Milena Fernandes de Freitas

**Mecanismos centrais da dor músculo-esquelética induzida
por carragenina em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2012**

Milena Fernandes de Freitas

**Mecanismos centrais da dor músculo-esquelética induzida
por carragenina em ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur

Versão original

**São Paulo
2012**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Freitas, Milena Fernandes de.

Mecanismos centrais da dor músculo-esquelética induzida por carragenina em ratos / Milena Fernandes de Freitas. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Marucia Chacur.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Neuroanatomia funcional da dor.

Versão do título para o inglês: Central mechanisms of musculoskeletal pain induced by carrageenan in rats.

1. Carragenina 2. Dor músculo-esquelética 3. Hiperálgia 4. Mediadores nociceptivos I. Chacur, Profa. Dra. Marucia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB088/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Milena Fernandes de Freitas.

Título da Dissertação: Mecanismos centrais da dor músculo-esquelética induzida por carragenina em ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Marucia Chacur.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: ep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **034** nas fls. **55** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Marucia Chacur, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Envolvimento das células da glia e TNF α em modelo de lesão muscular em ratos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Milena Fernandes de Freitas e o pesquisador Luiz Roberto G. de Britto** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **29.05.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 29 de maio de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
	<small>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</small>

SOLICITAÇÃO DE RENOVAÇÃO DE PROTOCOLO - CEUA

Ao

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais-ICB/USP

Solicito à Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB/USP a renovação do protocolo nº **034**, nas fls. **55** do livro **02**, aprovado em 29/05/2008, intitulado **"Envolvimento das células da glia e TNFa em modelo de lesão muscular em ratos"** sob minha responsabilidade.

Declaro que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas inicialmente para esta presente solicitação.

São Paulo, 06 /05/2011

RECEBI ORIGINAL

27 / 5 / 11
[Assinatura]

Prof. Dr. [Assinatura]

Coordenador da Linha de Pesquisa

**Dedico este trabalho à minha família,
em especial à minha mãe por ter me
dado todo apoio e incentivo para a
realização deste trabalho e por
simplesmente ter sido a melhor mãe do
mundo durante toda a sua existência.**

Obrigada ♥

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado durante esta jornada e que de alguma forma me ajudaram a tornar tudo isso possível.

À minha mentora intelectual, Profa. Dra. Marucia Chacur, pela orientação, apoio, incentivo constante e confiança, a quem serei eternamente grata. “Maru, você é uma pessoa incrível, excelente profissional e acima de tudo uma pessoa com quem podemos sempre contar, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Você tem toda minha admiração, e espero conseguir um dia ser como você. Obrigada!”

Aos meus amigos da família neurodor, Pri, Li, Mara, Rê, Jójó, Dani e Fabio, pessoas que estiveram comigo todos esses dias acertando e errando experimentos e discutindo sobre a ciência... mas, muito além disso, que me fizeram rir todos os dias e me abraçaram naqueles dias mais difíceis e seguraram as pontas enquanto eu passava pelo momento mais difícil de minha vida. Vocês são de longe os melhores amigos que eu poderia pedir. Amo muito vocês.

Aos meus amigos do departamento, especialmente aos membros do lab. de metabolismo ósseo, ao LBCAF e agregados. Vocês desde o início fizeram os meus dias mais divertidos! Estar com vocês é certamente motivo de uma alegria imensa! Mabi, Cris, Felix, Miguel, Cleyton. Muito mais do que me fazer sorrir, hoje vocês são um porto seguro pra mim.

Ao Prof. Luiz Roberto Giorgetti de Britto, pelo exemplo como ser humano, chefe, docente e pesquisador, e a todos os seus alunos (mais antigos), meus queridos amigos que carrego no coração e sinto muita saudade! E também àqueles que hoje não estão mais no lab mas que passaram por lá e me ajudaram muito. Meus agradecimentos especiais ao Dids, sempre muito disposto a ajudar, e à Rozinha (hoje no sírio), por estar sempre por perto e me ajudar em minha formação desde o iníciozinho. Admiro muito vocês como profissionais e pessoas. Muito obrigada!

À Comissão de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais e ainda a todos os profissionais do departamento por terem dado suporte para a realização deste projeto, do início ao fim. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para realização deste projeto.

Ao laboratório do Prof. Roelf-Detlef Treede (Zentrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg), que me recebeu tão bem (em pleno inverno alemão) e que me deu suporte e cedeu o espaço para que eu pudesse aprender eletrofisiologia e trazer esses conhecimentos para o nosso lab. Meus agradecimentos especiais ao pesquisador Uli Hoheisel (meu chefinho, mentor, mestre) que me ensinou tudo com tanto bom humor e paciência – Science is fun! Agradeço ainda às pessoas que foram essenciais para a minha estadia naquela cidadezinha tão gelada – Meike und Marius, Sie sind erstaunlich, danke für alle, viel Liebe!

Agradeço ainda aos meus amigos de toda a vida, minhas meninas Bia, Dani, Fabi, Mari e Carol. Somos a prova viva de como o amor de verdade não separa nada, no matter what! É muito amor! E ainda meus especiais agradecimentos aos meus amigos de faculdade. Carrego todos no coração, “Mackenzie minha vida, Mackenzie meu amor!”. Mabi, minha companheira de dias bons e ruins, você é minha irmã! Me aguenta, tem (ou não) paciência comigo, me ouve, me consola, me ajuda e briga comigo. Agradeço por ter você em minha vida, eu te amo muito, e hoje, sem você eu nem sei o que seria de mim! Sem vocês todos eu jamais teria forças pra continuar. Obrigada por me mostrar que a vida ainda pode ser divertida e me mostrar que depois de toda tempestade vem um arco-íris.

Agradeço acima de tudo à minha família, que se mostrou tão forte no momento mais difícil da vida de todos nós. É muito difícil acreditar que tudo isso aconteceu. A mãe nos deixou de uma forma muito inesperada e o buraco dentro dos nossos corações não tem tamanho. Pai, o senhor é a razão pela qual ainda quero viver, para cuidar de você e te dar muito orgulho. Meu suporte, minha base, meu chão. É um amor to incondicional que não cabe nas palavras. Você é meu exemplo, meu herói. Meus irmãos, Guto e Rique, mais do que irmãos mais velhos vocês são meu braço direito e esquerdo. Agradeço à minha cunhada Livia, que hoje é uma irmã pra mim. Obrigada por me confortarem nas noites mais difíceis e cuidarem de mim com tanto amor.

Mãe, onde quer que você esteja, obrigada por ter me amado tanto e ter me dado tanto apoio, incondicionalmente, para realizar tudo o que eu sempre quis. A falta, a saudade, são coisas muito difíceis de lidar, mas as boas lembranças e amor vão ficar para sempre. Nunca vai existir alguém como você. Eu te amo muito e sinto sua falta todos os dias da minha vida. Sei que você sempre vai me acompanhar daí de cima e que não é à toa que toda vez que olho para o céu, a estrela mais brilhante está sempre bem em cima de mim.

“And in the end, the love you take is equal to the love you make”

(The Beatles)

RESUMO

Freitas MF. Mecanismos centrais da dor músculo-esquelética induzida por carragenina em ratos. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A estimulação química das fibras aferentes nociceptivas através da injeção de diferentes substâncias álgicas vem sendo estudada em modelos de dor muscular em animais. É sabido que a dor músculo esquelética está envolvida na modulação e sustentação das fibras aferentes do grupo III e IV após inflamação muscular. A carragenina é um dos agentes que produz inflamação aguda e é freqüentemente utilizada em modelos de dor muscular. O nosso objetivo é observar, aprofundar nossa compreensão e explorar em maior detalhe a participação das células gliais (astrócitos e microglia), de citocinas pró-inflamatórias, prostanóides e do óxido nítrico, após a indução de miosite aguda, correlacionando com modelos comportamentais nociceptivos. Para tanto, serão avaliadas as atividades dos mediadores, previamente descritos, na medula espinal dos ratos com e/ ou sem indução de miosite, através do método de Western blotting. Tais investigações poderão vir a ser uma abordagem totalmente inovadora para tentar entender porque, como e quais são alguns dos mediadores envolvidos neste modelo de dor. Assim, os dados obtidos neste projeto poderão elucidar os mecanismos envolvidos na dor músculo-esquelética, a qual se enquadra nas patologias de difíceis tratamentos e de grande relevância clínica.

Palavras-chave: Carragenina. Dor músculo-esquelética. Hiperalgesia. Mediadores nociceptivos.

ABSTRACT

Freitas MF. Central mechanisms of musculoskeletal pain induced by carrageenin in rats. [Masters thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Chemical stimulation of nociceptive afferent fibers through the injection of different substances has been studied in different models of muscle pain in animals. It is known that musculoskeletal pain is involved in the modulation and maintenance of the afferent fibers of group III and IV after muscle inflammation. Carrageenan is one of the agents that produce inflammation and is often used in models of muscle pain. Our goal is to observe, to understand and to explore in greater detail the involvement of glial cells (astrocytes and microglia), pro-inflammatory cytokines, prostanoids and nitric oxide after induction of acute myositis and correlate it with nociceptive behavioral models. It will be assessed the activity of these mediators in the spinal cord after induction of myositis in rats, using Western blotting assay. Such investigations may be a totally new approach to try to understand why and how some of the mediators are involved in this kind of pain. Thus, the data obtained in this project will elucidate the mechanisms involved in musculoskeletal pain, which are of difficult treatment and of great clinical relevance.

Keywords: Carrageenan. Musculoskeletal pain. Hiperalgisia. Nociceptive mediators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Local da injeção de carragenina: músculo gastrocnêmio de ratos.....	27
Figura 2 -	Ilustração do aparelho para uso do teste comportamental: Von Frey Eletrônico.....	28
Figura 3 -	Ilustração do Teste de Hargreaves ou Teste da Placa Quente.....	29
Figura 4 -	Ilustração esquemática do campo aberto.....	31
Figura 5 -	Curva dose-resposta da carragenina.....	38
Figura 6 -	Efeito da carragenina sobre a atividade motora dos animais.....	39
Figura 7 -	Efeito da miosite aguda induzida pela injeção intramuscular de carragenina sobre o limiar de dor em ratos	41
Figura 8 -	Histologia do músculo gastrocnêmio	42
Figura 9 -	Efeito do tratamento com fluorocitrato sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina.....	44
Figura 10 -	Efeito do tratamento com minociclina sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina.....	46
Figura 11 -	Efeito do tratamento com 7Ni sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina.....	48
Figura 12 -	Efeito do tratamento com L-NIL sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina.....	50
Figura 13 -	Efeito do tratamento com anti-TNF- α sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina	52
Figura 14 -	Efeito do tratamento com celecoxibe sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina	54
Figura 15 -	Ilustração das diferentes camadas da medula espinal de acordo com a nomenclatura de Rexed.....	55
Figura 16 -	Quantificação da atividade de nNOS ao redor do canal central da medula espinal de ratos com miosite	56

Figura 17 -	Imagens digitais de cortes transversais da porção lombar da medula espinal de ratos submetidos à miosite e tratados com fluorocitrato.....	57
Figura 18 -	Efeito da NADPH diaforase na medula espinal após a injeção de carragenina.....	58
Figura 19 -	Imagens digitais de cortes transversais da porção lombar da medula espinal de ratos submetidos à miosite aguda.....	58
Figura 20 -	Efeito do fluorocitrato na ativação astrocitária da medula espinal de ratos com miosite.....	60
Figura 21 -	Efeito do fluorocitrato e da minociclina na ativação microglial da medula espinal de ratos com miosite.....	62
Figura 22 -	Efeito do inibidor da nNOS no modelo de miosite aguda em ratos.....	65
Figura 23 -	Efeito do inibidor de TNF- α no modelo de miosite aguda em ratos.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7Ni	7-Nitroindazol
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
APS	Ammonium Persulfate (Persulfato de amônio)
BSA	Bovin Serum Albumine (Albumina de Soro Bovino)
CDME	Corno Dorsal da Medula Espinal
Cg	Carragenina
cGMP	GMP cíclico
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-1	Ciclooxygenase tipo 1
COX-2	Ciclooxygenase tipo 2
DTT	Ditiotreitol
ECL	Eletroquimioluminescência
EDTA	thylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal endotelial
Flu	Fluorocitrato
Gc	Gastrocnêmio
GFAP	Proteína Fibrilar Acídica Glial
HE	Hematoxilina-eosina
IHC	Imuno-histoquímica
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
i.m.	Intramuscular
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratecal
L3	Terceira Vértebra Lombar
L4	Quarta Vértebra Lombar
L5	Quinta Vértebra Lombar
L6	Sexta Vértebra Lombar

LE	Frequência de Levantar
L-NIL	N6-(1-iminoethyl)-Liysine-dihydrochloride
LO	Frequência de Locomoção
Mino	Minociclina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato reduzida
NADPHd	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato reduzida diaforase
NGF	Fator de Crescimento Neuronal
NMDA	N-metil D-Aspartato
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O2	Oxigênio
PB	Tampão Fosfato
PFA	Paraformaldeído
PGE2	Prostaglandina E2
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoreto De Fenilmetilsulfonil)
RNA	Ácido Ribonucléico
S-I	Córtex Sensorial Primário
S-II	Córtex Sensorial Secundário
Sal	Salina
s.c.	Subcutânea
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TEMED	Tetramethyl ethylene diamine (Tetrametil etileno diamino)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VPL	Núcleo Talâmico Ventral Pósterio-Lateral
VPM	Núcleo Talâmico Ventral Pósterio-Medial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1 Dor muscular	16
1.2 Dor: Considerações Gerais	18
1.3 Células da glia e nocicepção.....	20
1.4 Atuação das prostaglandinas no processo nociceptivo.....	22
1.5 Citocinas pró-inflamatórias	22
1.6 Óxido Nítrico.....	23
1.7 Justificativa e hipótese	25
1.8 Objetivos específicos.....	25
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Animais.....	27
2.2 Procedimento cirúrgico - Indução da miosite	27
2.3 Avaliação da sensibilidade dolorosa	28
2.3.1 <i>Teste da hiperalgesia mecânica – Von Frey eletrônico.....</i>	<i>28</i>
2.3.2 <i>Teste da hiperalgesia térmica – Hargreaves test.....</i>	<i>29</i>
2.4 Avaliação da atividade geral – Teste do campo aberto.....	30
2.5 Administração intratecal das drogas	31
2.6 Tratamentos farmacológicos	32
2.7 Ensaios de Imuno-histoquímica	33
2.8 Ensaios de Western Blotting	33
2.9 Histoquímica - NADPHd.....	34
2.10 Técnica Histológica - HE.....	35
2.11 Análise estatística.....	36
3 RESULTADOS	37
3.1 Curva dose-resposta da carragenina	37
3.2 Avaliação da atividade locomotora – teste do campo aberto.....	39
3.3 Caracterização da hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção i.m. de Cg	40
3.4 Morfofisiologia do m. gastrocnêmio de ratos submetidos à indução de miosite aguda	42
3.5 Efeito do tratamento com fluorocitrato na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela miosite.....	43
3.6 Efeito do tratamento com minociclina na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção de Cg.	45

3.7 Efeito do tratamento com 7-Ni na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção de Cg	47
3.8 Efeito do tratamento com L-NIL na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção de Cg	49
3.9 Efeito do tratamento com anti-TNF- α na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção de Cg	51
3.10 Efeito do tratamento com celecoxibe na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção de Cg	53
3.11 Ensaios de Imuno-Histoquímica	55
3.11.1 Envolvimentos das células NO positivas ao redor do canal central da medula espinal	55
3.12 Análise histoquímica - NADPHd	57
3.13 Ensaios de Western Blotting	59
3.13.1 Efeito das células da glia na medula espinal de animais com miosite e animais tratados com inibidores gliais... ..	59
3.13.2 Efeito da miosite aguda sob a atividade de nNOS na medula espinal de ratos	63
3.13.3 Efeito da miosite aguda sob a atividade de TNF- α na medula espinal de ratos	64
4 DISCUSSÃO	65
5 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXO – Outras atividades realizadas no período.....	86

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Dor muscular

A dor aguda é de ocorrência quase universal e constitui sintomas que primariamente alerta os indivíduos para a necessidade de assistência médica (Teixeira et al., 1994). Ocorrem anualmente aproximadamente 50 milhões de lesões traumáticas, e mais de 15 milhões de indivíduos apresentam câncer e frequentemente episódios de dor aguda nos EUA. Em 1980, aproximadamente 23 milhões de cirurgias foram realizadas nos EUA e resultaram na ocorrência de dor moderada ou intensa em mais de 70% dos casos. Os traumatismos do tegumento e das estruturas musculoesqueléticas advindos de acidentes ou induzidos por procedimentos terapêuticos são a causa mais freqüente de dor aguda (Teixeira e Pimenta, 1994). Há dor persistente especialmente na região lombar, quadris, joelhos e outras articulações em 11 a 14% da população geral (Crook et al., 1984; McFarlane, 1999).

Para traçar um perfil das dores que o brasileiro mais reclama, a Pfizer realizou em 2008 em parceria com o Ibope, a pesquisa “Dor no Brasil”, que apontou a dor de coluna como uma a mais grave, a que mais incomoda e a que mais atrapalha as atividades profissionais. Mas apesar de a dor nas costas ser considerada a mais incômoda, a dor de cabeça ainda é considerada a mais normal, tendo sido citada por 92% dos entrevistados. Vários aspectos da relação do brasileiro com a dor foram revelados pelo estudo. A dor interfere na vida das pessoas de diferentes formas, seja tirando o sono (43%) ou atrapalhando o trabalho (42%). Apesar de dores em geral fazerem parte da rotina dos brasileiros - 51% relataram alguma ocorrência na semana anterior à entrevista para a pesquisa e apenas 42% destes procuram um médico quando a dor é reincidente. É alto o índice de automedicação e aproximadamente metade das pessoas entrevistadas (49%) se considera resistente à dor.

A maior parte dos nossos conhecimentos ligados aos mecanismos de dor são baseados em estudos de tecido cutâneo. Relativamente pouco se sabe sobre a ativação de nociceptores viscerais e de articulações, e tão pouco sobre nociceptores musculares. Os nociceptores musculares são terminações nervosas livres que estão conectadas ao SNC por fibras mielinizadas finas, ou fibras não-mielinizadas. Histologicamente, elas compreendem fibras mielínicas finas (grupo III) e amielínicas (grupo IV), de acordo com a nomenclatura numeral romana sugerida por Lloyd (1943) (Lloyd, 1943). Estudos em animais experimentais (gatos e ratos) detectaram unidades amielínicas aferentes que têm campo receptivo em diferentes tecidos. Algumas unidades tiveram campo receptivo profundo (articulações, músculos ou

periósteo) e outras na pele, distal ao campo receptivo profundo. A base anatômica destas características provavelmente envolve um desvio da próxima fibra aferente para o seu término (Mense, 1981).

A estimulação química da fibra aferente nociceptiva através da injeção de diferentes substâncias álgicas vem sendo estudada em modelos de dor muscular em animais (Graven-Nielsen et al., 2001). É sabido que a dor músculo esquelética está envolvida na modulação e sustentação das fibras aferentes do grupo III e IV após inflamação muscular. A carragenina é um dos agentes que produz inflamação aguda e é freqüentemente utilizada em modelos de dor muscular. Estudos mostram que a injeção unilateral de carragenina no gastrocnêmio ou na articulação do joelho induz hiperalgesia bilateral (Radhakrishnan et al., 2003). Ainda, durante inflamação periférica, o NO endógeno pode estar envolvido na sensibilização central observada em modelos de dor muscular (Aley et al., 1999).

Com relação aos mediadores envolvidos durante patologias musculares, foi demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias, como o $TNF\alpha$, têm sido associadas a essas patologias. Entretanto, o papel destas citocinas na dor músculo-esquelética é ainda pouco explorado. Estudos demonstraram que o aumento de níveis de $TNF\alpha$ no músculo esquelético pode induzir a ativação de receptores para $TNF\alpha$ e/ou estimular a produção de outras citocinas pro-inflamatórias (Alvarez et al., 2002; Zhang et al., 2000). Ainda, Schäfers et al. (2003) mostraram que a injeção intramuscular de $TNF\alpha$ induz hiperalgesia e aumenta a liberação de mediadores hiperalgésicos como fator de crescimento neuronal-NGF, CGRP e prostaglandina E_2 (PGE_2) (Schafers et al., 2003).

Muitas dores musculares, incluindo as induzidas por exercícios, parecem ter origem no músculo inflamado. Estudos mostram a liberação de citocinas durante a dor muscular induzida pelo exercício e estas citocinas ou quimiocinas liberadas parecem possuir um papel importante no tecido muscular. Ainda, estudos mostram um aumento da concentração de interleucinas dos tipos 1 e 6 após injeção de carragenina no músculo gastrocnêmio, bem como um aumento da resposta hiperalgésica induzida pela carragenina durante a dor músculo-esquelética (Loram et al., 2007).

Existem poucos dados na literatura a respeito do papel das células gliais em modelos de lesão muscular periférica. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos durante este processo, dentre eles o envolvimento da célula da glia e de mediadores por elas liberadas podem contribuir para aperfeiçoar os tratamentos clínicos empregados durante a dor músculo-esquelética. Alterações patológicas no tecido muscular esquelético, como por exemplo, durante a resposta inflamatória, freqüentemente se manifestam na presença de dor e

alodinia. Estas alterações são usualmente atribuídas a mudanças que ocorrem nos nociceptores causados pela liberação de substâncias pró-inflamatórias no tecido lesionado. Estudos realizados pelo grupo do Prof. Dr. Siegfried Mense da Universidade de Heidelberg - Alemanha demonstraram que uma inflamação crônica no músculo gastrocnêmio de ratos induz alterações neuroplásticas em neurônios do corno dorsal da medula espinal, sendo esta sensibilização central a base para a dor espontânea e hiperalgesia observada em pacientes (Hoheisel et al., 2000, 2005; Tenschert et al., 2004). Ainda, estudos realizados pelo mesmo grupo demonstraram que lesões no nervo ou inflamação muscular induzem alterações morfológicas algumas horas após lesão (Hoheisel et al., 1998), e que a miosite crônica induzida no músculo esquelético leva, além de alterações dos neurônios do corno dorsal, à alterações morfológicas e funcionais de astrócitos (Tenschert et al., 2004).

1.2 Dor: Considerações Gerais

Em 2008 a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), definiu a dor como uma “experiência sensitiva e emocional associada ao dano tecidual real ou potencial ou à descrição destes danos“. A dor, portanto é um processo cognitivo que depende de memória, aspectos culturais e psíquicos (Loeser et al., 2008).

Os neurônios responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva possuem, na periferia, terminações nervosas livres de alto limiar (nociceptores) responsáveis pela detecção dos estímulos nocivos. As fibras nervosas nociceptivas que transmitem a mensagem ao sistema nervoso central (SNC) são fibras aferentes primárias mielinizadas de pequeno calibre (fibras A δ), também chamadas fibras do grupo III, com velocidade de condução de 5-30 m/s e respondem a estímulos térmicos e mecânicos; e as fibras não-mielinizadas (fibras C), também chamadas fibras do grupo IV, com baixa velocidade de condução (< 1 m/s) e respondem a estímulos de origem térmica, mecânica e química (Coggeshall et al., 1983; Julius et al., 2001).

Tecidos intactos quando sofrem estimulação nociva ativam o reflexo de retirada impedindo lesão adicional, sendo essa dor considerada fisiológica, pelo seu caráter protetor. Porém quando o tecido é inflamado ou sofre lesão é gerada a dor patológica. Nesse caso, ocorre o mecanismo de sensibilização periférica e central. Esse mecanismo envolve a liberação de mediadores químicos no local da lesão e nas regiões do SNC relacionadas, o que intensifica a transmissão nociceptiva durante esse processo. A dor pode ocorrer espontaneamente e/ou ainda por fenômenos de sensibilização, traduzidos pelo aumento da resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia), bem como pela presença de dor em resposta a

estímulos não nocivos (alodinia) (Besson, 1999; Kidd et al., 2001; Millan, 1999; Urban et al., 1999).

Várias substâncias sintetizadas e/ou liberadas durante o processo inflamatório tais como cininas, eicosanóides, neuropeptídeos (Substância P, Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina-CGRP e Neurocinina A), citocinas, espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, entre outros, podem interferir com a atividade de fibras nervosas sensitivas aferentes (Ferreira et al., 1994). A liberação sequencial de mediadores responsáveis pelo quadro hiperalgésico foi demonstrada em resposta a determinados agentes lesivos. Estes mediadores, através da atuação em receptores específicos e geração de segundos mensageiros, agem: a) ativando diretamente os nociceptores, causando dor (bradicinina, histamina e substância P, por exemplo) ou b) induzindo hiperalgesia (como: eicosanóides, serotonina, dopamina). Alguns dos mediadores que ativam diretamente os nociceptores podem também acarretar hiperalgesia, pela liberação de agentes hiperalgésicos (Machelska et al., 2002).

Outro importante mediador do processo nociceptivo é o óxido nítrico (NO). Vários estudos têm mostrado que o NO interfere com o desenvolvimento da resposta inflamatória e com a nocicepção, podendo ter efeitos tanto pró ou antiinflamatório como nociceptivo ou antinociceptivo dependendo da concentração, do local de atuação e do modelo utilizado para a avaliação da sensibilidade dolorosa (Cudeiro et al., 1999; Sousa et al., 2001). Alguns dados da literatura têm evidenciado também que células da glia da medula espinal, por meio de liberação de mediadores nociceptivos dentre eles o NO, têm papel relevante para a transmissão da informação nociceptiva no sistema nervoso central.

A propagação da dor é iniciada pela geração de potenciais de ação nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, classificadas como fibras C e A δ , descritas anteriormente. Os neurônios aferentes primários, uma vez ativados, fazem conexões, diretas ou indiretas, com neurônios intrínsecos na coluna posterior da medula espinal (CDME) que são classificados como: neurônios de projeção - que levam a informação nociceptiva para centros supraespinais; interneurônios excitatórios - que levam os impulsos sensoriais para os neurônios de projeção; ou interneurônios inibitórios - que regulam o fluxo de informação nociceptiva para as áreas mais altas (Kandell et al., 1991). Os neurônios de projeção levam a informação nociceptiva, por diferentes vias ascendentes, para estruturas do tronco encefálico e diencefalo (Millan, 1999). Dentre as principais projeções supraespinais da via nociceptiva estão os tratos espinomesencefálico, espinoreticular, espino-hipotalâmico e espinotalâmico, sendo este último o mais proeminente na condução do impulso nocivo (Kandell e Schwartz, 1991). A via espinotalâmica projeta-se para os núcleos talâmicos específicos (ventral pósterio-

lateral (VPL) e ventral póstero-medial (VPM), envolvidos com os componentes discriminativos da sensibilidade dolorosa e para núcleos talâmicos inespecíficos, relacionados com os componentes afetivos da dor. No tálamo ocorre a recepção, integração e transferência do potencial nociceptivo para o córtex cerebral, onde a informação pode ser somatotopicamente organizada (Craig et al., 1999). Baseando-se em critérios funcionais, as principais regiões corticais envolvidas na resposta dolorosa são os córtices sensorial primário (S-I), secundário (S-II) e motor (ou giro pré-central) (Bromm et al., 1987; Schnitzler et al., 2000). Entretanto, foi observado que pacientes com lesões cerebrais específicas, particularmente no córtex S-I, são ainda capazes de sentir dor (Brooks et al., 2005). Desta maneira a relevância dessas regiões corticais durante a percepção da resposta nociceptiva ainda permanece sem ser elucidada.

1.3 Células da glia e nocicepção

Nas últimas duas décadas, diversos estudos têm voltado sua atenção as células gliais, principalmente astrócitos e microglia, com o intuito de melhor esclarecer suas funções em modelo de dor experimental. Vários aspectos da contribuição nociceptiva da glia espinal foram reforçados, a um ponto em que elas agora aparecem como células de meta para o futuro (Milligan et al., 2002; Scholz et al., 2007; Tsuda et al., 2005). Centralmente, a glia é formada pela macroglia (oligodentrócitos e astrócitos) e pela microglia (Haydon, 2001). Os astrócitos constituem cerca de 50% das células gliais (Kimmelberg, 1983), contribuindo para a homeostasia e para a regulação de concentrações de íons K^+ . Evidências recentes têm demonstrado a existência de interação entre astrócitos e neurônios (Araque et al., 2001; Perea et al., 2002). Estas evidências estão baseadas em estudos empregando células em cultura e mostraram que neurotransmissores liberados por neurônios induzem, nos astrócitos, aumento dos níveis intracelulares de Ca^{++} , com consequente liberação de glutamato. O glutamato, uma vez liberado, modula a excitabilidade neuronal e o aumento da transmissão sináptica (Haydon, 2001). Os oligodentrócitos são responsáveis pela mielinização das fibras nervosas no SNC e podem ser considerados como equivalente às células de Schwann no sistema nervoso periférico. A microglia é caracterizada pela presença de células pequenas e ovais (Streit et al., 1988). A microglia é o primeiro tipo de célula a responder a diversos tipos de injúria. A ativação microglial envolve um padrão de resposta celular estereotipado, com proliferação e recrutamento celular para o local da lesão, aumento da expressão de

imunomoléculas e mudanças funcionais, incluindo a liberação de mediadores citotóxicos e/ou inflamatórios (Colburn et al., 1999).

As células da glia sintetizam várias substâncias, muitas das quais são também liberadas por neurônios nociceptivos que modulam a resposta nociceptiva, dentre as quais podemos citar as prostaglandinas, o glutamato, o ácido araquidônico, o óxido nítrico (NO) e as citocinas (Agullo et al., 1995; Hartung et al., 1988; Marriott et al., 1991; Stella et al., 1994). Concomitante, as mudanças de longa duração que ocorrem nestas células também incluem alterações estruturais, a proliferação celular, perda de neurotransmissor ou capacidades tampão-íon, liberação de mediadores pró-inflamatórios ou proalgesia e neurotoxicidade. Surpreendentemente, muitos modelos de dor crônica investigados até agora resultaram em muitas mudanças fenotípicas da glia, principalmente na medula espinal (a primeira retransmissão sináptica na via nociceptiva), mas também em estruturas cerebrais superiores (Hains et al., 2006) e no sistema nervoso periférico (Ohtori et al., 2004; Rothermundt et al., 2007). Isto sugere que a alteração da glia pode ser um mecanismo importante para a persistência de hipersensibilidade.

A importância das células da glia da medula espinal em processos nociceptivos foi primeiramente evidenciada por Garrison et al. (1991), que mostraram o aumento da densidade destas células, mais especificamente de astrócitos, na medula espinal, após a indução de ligaduras no nervo isquiático (Garrison et al., 1991). Ainda, a hiperalgesia térmica resultante da injeção s.c. de formalina e i.p. de endotoxina (Watkins et al., 1999) é bloqueada pela injeção intratecal de inibidores gliais. Da mesma forma, a alodinia mecânica resultante da injeção periférica de zimosan, é também bloqueada por inibidor metabólico das células da glia (Milligan et al., 2000). A lesão de nervos periféricos acarreta, na medula espinal, a liberação, pelas células da glia, de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β e o TNF α , as quais medeiam os processos nociceptivos decorrentes desta lesão (Benveniste, 1992; Luber-Narod et al., 1994). Estudos realizados por Chacur et al. (2007), mostraram que o inibidor do TNF α e a minociclina, um inibidor de microglia, foram capazes de diminuir a hiperalgesia induzida pela injeção de adjuvante completo de Freund no músculo gastrocnêmio de ratos, sugerindo a participação de células gliais e citocina neste fenômeno (Chacur et al., 2007, 2009).

A ativação das células gliais presentes na medula espinal, induzem hiperalgesia e alodinia por liberarem fatores solúveis que agem em neurônios e vias nociceptivas, porém, pouco se sabe a respeito destes fatores. No entanto, é importante identificar quais fatores (citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, NO) são liberados não somente pela microglia, mas

também pelos astrócitos sob diferentes condições patológicas, para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos neste fenômeno.

1.4 Atuação das prostaglandinas no processo nociceptivo

As prostaglandinas desempenham papel relevante na transmissão nociceptiva na medula espinal (Vane et al., 1998). As enzimas COX-1 e COX-2 catalizam a formação de ácido araquidônico em prostanóides e na medula espinal, sendo, tanto COX-1 quanto COX-2 expressas constitutivamente (Yaksh et al., 2001). Evidências têm mostrado que os níveis de PGs estão aumentados no líquido em resposta a ativação persistente de fibras C (Malmberg et al., 1995) ou inflamação persistente (Samad et al., 2001). Além disso, a administração intratecal de PGE₂ acarreta hiperalgesia térmica, mecânica ou química que pode ser revertida pela administração i.t. de inibidores de COX ou antagonistas de receptores para PGE₂ (Svensson et al., 2002).

Na medula espinal, a COX-2 está presente em regiões associadas ao processamento do estímulo nociceptivo, como nas lâminas I e II (Beiche et al., 1996). Inibidores de COX-2, mas não de COX-1, bloqueiam a hiperalgesia induzida pela administração periférica de carragenina (Svensson e Yaksh, 2002), ou pela injeção intratecal de NMDA, AMPA (Yamamoto et al., 1998), SP ou glutamato (Malmberg et al., 1992). Além disso, estudos têm evidenciado aumento na expressão de RNA mensageiro para COX-2 após inflamação periférica (Beiche et al., 1996). Contudo, ainda não está bem esclarecido o envolvimento da COX-2 em modelo de lesão músculo-esquelética.

1.5 Citocinas pró-inflamatórias

Vários estudos têm mostrado que, na medula espinal, uma variedade de citocinas estão envolvidas na dor induzida por inflamação periférica e dor neuropática (Arruda et al., 2000; Milligan et al., 2001). Os mecanismos envolvidos nesta hiperalgesia incluem a liberação de eicosanóides de vários tecidos; o aumento da expressão de receptores para fator de crescimento neuronal-NGF (Hatashita et al., 2008; Holmes et al., 2004) e cininas ou a ativação de fibras simpáticas (Cunha et al., 1991, 1992). Além disso, tem sido proposto que o TNF α e a interleucina(IL)-1 β têm papel relevante para a indução e manutenção de estados hipernociceptivos por meio da regulação da síntese de IL-6 (Sweitzer et al., 2001). É importante salientar ainda que a IL-1 β é capaz de aumentar a síntese de ciclooxygenase do

tipo 2 (COX-2) no SNC, contribuindo para os fenômenos hipernociceptivos (Samad et al., 2001). Ainda, estudos realizados por Milligan et al. (2001) observaram que $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ podem ser liberados na medula espinal após estimulação antigênica local, aumentando os estados dolorosos. Assim, estudos sobre a fisiopatologia da dor sugerem que o $\text{TNF-}\alpha$ participa desse processo, por mecanismos que envolvem tanto o sistema nervoso periférico quanto o central (Zimmermann, 2001). Ainda, resultados suportam a idéia de que o $\text{TNF}\alpha$ é amplamente envolvido na cascata de eventos celulares durante o fenômeno da dor (Miao et al., 2008).

1.6 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. É formado numa reação catalisada por enzimas entre o oxigênio molecular e a L-arginina em mamíferos, bem como em espécies mais primitivas. A convergência de várias linhas de pesquisa levou ao reconhecimento de que o NO atua como mecanismo fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso e desempenha a função de defesa do hospedeiro.

Uma das funções fisiológicas do NO foi inicialmente descoberta na vasculatura, quando foi demonstrado que o fator de relaxamento derivado do endotélio, descrito por Furchgott e Zawadzki, em 1980, podia ser explicado quantitativamente por meio da formação de NO pelas células endoteliais (Furchgott et al., 1980).

Foi descoberto, independentemente, que o NO é ativador endógeno da guanilato ciclase solúvel, resultando na formação de GMP cíclico (cGMP), que atua como segundo mensageiro em muitas células, incluindo nervos. Sabe-se também que é um mensageiro químico difusível através das membranas citoplasmáticas, altamente reativo e não armazenável, sendo sua síntese a única forma de regulá-lo e que apresenta um importante papel no controle da transmissão neuronal, processos inflamatórios, citotoxicidade e plasticidade neural (Allan et al., 2003; Zembowicz et al., 1991). Por ser o nitrogênio e o oxigênio (O_2) vizinhos na tabela periódica, o NO compartilha várias propriedades com o O_2 , em particular sua alta afinidade pelo heme e por outros grupos ferro enxofre. Isto é importante

para a ativação da guanilato ciclase, que contém um grupo heme, e para a inativação do NO pela hemoglobina (Gabbita et al., 2000).

Vários estudos têm mostrado que o NO interfere com o desenvolvimento da resposta inflamatória e com a nocicepção, podendo ter efeitos pró ou antiinflamatório e nociceptivo ou antinociceptivo (Duarte et al., 1990; Ferreira et al., 1992). Os efeitos na nocicepção dependem da concentração do NO, do local de atuação e do modelo utilizado para a avaliação da sensibilidade dolorosa. Souza e Prado (2001) sugeriram que em baixas concentrações, o NO induz efeito antinociceptivo, por ação na via descendente de modulação da dor, enquanto que altas concentrações são necessárias para manter o estado de hiperalgesia (Sousa e Prado, 2001). Ainda, Ferreira et al. (1991) demonstraram o envolvimento da via do NO na antinocicepção periférica induzida pela morfina, um agonista de receptor μ -opióide (Duarte et al., 1990; Ferreira et al., 1992). Porém, pouco se sabe sobre o envolvimento de um tipo de isoenzima- nNOS no modelo de miosite. Ainda, se esta isoenzima se expressa ou se é ou não proveniente das células gliais presentes em processos inflamatórios.

*

* *

A proposta deste projeto está conectada a uma série de investigações realizadas em nosso grupo de pesquisa ao longo dos últimos anos, com o objetivo geral de entender os aspectos da fisiopatologia da dor. Alternativas terapêuticas para o tratamento da dor muscular se fazem necessárias, uma vez que essa patologia não responde satisfatoriamente a nenhum tipo de intervenção convencional. Modelos experimentais de dor neuropática já estão bem estabelecidos, porém modelos de dor muscular têm sido pouco estudados. Como mencionado anteriormente, as células da glia (astrócitos e microglia), além de participarem de processos inflamatórios, têm papel relevante para a manutenção de processos algogênicos, liberando quantidades elevadas de diferentes mediadores envolvidos na transmissão da informação nociceptiva, incluindo, óxido nítrico (NO), citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e prostanoídes.

1.7 Justificativa e Hipótese

Diante do fato de que poucos estudos em modelos de dor muscular se fazem presentes, o objetivo central deste projeto é aprofundar nossa compreensão e explorar em maior detalhe a participação das células da glia, do fator de necrose tumoral α , da via da ciclooxygenase (COX1 e COX2) e do óxido nítrico após a indução de miosite. Esperamos que esta série de investigações favoreça uma maior elucidação dos mecanismos envolvidos na gênese da dor muscular. Além disso, a identificação de diferentes mediadores poderá fornecer maiores fundamentos para aperfeiçoamento de diferentes tratamentos clínicos.

1.8 Objetivos específicos

- a) avaliar a sensibilidade dolorosa dos animais após indução de miosite, utilizando modelo de hiperalgesia mecânica (teste de Von Frey eletrônico) e hiperalgesia térmica (teste plantar, ou teste de Hargreaves);
- b) avaliar a atividade locomotora dos animais submetidos à miosite aguda;
- c) avaliar o comportamento dos animais após a indução de miosite e tratados com bloqueadores farmacológicos para uma citocina pró-inflamatória (TNF- α), prostanoídes (COX-2), óxido nítrico (duas isoformas – nNOS e iNOS), bem como o envolvimento das células da glia no decorrer do fenômeno nociceptivo;
- d) avaliar a ativação das células gliais (astrócitos e microglia), de nNOS e TNF- α na medula espinal de ratos, pelo método de Western blotting;
- e) avaliar as possíveis alterações histopatológicas de tecido muscular de ratos com miosite;
- f) avaliar o envolvimento do óxido nítrico através de ensaios de imuno-histoquímica e ensaios histológicos para NADPHd, uma das enzimas responsáveis pela síntese de NO.

Desta forma, este conjunto de estudos poderá não apenas aprofundar o entendimento dos aspectos expostos acima, como também fornecer uma base para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos na dor muscular que são de grande relevância clínica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 180-220 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas e mantidos no Biotério do departamento de anatomia, ambos da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Para avaliação da sensibilidade dolorosa, os animais foram mantidos em sala apropriada, durante um período de dois dias que antecede o experimento, com ciclo claro e escuro (12/12 h) e acesso livre à água e ração. A sala em que foram mantidos ainda possuía isolamento acústico e temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB, protocolo nº 34/2008; Para a realização dos experimentos, os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

2.2 Procedimentos cirúrgicos - Indução de miosite

A miosite aguda foi induzida no músculo gastrocnêmio (Figura 1) da pata direita dos ratos, pela injeção de carragenina na dose de 200 ou 400 $\mu\text{g}/150 \mu\text{L}$. Animais que receberam injeção de salina (150 μL) foram utilizados como controle (Loram et al., 2007).

Figura 1 – Local da injeção de carragenina: músculo gastrocnêmio de ratos

FONTE: Bender (2012).

2.3 Avaliação da sensibilidade dolorosa

2.3.1 Teste de hiperalgesia mecânica - Von Frey eletrônico

Para a avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais, foi utilizado o teste de Von Frey eletrônico (anesthesiometer, IITC Inc. Life Science Instruments, Woodland Hills, Ca, USA) Von Frey - 1986 (Figura 2), segundo método descrito por Guerrero et al. (2006) (Guerrero et al., 2006), modificado. Neste teste, uma ponteira do próprio aparelho foi pressionada e aplicada contra a região da pele intacta do músculo gastrocnêmio dos animais. Neste modelo, o limiar de dor é representado pela força em gramas necessária para a retirada do membro do animal. Para este teste os animais foram adaptados no aparelho um dia antes do início dos experimentos. Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e 2 horas (medida final) após a indução da miosite aguda. Os resultados foram avaliados através da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 2 – Aparelho para uso do teste comportamental: Von Frey eletrônico

FONTE: ITCC Life Science (2011).

2.3.2 Teste de hiperalgesia térmica – Hargreaves test

Além do teste utilizado descrito acima, fez-se uso de outro teste para a avaliação da sensibilidade dolorosa dos animais: o teste da placa quente ou Hargreaves *test* (Figura 3). Este teste mede a latência (em segundos) da resposta ao estímulo térmico na superfície plantar da pata dos animais. Cada rato foi colocado individualmente em um recipiente retangular de plástico transparente sobre uma placa de vidro em uma sala com temperatura controlada (28 ± 1 °C) e permitiu-se que cada animal fosse adaptado a este ambiente por 30 minutos antes do teste. Os valores de retirada da pata foram calculados a partir de uma média de 2-3 latência de retirada consecutiva da pata experimental (direita), medidas com um intervalo de 10 minutos. A tensão da fonte de luz foi ajustada para produzir latências basais variando de 15-20 segundos. O tempo-limite imposto para evitar danos ao tecido foi de 30 segundos. Cabe ressaltar que este teste foi aplicado antes (medida inicial) e após (medida final) a indução de miosite, bem como após a administração de diferentes fármacos, como medida de tratamento farmacológico.

Figura 3 – Ilustração do Teste de Hargreaves ou Teste da placa quente

FONTE: Santos (2010)¹.

¹ Fotografias retiradas por F. M. Santos. São Paulo, 2010.

2.4 Avaliação da atividade geral – Teste do Campo Aberto (Open Field Test)

Para a avaliação da atividade geral dos ratos foi utilizado o método do Campo Aberto, de acordo com o proposto por Broadhurst (1960) (Broadhurst, 1960). O campo aberto consiste em uma arena de cartolina plastificada, com formato cilíndrico. O corpo do cilindro tem 32,5 cm de altura e base circular com 97 cm de diâmetro, pintada de branco. O chão da arena é subdividido em 19 regiões aproximadamente iguais, demarcadas por 3 circunferências concêntricas, intersectadas por segmentos de retas radiais. Os animais foram colocados individualmente na arena e observados por um período de três minutos (Figura 4). Os parâmetros avaliados foram:

- a) frequência de locomoção (LO): cada unidade de medida corresponde ao ato de o animal penetrar, com as 4 patas, em uma das divisões do chão da arena (Figura 4A e 4B);
- b) frequência de levantar (LE): cada unidade de medida corresponde à postura de o animal permanecer apoiado somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando, ou não, com as patas anteriores, as paredes do Campo Aberto (Figura 4C).

Animais com injeção de salina no músculo gastrocnêmio foram usados como controle. O campo aberto foi limpo com álcool 5% antes dos animais serem colocados nele, a fim de evitar possíveis manifestações devido às pistas de odor deixadas pelos animais previamente avaliados.

Figura 4 – Ilustração esquemática do Campo Aberto

A) Animal colocado ao centro do campo no início do procedimento; B) Animal movimentando-se no campo, representando sua frequência de locomoção (LO); C) Animal elevando-se na parede do campo, representando sua frequência de levantar (LE).

FONTE: Pagano (2007)²

2.5 Administração intratecal das drogas

Para injeções intratecais, utilizamos o método de acordo com o proposto por Milligan et. al (2004) (Ledeboer et al., 2005; Milligan et al., 2004). Os animais foram anestesiados com injeção inalatória de Halotano (Cristália Ltda.). Erguendo-se o osso ilíaco (espinhas ilíacas ventrais), uma agulha de número 27,5G (0,38 x 13) foi inserida diretamente no espaço subaracnóideo entre as vértebras lombares L5 e L6 do animal. Imediatamente após a inserção, o *flick* (retirada da cauda) característico da cauda foi observado, indicando a entrada da agulha no espaço subaracnóideo da medula.

² Ilustração elaborada por R. L. Pagano. São Paulo, 2007.

2.6 Tratamento Farmacológico

Com o intuito de avaliar o envolvimento das células gliais na hipernocicepção induzida pela injeção de carragenina, foi utilizado fluorocitrato, um bloqueador de células gliais. O fluorocitrato (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO/EUA - 1 nmol, volume de injeção de 50 µL, dose equivalente a $2,05 \times 10^{-4}$ µg/Kg), foi diluído em salina estéril e injetado por via intratecal 30 minutos antes da injeção de carragenina (Milligan et al., 2000). Salina estéril foi utilizada como veículo (controle). Ainda, com o intuito de avaliar especificamente a participação dos microgliócitos, foi utilizado um bloqueador específico para estas células, a minociclina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO/EUA - 100 µg, volume de injeção de 50 µL, dose equivalente a 500 µg/Kg) administrada 60 minutos antes da injeção de carragenina (Milligan et al., 2005).

Tendo em vista a participação do óxido nítrico na manutenção de processos dolorosos, foram utilizados inibidores específicos das diferentes isoformas deste gás: o 7-Ni (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO/EUA) com a função de bloquear a isoforma neuronal do óxido nítrico (nNOS), e o L-NIL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO/EUA), inibidor específico da isoforma induzível deste gás (iNOS). Ambos foram utilizados com o intuito de avaliar a participação do óxido nítrico no modelo de dor proposto. Estes inibidores foram injetados por via intratecal uma hora após a indução de miosite (1.11 µM, volume de injeção 50 µg, dose equivalente a 0,045 µg/Kg), (Osborne et al., 1999).

Como mencionado anteriormente, as células da glia são capazes de liberar citocinas que atuam no processo inflamatório característico da instalação do processo nociceptivo. Tendo isto em vista, foi nosso objetivo avaliar a participação do fator de necrose tumoral α (TNF- α) no modelo de dor proposto. Para tal, foi utilizado o inibidor específico desta citocina, o anticorpo anti-TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN/EUA), na dose de 1 µg/50 µL (dose equivalente a 50 µg/Kg), e injetado por via i.t, 20 minutos antes da administração da carragenina (Chacur et al., 2004).

Sabe-se que o modelo de miosite aguda, por causar um quadro inflamatório além da instalação de um quadro hiperalgésico, tem como participante de seu processo diversas prostaglandinas produzidas pela via metabólica do ácido aracdônico. Com o intuito de avaliar se as prostaglandinas como a COX-2 (e sua cascata subsequente) participam do modelo proposto na indução de hiperalgesia, foi utilizado o Celecoxibe

(Celebra®, Pfizer, New York, NY/EUA), pertencente ao grupo de anti-inflamatório não esteroidais, e inibidor seletivo de COX-2. Para tal, o fármaco foi injetado por via intratecal, 10 minutos antes da administração de carragenina, na dose de 100 µg/50µL (dose equivalente a 500 µg/Kg) (Chacur et al., 2004).

2.7 Ensaios de Imuno-histoquímica

Para realização deste ensaio, 2 horas após a indução de miosite e/ou após os tratamentos farmacológicos, os animais foram anestesiados e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina (300 mL), seguida de solução fixadora (500 mL) constituída de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após perfusão, a intumescência lombossacral (L6-L3) da medula espinal foram coletados e armazenados em formaldeído 4%, durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução contendo sacarose 30% para crioproteção. As medulas foram cortadas a espessura de 30µm em um micrótomo deslizante de congelamento. Os cortes foram submetidos à metodologia de imuno-histoquímica para detecção de anticorpos específicos para nNOS, diluídos a 1:1000 (Sigma, St. Louis, MO/USA). A imunorreatividade foi analisada ao microscópio de luz para detecção de nNOS (Chacur et al., 2006, 2009) . Foi realizada análise tanto qualitativa quanto quantitativa para este ensaio através da contagem de células nNOS positivas ao redor do canal central da medula espinal.

2.8 Ensaios de Western blotting

O conteúdo protéico do material isolado, intumescência lombossacral (L6-L3) da medula espinal e os gânglios da raiz dorsal, referentes à mesma porção, dos diferentes grupos foram dosado pelo método de Bradford (Amresco, U.S.A) (Bradford, 1976). Cabe mencionar que foram coletados e processados separadamente os lados ipisolateral e contralateral da medula espinal e em relação aos gânglios da raiz dorsal, foram retirados e processados também separadamente o lado ipisolateral e contralateral, sendo que com todos os gânglios do mesmo lado foi feito um “pool” para alcançar uma quantidade suficiente de proteína (gânglios da porção lombossacral da medula espinal, L3-L6).

Após a quantificação de proteína total pelo método de Bradford, os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Laemmli, contendo 54 mg/ml de DTT, as amostras foram posteriormente fervidas em banho maria por 5 min e o material foi aplicado em gel de poliacrilamida 6,5% ou 12% (dependendo do anticorpo a ser utilizado) e submetido a eletroforese com corrente contínua de 120V.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 µm de diâmetro) de acordo com a técnica descrita por (Towbin et al., 1979). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), por 2 horas, as membranas foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos para detecção de nNOS (1:500) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO/USA), de TNF- α (1:500) (R&D Systems, Minneapolis, MN/EUA) e para detecção de células da glia, astrócitos e microgliócitos (1:1000 BD Science) em solução bloqueadora (1% de BSA) por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (1:5000 Amersham Biosciences, NJ/EUA). O excesso de conjugado foi removido com mais de um ciclo de lavagens. As membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (Amersham Biosciences, NJ/EUA) de quimioluminescência e foram analisadas quanto à densidade das bandas marcadas, com o programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD/EUA). A análise dos dados foi feita pela média das diferenças percentual entre os diferentes grupos experimentais. A correção foi realizada pela densidade óptica para a β -actina (1:10000 Sigma, St. Louis, MO/USA), considerando as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados.

2.9 Histoquímica – NADPH diaforase

A enzima NADPH é uma das enzimas responsáveis pela síntese de NO. A NADPH diaforase é uma técnica utilizada para detectar células NO positivas, ou seja, células responsáveis pela produção de óxido nítrico, tanto em sua isoforma neuronal quanto endotelial ou induzível (nNOS, eNOS e iNOS respectivamente).

Após a avaliação comportamental, os animais com miosite (injetados com carragenina) e animais controle (injetados com salina) foram anestesiados (quetamina e xilazina 1:1, 100 µL/100 g de peso corpóreo) e submetidos à perfusão transcardíaca,

com solução salina, seguida de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% (PFA) dissolvido em tampão fosfato 0,1M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, a porção lombar (L3-L5) da medula espinal foi coletada e armazenada em PFA, durante 4 horas. Após este período, o material foi transferido para uma solução de sacarose a 30% em PB, para crioproteção. Após 48 horas, a dada porção da medula espinal foi cortada em uma espessura de 30 μ m em micrótomo deslizante de congelamento. A seguir, o tecido foi lavado em tampão fosfato por aproximadamente 18 horas com algumas trocas de solução durante esse período, em seguida, os cortes foram transferidos para uma solução a 37 °C d Tris-HCL, 0,1% de triton X-100, β NADPH (0,02% Sigma, St. Louis, MO/USA) e Nitroblue Toluidina (0,02% Sigma, St. Louis, MO/USA) diluídos no escuro. Os tecidos devem permanecer no escuro durante toda a reação. O tempo da reação é variável e freqüentes observações devem ser feitas ao microscópio, até que a coloração desejada seja atingida (as células devem ficar com tonalidade azul clara). Para parar a reação, foram feitas novas lavagens com PB, durante 15 minutos cada (Hope e Vincent, 1989).

2.10 Técnica histológica -Hematoxilina-Eosina (HE)

Com o intuito de determinar possíveis alterações no músculo gastrocnêmio de ratos, foram realizadas análises histológicas comparando com os animais injetados com carragenina com os animais injetados com salina (controle). Cabe mencionar, que inicialmente estes animais passaram pelos testes comportamentais e a seguir foram perfundidos, conforme descrito no item acima.

Para tanto, os músculos do gastrocnêmio dos ratos foram retirados e imersos em solução de formol a 10%. As peças foram processadas para análise por técnicas de microscopia óptica. Após a fixação em formol a 10%, os fragmentos foram descalcificados em ácido nítrico a 5% por 5 dias, desidratados, clarificados, incluídos em parafina e cortados na espessura de 5 μ m com micrótomo Spencer (American Optical). Os cortes foram então, corados com a técnica de hematoxilina-eosina. A técnica em hematoxilina-eosina (HE) é clássica no diagnóstico histológico e de grande avaliação dos padrões de reações teciduais. Esta técnica possui dois corantes: hematoxilina, que cora todos os núcleos de todas as células, e eosina, que cora o citoplasma de todas as células (Brancroft et al., 1994).

2.11 Análise estatística

Os dados foram representados como média $\pm$ e.p.m. A análise estatística foi gerada utilizando o programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., CA, USA). A comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O índice de significância foi considerado de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Curva dose-resposta da carragenina

Foram realizados testes comportamentais em animais submetidos à injeção de carragenina na dose de 200 µg, 400 µg, ou salina (animais controle), a fim de avaliar a duração (em horas) da sensibilidade dolorosa dos animais induzida pela miosite aguda. Os resultados obtidos nos mostram que no teste de hiperalgesia mecânica (Von Frey eletrônico) os animais com a injeção de carragenina na menor dose (200 µg) permaneceram com dor na segunda e terceira hora após a injeção de carragenina (Figura 5A); já os animais submetidos à injeção de 400 µg apresentaram uma diminuição do limiar nociceptivo duas, três, cinco e sete horas após a indução de miosite (Figura 5A).

No teste de hiperalgesia térmica (Hargreaves), os animais submetidos à injeção de maior dose (400 µg) apresentaram diferença estatística significativa em suas medidas finais apenas na segunda hora da ação da carragenina quando comparados ao grupo salina (controle), já àqueles submetidos à injeção da menor dose (200 µg) apresentaram uma resposta mais tardia. Observa-se que estes últimos tiveram uma diminuição de seu limiar nociceptivo na terceira e quinta horas após a injeção do algogênico (Figura 5B). Ainda, pode-se observar que em ambos os testes, os grupos submetidos às injeções das duas diferentes doses de carragenina não apresentaram diferença significativa nas vinte e quatro horas após a injeção, voltando às suas medidas basais (Figura 5A e 5B). Portanto foi escolhida a dose de 400 µg à ser utilizada nos experimentos futuros.

Figura 5- Curva dose-resposta da carragenina

A)

B)

Os limiares de dor, avaliados pelos testes de Von Frey eletrônico (expresso em gramas) (A), e pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos) (B), foram determinados no tempo zero (MI), 2, 3, 5, 7 e 24 horas após a injeção da carragenina (Cg- 200 ou 400 µg/150 µL). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5-8 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com grupo salina (Sal).

FONTE: Freitas (2012).

3.2 Avaliação da atividade locomotora - Teste do campo aberto

Dois grupos de animais foram submetidos ao teste de campo aberto para que a resposta fosse avaliada. O primeiro teve a injeção via intramuscular (i.m.), de carragenina, na dose de 400 µg/150 µL, e o segundo grupo a injeção i.m. de salina (150 µL, animal controle). Todos os animais foram avaliados na 2ª hora após as injeções de salina e carragenina, passando pelo teste onde foram avaliadas a frequência de locomoção e frequência de levantar de ambos os grupos. Os resultados obtidos mostram que não houve diferença estatística significativa entre as frequências de locomoção/levantar de animais que tiveram a carragenina administrada em comparação àqueles que receberam a injeção de salina no músculo gastrocnêmio (grupo controle) (Figura 6).

Figura 6- Efeito da carragenina sobre a atividade motora dos animais

As frequências de locomoção e de levantar foram avaliadas no Campo Aberto, 2h após a administração i.m. da carragenina (400 µg/150 µL). O grupo controle recebeu salina nas mesmas condições experimentais. Os dados correspondem à média ± e.p.m. de 5-6 animais por grupo.

FONTE: Freitas (2012).

3.3 Caracterização da hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela injeção intramuscular de carragenina

Os animais tiveram a injeção, via intramuscular (i.m.), de carragenina, na dose de 400 µg ou salina (animais controle). A carragenina acarretou aumento da sensibilidade à dor de 56% para hiperalgesia mecânica (Figura 7A), e 53% para hiperalgesia térmica (Figura 7B) quando comparado à medida inicial. O efeito hiperalgésico foi avaliado na 2^a hora após a indução de miosite. A administração i.m. de salina (animais controles) não modificou a resposta dos animais, em relação à medida inicial, durante o período de experimentação (Figura 7).

Figura 7- Efeito da miosite aguda induzida pela injeção intramuscular de carragenina sobre o limiar de dor em ratos

A)

B)

Os limiares de dor, avaliado pelo testes de Von Frey eletrônico (expresso em gramas)(A), e pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos)(B) foram determinados antes (tempo zero- MI) e 2 horas após a injeção de carragenina 400 µg ou salina (controle). Os resultados representam a média $\pm$ epm de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação a medida inicial do mesmo grupo.

FONTE: Freitas (2012).

3.4 Morfofisiologia do músculo gastrocnêmio de ratos submetidos à indução de miosite aguda

A miosite foi induzida através da injeção intramuscular de 400 µg de carragenina no músculo gastrocnêmio dos animais. Duas horas após a injeção, avaliações histológicas dos músculos mostraram a ocorrência de infiltração de leucócitos, principalmente monócitos e células linfóides. Geralmente, as primeiras células a chegar ao tecido lesado são os neutrófilos e, subsequentemente, os macrófagos teciduais. Pode ser observada uma menor quantidade de infiltração de células inflamatórias no músculo do animal controle, ou seja, que recebeu uma injeção de salina estéril (Figura 8A), quando comparado com o músculo daquele submetido à injeção de carragenina (Figura 8B). Este último apresenta maior infiltração de neutrófilos, monócitos e células linfóides nas fibras musculares, sugerindo que foi efetivo o efeito inflamatório que se desejava causar no modelo utilizado. A histologia do músculo gastrocnêmio de animais submetido à indução de miosite e daqueles que receberam injeção de salina estéril (controle) estão representados nas figuras abaixo.

Figura 8 – Histologia do músculo gastrocnêmio

Histologia do músculo gastrocnêmio de animais submetidos à injeção de salina estéril (A), e de carragenina 400µg. Este último possui maior infiltração de células da resposta inflamatória, células estas representadas por pontos corados cujos acúmulo está demonstrado pelas setas pretas (→), conforme se observa nas figuras. Os tecidos foram congelados e submetidos a seções transversais (40 µm), e posteriormente corados com hematoxilina e eosina (HE).

FONTE: Freitas (2012).

3.5 Efeito do tratamento com fluorocitrato na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela miosite

Os animais foram injetados, por via intramuscular (i.m.), com carragenina (Cg) ou salina (controle) e duas horas após a injeção de Cg, os animais foram avaliados nos testes comportamentais. Podemos observar que a dose utilizada de Cg acarretou uma diminuição do limiar nociceptivo mecânico e térmico, quando comparado à medida inicial (Figuras 9A e 9B, respectivamente).

Com o intuito de avaliar o envolvimento das células gliais neste fenômeno, administramos o fluorocitrato (bloqueador metabólico das células da glia), por via intratecal (i.t.) 30 minutos antes da carragenina e avaliamos os animais em ambos os testes comportamentais. Nossos resultados demonstram que o fluorocitrato foi capaz de inibir significativamente o efeito hiperalgésico da miosite aguda induzida pela carragenina em ambos testes comportamentais (Figuras 9A, resposta mecânica e figura 9B, teste térmico). A droga, *per se*, não acarretou alteração do limiar de dor dos animais, como pôde ser observado no grupo Flu+Sal (utilizado como controle). Ainda, não observamos alteração na resposta dolorosa dos animais tratados apenas com salina (também utilizado como controle).

Figura 9 - Efeito do tratamento com fluorocitrato sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina

A)

B)

Os limiares de dor, avaliados pelos testes de Von Frey eletrônico (expresso em gramas) (A), e pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos) (B), foram determinados antes (tempo zero- MI) e 2 horas após a injeção da carragenina (Cg-400 μ g/150 μ L) - MF. Os animais foram tratados com Fluorocitrato (Flu-1 nmol) ou Veículo (Sal), por via intratecal, 30 minutos antes da injeção de carragenina. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial do mesmo grupo.

FONTE: Freitas (2012).

3.6 Efeito do tratamento com minociclina na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela miosite

Com o intuito de analisar o efeito individual dos microgliócitos no controle nociceptivo, foi administrada minociclina, um inibidor seletivo de células da microglia, uma hora (60 min) antes da indução da miosite pela injeção de carragenina. Podemos observar nos gráficos abaixo que houve um bloqueio do quadro nociceptivo, uma vez que o grupo tratado com minociclina (Mino+Cg) não apresentou diferenças estatísticas significantes quando comparado com a medida inicial deste mesmo grupo (MI), tanto no teste de hiperalgesia mecânica (Figura 10A) como no teste térmico (Figura 10B). A droga, *per se*, não acarretou alteração do limiar de dor dos animais, como pôde ser observado no grupo Mino+ Sal. Ainda, não observamos alteração na resposta dolorosa dos animais tratados apenas com salina (também utilizado como controle).

Figura 10 - Efeito do tratamento com minociclina sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina

A)

B)

Os limiares de dor, avaliados pelos testes de Von Frey eletrônico (expresso em gramas) (A), e pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos) (B), foram determinados antes (tempo zero- MI) e 2 horas após a injeção da carragenina (Cg-400 µg/150 µL) - MF. Os animais foram tratados com Minociclina (Mino-100 µg) ou Veículo (sal), por via intratecal, 60 minutos antes da injeção de carragenina. Os resultados representam a média ± epm de 5-6 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a medida inicial do mesmo grupo.

FONTE: Freitas (2012).

3.7 Efeito do tratamento com 7Ni na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela miosite

Com o intuito de avaliar a participação do óxido nítrico no modelo de dor estudado foi utilizado o 7Ni, um inibidor seletivo da isoforma nNOS, a fim de analisar se este mediador influencia o comportamento nociceptivo e as alterações fisiológicas dos animais no momento em que a miosite se instala. O 7Ni foi injetado por via intratecal uma hora após a administração intramuscular de carragenina. Diferentemente dos resultados mostrados anteriormente, o 7Ni não foi capaz de interferir na resposta hiperalgésica mecânica, induzida pela Cg (Figura 11A). Com relação ao teste de hiperalgesia térmica, o mesmo tratamento foi capaz de interferir com o efeito hiperalgésico, uma vez que foi possível observar melhora no quadro hiperalgésico dos animais tratados com inibidor, quando comparado com o grupo de animais com miosite (Sal+Cg) (Figura 11B). A droga, *per se*, não acarretou alteração do limiar de dor dos animais, como pôde ser observado no grupo 7Ni+Sal. Ainda, não observamos alteração na resposta dolorosa dos animais tratados apenas com salina (Sal+Sal, também utilizado como controle).

Figura 11 - Efeito do tratamento com 7Ni sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina

A)

B)

Os limiares de dor, avaliados pelos testes de Von Frey eletrônico (expresso em gramas) (A), e pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos) (B), foram determinados antes (tempo zero- MI) e 2 horas após a injeção da carragenina (Cg-400 μ g/150 μ L) - MF. Os animais foram tratados com 7Ni (1.11 μ M) ou Veículo (Sal), por via intratecal, uma hora após a injeção de carragenina. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a medida inicial do mesmo grupo. FONTE: Freitas (2012).

3.8 Efeito do tratamento com L-NIL na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela miosite

Ainda com o intuito de avaliar a participação de outra isoforma do óxido nítrico no modelo de dor estudado, foi utilizado o L-NIL, um inibidor específico da isoforma iNOS, a fim de analisar se este mediador influencia o comportamento nociceptivo dos animais submetidos à miosite. O L-NIL foi injetado por via intratecal uma hora após a administração intramuscular de carragenina. Os resultados nos mostram que da mesma maneira que o inibidor específico de nNOS, o L-NIL não foi capaz de interferir na resposta hiperalgésica mecânica induzida pela Cg (Figura 12A), e sim somente com o efeito hiperalgésico no teste de hiperalgesia térmica (Figura 12B).

A droga, *per se*, não acarretou alteração do limiar de dor dos animais, como pôde ser observado no grupo Sal+L-NIL. Ainda, não observamos alteração na resposta dolorosa dos animais tratados apenas com salina (Sal+Sal, também utilizado como controle).

Figura 12 - Efeito do tratamento com L-NIL sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina

A)

B)

Os limiares de dor, avaliados pelos testes de Von Frey eletrônico (expresso em gramas) (A), e pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos) (B), foram determinados antes (tempo zero- MI) e 2 horas após a injeção da carragenina (Cg-400 μ g/150 μ L) - MF. Os animais foram tratados com L-NIL (1.11 μ M) ou Veículo (Sal), por via intratecal, uma hora após a injeção de carragenina. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a MI do mesmo grupo.

FONTE: Freitas (2012).

3.9 Efeito do tratamento com anti-TNF- α na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela miosite

A fim de investigar a participação das citocinas pró-inflamatórias no modelo experimental proposto, iniciaram-se experimentos realizando a análise comportamental dos animais tratados com anti-TNF- α , inibidor específico da citocina em questão. O inibidor foi injetado por via intratecal 20 minutos antes da administração intramuscular de carragenina. Os resultados mostram que o anti-TNF- α não foi capaz de interferir na resposta hiperalgésica mecânica induzida pela Cg (Figura 13A), interferindo apenas no teste de hiperalgesia térmica (Figura 13B). A droga, *per se*, não acarretou alteração do limiar de dor dos animais, como pôde ser observado no grupo anti-TNF- α +Sal. Ainda, não observamos alteração na resposta dolorosa dos animais tratados apenas com salina (Sal+Sal, também utilizado como controle).

Figura 13 - Efeito do tratamento com anti-TNF- α sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina

A)

B)

Os limiares de dor, avaliados pelos testes de Von Frey eletrônico (expresso em gramas) (A), e pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos) (B), foram determinados antes (tempo zero- MI) e 2 horas após a injeção da carragenina (Cg-400 μ g/150 μ L) - MF. Os animais foram tratados com anti-TNF- α (1 μ g/50 μ L) ou Veículo (Sal), por via intratecal, vinte minutos antes da injeção de carragenina. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a MI do mesmo grupo.

FONTE: Freitas (2012).

3.10 Efeito do tratamento com celecoxibe na hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela miosite

Com o intuito de avaliar se as prostaglandinas como a COX-2 participam do modelo proposto na indução de hiperalgesia, foi utilizado o Celecoxibe (Celebra®), pertencente ao grupo de anti-inflamatório não esteroidais, e inibidor seletivo de COX-2. Para tal, o fármaco foi injetado por via intratecal, 10 minutos antes da administração de carragenina. Os resultados aqui apresentados nos indicam que o celecoxibe foi capaz de diminuir a resposta nociceptiva induzida em ambos os testes comportamentais (Figura 14). No entanto, a diminuição do limiar nociceptivo foi apenas parcial, uma vez que ainda é possível observar diferença estatística em relação à medida inicial do mesmo grupo (Figura 14A e 14B, respectivamente). A droga, *per se*, não acarretou alteração do limiar de dor dos animais, como pôde ser observado no grupo COX+Sal. Ainda, não observamos alteração na resposta dolorosa dos animais tratados apenas com salina (Sal+Sal, também utilizado como controle).

Figura 14 - Efeito do tratamento com celecoxibe sobre a hiperalgesia mecânica e térmica induzida pela carragenina

A)

B)

Os limiares de dor, avaliados pelos testes de Von Frey eletrônico (expresso em gramas) (A), e pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos) (B), foram determinados antes (tempo zero- MI) e 2 horas após a injeção da carragenina (Cg-400 μ g/150 μ L) - MF. Os animais foram tratados com celecoxibe (100 μ g/50 μ L) ou Veículo (Sal), por via intratecal, dez minutos antes da injeção de carragenina. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com a MI do mesmo grupo e ** $p < 0,05$ por comparação com a MF do grupo Sal+Cg.

FONTE: Freitas (2012).

3.11 Ensaios de Imuno-histoquímica

3.11.1 Envolvimento de células NO positivas ao redor do canal central da medula espinal

Sabe-se que as células da glia (astrócitos e microglia), além de participarem de processos inflamatórios, têm papel relevante para a manutenção de processos algôgenicos, liberando quantidades elevadas de diferentes mediadores envolvidos na transmissão da informação nociceptiva, incluindo óxido nítrico (NO). Uma vez vista a participação das células gliais neste modelo, um dos nossos objetivos, adicionado ao projeto inicial, foi avaliar o envolvimento da nNOS neste modelo e ainda avaliar se o inibidor glial era capaz de interferir com este resultado. Com isso poderíamos avaliar se o NO observado é ou não proveniente das células gliais.

Cabe mencionar que após os experimentos comportamentais, parte dos animais foram sacrificados para ensaios de imuno-histoquímica. Para tanto, foi analisada a porção lombar (L3-L5) da medula espinal (que recebe inervação do músculo gastrocnêmio de ratos). A Figura 15 mostra uma ilustração das diferentes camadas da medula espinal de acordo com a nomenclatura de Rexed (Rexed, 1952). A porção analisada em questão corresponde à lâmina X, mostrada na ilustração abaixo.

Figura 15 - Ilustração das diferentes camadas da medula espinal de acordo com a nomenclatura de Rexed

FONTE: Oxford (2006).

Nossos resultados mostraram que a carragenina (Cg) foi capaz de induzir um aumento de células marcadas para nNOS, uma vez que foi possível observar aumento destas células 2 horas após a administração de Cg quando comparada com o grupo que

recebeu apenas salina (Figura 16). Ao utilizar-se do inibidor específico de nNOS, 7-Ni, observou-se uma diminuição no número de células imunomarcadas para nNOS (7Ni + Cg), chegando a valores basais. Quando tratamos os animais com fluorocitrato (inibidor glial), este tratamento não foi capaz de interferir com a expressão de nNOS, conforme demonstrado na mesma figura (Flu+Cg). Sugerindo, portanto, que as células gliais provavelmente não estão ligadas à produção de NO em sua isoforma neuronal na medula espinal no modelo de dor proposto.

Ainda, o mesmo podemos observar na análise das imagens digitais obtidas dos cortes transversais da medula espinal (Figura 17). Pode-se observar uma diminuição na quantidade de neurônios NO positivos no grupo de animais tratados com 7Ni quando comparado com a densidade de células marcadas em animais do grupo experimental (Sal+Cg).

Figura 16 - Quantificação da atividade de nNOS ao redor do canal central da medula espinal de ratos com miosite

Os animais foram tratados com Fluorocitrato (Flu-1 nmol) ou Veículo (sal), por via intratecal, 30 minutos antes da injeção de carragenina, ou ainda com 7-Ni (inibidor específico de nNOS) uma hora após a indução da miosite. Os resultados representam a média $\pm$ epm de 3-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ por comparação com os demais grupos.

FONTE: Freitas (2012).

Figura 17 - Imagens digitais de cortes transversais da porção lombar da medula espinal de ratos submetidos à miosite aguda

Imagens digitais capturadas 2 horas após injeção da carragenina (Cg), ou após tratamento com 7Ni ou fluorocitrato. Escala: 200 μm. cc. Canal central

FONTE: Freitas (2012).

3.12 Análise histoquímica – NADPH diaforase: Efeito da administração de carragenina intramuscular sobre a expressão de NO

Experimentos foram realizados a fim de demonstrar a participação de todas as isoformas do óxido nítrico no modelo de dor proposto. Nos resultados apresentados a seguir, podemos observar a pr

edominância de células sendo expressas ao redor do canal central da medula espinal de ratos que apresentam miosite (Sal+Cg) (Figuras 18 e 19) quando comparado ao grupo controle (Sal+Sal). Ainda, o mesmo podemos observar na análise das imagens digitais obtidas dos cortes transversais da medula espinal (Figura 19).

Figura 18 - Efeito da NADPH diaforase na medula espinal após a injeção de carragenina

A carragenina foi injetada no músculo gastrocnêmio dos ratos 400 µg/150 µL e a Sal (salina) foi utilizada como controle. Duas horas após as injeções os animais foram perfundidos e a porção lombar da medula espinal foi coletada. Estes resultados apresentam a média± epm de 3-4 animais por grupo. * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle (Sal+Sal).

FONTE: Freitas (2012).

Figura 19 - Imagens digitais de cortes transversais da porção lombar da medula espinal de ratos submetidos à miosite aguda

Observa-se um menor número de neurônios marcados ao redor do canal central em ratos controle (Sal+Sal) quando comparado ao grupo de animais com miosite (Sal+Cg). Imagens digitais capturadas 2 horas após injeção da Cg. Escala: 200 µm. cc. Canal central

FONTE: Freitas (2012).

3.13 Ensaios de Western Blotting

3.13.1 Efeito das células da glia na medula espinal de animais com miosite e animais tratados com inibidores gliais

Experimentos anteriores realizados por nosso grupo de estudo e durante meu projeto de iniciação científica demonstraram a participação de astrócitos e microgliócitos na coluna posterior da medula espinal de ratos induzidos à miosite aguda através de ensaios de imuno-histoquímica. Ensaios de Western Blotting foram então realizados em amostras da porção lombar da medula espinal dos animais para confirmar esta participação. Os anticorpos utilizados neste estudo reconhecem suas bandas específicas para GFAP e OX-42. Foram feitas comparações entre os animais com miosite aguda no músculo gastrocnêmio contra os grupos controles (Salina) para efetivamente determinar a participação das células gliais neste processo. Os resultados revelaram diferença significativa no nível de proteínas dos animais com miosite quando comparados aos grupos controle. Cabe mencionar que os experimentos foram realizados com um número de 5 a 6 animais por grupo.

Ao avaliarmos a participação astrocitária neste processo podemos observar um aumento significativo de proteína no grupo de animais com miosite (185%) (Sal+Cg) quando comparado com o grupo controle (Sal+Sal). O grupo de animais tratados com fluorocitrato, o inibidor de células gliais, apresentou uma diminuição (161%) na densidade óptica das bandas imunorreativas, alcançando valores basais (Figura 20). Não foi possível observar diferença estatística significativa no grupo tratado somente com fluorocitrato e salina, utilizado como controle (Flu+Sal).

Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Figura 20 - Efeito do fluorocitrato na ativação dos astrócitos da medula espinal de ratos com miosite

Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5-6 animais por grupo. * $p < 0.05$ por comparação com os demais grupos.

FONTE: Freitas (2012).

Ao analisarmos a atividade das células da microglia na medula espinal podemos observar aumento na densidade óptica das bandas marcadas no grupo de animais que recebeu carragenina 121% (Sal+Cg), quando comparada ao grupo controle (Sal+Sal) (Figuras 21A e 21B). A fim de analisar a atividade microglial, foram utilizados dois inibidores, injetados por via intratecal 30 ou 60 minutos antes da injeção de carragenina. Um grupo recebeu o fluorocitrato, inibidor geral de células gliais, 30 minutos antes, na dose de 1nmol. O outro grupo recebeu minociclina, inibidor específico de microglia, ambos por via i.t., na dose de 100 μ g, uma hora antes da injeção i.m. de carragenina. A administração destes inibidores tinha como intuito avaliar a atividade das células gliais, a fim de observar sua participação na sensibilidade dolorosa dos animais e na manutenção do processo doloroso em geral.

As bandas do grupo “Flu+Cg” (tratados com fluorocitrato) apresentaram redução de 131% na sua densidade óptica em comparação ao grupo com miosite “Sal+Cg” (Figura 21A), e a ainda observa-se que a droga *per se* não interferiu no processo.

O mesmo podemos observar quando os animais foram tratados com minocilina, inibidor específico para microglia. Este tratamento foi capaz de diminuir 137% a expressão desta proteína quando comparado ao grupo controle (Figura 21B). O grupo de animais que não sofreu nenhum procedimento (Naive), também foi utilizado como controle e apresentou bandas imunorreativas nos mesmos parâmetros do grupo controle (Sal+Sal) (Figura 21B). Os resultados estão representados em gráficos para os diferentes grupos e ilustrados por imagens das bandas imunorreativas. Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Figura 21 - Efeito do fluorocitrato (A) e de minociclina (B) na ativação microglial da medula espinal de ratos com miosite

A)

B)

Os resultados representam a média $\pm$ epm de 5-6 animais por grupo. *p < 0.05 por comparação com os demais grupos.

FONTE: Freitas (2012).

3.13.2 Efeito da miosite aguda sobre a atividade de nNOS na medula espinal de ratos

Dados da imuno-histoquímica mostraram que a carragenina foi capaz de interferir com a regulação de nNOS 2h após a indução de miosite, e ao utilizar-se do inibidor específico de nNOS (7-Ni) observou-se um bloqueio parcial no número de células imunomarcadas. Ensaios de Western blotting foram realizados a fim de corroborar com os dados da imuno-histoquímica. Podemos observar na figura 22 que houve uma redução de 134% na densidade óptica das bandas no grupo de animais que recebeu o 7Ni após a injeção de carragenina (Cg+7Ni) quando comparado com o grupo tratado somente com Cg. Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Figura 22 - Efeito do inibidor da nNOS no modelo de miosite aguda em ratos: análise da porção lombar da medula espinal

Os resultados representam a média $\pm$ epm de 3-4 animais por grupo. *p <0.05 por comparação com os demais grupos.

FONTE: Freitas (2012).

3.13.3 Efeito da miosite aguda sobre a atividade de $TNF-\alpha$ na medula espinal de ratos

Ensaio de Western blotting para análise da participação da citocina pró-inflamatória $TNF-\alpha$ foram realizados a fim de corroborar com dados previamente encontrados pelo nosso grupo, dados estes que mostram uma maior imunomarcagem do $TNF-\alpha$ no corno posterior da medula espinal após a indução de miosite aguda pela injeção de carragenina. Podemos observar na figura 23 que houve uma redução de 124% na densidade óptica das bandas no grupo de animais que recebeu o anti- $TNF\alpha$ após a injeção de carragenina (Cg+aTNF) quando comparado ao grupo com carragenina (Figura 23). Nenhuma diferença foi observada para β -actina entre os grupos analisados.

Figura 23 - Efeito do inibidor de $TNF-\alpha$ no modelo de miosite aguda em ratos: análise da porção lombar da medula espinal

Os resultados representam a média $\pm$ epm de 3-4 animais por grupo. *p <0.05 por comparação com os demais grupos.

FONTE: Freitas (2012).

4 DISCUSSÃO

A sensação de dor, pela sua natureza inerente, contribui com uma das funções vitais do sistema nervoso, que é prover informações sobre a ocorrência ou perigo de lesões (Raja et al., 1999). A dor é o resultado subjetivo da nocicepção, sendo postulado que a nocicepção refere-se à manifestação neurofisiológica gerada por estímulos nocivos, enquanto que a dor envolve a percepção do estímulo aversivo, o qual requer a capacidade de abstração e a elaboração dos impulsos sensoriais (Millan, 1999; Schaible et al., 2004).

O mecanismo pelo qual diferentes estímulos conseguem evocar a atividade das terminações nervosas nociceptivas é compreendido apenas vagamente. As captações de informações nociceptivas ocorrem por meio da ativação de terminações nervosas livres denominadas nociceptores. A dor nociceptiva ocorre como resultado da ativação destes receptores, que, por serem livres, se localizam em diversos tecidos que constituem o organismo. Os receptores sensoriais, preferencialmente sensíveis a estímulos nocivos ou potencialmente nocivos, encontram-se na pele, músculos, tecidos conjuntivos e vísceras. Estas unidades têm aparência morfológica bem evidente à microscopia de luz e eletrônica e, fisiologicamente, caracterizam-se pelos seus padrões de reação a estímulos cutâneos, mecânicos, térmicos e químicos. Uma vez ativados, os nociceptores conduzem impulsos por meio de fibras aferentes mielínicas ou não mielínicas. Estudos fisiológicos demonstraram que os nociceptores podem ser ativados espontaneamente ou, podem ser ativados particularmente após um dano tecidual (Dray, 1994).

A sensibilização manifesta-se com uma diminuição do limiar nociceptivo de ativação após um dano tecidual e intensidade aumentada da reação a um dano prejudicial. Em muitas condições patológicas, a lesão tecidual representa a causa imediata da dor. Esta lesão resulta na liberação local de diversos mediadores químicos que irão agir sobre as terminações nervosas, ativando-as diretamente, ou exacerbando sua sensibilidade para outras formas de estimulação (Dray, 1995, 1997).

O presente estudo torna-se importante, uma vez que a dor músculo-esquelética é um dos tipos mais frequentes de dor observada na clínica e os distúrbios musculoesqueléticos são as principais causas de dor na população; assim, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos durante este processo, dentre eles o envolvimento das células da glia e de mediadores por elas liberadas podem contribuir para aperfeiçoar os tratamentos clínicos empregados durante a dor músculo-esquelética.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi ampliar os conhecimentos sobre a atividade nociceptiva induzida no modelo de miosite aguda.

Para a determinação da sensibilidade dolorosa dos animais, foram utilizados os testes de hiperalgesia mecânica, o Von Frey eletrônico, e o de hiperalgesia térmica, o teste plantar (teste de Hargreaves). Ambos os testes foram realizados antes e após a indução da miosite (medida inicial – MI, e medida final - MF).

Foi realizada uma curva dose-resposta com o intuito de estabelecer o tempo de duração da hiperalgesia em animais submetidos à injeção de miosite. Como demonstrado nos resultados, a dose de 400 µg de carragenina foi capaz de reduzir o limiar nociceptivo dos animais em ambos os testes, hiperalgesia mecânica e térmica, até a 7^a hora pós carragenina. A dose de 200 µg alterou a sensibilidade nociceptiva dos animais somente até a 5^a hora após a indução de miosite. Além disso, o limiar nociceptivo dos animais com injeção de 400 µg apresentou-se em valores menores quando comparados à dose de 200 µg. Partindo deste resultado, a dose de 400 µg foi estabelecida para os demais experimentos contidos neste projeto.

Outro teste comportamental utilizado foi o do “campo aberto” a fim de avaliar possíveis alterações na atividade locomotora induzida pela injeção do irritante. No entanto, não foi possível observar alterações dos animais submetidos à indução de miosite aguda quando comparados aos animais controle. Estudos realizados por Chacur et al. (2000) demonstraram que a injeção de adjuvante de Freund induz hiperalgesia mecânica e alteração no modelo de campo aberto, quando administrado no músculo gastrocnêmio de ratos adultos, em modelo crônico (Chacur et al., 2009). Esse resultado contraditório pode estar ligado ao tipo de dor estudada, uma vez que utilizamos de um modelo de indução de dor aguda, com seu pico definido em duas horas após a administração do agente algogênico, ao passo que os demais grupos que observam alterações neste teste avaliam modelos de dor muscular crônica. Com o intuito de avaliar possíveis alterações na resposta inflamatória causada pela administração da carragenina foi realizada uma análise da morfofisiologia do músculo gastrocnêmio dos animais controle e daqueles que tiveram a miosite induzida pela injeção de carragenina. A carragenina é um polissacarídeo derivado de algas marinhas, sua injeção promove rapidamente uma inflamação aguda caracterizada pela formação de edema e intenso infiltrado inflamatório. Seu mecanismo de ação é complexo, envolvendo diversos mediadores, tais como, histamina, serotonina, cininas e prostaglandinas, além do óxido

nítrico. Seu pico de ação é em torno de 2 a 5 horas após sua administração, quando a resposta vascular e migração celular atingem seus maiores níveis.

Nossos resultados demonstram que houve um aumento no número de células do sistema imune entre as fibras musculares do animal com miosite aguda quando comparado com o animal controle (injeção de salina aplicada no músculo). A migração e acúmulo das células do sistema imune no local caracteriza uma resposta inflamatória. A reação inflamatória aguda caracteriza-se por uma série de eventos inter-relacionados, dentre os quais podemos citar: aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluido (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação e reparo tecidual (Abbas et al., 2000; Gomes-Leal et al., 2002). A resposta inflamatória inclui também a participação de diferentes tipos celulares, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos.

Com o intuito de avaliar a participação central das células gliais, utilizamos inicialmente o fluorocitrato, uma droga capaz de bloquear a função da glia, por inibir o ciclo de Krebs de células da microglia e astrócitos. A especificidade do fluorocitrato pelas células da glia decorre de sua ação sobre a aconitase, uma enzima usada para produção de energia pelas células da glia, mas não por neurônios (Hassel et al., 1992; Peters, 1957); ele induz mudanças ultra estruturais apenas em células da glia (Paulsen et al., 1987) e também inibe o transmissor da síntese de aminoácidos (Paulsen et al., 1988). A dose presentemente empregada para o fluorocitrato está baseada em dados de literatura mostrando a sua seletividade pelas células da glia (Hassel et al., 1992; Milligan et al., 2000). Nossos resultados indicam que o pré-tratamento com fluorocitrato foi efetivo na reversão da sensibilidade dolorosa dos animais tanto no teste de hiperalgesia térmica quanto mecânica. Após observado o efeito deste inibidor inespecífico, fomos avaliar o efeito da minociclina, um inibidor específico para células da microglia. Nossos resultados mostraram que este tratamento foi capaz de interferir de forma significativa em ambos os testes experimentais utilizados. Nossos resultados corroboram com o estudo de Jang et al. (2009), que demonstra a efetiva inibição de astrócitos e microgliócitos após a administração do fluorocitrato ou minociclina em um modelo de dor induzida por veneno de escorpião (Jang et al., 2009). A minociclina tem sido utilizada para estudar o papel da microglia em experimentos de isquemia cerebral (Yrjanheikki et al., 1999), lesão traumática no cérebro (Chen et al., 2000), doença de

Parkinson (Wu et al., 2002), entre outros. A minociclina, uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração, tem mostrado exercer uma função biológica distinta de suas ações antimicrobianas (Tikka et al., 2001). É uma molécula lipoproteica rapidamente absorvida pela barreira hemato-encefálica (Aronson, 1980). Ela seletivamente interrompe a atividade da microglia sem afetar neurônios ou astrócitos (Raghavendra et al., 2003; Tikka et al., 2001). Estudos mostram que a minociclina administrada na medula espinal e não sistemicamente, produz uma antinocicepção robusta em lesões teciduais e dor induzida por inflamação periférica através do efeito mediado pela sua inibição da ativação da p38 na medula espinal (Hua et al., 2005). Recentemente seus efeitos alodínicos e hiperalgésicos têm sido demonstrados em modelos de artrite, transecção do nervo espinal, e neurite inflamatória do isquiático (Ledeboer et al., 2005; Raghavendra et al., 2003; Shan et al., 2007).

Com relação aos mediadores envolvidos durante patologias musculares, foi demonstrado que, além das células gliais, os mediadores químicos liberados, como o NO, TNF α e COX têm sido associadas a essas patologias. Entretanto, o papel destes mediadores na dor músculo-esquelética é ainda pouco explorado. O NO, como descrito anteriormente, é um radical livre que age como segundo mensageiro, regulando as funções imunes, vasculares e atuando como neurotransmissor ou neuromodulador em processos nociceptivos. Estudos imuno-histoquímicos demonstraram que a NOS é expressa tanto centralmente como no sistema nervoso periférico. Uma lesão em nervos periféricos leva a um aumento de excitabilidade de neurônios da medula espinal (sensibilização central) pela ativação de aferentes sensoriais, levando à ativação de receptores do tipo NMDA e subsequente produção de NO (Meller et al., 1992).

Baseado nos experimentos previamente realizados por nosso grupo de pesquisa, foi um dos nossos objetivos avaliar a distribuição e participação da nNOS e iNOS na medula espinal de ratos após inibição de sua síntese com inibidores específicos. Nossos resultados comportamentais demonstram que o 7Ni (inibidor seletivo de nNOS) quando injetado por via intratecal uma hora após a administração intramuscular de carragenina não foi capaz de interferir na resposta hiperalgésica mecânica, induzida pela Cg. Por outro lado o mesmo tratamento foi capaz de interferir com o efeito hiperalgésico térmico. Nossos resultados corroboram com os resultados demonstrados por Khalil et al. (2010), onde seu grupo observou que houve uma diminuição significativa da hiperalgesia térmica em ratos com constrição do nervo isquiático após a administração do inibidor de nNOS (3Br-7Ni) (Khalil et al., 2001).

Nossos resultados demonstram uma resposta semelhante ao observado com o inibidor da iNOS (L-NIL) e também com o grupo de animais tratados com o anti-TNF α (inibidor específico da citocina), ou seja, observamos uma reversão da resposta ao teste de hiperalgesia térmica, sem qualquer alteração no teste de hiperalgesia mecânica. A diferença observada entre os testes comportamentais de hiperalgesia mecânica e térmica pode ser melhor explicado devido as diferenças entre os tipos de fibras do tipo; A β , A δ e C. Estas apresentam diferenças nos diâmetros, na mielinização e com isso na velocidade de condução e regeneração em suas fibras que conduzem as informações de dor e temperatura (Willis et al., 2004). Outro aspecto a ser levado em consideração para as diferenças observadas nos testes comportamentais é o fato de alguns subgrupos de fibras do tipo A α conduzirem predominantemente estímulos térmicos (Treede et al., 1998) e possuírem bainha de mielina, fator que reduz o tempo de regeneração nervosa quando comparado com as fibras do tipo C (Lent, 2004). Outros estudos demonstram a participação do canal iônico de TRPV1 no desenvolvimento da hiperalgesia térmica após inflamação (Belmonte et al., 2008; Koerber et al., 2010).

Resultados demonstrados pelo grupo da Dra. Yara Cury indicam que a isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) parece ser responsável pela síntese de NO, uma vez que a administração intratecal de L-NIL (um seletivo inibidor iNOS), mas não de 7-NI, (um inibidor seletivo da NOS neuronal), reduz o efeito da dor reforçada por um veneno de aranha (Zanchet et al., 2004). Alguns estudos experimentais têm demonstrado que o curso de tempo de indução da expressão de iNOS na medula espinal está relacionado com estímulos periféricos nociceptivos. Guhring et al. (2000) observaram um aumento na expressão do mRNA de iNOS na medula espinal 30 minutos após a injeção de zimosan em ratos (Guhring et al., 2000), enquanto o grupo de Wu et al. (2001) encontrou um aumento na proteína iNOS na medula espinhal de ratos 20 min após a injeção de capsaicina (Wu et al., 2001). A rápida síntese de proteínas para iNOS pode ser devido à presença de uma concentração elevada de mRNA que codifica iNOS na medula espinal. O óxido nítrico espinal pode ser gerado como consequência da ação de neurotransmissores ou outros mediadores hipernociceptivos, como citocinas (Heneka et al., 2001; Meller et al., 1993; Svensson e Yaksh, 2002). Com base nos resultados presentes e nos dados da literatura, é plausível sugerir que a administração intramuscular de carragenina provoca a liberação de neurotransmissores e/ou citocinas na medula espinal, que por sua vez leva à produção de iNOS e nNOS, provocando um quadro de hiperalgesia térmica nos animais, porém, esta liberação

possivelmente não é capaz de provocar uma sensibilização significativa no limiar nociceptivo mecânico dos animais e reverter a hiperalgesia mecânica destes mesmos através do uso de inibidores seletivos.

Com relação aos ensaios de imuno-histoquímica foi observado um aumento das células marcadas para nNOS ao redor do canal central (lâmina X) da porção lombar da medula espinal em animais com miosite quando comparado ao grupo controle (salina), sugerindo assim, uma participação desta isoforma no modelo proposto. Como descrito anteriormente as células da glia são capazes de liberar NO. Um dos objetivos propostos foi observar se a NOS encontrada em nosso modelo poderia estar sendo liberada por células gliais. Para tanto, bloqueamos as células gliais com o fluorocitrato, e avaliamos a porção lombar da medula espinal dos ratos com miosite. Não foi possível observar diferença na imunoreatividade de células marcadas para nNOS em animais tratados com o bloqueador glial, ou seja, não foi possível encontrar alteração na marcação de nNOS nos ratos submetidos à miosite e tratados com fluorocitrato.

Nossos resultados discordam com o demonstrado por Sun et al. (2009), onde demonstraram que a administração de fluorocitrato foi capaz de inibir a atividade de nNOS na medula espinal de ratos após a injeção de formalina (Sun et al., 2009). Nossos resultados podem sugerir, até o momento, que a produção de nNOS observada na medula espinal de ratos não é decorrente das células da glia especificamente, podendo ser proveniente de outras fontes.

Sabe-se que tanto a nNOS como a eNOS são constitutivas e expressam sua atividade dependente das concentrações de cálcio intracelular. Em contrapartida, a iNOS só aparece após a ativação por citocinas e endotoxinas, e a sua função não é afetada pela concentração de cálcio intracelular (Bian et al., 2006). Ainda, para melhor fundamentar nossos resultados, buscando melhor compreender o envolvimento desta enzima e de seu produto durante a nocicepção induzida pela carragenina, realizamos ensaios de NADPH diaforase. NADPH é uma técnica amplamente utilizada para a avaliação da expressão da NOS (Gonzalez Deniselle et al., 1999; Lalatta-Costerbosa et al., 2007). Esta técnica é capaz de detectar neurônios NO positivos no tecido analisado, podendo portanto ter origem endotelial, neuronal, e/ou induzível.

Os resultados demonstraram que há uma diferença estatística significativa no número de células NO positivas entre o grupos controle (Salina) e o experimental (Carragenina), indicando que a indução de miosite foi capaz de elevar os níveis de

produção de NO, assim como o proposto por Sun et al. (2009), onde a injeção plantar de formalina aumenta o número de células NADPH-d reativas (Sun et al., 2009).

Os resultados apresentados neste projeto também indicam que prostanoídes espinais, gerados pela atividade da COX-2, são mediadores importantes no quadro inflamatório gerado, pois participa da facilitação da hiperalgesia induzida pela carragenina. Nossos resultados corroboram com pesquisas anteriores que mostram que a inflamação periférica aumenta a expressão da ciclooxygenase e formação de prostaglandina E2 na medula espinal, contribuindo para a sensibilização nociceptiva (Hay et al., 1997; Seybold et al., 2003; Yaksh et al., 1993) uma vez que observou-se uma prevenção do quadro da hiperalgesia mecânica e térmica em animais pré-tratados com celecoxibe (inibidor seletivo para COX2). Várias linhas de evidência sugerem que as prostaglandinas induzem a liberação de neurotransmissores, tais como aminoácidos excitatórios, SP, CGRP e NO. Com base nesses dados, um papel de cooperação entre prostanoídes espinais e estes neurotransmissores podem ocorrer e contribuir para o efeito a dor causada pela carragenina.

Os resultados referentes aos ensaios de Western Blotting para todos os fatores ou mediadores em questão corroboraram com os resultados comportamentais. Supunha-se que por ter havido uma reversão do quadro doloroso dos animais através da administração dos inibidores, as células da glia poderiam estar agindo efetivamente na manutenção do processo doloroso. Foi visto que na quantificação de proteínas através das bandas imunorreativas ocorreu um aumento tanto na densidade proteica referente à atividade astrocitária (marcada por GFAP), quanto pela microglial (marcada por OX-42), e ainda que ambos os inibidores (fluorocitrato ou minociclina) foram capazes de diminuir essa expressão, demonstrando assim sua participação no modelo de miosite aguda. Uma vez que a glia tem papel preponderante para a liberação de mediadores envolvidos em fenômenos de sensibilização, é possível sugerir que a ativação destas células acarretada pela carragenina possa estar contribuindo para a indução do fenômeno nociceptivo no modelo de miosite aguda.

Ao que se refere à participação de citocinas pró-inflamatórias, foram realizados, da mesma maneira, ensaios de Western Blotting para a marcação de bandas imunorreativas ao fator de necrose tumoral α (TNF α), a fim de verificar se esta citocina participaria do processo de iniciação/manutenção da nocicepção no modelo proposto. Verificou-se que houve um aumento significativo na densidade óptica das bandas marcadas para TNF α no grupo com miosite induzida (Sal+Cg). Em contrapartida,

ocorreu uma diminuição nesta densidade no grupo de animais previamente tratados com anti-TNF α (inibidor desta citocina). Este resultado sugere que este fator de necrose tumoral participa do processo nociceptivo deste modelo, sendo liberado em maior quantidade após a indução de miosite. Sabe-se que esta citocina pode ser liberada por uma série de células tanto do sistema imune (macrófagos, células T) como do sistema nervoso (neurônios e células gliais), promovendo a ativação de neutrófilos e de células endoteliais e induzindo o processo de inflamação (Abbas e Janeway, 2000; Gomes-Leal et al., 2002). Kobayashi et al. (2012) mostraram que há um aumento do mRNA das citocinas IL1- β e TNF α e de moléculas microgliais específicas (Iba-1 e CD11b) na medula espinal de animais com indução de dor neuropática após a ligação parcial do nervo isquiático (Kobayashi et al., 2012). Estes fatores têm sido relatados como contribuidores para a hipersensibilidade após a lesão de nervos periféricos e para a ativação da microglia (Cao et al., 2009; Milligan et al., 2009).

Ainda, avaliamos o envolvimento da nNOS através de ensaios de Western Blotting. Nossos resultados mostraram uma diferença estatística referentes à diminuição da densidade óptica das bandas imunorreativas para nNOS após administração de seu bloqueador. A indução de um dano mecânico no músculo gastrocnêmio demonstrou um aumento na formação de NO, que acredita-se ser o início de um processo de reparação de danos (Kerkweg et al., 2006). Além disso, a importância do NO na função muscular tem sido demonstrada com uma inibição de NO resultando em uma grave redução na velocidade de locomoção em ratos (Wang et al., 2001). Portanto, pode-se sugerir que o NO é gerado durante a contração muscular como resultado da ativação de nNOS (Percival et al., 2010), eNOS (Hoier et al., 2010), e iNOS (Carmeli et al., 2010) podendo causar a diminuição da geração da força e dor como um mecanismo de proteção (Radak et al., 2012).

Cabe mencionar que durante o período proposto para este projeto foram realizados diversos testes com diferentes concentrações de anticorpo específico para iNOS, porém não foi possível observar a marcação para esta isoforma no método de Western Blotting.

*

*

*

Muito ainda deve ser estudado a respeito dos mecanismos que envolvem os processos dolorosos. Estudos experimentais se fazem necessários uma vez que a ocorrência de dor é crescente. Talvez em decorrência dos novos hábitos de vida, da maior longevidade do indivíduo, do prolongamento da sobrevivência dos doentes com afecções clínicas naturalmente fatais, das modificações do meio ambiente, do reconhecimento de novas condições álgicas e, provavelmente, da aplicação de conceitos que traduzem seu significado. Além de gerar estresses físicos e emocionais significativos para os doentes e para aqueles que os assistem, é razão de fardos econômicos e sociais para a sociedade.

Cada indivíduo adota conceitos próprios sobre a gravidade de suas condições em função dos aspectos demográficos, culturais, psicossociais, econômicos, profissionais e outras de suas características e dos seus circundantes, e estas influenciam no comportamento da procura pela assistência. A necessidade de tratamento, segundo as equipes de saúde, baseia-se no conhecimento do estado doloroso, na sua tratabilidade e nas possibilidades prognósticas. A percepção que o indivíduo tem da necessidade da assistência é que determina a demanda pelo tratamento e baseia-se na experiência subjetiva que ele tem sobre a dor e seu simbolismo. É provável que a necessidade percebida e a demanda pelo cuidado excedam a estimativa clínica das necessidades dos cuidados.

5 CONCLUSÃO

O tratamento com diferentes inibidores farmacológicos se mostrou eficiente no bloqueio de diferentes substâncias liberadas durante o processo algico. Observou-se que as células da glia (astrócitos e microglíócitos) participam ativamente da manutenção do processo de dor muscular aguda uma vez que seu bloqueio foi capaz de prevenir o quadro de hiperalgesia térmica e mecânica. Sugere-se que as demais substâncias estudadas, os prostanóides da cascata da ciclooxigenase (COX-2), o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as duas isoformas de NOS (nNOS e iNOS), participam da transmissão e/ou manutenção da hiperalgesia mecânica nesse modelo, não influenciando na transmissão do estímulo térmico, uma vez que o uso de inibidores destas substâncias não alterou o estado doloroso dos animais.

Ao mesmo tempo, foi observado que houve um aumento da densidade óptica das bandas marcadas para as células gliais, o nNOS e o TNF- α nos ensaios de Western Blotting, demonstrando uma maior ativação destes fatores durante o modelo de miosite aguda proposto.

(*) REFERÊNCIAS

Abbas AK, Janeway Jr. CA. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell*. 2000;100(1):129-38.

Agullo L, Baltrons MA, Garcia A. Calcium-dependent nitric oxide formation in glial cells. *Brain Res*. 1995;686(2):160-8.

Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci*. 1999;19(6):2181-6.

Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358(1438):1669-77.

Alvarez B, Quinn LS, Busquets S, Quiles MT, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Tumor necrosis factor- α exerts interleukin-6-dependent and -independent effects on cultured skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1542(1-3):66-72.

Araque A, Carmignoto G, Haydon PG. Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:795-813.

Aronson AL. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *J Am Vet Med Assoc*. 1980;176(10 Spec No):1061-8.

Arruda JL, Sweitzer S, Rutkowski MD, DeLeo JA. Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. *Brain Res*. 2000;879(1-2):216-25.

Beiche F, Scheuerer S, Brune K, Geisslinger G, Goppelt-Strube M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett*. 1996;390(2):165-9.

Belmonte C, Viana F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Molecular pain*. 2008;4(1):14.

Bender D. Gastrocnemius muscle of rats. 2007. Available from: <http://david-bender.purplecloud.net/metonline/central/musclefuels/fuels5.htm> [2012 Jan 27].

Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol*. 1992;263(1 Pt 1):C1-16.

Besson JM. The neurobiology of pain. *Lancet*. 1999;353(9164):1610-5.

Bian K, Ke Y, Kamisaki Y, Murad F. Proteomic modification by nitric oxide. *J Pharmacol Sci*. 2006;101(4):271-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

(*) International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

- Brancroft JD, Cook HC. Principles of tissue demonstration and routine morphological staining. In: Brancroft JD, Cook HC. Manual of histological techniques and their diagnostic application. Livingstone: Livingstone C; 1994. p. 146-7.
- Broadhurst PL. Experiments in psychogenetics. In: Eisenk, HJ. Experiments in Personality. London: Routledge and Kegan Paul; 1960. p. 31-71.
- Bromm B, Treede RD. Human cerebral potentials evoked by CO2 laser stimuli causing pain. *Exp Brain Res*. 1987;67(1):153-62.
- Brooks J, Tracey I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J Anat*. 2005;207(1):19-33.
- Cao L, Tanga FY, Deleo JA. The contributing role of CD14 in toll-like receptor 4 dependent neuropathic pain. *Neuroscience*. 2009;158(2):896-903.
- Carmeli E, Beiker R, Maor M, Kodesh E. Increased iNOS, MMP-2, and HSP-72 in skeletal muscle following high-intensity exercise training. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2010;21(2):127-46.
- Chacur M, Gutierrez JM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Britto LR, Maier SF, Watkins LR, Cury Y. Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. *Pain*. 2004;111(1-2):65-76.
- Chacur M, Hoheisel U, Mense S. Sind spinale Mikrogliazellen na der Entstehung chronischer Muskelschmerzen beteiligt? German Pain Congress. Berlin, 2007. p. 14.
- Chacur M, Lambertz D, Hoheisel U, Mense S. Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: an immunohistochemical and behavioural study in rats. *Eur J Pain*. 2009;13(9):915-23.
- Chacur M, Matos RJ, Batista SS, Kihara AH, Britto LR. Differential regulation of the neuronal isoform of nitric oxide synthase in the superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus of the adult rat brain following eye enucleation. *Int J Dev Neurosci*. 2006;24(7):461-8.
- Chen SR, Eisenach JC, Pan HL. Intrathecal S-nitroso-N-acetylpenicillamine and L-cysteine attenuate nerve injury-induced allodynia through noradrenergic activation in rats. *Neuroscience*. 2000;101(3):759-65.
- Coggeshall RE, Hong KA, Langford LA, Schaible HG, Schmidt RF. Discharge characteristics of fine medial articular afferents at rest and during passive movements of inflamed knee joints. *Brain Res*. 1983;272(1):185-8.
- Colburn RW, DeLeo JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Res Bull*. 1999;49(6):419-27.

Referências

- Craig JA, Barron J, Walsh DM, Baxter GD. Lack of effect of combined low intensity laser therapy/phototherapy (CLILT) on delayed onset muscle soreness in humans. *Lasers Surg Med.* 1999;24(3):223-30.
- Crook J, Rideout E, Browne G. The prevalence of pain complaints in a general population. *Pain.* 1984;18(3):299-314.
- Cudeiro J, Rivadulla C. Sight and insight--on the physiological role of nitric oxide in the visual system. *Trends Neurosci.* 1999;22(3):109-16.
- Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol.* 1991;104(3):765-7.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti B, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.* 1992;107:660-4.
- Dray A. Tasting the inflammatory soup: role of peripheral neurones. *Pain Rev.* 1994;1:153-71.
- Dray A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth.* 1995;75:125-31.
- Dray A. Peripheral mediators of pain. In: Dray A. *The pharmacology of pain. Handbook of experimental pharmacology.* Berlin: Besson ADJ-M; 1997. p. 21-41.
- Duarte ID, Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur J Pharmacol.* 1990;186(2-3):289-93.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. *Neuropharmacology.* 1994;33(11):1479-85.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Faccioli LH. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. *Eur J Pharmacol.* 1992;217(2-3):207-9.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-6.
- Gabbita SP, Robinson KA, Stewart CA, Floyd RA, Hensley K. Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. *Arch Biochem Biophys.* 2000;376(1):1-13.
- Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM. Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.* 1991;565(1):1-7.
- Gomes-Leal W, Silva GJ, Oliveira RB, Picanco-Diniz CW. Computer-assisted morphometric analysis of intrinsic axon terminals in the supragranular layers of cat striate cortex. *Anat Embryol (Berl).* 2002;205(4):291-300.

Referências

- Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Lima AE, Wilkin G, De Nicola AF. The 21-aminosteroid U-74389F attenuates hyperexpression of GAP-43 and NADPH-diaphorase in the spinal cord of wobbler mouse, a model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res.* 1999;24(1):1-8.
- Graven-Nielsen T, Mense S. The peripheral apparatus of muscle pain: evidence from animal and human studies. *Clin J Pain.* 2001;17(1):2-10.
- Guerrero AT, Verri WA, Jr., Cunha TM, Silva TA, Rocha FA, Ferreira SH, Cunha FQ, Parada CA. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;84(2):244-51.
- Guhring H, Gorig M, Ates M, Coste O, Zeilhofer HU, Pahl A, Rehse K, Brune K. Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice. *J Neurosci.* 2000;20(17):6714-20.
- Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2006;26(16):4308-17.
- Hartung HP, Heininger K, Schafer B, Toyka KV. Substance P and astrocytes: stimulation of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism. *Faseb J.* 1988;2(1):48-51.
- Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnum F. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res.* 1992;576(1):120-4.
- Hatashita S, Sekiguchi M, Kobayashi H, Konno S, Kikuchi S. Contralateral neuropathic pain and neuropathology in dorsal root ganglion and spinal cord following hemilateral nerve injury in rats. *Spine.* 2008;33(12):1344-51.
- Hay C, de Belleruche J. Carrageenan-induced hyperalgesia is associated with increased cyclo-oxygenase-2 expression in spinal cord. *Neuroreport.* 1997;8(5):1249-51.
- Haydon PG. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2(3):185-93.
- Heneka MT, Feinstein DL. Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol.* 2001;114(1-2):8-18.
- Hoheisel U, Kaske A, Mense S. Relationship between neuronal activity and substance P-immunoreactivity in the rat spinal cord during acute and persistent myositis. *Neurosci Lett.* 1998;257(1):21-4.
- Hoheisel U, Unger T, Mense S. A block of spinal nitric oxide synthesis leads to increased background activity predominantly in nociceptive dorsal horn neurones in the rat. *Pain.* 2000;88(3):249-57.

- Hoheisel U, Unger T, Mense S. The possible role of the NO-cGMP pathway in nociception: different spinal and supraspinal action of enzyme blockers on rat dorsal horn neurones. *Pain*. 2005;117(3):358-67.
- Hoier B, Rufener N, Bojsen-Moller J, Bangsbo J, Hellsten Y. The effect of passive movement training on angiogenic factors and capillary growth in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2010;588(Pt 19):3833-45.
- Holmes GM, Hebert SL, Rogers RC, Hermann GE. Immunocytochemical localization of TNF type 1 and type 2 receptors in the rat spinal cord. *Brain Res*. 2004;1025(1-2):210-9.
- Hua XY, Svensson CI, Matsui T, Fitzsimmons B, Yaksh TL, Webb M. Intrathecal minocycline attenuates peripheral inflammation-induced hyperalgesia by inhibiting p38 MAPK in spinal microglia. *Eur J Neurosci*. 2005;22(10):2431-40.
- IITCINC. Eletronic Von Frey. 2011. Available from: <http://www.iitcinc.com> [2012 Jan 27].
- Jang SW, Svaren J. Induction of myelin protein zero by early growth response 2 through upstream and intragenic elements. *J Biol Chem*. 2009;284(30):20111-20.
- Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.
- Kandell ER, Schwartz JH, Pain and analgesia In: Jessell TM, Kelley KW. *Principles of neural science*. Norwalk: Appleton & Lange; 1991. p. 385-99.
- Kerkweg U, Schmitz D, de Groot H. Screening for the formation of reactive oxygen species and of NO in muscle tissue and remote organs upon mechanical trauma to the mouse hind limb. *Eur Surg Res*. 2006;38(2):83-9.
- Khalil Z, Khodr B. A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001;31(4):430-9.
- Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*. 2001;87(1):3-11.
- Kimelberg HK. Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. *Cell Mol Neurobiol*. 1983;3(1):1-16.
- Kobayashi Y, Kiguchi N, Maeda T, Ozaki M, Kishioka S. The critical role of spinal ceramide in the development of partial sciatic nerve ligation-induced neuropathic pain in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;4(421):318-22.
- Koerber HR, McIlwrath SL, Lawson JJ, Malin SA, Anderson CE, Jankowski MP, Davis BM. Cutaneous C-polymodal fibers lacking TRPV1 are sensitized to heat following inflammation, but fail to drive heat hyperalgesia in the absence of TPV1 containing C-heat fibers. *Molecular Pain*. 2010;6(1):58.

Referências

- Lalatta-Costerbosa G, Mazzoni M, Clavenzani P, Di Guardo G, Mazzuoli G, Marruchella G, De Grossi L, Agrimi U, Chiocchetti R. Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-d histochemistry in the enteric nervous system of Sarda breed sheep with different PrP genotypes in whole-mount and cryostat preparations. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(4):387-401.
- Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation. *Pain.* 2005;115(1-2):71-83.
- Lent R. Os neurônios se transformam. In: Lent R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 55-6.
- Lloyd DPC. Neuron patterns controlling transmission of ipsilateral hind limb reflexes in cats. *Journal of Neurophysiology.* 1943;(6):293-315.
- Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* 2008;137(3):473-7.
- Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S, Mitchell D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J Pain.* 2007;8(2):127-36.
- Luber-Narod J, Kage R, Leeman SE. Substance P enhances the secretion of tumor necrosis factor- α from neuroglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1994;152(2):819-24.
- Machelska H, Stein C. Immune mechanisms in pain control. *Anesth Analg.* 2002;95(4):1002-8, table of contents.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science.* 1992;257(5074):1276-9.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci.* 1995;15(4):2768-76.
- Marriott DR, Wilkin GP, Wood JN. Substance P-induced release of prostaglandins from astrocytes: regional specialisation and correlation with phosphoinositol metabolism. *J Neurochem.* 1991;56(1):259-65.
- McFarlane GJ. *Epidemiology of Pain.* Seattle: IASP; 1999.
- Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain.* 1993;52(2):127-36.
- Meller ST, Pechman PS, Gebhart GF, Maves TJ. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience.* 1992;50(1):7-10.

Referências

- Mense S. Sensitization of group IV muscle receptors to bradykinin by 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2. *Brain Res.* 1981;225(1):95-105.
- Miao P, Madec K, Gong Y, Shen H, Eisenstat D, Melanson M, Gu X, Leong C, Klowak M, Namaka M. Axotomy-induced up-regulation of tumor necrosis factor- α in the dorsal root ganglia. *Neurol Res.* 2008;30(6):623-31.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999;57(1):1-164.
- Milligan E, Zapata V, Schoeniger D, Chacur M, Green P, Poole S, Martin D, Maier SF, Watkins LR. An initial investigation of spinal mechanisms underlying pain enhancement induced by fractalkine, a neuronally released chemokine. *Eur J Neurosci.* 2005;22(11):2775-82.
- Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, Maier SF, Watkins LR. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res.* 2000;861(1):105-16.
- Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, Holguin A, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci.* 2001;21(8):2808-19.
- Milligan ED, Verge G, Twining C, Chapman G, Maier SF, Naeve G, Watkins LR. The potential role of fractalkine, a neural chemokine, in creating spinally mediated exaggerated pain states. *J Pain Suppl.* 2002;2:30.
- Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(1):23-36.
- Milligan ED, Zapata V, Chacur M, Schoeniger D, Biedenkapp J, O'Connor KA, Verge GM, Chapman G, Green P, Foster AC, Naeve GS, Maier SF, Watkins LR. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci.* 2004;20(9):2294-302.
- Ohtori S, Takahashi K, Moriya H, Myers RR. TNF- α and TNF- α receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine.* 2004;29(10):1082-8.
- Osborne MG, Coderre TJ. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. *Br J Pharmacol.* 1999;126(8):1840-6.
- Oxford University. Rexed laminae. 2006. Available from: <https://webauth.ox.ac.uk/> [2012 Jan 27].

- Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F. An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J Neurochem.* 1987;48(5):1377-85.
- Paulsen RE, Odden E, Fonnum F. Importance of glutamine for gamma-aminobutyric acid synthesis in rat neostriatum in vivo. *J Neurochem.* 1988;51(4):1294-9.
- Percival JM, Anderson KN, Huang P, Adams ME, Froehner SC. Golgi and sarcolemmal neuronal NOS differentially regulate contraction-induced fatigue and vasoconstriction in exercising mouse skeletal muscle. *J Clin Invest.* 2010;120(3):816-26.
- Perea G, Araque A. Communication between astrocytes and neurons: a complex language. *J Physiol Paris.* 2002;96(3-4):199-207.
- Peters RA. Mechanisms of the toxicity of the active constituent of *Dichapetalum cymosum* and related compounds. *Adv Enzymol.* 1957:113-59.
- Radak Z, Naito H, Taylor AW, Goto S. Nitric oxide: is it the cause of muscle soreness? *Nitric Oxide.* 2012;26(2):89-94.
- Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003;104(3):567-77.
- Raghavendra V, Tanga F, DeLeo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(2):624-30.
- Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN. *Textbook of pain.* London: Livingstone C; 1999. p. 1-50.
- Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *Journal of Comparative Neurology.* 1952;96:415-95.
- Rothermundt M, Ohrmann P, Abel S, Siegmund A, Pedersen A, Ponath G, Suslow T, Peters M, Kaestner F, Heindel W, Arolt V, Pfleiderer B. Glial cell activation in a subgroup of patients with schizophrenia indicated by increased S100B serum concentrations and elevated myo-inositol. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2007;31(2):361-4.
- Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S, Bonventre JV, Woolf CJ. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature.* 2001;410(6827):471-5.
- Schafers M, Sorkin LS, Sommer C. Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003;104(3):579-88.
- Schaible HG, Richter F. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg.* 2004;389(4):237-43.

- Schnitzler A, Ploner M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *J Clin Neurophysiol.* 2000;17(6):592-603.
- Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci.* 2007;10(11):1361-8.
- Seybold VS, Jia YP, Abrahams LG. Cyclo-oxygenase-2 contributes to central sensitization in rats with peripheral inflammation. *Pain.* 2003;105(1-2):47-55.
- Shan S, Qi-Liang M-Y, Hong C, Tingting L, Mei H, Haili P, Yan-Qingb W, Zhi-Qia Z, Yu-Qiu Z. Is functional state of spinal microglia involved in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of electropuncture in rat model of monoarthritis? *Neurobiology.* 2007:558-68.
- Sousa AM, Prado WA. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.* 2001;897(1-2):9-19.
- Stella N, Tence M, Glowinski J, Premont J. Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes. *J Neurosci.* 1994;14(2):568-75.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia.* 1988;1(5):301-7.
- Sun XC, Chen WN, Li SQ, Cai JS, Li WB, Xian XH, Hu YY, Zhang M, Li QJ. Fluorocitrate, an inhibitor of glial metabolism, inhibits the up-regulation of NOS expression, activity and NO production in the spinal cord induced by formalin test in rats. *Neurochem Res.* 2009;34(2):351-9.
- Svensson CI, Yaksh TL. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:553-83.
- Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA. Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience.* 2001;103(2):529-39.
- Teixeira MJ, Pimenta CAM. *Dor: conceitos gerais.* São Paulo: Limay; 1994.
- Tenschert S, Reinert A, Hoheisel U, Mense S. Effects of a chronic myositis on structural and functional features of spinal astrocytes in the rat. *Neurosci Lett.* 2004;361(1-3):196-9.
- Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci.* 2001;21(8):2580-8.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.

- Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. Myelinated mechanically insensitive afferents from monkey hairy skin: heat-response properties. *J Neurophysiol.* 1998;80(3):1082-93.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci.* 2005;28(2):101-7.
- Urban MO, Gebhart GF. Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):7687-92.
- Vane JR, Botting RM. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Res.* 1998;47(2):578-87.
- Wang MX, Murrell DF, Szabo C, Warren RF, Sarris M, Murrell GA. Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. *Nitric Oxide.* 2001;5(3):219-32.
- Watkins LR, Maier SF. Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):7710-3.
- Willis WD, Coggeshall RE. Sensory mechanisms of the spinal cord: primary afferent neurons and the spinal dorsal horn. New York: Kluwer Academic/Plenum; 2004.
- Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C, Choi DK, Ischiropoulos H, Przedborski S. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci.* 2002;22(5):1763-71.
- Wu J, Fang L, Lin Q, Willis WD. Nitric oxide synthase in spinal cord central sensitization following intradermal injection of capsaicin. *Pain.* 2001;94(1):47-58.
- Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Svensson C, Luo ZD, Isakson PC. The acute antihyperalgesic action of nonsteroidal, anti-inflammatory drugs and release of spinal prostaglandin E2 is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclooxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci.* 2001;21(16):5847-53.
- Yaksh TL, Malmberg AB. Spinal actions of NSAIDS in blocking spinally mediated hyperalgesia: the role of cyclooxygenase products. *Agents Actions Suppl.* 1993;41:89-100.
- Yamamoto T, Sakashita Y. COX-2 inhibitor prevents the development of hyperalgesia induced by intrathecal NMDA or AMPA. *Neuroreport.* 1998;9(17):3869-73.
- Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(23):13496-500.
- Zanchet EM, Longo I, Cury Y. Involvement of spinal neurokinins, excitatory amino acids, proinflammatory cytokines, nitric oxide and prostanooids in pain facilitation induced by Phoneutria nigriventer spider venom. *Brain Res.* 2004;1021(1):101-11.

Zembowicz A, Hecker M, Macarthur H, Sessa WC, Vane JR. Nitric oxide and another potent vasodilator are formed from NG-hydroxy-L-arginine by cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(24):11172-6.

Zhang Y, Pilon G, Marette A, Baracos VE. Cytokines and endotoxin induce cytokine receptors in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(1):E196-205.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.

Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2001;429(1-3):23-37.

ANEXO - OUTRAS ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO

Participação em Reuniões Científicas

- Apresentação de trabalho no **XXXIV Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento**, realizado em Caxambu/MG – Brasil, de 8 a 11 de Setembro de 2010, apresentado em formato de pôster intitulado “UP-REGULATION OF NOS EXPRESSION, ACTIVITY AND NO PRODUCTION IN THE SPINAL CORD INDUCED BY ACUTE MYOSITIS IN RATS”.
- Apresentação de trabalho na “**30th Annual Scientific Meeting of the American Pain Society -Austin Convention Center, Austin, Texas**”, apresentado em formato de pôster intitulado “UP-REGULATION OF NOS EXPRESSION, ACTIVITY AND NO PRODUCTION IN THE SPINAL CORD INDUCED BY ACUTE MYOSITIS IN RATS”, entre os dias 19-21 de Maio de 2011, realizado em Austin/TX – EUA.
- Apresentação de trabalho no “**7th Congress of the European Federation of IASP® Chapters (EFIC®)**”, apresentado em formato de poster intitulado “ROLE OF MINOCYCLINE IN ACUTE MUSCLE PAIN INDUCED BY CARRAGEENAN IN RATS”, entre os dias 21-24 de Setembro de 2011, realizado em Hamburgo – Alemanha.

Participação em Cursos e Simpósios

- Participação, como ouvinte, do “**I Encontro Internacional de Ensino em Anatomia do ICB/USP**”, ocorrido de 08-13 de Março de 2010 na Universidade de São Paulo, Brasil.
- Participação, como ouvinte, do “**V Simpósio Retrospectivas e Perspectivas da Fisiologia**”, ocorrido no Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB I, USP, em 01 de Junho de 2010.
- Apresentação de trabalho, no formato de pôster intitulado “UP-REGULATION OF NOS EXPRESSION, ACTIVITY AND NO PRODUCTION IN THE SPINAL CORD INDUCED BY ACUTE MYOSITIS IN RATS” no **I Simpósio da Pós Graduação em Ciências Morfofuncionais**, ocorrido no Departamento de Anatomia, USP, nos dias 4 e 5 de Outubro de 2010.

Referências

- Participação na organização do evento **“I Fórum da Pós-Graduação do ICB-USP”**, ocorrido em 26 de Novembro de 2010 na Universidade de São Paulo/Brasil.
- Participação na organização da **“III Jornada de Anatomia – Estudo do Sistema Cardiovascular”**, ocorrido no Departamento de Anatomia, ICB III, USP – no período de 10 a 21 de Janeiro de 2011.
- Participação, como ouvinte, do **“I Encontro de Neurociência e Educação da USP”** ocorrido no dia 26 de janeiro de 2010, na Universidade de São Paulo/Brasil.

Participação em aulas e seminários

- Participação em seminários realizados no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor – Departamento de Anatomia USP, e de Fisiopatologia da Dor – Instituto Butantan durante o ano de 2010 e 2011.
- Participação voluntária como monitora da disciplina de Anatomia Humana (código BMA 125) para o curso de graduação de Terapia Ocupacional, durante o 1º semestre de 2011, pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) da Pró-Reitoria da Pós Graduação da Universidade de São Paulo, junto ao programa de Ciências Morfofuncionais.

Estágio no exterior

Cabe mencionar, que nosso laboratório mantém colaboração com o laboratório do Prof. Dr. med. Roelf-Detlef Treede, Departamento de Neurofisiologia, Centro de Biomedicina e Tecnologia Médica – Mannheim, Alemanha (Zentrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg). No presente local, realizei um estágio de 8 de Setembro a 15 de Dezembro de 2011 com o intuito de aprender técnicas de eletrofisiologia, para um melhor aprofundamento dos nossos resultados uma vez que pretendemos dar continuidade ao estudo da dor músculo-esquelética em meu futuro projeto de doutorado.

Artigo

Foi confeccionado e enviado o artigo científico relativo à parte deste trabalho, intitulado **“Role of spinal glia cells in myositis-induced central sensitization”**, na autoria de ¹Freitas, MF; ¹Bonifácio, RP; ²Britto, LRG; ¹Chacur, M* (¹Departamento de Anatomia, ²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil), e encontra-se, no presente momento, em fase de revisão.