estas células possam encontrar no ambiente inflamatório, além de serem fatores que aumentam a viabilidade dessas células^{156–158}. Assim, mesmo sendo estimulados com LPS ou CXCL8, o CGRP recombinante foi capaz de causar a morte dos neutrófilos por apoptose, embora a concentração necessária tenha sido maior em relação os neutrófilos não estimulados (Figuras 11A e 11B).

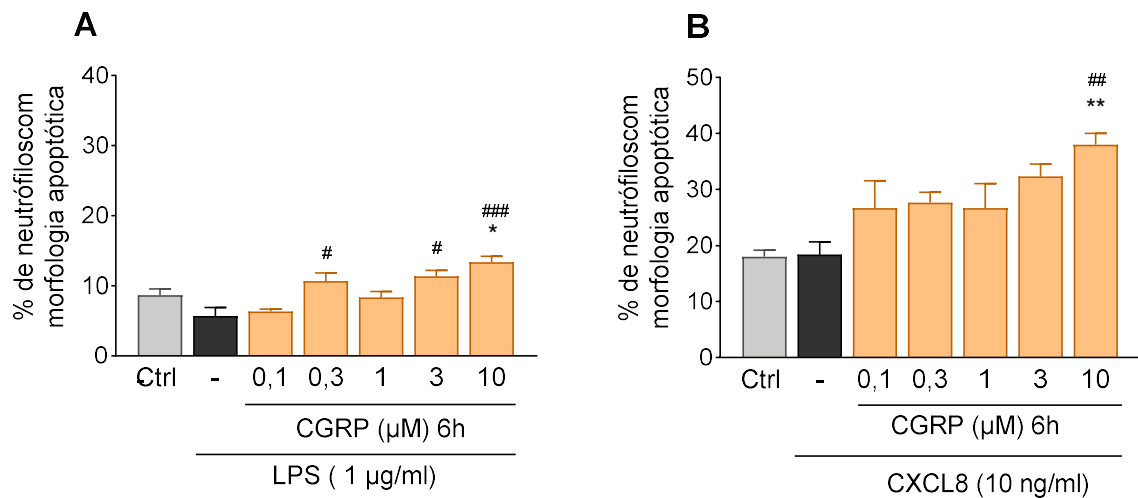


Figura 11: O CGRP induz a apoptose de neutrófilos estimulados em concentração maiores. Neutrófilos humanos foram incubados com CGRP (0,1, 0,3, 1, 3 e 10 µM) por 6 horas na presença de LPS (1 µg/ml) (A) e CXCL8 (10 ng/ml) (B). As barras representam a média ± desvio padrão de 3 poços por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (#) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo estimulado com LPS (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Tomados em conjunto, os dados descritos até aqui sugerem que o aumento de CGRP dois dias após o desafio pode estar relacionado, em parte, com mecanismos associados com a resolução da inflamação articular, uma vez que a detecção de CGRP no tecido articular coincide com um aumento da apoptose de neutrófilos presentes na cavidade articular e porque o CGRP foi capaz de induzir a apoptose de neutrófilos *in vitro* mesmo na presença de estímulos inflamatórios. Assim, foi investigado se o bloqueio de CGRP *in vivo* seria suficiente para alterar os parâmetros da resolução da inflamação no modelo de AIA.

5.3. Investigação do efeito do Fremanezumab na resolução da inflamação articular

Os animais imunizados foram tratados via intraperitoneal com 50 mg/kg de Fremanezumab, um anticorpo monoclonal neutralizante anti-CGRP, seis horas antes do desafio intra-articular e as análises foram realizadas 2 e 3 dias após esse desafio. Através dos resultados, foi possível observar que não houve diferença nos parâmetros inflamatórios entre os grupos que receberam ou não o tratamento por Fremanezumab após 2 dias do desafio, como número e porcentagem de leucócitos recuperados da cavidade articular e das citocinas IL-1β e IL-6 detectadas no tecido periarticular (Figura

12A a 12G). Em relação aos grupos analisados 3 dias após o desafio, houve uma diminuição de células totais (Figura 12A) e neutrófilos (Figura 12B) no grupo que recebeu o tratamento, porém não houve diferenças no número de células mononucleares (Figura 12C), porcentagem de neutrófilos (Figura 12D), e porcentagem de células mononucleares (Figura 12E) e das citocinas IL-1 β e IL-6 (Figura 12F e 12G).

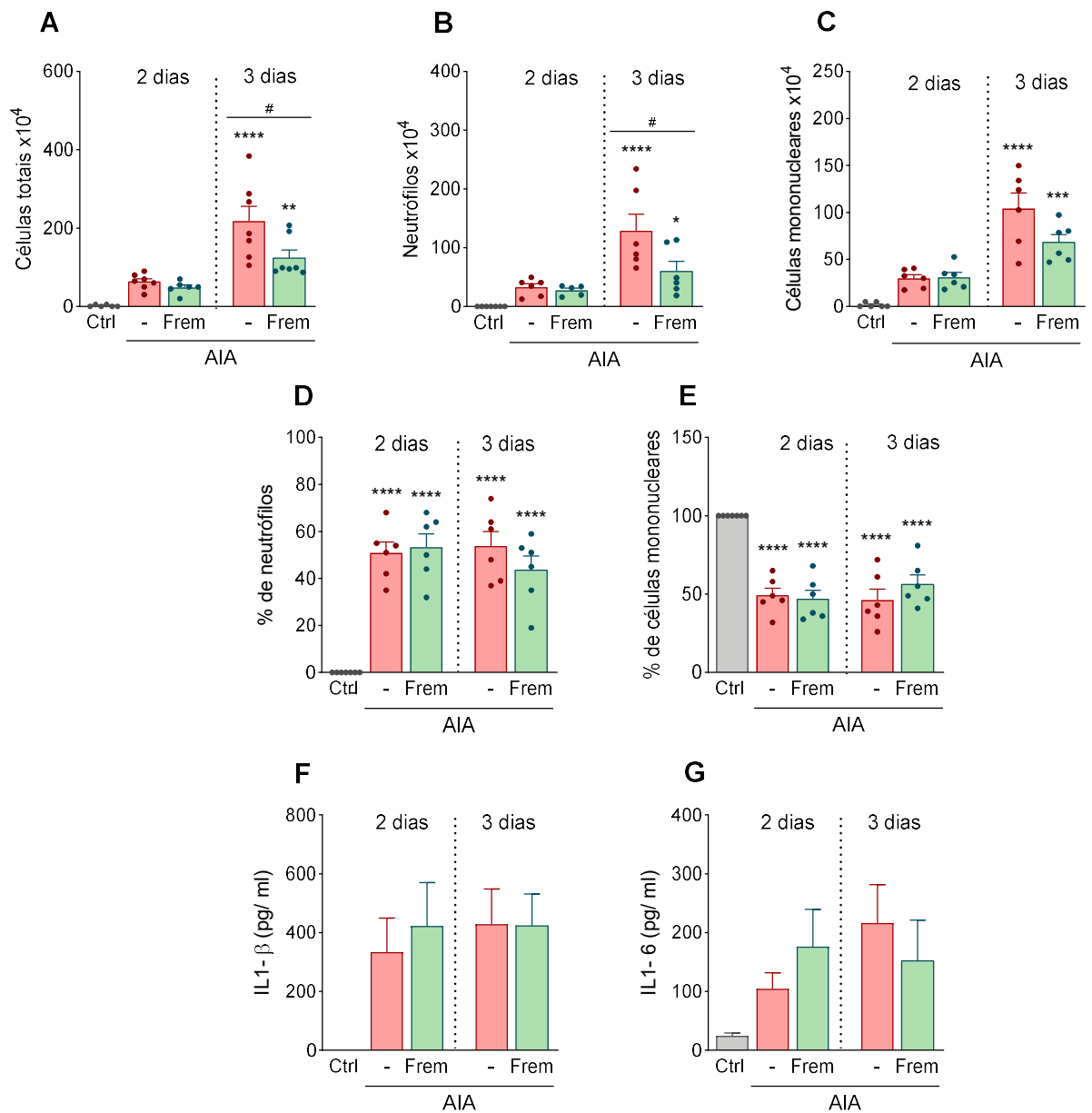


Figura 12: Efeito do tratamento com Fremanezumab na resposta inflamatória articular.

Os animais foram tratados com Fremanezumab (50 mg/kg) 6 horas antes do desafio intra-articular. Após dois e três dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos (B) células mononucleares (C), porcentagem de neutrófilos (D) e de células mononucleares (E). O tecido periarticular foi utilizado para a quantificação de IL-1 β (F) e IL-6 (G) por ELISA. As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Ainda, em relação aos parâmetros de resolução, não houve diferença na apoptose com dois dias após o desafio (Figura 13A e 13B) e a porcentagem de

eferocitose estava diminuída no grupo tratado (Figura 13D). Em relação ao terceiro dia, o tratamento levou a uma diminuição da porcentagem de apoptose (Figura 13 B) e não houve diferença quanto a eferocitose (13C e D).

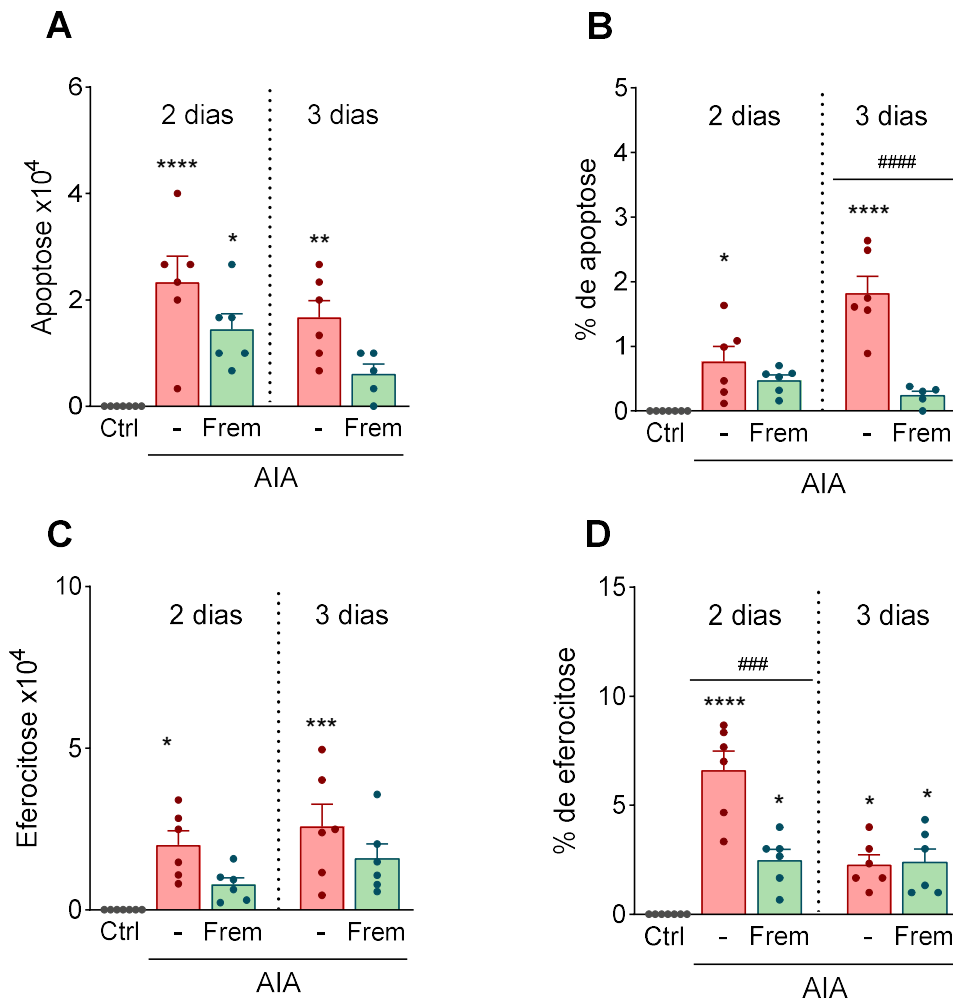


Figura 13: Efeito do tratamento com Fremanezumab nos parâmetros de resolução. Os animais foram tratados com Fremanezumab (50 mg/kg) 6 horas antes do desafio intra-articular. Após dois e três dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de neutrófilos apoptóticos total (A), porcentagem de neutrófilos apoptóticos (B), eferocitose total (C), porcentagem de eferocitose (D). As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

5.4. Efeito da depleção de nociceptores TRPV1⁺ na resposta inflamatória articular

A ativação de canais catiônicos não seletivos TRPV1 localizados nos nociceptores periféricos estimulam a liberação de neuropeptídeos sensoriais, principalmente o CGRP¹⁴³. Assim, o próximo passo foi avaliar se a depleção desses nociceptores TRPV1⁺ interferem na resposta inflamatória articular no modelo de AIA. Para isso, foi utilizado composto Resiniferatoxina (RTX), um análogo ultrapotente da capsaicina e que atua como um agonista nos receptores TRPV1⁺. Em elevadas concentrações, ele pode dessensibilizar irreversivelmente os nociceptores TRPV1⁺, induzindo a dessensibilização de longo prazo do receptor via necrólise, levando, assim, a um alívio duradouro da dor e diminuição da produção neurotransmissores, dentre eles, o CGRP¹⁵⁹.

Para avaliar se a dessensibilização de nociceptores TRPV1⁺ interfere na inflamação articular, os camundongos com 4 semanas receberam por via intradérmica RTX por 3 dias seguidos em concentrações crescentes (30, 70 e 100 mg/kg). Após 4 semanas, período necessário para a dessensibilização dos neurônios TRPV1⁺, os animais tratados com RTX apresentaram feixes de pelos brancos, um fenótipo característico deste tratamento (Figura 14A)¹⁵⁰. Corroborando a eficácia deste protocolo, foi realizado um teste para verificar se o tratamento com RTX foi eficaz na dessensibilização de nociceptores. Para isso, foi realizada uma injeção intraplantar de capsaicina, um importante agente nociceptivo, e avaliada a nocicepção dos animais através do tempo de lambida de pata. Conforme verificado na Figura 14B, o grupo de animais tratados com RTX não apresentaram resposta nociceptiva, apenas nos animais tratados com veículo, comprovando o sucesso dessa dessensibilização.

Em seguida, os mesmos animais foram imunizados e, após 14 dias, desafiados para a realização do experimento de AIA. O grupo de animais artríticos que não foram dessensibilizados com RTX apresentou um aumento da resposta nociceptiva mecânica (von Frey eletrônico) quando comparado ao grupo controle não artrítico nos dias 1 e 2 após o desafio intra-articular. Por outro lado, o grupo artrítico tratado com RTX apresentou um limiar de retirada da pata mais alto, indicativo de menor nocicepção, com valores semelhantes ao do grupo controle não artrítico (Figura 14C).

semanas após o tratamento com RTX. Para isso, foi feita a titulação de anticorpos anti-mBSA no soro dos animais como um parâmetro indireto da atividade imune provocada no modelo. Como pode ser observado na Figura 15, não houve diferença na quantidade desses anticorpos entre os animais tratados e não tratados com RTX, indicando, assim, que houve uma uniformidade no padrão de imunização dos animais desses grupos.

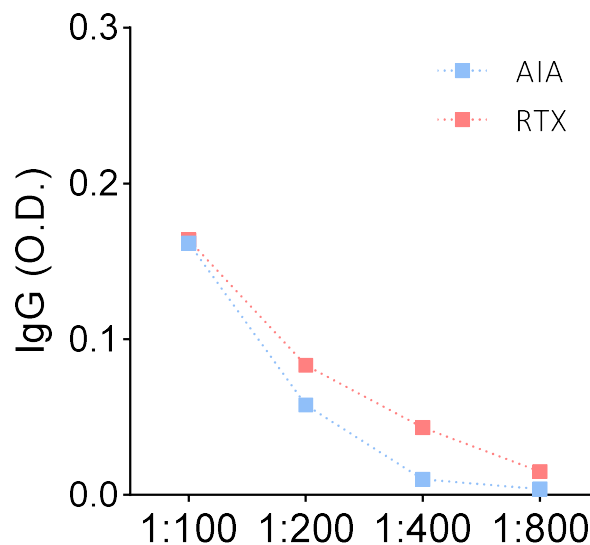


Figura 15: A dessensibilização por RTX não causou alteração na resposta imunológica. Os animais previamente imunizados foram desafiados com injeção intra-articular de mBSA, dois dias após o desafio os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para quantificação de IgG anti-mBSA no plasma no ELISA. Representação da média \pm desvio padrão de 7 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo que não recebeu RTX (Teste T).

Em seguida, foi avaliado se o tratamento com RTX altera principais parâmetros inflamatórios característicos desse modelo. Após 2 dias do desafio intra-articular, não houve diferença no número de células totais (Figura 16A), neutrófilos (Figura 16B) e células mononucleares (Figura 16C), bem como não houve diferenças na porcentagem de neutrófilos (Figura 16D) e células mononucleares (Figura 16E) entre os animais com AIA que não receberam RTX em relação aos animais dessensibilizados por RTX. Esses dois grupos tiveram os parâmetros significativamente alterados em relação ao grupo controle.

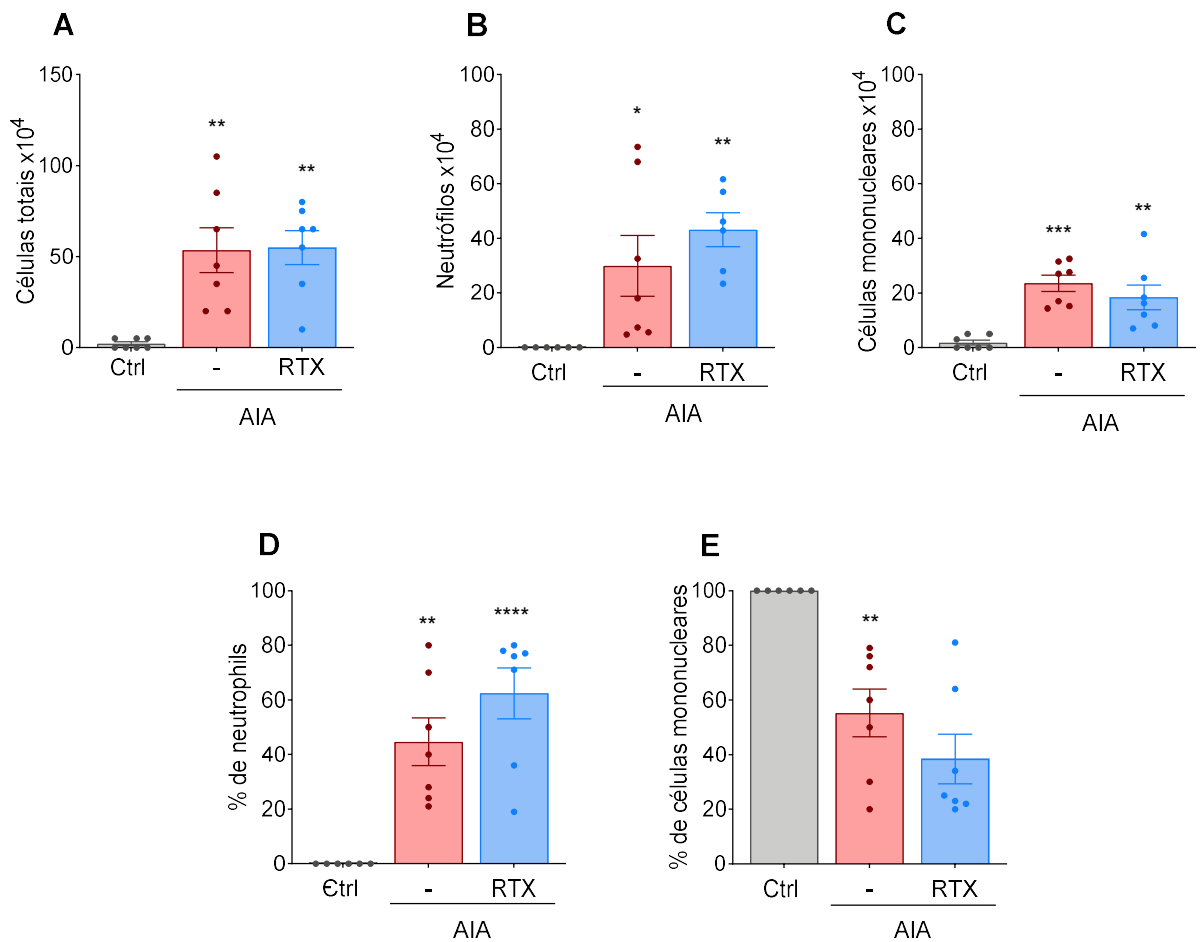


Figura 16: O tratamento com RTX não levou a diferenças no perfil celular do lavado articular 2 dias após o desafio. Os animais foram dessensibilizados com RTX. Após 28 dias, o modelo de AIA foi induzido. Após dois dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos (B) células mononucleares (C), porcentagem de neutrófilos (D) e de células mononucleares (E). As barras representam a média \pm desvio padrão de 7 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu RTX (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Além disso, a dessensibilização não alterou os parâmetros relativos à resolução da inflamação aguda, como a apoptose de neutrófilos (Figura 17A e 17B) ou a eferocitose por macrófagos (Figura 17C e 17D). Porém, é importante notar que houve um aumento na quantidade de apoptose e eferocitose entre os animais com AIA sem tratamento com RTX e o grupo controle, fato não observado entre os grupos AIA tratado com RTX e grupo controle.

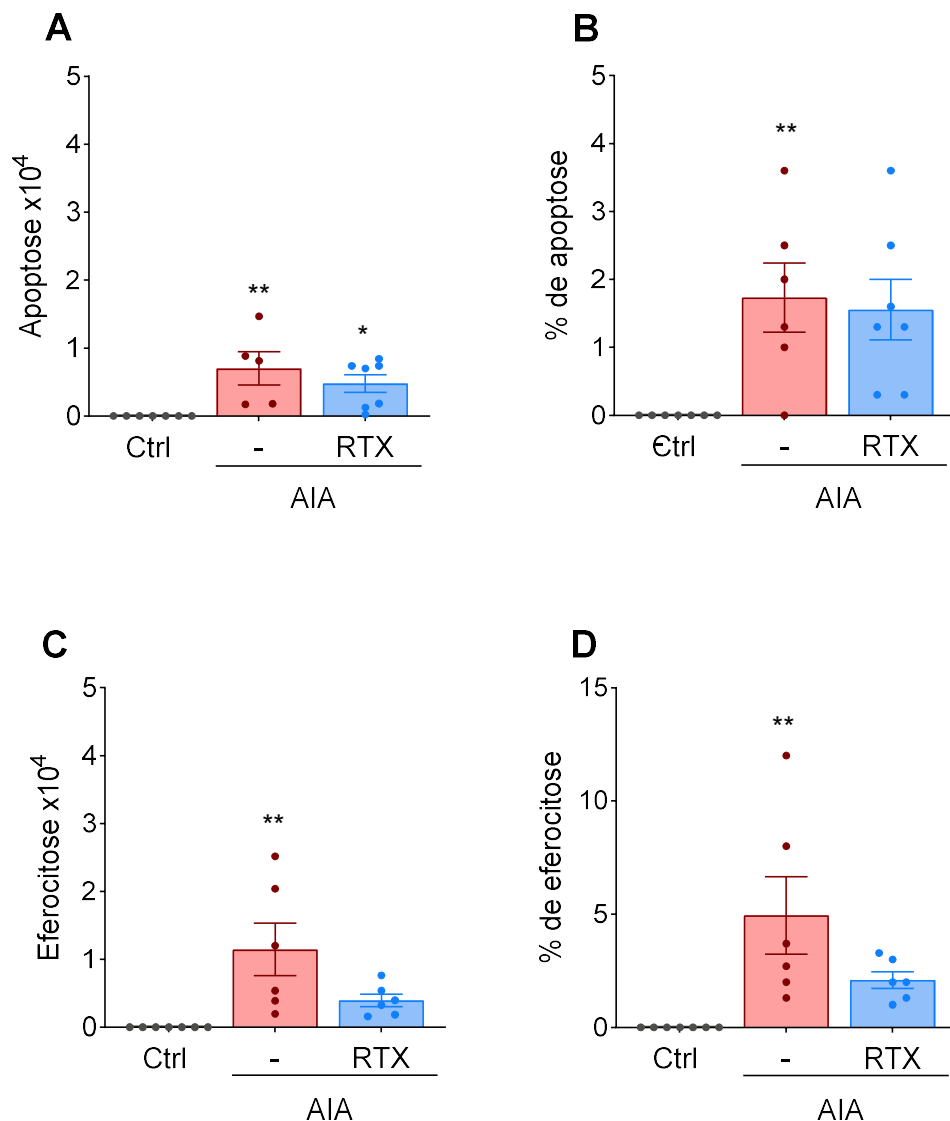


Figura 17: O tratamento com RTX não levou a diferenças nos parâmetros resolutivos 2 dias após o desafio. Os animais foram dessensibilizados com RTX, 28 dias depois da dessensibilização o modelo de AIA foi induzido. Após dois dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de neutrófilos apoptóticos total (A), porcentagem de neutrófilos apoptóticos (B), eferocitose total (C), porcentagem de eferocitose (D). As barras representam a média \pm desvio padrão de 7 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu RTX (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Como não houve diferença nos parâmetros inflamatórios e resolutivos entre os animais AIA tratados ou não com RTX 2 dias após o desafio intra-articular e também nos parâmetros de resolução, foi avaliado se esses parâmetros estavam alterados após 3 dias do desafio intra-articular. Assim como no tempo de 2 dias após o desafio

(Figura 14C), animais AIA não tratados com RTX apresentaram uma diminuição no limiar de retirada da pata, significando um aumento da nocicepção mecânica, enquanto os animais dessensibilizados por RTX tiveram uma menor nocicepção, equivalente ao grupo controle (Figura 18).

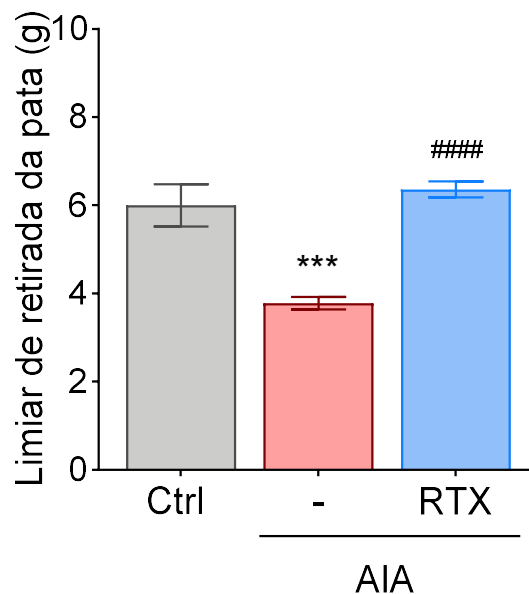


Figura 18: O protocolo de dessensibilização por RTX levou a menor nocicepção. Os animais foram dessensibilizados com RTX, 28 dias depois da dessensibilização o modelo de AIA foi induzido. O limiar de retirada da pata foi analisado 3 dias depois do desafio. Representação da média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu RTX (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Por outro lado, as células totais recuperadas pelo lavado na cavidade articular estavam aumentadas no grupo dessensibilizado por RTX em comparação com o grupo não dessensibilizados (Figura 19A). Essa diferença também foi observada nos neutrófilos e macrófagos (Figuras 19B e 19C). Porém, não houve diferença na porcentagem de células entre os grupos AIA (Figuras 19D e 19E).

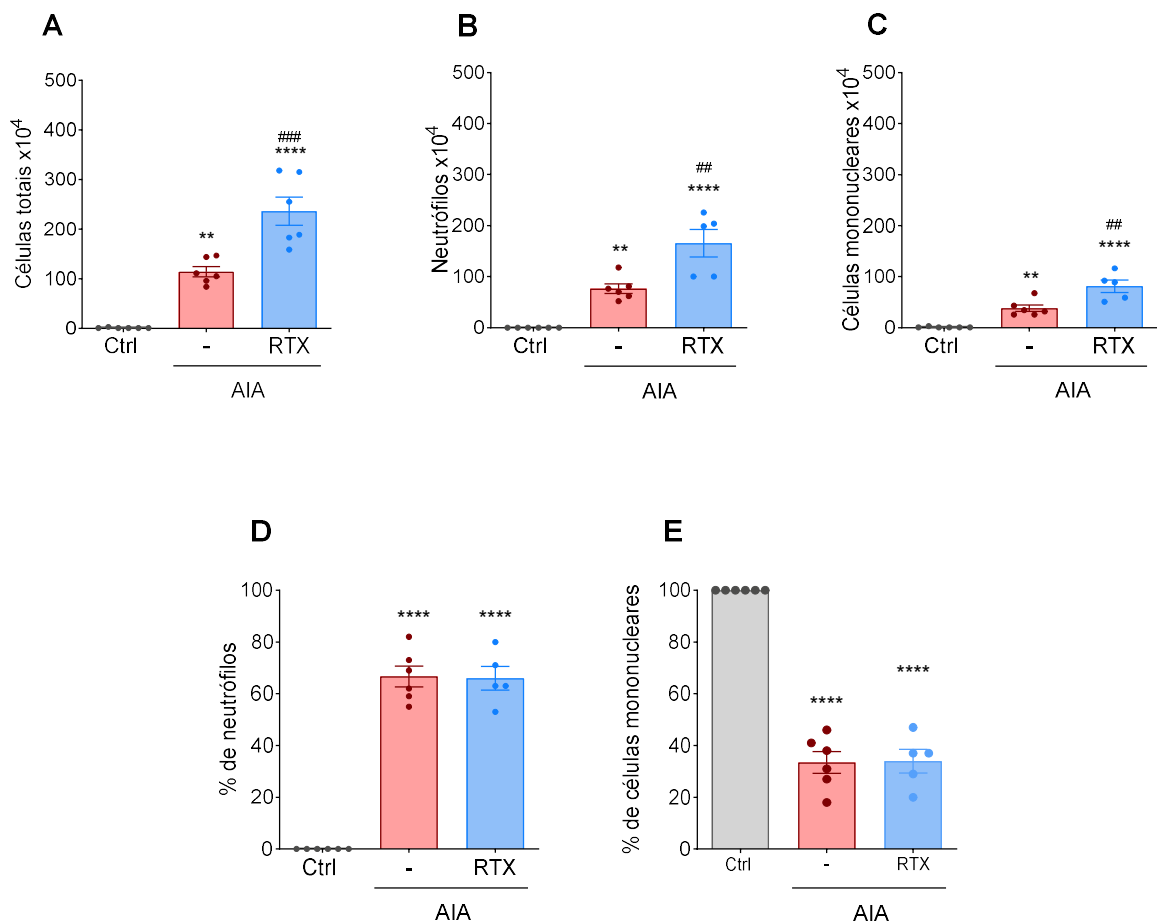


Figura 19: A dessensibilização por RTX levou ao aumento de neutrófilos 3 dias após o desafio. Os animais foram dessensibilizados com RTX, 28 dias depois da dessensibilização o modelo de AIA foi induzido. Após três dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos (B) células mononucleares (C), porcentagem de neutrófilos (D) e de células mononucleares (E). As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu RTX (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

No que diz respeito aos parâmetros avaliados sobre resolução da inflamação, não houve diferença entre a quantidade de neutrófilos apoptóticos entre os grupos AIA (Figura 20A). Porém, houve uma maior porcentagem de neutrófilos apoptóticos nos animais AIA que não receberam RTX em relação aos animais AIA tratados com RTX (Figura 20B). Por outro lado, de maneira não esperada, os animais AIA tratados com RTX tiveram uma maior quantidade de eferocitose em comparação com os animais AIA sem RTX (Figura 20C), ao passo que a porcentagem de eferocitose estava equiparável entre esses dois grupos (Figura 20D).

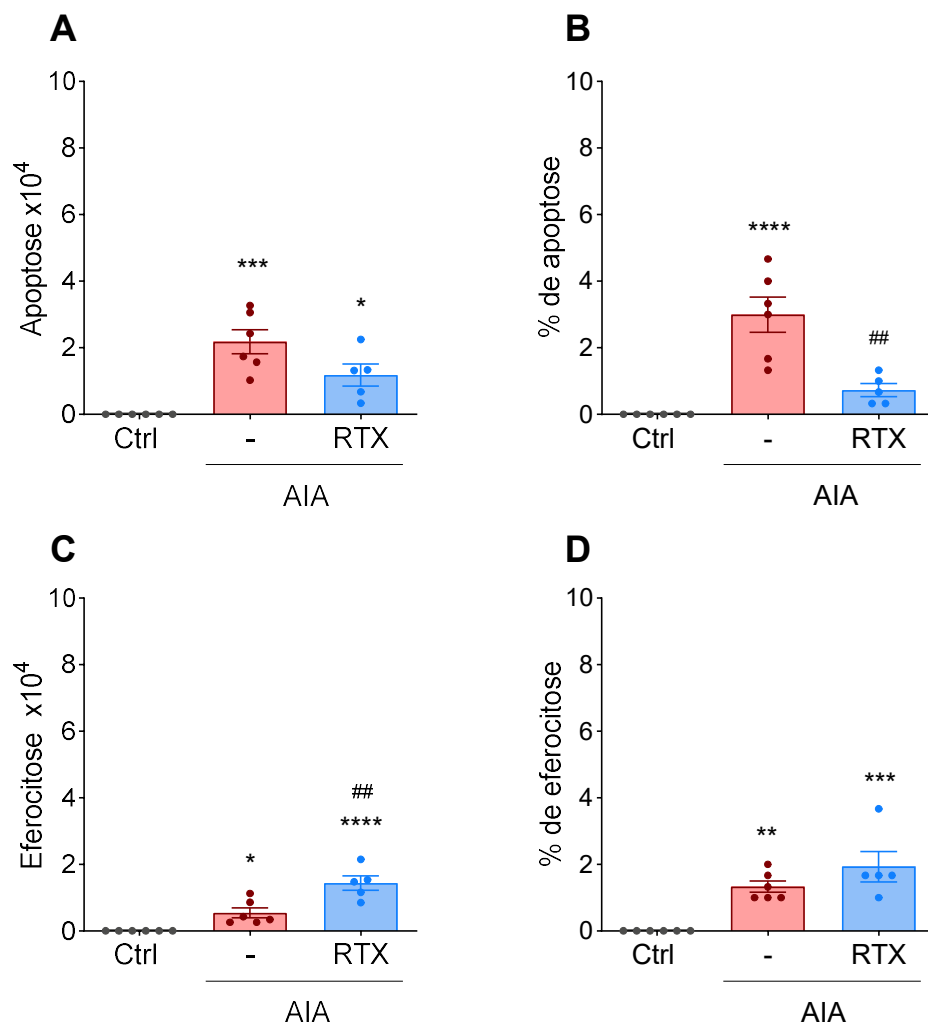


Figura 20: A dessensibilização por RTX levou ao aumento dos parâmetros resolutivos 3 dias após o desafio. Os animais foram dessensibilizados com RTX, 28 dias depois da dessensibilização o modelo de AIA foi induzido. Após três dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de neutrófilos apoptóticos total (A), porcentagem de neutrófilos apoptóticos (B), eferocitose total (C), porcentagem de eferocitose (D). As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu RTX (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Ainda, a dessensibilização por RTX levou a uma diminuição de macrófagos residentes (CX3CR1⁺) no tecido sinovial três dias após o desafio (Figura 21 A), de forma interessante, a quantidade desses macrófagos relacionados ao controle da inflamação (CD206⁺) também foi diminuída pela dessensibilização (Figura 21 B).

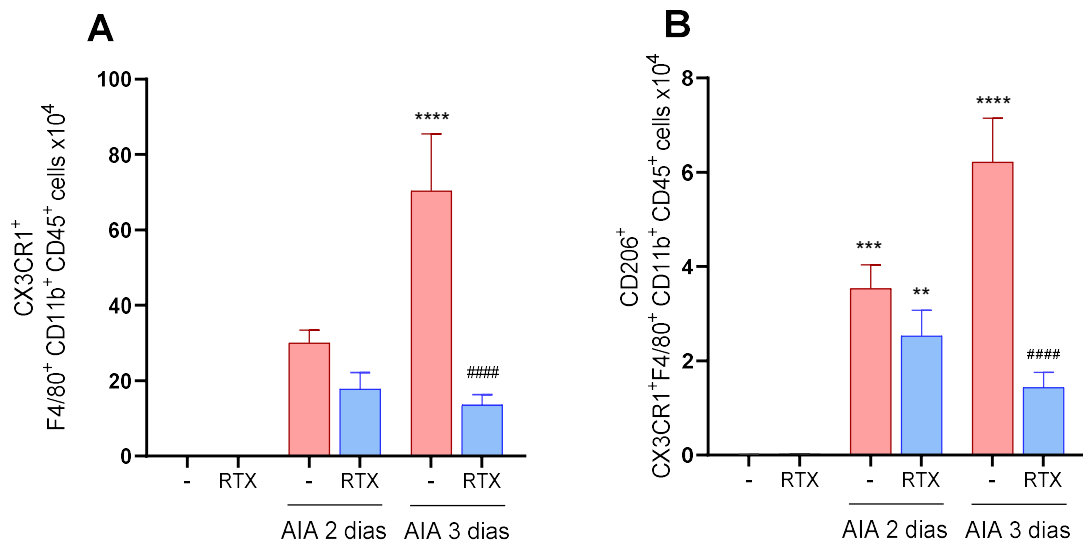


Figura 21: A dessensibilização por RTX levou a diminuição de macrófagos CD206⁺. Os animais foram dessensibilizados com RTX, 28 dias depois da dessensibilização o modelo de AIA foi induzido. Após dois e três dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para coleta de tecido sinovial para a marcação para citometria (A), células F4/80⁺ CD11b⁺ CD45⁺ positivas para CD206 (B) células F4/80⁺ CD11b⁺ CD45⁺, CD206⁺ e CX3CR1⁺. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 amostras por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu RTX (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Em conjunto, a dessensibilização por RTX não levou a diferença nos parâmetros inflamatórios e resolutivos dois dias após o desafio. Entretanto, quando analisados no terceiro dia após o desafio intra-articular, a dessensibilização levou a um aumento do número de células totais recuperadas da cavidade articular, o que refletiu num aumento de neutrófilos e células mononucleares totais ao mesmo tempo que houve uma diminuição na porcentagem de apoptose, e de macrófagos CD206⁺ (M2) eventos relacionados a um atraso na resolução da inflamação.

5.5. Avaliação da resposta inflamatória articular após o tratamento com o analgésico Buprenorfina

Como próxima estratégia experimental, optamos pela utilização de um analgésico para a investigar se a redução nociceptiva causada não apenas nociceptores TRPV1⁺ poderia influenciar no curso da resposta inflamatória articular. Para isso, foi utilizada a buprenorfina, um analgésico potente que atua no sistema nervoso central, se ligando com alta afinidade a todas as três principais classes de

receptores opioides (μ , δ e κ) nos neurônios do cérebro e da medula espinhal e a receptores periféricos de terminações nervosas bloqueando a sinalização da dor¹⁶⁰. Assim, buscando inibir a dor dos animais com AIA, foi escolhida a dose 2 mg/kg de buprenorfina conforme recomendada pelo CONCEA (Resolução Normativa CONCEA nº 35, de 11.08.2017), administrada a cada 8 horas a partir de 2 horas antes do desafio intra-articular com mBSA. Inicialmente, como forma de provar a eficácia do tratamento por Buprenorfina no controle da nocicepção, os animais tratados tiveram uma redução muito grande da resposta nociceptiva mecânica no modelo de AIA em relação aos animais não tratados (Figura 22).

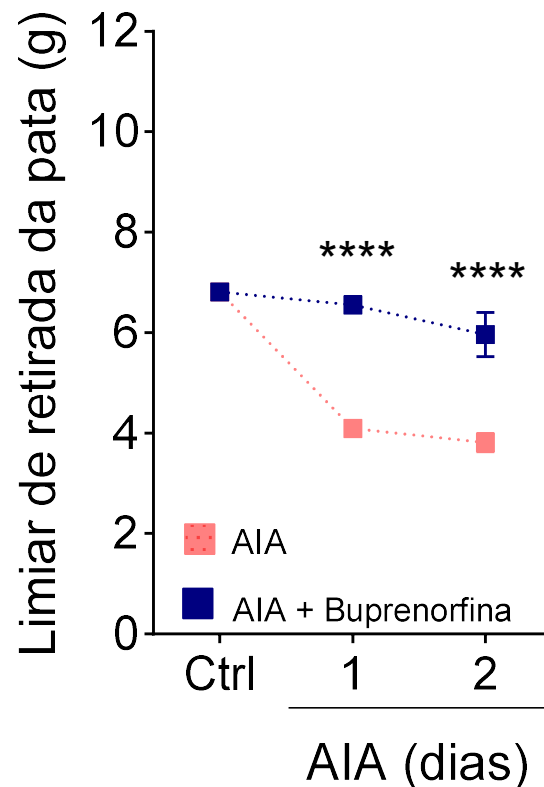


Figura 22: O tratamento com Buprenorfina reduziu a nocicepção. Os animais com AIA foram tratados com Buprenorfina (2 mg/kg) a cada 8 horas a contar do primeiro tratamento 2 horas antes do desafio intra-articular. O limiar de retirada da pata foi analisado 2 dias depois do desafio. Representação da média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo que não recebeu RTX (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Uma vez mostrada a eficácia do tratamento com Buprenorfina na redução da resposta nociceptiva, o próximo passo foi avaliar os parâmetros inflamatórios. Inicialmente, foi escolhido o tempo de 2 dias após o desafio articular. Porém, os animais AIA tratados ou não com Buprenorfina tiveram quantidades equiparáveis de células totais (Figura 23A), de neutrófilos (Figura 23B), de células mononucleares (Figura 23C) e das porcentagens de neutrófilos (Figura 23D) e células mononucleares (Figura 23E).

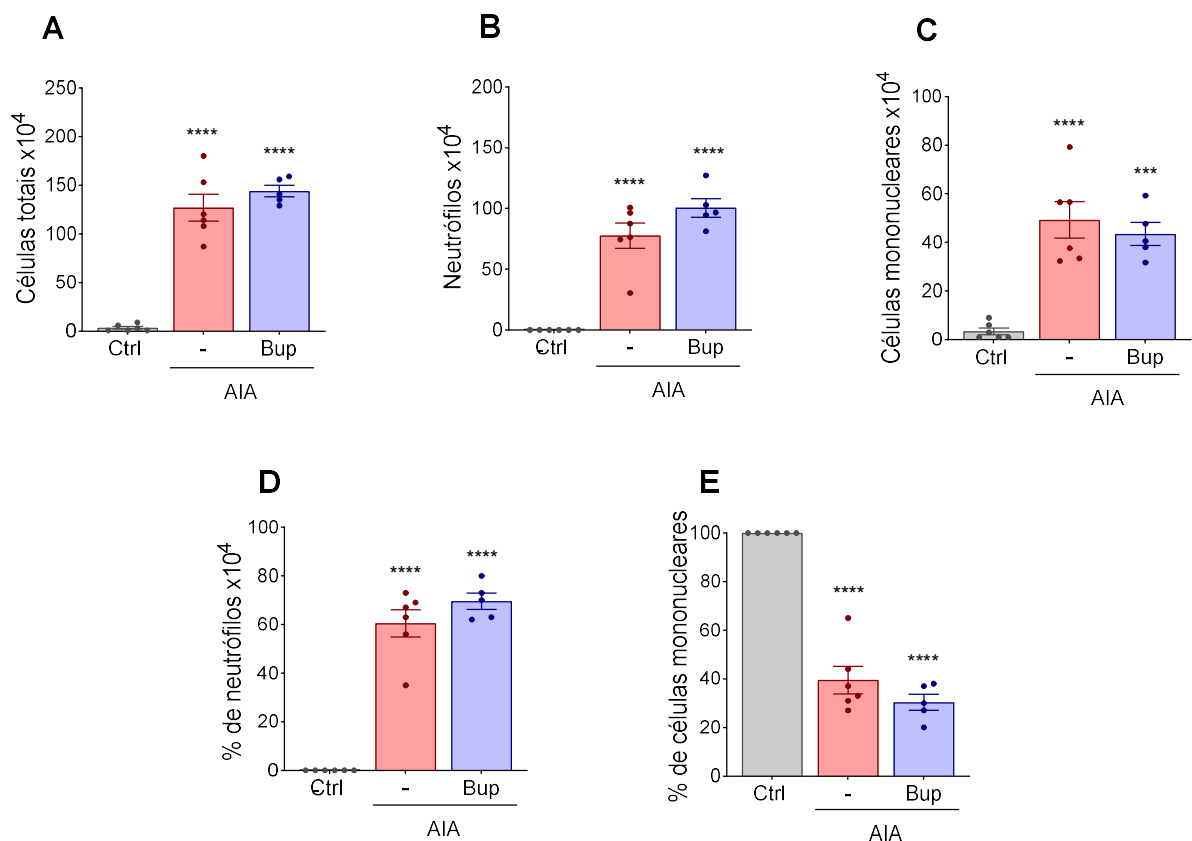


Figura 23: A buprenorfina não alterou o perfil celular no lavado articular 2 dias após o desafio. Os animais com AIA foram tratados com Buprenorfina (2 mg/kg) a cada 8 horas a contar do primeiro tratamento 2 horas antes do desafio intra-articular. Após dois dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos totais (B) células mononucleares totais (C), porcentagem de neutrófilos (D) e de células mononucleares (E). As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu o tratamento com Buprenorfina (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

De forma similar, não houve diferenças entre a quantidade e porcentagem de células apoptóticas (Figuras 24A e 24B) e eferocitose (Figura 24C e 24D).

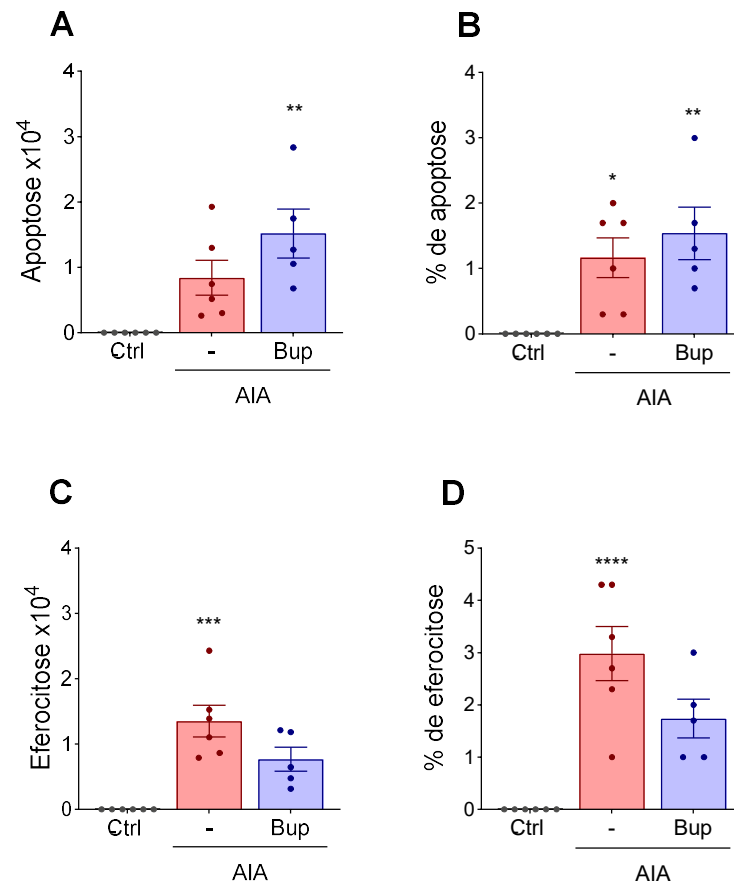


Figura 24: O tratamento com Buprenorfina não interferiu nos parâmetros de resolução dois dias após o desafio. Os animais com AIA foram tratados com Buprenorfina (2 mg/kg) a cada 8 horas a contar do primeiro tratamento 2 horas antes do desafio intra-articular. Após dois dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de neutrófilos apoptóticos total (A), porcentagem de neutrófilos apoptóticos (B), eferocitose total (C), porcentagem de eferocitose (D). As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu o tratamento com Buprenorfina (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Visto que não houve diferença nos parâmetros inflamatórios e resolutivos com o tratamento por Buprenorfina 2 dias após o desafio intra-articular, os mesmos parâmetros foram avaliados no tempo de 3 dias após o desafio. Não houve diferença entre os animais tratados e não tratados no que diz respeito a células totais (Figura 25A), neutrófilos (Figura 25B) e células mononucleares (Figura 25C), assim como a

porcentagem de neutrófilos (Figura 25D) e células mononucleares (Figura 25E).

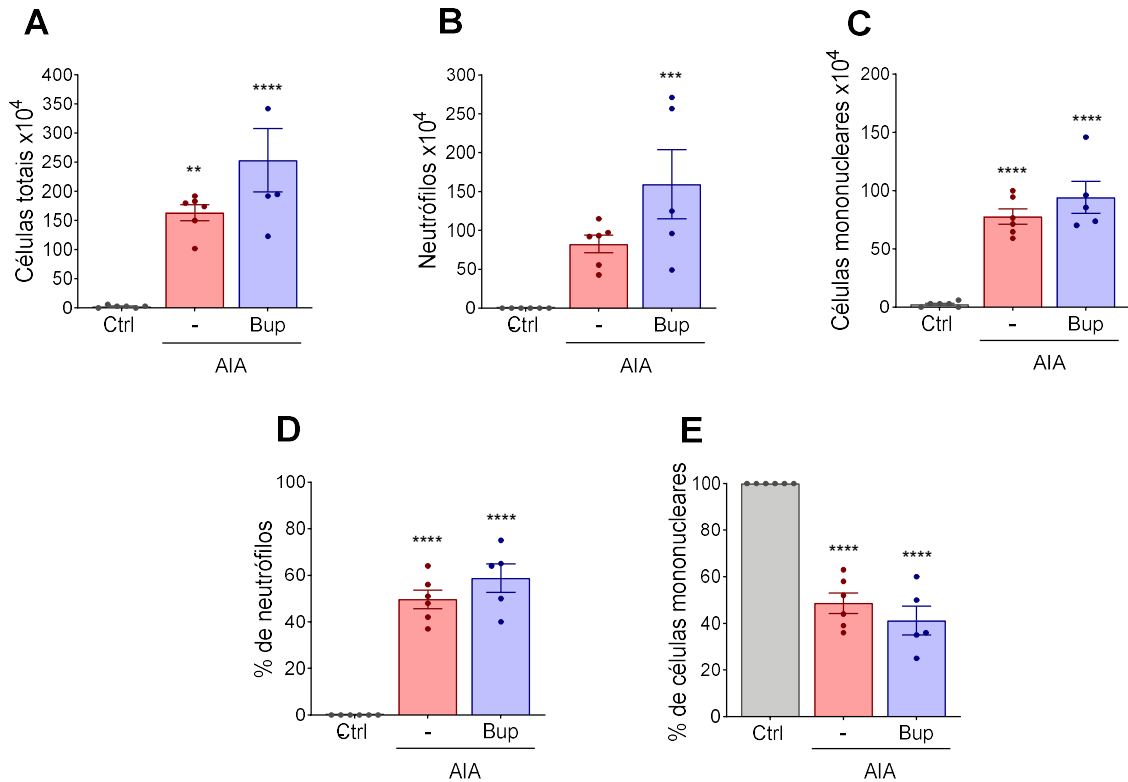


Figura 25: A buprenorfina não alterou o perfil celular no lavado articular 3 dias após o desafio. Os animais com AIA foram tratados com Buprenorfina (2 mg/kg) a cada 8 horas a contar do primeiro tratamento 2 horas antes do desafio intra-articular. Após três dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de células totais (A), neutrófilos totais (B) células mononucleares totais (C), porcentagem de neutrófilos (D) e de células mononucleares (E). As barras representam a média ± desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu o tratamento com Buprenorfina (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Porém, o tratamento com Buprenorfina causou uma redução na porcentagem de neutrófilos apoptóticos (Figura 26B) e na quantidade (Figura 26C) e porcentagem (Figura 26D) de eferocitose. Não houve diferença na quantidade de neutrófilos apoptóticos entre os dois grupos AIA, tratados ou não com Buprenorfina. Esses dados indicam que a analgesia causada pela Buprenorfina possa reduzir a resolução da resposta inflamatória da artrite induzida por antígeno.

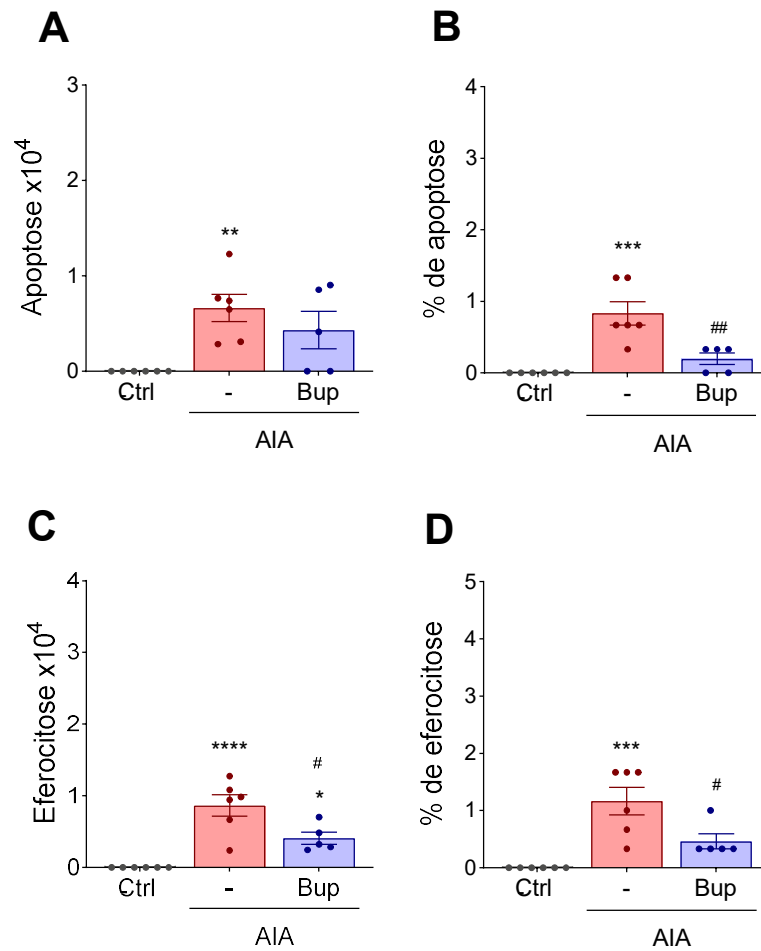


Figura 26: O tratamento com Buprenorfina reduziu parâmetros de resolução três dias após o desafio. Os animais com AIA foram tratados com Buprenorfina (2 mg/kg) a cada 8 horas a contar do primeiro tratamento 2 horas antes do desafio intra-articular. Após três dias do desafio com mBSA, os animais foram eutanasiados para a realização do lavado articular e contagem do número de neutrófilos apoptóticos total (A), porcentagem de neutrófilos apoptóticos (B), eferocitose total (C), porcentagem de eferocitose (D). As barras representam a média \pm desvio padrão de 6 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle, (#) para $p < 0,05$ quando comparado com o grupo que não recebeu RTX (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

6. DISCUSSÃO

A resolução da inflamação é caracterizada por eventos moleculares e celulares que levam ao reparo tecidual e recuperação da função fisiológica⁶. Embora a resposta inflamatória aguda seja necessária para a eliminar o agente nocivo, o acúmulo de leucócitos nos tecidos, especialmente de neutrófilos, tem impacto direto nos danos e disfunção teciduais⁷⁴. A presença de estímulos inflamatórios contínuos pode levar a respostas inflamatórias agressivas e/ou prolongadas, que podem ser prejudiciais ao tecido, levando à inflamação crônica¹⁶¹. A falha na resolução da resposta inflamatória aguda, ou a ativação contínua das respostas, tornam-se prejudiciais ao tecido e conseqüentemente evoluem para a lesão crônica que chamamos de doenças inflamatórias¹⁶¹. A resolução da inflamação aguda é um processo ativo envolve e uma série complexa de mecanismos que visam promover o retorno à homeostase⁷⁴. Neste contexto, a homeostase é recuperada após a produção de mediadores pró-resolutivos que atuam na remoção de microrganismos, células mortas e detritos, restauração da integridade e perfusão vascular, regeneração tecidual, remissão da febre e alívio da dor inflamatória^{74,162,163}. Nesse trabalho, estudamos a participação do CGRP e dos nociceptores na resolução da inflamação articular aguda e observamos que os nociceptores estão associados ao aumento da apoptose de neutrófilos e sua eferocitose.

O modelo de AIA agudo é caracterizado por um intenso infiltrado de leucócitos, principalmente neutrófilos, hiperplasia sinovial, e dano articular¹¹⁵. A chegada de neutrófilos na articulação ocorre a partir das primeiras horas após o desafio articular, sendo que o rolamento e adesão de leucócitos permanecem aumentados nos vasos sanguíneos articulares até dois dias após o desafio¹⁴⁵. A diminuição do acúmulo de neutrófilos na articulação, a apoptose dessas células e a eferocitose dos corpos apoptóticos por macrófagos estão diretamente relacionados à fase de resolução da inflamação articular e reparo tecidual¹⁶⁴. Entretanto, trabalhos anteriores já demonstraram que mesmo após a resolução completa da inflamação, a nocicepção mecânica articular presente na AIA persiste por vários dias^{115,145}. Assim, investigamos participação da resposta nociceptiva no controle da inflamação aguda neutrofílica induzida pelo modelo de AIA.

A comunicação bidirecional entre o sistema imunológico e nervoso é importante na regulação das respostas imunes. De fato, o modelo AIA desencadeia uma resposta

inflamatória dependente da presença e atividade de neutrófilos¹⁶⁴. Os mediadores inflamatórios produzidos por neutrófilos juntamente com células residentes e outros leucócitos, além de contribuir com a inflamação podem atuar como moléculas neuroestimulatórias, levando ao desenvolvimento da dor periférica e central¹¹⁵. De fato, em infecções cutâneas, neurônios sensoriais podem identificar bactérias diretamente e sinalizar ao sistema imunológico inato para suprimir a resposta imune¹⁶⁵. Ainda, neurônios TRPV1⁺ inibem o recrutamento de neutrófilos para o tecido infectado e modulam a polarização de macrófagos para o perfil M2 em resposta à infecção por *S. aureus*, levando à exacerbação da infecção local¹⁶⁶. Nos pulmões, os nociceptores TRPV1⁺ também suprimiram as funções de neutrófilos, a produção de citocinas pró-inflamatórias e da quimiocina CXCL1 na pneumonia induzida por *S. aureus*¹⁴³. De forma similar, no modelo murino de fasciíte necrosante devido a *S. pyogenes*, a depleção de nociceptores TRPV1⁺ levou ao aumento do recrutamento de neutrófilos e melhorou o controle da infecção¹⁶⁷. De forma interessante, os efeitos do TRPV1⁺ estavam diretamente relacionados a liberação de CGRP pelos nociceptores sendo que a ablação da fibra e/ou seu bloqueio do CGRP por antagonistas do receptor melhoraram a resposta frente a infecção^{143,166,167}

Os nociceptores também modulam a inflamação em modelos não infecciosos. A estimulação a estimulação elétrica nociva de neurônios nociceptivos é capaz de estimular a liberação da L-selectina expressa na membrana celular de neutrófilos da corrente sanguínea, diminuindo o influxo de neutrófilos para o sitio inflamatório na inflamação articular induzida por bradicinina¹⁶⁸. Em modelo de ferida de pele, a ausência de nociceptores Na^v 1.8⁺ que expressão CGRP e substância P, resultou em um aumento de neutrófilos e macrófagos inflamatórios, o que ocasionou um atraso na transição para uma fase anti-inflamatória e pró-reparo, levando à cicatrização prejudicada do tecido¹⁶⁹. Além disso, *in vitro*, o CGRP inibiu a migração de neutrófilos e macrófagos em direção a quimiocinas CXCL1 e CCL2¹⁶⁹. O CGRP também demonstrou diminuir o recrutamento de neutrófilos ao inibir a produção de quimiocinas pelas células endoteliais¹⁷⁰.

De fato, o papel das fibras nociceptivas no controle da resposta inflamatória pode estar associada a liberação de CGRP por esses neurônios. Por outro lado, a liberação de CGRP nas terminações nervosas eferentes do nervo trigêmeo induz vasodilatação, edema e degranulação dos mastócitos durais, que contribuem para a inflamação neurogênica, uma forma estéril de inflamação secundária à ativação do

nervo sensorial, associada a enxaqueca¹³⁸. Entretanto, a vasodilatação promovida pelo CGRP talvez possa facilitar a migração de macrófagos para o sítio inflamatório onde irão adquirir um fenótipo anti-inflamatório, uma vez que o CGRP promove a polarização dessas células para o perfil M2^{169,171,172}.

De forma geral, as funções do CGRP estão relacionadas a expressão de seu receptor, presente em uma série de células imunes, envolvidas tanto na fase inflamatória como pró-resolutiva da inflamação^{169,173}. Ainda, embora a principal fonte de CGRP sejam os neurônios sensoriais, a expressão por outras células do sistema imune como linfócitos T, linfócitos B, monócitos e macrófagos já é descrita¹⁷⁴⁻¹⁷⁷. Aqui mostramos que a expressão de CGRP está aumentada no tecido sinovial e no DRG simultaneamente ao acúmulo de neutrófilos e aumento da apoptose no tecido sinovial, o que nos levou a investigar se o CGRP poderia induzir a apoptose de neutrófilos. Nossos achados *in vitro* demonstram que o CGRP pode induzir a apoptose de neutrófilos. Recentemente, LU *et al.*, 2024 demonstraram que o CGRP não só aumenta a morte de neutrófilos, como também de macrófagos quando na presença de citocinas pró-inflamatória. De forma interessante, o CGRP perde sua função pró-apoptótica em macrófagos não estimulados ou diferenciados em M2, o que ressalta a relevância deste neuropeptídeo para o controle da inflamação por atuar na eliminação de potenciais macrófagos pró-inflamatórios. Além disso, o CGRP aumentou a eferocitose de neutrófilos apoptóticos pelos macrófagos bem como estimulou a polarização de macrófagos para um perfil anti-inflamatório e pró-reparo¹⁶⁹.

Em nossos resultados observamos que a diminuição de neutrófilos recuperados da cavidade sinovial foi simultânea ao aumento de neutrófilos apoptóticos e da eferocitose, indicando a fase de resolução da inflamação. Paralelamente, o CGRP estava aumentado, indicando seu papel potencial na resolução da inflamação. Para aprofundar avaliar o papel do CGRP na AIA, usamos o Fremanezumab (AJOVY), um anticorpo monoclonal humanizado recombinante que se liga seletiva e potientemente ao CGRP bloqueando sua ligação ao receptor, amplamente utilizado no tratamento de enxaqueca¹⁷⁸. O tratamento inicial foi realizado na concentração comumente encontrada na literatura, 30 mg/kg, entretanto, embora tenha havido uma tendência a aumento de neutrófilos após o desafio com o mBSA, não houve diferenças nos parâmetros inflamatórios e resolutivos analisados passados dois ou três dias após o desafio intra-articular (dados não mostrados, descritos no anexo II). Assim, optamos por aumentar a dose de Fremanezumab para 50 mg/kg e

observamos um resultado oposto a esperado, o Fremanezumab levou a uma redução de células totais, que refletiu em uma redução de neutrófilos totais. De forma interessante, a apoptose estava aumentada nesse mesmo tempo, contudo, embora possa ser um indicativo da ação do CGRP, outros experimentos são necessários para levar a esse tipo de afirmação.

Outra ferramenta interessante para se estudar o os efeitos do CGRP são os antagonistas do receptor. O Olcegepant (BIBN4096BS) é um antagonista potente e seletivo para o CGRP, com afinidade a resíduos da porção extracelular de RAMP1^{139,179}. Embora seja amplamente utilizado, não existe um consenso na literatura sobre a concentração de Olcegepant, nós utilizamos a concentração de 30 μ M administradas por via intra-articular nos seguintes desenhos experimentais: I) Tratamento i.a. 24 horas após o desafio e análise 48 horas após o desafio. II) Tratamento 30 μ M i.a. 48 horas após o desafio e análise 72 horas após o desafio. Em ambas análises experimentais as células foram recuperadas da cavidade articular e quantificadas células totais, neutrófilos, células mononucleares, apoptose e eferocitose. De forma unânime, os resultados não apresentam nenhuma diferença entre os grupos AIA e AIA tratados com Olcegepant, todos os grupos artríticos tiveram diferença em relação ao controle (dados não mostrados e descritos no quadro 2/ Anexo II). Concentrações menores do que as utilizadas nesse trabalho já haviam sido utilizadas em outros trabalhos onde demonstraram bloquear as ações do CGRP¹⁸⁰⁻¹⁸³. Ainda, outros trabalhos usam o Olcegepant em tratamentos sistêmicos administrados por via intraperitoneal, inclusive no modelo de artrite induzida por soro onde o Olcegepant inibiu os efeitos do CGRP em camundongos¹⁸⁴. De fato, novos testes precisam ser realizados em novas concentrações e vias de administração, embora também não descartamos problemas relacionados a condições de armazenamento do antagonista.

Em nossos resultados, não conseguimos observar o papel direto do CGRP na inflamação *in vivo*, embora tenhamos observado sua ação induzindo a apoptose *in vitro*. A liberação de neuropeptídeos por neurônios TRPV1⁺ não é restrita ao CGRP. Os nociceptores também liberam outros neuropeptídeos, incluindo substancia P, neurocinina A e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), que assim como o CGRP são descritos por ações pró e anti-inflamatórias¹⁴³. Por exemplo a substancia P, que estimula a liberação de citocinas pro-inflamatórias por monócitos de sangue humano e monócitos/macrófagos murinos também foi demonstrada em atividade anti-

inflamatória ao induzir a polarização de macrófagos ativos para o perfil M2¹⁸⁵. Particularmente no modelo de artrite induzida por colágeno do tipo II, a substância P levou a diminuição da inflamação, alterando o perfil de citocinas pro-inflamatórias para anti-inflamatórias e aumentando a quantidade de macrófagos M2¹⁸⁶. De fato, o papel das fibras TRPV1⁺ pode envolver outras moléculas além do CGRP, assim, resolvemos ampliar nossos estudos e avaliar o papel desses neurônios de forma abrangente e não limitada apenas a função do CGRP.

Uma maneira de se estudar a relação entre a estimulação nociceptiva em um contexto inflamatório é através do silenciamento de fibras nociceptivas. Aqui, utilizamos o RTX, agonista TRPV1, que causa dessensibilização irreversível de neurônios que expressam TRPV1 em camundongos jovens ao afetar a entrada de Ca²⁺ a longo do tempo¹⁴³. O tratamento com RTX leva a perda de neurônios TRPV1⁺ no DRG e gânglios vagais¹⁴³. Em nossos resultados, a eficácia da despolarização por RTX pode ser observada através da presença de pelos brancos despigmentados, uma vez que o estresse induzido por nocicepção leva a despigmentação do pelo pela rápida depleção de células-tronco de melanócitos e também do comportamento animal pelo comportamento nociceptivos dos animais após injeção de capsaicina, o TRPV1¹⁵⁰. Em nossos resultados, o protocolo de dessensibilização por RTX levou a menor nocicepção nos animais com AIA a níveis comparáveis aos animais que receberam injeção intra-articular com o veículo. Além disso, no terceiro dia após o desafio, o pré-tratamento com RTX levou ao aumento do número de leucócitos recuperados na cavidade articular. Nossos dados corroboram com trabalho anterior que mostrou uma maior atividade de neutrófilos na articulação de pata de animais com artrite induzida por soro pré-tratados com RTX¹⁸⁷. Ainda, o pré-tratamento com RTX promoveu a diminuição de neutrófilos apoptóticos e de macrófagos CD206⁺, associados ao perfil M2, na fase pró-resolutiva desse modelo.

Dentre as estratégias farmacológicas no controle da dor inflamatória periférica, os medicamentos analgésicos, como opioides, podem bloquear diretamente a sensibilização constante do nociceptor por meio de ações periféricas¹⁸⁸. O tecido inflamado favorece o aumento da síntese dos receptores opioides μ , δ e κ , que são transportados para os terminais nociceptivos, onde são positivamente regulados¹⁸⁹⁻¹⁹¹. A ligação de opioides a seus receptores pode atenuar a excitabilidade, a propagação dos potenciais de ação dos neurônios nociceptivos TRPV1⁺ e a liberação dos neuropeptídeos dos terminais neuronais centrais e periféricos resultando em

analgesia¹⁹¹. Os opioides também podem se ligar a receptores expressos por células imunes e a modular o ambiente inflamatório por diferentes mecanismos, sendo que diferentes opioides demonstram vários efeitos no sistema imunológico: imunossupressor, imunoestimulatório ou efeito duplo¹⁹². Nós utilizamos a buprenorfina, um opioide semissintético que atua como um agonista parcial do receptor μ para avaliar o papel das fibras nociceptivas no controle da inflamação articular. De forma interessante, foi proposto que a buprenorfina afeta a resposta inflamatória menos do que outros opioides^{193–195}. Estudos que avaliaram o papel da Buprenorfina em modelos de artrite divergem quanto as conclusões: diminuiu marcadores moleculares de estresse inflamatório e oxidativo no modelo murino de artrite induzida por colágeno¹⁹⁶, enquanto não alterou o edema da pata em ratos no modelo de artrite por parede celular estreptocócica e no modelo de artrite induzida por CFA^{197,198}. Aqui, a buprenorfina reduziu a nocicepção a níveis basais, mas não alterou os parâmetros inflamatórios três dias após o desafio com mBSA, por outro lado, os parâmetros de resolução da inflamação, apoptose e eferocitose, foram reduzidos com o tratamento, indicando que a analgesia causada pela Buprenorfina pode interferir na resolução da inflamação atrasando a apoptose de neutrófilos e sua eferocitose.

Outra estratégia farmacológica de modulação da dor é o uso de AINES, agentes importantes para o tratamento da dor inflamatória aguda por inibem a COX-1 e/ou COX-2) e a produção de prostaglandinas¹⁰⁸. Particularmente a PGE₂ sensibiliza os nociceptores periféricos levando à hipersensibilidade mecânica e térmica durante a dor inflamatória^{188,199}. Por outro lado, a COX-2 também está envolvida na resolução da inflamação. Em modelo de pleurisia, o bloqueio de COX-2 reduziu a inflamação em tempos iniciais, onde a produção de PGE₂ foi inibida, porém prolongou a resolução da inflamação, que foi relacionado ao bloqueio da produção de prostaglandina (PG)D₂²⁰⁰. De forma interessante, a síntese dos diferentes mediadores lipídicos parece estar diretamente associada ao longo da resposta inflamatória. A PGE₂ é essencial para a resolução da inflamação mediada por neutrófilos, elas sinalizam o fim ativando a regulação transcricional da 15-lipoxigenase (15-LO), o que por sua vez leva à dissociação temporal e produção de lipoxinas do ácido araquidônico, que têm funções anti-inflamatórias e pró-resolutivas, evento conhecido como troca de classe dos eicosanoides derivados do ácido araquidônico de prostaglandinas e leucotrienos para lipoxinas²⁰¹. Assim, o uso de AINES pode prolongar a inflamação e a dor inflamatória,

ao mesmo tempo em que atrasa a resolução ao suprimir a síntese de PGE₂ e seus efeitos anti-inflamatórios.

No presente estudo, investigamos a participação de vias nociceptivas no controle da inflamação aguda neutrofilica, utilizando como ferramenta o modelo de AIA, nossos principais achados estão representados na figura 26. Na inflamação articular promovida pelo modelo de AIA o aumento do CGRP no DGR e no tecido sinovial ocorreu simultaneamente ao aumento de apoptose de neutrófilos e sua eferocitose, indicando um papel desse neurotransmissor na resolução da inflamação. O tratamento com anticorpo anti-CGRP diminuiu a apoptose de neutrófilos, mas não alterou a eferocitose ou o acúmulo de neutrófilos na cavidade articular. De forma interessante, a depleção química das fibras TRPV1⁺ por RTX levou ao aumento de neutrófilos, a diminuição da apoptose e da eferocitose na cavidade articular e de macrófagos CD206⁺ no tecido sinovial. Ainda, o bloqueio farmacológico da ativação de fibras TRPV1⁺ por Buprenorfina também levou a diminuição da apoptose e da eferocitose na cavidade articular.

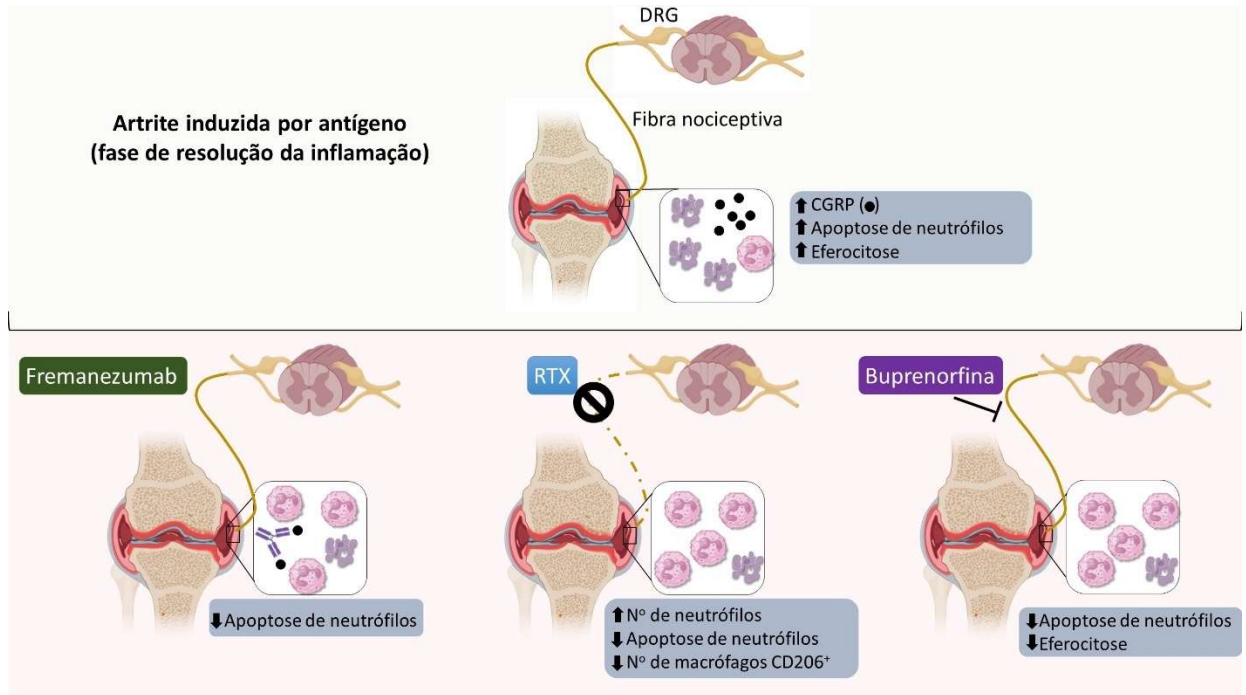


Figura 27: Resumo gráfico. Na inflamação articular da AIA o aumento do CGRP no DRG e no tecido sinovial ocorreu simultaneamente ao aumento de apoptose de neutrófilos e sua eferocitose. O tratamento com anti-CGRP diminuiu a apoptose de neutrófilos. A depleção química das fibras TRPV1⁺ levou ao aumento de neutrófilos, diminuição da apoptose e eferocitose na cavidade articular e de macrófagos CD206⁺ no tecido sinovial. O bloqueio farmacológico da ativação de fibras TRPV1⁺ levou a diminuição da apoptose e eferocitose na cavidade articular.

7. CONCLUSÃO

Nossos estudos demonstraram que a dor articular parece estar relacionada a resolução da inflamação. Os efeitos pro-resolutivos podem, em parte, estar relacionados ao neuropeptídeo CGRP, principalmente por seu papel como indutor na apoptose de neutrófilos, mecanismo chave da resolução da inflamação, entretanto o bloqueio do CGRP por anticorpo anti-CGRP ou antagonista do receptor, não levou a alterações no perfil inflamatório nas concentrações analisadas. De fato, não descartamos o papel do CGRP na modulação da resposta imune, novos estudos são necessários utilizando diferentes concentrações de antagonista e anti-CGRP. Por outro lado, as ações do CGRP também podem estar associadas a outras moléculas liberadas pelos nociceptores TRPV1⁺, uma vez que a depleção química e/ou o bloqueio farmacológico de nociceptores TRPV1⁺ parece atrasar a resolução da inflamação promovendo a manutenção de neutrófilos na articulação e diminuindo sua apoptose. Portanto, novos estudos são necessários para investigar o papel dos nociceptores TRPV1⁺ e das moléculas secretadas por eles na resolução da inflamação articular.

8. REFERÊNCIAS

1. Freire, M. O. & Van Dyke, T. E. Natural resolution of inflammation. *Periodontol 2000* **63**, 149 (2013).
2. Barton, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* **118**, 413 (2008).
3. Medzhitov, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* vol. 140 771–776 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006> (2010).
4. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology* **2005** 6:12 **6**, 1191–1197 (2005).
5. The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World - Guido Majno - Google Livros. https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=IZmZNIq7gCoC&oi=fnd&pg=PR22&ots=vsRx9wMtN&sig=VTpLCgfPtiq3RU0l5F4erE5_Sfs&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
6. Alessandri, A. L. *et al.* Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther* **139**, 189–212 (2013).
7. Roh, J. S. & Sohn, D. H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* **18**, (2018).
8. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008** 454:7203 **454**, 428–435 (2008).
9. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295–298 (1997).
10. Headland, S. E. & Norling, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol* **27**, 149–160 (2015).
11. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology* **2007** 7:10 **7**, 803–815 (2007).
12. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* **2007** 7:9 **7**, 678–689 (2007).
13. Nathan, C. Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* vol. 6 173–182 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1785> (2006).
14. Pruchniak, M. P., Arazna, M. & Demkow, U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir Physiol Neurobiol* **187**, 68–73 (2013).
15. Sherwood, E. R. & Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **18**, 385–405 (2004).
16. Häger, M., Cowland, J. B. & Borregaard, N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med* **268**, 25–34 (2010).
17. Faurschou, M. & Borregaard, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* **5**, 1317–1327 (2003).

18. Kjeldsen, L., Bainton, D. F., Sengelov, H. & Borregaard, N. Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase- containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. *Blood* **82**, 3183–3191 (1993).
19. Borregaard, N., Sehested, M., Nielsen, B. S., Sengeløv, H. & Kjeldsen, L. Biosynthesis of Granule Proteins in Normal Human Bone Marrow Cells. Gelatinase Is a Marker of Terminal Neutrophil Differentiation. *Blood* **85**, 812–817 (1995).
20. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol* **9**, 181 (2014).
21. Borregaard, N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
22. Muller, W. A. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Laboratory Investigation* **82**, 521–533 (2002).
23. Kanwar, S. *et al.* The Association between α 4-Integrin, P-Selectin, and E-Selectin in an Allergic Model of Inflammation. *J Exp Med* **185**, 1077 (1997).
24. Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M. & Amaral, F. A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.894886> **10**, 593–619 (2014).
25. Williams, M. R., Azcutia, V., Newton, G., Alcaide, P. & Luscinskas, F. W. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. *Trends Immunol* **32**, 461 (2011).
26. Hynes, R. O. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549–554 (1987).
27. COTRAN, R. S. & MAJNO, G. The Delayed and Prolonged Vascular Leakage in Inflammation: I. Topography of the Leaking Vessels after Thermal Injury. *Am J Pathol* **45**, 261 (1964).
28. Lämmermann, T. *et al.* Neutrophil swarms require LTB4 and integrins at sites of cell death in vivo. *Nature* **2013 498:7454 498**, 371–375 (2013).
29. Ng, L. G. *et al.* Visualizing the neutrophil response to sterile tissue injury in mouse dermis reveals a three-phase cascade of events. *Journal of Investigative Dermatology* **131**, 2058–2068 (2011).
30. Mayadas, T. N., Cullere, X. & Lowell, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **9**, 181–218 (2014).
31. Condliffe, A. M., Kitchen, E. & Chilvers, E. R. Neutrophil Priming: Pathophysiological Consequences and Underlying Mechanisms. *Clin Sci* **94**, 461–471 (1998).
32. Segal, A. W. HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653> **23**, 197–223 (2004).
33. Nordenfelt, P. & Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J. Leukoc. Biol* **90**, 271–284 (2011).
34. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074942> **30**, 459–489 (2012).

35. Borregaard, N. & Cowland, J. B. Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte.
36. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (1979)* **303**, 1532–1535 (2004).
37. Balloy, V., Sallenave, J. M., Crestani, B., Dehoux, M. & Chignard, M. Neutrophil DNA Contributes to the Antielastase Barrier during Acute Lung Inflammation. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0119OC> **28**, 746–753 (2012).
38. Lee, C.-H. & Choi, E. Y. Macrophages and Inflammation. *Journal of Rheumatic Diseases* **25**, 11–18 (2018).
39. Wilgus, T. A., Roy, S. & McDaniel, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2**, 379 (2013).
40. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. & Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**, 617–654 (2000).
41. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology 2011 11:8* **11**, 519–531 (2011).
42. Cascão, R., Rosário, H. S., Souto-Carneiro, M. M. & Fonseca, J. E. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev* **9**, 531–535 (2010).
43. Wright, H. L., Moots, R. J., Bucknall, R. C. & Edwards, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* **49**, 1618–1631 (2010).
44. Conte, F. de P. *et al.* Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB₄, TNF- α , and CXCL-1. *J Leukoc Biol* **84**, 652–660 (2008).
45. Mathis, S., Jala, V. R. & Haribabu, B. Role of Leukotriene B₄ Receptors in Rheumatoid Arthritis. *Autoimmun Rev* **7**, 12 (2007).
46. Cross, A., Bucknall, R. C., Cassatella, M. A., Edwards, S. W. & Moots, R. J. Synovial fluid neutrophils transcribe and express class II major histocompatibility complex molecules in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 2796–2806 (2003).
47. Assi, L. K. *et al.* Tumor Necrosis Factor α Activates Release of B Lymphocyte Stimulator by Neutrophils Infiltrating the Rheumatoid Joint. *Arthritis Rheum* **56**, 1776 (2007).
48. Rosas, E. C. *et al.* Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: A Target for Discovering New Therapies Based on Natural Products. *Role of Neutrophils in Disease Pathogenesis* (2017) doi:10.5772/INTECHOPEN.68617.
49. Wright, H. L., Moots, R. J. & Edwards, S. W. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology 2014 10:10* **10**, 593–601 (2014).
50. Van den Steen, P. E. *et al.* Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis. *FASEB J* **16**, 379–389 (2002).

51. Katano, M. *et al.* Implication of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. *Arthritis Res Ther* **11**, (2009).
52. Elsaid, K. A., Jay, G. D. & Chichester, C. O. Detection of collagen type II and proteoglycans in the synovial fluids of patients diagnosed with non-infectious knee joint synovitis indicates early damage to the articular cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 673–680 (2003).
53. Baici, A., Salgam, P., Cohen, G., Fehr, K. & Böni, A. Action of collagenase and elastase from human polymorphonuclear leukocytes on human articular cartilage. *Rheumatol Int* **2**, 11–16 (1982).
54. Sopata, I. *et al.* Neutrophil gelatinase levels in plasma and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Rheumatol Int* **15**, 9–14 (1995).
55. Pham, C. T. N. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* **6**, 541–550 (2006).
56. Wang, C. H. *et al.* Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. *J Cell Mol Med* **15**, 850–860 (2011).
57. Chakravarti, A., Raquil, M. A., Tessier, P. & Poubelle, P. E. Surface RANKL of Toll-like receptor 4–stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood* **114**, 1633–1644 (2009).
58. Boff, D. *et al.* Molecular Sciences Neutrophils: Beneficial and Harmful Cells in Septic Arthritis. (2018) doi:10.3390/ijms19020468.
59. Nauseef, W. M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* **219**, 88–102 (2007).
60. Delgado-Rizo, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol* **8**, 81 (2017).
61. Li, Y., Cao, X., Liu, Y., Zhao, Y. & Herrmann, M. Neutrophil extracellular traps formation and aggregation orchestrate induction and resolution of sterile crystal-mediated inflammation. *Frontiers in Immunology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01559> (2018).
62. Schauer, C. *et al.* Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med* **20**, 511–517 (2014).
63. Schett, G., Schauer, C., Hoffmann, M. & Herrmann, M. Why does the gout attack stop? A roadmap for the immune pathogenesis of gout. *RMD Open* vol. 1 Preprint at <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2015-000046> (2015).
64. Boff, D. *et al.* The chemokine fragment CXCL9(74-103) diminishes neutrophil recruitment and joint inflammation in antigen-induced arthritis. *J Leukoc Biol* **104**, 413–422 (2018).
65. Cunha, T. M. *et al.* Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. *Br J Pharmacol* **154**, 460 (2008).

66. Coelho, F. M. *et al.* The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum* **58**, 2329–2337 (2008).
67. Serhan, C. N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* **21**, 325 (2007).
68. Bindu, S., Mazumder, S. & Bandyopadhyay, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochem Pharmacol* **180**, 114147 (2020).
69. Schjerning, A. M., McGettigan, P. & Gislason, G. Cardiovascular effects and safety of (non-aspirin) NSAIDs. *Nature Reviews Cardiology* **2020 17:9 17**, 574–584 (2020).
70. Perretti, M. & D’Acquisto, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology* **2009 9:1 9**, 62–70 (2009).
71. Barnes, P. J., Adcock, I., Spedding, M. & Vanhoutte, P. M. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 436–441 (1993).
72. Miller, A., Stanton, C. & Devery, R. Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipids* **36**, 1161–1168 (2001).
73. Serhan, C. N., Chiang, N. & Dalli, J. The Resolution Code of Acute Inflammation: Novel Pro-Resolving Lipid Mediators in Resolution. *Semin Immunol* **27**, 200 (2015).
74. Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M. & Teixeira, M. M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol* **7**, 160 (2016).
75. Sugimoto, M. A., Vago, J. P., Perretti, M. & Teixeira, M. M. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends Immunol* **40**, 212–227 (2019).
76. Feehan, K. T. & Gilroy, D. W. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med* **25**, 198–214 (2019).
77. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239 (1972).
78. Kroemer, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation* **2009 16:1 16**, 3–11 (2008).
79. Creagh, E. M., Conroy, H. & Martin, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* **193**, 10–21 (2003).
80. McCracken, J. M. & Allen, L. A. H. Regulation of Human Neutrophil Apoptosis and Lifespan in Health and Disease. *J Cell Death* **7**, 15 (2014).
81. Taylor, R. C., Cullen, S. P. & Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008 9:3 9**, 231–241 (2008).
82. Bratton, D. L. & Henson, P. M. Neutrophil Clearance: when the party’s over, cleanup begins. *Trends Immunol* **32**, 350 (2011).
83. Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L. & Henson, P. M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death & Differentiation* **1998 5:7 5**, 551–562 (1998).

84. Segawa, K. & Nagata, S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol* **25**, 639–650 (2015).
85. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784–788 (2000).
86. Lauber, K. *et al.* Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell* **113**, 717–730 (2003).
87. Fadok, V. A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *Journal of Clinical Investigation* **101**, 890–898 (1998).
88. Doran, A. C., Yurdagul, A. & Tabas, I. Efferocytosis in health and disease. *Nature Reviews Immunology* **20**, 254–267 (2019).
89. Rose, D. M. & Liu-Bryan, R. Innate immunity in triggering and resolution of acute gouty inflammation. *Curr Rheumatol Rep* **8**, 209–214 (2006).
90. Schif-Zuck, S. *et al.* Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b^{low} macrophages: Modulation by resolvins and glucocorticoids. *Eur J Immunol* **41**, 366–379 (2011).
91. Mosser, D. M. & Zhang, X. Activation of Murine Macrophages. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* **CHAPTER**, Unit (2008).
92. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* **8**, 958–969 (2008).
93. Huynh, M.-L. N., Fadok, V. A. & Henson, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* **109**, 41 (2002).
94. Kim, S., Elkon, K. B. & Ma, X. Transcriptional Suppression of Interleukin-12 Gene Expression following Phagocytosis of Apoptotic Cells. *Immunity* **21**, 643–653 (2004).
95. Ariel, A. & Serhan, C. N. New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Front Immunol* **3**, (2012).
96. Tavares, L. P. *et al.* Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation. *Pharmacol Res* **159**, 105030 (2020).
97. Serezani, C. H., Ballinger, M. N., Aronoff, D. M. & Peters-Golden, M. Cyclic AMP. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0091TR> **39**, 127–132 (2012).
98. Besedovsky, H., Del Rey, A., Sorkin, E. & Dinarello, C. A. Immunoregulatory Feedback Between Interleukin-1 and Glucocorticoid Hormones. *Science* (1979) **233**, 652–654 (1986).
99. Otmishi, P. *et al.* Neuroimmune Interaction in Inflammatory Diseases. *Clin Med Circ Respirat Pulm Med* **2**, CCRPM.S547 (2008).
100. Li, M. *et al.* Effects of complete Freund's adjuvant on immunohistochemical distribution of IL-1 β and IL-1R I in neurons and glia cells of dorsal root ganglion. *Acta Pharmacologica Sinica* **26**, 192–198 (2005).

101. Steinberg, B. E. *et al.* Cytokine-specific Neurograms in the Sensory Vagus Nerve. *Bioelectron Med* **3**, 7 (2016).
102. Xu, Z. Z. *et al.* Inhibition of mechanical allodynia in neuropathic pain by TLR5-mediated A-fiber blockade. *Nature Medicine* **21**:11 **21**, 1326–1331 (2015).
103. Hosoi, T., Okuma, Y., Matsuda, T. & Nomura, Y. Novel pathway for LPS-induced afferent vagus nerve activation: Possible role of nodose ganglion. *Auton Neurosci* **120**, 104–107 (2005).
104. Chavan, S. S., Pavlov, V. A. & Tracey, K. J. Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity* **46**, 927–942 (2017).
105. Wang, H. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* **421**:6921 **421**, 384–388 (2002).
106. Rosas-Ballina, M. *et al.* Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* **334**, 98 (2011).
107. Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y. & Misawa, H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci* **91**, 1027–1032 (2012).
108. Pinho-Ribeiro, F. A., Verri, W. A. & Chiu, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol* **38**, 5–19 (2017).
109. Millan, M. J. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* **66**, 355–474 (2002).
110. Schaible, H. G. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. *Arthritis Res Ther* **16**, (2014).
111. Cunha, T. M. *et al.* Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* **83**, 824–832 (2008).
112. Kanashiro, A. *et al.* The role of neutrophils in neuro-immune modulation. *Pharmacol Res* **151**, 104580 (2020).
113. Wang, Z. Q. *et al.* A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 869–878 (2004).
114. Trevisan, G. *et al.* TRPA1 receptor stimulation by hydrogen peroxide is critical to trigger hyperalgesia and inflammation in a model of acute gout. *Free Radic Biol Med* **72**, 200–209 (2014).
115. Sachs, D. *et al.* Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *Br J Pharmacol* **162**, 72 (2011).
116. Carreira, E. U. *et al.* Neutrophils recruited by CXCR1/2 signalling mediate post-incisional pain. *Eur J Pain* **17**, 654–663 (2013).
117. Verri, W. A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* **112**, 116–138 (2006).
118. Wise, B. L., Seidel, M. F. & Lane, N. E. The evolution of nerve growth factor inhibition in clinical medicine. *Nature Reviews Rheumatology* **17**:1 **17**, 34–46 (2020).

119. Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S. & Evans, R. M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 1982 298:5871 **298**, 240–244 (1982).
120. Muff, R., Born, W., Lutz, T. A. & Fischer, J. A. Biological importance of the peptides of the calcitonin family as revealed by disruption and transfer of corresponding genes. *Peptides (N.Y.)* **25**, 2027–2038 (2004).
121. Chu, C., Artis, D. & Chiu, I. M. Neuro-immune Interactions in the Tissues. *Immunity* **52**, 464–474 (2020).
122. Martins, D., Tavares, I. & Morgado, C. “Hotheaded”: The role OF TRPV1 in brain functions. *Neuropharmacology* **85**, 151–157 (2014).
123. Sanchez, J. F., Krause, J. E. & Cortright, D. N. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience* **107**, 373–381 (2001).
124. Bullock, C. M. *et al.* Peripheral calcitonin gene-related peptide receptor activation and mechanical sensitization of the joint in rat models of osteoarthritis pain. *Arthritis Rheumatol* **66**, 2188–2200 (2014).
125. Hirsch, S., Corradini, L., Just, S., Arndt, K. & Doods, H. The CGRP receptor antagonist BIBN4096BS peripherally alleviates inflammatory pain in rats. *Pain* **154**, 700–707 (2013).
126. Sun, R. Q. *et al.* Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. *J Neurophysiol* **92**, 2859–2866 (2004).
127. Zaninelli, T. H. *et al.* RvD1 disrupts nociceptor neuron and macrophage activation and neuroimmune communication, reducing pain and inflammation in gouty arthritis in mice. *Br J Pharmacol* **179**, 4500–4515 (2022).
128. McLatchie, L. M. *et al.* RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 1998 393:6683 **393**, 333–339 (1998).
129. Evans, B. N., Rosenblatt, M. I., Mnayer, L. O., Oliver, K. R. & Dickerson, I. M. CGRP-RCP, a Novel Protein Required for Signal Transduction at Calcitonin Gene-related Peptide and Adrenomedullin Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 31438–31443 (2000).
130. Edvinsson, L., Haanes, K. A., Warfvinge, K. & Krause, Di. N. CGRP as the target of new migraine therapies — successful translation from bench to clinic. *Nature Reviews Neurology* 2018 14:6 **14**, 338–350 (2018).
131. Arkless, K., Argunhan, F. & Brain, S. D. CGRP discovery and timeline. *Handb Exp Pharmacol* **255**, 1–12 (2019).
132. Miller, P. S. *et al.* Non-peptidic antagonists of the CGRP receptor, BIBN4096BS and MK-0974, interact with the calcitonin receptor-like receptor via methionine-42 and RAMP1 via tryptophan-74. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 437–442 (2010).
133. Wimalawansa, S. J. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* **11**, 167–239 (1997).

134. Walker, C. S., Conner, A. C., Poyner, D. R. & Hay, D. L. Regulation of signal transduction by calcitonin gene-related peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci* **31**, 476–483 (2010).
135. Drissi, H., Lasmoles, F., Mellay, V. Le, Marie, P. J. & Lieberherr, M. Activation of Phospholipase C- β 1 via G α q/11 during Calcium Mobilization by Calcitonin Gene-related Peptide. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20168–20174 (1998).
136. Fisher, L. A. *et al.* Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin gene-related peptide. *Nature* **1983** 305:5934 **305**, 534–536 (1983).
137. Edvinsson, L., Fredholm, B. B., Hamel, E., Jansen, I. & Verrecchia, C. Perivascular peptides relax cerebral arteries concomitant with stimulation of cyclic adenosine monophosphate accumulation or release of an endothelium-derived relaxing factor in the cat. *Neurosci Lett* **58**, 213–217 (1985).
138. Jacobs, B. & Dussor, G. Neurovascular contributions to migraine: moving beyond vasodilation. *Neuroscience* **338**, 130 (2016).
139. Doods, H. *et al.* Pharmacological profile of BIBN4096BS, the first selective small molecule CGRP antagonist. *Br J Pharmacol* **129**, 420–423 (2000).
140. Paone, D. V. *et al.* Potent, orally bioavailable calcitonin gene-related peptide receptor antagonists for the treatment of migraine: Discovery of N-(3R,6S)-6-(2,3-difluorophenyl)-2-oxo-1-(2,2,2-trifluoroethyl)azepan-3-yl-4-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-imidazo[4,5-b]pyridin-1-yl)piperidine-1-carboxamide (MK-0974). *J Med Chem* **50**, 5564–5567 (2007).
141. Diener, H.-C. *et al.* Prevention of migraine with monoclonal antibodies against CGRP or the CGRP receptor. *Neurol Res Pract* **2**, 1–6 (2020).
142. Gomes, R. N. *et al.* Calcitonin gene-related peptide inhibits local acute inflammation and protects mice against lethal endotoxemia. *Shock* **24**, 590–594 (2006).
143. Baral, P. *et al.* Nociceptor sensory neurons suppress neutrophil and $\gamma\delta$ T cell responses in bacterial lung infections and lethal pneumonia. *Nature Medicine* **2018** 24:4 **24**, 417–426 (2018).
144. Pinho-Ribeiro, F. A. *et al.* Blocking Neuronal Signaling to Immune Cells Treats Streptococcal Invasive Infection. *Cell* **173**, 1083-1097.e22 (2018).
145. Gonçalves, W. A. *et al.* Sensory Ganglia-Specific TNF Expression Is Associated With Persistent Nociception After Resolution of Inflammation. *Front Immunol* **10**, 3120 (2019).
146. Epstein, F. H. & Harris, E. D. Rheumatoid Arthritis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199005033221805> **322**, 1277–1289 (2010).
147. Mellado, M. *et al.* T cell migration in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00384> (2015).
148. Walsh, D. A. & McWilliams, D. F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* **2014** 10:10 **10**, 581–592 (2014).
149. Bessis, N., Decker, P., Assier, E., Semerano, L. & Boissier, M. C. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol* **39**, 469–486 (2017).

150. Zhang, B. *et al.* Hyperactivation of Sympathetic Nerves Drives Melanocyte Stem Cell Depletion. *Nature* **577**, 676 (2020).
151. Kopruszinski, C. M. *et al.* Characterization and preclinical evaluation of a protease activated receptor 2 (PAR2) monoclonal antibody as a preventive therapy for migraine. *Cephalalgia* **40**, 1535–1550 (2020).
152. Kopruszinski, C. M. *et al.* CGRP monoclonal antibody prevents the loss of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in a mouse model of post-traumatic headache. *Cephalalgia* **41**, 749–759 (2021).
153. MCTI.
https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CO_NCEA_n_35_de_11082017.html.
154. Ängeby Möller, K., Johansson, B. & Berge, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J Neurosci Methods* **84**, 41–47 (1998).
155. Barroso, L. C. *et al.* Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Front Immunol* **8**, (2017).
156. Akgul, C., Moulding, D. A. & Edwards, S. W. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* **487**, 318–322 (2001).
157. Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. & Mantovani, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* **80**, 2012–2020 (1992).
158. Kettritz, R. *et al.* Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney Int* **53**, 84–91 (1998).
159. Szolcsanyi, J., Szallasi, A., Szallasi, Z., Joo, F. & Blumberg, P. M. Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **255**, (1990).
160. Davis, M. P., Pasternak, G. & Behm, B. Treating Chronic Pain: An Overview of Clinical Studies Centered on the Buprenorphine Option. *Drugs* **78**, 1211 (2018).
161. Nathan, C. & Ding, A. Nonresolving Inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).
162. Ortega-Gómez, A., Perretti, M. & Soehnlein, O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* **5**, 661–674 (2013).
163. Basil, M. C. & Levy, B. D. Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* vol. 16 51–67 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri.2015.4> (2016).
164. Lopes, F. *et al.* Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **63**, 2651–2660 (2011).
165. Chiu, I. M. *et al.* Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature* **501**, 52 (2013).
166. Huang, C. *et al.* TRPV1+ neurons alter Staphylococcus aureus skin infection outcomes by affecting macrophage polarization and neutrophil recruitment. *BMC Immunol* **24**, 55 (2023).

167. Pinho-Ribeiro, F. A. *et al.* Blocking Neuronal Signaling to Immune Cells Treats Streptococcal Invasive Infection. *Cell* **173**, 1083–1097.e22 (2018).
168. Strausbaugh, H. J. *et al.* Painful stimulation suppresses joint inflammation by inducing shedding of L-selectin from neutrophils. *Nature Medicine* **1999** 5:9 **5**, 1057–1061 (1999).
169. Lu, Y. Z. *et al.* CGRP sensory neurons promote tissue healing via neutrophils and macrophages. *Nature* **2024** 628:8008 **628**, 604–611 (2024).
170. Huang, J., Stohl, L. L., Zhou, X., Ding, W. & Granstein, R. D. Calcitonin Gene-related Peptide Inhibits Chemokine Production by Human Dermal Microvascular Endothelial Cells. *Brain Behav Immun* **25**, 787 (2011).
171. Duan, J. X. *et al.* Calcitonin gene-related peptide exerts anti-inflammatory property through regulating murine macrophages polarization in vitro. *Mol Immunol* **91**, 105–113 (2017).
172. Yuan, K. *et al.* Sensory nerves promote corneal inflammation resolution via CGRP mediated transformation of macrophages to the M2 phenotype through the PI3K/AKT signaling pathway. *Int Immunopharmacol* **102**, (2022).
173. Hanč, P., Messou, M. A., Wang, Y. & von Andrian, U. H. Control of myeloid cell functions by nociceptors. *Front Immunol* **14**, (2023).
174. Wang, X., Xing, L., Xing, Y., Tang, Y. & Han, C. Identification and characterization of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from lymphocytes of the rat. *J Neuroimmunol* **94**, 95–102 (1999).
175. Lee, S. H. & Zhang, J. Heterogeneity of macrophages in injured trigeminal nerves: Cytokine/chemokine expressing vs. phagocytic macrophages. *Brain Behav Immun* **26**, 891–903 (2012).
176. Linscheid, P. *et al.* Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit Care Med* **32**, 1715–1721 (2004).
177. Bracci-Laudiero, L. *et al.* NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: A possible anti-inflammatory action of NGF? *J Neuroimmunol* **123**, 58–65 (2002).
178. Hoy, S. M. Fremanezumab: First Global Approval. *Drugs* **78**, 1829 (2018).
179. Mallee, J. J. *et al.* Receptor activity-modifying protein 1 determines the species selectivity of non-peptide CGRP receptor antagonists. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 14294–14298 (2002).
180. Walker, C. S., Raddant, A. C., Woolley, M. J., Russo, A. F. & Hay, D. L. CGRP receptor antagonist activity of olcegepant depends on the signalling pathway measured. *Cephalalgia* **38**, 437 (2018).
181. Mallee, J. J. *et al.* Receptor activity-modifying protein 1 determines the species selectivity of non-peptide CGRP receptor antagonists. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 14294–14298 (2002).
182. Zhang, Z., Winborn, C. S., De Prado, B. M. & Russo, A. F. Sensitization of Calcitonin Gene-Related Peptide Receptors by Receptor Activity-Modifying Protein-1 in the Trigeminal Ganglion. *The Journal of Neuroscience* **27**, 2693 (2007).

183. Tröltzsch, M., Denekas, T. & Messlinger, K. The calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist BIBN4096BS reduces neurogenic increases in dural blood flow. *Eur J Pharmacol* **562**, 103–110 (2007).
184. Oggero, S. *et al.* Dorsal root ganglia CX3CR1 expressing monocytes/macrophages contribute to arthritis pain. *Brain Behav Immun* **106**, 289 (2022).
185. Lim, J. E., Chung, E. & Son, Y. A neuropeptide, Substance-P, directly induces tissue-repairing M2 like macrophages by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway even in the presence of IFN γ . *Sci Rep* **7**, (2017).
186. Hong, H. S. & Son, Y. Substance P ameliorates collagen II-induced arthritis in mice via suppression of the inflammatory response. *Biochem Biophys Res Commun* **453**, 179–184 (2014).
187. Borbély, É. *et al.* Capsaicin-sensitive sensory nerves exert complex regulatory functions in the serum-transfer mouse model of autoimmune arthritis. *Brain Behav Immun* **45**, 50 (2015).
188. Cunha, T. M. *et al.* Stimulation of peripheral Kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K γ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Mol Pain* **8**, 10 (2012).
189. Fields, H. L., Emson, P. C., Leigh, B. K., Gilbert, R. F. T. & Iversen, L. L. Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature* **1980** 284:5754 **284**, 351–353 (1980).
190. Young, W. S., Wamsley, J. K., Zarbin, M. A. & Kuhar, M. J. Opioid Receptors Undergo Axonal Flow. *Science* (1979) **210**, 76–78 (1980).
191. Endres-Becker, J. *et al.* μ -Opioid Receptor Activation Modulates Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Currents in Sensory Neurons in A Model of Inflammatory Pain. *Mol Pharmacol* **71**, 12–18 (2007).
192. Liang, X., Liu, R., Chen, C., Ji, F. & Li, T. Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. *Transl Perioper Pain Med* **1**, 5 (2016).
193. Martucci, C., Panerai, A. E. & Sacerdote, P. Chronic fentanyl or buprenorphine infusion in the mouse: Similar analgesic profile but different effects on immune responses. *Pain* **110**, 385–392 (2004).
194. D’Elia, M., Patenaude, J., Hamelin, C., Garrel, D. R. & Bernier, J. No detrimental effect from chronic exposure to buprenorphine on corticosteroid-binding globulin and corticosterone immune parameters. *Clinical Immunology* **109**, 179–187 (2003).
195. Gomez-Flores, R. & Weber, R. J. Differential effects of buprenorphine and morphine on immune and neuroendocrine functions following acute administration in the rat mesencephalon periaqueductal gray. *Immunopharmacology* **48**, 145–156 (2000).
196. Hemshekhar, M., Anaparti, V., Hitchon, C. & Mookherjee, N. Buprenorphine Alters Inflammatory and Oxidative Stress Molecular Markers in Arthritis. *Mediators Inflamm* **2017**, (2017).
197. Berke, M. S. *et al.* Effects of buprenorphine on acute pain and inflammation in the adjuvant-induced monoarthritis rat model. *Heliyon* **8**, e11554 (2022).

198. Chakravarthy, K. *et al.* Etanercept ameliorates inflammation and pain in a novel monoarthritic multi-flare model of streptococcal cell wall induced arthritis. *BMC Musculoskeletal Disord* **15**, (2014).
199. Omote, K. *et al.* Effects of a novel selective agonist for prostaglandin receptor subtype EP4 on hyperalgesia and inflammation in monoarthritic model. *Anesthesiology* **97**, 170–176 (2002).
200. Gilroy, D. W. *et al.* Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature Medicine* **1999** 5:6 **5**, 698–701 (1999).
201. Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., Gronert, K. & Serhan, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nature Immunology* **2001** 2:7 **2**, 612–619 (2001).
202. Zheng, D. J., Taka, M. A. & Heit, B. Role of Apoptotic Cell Clearance in Pneumonia and Inflammatory Lung Disease. *Pathogens* **10**, 1–32 (2021).

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 5/2023

Título do projeto: Papel fisiológico do neurotransmissor CGRP na resolução da inflamação articular

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Flavio Almeida Amaral

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Bioquímica e Imunologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 08/05/2023. Validade: 08/05/2023 à 07/05/2028.

Belo Horizonte, 08/05/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II

Estratégia	Molécula	Dose	Via de administração	Tempo de tratamento	Tempo de análise	Principais resultados
1	Fremanezumab	30 mg/kg	Intraperitoneal	6 horas antes do desafio	48 horas após o desafio	Não houve diferença significativa na nocicepção, células recuperadas no lavado sinovial (células totais, neutrófilos, células mononucleares) e na quantificação de MPO e IL-1 β no tecido periarticular entre os grupos com AIA tratados e não tratados.
2	Fremanezumab	30 mg/kg	intraperitoneal	48 horas após o desafio	72 horas após o desafio	Não houve diferença significativa na nocicepção, células recuperadas no lavado sinovial (células totais, neutrófilos, células mononucleares), apoptose e eferocitose entre os grupos com AIA tratados e não tratados. Porém, o grupo não tratado teve um aumento significativo da eferocitose em relação ao controle, não observada no grupo tratado.
3	Olcegepant	30uM	Intra-articular	24 horas após o desafio	48 horas após o desafio	Não houve diferença significativa na nocicepção e células recuperadas no lavado sinovial (células totais, neutrófilos, células mononucleares) entre os grupos com AIA tratados e não tratados.
4	Olcegepant	30uM	Intra-articular	48 horas após o desafio	72 horas após o desafio	Não houve diferença significativa na nocicepção, células recuperadas no lavado sinovial (células totais, neutrófilos, células mononucleares), apoptose e eferocitose entre os grupos com AIA tratados e não tratados.

Quadro 2: Estratégias experimentais e principais resultados.