Milena Fernandes de Freitas

Avaliação do envolvimento de células microgliais e citocinas em modelo de dor musculoesquelética

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

São Paulo
2017

Milena Fernandes de Freitas

Avaliação do envolvimento de células microgliais e citocinas em modelo de dor musculoesquelética

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

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Freitas, Milena
Avaliação do envolvimento de células microgliais e citocinas em modelo de dor musculoesquelética / Milena Freitas; orientadora Marucia Chacur. -- São Paulo, 2017.
100 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Dor muscular. 2. inflamação. 3. miosite. 4. fractalquina. 5. citocinas. I. Chacur, Marucia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Milena Fernandes de Freitas

Título da Tese: Avaliação do envolvimento de células microgliais e citocinas em modelo de dor musculoesquelética

Orientador(a): Marucia Chacur

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **114** nas fls. **133** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marucia Chucar**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Alterações histológicas e neurofisiológicas induzidas por miosite crônica em músculo esquelético e fascia"* do qual participam o(s) aluno(s) **Milena Fernandes de Freitas,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **20.08.2012, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 23 de agosto de 2012.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.079/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **114/2012/CEUA**, informo que o título do projeto de pesquisa da aluna **Milena Fernandes de Freitas** foi alterado para *"Avaliação do envolvimento de células microgliais e citocinas em modelo de dor musculoesquelética*" sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 15 de setembro de 2015.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da Comissão de
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.068.16

São Paulo, 30 de agosto de 2016.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado " ***Avaliação do envolvimento de células microgliais e citocinas em modelo de dor musculoesquelética***", registrado sob o protocolo nº ***114/2012*** e aprovado em 20/08/2012 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 20/08/2020**, sem a inclusão de novos animais no projeto citado acima.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Marúcia Chacur**
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais, que me dão forças além deste mundo ♥

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com este trabalho e me ajudaram a torná-lo possível, sendo colaboradores, conselheiros intelectuais, ou família e amigos dando a força que um pós-graduando precisa para enfrentar esses anos todos.

À minha orientadora Profª Marucia Chacur, pelo apoio, incentivo constante e confiança, a quem serei eternamente grata. Nem todo mundo tem a sorte de ser amiga da chefe – eu tive e tenho. Se eu não tivesse cruzado o seu caminho nada disso teria acontecido. Agradeço todos os dias por ter tido você a frente das maiores decisões da minha vida, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal. Você tem toda minha admiração e espero conseguir um dia ser como você. Espero me tornar uma grande cientista da qual você pode se orgulhar e quem sabe até colaborar no futuro. Vou sentir saudades imensas. Obrigada por tudo, tudo, tudo mesmo!

Uma enorme gratidão por ter convivido diariamente com os membros da família Neurodor, os antigos Pri, Li, Rê, Jojó, e aos que continuam comigo lá, firme e fortes - Dani, Fabio e Mara – grandes amigos da geração que iniciou esse lab incrível. Agradeço também aos outros membros que chegaram depois, se tornaram especiais, e que hoje são as pessoas que convivo todos os dias, acertando e errando experimentos e discutindo sobre a ciência (Igor, Alyne, Rafa, Marina, Camilla e Dani boy). Vocês todos formam um lab do qual eu tenho muito orgulho de fazer parte! Obrigada pelo companheirismo e carinho sempre! Espero deixar apenas coisas boas como legado da minha passagem por esse lab especial.

Aos amigos que o departamento me deu, especialmente aos carinhosamente nomeados Cookies: Ivson (Pretinho), Vanis, Mabi, Manu e Marina (Má). Vocês desde o início fizeram os meus dias melhores dentro e fora do ambiente de trabalho. Muito mais do que me fazer sorrir, vocês me deram suporte e se tornaram um porto seguro pra mim. Obrigada pelos cafés científicos e por essa amizade tão verdadeira que levarei comigo pra onde for.

Agradeço ao apoio, amizade e colaboração dos membros dos laboratório LEDs, no Instituto Butatan e do laboratório de Neurofisiologia, do Prof. Brito, no Departamento de Fisiologia do ICB. Obrigada por sempre estarem de portas abertas para nós!

Obrigada também à outra geração de pessoas que fizeram com que eu evoluísse e chegasse ate aqui: Dani, que me levou pra essa carreira sem saber que eu ia ficar de verdade! Ro, por me orientar e me apresentar a Maru e depois fazer parte de tantos momentos divertidos e importantes na minha vida acadêmica. Além de pessoas incríveis que tive a sorte de ter como amigos: Cleytão, Kallene e Raquelzinha. Agradeço vcs por estarem sempre por perto e me ajudarem a construir a minha formação desde o iniciozinho. Admiro muito vocês como profissionais e pessoas. Muito obrigada!

Agradeço ainda aos meus amigos de toda a vida, minhas meninas Bia, Dani, Fabi, Mari e Carol. Somos a prova viva de como a amizade de verdade não separa nada. Obrigada por essa jornada e pela força de sempre. E ainda meus agradecimentos especiais aos meus amigos do Mackenzie que, mesmo depois que a faculdade acabou, continuam ao meu lado e que sei que posso contar a qualquer momento. Carrego todos no coração. Mabi, minha companheira da vida, obrigada por sempre estar lá por mim, por ser um exemplo de força e determinação e por tornar a jornada da vida mais divertida! Obrigada Cá (Camilla) por não me deixar surtar nessa reta final – vai dar tudo certo pra nós! Já deu!

Nesses últimos anos, agradeço especialmente à força dada pelas amigas Bia e Má. Obrigada por me mostrarem que depois de toda tempestade vem um arco-íris. Admiro e amo

vocês demais. Vocês são fundamentais para a minha sobrevivência nesse mundo de imprevisibilidades.

Agradeço à Profª. Marzia Malcangio, pelo aceite da colaboração que propusemos e abriu as portas de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver meu projeto e participar das atividades de seu grupo de pesquisa em um grande centro de excelência na pesquisa (Wolfson CARD - King's College London). Em especial agradeço a todos os membros do *Malcangio lab*, que foram mais do que lab mates, me ajudaram no dia-a-dia dos experimentos e se tornaram grandes amigos. Thank you Kelly (best and favorite mate), Karli (Wonder Jaffa Karli), João (moon landing! banana!), Keshi (bloody trains!), Yahyah (it's a mess…), Raf (Que dire?!), Tom (the mice man), and all other Wolfson members that made luch or bench time more fun, specially Doug, that became a great friend over this year. Also, a special thanks for Thomas Pitcher for helping with all behaviour and perfusions along the year.

Ao Jim, por ter aparecido em minha vida em um momento turbulento e me trazido paz, companheirismo e o amor que eu precisava para continuar. Por ter mudado de país por mim e por ter sempre sido incrivelmente otimista em todos os nossos planos e sempre ver o lado bom de todas as situações. You are my best half! Thank you, amor.

Agradeço, acima de tudo, à minha família que ao longo dessa trajetória me apoiou e acreditou em mim a todo o momento. Espero ser motivo de orgulho para vocês porque afinal é tudo que me importa. Meus irmãos, que são meu braço direito e esquerdo, minha cunhada Lívia, que é um exemplo para mim e aos meus sobrinhos que de longe ou perto são minha fonte de alegria e só me arrancam sorrisos. Ao meu pai que é puro coração. Meu neguinho, meu exemplo, meu espelho, meu herói. Sem vocês jamais chegaria aqui. À minha mãe, que sempre vai me acompanhar aonde eu for, na forma da estrela mais brilhante que ilumina o céu do meu mundo. Obrigada família, por serem tão incríveis e por tanto amor.

Ao Depto de Anatomia e à Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais e ainda a todos os profissionais do departamento por terem dado suporte para a realização deste projeto e no dia-a-dia acadêmico, especialmente à Patricia e a Cris, aos técnicos de anatomia do bloco didático e aos funcionários do Biotério da Anatomia, sobretudo ao Renivaldo. Agradeço ainda ao Seu João, por recolher o lixo com tanta alegria e nos presentear com abacates e tapiocas e por ser um grande exemplo de ser humano do bem que nos ensina todo dia! Obrigada!

Aos professores do departamento e do programa, especialmente àqueles que sempre tiveram as portas de seus laboratórios abertas para colaborações, conselhos ou cafés – Profª Maria Luiza, pela qual tenho enorme carinho por toda ajuda ao longo da minha trajetória e também ao Prof. Jackson, Profª Renata, Prof. Newton e Prof. Edson. Agradeço a todos os ensinamentos dados, tenho grande admiração por vocês.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro da CAPES que tornou possível a realização deste projeto. Junto a isso, agradeço a grande oportunidade de realizar o período de doutorado sanduíche pelo PDSE na Universidade King's College London (processo número 7050/2015-01), o que contribuiu de forma importante para o enriquecimento deste trabalho e para a minha evolução como cientista.

Muito obrigada a todos vocês!

"And at the end, the love you make is equal to the love you take"

(The Beatles)

Há mais mistérios entre o céu e a terra do que sonha a nossa vã filosofia.

William Shakespeare

RESUMO

Freitas, MF. Avaliação do envolvimento de células microgliais e citocinas em modelo de dor musculoesquelética. [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2017.

Distúrbios musculoesqueléticos são as principais causas de incapacidade nas pessoas durante seus anos de trabalho. Diversos estudos têm sido realizados com o uso de modelos experimentais para melhor entendimento da dor muscular com foco no local da lesão, porém, estudos aprofundando a avaliação da transmissão medular neste modelo ainda são escassos. É sabido que as células da glia são importantes fontes de mediadores da sensibilização nociceptiva e que contribuem para a iniciação e manutenção deste processo. Com base nisto, nosso objetivo foi avaliar a participação de astrócitos, e mais profundamente, das células da microglia na medula espinal (ME) dos animais em dois modelos de inflamação muscular (aguda e crônica) além de um modelo de inflamação plantar. Em adição, avaliamos a participação de determinadas citocinas com o intuito de obter um perfil inflamatório em nossos modelos. Nossos resultados demonstraram um quadro de inflamação instalada no tecido muscular de animais com miosite crônica através das análises histológicas realizadas. Os testes comportamentais tanto para hiperalgesia mecânica como térmica e alodinia confirmaram a instalação do quadro álgico uma vez que os animais com miosite apresentaram uma queda em seus limiares nociceptivos em relação aos grupos controle. A atividade locomotora dos animais também se demonstrou comprometida após a indução de miosite. Em relação à participação das células gliais neste modelo, demonstramos que houve um aumento na expressão de GFAP e OX-42, correspondentes à marcação astrócitos e células da microglia na porção lombar da medula espinal dos animais com miosite, quando comparados ao grupo controle. O tratamento com minociclina foi capaz de reverter a sensibilidade nociceptiva nos animais com miosite, além de reduzir a expressão de OX-42 e fractalquina (FKN) na ME. Quanto à participação dos mediadores sistêmicos sob a condição crônica, observamos um aumento nos níveis de IL-1β e FKN no sangue dos animais com miosite crônica, enquanto o nível de IL-10 permaneceu baixo em relação ao grupo controle. Com relação ao modelo agudo de inflamação muscular ou plantar, observamos que perante a deleção do receptor de FKN em células microgliais, ocorre uma reversão significativa no limiar nociceptivo para alodinia mecânica, 24 e 48 horas após a indução da inflamação muscular e plantar, respectivamente. Ainda, a deleção presente nos animais transgênicos foi capaz de diminuir a ativação de células da microglia na ME no modelo de inflamação plantar mas não no modelo de miosite aguda. Nossos dados indicam o envolvimento da FKN de diferentes formas nos modelos propostos. Com nossos achados esperamos colaborar com o aprimoramento de estratégias terapêuticas focadas na manipulação de células microgliais para tratamento de dores musculares.

Palavras-chave: Dor muscular. Inflamação. Miosite. Hiperalgesia. Alodinia. Células gliais. Interleucinas. Fractalquina.

ABSTRACT

Freitas, MF. Evaluation of microglia cells and cytokines involvement in a musculoskeletal pain model. [Ph. D. thesis (Morphofuncional Sciences)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Musculoskeletal disorders are the leading causes of disability in people during their working years. Several studies have been carried out with the use of experimental models for better understanding of muscle pain with a focus on the lesion site, however, further studies evaluating the spinal cord transmission in this model are still scarce. It is known that glial cells are a important source of mediators for nociceptive sensitization and contribute to the initiation and maintenance of this process. Based on this, our aim was to evaluate the participation of astrocytes, and more deeply, the microglia cells in the spinal cord (SC) of the animals in two models of muscle inflammation (acute and chronic) in addition to a model of plantar inflammation. In addition, we evaluated the participation of certain cytokines in order to obtain an inflammatory profile in our models. Our results demonstrated a framework of inflammation installed in the muscle tissue of animals with chronic myositis through histological analysis. Behavioral tests for both mechanical and thermal hyperalgesia and also allodynia confirmed the onset of nociception since myositis animals showed a decrease in their nociceptive thresholds in relation to the control groups. The locomotor activity of the animals was also shown to be compromised after induction of myositis. In relation to the participation of glial cells in this model, we demonstrated that there was an increase in the expression of GFAP and OX-42, corresponding to the labeling of astrocytes and microglia cells in the lumbar portion of the SC of animals with myositis, when compared to the control group. Minocycline treatment was able to revert the nociceptive sensitivity in animals with myositis, in addition to reducing the expression of OX-42 and fractalkine (FKN) in the SC. Regarding the participation of systemic mediators under the chronic condition, we observed an increase in the levels of IL-1β and FKN in the blood of the animals with chronic myositis, while the level of IL-10 remained low in relation to the control group. Regarding the acute model of muscle or plantar inflammation, we observed that, facing the FKN receptor deletion in microglial cells, a significant reversal occurs in the animals nociceptive threshold for mechanical allodynia, 24 and 48 hours after induction of muscle and plantar inflammation, respectively. Furthermore, the deletion found in transgenic animals was able to decrease the activation of microglia cells in ME in the plantar inflammation model, but not in the acute myositis model. Our data indicate the involvement of FKN in different ways in the proposed models. With our findings we hope to collaborate with the improvement of therapeutic strategies focused on the manipulation of microglial cells for the treatment of muscle pain.

Keywords: Muscle pain. Inflammation. Myositis. Hyperalgesia. Alodinia. Glial cells. Interleukins. Fractalkine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de transmissão nociceptiva.....25

Figura 2 – Linha do tempo de acordo com as diferentes etapas experimentais.....38

Figura 3 – Von Frey Eletrônico.....39

Figura 4 – Teste de Hargreaves.....40

Figura 5 – Teste de Alodinia.....41

Figura 6 - Teste do Índice Funcional da Atividade Locomotora.....42

Figura 7 – Segmentos lombares da medula espinal de camundongos.....47

Figura 8 – Representação esquemática das lâminas de Rexed na medula espinal.....48

Figura 9 – Avaliação da hiperalgesia mecânica de animais com miosite crônica.....53

Figura 10 – Avaliação da hiperalgesia térmica de animais com miosite crônica.....54

Figura 11 – Avaliação da alodinia tátil de animais com miosite crônica.....55

Figura 12 – Índice funcional da atividade locomotora de animais com miosite crônica.....56

Figura 13 – Cortes histológicos dos tecidos musculares de animais submetidos à miosite crônica.....57

Figura 14 A e B – Quantificação da expressão glial na medula espinal de animais coma miosite crônica.....58

Figura 14 C – Efeito da miosite crônica induzida por CFA na expressão fractalquina.....59

Figura 15 – Quantificação de citocinas e FKN no plasma sanguíneo de animais com miosite crônica.....60

Figura 16 – Edema plantar causado pela injeção de Cg na pata.....61

Figura 17 – Avaliação da alodinia mecânica de animais com inflamação plantar.....62

Figura 18 – Avaliação da hiperalgesia térmica de animais com inflamação plantar.....63

Figura 19 – Edema muscular causado pela injeção de Cg.....64

Figura 20 – Avaliação da alodinia mecânica de animais com inflamação muscular.....65

Figura 21 – Avaliação da hiperalgesia térmica de animais com inflamação muscular.....66

Figura 22 – Quantificação da ativação microglial por segmentos lombares da medula espinal após a injeção intraplantar de Cg.....67

Figura 23 – Fotomicrografia e densidade de células GFP+ e imunorreativas para proteína pP38 em modelo de inflamação intraplantar.....68

Figura 24 – Quantificação da ativação microglial por segmentos lombares da medula espinal após a injeção intramuscular de Cg.....69

Figura 25 – Fotomicrografia e densidade de células GFP+ e células imunorreativas para proteína pP38 em modelo de inflamação intramuscular.....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Indução dos modelos de miosite e inflamação plantar.....35

Tabela 2 – Lista dos anticorpos primários utilizados para análise de expressão protéica por *Western Blotting*.....44

Tabela 3 - Lista dos anticorpos e amplificadores de sinal utilizados para análise da ativação microglial por Imuno-histoquímica.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Analysis of variance (Analise de Variância)
ASPA	*Animals Scientific Procedures Act*
BSA	*Bovine Serum*
CARD	*Centre for Age-Related Diseases*
CDME	Coluna/Corno Dorsal da Medula Espinal
cDNA	*Complementary* DNA (DNA complementar)
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CFA	*Complete Freund's Adjuvant* (Adjuvante Completo de Freund)
Cg	Carragenina
CMD	Concentração mínima detectada
CSF	Cerebrospinal fluid (Fluido cerebrospinal)
CX_3CL1	Fractalquina/ Fractalcina
CX_3CR1	Receptor de fractalquina
DNA	*Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
dNTP	*Deoxynucleotide* (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)
DTT	Ditiotreiol
DRG	*Dorsal Root Ganglia* (Gânglio da Raiz Dorsal ou Gânglio da Coluna posterior
ECL	*Enhanced chemiluminescence*
e.g.	*exempli gratia* (por exemplo)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
e.p.m	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da America
FKN	*Fractalkine* (Fractalquina/Fractalcina)
gfp	*greeen fluorescent protein* (proteína verde fluorescente)
Gt	*Goat* (cabra)

HE	Hematoxilina-Eosina
HET	*Heterozygous* (heterozigoto)
HCl	Ácido clorídrico
Iba-1	*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
IT	*Intermediate Toes* (Espalhamento dos dígitos intermediários)
Kb	Kilo-base
KO	*Knock-out* (com deleção de gene)
L3	Segmento lombar 3 da medula espinal
L4	Segmento lombar 4 da medula espinal
L5	Segmento lombar 5 da medula espinal
M.	Músculo
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinases*
MF	Medida Final
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
MI	Medida Inicial
Mino	Minociclina
MP	Medida Parcial
NaCl	Cloreto de Sódio

NGF	*Nerve Growth Factor* (Fator de Crescimento Neural)
NO	Nitric Oxide (Óxido Nítrico)
PAG	*Periaqueductal Grey* (Substância Cinzenta Periaquedutal)
PB	Phophate Buffer (Tampão Fosfato)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFA	Paraformaldeído
PGE_2	Prostaglandina E2
Ph	*Potential of hydrogen* (Potencial hidrogeniônico)
PL	*Print Length* (Comprimento da pegada)
pP38	Phospho-P38
Rb	*Rabbit* (Coelho)
Sal	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
TA	Temperatura Ambiente
TS	*Total Spread of Toes* (Espalhamento Total dos Dígitos)
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor alpha* (Fator de Necrose Tumoral alfa)
USP	Universidade de Sao Paulo
UK	*United Kingdom* (Reino Unido)
vs.	*Versus*
WT	*Wild-type* (Selvagem)
6º d	Sexto dia
12º d	Décimo segundo dia
24 h	Vinte e quatro horas
48 h	Quarenta e oito horas

Unidades

pb	Pares de base
cm	Centímetros
^{o}C	Grau(s) Celsius
G	Gauge
g	Grama(s)
h	Horas
log	logaritmo
M	Molar
mA	Miliampère
mg	Miligramas
µg	Microgramas
min	Minutos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mM	Milimolar
µm	Micrometro
µM	Micromolar
%	Porcentagem
rpm	Rotações por minuto
V	Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....23

1.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....**23**

1.2 DOR MUSCULAR.....**25**

1.3 CÉLULAS DA GLIA E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....**27**

1.4 FRACTALQUINA E DOR.....**29**

1.5 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....**30**

2 OBJETIVOS.....31

2.1 ETAPA 1: MODELO DE MIOSITE CRÔNICA EM RATOS.....**31**

2.2 ETAPA 2: MODELO DE MIOSITE AGUDA E INFLAMAÇÃO PLANTAR EM CAMUNDONGOS.....**31**

3 MATERIAL E MÉTODOS.....32

3.1 ANIMAIS.....**32**

3.1.1 GERAÇÃO E CRUZAMENTO DE CAMUNDONGOS CX_3CR1-GFP.....**33**

3.1.2 GERAÇÃO E CRUZAMENTO DE CAMUNDONGOS $CX_3CR1^{-/-}$.....**33**

3.2 INDUÇÃO DA NOCICEPÇÃO POR INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA.....**34**

3.2.1 ETAPA 1: INDUÇÃO DE MIOSITE CRÔNICA.....**34**

3.2.2 ETAPA 2: INDUÇÃO DE MIOSITE AGUDA E INFLAMAÇÃO PLANTAR.....**34**

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....**35**

3.3.1 ETAPA 1: ESTUDO DO MODELO DE MIOSITE CRÔNICA.....**35**

3.3.2 ETAPA 2: ESTUDO DO MODELO DE MIOSITE E INFLAMAÇÃO PLANTAR AGUDA.....**36**

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL.....**37**

3.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE NOCICEPTIVA.....**38**

3.5.1 DETERMINAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA.....**39**

3.5.2 DETERMINAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA.....**39**

3.5.3 DETERMINAÇÃO DA DA ALODÍNIA MECÂNICA/TÁTIL.....**40**

3.6 ÍNDICE FUNCIONAL DA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....**41**

3.7 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO: ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DE MINOCICLINA.....**42**

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES COMPORTAMENTAIS.....**43**

3.9 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING.....**43**

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS DE WESTERN BLOT.....**44**

3.11 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA.....**45**

3.12 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DA MICROGLIA.....**46**

3.13 TÉCNICA HISTOLÓGICA – HEMATOXILINA-EOSINA (HE).....**48**

3.14 ENSAIOS PARA DOSAGEM DE CITOCINAS.....**49**

3.15 GENOTIPAGEM.....**50**

3.15.1 CX_3CR1-GFP.....**50**

3.15.2 $CX_3CR1^{-/-}$.....**50**

3.15.3 ELETROFORESE EM GEL E VISUALIZAÇÃO DAS BANDAS.....**51**

4 RESULTADOS.....**52**

4.1 ETAPA 1 – MIOSITE CRÔNICA.....**52**

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CFA E TRATAMENTO INTRATECAL COM MINOCICLINA.....**52**

4.1.2 CARACTERIZAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CFA E TRATAMENTO INTRATECAL COM MINOCICLINA.....**53**

4.1.3 CARACTERIZAÇÃO DA ALODINIA TÁTIL INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CFA E TRATAMENTO INTRATECAL COM MINOCICLINA.....**54**

4.1.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RESPOSTA A INDUÇÃO DE MIOSITE CRÔNICA.....**55**

4.1.5 MORFOFISIOLOGIA DO TECIDO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À INDUÇÃO DE MIOSITE CRÔNICA.....**56**

4.1.6 PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS GLIAIS NA MEDULA ESPINAL DE ANIMAIS COM MIOSITE CRÔNICA - ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING.....**57**

4.1.7 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS E FRACTALQUINA NO PLASMA SANGUÍNEO DE ANIMAIS COM MIOSITE CRÔNICA.....**59**

4.2 ETAPA 2 – MIOSITE E INFLAMAÇÃO PLANTAR AGUDA.....**60**

4.2.1 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO PELO EDEMA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGEENINA.....**61**

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA.....**62**

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA.....**63**

4.2.4 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO PELO EDEMA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CARRAGEENINA.....**64**

4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DA ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CARRAGENINA.....**65**

4.2.6 CARACTERIZAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CARRAGENINA.....**65**

4.2.7 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL INDUZIDA PELAS INJEÇÕES INTRAPLANTARES E INTRAMUSCULARES DE CARRAGENINA.....**66**

4.2.7.1 QUANTIFICAÇÃO POR SEGMENTOS LOMBARES DA MEDULA ESPINAL.....**66**

5 DISCUSSÃO.....**71**

6 CONCLUSÃO.....**81**

REFERÊNCIAS*.....**82**

ANEXO.....**92**

A - PROGRAMA DE DOUTORADO-SANDUÍCHE NO EXTERIOR (PDSE).....**92**

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A dor, apesar de estar inserida em uma categoria universal, não é sentida ou expressa por todos da mesma forma. A interpretação da dor variou conforme cada sociedade e o momento histórico em que se encontrava. Nos povos antigos a dor era atribuída a uma punição ao indivíduo que resultava na invasão de maus espíritos em seu corpo. Dor e religião caminhavam juntos em diferentes crenças e o conceito religioso de dor foi fundamentado na medicina clássica de Hipócrates que postulou que "Sedar a dor é obra divina" (Teixeira, Osaka, 2010). Com o decorrer do tempo e a evolução da medicina e da ciência, os povos atuais passaram a estudar os mecanismos de dor e utilizar argumentos lógicos para justificar sua condição.

Atualmente, a dor é definida com uma "experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial ou ainda descrita em termos que sugerem tais lesões" (Loeser, Treede, 2008). Portanto, sabe-se que a dor envolve processos de sensibilização, mas também engloba processos cognitivos e dependentes da memória, aspectos culturais e psíquicos. A interpretação das dimensões da dor é única e exclusiva de cada indivíduo, tornando o próprio fenômeno e o seu tratamento processos de natureza complexa.

Com o aprofundamento dos estudos focados nos mecanismos de diferentes tipos de dor, ampliaram-se os conceitos, e porventura, o vocabulário específico envolvendo termos ligados a estes fenômenos. Por exemplo, o termo "nocicepção" se refere ao processo neural de codificação e processamento de estímulos nocivos (Dubin, Patapoutian, 2010) e, portanto, passou a ser utilizado para referir-se ao processo doloroso em animais, os quais por natureza não são capazes de verbalizar o que sentem.

Em termos fisiológicos, a informação nociceptiva se propaga do local da lesão até centros específicos ou difusos do sistema nervoso central (SNC). Os neurônios responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva possuem, na periferia, terminações não mielinizadas (nociceptores) responsáveis pela detecção dos estímulos nocivos. As fibras nervosas nociceptivas estão envolvidas na transdução do estímulo nocivo periférico, na condução do potencial de ação para a medula espinal e na transmissão da informação nociceptiva para os neurônios centrais. Mecanismos distintos de transdução além de uma

variedade de receptores, canais iônicos e transmissores sensoriais medeiam estes processos (Grigg et al., 1986; Woolf, Costigan, 1999).

Durante o processo inflamatório, 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, Urban, 2001). A sensibilização dos nociceptores pela ação de mediadores químicos liberados durante o processo inflamatório, bem como o aumento da excitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula espinal (sensibilização central), contribuem para estes estágios hipernociceptivos (Millan, 1999; Urban, Gebhart, 1999).

A dor transitória é usualmente observada quando neurônios sensoriais são ativados por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. As fibras nervosas responsáveis pela nocicepção são caracterizadas como fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, denominadas fibras C e Aδ. As fibras C são fibras não mielinizadas, também chamadas fibras do grupo IV, com baixa velocidade de condução (< 2,5 m/s) e respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química. As fibras Aδ são fibras mielinizadas, também chamadas fibras do grupo III, com velocidade de condução de 2,5-30 m/s e respondem a estímulos térmicos e mecânicos (Julius, Basbaum, 2001). Estas fibras podem ser classificadas de acordo com sua resposta a estímulos nociceptivos e não-nociceptivos (Coggeshall et al., 1983).

A propagação da dor é iniciada pela geração de potenciais de ação nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, classificadas como fibras C e Aδ, descritas anteriormente. Os neurônios aferentes primários, uma vez ativados, fazem conexões, diretas ou indiretas, com neurônios intrínsecos na coluna dorsal 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 supraespinais (Kandell, Schwartz, 1991). Os neurônios de projeção levam a informação nociceptiva, por diferentes vias ascendentes, para estruturas do tronco encefálico e diencéfalo (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, Schwartz, 1991) (Figura 1).

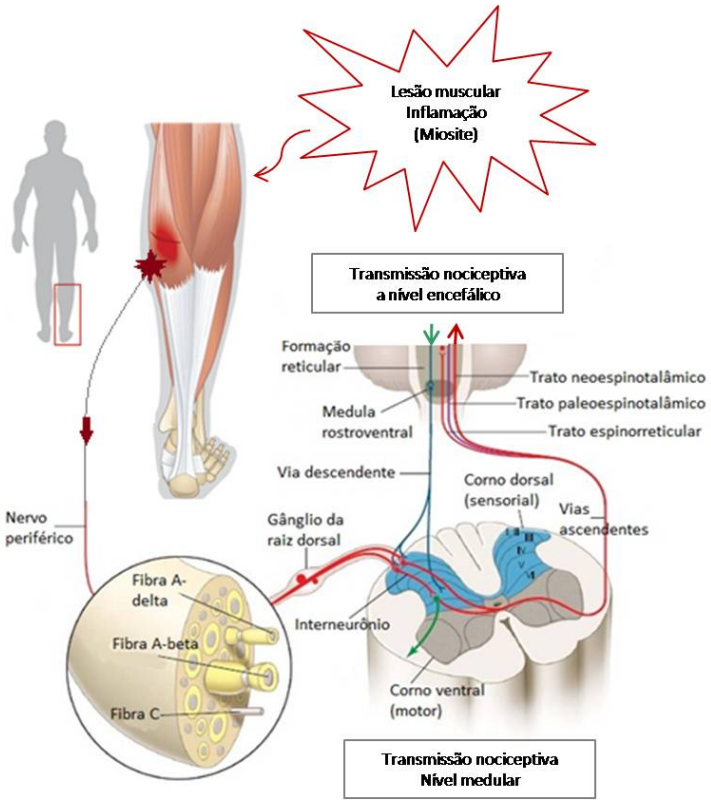


Figura 1 - *Modelo de transmissão nociceptiva*. A estimulação das fibras do tipo C, por lesão muscular produz dor espontânea e/ou dor provocada por toques leves no local da lesão (hiperalgesia primária). Quando ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, os nociceptores conduzem impulsos aferentes na direção da medula espinal, através de diferentes fibras (A-δdelta, A-beta ou C). A coluna posterior (ou corno dorsal) da medula espinal constitui o 1º centro de retransmissão sensorial junto ao SNC. A partir daí as vias nociceptivas levam a informação para níveis superiores (encefálicos) onde ocorre a percepção consciente da dor. Fonte: adaptado do *website* medicina.com

1.2 DOR MUSCULAR

A dor muscular crônica afeta entre 11 e 24% da população mundial e a maioria das pessoas provavelmente já experenciou ou ainda vai experenciar algum tipo de dor muscular em certo momento da vida (Cimmino et al., 2011). Os indivíduos mais idosos, sedentários, desempregados, menos instruídos e com ansiedade são mais propensos a sofrer de dor muscular crônica (Ahacic, Kåreholt 2010; Azevedo et al., 2012). Aqueles que sofrem de dor muscular crônica muitas vezes relatam diminuição da produtividade e uma parcela significativa teve que mudar de emprego ou deixar de trabalhar inteiramente como resultado de sua dor (Miranda et al., 2010).

É sabido que a dor músculo esquelética está envolvida na modulação das fibras aferentes do grupo III e IV após inflamação muscular (Graven-Nielsen, Mense, 2001). Em uma situação de lesão muscular, não apenas as fibras musculares são atingidas, mas também os seus tecidos

adjacentes. A fáscia é um tecido conjuntivo denso que envolve os músculos, cada feixe de músculos e fibras. Esse tecido conectivo está ligado aos músculos e se estende para tendões e periósteo. A fáscia é composta de células - incluindo fibroblastos, macrófagos e mastócitos – e matriz extracelular. A matriz extracelular é composta de substâncias base, colágeno e fibras de elastina. A inervação muscular está primeiramente localizada na fáscia: consistindo de 25% de receptores de estiramento de células musculares, e 75% de terminações nervosas livres na fáscia intramuscular, e nas paredes de vasos sanguíneos e tendões (Bonica, 1990). A inflamação está atribuída ao trauma que supera a habilidade do tecido de se auto-regenerar, resultando em uma reação de inflamação crônica.

A resposta à lesão no tecido conjuntivo, incluindo a fáscia, ligamentos e tendões, ocorre em três fases (Kumar, 1999):

1) Fase inflamatória: invasão de células polimorfonucleares e monócitos/macrófagos, e liberação de prostaglandinas e citocinas;

2) Fase proliferativa: fibroblastos ativados para a produção de colágeno e matriz extracelular que estão organizados de forma desorganizada;

3) Fase de remodelação: maturação progressiva e alinhamento das fibras de colágeno e remodelamento da matriz extracelular.

Portanto, se porventura uma dessas fases não for inteiramente finalizada o tecido permanecerá com danos. Isso pode acarretar no surgimento de um processo de inflamação crônica e, por conseqüência, de um quadro doloroso persistente. Isso vem acompanhado da formação de fibrose e em casos mais graves, da perda da função do membro atingido.

A estimulação química das fibras aferentes nociceptivas através da injeção de diferentes substâncias álgicas vem sendo estudada em modelos de dor muscular em animais. Substâncias como a Carragenina (Cg) e o Adjuvante Completo de Freund (CFA) tem sido amplamente utilizadas para causar inflamação em modelos experimentais. A Cg é um polissacarídeo complexo extraído de algas vermelhas e que, uma vez injetado perifericamente provoca a liberação local de mediadores inflamátorios como a bradicinina, prostaglandinas e espécies reativas do oxigênio. Ela possui um efeito agudo bifásico caracterizado pela liberação de diferentes agentes inflamatórios em cada uma das fases (Necas, Bartosikova, 2013). O CFA é uma solução de antígeno emulsionada em óleo mineral utilizada como imunopotenciador e é composto por micobactérias inativadas e secas. Rapidamente após a sua administração, o CFA é capaz de induzir um efeito inflamatório de longa duração por seu potencial em atrair células do sistema imune e provocar uma cascata de eventos ligados a este processo (Larson et al., 1986).

Experimentalmente demonstrou-se que tanto a Cg quanto o CFA são capazes de resultar em sensibilização por diminuição dos limiares nociceptivos (Ren, Dubner, 1999). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que o aumento da atividade da fibra aferente nociceptiva após inflamação crônica muscular está correlacionada com a dor espontânea, freqüentemente associada com miosite (Berberich et al., 1988).

O fenômeno de sensibilização de nociceptores tem sido observado na pele, articulação do joelho e músculo esquelético após uma estimulação térmica ou indução de inflamação (Mense, Meyer, 1988). É sabido que, durante estas circunstâncias, várias substâncias liberadas no tecido podem afetar a atividade de receptores e a sensibilidade dos nociceptores, entre elas: bradicinina, serotonina e PGE_2 (Perl et al., 1976). Histamina e serotonina aumentam a excitabilidade mecânica de fibras mielinizadas da pele, enquanto que PGE_2 aumenta o efeito da bradicinina no músculo em fibras não-mielinizadas.

Estudos anteriores realizados por nosso grupo com eletrofisiologia *in vivo* demonstraram que as células da glia participam da despolarização das fibras nociceptivas no modelo de miosite crônica induzida pela injeção de CFA (Chacur et al., 2009). Em continuidade a estes estudos, nossos resultados evidenciam um efeito antinociceptivo dos inibidores das células da glia e do o fator de necrose tumoral-α (TNFα) no efeito nociceptivo induzido pela injeção de Cg no músculo gastrocnêmio de ratos, mimetizando um modelo de miosite inflamatória (dados não publicados). Ainda, em um estudo mais recente realizado por nosso grupo de pesquisa observamos que injeções repetidas de NGF no músculo refletiam no aparecimento de novos campos receptivos em neurônios do corno dorsal da medula espinal, bem como na localização distal de novos campos receptivos profundos podendo, desta maneira, refletir em mecanismos espinais que estão subjacentes a propagação da dor (Hoheisel et al., 2013).

1.3 CÉLULAS DA GLIA E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Como mencionado anteriormente, para que a dor ocorra é necessário que haja a sensibilização de nociceptores através da participação de inúmeros mediadores que no processo da instalação do estado nociceptivo são liberados por diferentes tipos celulares, como células do sistema imune e os próprios componentes celulares do sistema nervoso, os neurônios e as céulas da glia. Diversos estudos têm mostrado que, na medula espinal, as células da glia, também chamadas de neuroglia ou gliócitos, estão envolvidas na dor induzida por inflamação periférica e dor neuropática (Watkins et al., 2003; Ledeboer et al., 2005). As

células da glia sintetizam várias substâncias, muitas das quais são também liberadas por neurônios que modulam a resposta nociceptiva, dentre as quais podemos citar as prostaglandinas, o glutamato, o ácido araquidônico, o NO e as citocinas (Hartung et al., 1988; Marriott et al., 1991; Stella et al., 1994; Agullo et al., 1995).

A importância das células da glia na medula espinal, em processos nociceptivos foi evidenciada por Garrison e colaboradores (1991), que mostrou o aumento da densidade destas células, mais especificamente de astrócitos, após a indução de ligaduras no nervo isquiático (Garrison et al., 1991). Dados posteriores demonstraram que os astrócitos e as células da microglia, além de participarem em processos inflamatórios, têm papel relevante para a manutenção de processos nociceptivos (Milligan et al., 2003; Watkins et al., 2003; Chacur et al., 2004). Assim, têm sido evidenciada a participação das células gliais na hiperalgesia induzida por processos inflamatórios periféricos. Na medula espinal, a lesão de nervos periféricos causa a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células da glia, tais como interleucina-1β (IL-1β) e TNFα, as quais medeiam os processos nociceptivos decorrentes desta lesão (Martin et al., 1992; Luber-Narod et al., 1994).

Alguns autores sugerem três importantes fenômenos que ocorrem no modelo de dor crônica: aumento da atividade de astrócitos; aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e alterações da arquitetura de neurônios (Gordh et al., 2006). Como mencionado anteriormente, 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, Mense, 2001).

Com relação aos mediadores envolvidos em patologias musculares, foi demonstrado que substâncias pró-inflamatórias, como o TNFα, têm sido associadas a essas patologias. Entretanto, o papel destas citocinas na dor musculoesquelética é ainda pouco explorado. Estudos demonstraram que o aumento de níveis de TNFα no músculo esquelético pode induzir a ativação de receptores para TNFα e/ou estimular a produção de outras citocinas pro-inflamatórias (Zhang et al., 2000; Alvarez et al., 2002). 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, pesquisadores demonstraram 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 durante a dor musculoesquelética (Loram et al., 2007).

Estudos realizados pelo grupo de Mense e colaboradores demonstraram que um modelo de inflamação muscular induz o aumento de substância P (SP) na medula espinal algumas horas após lesão e que a atividade de background neuronal persiste durante a miosite crônica (Hoheisel et al., 1998). Além disso, a miosite crônica induzida no músculo esquelético induz, além de alterações dos neurônios do corno dorsal, alterações morfológicas e funcionais de astrócitos (Tenschert et al., 2004). No entanto, estudos relacionando dor muscular e células da microglia são escassos e se fazem necessários.

1.4 FRACTALQUINA E DOR

Quimiocinas são uma família de proteínas altamente envolvidas na migração de leucócitos. A proteína CX_3CL1, também conhecida como fractalquina (FKN), não é uma exceção a esta regra. Como determinado por sua estrutura, ela é o único membro da família de quimiocinas CX_3C, e foi descrita pela primeira vez por Bazan e colaboradores como sendo um potente atraente de células T e monócitos (Bazan et al., 1997).

O padrão de expressão *in vivo* de FKN é bem menos definido do que o do seu receptor, CX_3CR1 (Kim et al., 2011). Atualmente é sabido que os neuroniôs são as células que mais expressam a FKN em comparacão com outras células do SNC (Nishiyori et al., 1998; Hughes et al., 2002; Tarozzo et al., 2003). Em contrapartida , foi demonstrada a abundância de seu receptor em células da microglia (Lindia et al., 2005; Clark et al., 2009).

Se examinarmos a FKN no contexto da dor, ela é uma substância pró-nociceptiva. A administração intratecal (i.t.) de FKN solúvel provoca alodinia mecânica e hipersensibilidade térmica (Milligan et al., 2004; Milligan et al., 2005; Clark et al., 2007; Sun et al., 2013). Similarmente, a ação da injeção de FKN na região da substância cinzenta periaquedutal (PAG) do cérebro, uma área de que desempenha um papel fundamental na via descendente de modulação da dor, também é pró-nociceptiva (Chen et al, 2007). A administração de um anticorpo anti-FKN atenua os comportamentos nociceptivos de animais com dor neuropática e artrite (Clark et al., 2007, Clark et al., 2012) e os compostos que são capazes de reduzir a expressão de FKN são analgésicos (Yang et al., 2012).

Estas e outras evidências demonstram uma ação pró-inflamatória e pró-patogênica de FKN e, portanto, nos sugere que compostos que bloqueiam tanto a síntese e a liberação de FKN como a sua sinalização via CX_3CR1 podem se mostrar vantajosos no tratamento diversas doenças inflamatórias;

1.5 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Esta proposta 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. No presente trabalho tais processos foram estudados em uma condição fisiopatológica de miosite induzida em animais. A investigação do processo nociceptivo em diferentes modelos experimentais (*e.g.* modelos de dor neuropática) vêm recebendo grande atenção dos pesquisadores, porém, modelos de dor musculoesqueléticas com foco em dores musculares têm sido pouco estudados.

Dando continuidade aos estudos previamente realizados em nosso laboratório relacionados com a participação glial em diferentes modelos de dor, sugerimos a análise destas células com o intuito de avaliar a contribuição glial para o modelo proposto. 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 citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Desta maneira, a nossa proposta consiste na hipótese de que a ativação das células microgliais e a liberação de seus sinalizadores podem constituir um fator substancial para o desencadeamento e a persistência de quadros de dor por inflamação muscular.

Desta forma, o conjunto de estudos proposto poderá fornecer dados para melhor elucidação dos mecanismos envolvidos na dor muscular, que além de altamente freqüente na população é de difícil tratamento devido à complexidade de sua cronificação. Esta abordagem também possibilitará uma melhor base para o aprimoramento de intervenções terapêuticas existentes ou desenvolvimento de novas terapias centradas em distúrbios musculares.

2 OBJETIVOS

Investigar a participação de células gliais (em particular das células da microglia) e citocinas inflamatórias envolvidas em modelo de sensibilização muscular e intraplantar em roedores. Para o desenvolvimento deste projeto o presente trabalho foi dividido em 2 etapas.

2.1 ETAPA 1: MODELO DE MIOSITE CRÔNICA EM RATOS

Esta etapa envolveu os seguintes aspectos:

- ✓ Indução de miosite crônica em ratos através da injeção i.m. de CFA e avaliação da sensibilidade nociceptiva dos animais;
- ✓ Avaliação do comportamento de locomoção dos animais com miosite crônica através da análise pelo índice funcional da atividade locomotora;
- ✓ Análise histológica do tecido e fáscia muscular de animais com miosite crônica;
- ✓ Análise do envolvimento das células gliais (astrócitos e microglia), e da quimiocina fractalquina na medula espinal de ratos.
- ✓ Avaliação do efeito do tratamento intratecal com minociclina em animais com miosite crônica.
- ✓ Avaliação da participação de citocinas inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-10, TNFα e FKN) no plasma sanguíneo de animais controle e com miosite crônica.

2.2 ETAPA 2: MODELO DE MIOSITE AGUDA E INFLAMAÇÃO PLANTAR EM CAMUNDONGOS

Esta etapa envolveu os seguintes aspectos:

- ✓ Indução de miosite aguda através da injeção i.m. de carragenina e avaliação da sensibilidade nociceptiva dos animais selvagens e mutantes para CX3CR1.
- ✓ Análise do edema muscular após a indução da inflamação muscular em animais selvagens e mutantes nos diferentes grupos experimentais.
- ✓ Análise do envolvimento de células da microglia na medula espinal de camundongos selvagens e mutantes para o receptor de fractalquina (CX_3CR1 *knockout* funcionais) em modelo de miosite aguda em diferentes grupos experimentais.
- ✓ Comparação do modelo de miosite aguda com modelo de inflamação plantar, induzidos por carragenina, utilizando as mesmas análises descritas nos itens acima.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para o desenvolvimento da etapa 1 desta proposta foram utilizados ratos machos *Wistar*, pesando entre 200 - 220 g (aproximadamente dois meses). Todos os animais foram adquiridos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Posteriormente, os animais foram encaminhados e mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada localizada no Biotério do Departamento de Anatomia (ICB III) da Universidade de São Paulo, com temperatura controlada (22 ^{o}C ± 1) e ciclo claro/escuro (12:12 h). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB, protocolo 114/2012 na folha 55/ livro 02. Para a realização dos experimentos comportamentais para hiperalgesia mecânica, térmica e alodinia foi utilizada a sala de comportamento do Biotério do Departamento de Anatomia, a qual possui temperatura controlada (22 ^{o}C ± 1). Todos os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

Para o desenvolvimento da etapa 2 desta proposta foram utilizados camundongos adulto machos e fêmeas C57Bl/6 selvagens (WT) e portadores da mutação no lócus CX_3CR1 (heterozigotos *1/*2 e homozigotos *2/*2, *background* C57/Bl6), pesando entre 22-27 g (10-14 semanas de vida). Os experimentos foram realizados na Universidade King's College London e os animais foram obtidos do biotério local (Wolfson CARD *Animal House*, King's College London, UK). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética, de acordo com seus regulamentos - *Home Office Approved Project Licence* (PPL 70/7629). Os experimentos realizados seguiram as diretrizes do ASPA (*The Animals Scientific Procedures Act*), 1986, Reino Unido. Os animais foram alojados em grupos de até 4 individuos e mantidos sob um ciclo claro/escuro (12:12 h) em sala com temperatura controlada (21-22 ^{o}C) e expostos à água e ração *ad libitum*.Os experimentos comportamentais foram realizados em salas especificas do bioterio mencionado com as mesmas especificações estruturais em termos de temperatura e iluminação.

3.1.1 GERAÇÃO E CRUZAMENTO DE CAMUNDONGOS CX_3CR1-GFP

Os camundongos CX_3CR1-GFP originais foram criados pela manipulação do locus CX_3CR1 por substituição dirigida do gene com cDNA que codifica o EGFP. No locus mutante o gene *egfp* substituiu os primeiros 390 pb do segundo exon *cx3cr1* que codifica o N-terminal. Fragmentos genômicos flanqueando o gene *cx3cr1* foram utilizados para construir um vetor de direcionamento. Após a recombinação e o isolamento de clones de células que possuíam a esperada substituição de *cx3cr1* por *egfp*, o gene neo-flanqueado no local loxP foi excisado e os clones de células alvo foram injetados em blastocistos para gerar camundongos quiméricos. A transmissão da linha germinal do alelo mutante produziu mutantes heterozigóticos, $CX_3CR1^{+/gfp}$. Estes animais foram cruzados para produzir camundongos $CX_3CR1^{gfp/gfp}$, que foram subsequentemente, em biotério local, cruzados com camundongos C57Bl/6 do tipo selvagem para gerar animais experimentais heterozigotos que possuíam tanto CX_3CR1-GFP quanto a proteína funcional CX_3CR1 (Jung et al., 2000). As ninhadas foram desmamadas aos 21 dias e o grupo de animais alojados (até 4 por gaiola) em caixas separadas por sexo. Tanto animais machos como fêmeas foram utilizados para estudos comportamentais a partir de dez semanas de idade.

3.1.2 GERAÇÃO E CRUZAMENTO DE CAMUNDONGOS $CX_3CR1^{-/-}$

Os camundongos originais CX_3CR1 *knock-out* (Taconic, EUA) foram criados pela inserção de uma fita de neomicina resistentes ao gene selvagem do tipo *cx3cr1,* causando uma interrupção da transcrição do gene. Dois recombinantes homólogos foram identificados por Southern blot e microinjectados em blastocistos de C57Bl/6. Camundongos quiméricos foram acasalados com animais C57Bl/6 do tipo selvagem para produzir camundongos heterozigotos, que foram então retrocruzados três vezes sobre o *background* C57Bl/6 (Combadiere et al., 2003). Estes animais transgênicos foram retrocruzados mais dez vezes com C57Bl/6 (Harlan, UK) para se obterem pares heterozigotos de reprodução. Estes pares reprodutores foram utilizados para obtenção de ninhadas para uso experimental, sendo eles: heterozigotos (+/-) ; nocaute homozigotos (-/-); homozigotos do tipo selvagem (+/+) , numa proporção de respectivamente 2:1:1. As ninhadas foram desmamadas aos 21 dias e o grupo alojado (até 4 por gaiola) em gaiolas separadas por sexo. Os animais foram utilizados para estudos comportamentais a partir de dez semanas. Utilizaram-se animais machos e fêmeas, sendo os companheiros de linhagem de tipo selvagem utilizados como controle.

3.2 INDUÇÃO DA NOCICEPÇÃO POR INFLAMAÇÃO PERIFÉRICA

A indução da sensibilização por inflamação muscular (miosite), ou plantar, foi realizada através da injeção de dois diferentes compostos, como descritos nas seguintes etapas abaixo e detalhados na tabela a seguir (Tabela 1).

3.2.1 ETAPA 1: INDUÇÃO DE MIOSITE CRÔNICA

A miosite crônica foi induzida no músculo gastrocnêmio do membro posterior direito de ratos, pela injeção de CFA (Complete Freund's Adjuvant)(BD™ Difco™, EUA), na dose de 150 µg/300 µL. Os animais foram anestesiados com anestésico inalatório isoflurano (Isoforine®, Cristália, Brasil) e posicionados em decúbito ventral, possibilitando o acesso ao músculo mencionado; cada animal recebeu duas injeções de 150 µL, uma na porção medial e outra na porção lateral do ventre do músculo gastrocnêmio. Animais com o músculo intacto e animais com injeção do veículo (150 µL de salina + 150 µL de óleo mineral) foram utilizados como controle (Chacur et al., 2009).

A injeção de CFA no músculo foi realizada um único dia, e todos os ensaios experimentais foram realizados no 6º e no 12º dia, dia este onde a miosite crônica está instalada; para os grupo tratado também foram realizados ensaios no 13º e 14º dia. O mesmo procedimento foi seguido para a injeção de veículo nos animais controle.

3.2.2 ETAPA 2: INDUÇÃO DE MIOSITE AGUDA E INFLAMAÇÃO PLANTAR

A miosite aguda foi induzida no músculo gastrocnêmio do membro posterior direito de camundongos, através da injeção de carragenina, um composto extraído de algas marinhas. Os animais foram contidos em um tubo Falcon de 50 mL que possuía um corte em sua base, permitindo a entrada do ar para possibilitar a respiração do animal. O membro posterior direito foi levemente esticado para trás possibilitando a injeção na porção medial do músculo. A dose utilizada foi de 3% de λ- Carragenina (Cg) (#22049 Sigma-Aldrich/MERK, EUA) diluído em veículo (salina estéril – NaCl 0,9%) e injetada em um volume único de 20 µL por músculo (Walder et al., 2010; Da Silva et al., 2015).

Além do modelo de injeção intramuscular de carragenina utilizado com a finalidade de de causar uma inflamação muscular, utilizamos, para meios de comparação, um grupo de animais induzidos com inflamação periférica da região plantar, uma vez que este modelo encontra-se bem estabelecido na literatura. Para tal, os animais foram contidos da mesma maneira descrita acima, dessa vez possibilitando o acesso à região plantar. Injeções

intraplantares de carragenina foram realizada na pata direita dos animas, na dose única de 3% e no volume de 50 µL por pata (Loram et al., 2007; Scheiber et al., 2008).

A injeção de Cg no músculo ou na pata foi realizada um único dia e todos os ensaios experimentais foram realizados 3, 24 e 48 horas após a indução da inflamação periférica, uma vez que o efeito álgico da carragenina se dá entre 3 e 72 horas (Posadas et al., 2004; Fehrenbacher et al., 2012). O mesmo procedimento foi seguido para a injeção de veículo nos animais controle.

Tabela 1 – Indução dos modelos de miosite e inflamação plantar

Modelo	Animais utilizados	Agente inflamatório	Local da injeção	Dose/Volume
Miosite crônica	Rato	Adjuvante Completo de Freund (CFA)	M. Gastrocnêmio	150 µg/300 µL
Miosite aguda	Camundongo	Carragenina (Cg)	M. Gastrocnêmio	3%/20 µL 3%/100 µL
Inflamação plantar	Camundongo	Carragenina (Cg)	Região plantar da pata	3%/50 µL

Cabe mencionar que após a indução da inflamação tanto aguda quanto crônica, os animais foram observados diariamente e não tiveram alteração em seus comportamentos de ingestão de comida ou água.

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 ETAPA 1: ESTUDO DO MODELO DE MIOSITE CRÔNICA

Para a realização desta etapa do trabalho foram utilizados 60 animais (ratos *Wistar* machos). Os animais foram alocados conforme divisão dos quatro grupos abaixo:

- Naive – Animais intactos, sem intervenção (grupo controle 1)

- Óleo mineral – Animais com injeção i.m. de óleo mineral + salina na proporção 1:1, volume final de 300 µL (grupo controle 2);
- CFA – Animais que receberam uma injeção única via i.m., na dose de 150 µg/300 µl (grupo experimental);
- CFA+Mino – Animais que receberam uma injeção única de CFA via i.m. e uma injeção de minociclina via i.t. (grupo tratado).

3.3.2 ETAPA 2: ESTUDO DO MODELO DE MIOSITE E INFLAMAÇÃO PLANTAR AGUDA

Utilizamos um total de 72 animais (camundongos machos e fêmeas) para a realização dos testes de comportamento e posterior análise dos tecidos. Os animais foram alocados conforme divisão dos grupos abaixo:

- Grupo Salina i.m. – Animais com injeção muscular de salina estéril (grupo controle 1);
- Grupo Cg i.m. – Animais com injeção muscular de 3% de carragenina (grupo experimental 1);
- Grupo Salina i.pl. - Animais com injeção plantar de salina estéril (grupo controle 2);
- Grupo Cg. i.pl. – Animais com injeção plantar de carragenina 3% (grupo experimental 2).

Tais grupos apresentam ainda a seguinte subdivisão, de acordo com seus genótipos:

- ❖ WT (do inglês *wild-type*), representando os animais selvagens (C57Bl/6);
- ❖ HETs (do inglês *heterozygous*), representando os animais heterozigotos ($CX_3CR1^{+/gfp}$);
- ❖ KO (do inglês *knock-out*), representando os animais homozigotos e carregando a deleção ($CX_3CR1^{-/-}$).

Cabe ressaltar que estes animais foram divididos igualmente entre machos (n = 36) e fêmeas (n = 36).

3.4 DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos às injeções dos diferentes agentes álgicos a fim de causar uma inflamação aguda ou crônica. No desenvolvimento da etapa 1, crônica, de nosso modelo, os animais foram previamente adaptados aos testes comportamentais (por um período de dois dias) e suas medidas iniciais foram aferidas (MI). Em seguida, estes mesmos receberam a injeção de CFA ou veiculo via intramuscular. No 6º dia após a injeção foi aferida a medida parcial dos grupos (MP) e posteriormente, no 12º dia, a medida final (MF). Os animais que receberam tratamento farmacológico com minociclina receberam a injeção intratecal do fármaco no 13º dia após a indução da miosite crônica e seus limiares nociceptivos foram aferidos, após o tratamento, na 1º e 24º hora subseqüentes. Neste momento todos os animais foram eutanasiados para coleta de tecidos para análise (Figura 2, etapa 1).

Para a realização da etapa dois, aguda, de nosso modelo os animais foram previamente adaptados aos testes comportamentais (por um período de dois dias) e então os grupos receberam injeções de Cg ou salina, via intramuscular (para indução de miosite) ou via intraplantar (para indução de inflamação periférica). A aferição da sensibilidade nociceptiva e a mensuração do edema provocado pela injeção dos animais se deu 3, 24 e 48 horas após as injeções e os grupos experimentais foram eutanasiados imediatamente após o testes comportamentais na 24ª hora ou na 48ª hora, a fim de comparar as alterações moleculares entre os diferentes tempos (Figura 2, etapa 2).

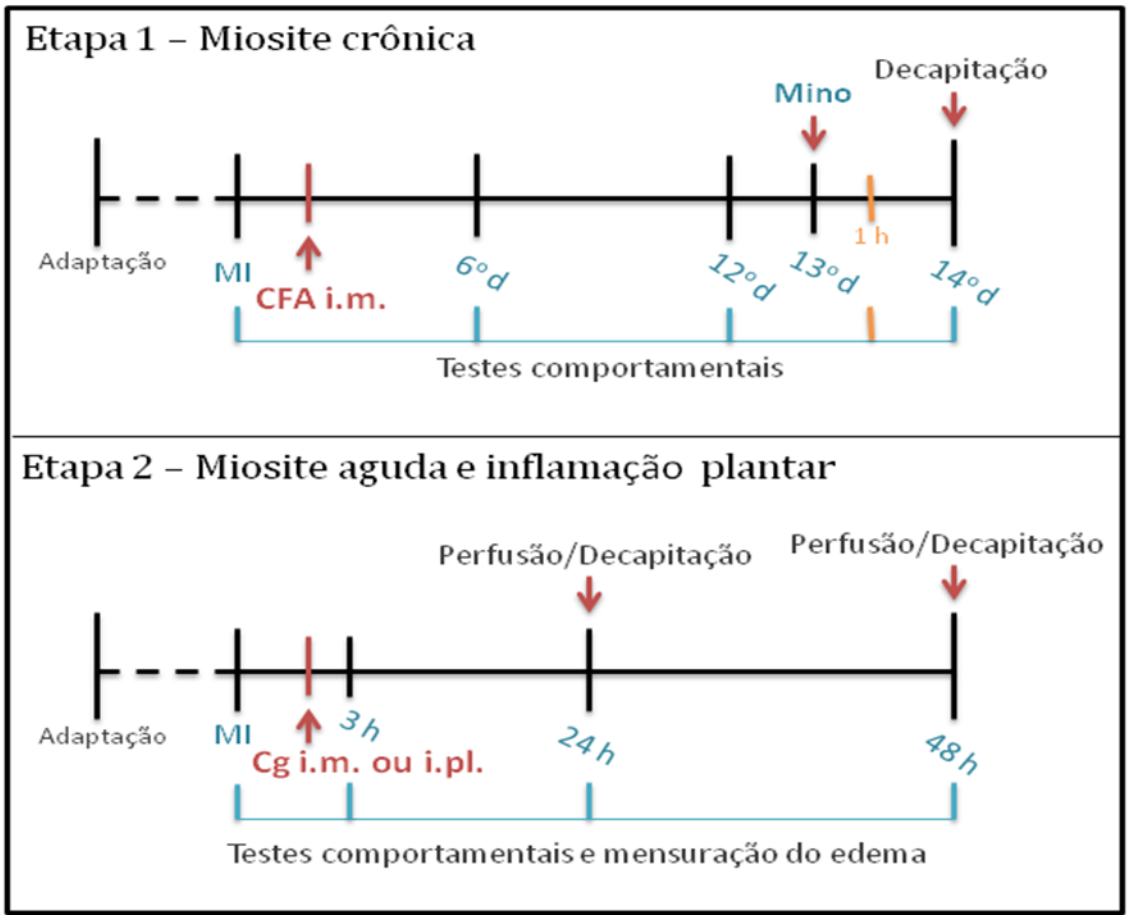


Figura 2 – *Linha do tempo de acordo com as diferentes etapas experimentais*. O esquema mostra as injeções de CFA ou Cg nas etapas 1 e 2 experimentais, respectivamente .

Além disso, para os experimentos da Etapa 2 de Miosite aguda e inflamação plantar foram realizadas mensurações dorso-ventrais do músculo e da pata dos animais com a utilização de um paquímetro e com o intuito de avaliar se os diferentes genótipos apresentariam uma alteração no edema plantar ou muscular causado pela injeção de Cg.

3.5 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE NOCICEPTIVA

Todos os animais foram submetidos a um ou mais testes comportamentais descritos a seguir. Para todos os testes os animais foram adaptados nos aparelhos dois dias antes do início dos experimentos. Cabe ressaltar que foram realizados estudos “cego” (*blinded*) nas análises comportamentais e posterior análise do tecido.

3.5.1 DETERMINAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA

Para a avaliação da hiperalgesia mecânica dos animais, foi utilizado o teste de Von Frey eletrônico (Anesthesiometer, IITC Inc. Life Science Instruments, EUA), (Figura 3), segundo o método descrito por Guerrero e colaboradores (2006) (Guerrero et al., 2006), modificado. Neste teste dois pesquisadores participam: um deles faz a contenção do animal com as duas mãos, cobrindo-o com uma flanela e segundo realiza a contenção do membro inferior e a aplicação da ponteira no músculo (Figura 3). Esta foi então aplicada e pressionada contra a região da pele intacta do músculo gastrocnêmio dos animais. O visor eletrônico do aparelho mostra digitalmente o aumento da força gradual aplicada pela mão do pesquisador. Neste modelo, o limiar de dor é representado pela força em gramas necessária para a retirada do membro do animal. Os resultados foram avaliados através da comparação das médias das medidas iniciais e finais e através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Figura 3 - *Von Frey Eletrônico.* Aparelho utilizado para acessar a hiperalgesia mecânica dos animais.

3.5.2 DETERMINAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA

A avaliação da hiperalgesia térmica dos animais foi realizada com o teste plantar térmico, descrito por Hargreaves e colaboradores (Hargreaves et al., 1988). Este teste utiliza como estímulo o calor induzido por energia radiante do aparato do teste plantar (Ugo Basile, EUA). Os animais foram colocados em caixas de acrílico dispostas sob uma base de vidro. O aparelho que emite a luz é posicionado abaixo da superfície plantar do animal e então se ativa o aparelho, que inicia a incidência de luz e a cronometragem. A sensibilidade ao estímulo térmico foi definida como a latência em segundos da permanência da pata do animal por duas

vezes, com intervalos de cinco minutos. Esse feixe foi ajustado a 75% da intensidade máxima de aquecimento com *cutoff* de 20 segundos (para ratos) ou 15 s (para camundongos) e o resultado foi representado pela média das duas medidas. Cabe mencionar que este experimento foi realizado tanto com ratos (etapa 1 experimental), quanto com camundongos (etapa 2). A diferença dos testes se dá apenas no tamanho das caixas em que os animais são contidos.

.

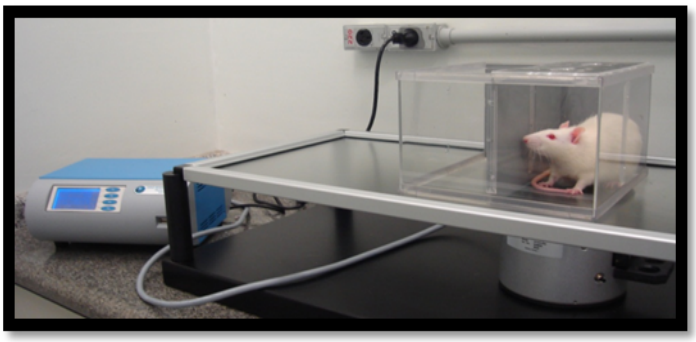


Figura 4 - *Teste de Hargreaves*. Ilustração do teste plantar térmico utilizado para acessar os limiares de hiperalgesia térmica em ratos.

3.5.3 DETERMINAÇÃO DA ALODINIA MECÂNICA/TÁTIL

A avaliação do teste da alodinia tátil nos animais foi realizada utilizando os filamentos de Von Frey (Stoelting Co., EUA) (Figura 5) e o método descrito por Chaplan e colaboradores (Chaplan et al., 1994). Neste testes os animais são posicionados em caixas de acrílico sob uma grade suspensa, para acesso a região plantar de suas patas. Os filamentos aplicados são de nylon e possuem diferentes diâmetros responsáveis por empregar diferentes intensidades de força. Tal teste consiste em um conjunto de filamentos que foram aplicados sobre a região plantar da pata posterior de cada animal.

Para os testes com ratos (etapa 1 dos experimentos, os filamentos utilizados foram: 0.4 g, 0.6 g, 1.4 g, 3.6 g, 8.5 g, 15.1 g e 28.8 g, e o limiar de retirada da pata foi determinado pelo aumento ou diminuição seqüencial da força. Para os testes em camundongos os filamentos utilizados foram: 0.07 g, 0.16 g, 0.4 g, 0.6 g e 1 g. O teste foi iniciado sempre com o filamento 3.6 g para ratos e 0.4 para camundongos e a contagem da de respostas foi iniciada quando a primeira resposta foi negativa e a segunda positiva. A partir desta resposta negativa/positiva foram registradas mais quatro respostas, respeitando-se sempre o princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo (filamento) inferior, enquanto que uma resposta negativa é sempre seguida por um estímulo (filamento) superior. Uma resposta é

considerada positiva quando o animal retira a pata ao estímulo mecânico e negativa quando o animal não possuiu reação alguma. O limiar de retirada da pata do animal foi analisado observando os padrões de respostas, onde estes padrões foram inseridos no cálculo a seguir:

$$50\%\ g = 10\ [\ Xf + K.\gamma]$$

Onde: Xf é o valor do último filamento em gramas que é convertido em log de base 10; K é o valor da sequência de seis respostas as quais os dados foram retirados da tabela (Chaplan et al., 1994) e δ: é a média da diferença (em log) entre os filamentos apresentados.

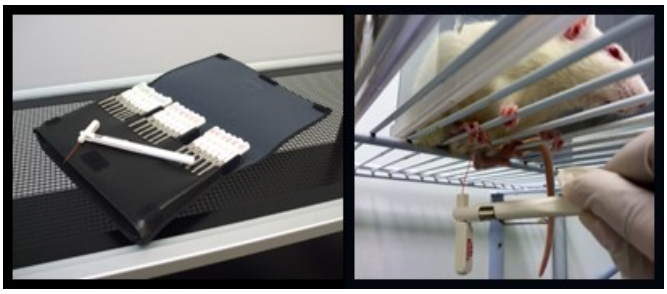


Figura 5 - *Teste de Alodinia – filamentos de Von Frey*. Ilustração do teste de sensibilidade tátil utilizado para acessar os limiares de alodinia em ratos.

3.6 ÍNDICE FUNCIONAL DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para avaliar a atividade de locomoção dos animais submetidos à miosite crônica, foi utilizado o índice funcional da atividade locomotora no qual se avalia o *print* das pegadas dos animais Este teste foi primeiramente aplicado para determinar o índice de disfunção locomotora causada pela lesão do nervo isquiático (De Medinaceli et al., 1982, 1984). As impressões das pegadas dos animais foram obtidas pelo método proposto por De Medinaceli e colaboradores, que utiliza tiras de papel impregnado com azul de bromofenol. O aparato constitui de uma passarela (44 cm X 8,7 cm) construída em madeira, com as laterais fechadas e dotada de um compartimento fechado ao final, onde o animal procura se abrigar e encontrar alguns *pellets* de ração após percorrer seu comprimento(Lowdon et al., 1988).

Os animais foram adaptados a caminhar na passarela previamente as medidas iniciais, e foram considerados aptos quando atravessavam a passarela, da abertura inicial até o compartimento fechado, sem hesitar. Depois de adaptados, foram realizadas as medidas iniciais, onde os animais tiveram suas patas traseiras umedecidas com água para reação com as folhas tingidas com azul de bromofenol. Desta maneira foram obtidas as impressões das

pegadas e, através do uso de um paquímetro eletrônico (Mitutoyo Sul Americana LTDA, Brasil), os seguintes parâmetros foram mensurados: (1) comprimento da pegada (PL, do inglês, print length); (2) espalhamento total dos dígitos, do 1º ao 5º (TS, do inglês, total spread of toes); e (3) espalhamento dos dígitos intermediários, do 2º ao 4º (IT, do inglês, intermediate toes) (Figura 6).

Os dados obtidos foram analisados por meio da equação desenvolvida por De Medinaceli e colaboradores e adaptada por Hare e colaboradores (Hare et al., 1992) como se segue: IFC= -38,3 x [(EPL-NPL)/NPL] + 109,5 x [(ETS-NTS)/NTS] + 13,3 x [(EIT-NIT)/NIT] - 8,8. Onde: N= Normal; E= Experimental; PL= Comprimento da pata; TS= Espalhamento total dos dígitos; IT= Espalhamento dos dígitos intermediários (Figura 5). Os resultados obtidos com esta equação são expressos num percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) (desvio padrão de -11 a 11) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. Este teste foi aplicado antes de qualquer procedimento de indução de dor para obtenção da medida inicial (MI) e após 12 dias da cronificação da inflamação por injeção de CFA.

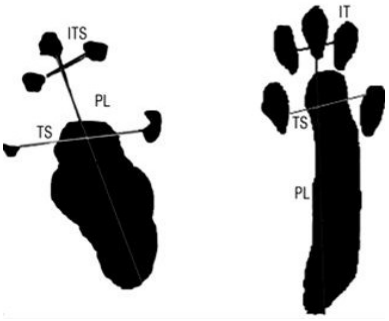


Figura 6 - *Teste do Índice Funcional da Atividade Locomotora*. Representação do *print* das patas dos animais utilizados para mensuração das distâncias entre os dígitos.

3.7 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO: ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL DA MINOCICLINA

Com o intuito de avaliar especificamente a participação das células da microglia, foi utilizado um bloqueador específico para estas células, a minociclina (SigmaAldrich, 100µg, volume de injeção de 50 µL) administrada no 13º dia após a cronificação da miosite. Os testes comportamentais foram realizados uma (1 h -13º dia) e vinte e quatro horas (24 h -14º dia) após o tratamento com o fármaco (Ledeboer et al., 2005).

Para estas a realização destas injeções, os animais foram anestesiados com inalação de Isoflurano (Isoforine ®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* (movimentação da cauda) característico da cauda foi observado, indicando a entrada da agulha no espaço subaracnóideo da medula Este método foi adaptado de acordo com o proposto por Milligan e colaboradores (Milligan et al., 2004) e Chacur e colaboradores (Chacur et al., 2004).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

Os dados foram representados como média ± e.p.m. A análise estatística foi gerada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7 (utilizando-se *GraphPad Software* Inc., CA, EUA). A comparação estatística entre os grupos e tempos foi realizada usando a análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni. O índice de significância foi considerado de $p \leq 0,05$.

3.9 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING

Para estes ensaios foram utilizados os mesmos animais submetidos aos testes comportamentais. Os animais foram eutanasiados por decapitação, sem anestesia prévia, com a utilização de uma guilhotina (Scienlabor, Brasil) e foi realizada uma laminectomia para exposição da medula espinal. O conteúdo protéico do material isolado, intumescência lombossacral (L4-L6) da medula espinal foi dosado pelo método de Bradford (Amresco, EUA)(Bradford, 1976). Após a quantificação de proteína total, os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Laemmli, contendo 54 mg/ml de DTT (Laemmli, 1970), as amostras foram posteriormente fervidas em banho-maria por 5 min e o material foi aplicado em gel de poliacrilamida a 12% e submetido a eletroforese com corrente contínua de 120 V e corrente constante de 2500 mA.

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 e colaboradores(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 astrócitos (GFAP), microglia (Anti-CD11b/c [OX-42]) - e fractalquina (Anti-CX3CL-1) em solução bloqueadora (1% de BSA) por 16 horas a 4 ^{o}C (Tabela 2). Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário marcado com peroxidase de raiz forte (*goat anti mouse* HRP para GFAP e OX-42 e *goat anti rabbit* HRP para FKN – [Chemicon, EUA]) diluidos a (1:5000 Amershan Biosciences, NJ/EUA). O excesso de conjugado foi removido com mais de um ciclo de lavagens. As membranas foram reveladas em aparelho UVITEC utilizando o Kit ECL de quimioluminescência (Amershan Biosciences, NJ/EUA) e foram analisadas quanto à densidade das bandas marcadas, utilizando o programa *Image J* (NIH, MD/EUA). A análise dos dados foi feita pela média das diferenças percentuais entre os diferentes grupos experimentais. A correção foi realizada pela densidade óptica para a β-actina (1:10000 Sigma, St. Louis, MO/EUA), considerando as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados.

Tabela 2 - Lista dos anticorpos primários utilizados para análise de expressão protéica por *Western Blotting*

Proteínas Analisadas	Origem	Peso Molecular	Concentração
CX3CL1	ABCAM (ab25088)	Previsto - 42kDa Observado -90kDa	1:1000
GFAP	Sigma Aldrich (G3893)	50 kDa	1:1000
OX-42	BD Science (554859)	160, 103 e 95 kDa*	1:1000

*Bandas encontradas e quantificadas para esse anticorpo: 95 kDa

3.10 Análise estatística dos Ensaios de Western Blot

Os dados foram representados como média ± e.p.m. A análise estatística foi gerada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7 (utilizando-se *GraphPad Software* Inc., CA, EUA) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de

uma via (*One-way* ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni. O índice de significância foi considerado de $p \leq 0,05$.

3.11 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FLUORESCÊNCIA

A fim de avaliar a ativação das células microgliais nos camundongos submetidos à indução de inflamação, ensaios de imuno-histoquímica de fluorescência foram realizados para detectar a expressão de p38 MAPK quando fosforilada. Além disso, foi realizada uma dupla marcação para células da microglia nos animais selvagens, por não possuírem a proteína verde fluorescente inserida em seus genótipos.

Após a realização dos ensaios comportamentais, os camundongos foram anestesiados com quetamina (87.5 mg / kg, i.p.) e xilazina (12,5 mg / kg, i.p.). Posteriormente, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina seguido de solução fixadora de paraformaldeído (PFA) a 4% em tampão fosfato, 1 M (PB) com pH 7,4 e contendo ácido pícrico a 1,5% .

As porções lombares da medula espinal dos animais (L3-L6) foram removidas e fixadas por imersão em solução fixadora de PFA 4% contendo ácido pícrico a 1,5% durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, os tecidos foram crioprotegidos numa solução de sacarose a 20% em PB a 4 °C durante pelo menos 48 horas. Em seguida as medulas foram embebidas em meio gelatinoso para emblocamento(OCT, BDH, Leicestershire, Reino Unido), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Por fim, secções transversais foram realizadas (20 μm de espessura) usando um criostato e de congelamento e foram montadas em lâminas de microscopia Superfrost Plus (BDH). No passo seguinte, as lâminas contendo os cortes transversais da medula espinal foram bloqueadas com albumina de soro bovino (BSA) a 1% (BSA, Sigma-Aldrich) e azida de sódio a 0,2% (Sigma-Aldrich) em Triton X-100 a 0,1%. A fim de co-localizar as marcações para as células da microglia e a proteína nuclear fosforilada p38, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário específico para fosfo-p38 (MAPK) (Cell Signaling) *overnight* e, em seguida com o anticorpo biotinilado secundário apropriado (Dk-α-Rb, Jackson Laboratories) por 90 minutos. Os passos seguintes se deram com dois estágios de amplificação do sinal: o primeiro com o complexo Avidina-Biotina por 30 minutos (Vector Laboratories Inc.) e o segundo com biotinil-tiramida (PerkinElmer) , por 10 minutos; finalmente as marcações puderam ser visualizadas com a adicão de ExtrAvidina-TRICT, incubada por 2 horas. Para os tecidos dos animais selvagens (que não continham a fluorêscencia endógena) foi dada continuidade no

procedimento e os cortes foram então incubados por 16 horas com o segundo anticorpo primário, Iba-1, a fim de detectar as células da microglia (Iba-1, Wako), seguido da incubação com anticorpo secundário específico (Gt-α-Rb, Thermo Scientific). Todas as lâminas foram cobertas com o meio de montagem Vectashield contendo marcador nuclear 4', 6-diamidino-2-fenilindole 2HCl (DAPI Vector Laboratories, Reino Unido) e a coloração fluorescente foi visualizada utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM710 (Zeiss, Cambridge, Reino Unido). As concentrações dos anticorpos e compostos amplificadores da reação estão descritos na tabela abaixo (Tabela 3).

Tabela 3 - Lista dos anticorpos e amplificadores de sinal utilizados para análise da ativação microglial por Imuno-histoquímica

Anticorpos	Origem	Concentração
Donkey anti-rabbit biotin	Jackson Lab. (711-066-152)	1:400
Extra-Avidin TRICT	Sigma(E3011)	1:500
Gt-α-Rb Alexa Fluor 488	Thermo Scientific (A11008)	1:1000
IBA-1	Wako (019-19741)	1:1000
Phospho-p38(MAPK)	Cell Signalling (9211)	1:100
Amplificadores	**Origem**	**Diluição**
Avidin-Biotin Complex	Vector Laboratories (PK6100)	1:1 (Sol. A:B) em 1:5 PBS
Biotinyl tyramide	Perkin Elmer (SAT700)	1:75 em diluente de amplificação

3.12 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS DA MICROGLIA

A coloração fluorescente dos cortes foi visualizada utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM710 (Zeiss, Cambridge, Reino Unido) com o qual as imagens foram capturadas e, posteriormente, quantificadas. Para tal, determinou-se o número de células positivas para cada marcador imuno-histoquímico (Pp38 e Iba-1). Quatro cortes do tecido foram selecionados por

lâmina de animal para cada segmento lombar analisado (L3, L4 e L5). Os três diferentes segmentos lombares foram identificados de acordo com a morfologia medular, baseda na caracterização do Allen Atlas e demonstrados na figura abaixo (Allen Spinal Cord Atlas, 2009) (Figura 7).

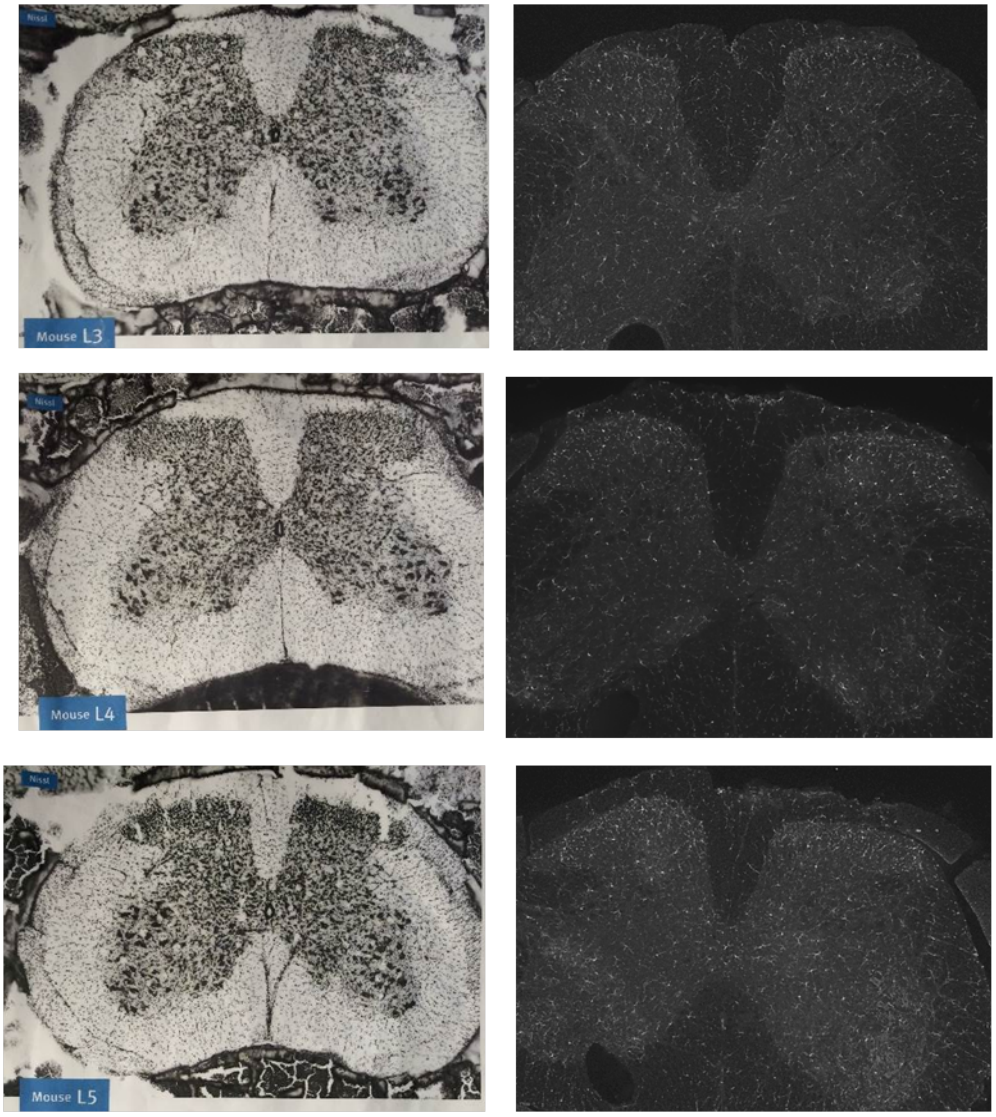


Figura 7 – *Segmentos lombares da medula espinal de camundongos.* A coluna da esquerda representa as imagens das porções medulares L3, L4 e L5 (de cima para baixo, respectivamente), como descritos no Atlas. À direita, a coluna representa as imagens capturadas em microscópio de fluorescência demonstrando os correspondentes segmentos (aumento de 10 x).

Para a quantificação, três quadrados (150 μm^2) foram espaçados igualmente e posicionados nas lâminas 1 e 2 da medula espinal, de acordo com a classificação de Rexed (Rexed, 1952) (Figura 8). O número de células positivo para os dois marcadores (Pp38 e Iba-1) foram contados e considerou-se o número de células ativas aquelas que apresentavam uma co-localização específica entre eles (Nieto et al, 2016). Para a quantificação das imagens o

programa utilizado foi Axiovision LE 4.8 software (Zeiss), e todas as análises foram realizadas em teste cego.

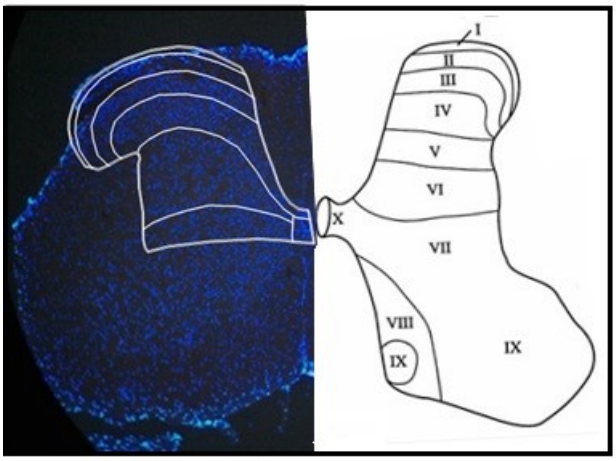


Figura 8 – *Representação esquemática das lâminas de Rexed na medula espinal.* As lâminas de Rexed representam uma divisão citoarquitetônica na substância cinzenta da medula espinal. As lâminas são divididas de I-X dentro do "H" medular.

Para análise estatística, os valores médio para cada grupo experimental foram calculados. Os dados foram representados como média ± e.p.m. A análise estatística foi gerada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7 (utilizando-se *GraphPad Software* Inc., CA, EUA) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Tukey. O índice de significância foi considerado de $p \leq 0,05$.

3.13 TÉCNICA HISTOLÓGICA – HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

Com o intuito de determinar possíveis alterações no músculo gastrocnêmio e fáscia dos animais, foram realizadas análises histológicas comparando com os animais injetados com CFA com os animais injetados com veículo e animais naive (controle); Cabe mencionar que foram utilizado os mesmos animais usados nos ensaios comportamentais.

Para tanto, os tecidos foram retirados a fresco e dissecados no sentido caudo-rostral, realizando a retirada de seus ventres lateral e medial. Os músculos foram imadiatamente imersos em solução de formol a 10% por no mínimo 48 horas. Após a fixação em formol, os fragmentos foram desidratados, clarificados, incluídos em parafina e cortados na espessura de 5 µm com micrótomo Spencer (American Optical) . Os cortes foram então, corados com a técnica de hematoxilina-eosina: lavagem em água deionizada (2 minutos), coloração de

hematoxilina (3 minutos), lavagem com água corrente (5 minutos), coloração com eosina (1 minuto e 30 segundos), desidratação com Álcool Absoluto I (2 minutos), desidratação com Álcool Absoluto II (2 minutos),fixação com Xilol I (2 minutos), fixação com Xilol 2 (2 minutos) e fixação com Xilol 3 (2 minutos). 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(Sokal, Rohlf, 1981).

3.14 ENSAIOS PARA DOSAGEM DE CITOCINAS

Após os ensaios comportamentais, os animais foram eutanasiados para a retirada dos tecidos e foi colhido o sangue de cada animal, de todos os grupos descritos anteriormente e analisados para cada citocina específica. O sangue armazenado após a decapitação foi colhido em um funil de vidro e armazenado em eppendorfs. Estes foram centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm e os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -20 ^{o}C. Para a dosagem de citocinas IL-1, IL-6 e IL-10, TNF-a e FKN foram utilizados reagentes específicos contidos no kit Milliplex®TM Map (Millipore Corporation, Darmstadt- Germany), conforme protocolo especificado pelo fabricante. Foram adicionados 200 µL de solução tampão por poço (placa de 96 poços) e a placa foi fechada e homogeneizada por dez minutos à temperatura ambiente. Foi retirado o sobrenadante e adicionado 25 µL da solução padrão/poço, previamente preparada, e, em seguida, adicionados os controles, as amostras e as beads. A incubação teve um total de tempo de 1 hora à temperatura ambiente (TA) e em seguida foi realizada a incubação overnight à temperatura de 4 ºC, sob agitação constante.

Após a incubação overnight a placa foi deixada por mais uma hora sob agitação constante à TA. Em seguida, o conteúdo foi despejado e a placa lavada com tampão Wash buffer, 200 µL em cada poço, por 3 vezes. Após a lavagem foram adicionados 25 µL dos anticorpos de detecção na placa que foi mantida sob agitação constante em TA. Posteriormente foram adicionados 25 µL do complexo estreptavidina-ficoeritrina por poço e a placa permanecerá em agitação por 30 minutos em TA. Após o tempo determinado de incubação a placa foi lavada novamente por 3 vezes com solução tampão Wash buffer. Após as lavagens foi adicionada uma solução de parada (Sheat Fluid), 125 µL por poço. Por fim, leva-se a placa para a leitura no aparelho Bioplex-200 System (Bio-Rad). A concentração mínima detectada (CMD) é calculada pelo aparelho em pg/mL e a dada curva padrão é comparadas com cada amostra para as diferentes citocinas.

Para a análise estatística dos dados de quantificação relacionados ao método de dosagem de citocinas foram realizadas análises pelo teste t (para comparação entre dois grupos) ou análises de variância de uma via (One-Way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey, para comparação entre três ou mais grupos, assumindo $p<0,05$.

3.15 GENOTIPAGEM

Cabe ressaltar que esta série de experimentos foi realizada pelos membros do laboratório "Plasticity of the first pain synapse", no Departamento Wolfson CARD, Universidade King's College London, Reino Unido.

3.15.1 CX_3CR1-GFP

A genotipagem dos camundongos utilizados na Etapa 2 deste projeto foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Realizou-se uma única reação de PCR para cada amostra de DNA. Para a amplificação, foram utilizados 2 mM de MgCl2 (Promega, UK), 20% (equivolume) de tampão de reação 5 x (Promega, RU), 300 µL de dNTP (Promega, RU), 50 unidades / ml de DNA Taq polimerase (Promega, UK), 2 µl de DNA (diluído a 1:10) e 1 µM de oligonucleotídios como *primer* (Sigma, RU), em um volume final de 25 µl. Foram utilizados *primers* sense de wild-types e GFP e *primers* antisense cujas sequências eram 5'CAACAGGGTTCCAAGCAAG 3', 5'GGACAGGAAGATGGTTCCAA 3' e 5'TGGTGCAGATGAACTTCAGG 3', respectivamente. A reação de PCR foi realizada em um termociclador TC412 Flexigene (Techne, UK) com o seguinte regime de temperaturas: desnaturação inicial de 94 ^{o}C durante 5 minutos, 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C durante 30 segundos, polimerização a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Os tamanhos esperados dos produtos finais foram 438 pb para o gene selvagem *cx3cr1* e 569 pb para o gene *cx3cr1-gfp*.

3.15.2 $CX_3CR1^{-/-}$

Foram realizadas reacoes individuais para amostras de DNA de animais WT e KO. Para a amplificação, uma reação master mix foi feita para cada alelo (WT e KO), consistindo de 1.5 mM de MgCl2 (Promega, UK), 20% (equivolume) de tampão de reação 5 x (Promega, UK), 0.2 mM de dNTP (Promega, UK), 50 unidades / mL de DNA Taq Polimerase (Promega

UK), 1.5 µL de DNA e 0.1 µM de WT e KO primers, em um volume final de 19.5 µL. Os *primers* sense e antisense WT e KO possuiam as sequencias 5' TGGGGTGACGCCACTAAGA 3', 5' GGCCTGTTATTTGGGCGACAT 3' e 5' GACCGCTTCCTCGTGCTTTA 3' respectivamente. A reação de PCR foi realizada em um termociclador TC412 Flexigene (Techne, UK) sob o regime de temperaturas: desnaturação inicial de 96 ^{o}C durante 3 minutos, 25 ciclos com desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, anelamento a 60 °C durante 30 segundos, polimerização a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C durante 10 minutos. Os tamanhos esperados dos produtos finais foram 440 pb para o gene selvagem *cx3cr1* e 600 pb para o gene *cx3cr1-gfp*.

3.15.3 ELETROFORESE EM GEL E VISUALIZAÇÃO DAS BANDAS

Para visualizar os produtos do PCR foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2% contendo 100 µg / ml de brometo de etídio (Sigma, UK), a 100 V , durante 25 minutos, utilizando um Pac Pac 200 (BioRad, UK). Um *ladder* de DNA de 1 kb (Promega, UK) também foi utilizado em cada gel para permitir que os tamanhos dos produtos fossem facilmente determinados. Os géis foram visualizados utilizando um sistema GeneGenius (Syngene, UK) e as imagens obtidas utilizando o programa GeneSnap (Syngene, UK). Todas as amostras de animais experimentais e reprodutores foram submetidas a análises repetidas para reduzir a probabilidade de resultados falsos positivos e falsos negativos.

4 RESULTADOS

4.1 ETAPA 1 – MIOSITE CRÔNICA

4.1.1 CARACTERIZAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CFA E TRATAMENTO INTRATECAL COM MINOCICLINA

Os animais foram submetidos à injeção, via intramuscular, de CFA a fim de induzir um quadro álgico caracterizado pela dor muscular crônica. Para a avaliação da hiperalgesia mecânica dos animais foi utilizado o teste do Von Frey Eletrônico, o qual acessa o limiar dos animais expresso em gramas, como descrito anteriormente (Item 3.5.1). Analisamos então o efeito do CFA intramuscular nos animais até o décimo quarto dia, após tratamento com minociclina (no 13º dia). Podemos observar que a administração de CFA foi capaz de diminuir o limiar nociceptivo dos animais a partir do 6º dia até a administração do fármaco, tanto comparando-se as medidas iniciais dos próprios grupos, quanto quando comparados aos grupos controle (naive e óleo mineral). Ainda, demonstramos o efeito do tratamento com o inibidor de células microgliais, a minociclina, na resposta nociceptiva mecânica dos animais (Figura 9). Observou-se um aumento significativo no limiar nociceptivo do grupo de animais tratados no 13º dia após a injeção de CFA, e, como demonstrado, esse efeito durou menos de 24 h a partir da aplicação do fármaco. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle (naive) e veículo (óleo mineral) (Figura 9).

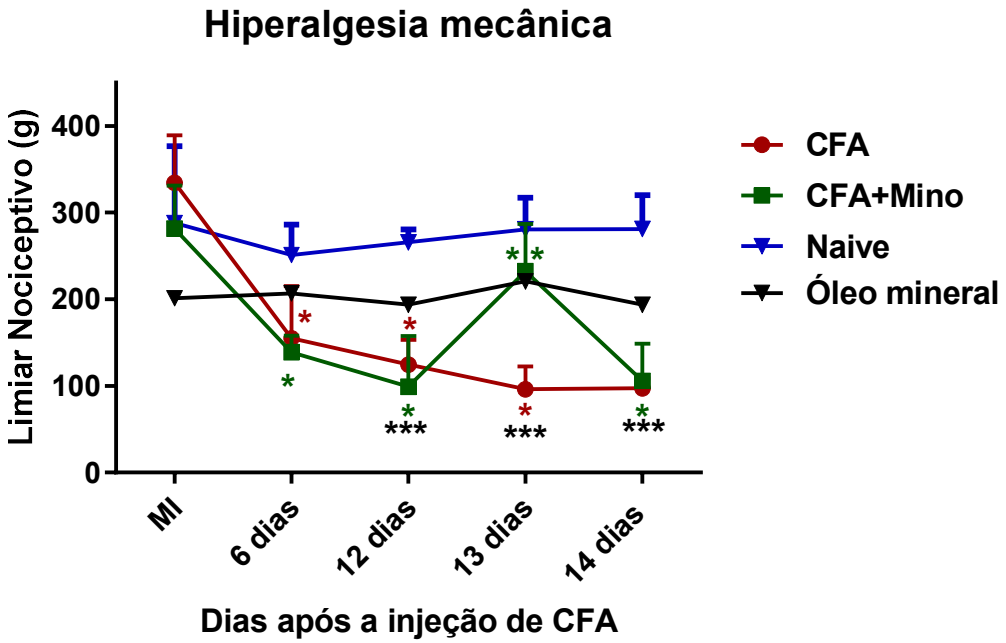


Figura 9 – *Avaliação da hiperalgesia mecânica de animais com miosite crônica*. O limiar de dor, avaliado pelo teste de Von Frey eletrônico (expresso em gramas) foi determinado antes (tempo zero-MI), no 6º, no 12º, 13º e 14º dia após a injeção de CFA (150 µg/300 µl). Os resultados representam a média ± epm de 6-10 animais por grupo. *p<0,01 por comparação com a MI do mesmo grupo/**p<0,05 em comparação com o grupo CFA/***p<0,05 em comparação com o grupo Naive.

4.1.2 CARACTERIZAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CFA E TRATAMENTO INTRATECAL COM MINOCICLINA

A fim de avaliar a sensibilidade nociceptiva decorrente de um estímulo térmico, foi utilizado o teste de Hargreaves, o qual expressa o limiar dos animais em segundos, como descrito anteriormente (Item 3.5.2). Nossos resultados demonstram que a administração de CFA no músculo gastrocnêmio foi capaz de diminuir em o limiar nociceptivo térmico dos animais com miosite crônica quando comparado ao grupo controles (naive e óleo mineral), a partir do 12º dia após a administração de CFA (Figura 10). Com relação ao tratamento dos animais com a minociclina, observou-se um aumento significativo no limiar nociceptivo térmico do grupo de animais tratados no 13º dia após a indução de miosite, quando comparados ao grupo CFA. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle (naive) e veículo (óleo mineral) (Figura 10).

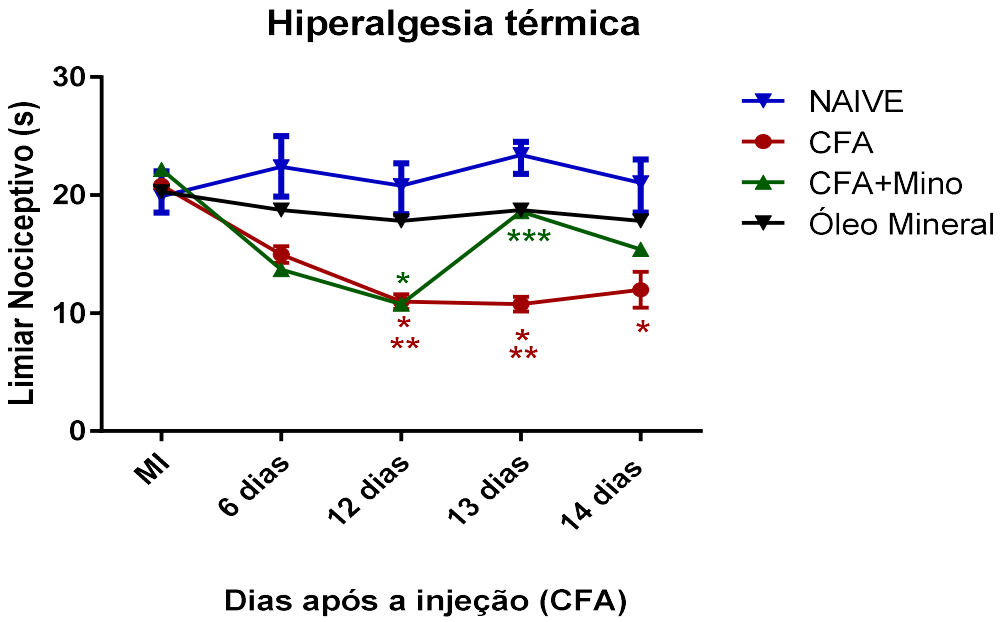


Figura 10 - *Avaliação da hiperalgesia térmica de animais com miosite crônica* O limiar de dor, avaliado pelo teste de Hargreaves (expresso em segundos) foi determinado antes (tempo zero- MI), no 6º, no 12º, 13º e 14º dia após a injeção de CFA (150 µg/300 µl). Os resultados representam a média ± epm de 6-10 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a MI do mesmo grupo/**p<0,05 em comparação com o grupo Naive/***p<0,05 em comparação com o grupo CFA.

4.1.3 CARACTERIZAÇÃO DA ALODINIA TÁTIL INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CFA E TRATAMENTO INTRATECAL COM MINOCICLINA

A fim de avaliar a sensibilidade nociceptiva decorrente de um estímulo tátil (não nocivo), foi utilizado o teste de filamentos de Von Frey, o qual expressa o limiar dos animais em gramas, como descrito anteriormente (Item 3.5.3). Nossos resultados demonstram que a administração de CFA músculo gastrocnêmio foi capaz de diminuir o limiar nociceptivo no 6º e 12º dias nos animais com miosite, quando comparado ao grupos controles (naive e óleo mineral) (Figura 11). Após o tratamento dos animais com a minociclina, observou-se um aumento significativo no limiar nociceptivo para alodinia tátil do grupo de animais tratados no 13º dia após a indução de miosite, quando comparados ao grupo CFA. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle (naive) e veículo (óleo mineral) (Figura 11).

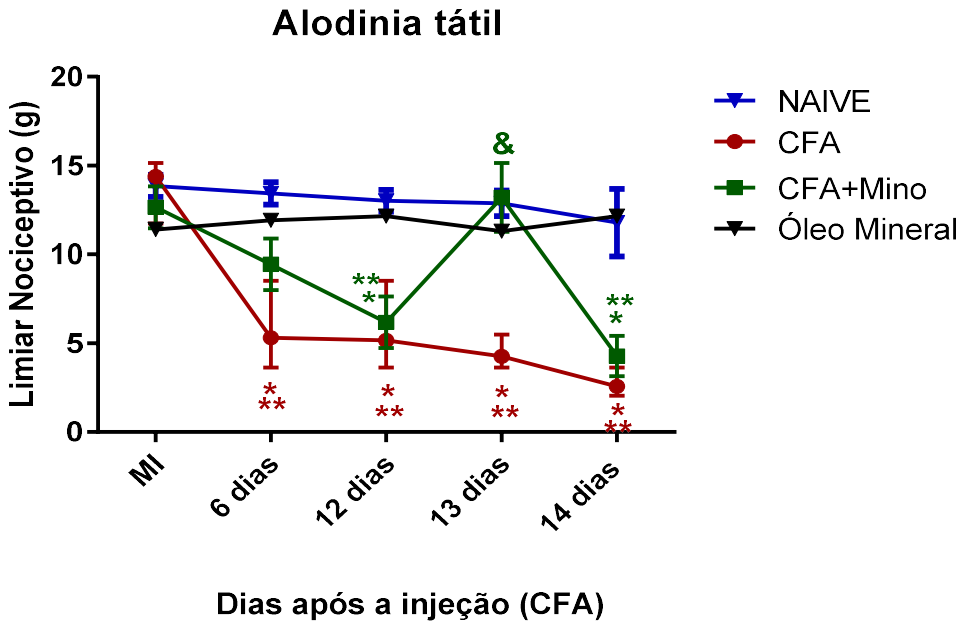


Figura 11 - *Avaliação da alodinia tátil de animais com miosite crônica.* O limiar de dor, avaliado pelo teste do filamentos de Von Frey (expresso em gramas) foi determinado antes (tempo zero- MI), no 6º, no 12º, 13º e 14º dia após a injeção de CFA (150 µg/300 µl). Os resultados representam a média ± epm de 6-10 animais por grupo.*p<0,01 por comparação com a MI do mesmo grupo. &p<0,01 por comparação com o grupo CFA. **p<0,01 em comparação com o grupo Naive.

4.1.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM RESPOSTA A INDUÇÃO DE MIOSITE CRÔNICA

A fim de avaliar se os animais com miosite crônica tiveram sua locomoção afetada, estes foram submetidos ao teste do índice funcional da atividade locomotora e comparados com o grupo controle (Naive). As medidas iniciais foram acessadas antes de qualquer procedimento e no 12º dia após a injeção de CFA (12º d) todos os animais foram re-avaliados para verificação de possíveis alterações de locomoção, uma vez que o músculo gastrocnêmio faz parte do grupo muscular que possibilita a atividade locomotora. Do 6º dia após a injeção em diante, através de observações diárias, notamos que os animais do grupo CFA descarregavam parcialmente o peso corporal sobre a pata direita (injetada) refletindo em uma retração do membro posterior. Estas alterações foram representadas por uma diminuição dos valores no teste do índice funcional ao compararmos com as medidas iniciais do próprio grupo CFA e com o grupo controle, os quais não apresentaram alterações nos em seus valores (Figura 12).

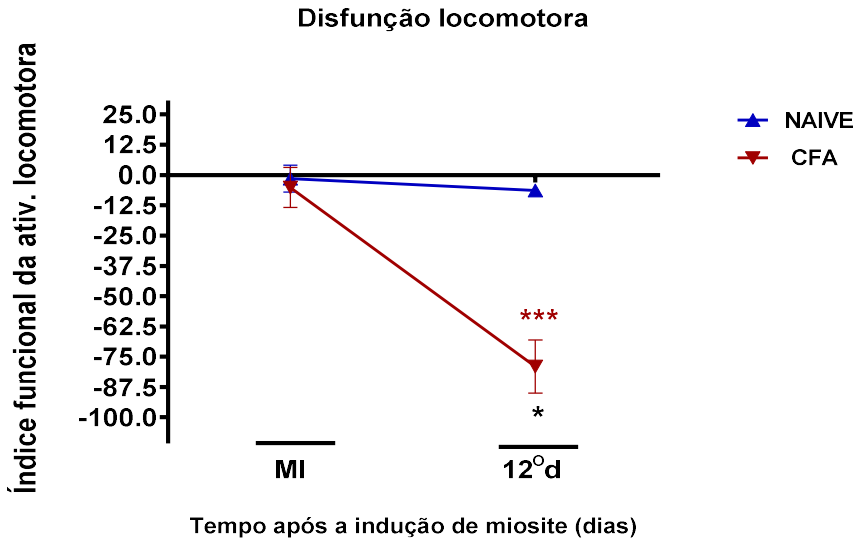


Figura 12 – *Índice funcional da atividade locomotora de animais com miosite crônica*.O resultado obtido expressa a disfunção motora induzida pela administração i.m. de CFA. Este expressa um percentual negativo da função normal, em que 0 (zero) corresponde à função normal, ou ausência de deficiência, e -100 (menos cem) corresponde à disfunção total. Os resultados representam a média ± e.p.m. de 6-10 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a MI do mesmo grupo/ ***P<0,001 em comparação com o grupo Naive.

4.1.5 MORFOFISIOLOGIA DO TECIDO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À INDUÇÃO DE MIOSITE CRÔNICA

A miosite foi induzida através da injeção intramuscular de 300 µg de CFA no músculo gastrocnêmio dos animais, conforme descrito anteriormente. Doze dias após a injeção avaliações histológicas do músculo gastrocnêmio e da fáscia, conectada a este músculo demostraram a ocorrência de infiltração de células inflamatórias, provavelmente macrófagos e células linfóides. Pode ser observada uma menor quantidade de infiltração de células inflamatórias na fáscia muscular do animal controle (naive), quando comparado com o músculo daquele submetido à injeção de CFA (Figura 13A). O mesmo pode ser visto na histologia das fibras musculoesqueléticas do músculo gastrocnêmio, uma vez que a densidade de infiltrado inflamatório nos animais lesionados é mais proeminente do que o músculo do animal controle (Figura 13B).

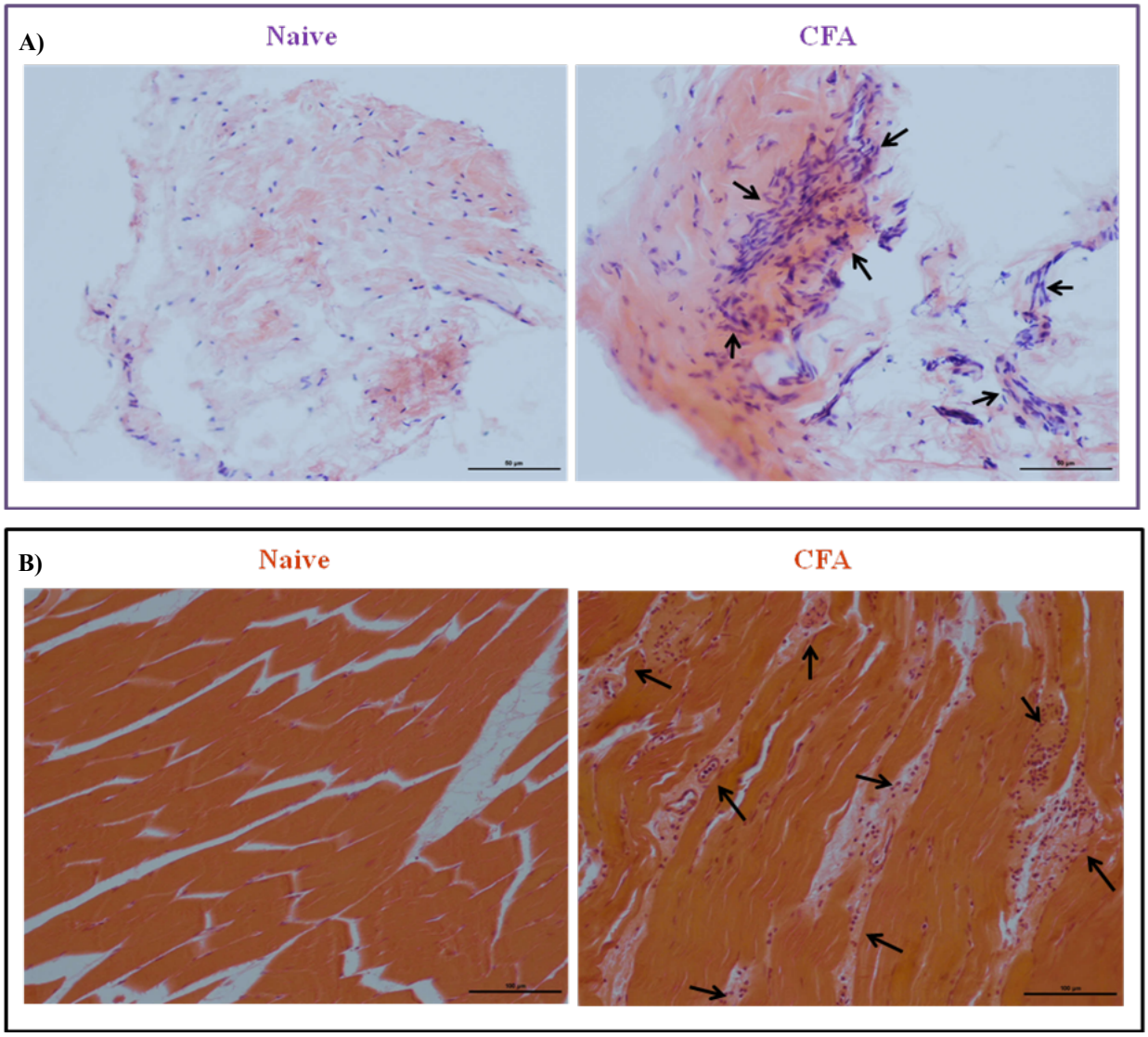


Figura 13 – *Cortes histológicos dos tecidos musculares de animais submetidos à miosite crônica.* A figura **A** representa a histologia da fáscia muscular, comparando-se os animais com miosite crônica induzida por CFA com animais controle (Naive); A Figura **B** compara as fibras musculares esqueléticas dos animais com (CFA) ou sem miosite (Naive). A infiltração de células da resposta inflamatória está representada por pontos corados em rosa, apontadas por setas pretas (➞), conforme se observa na figuras. Objetiva de 40 x.

4.1.6 PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS GLIAIS NA MEDULA ESPINAL DE ANIMAIS COM MIOSITE CRÔNICA- Ensaios de Western Blotting

Ensaios de Western Blotting foram realizados processando-se amostras da porção lombar (L4-L6) da medula espinal dos animais a fim de avaliar a participação das células da glia no presente modelo. Foram realizadas comparações entre os animais com miosite crônica no músculo gastrocnêmio contra os grupos controles (Naive). Os resultados revelaram uma diferença significativa na quantidade de proteínas expressas para GFAP (marcador de

astrócitos) nos animais com miosite quando comparados ao grupo controle. O aumento na densidade óptica das bandas marcadas para GFAP no grupo de animais com miosite foi de 97% quando comparado com o grupo controle (Figura 14A).

Os resultados revelaram ainda uma diferença significativa na quantidade de proteínas imunorreativas para OX-42 (marcador de microglia) nos animais com miosite quando comparados ao grupo controle. O aumento na densidade óptica das bandas marcadas para OX-42 no grupo de animais com miosite foi de 150% quando comparado com o grupo controle (Figura 14B). Além disto, observamos o efeito da minociclina na expressão de células microgliais neste modelo, uma vez que fomos capazes de detectar a diminuição da expressão destas após sua administração como forma de tratamento. Os dados mostram quem houve uma redução de 144% na densidade óptica destas células no grupo de animais tratados (Mino+CFA) quando comparado ao grupo experimental (CFA), voltando a níveis basais semelhantes aos animais do grupo controle (Naive) e demonstrando a efetividade do bloqueio destas células pelo fármaco (Figura 14B). Nenhuma diferença foi observada para β-actina entre os grupos analisados.

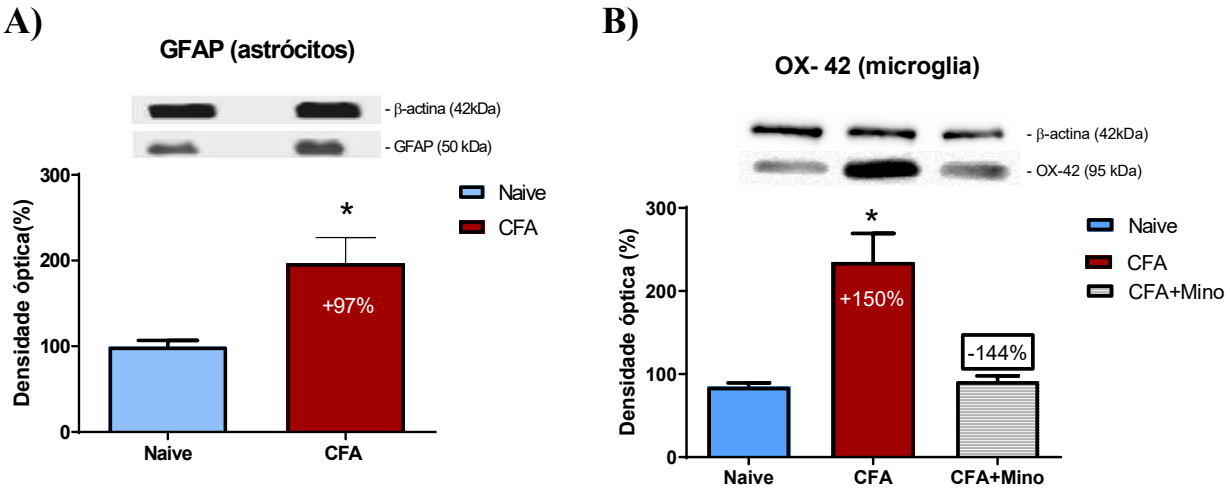


Figura 14 A e B - *Quantificação da expressão glial na medula espinal de animais coma miosite crônica.* Expressão de astrócitos (A) e células da microglia (B) da porção lombar da ME pelo método de Western Blotting. Os resultados representam a média ± e.p.m. de 7-8 animais por grupo. *p<0.05 por comparação com os demais grupos.

Com o intuito de avaliar a expressão de fractalquina no modelo proposto, foi realizada a análise da expressão protéica dessa quimiocina na porção lombar da medula espinal. Nossos resultados demonstraram que houve um aumento de 45% da proteína expressa no grupo CFA e uma diminuição de 59% desta expressão no grupo tratado com minociclina (CFA+Mino) (Figura 14C).

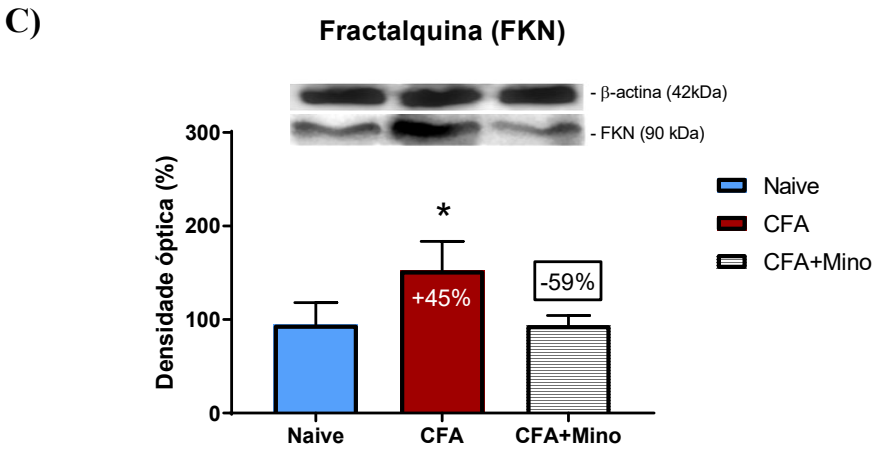


Figura 14 C - *Efeito da miosite crônica induzida por CFA na expressão fractalquina.* O gráfico ilustra a quantificação da quimiocina na porção lombar da ME pelo método de Western Blotting. Os resultados representam a média ± e.p.m. de 7-8 animais por grupo. *p <0.05 por comparação com os demais grupos

4.1.7 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS E FRACTALQUINA NO PLASMA SANGUÍNEO DE ANIMAIS COM MIOSITE CRÔNICA

Com o intuito de avaliar a participação de citocinas pró e anti-inflamatórias no modelo estudado, foi realizado um ensaio para dosagem de citocinas no plasma sanguíneo dos animais, a fim de selecionar quais das citocinas propostas estariam agindo de forma mais relevante no processo de miosite crônica. Inicialmente propusemos quantificar as citocinas IL-1, IL-6 e IL-10, TNF-α e a quimiocina fractalquina (FKN) circulantes no sangue dos animais. Porém, após nosso teste de dosagem para essas citocinas propostas, obtivemos apenas os resultados da quantificação de IL-1, IL-10 e FKN, uma vez que as citocinas restantes (IL-6 e TNF- α) não alcançaram a taxa mínima para dosagem em nossas amostras.

Nossos resultados demonstraram que tanto a IL-1β quanto a FKN apresentaram uma um aumento de suas quantidades (em pg/mL) no grupo experimental, (CFA), quando comparado ao grupo controle (Naive) (Figura 15A e 15B). Em contrapartida, a interleucina

10, anti-inflamatória, demonstrou estar menos presente no sangue circulante de animais CFA do que do grupo de animais controle (Figura 15C).

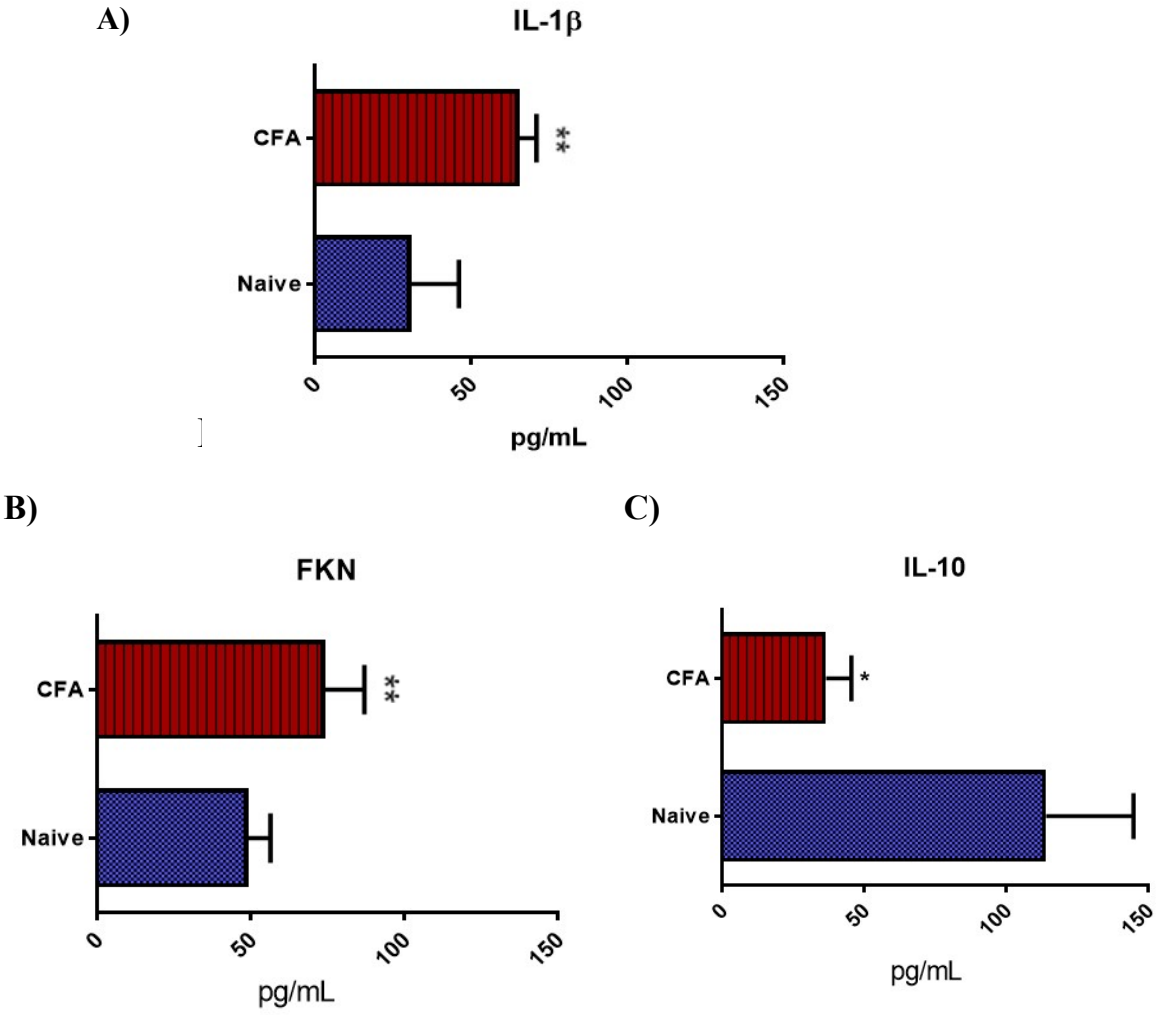


Figura 15 - *Quantificação de citocinas e FKN no plasma sanguíneo de animais com miosite crônica.* A figura15A representa a quantificação da Interleucina-1β; a figura 15B representa a quantificação da fractalquina (FKN) e a figura 15C ilustra a quantificação da Interleucina 10; a quantificação é dada em pg/mL de sangue analisado (em um volume de 2 mL) . Os resultados representam a média ± e.p.m. de 7-8 animais por grupo. *p <0.01 e **p<0,05 por comparação entre os grupos CFA e Naive.

4.2 ETAPA 2 – MIOSITE E INFLAMAÇÃO PLANTAR AGUDA

Cabe ressaltar que esta etapa do projeto foi realizada durante o período de estágio no exterior em colaboração com a Prof. Marzia Malcangio, no laboratório “Plasticity of the first pain synapse”, no Departamento Wolfson CARD, Universidade King’s College London, Reino Unido.

4.2.1 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO PELO EDEMA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGEENINA

Com o intuito de avaliar se a injeção intraplantar de 50 µL de Cg 3% via seria capaz de causar uma inflamação local (caracterizada pelo edema) se os diferentes genótipos apresentariam uma alteração neste processo foi realizada a mensuração da espessura da pata dos animais, em um sentido dorso-ventral, e comparando-se as patas contralaterais e ipsilaterais à injeção de Cg. As medidas foram obtidas 3, 24 e 48 horas após a administração da Cg. Os dados obtidos demonstram que a injeção i.pl. de Cg causou um aumento significativo na espessura da pata ipsilateral de todos os grupos injetados (animais Selvagens-WT, Heterozigotos-HET e Knockouts-KO contra), quando comparados ao lado controle (ipsi) (Figura 16). Não foram encontradas diferenças significativas no edema entre os grupos WT, HET e KO. Também foram comparadas as patas contra e ipsilaterais dos diferentes genótipos de animais com injeção de veiculo (salina), e não observamos alterações significativas nestes mesmos tempos (dados não mostrados).

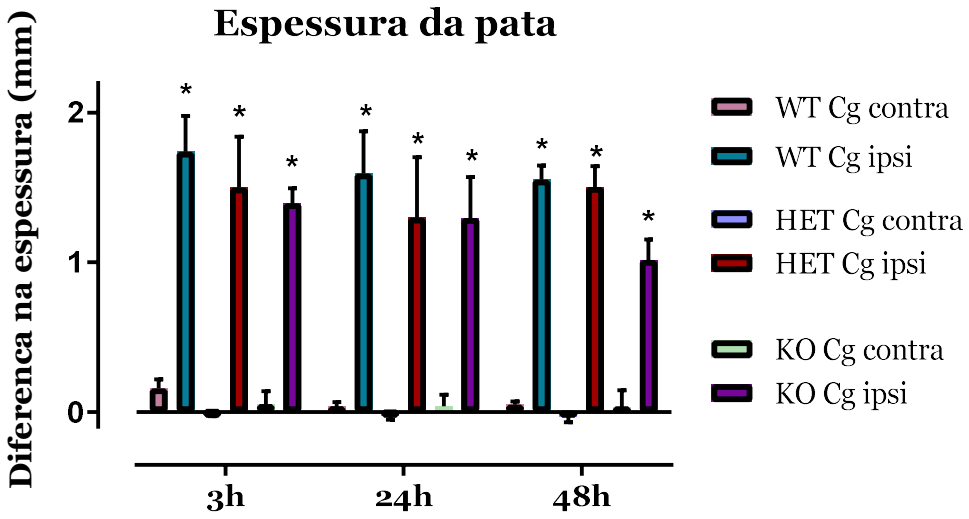


Figura 16 - *Edema plantar causado pela injeção de Cg.* O gráfico ilustra a diferença na espessura da pata contralateerais e ipsilaterais à injeção de carrageenina. Os resultados representam a média ± e.p.m de 6 animais por genótipo. *p <0.0001 por comparação entre as patas contra e ipsilaterais dos dados grupos (contra x ipsi).

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA

Cabe mencionar que o teste de Von Frey avaliou a sensibilidade de ratos e camundongos de maneira distinta uma vez que os filamentos utilizados para os ratos representam um estimulo não nocivo para estes, enquanto o calibre utilizado para camundongos pode representar um estímulo nocivo tátil.

Portanto, a fim de avaliar a sensibilidade nociceptiva decorrente de um estímulo mecânico em camundongos, foi utilizado o teste descrito, o qual expressa o limiar dos animais em gramas. Nossos resultados demonstram que a administração de Cg na pata foi capaz de diminuir significativamente o limiar nociceptivo 3 e 24 horas após sua administração no grupo de animais experimentais (Cg). Porém, o grupo KO apresentou uma significativa reversão neste quadro 48 horas após a lesão, e uma tendência à aproximação dos limiares dos grupos controles (WT, HET e KO Sal). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle (Sal) ao longo dos tempos avaliados (Figura 17).

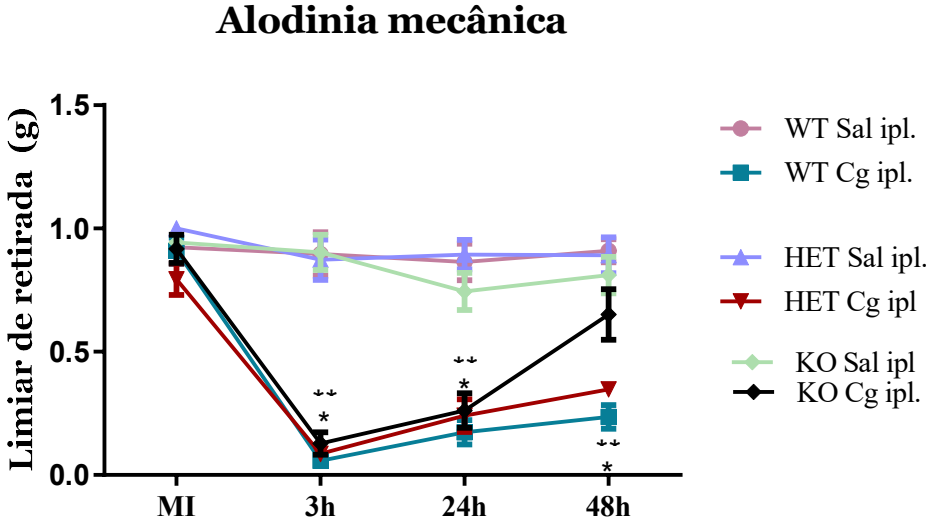


Figura 17 - *Avaliação da alodinia mecânica de animais com inflamação plantar.* O limiar de dor, avaliado pelo teste de Von Frey (expresso em gramas) foi determinado antes (tempo zero- MI), na 3º, 24º e 48º horas após a injeção i.pl. de Cg (3% em 50µg). Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. *p<0,001 por comparação com a MI do mesmo grupo. **p<0,05 por comparação com os grupos Salina (Sal).

4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA INDUZIDA PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA

A fim de avaliar a sensibilidade nociceptiva decorrente de um estímulo térmico nos animais, foi utilizado o teste de Hargreaves, o qual expressa o limiar dos animais em segundos. Nossos resultados demonstram que a administração de Cg na pata foi capaz de diminuir significativamente o limiar nociceptivo 3, 24 e 48 horas após sua administração no grupo de animais experimentais (Cg) e o grupo KO injetados com Cg apresentou um aumento em seu limiar nociceptivo 24 horas após a lesão. Porém, esta diferença na apresentou significância estatística. Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle (Sal) ao longo dos tempos avaliados (Figura 18).

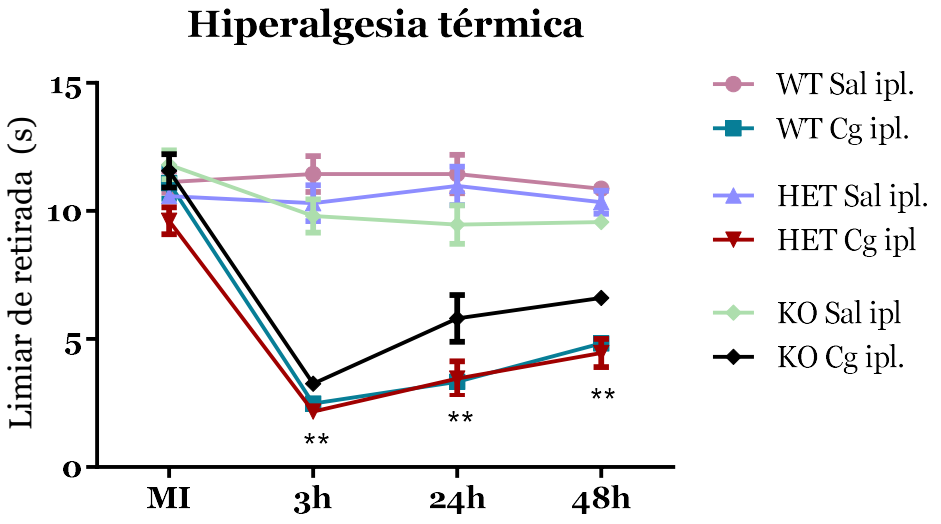


Figura 18 - *Avaliação da hiperalgesia térmica de animais com inflamação plantar.* O limiar de dor, avaliado pelo teste de (expresso em segundos) foi determinado antes (tempo zero- MI), e 3, 24 e 48 horas após a injeção de Cg. Os resultados representam a média ± epm de 6 animais por grupo. **p<0,01 por comparação com a MI do mesmo grupo e por comparação com os grupos controle (Sal).

4.2.4 AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO PELO EDEMA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAMUSCULAR DE CARRAGEENINA

Com o intuito de avaliar se a injeção intramuscular de 20 µL de Cg 3% via seria capaz de causar uma inflamação local (caracterizada pelo edema) e se os diferentes genótipos apresentariam uma alteração neste processo, foi realizada a mensuração da espessura do músculo gastrocnêmio dos animais, em um sentido dorso-ventral, e comparando-se os músculos contralaterais e ipsilaterais à injeção de Cg. As medidas foram obtidas 3, 24 e 48 horas após a administração da Cg. Os dados obtidos demonstram que a injeção i.m. de Cg causou um aumento significativo na espessura do músculo ipsilateral à lesão de todos os grupos injetados (WT, HET e KO contra), quando comparados ao lado controle (ipsi) (Figura 19). Não foram encontradas diferenças significativas no edema entre os grupos WT, HET e KO "contra". Também foram comparados os músculos contra e ipsilaterais dos diferentes genótipos de animais com injeção de veiculo (salina), e não observamos alterações significativas nestes mesmos tempos (dados não mostrados).

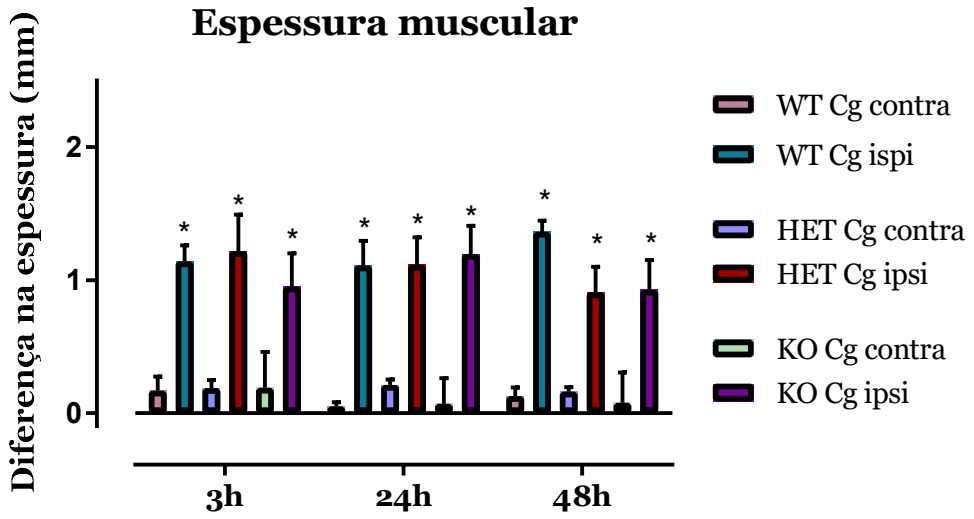


Figura 19 - *Edema muscular causado pela injeção de Cg.* O gráfico ilustra a diferença na espessura dos músculos contralaterais e ipsilaterais à injeção de carrageenina. Os resultados representam a média ±e.p.m de 6 animais por genótipo. *p <0.0001 por comparação entre os músculos contra e ipsilaterais dos grupos dados (contra x ipsi).

4.2.5 *Caracterização da alodinia mecânica induzida pela injeção intramuscular de carragenina*

De forma semelhante ao resultado encontrado na avaliação da sensibilidade mecânica após a injeção i.pl. de Cg, a injeção muscular causou uma diminuição nos limiares nociceptivos dos grupos controle e um aumento do limiar nociceptivo dos animais KO a partir da 24º hora após a lesão, sendo este o tempo com maior relevância em termos de significância. Novamente, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle (Sal) ao longo dos tempos avaliados (Figura 20).

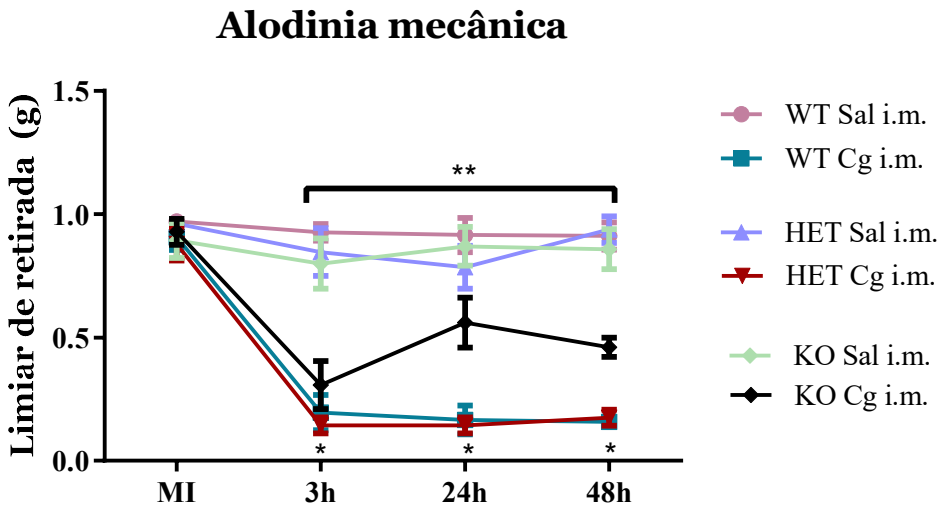


Figura 20 - *Avaliação da alodinia mecânica de animais com inflamação muscular.*O limiar de dor, avaliado pelo teste de Von Frey (expresso em gramas) foi determinado antes (tempo zero- MI), na 3º, 24º e 48º horas após a injeção i.m. de Cg (3% em 20 µg). Os resultados representam a média ±epm de 6 animais por grupo. *p<0,001 por comparação com a MI do mesmo grupo. **p<0,001 por comparação com os grupos Carragenina WT e HET (Cg) e "KO Cg 3h".

4.2.6 *Caracterização da hiperalgesia térmica induzida pela injeção intramuscular de carragenina*

A fim de avaliar a sensibilidade nociceptiva decorrente de um estímulo térmico nos animais injetados com Cg por via intramuscular, foi utilizado o teste de Hargreaves. Nossos resultados demonstram que o grupo de animais experimentais (Cg) tiveram uma diminuição de seu limiar nociceptivo, porém esta não foi tão significativa quanto no grupo de animais injetados com Cg via i.pl. descritos previamente. Estes dados montram que os animais com o músculo sensibilizado não demonstram uma grande resposta nociceptiva por um estímulo

térmico apesar de os grupos WT Cg e HET Cg apresentarem uma diminuição em seus limiares após 24 horas da injeção quando comparados as suas MI e aos grupos controle (Sal). Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle (Sal) ao longo dos tempos avaliados (Figura 21).

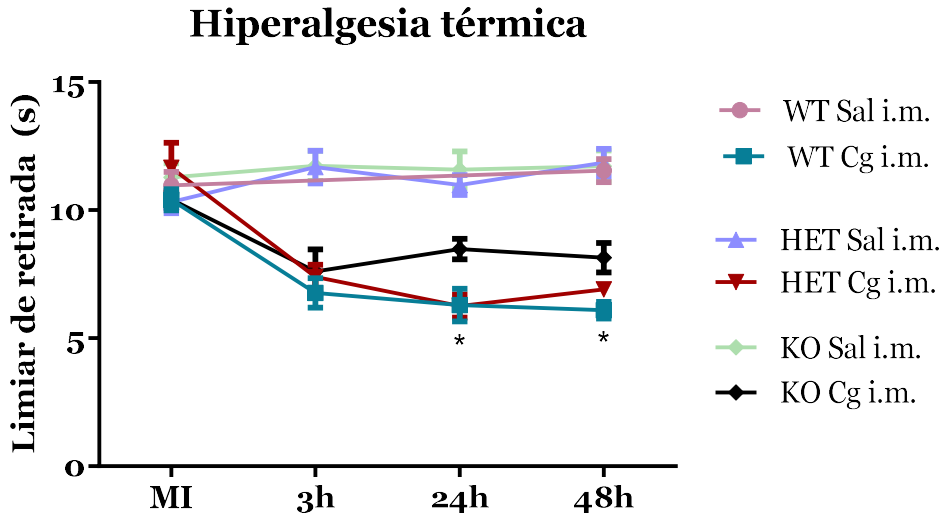


Figura 21 - *Avaliação da hiperalgesia térmica de animais com inflamação muscular.* O limiar de dor, avaliado pelo teste de (expresso em segundos) foi determinado antes (tempo zero- MI), e 3, 24 e 48 horas após a injeção de Cg. Os resultados representam a média ±epm de 6 animais por grupo. Os resultados representam a média ±epm de 6 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com a MI do mesmo grupo e aos grupos controle (Sal).

4.2.7 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVAÇÃO MICROGLIAL INDUZIDA PELAS INJEÇÕES INTRAPLANTARES E INTRAMUSCULARES DE CARRAGENINA

Após a avaliação comportamental dos animais, a medula espinal destes foi coletada e processada para análise. Os cortes foram incubados para a detecção da ativação microglial (Pp38) e análise destas células no CDME através da co-localização com os marcadores de cada genótipo (WT- Iba-1/ HETs e KO – gpf^{+}).

4.2.7.1 QUANTIFICAÇÃO POR SEGMENTOS LOMBARES DA MEDULA ESPINAL

Em uma análise inicial a densidade de células, contadas por área das laminas I e II da medula espinal, foi avaliada no segmento lombar como um todo e não obtivemos diferenças

significativas (dados não mostrados). Porém, ao realizar a contagem de células microgliais ativadas em cada segmento lombar separadamente (L3, L4e L5) pudemos encontrar modificações nos padrões de ativação destas células. Os animais com injeção i.pl. de Cg demonstraram uma diferença na ativação microglial entre os grupos apenas em L5 onde os genótipos WT e HET tiveram um aumento no número de células ativadas quando comparado com animais do mesmo genótipo injetados com salina (Figura 22 e 23). Interessantemente, o grupo KO não demonstrou variações no número de células ativadas expressas na ME. Cabe mencionar que os tecidos foram analisados na 48ª hora após a indução de miosite.

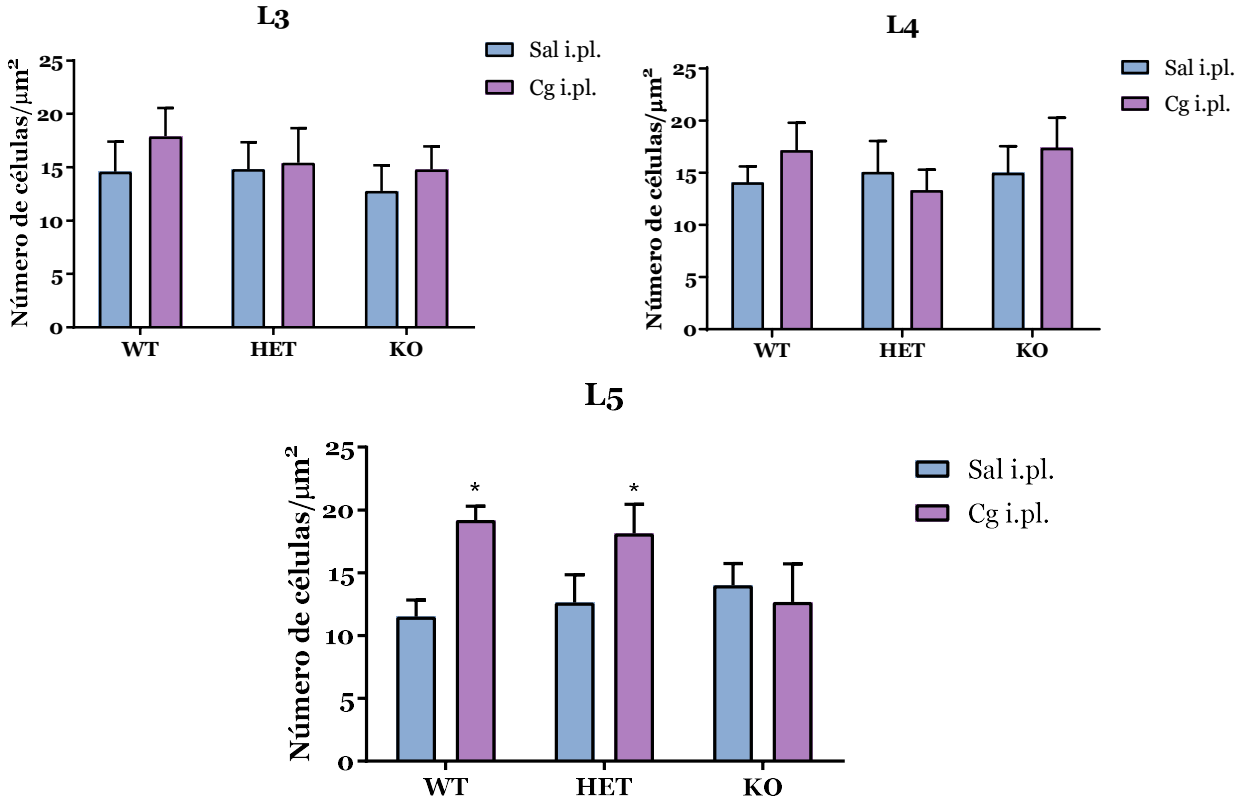
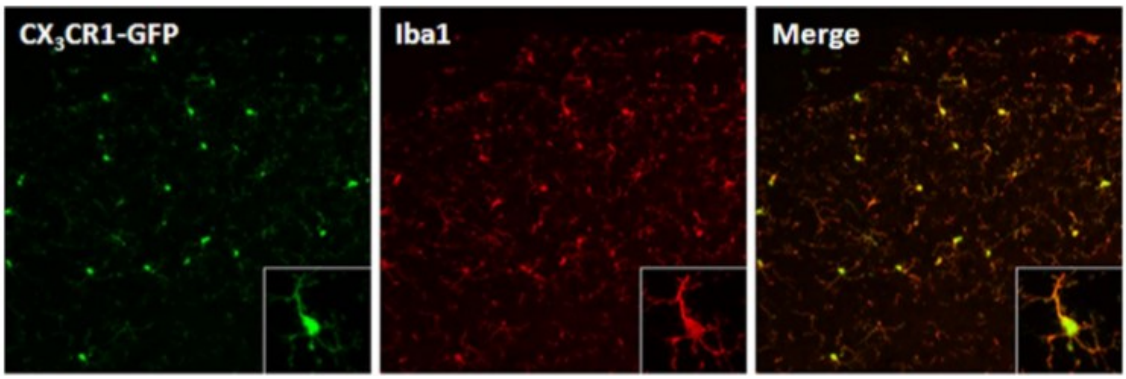


Figura 22 – *Quantificação da ativação microglial por segmentos lombares da medula espinal após a injeção intraplantar de Cg.* Os gráficos representam a contagem de células co-localizadas para marcação de microglia e a proteína nuclear p38 fosforilada. Os cortes da ME foram avaliados 48 horas após a lesão. Os resultados demonstram uma diferença significativa apenas em L5 e representam a média ±epm de 6 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo Salina (Sal i.pl.).

Cabe ressaltar que as células GFP^+ em animais HETs e KOs correspondem às células microgliais, que, em animais WT são representadas pela marcação de Iba-1. Realizamos uma imuno-marcação no corno dorsal da medula espinal para comprovar esta co-localização (Figura 23A).

A)



B)

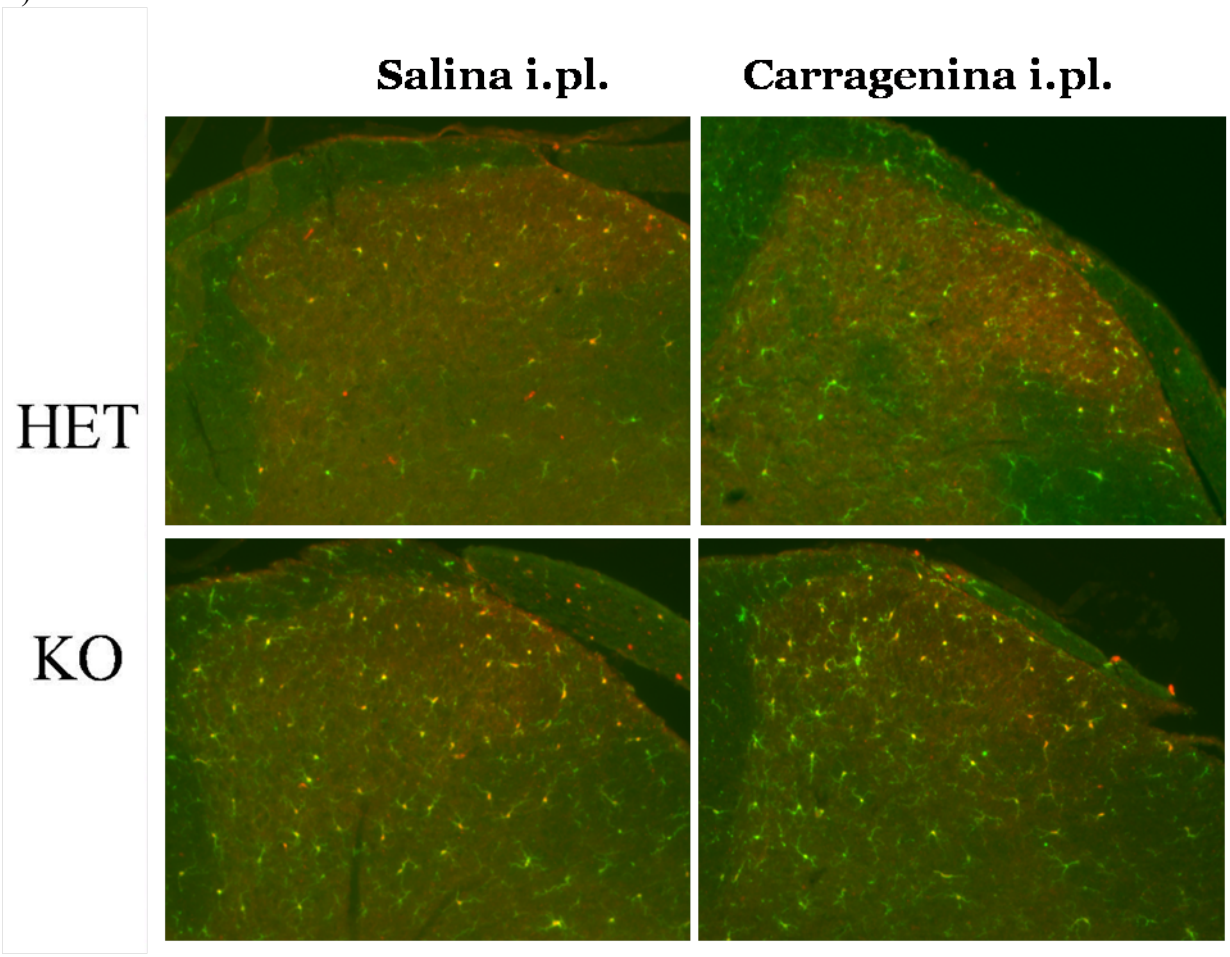


Figura 23 – *Fotomicrografia e densidade de células GFP+ e imunorreativas para proteína Pp38 em modelo de inflamação intraplantar*. A) Co-localização (Merge) de células gfp+ e Iba1+ em animais HET (representadas por CX_3CR1-GFP, em verde). B) A marcação em verde representa as células microgliais gfp+ e em vermelho a marcação para Pp38 no lado ipsilateral a lesão. A co –localização destas se dá pela cor amarelada. Aumento de 20 x.

Com relação à ativação das células da microglia em modelo de lesão aguda muscular, obtivemos resultados semelhante em relação ao segmento lombar participante no processo nociceptivo, sendo este o segmento L5. Nesta porção lombar da ME, os três genótipos (WT, HET e KO) apresentaram um aumento significativo no número de células ativadas em relação aos seus grupos controle (mesmo genótipo com administração de Salina i.m.). Portanto, de maneira oposta ao resultado encontrado nos animais com injeção intraplantar de Cg, os animais portadores da deleção (CX_3CR1 KO) demonstraram maior participação glial sob a condição nociceptiva (Figura 24 e 25).

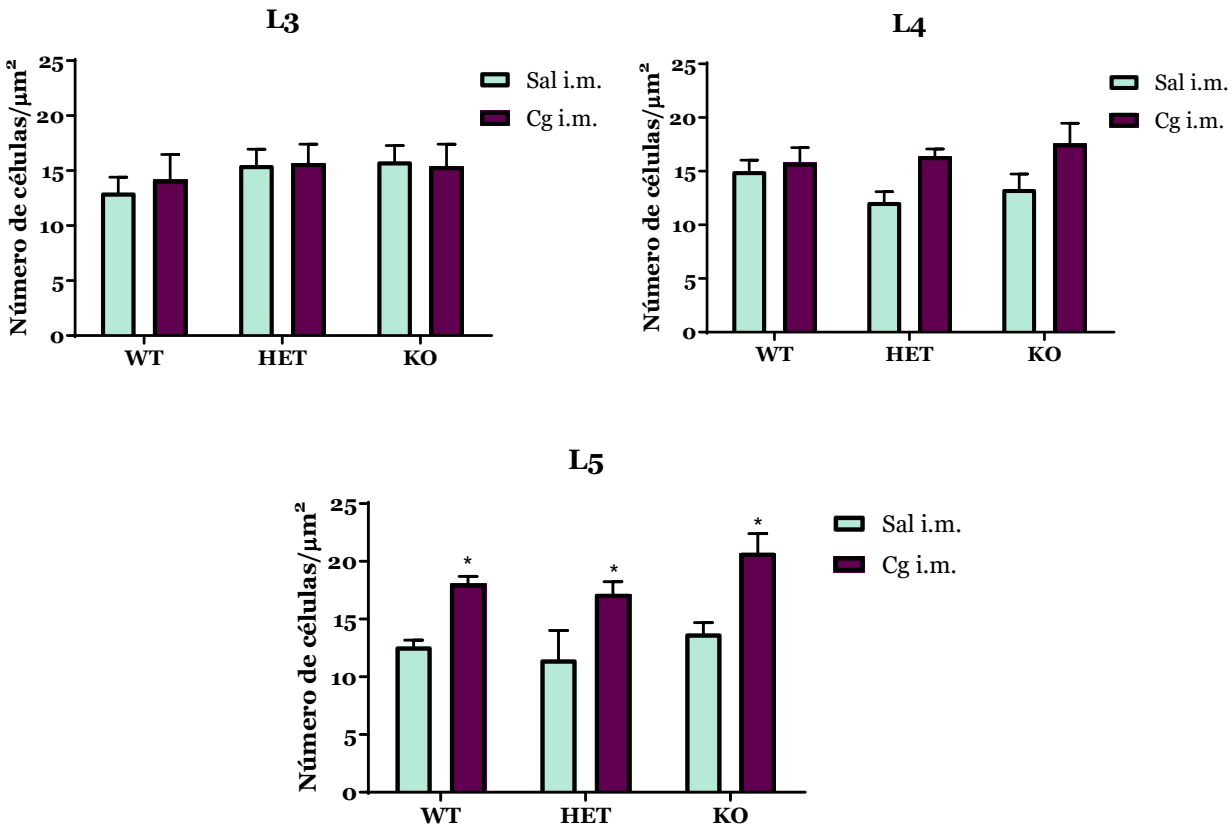


Figura 24 - *Quantificação da ativação microglial por segmentos lombares da medula espinal após a injeção intramuscular de Cg*Os gráficos representam a contagem de células co-localizadas para marcação de microglia e a proteína nuclear Pp3 fosforilada. Os cortes da ME foram avaliados 48 horas após a lesão. Os resultados demonstram uma diferença significativa apenas em L5 e representam a média ±epm de 6 animais por grupo. *p<0,05 por comparação com o grupo Salina (Sal i.pl.).

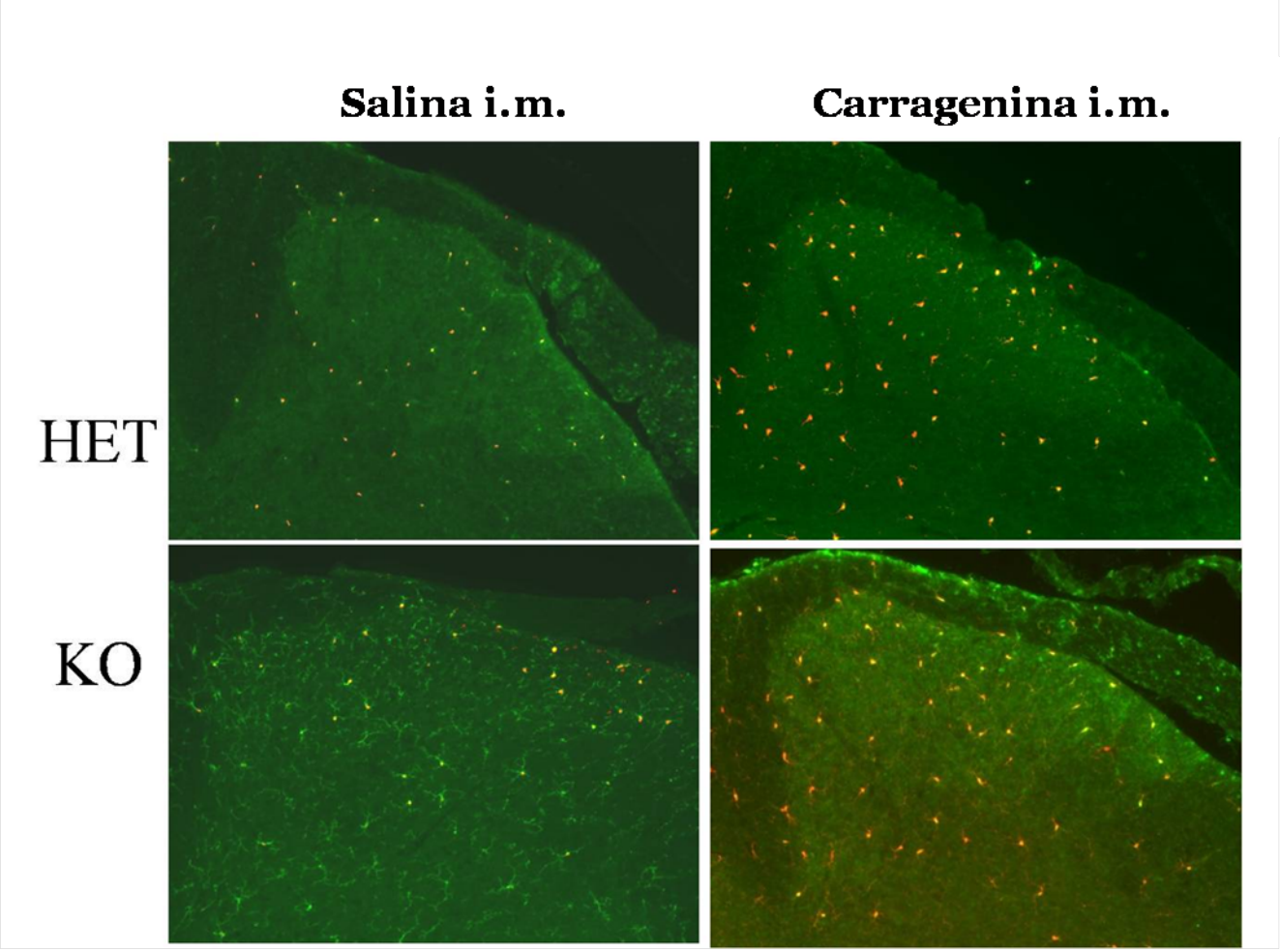


Figura 25 - *Fotomicrografia e densidade de células GFP+ e imunorreativas para proteína Pp38 em modelo de inflamação intramuscular*. A marcação em verde representa as células microgliais gfp+ e em vermelho a marcação para Pp38 no lado ipsilateral a lesão. A co –localização destas se dá pela cor amarelada. Aumento de 20 x.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como finalidade avaliar dois modelos de inflamação muscular (miosite aguda e crônica) além de um modelo de inflamação plantar com o intuito de identificar a participação das células da microglia e de mediadores pró-inflamatórios importantes para a sinalização nociceptiva nestes modelos.

A fim de avaliar possíveis alterações na resposta inflamatória causada pela administração do CFA (Etapa 1 deste projeto) foi realizada uma análise da morfofisiologia do músculo gastrocnêmio e do tecido conjuntivo que o envolve (fáscia muscular) dos animais que tiveram a miosite induzida pela injeção do agente. O CFA é uma solução utilizada como imunopotencializador, e quando injetado via intramuscular o CFA causa pode causar lesões temporárias ou permanentes. O tempo escolhido para a análise do tecido e para os testes comportamentais (12 dias após a injeção de CFA) foi determinado a partir de um estudo eletrofisiológico que demonstrou o aumento da atividade de *background* neuronal neste momento (Hoheisel et al., 1998), e baseado em estudos que demonstraram o aumento da sensibilidade nociceptiva no dado *timepoint* (Chacur et al., 2009; Rosa et al., 2016).

A injeção de CFA promove uma inflamação crônica caracterizada pela formação de edema e intenso infiltrado inflamatório(Leenaars et al., 1998; Stills, 2005). Seu mecanismo de ação no músculo não é totalmente compreendido, mas sabe-se que o CFA causa uma miosite crônica envolvendo o recrutamento de células e a participação diversos mediadores da resposta inflamatória tardia(Rosenberg et al., 1987; Suzuki et al., 2005).

Nossos resultados corroboram com estes estudos uma vez que demonstram que houve um aumento no número de células inflamatórias entre as fibras musculares do animal com miosite crônica quando comparado com o animal controle (Naive).

A migração e acúmulo das células do sistema imune no local caracteriza uma resposta inflamatória. A reação inflamatória 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, Janeway, 2000; Gomes-Leal et al., 2002). A resposta inflamatória inclui também a participação de diferentes tipos celulares, tais como neutrófilos, macrófagos (MØ), mastócitos, linfócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos, entre outras.

Importantemente, nossos estudos histológicos identificaram pela primeira vez o acúmulo de células inflamatórias na fáscia que envolve o músculo gastrocnêmio dos animais com miosite crônica induzida por CFA. A importância da fáscia na sensibilização muscular ainda é pouco explorada, enquanto em outros modelos de dor musculoesquelética como a fibromialgia, a fáscia parece ser uma estrutura relevante para o processo de sensibilização (Liptan, 2010). O grupo de Mense e colaboradores demonstrou que há um aumento na densidade de fibras nociceptivas na fáscia em um modelo de inflamação da fáscia toracolombar (Hoheisel et al., 2015). Baseado nisto, sugerimos que o modelo de miosite crônica induzida por CFA é capaz de causar uma sensibilização por aumento da densidade de células inflamatórias não somente local, mas que também se estende para tecidos mais superficiais (tecidos conjuntivo e epitelial), corroborando com dados eletrofisiológicos da literatura que mostram a expansão do campo receptivo de nociceptores superficiais em modelo de dor muscular (Hoheisel, et al., 2013).

Para a determinação da sensibilidade nociceptiva dos animais, foram utilizados os testes de hiperalgesia mecânica, o Von Frey eletrônico, o qual realiza uma medida diretamente no local da injeção (músculo gastrocnêmio); o de hiperalgesia térmica, (teste de Hargreaves) e o teste de alodínia mecânica, a fim de avaliar se fibras não nociceptivas (táteis) também seriam ativadas neste modelo. Ambos os últimos testes mencionados realizam a aferição do limiar nociceptivo na planta da pata dos animais, representando, desta forma, uma medida em um local secundário ao da origem da lesão.

Todos os testes foram realizados antes e após a indução da miosite (medida inicial, no 6º dia e no 12º dia após a administração do composto - medida final). Observarmos que o CFA foi capaz de induzir uma diminuição no limiar nociceptivo dos animais em no teste de hiperalgesia mecânica e térmica, a partir do 6º dia até o 12º. Pudemos observar ainda que os animais apresentaram uma sensibilização das fibras táteis decorrente da inflamação crônica, uma vez que o limiar nociceptivo dos animais com injeção de CFA também diminui após a administração do composto.

Baseado nisto, sugerimos que a miosite crônica induzida por CFA causa hiperalgesia (mecânica e térmica) e alodonia ipsilateral à lesão muscular por um processo inflamatório que se inicia localmente e que propaga a sensibilização para áreas circundantes, possivelmente se manifestando ao longo do trajeto nervoso onde ocorre o estímulo (nervo sural, tibial e fibular e suas ramificações plantares). Dados semelhantes são encontrados na literatura, porém, os trabalhos que demonstram uma diminuição de limiar nociceptivo nos testes de alodínia e hiperalgesia térmica estão relacionados à lesões plantares induzidas por CFA e outros

compostos (Vega-Avelaira et al., 2013; Leung et al., 2015). Segundo Graven-Nielsen e colaboradores, a sensibilização central pode facilitar o mecanismo de dor referida. Do mesmo modo, a sensibilização central pode ser envolvida na hiperalgesia em locais fora do lócus da dor, como hiperalgesia referida ou generalizada (Arendt-Nielsen et al., 2000; Graven-Nielsen, Arendt-Nielsen, 2002).

Além disso, observamos que este modelo induz uma alteração na atividade de locomoção, avaliada pelo índice funcional de atividade locomotora. Foi possível observar uma deficiência instalada 12 dias após a administração do irritante, sendo evidente a dificuldade de locomoção dos animais com miosite – cabe ressaltar que este teste foi realizado apenas no 12º após a indução de miosite, momento que, como demonstram nossos ensaios histológicos, ocorre uma intensa infiltração de células inflamatórias, além da sensibilização nociceptiva local e irradiada. Schomburg e colaboradores sugerem que a dor muscular, particularmente se cronicamente persistente, requer um outro padrão de resposta comportamental comparado à dor aguda exteroceptiva (Schomburg et al., 2015). Segundo os autores, as vias reflexas bilaterais da coluna vertebral são cruciais para a postura estável e locomoção, portanto sugere-se que ocorre um comprometimento destas vias através das fibras dos grupos de aferentes III e IV em nosso modelo, alterando a capacidade de locomoção dos animais.

Estudos prévios demonstram que a inflamação do músculo gastrocnêmio de ratos conduzem à mudanças neuroplásticas distintas em neurônios do no corno dorsal (Hoheisel et al., 1998; Tenschert et al., 2004). Sabe-se que as células gliais presentes no corno dorsal da medula espinal têm função crucial para a iniciação e manutenção do processo nociceptivo de dores agudas a crônicas. Portanto, com o intuito de avaliar a participação central das células gliais no modelo de miosite crônica, analisamos a expressão de OX-42, marcador de microglia e GFAP, marcador de astrócitos. Observamos um aumento na densidade proteica referente à atividade microglial e à atividade dos astrócitos nos animais com lesão muscular crônica, quando comparado aos grupos controle. Estudos prévios feitos em nosso grupo de pesquisa demonstraram a participação da glia na reversão ou prevenção de dor muscular aguda induzida por carragenina através de diferentes inibidores gliais (dados não publicados). A participação de astrócitos em modelo de dor crônica muscular foi demonstrada por Tenschert et al. (2004), e seus resultados indicaram que os astrócitos espinais influenciam processos de dor particulamente através do aumento da síntesedo fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF-2), além de observar mudanças morfológicas nestas células (Tenschert et al., 2004). Ainda, um estudo realizado por Guo e colaboradores demonstrou um aumento na expressão da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) em astrócitos presentes no nervo massetérico após

inflamação crônica induzida por CFA neste músculo e, além disso, demonstrou que a marcação de GFAP se co-localiza com a de IL1-β. Já é sabido que a IL-1β é liberada a partir de células gliais que são ativados pela aferência do nervo e que agem em volta de neurônios para aumentar ainda mais a manutenção de hiperexcitabilidade (Guo et al., 2007; Kawasaki et al., 2008).

Ainda em nosso modelo de miosite crônica e com o intuito de avaliar mais profundamente a participação das células da microglia no dado modelo, foi realizado o tratamento com minociclina, um inibidor especifico para estas células. Observou-se uma diminuição significativa na densidade óptica destas células após o tratamento com este fármaco, através do método de Western blotting. A minociclina vem sendo 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 (Tikka et al., 2001; Raghavendra,et al., 2003). Estudos mostram que a minociclina administrada na medula espinal 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).

Em geral, a microglia parece estar mais intimamente ligada a processos de cronicidade do que os astrócitos. Zhao e colaboradores, demonstraram a participação da microglia espinal através do receptor Toll-4 (TLR4) presente nestas células, em modelo de dor inflamatória induzida por CFA intraplantar, sugerindo que a ação deste receptor tenha participação efetiva na sensibilidade dolorosa dos animais em modelo experimental (Zhao et al., 2015). Ainda, Vega-Avelaira e colaboradores, demonstram que a microglia, em modelo de dor inflamatória se comporta de diferente maneira, em 3 fases: a fase inicial (ou seja, 1-h pós inflamação), onde ocorre o aumento do tamanho das células microgliais residentes e aumento de densidade celular, provavelmente devido à infiltração de macrófagos; a segunda fase (ou seja, 24 horas pós- inflamação), há um aumento da densidade celular, mas não o tamanho da célula, sugerindo que a proliferação poderia ser o processo mais relevante ocorrendo neste momento; e a terceira fase (ou seja, 7 dias pós-inflamação), onde um "*boom*" de ativação microglial ocorre, e consequentemente, o aumento do tamanho celular e densidade(Vega-Avelaira et al., 2013).Uma vez que a glia tem papel preponderante em fenômenos de sensibilização, é

possível sugerir que a ativação destas células acarretada pela injeção de CFA possa contribuir para a manutenção do fenômeno de hiperalgesia modelo de miosite crônica.

Nossos resultados, em conjunto, demonstraram que o tratamento intratecal com minociclina foi capaz de interferir de forma significativa nos ensaios experimentais utilizados. Houve um aumento do limiar nociceptivo dos animais após o uso do fármaco, demonstrando uma reversão pontual do quadro nociceptivo em todos os testes comportamentais utilizados e, além disso, demonstrou-se a concomitante inibição destas células nos animais tratados, através de ensaios moleculares. Podemos então sugerir que as células da microglia participam ativamente em nosso modelo de miosite crônica, através da manutenção do processo doloroso, uma vez que bloqueadas promovem a alteração do quadro nociceptivo dos animais. Estudos prévios realizados por nosso grupo demonstraram que a administração de minociclina antes da indução de miosite foi capaz de prevenir a exacerbação do estado nociceptivo, bem como a proliferação glial no CDME e que esse mecanismo se relaciona com a participação do Fator de Necrose Tumoral α (Chacur et al., 2009). No presente estudo, no entanto, sugerimos uma correlação entre a participação das células microglias e a expressão de fractalquina (FKN) na medula espinal. Demonstramos que, em animais com miosite crônica, ocorre um aumento da expressão de FKN na medula, ao passo que a expressão microglial também se eleva. A FKN é uma quimiocina liberada por aferentes primários e que, no SNC, encontra seus receptores exclusivamente em células da microglia, e, portanto se torna evidente a correlação (Verge et al., 2004; Lindia et al., 2005). Kiyomoto e colaboradores (2013) demonstraram um aumento de FKN em C1 e C2 após inflamação induzida com CFA no músculo trapézio, bem como de IL-1β e p38 na medula espinal, além de causar alodinia nos animais (Kiyomoto et al., 2013), corroborando com o nosso achado.

Com relação ao envolvimento de sinalizadores centrais da lesão muscular crônica de nosso modelo, foi demonstrado que, além das células gliais, as interleucinas são associadas a essa condição. O papel destes mediadores na dor muscular é ainda pouco explorado. Ao que se refere à participação de citocinas pró e antiinflamatórias, ensaios para dosagem de citocinas foram realizados para detecção destas mesmas. Verificou-se que houve um aumento na quantidade de interleucina-1β e da quimiocina FKN, pró-inflamatórias, nas amostras de plasma sanguíneo de animais com miosite induzida por CFA, quando comparadas com amostras de sangue de animais controle. Em contrapartida, a quantidade de Interleucina 10 (IL-10), antiinflamatória, apresentou-se diminuída no grupo de animais experimentais, quando comparada ao grupo controle. Com relação ao comportamento desta citocina, era esperado que no 12º dia o nível encontrado fosse reduzido em relação às outras, pois a IL-10 é

antiinflamatória, e geralmente encontra-se em altas concentrações em fases agudas da dor, quando o organismo tenta suprimir o estado patológico. Portanto, nossos resultados sugerem que a IL-1β e a quimiocina FKN participam do processo nociceptivo neste modelo, sendo liberadas em maior quantidade após a indução de miosite, durante o processo inflamatório crônico. Sabe-se que citocinas podem ser liberadas 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, Janeway, 2000; Gomes-Leal et al., 2002). Kobayashi e colaboradores (2012) mostraram que há um aumento do mRNA das citocinas IL1-β e TNFα 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, Watkins, 2009). Sluka e colaboradores (2006) demonstraram a importância da IL-10 na prevenção da dor crônica muscular através da prática do exercício físico com conseqüentes alterações em macrófagos residentes no tecido muscular de camundongos(Leung et al., 2015).

Com relação aos resultados obtidos na Etapa 2 deste projeto, foram induzidos os modelos agudos de inflamação muscular e inflamação plantar em camundongos transgênicos com o intuito de avaliar a participação especifica do receptor de FKN (CX_3CR1), uma vez que observamos nos experimentos anteriores que a FKN possui um papel relevante no processo de miosite crônica.

A carragenina (Cg) é um polissacarídeo extraído de algas marinhas que uma vez injetada no tecido biológico causa uma inflamação aguda e com duração limitada de, no máximo 72 horas, dependendo de sua dose (Posadas et al., 2004; Fehrenbacher et al., 2012). Nossos resultados demonstraram que a injeção de Cg foi capaz de induzir um edema plantar e muscular nos animais em que a Cg foi administrada, quando comparados com os membros contralaterais à lesão em todos os genótipos analisados. Isso vai de encontro ao resultado esperado, no qual encontraríamos um edema (plantar ou muscular) menos evidente nos animais KO para CX_3CR1. Isso se daria pelo fato de que estes receptores são encontrados em macrófagos circulantes e são responsáveis pela captação de FKN sistemicamente (Montague, 2017). Como mencionado anteriormente, macrófagos fazem parte dos tipos celulares recrutados em caso de inflamação e a FKN possui um papel pró-inflamatório. Portanto, na ausência da ligação MØ-FKN, esperava-se uma diminuição na intensidade do edema. Este resultado sugere que o edema, causado pela injeção de Cg, depende de outros fatores e/ou

mediadores para induzir o edema local, como previamente reportado pela literatura, através da redução dos níveis de IL-8, IL-1β, TNF-a, NO via inibição de iNOS e PGE2 através de inibição de COX-2 (Park et al., 2006, 2007).

Em relação aos diferentes testes comportamentais realizados para os diferentes modelos e comparando-se os tres genótipos, observamos uma importante alteração no limiar para hiperalgesia mecanica dos animais KO tanto no modelo de inflamação intraplantar quanto intramuscular. Essa diferenca se deu pela reversão parcial da nocicepção induzida pela Cg nos animais portadores da deleção ($CX_3CR1^{-/-}$), no teste de alodinia mecânica 48 horas após a lesão, quando comparados com os grupos controle (WT, HETs injetados com Cg). Diferentemente, a deleção do receptor de FKN nos animais KO não interferiu significativamente nos limiares de hiperalgesia térmica destes animais, tanto no modelo de miosite aguda, quanto para o modelo de inflamação plantar.

Na medula espinal de animais naive, não lesionados, a microglia desempenha um papel de sobrevivência, portanto, na ausência de um estímulo nocivo a ruptura da relação FKN/CX_3CR1 não deve afetar as respostas nociceptivas dos animais. Isto foi demonstrado por Malcangio e colaboradores, em um estudo em que animais com a deleção de CX_3CR1 foram avaliados em uma série de testes para determinar se o processamento da dor aguda em resposta a estímulos térmicos e mecânicos aplicados perifericamente seriam alterados após a deleção do gene. Os dados deste estudo mostram que os animais trangênicos responderam de maneira muito semelhante aos animais selvagens quando avaliados nos testes de hiperalgesia térmica (Hargreaves), mecanica (Von Frey), teste de locomoção (Rotarod), entre outros. Estes dados dãosuportam à idéia de que as microglias são "quiescentes" em termos de sinalização nociceptiva em animais sem lesão e que a via FKN-CX_3CR1 representa um sistema alvo que é importante apenas no contexto da "ativação" microglial, isto é, quando existe dor como a que ocorre após uma lesão (Staniland et al., 2010). Este mesmo estudo demonstrou que após a injeção de zymosan intraplantar, os ratos KO para CX_3CR1não apresentaram hiperalgesia térmica, enquanto a alodinia mecânica se desenvolveu completamente, indo de encontro com o nosso achado no presente estudo. Em contrapartida, um estudo utilizando o modelo de dor induzida por quimioterapia demonstrou um retardo no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica em animais KO para FK (Old et al., 2014). Nesse sentido ressaltamos que diferentes populações de fibras aferentes são responsáveis pela geração de dor mecânica *versus* térmica em modelo de inflamação(Shir, Seltzer, 1990), e esse fato pode resultar em um âmbito diferente em que a via de sinalização FKN-CX_3CR1 e a ativação microglial são importantes de diferentes maneiras na dor inflamatória térmica e mecânica. Além disso é importante

considerar os tempos avaliados nos diferentes estudos e as substâncias pró-inflamatórias utilizadas para induzir a lesão.

Nesse contexto, avaliamos a ativação microglial nos modelos e genótipos em questão a fim de avaliar mais afundo a participação da FKN em nosso modelo. Para tal, foi realizada a quantificação destas células no CDME. Destacamos aqui que a substância cinzenta da medula espinal pode ser dividida em nove camadas celulares distintas, ou lâminas, organizadas dorso-ventralmente e incluindo a lâmina 10, que cerca o canal central. Cada lâmina possui diferentes características fisiológicas, histoquímicas e citoarquitetônicas. Esse padrão foi primeiramente descrito por Rexed em 1952 em medulas espinais de gatos (Rexed, 1952), e essa organização foi confirmada mais tarde em outras espécies, incluindo em camundongos (Sidman et al., 1972; Watson et al;, 2008), ratos (Molander et al., 1984), e humanos (Schoenen, Faull, 2004). Nossos resultados demonstraram que ao realizar a contagem de células microgliais ativadas nas lâminas I e II da ME em todos os segmentos lombares unificados (L3, L4 e L5), não há diferenças estatísticas significativas (dados não mostrados). Porém, ao se fazer a contagem das células nos segmentos lombares individualmente, observamos um aumento importante em L5 para ambos os modelos de indução de inflamação plantar e muscular. Estes resultados demostram que houve uma diminuição na ativação microglial nos animais KO para CX_3CR1 no modelo de inflamação plantar e, inversamente, um aumento nessa ativação em modelo de miosite aguda (inflamação intramuscular).

Dentro do SNC, CX_3CR1 é exclusivamente expresso em microglia, onde sua interação com FKN contribui para a supressão de um estado inflamatório nessas células; FKN é capaz de limitar a liberação de mediadores pró-inflamatórios, reduzindo a produção de NO e TNFα (Mizuno et al., 2003; Lyons et al., 2009). Como descrito por Stanilad e colaboradores, a sensibilização periférica por meio da injeção de uma substância álgica em animais provoca o aumento da imunomarcação para Iba-1 e Pp38 na medula espinal de animais WT, mas não em KO para CX_3CR1,, corroborando com nossos resultados de inflamação plantar e com os testes comportamental para hiperalgesia mecânica (Staniland et al., 2010). Além disso, em vários modelos de lesão do nervo periférico, verificou-se que a administração intratecal de anticorpos neutralizantes contra FKN ou CX_3CR1 retarda ou atenua os comportamentos associados à dor crônica (Milligan et al., 2004; Clark et al., 2007; Zhuang et al. 2007) através de uma redução na fosforilação de p38 MAPK na microglia e, por sua vez, redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias e atenuamento da comunicação neurônio-glia (Zhuang et al., 2007). Em contrapartida o estudo de Combadiere e colaboradores demonstraram um acúmulo de microglia hipertrofiada em animais CX_3CR1 KO no espaço

sub-retinal de animais com degeneração macular (Combadiere et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo que mostrou o aumento de células microgliais ativas em animais KO após inflamação muscular. É sabido que a FKN facilita a proliferação de microglia, e é improvável que a proliferação excessiva ocorra na deficiência de CX_3CR1. Por outro lado, a remoção das células da microglia por apoptose ou migração pode ser afetada pela anulação de CX_3CR1. Sugerimos, portanto, que o mecanismo de interação entre FKN-CX_3CR1 ocorre de maneiras distintas nos modelos avaliados e que a via da p38 pode estar envolvida nesta comunicação em diferentes tempos do estudado em nossas análises, no modelo de dor muscular. Ainda sugerimos que a ativação microglial pode ocorrer por via de outras proteinas quinases, como a via ERK. Estudos demonstraram que a ativação de ambas as proteínas ERK e P38 resulta na ativação de fatores de transcrição que medeia uma regulação ascendente de várias moléculas, dentre elas IL-1, TNF, IL-6, IL-18, NO, CX3CL1, CCL2, prostaglandinas e BDNF (McMahon, Malcangio, 2009); Todos as quais são pró-nociceptivas.

Com base nos resultados apresentados e nas amplas evidências reforçamos que as células gliais na medula espinal contribuem para o aumento de dor e hipersensibilidade após diferentes lesões(Scholz, Woolf, 2007; Ren, Dubner, 2010) e que nos modelos apresentados neste trabalho ocorre da mesma forma. Além de glutamato, neurônios espinais e os terminais centrais de aferentes primários liberam quimiocinas como a fractalquina, ativando as células da glia que localizam-se no mesmo microambiente(Milligan et al., 2004; Milligan et al., 2008). Além disso, as células da glia hiperativadas amplificam a excitabilidade neuronal e facilitam a transmissão nociceptiva na medula espinal por meio de liberação de citocinas pró-inflamatórias (DeLeo, Yezierski, 2001; Hansson, Ronnback, 2004; Guo et al., 2007). O aumento da atenção tem sido dado à sinalização neurônio-glia-neurônio como uma força motriz para o desenvolvimento e manutenção da dor persistente (Scholz, Woolf, 2007; Ren, Dubner, 2010) e este estudo suporta a hipótese de que as células da microglia e seus mediadores representam importantes mediadores da miosite aguda à crônica.

A dor aguda e a dor crônica são diferentes entidades clínicas. A dor aguda é provocada por uma doença ou lesão específica, possui uma finalidade biológica útil e está associada ao espasmo do músculo esquelético, à ativação do sistema nervoso simpático e é auto-limitada. A dor crônica, ao contrário, pode ser considerada um estado de doença. É a dor que supera o tempo normal de cura, se associada a uma doença ou lesão. A dor crônica pode surgir de estados psicológicos, não possui fins biológicos e não possui um ponto final reconhecível. A dor aguda e crônica é um enorme problema universal e custa dias de trabalho perdidos por

ano. A terapia da dor aguda visa tratar a causa subjacente e interromper os sinais nociceptivos. A terapia da dor crônica deve depender de uma abordagem multidisciplinar e deve envolver mais de uma modalidade terapêutica (Grichnik, Ferrante, 1991).

O presente estudo torna-se importante, uma vez que as dores musculares representam 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 glias e de mediadores liberados podem contribuir para aperfeiçoar os tratamentos clínicos empregados durante a dor muscular crônica.

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 individuo, do prolongamento da sobrevida 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.

6 CONCLUSÃO

Em síntese, observamos neste trabalho que o processo nociceptivo induzido por miosite aguda ou crônica envolve a participação de uma série de mediadores conhecidos pela participação em outros modelos nociceptivos, mas não frequentemente descritos como fazendo parte dos mecanismos da dor muscular, como exemplo, as células microgliais e os mediadores IL-1b e Fractalquina. Em especial, destaca-se a participação desta última, que demonstrou ser parte do processo inflamatório em modelo agudo induzido pela miosite e que, na ausência da ligação com seu receptor, causa um retardo no desenvolvimento da sensibilização mecânica dos animais.

Além disso, as células da microglia espinais demonstraram ser um importante tipo celular no processamento e manutenção da dor muscular em nossos modelos. Sua inibição, através de um agente farmacológico, foi capaz de reverter totalmente a sensibilidade nociceptiva dos animais na etapa crônica do processo, e, além disso, ficou evidente a sua ativação no processo agudo de sensibilização. O mecanismo pelo qual as células gliais agem no processo de dor vem sendo estudado, e aqui deixamos nossa contribuição para tais esclarecimentos, evidenciando a participação das células da microglia na dor muscular.

A dor muscular, como já descrito anteriormente, é uma dor caracterizada pelo seu difícil tratamento e efeitos adversos quando nos referimos aos fármacos utilizados nos dias de hoje, no entanto, com este trabalho apresentamos as células microgliais como alvos de possíveis estratégias terapêuticas que poderá futuramente auxiliar os pacientes desta condição.

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Janeway CA, Jr. 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.

Ahacic K, Kåreholt I. Prevalence of musculoskeletal pain in the general Swedish population from 1968 to 2002: age, period, and cohort patterns. PAIN. 2010;151:206–14.

Allen Spinal Cord Atlas [Internet]. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science. ©2009. Disponivel em: *http://mousespinal.brainmap.org/imageseries/showref.html*

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

Arendt-Nielsen L, Laursen RJ, Drewes AM. Referred pain as an indicator for neural plasticity. Prog Brain Res. 2000; 129: 343-56.

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

Azevedo LF, Costa-Pereira A, Mendonça L, et al. Epidemiology of chronic pain: a population-based nationwide study on its prevalence, characteristics and associated disability in Portugal. J Pain. 2012;13:773–83.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. Nature. 1997; 385:640-44.

Berberich, P, Hoheisel U, Mense S. Effects of a carrageenan-induced myositis on the discharge properties of group III and IV muscle receptors in the cat, J Neurophysiol, 59 (1988), pp. 1395-1409.

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

Bonica, JJ. The Management of Pain. Lea & Febinger, Philadelphia. 1990; 34.

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.

---

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

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.

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, 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.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. Journal of Neuroscience Methods. 1994; 53: 55-63.

Chen SR, Eisenach JC, Pan HL. Intrathecal S-nitroso-N-acetylpenicillamine and Lcysteine attenuate nerve injury-induced allodynia through noradrenergic activation in rats. Neuroscience. 2000; 101(3): 759-65.

Chen X, Geller EB, Rogers TJ, Adler MW. The chemokine CX3CL1/fractalkine interferes with the antinociceptive effect induced by opioid agonists in the periaqueductal grey of rats. Brain Res. 2007; 1153: 52-57.

Cimmino MA, Ferrone C, Cutolo M. Epidemiology of chronic musculoskeletal pain. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2011;25:173–83.

Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malcangio M. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. Eur J Pain. 2007; 11(2): 223-30.

Clark AK, Grist J, Al-Kashi A, Perretti M, Malcangio M. Spinal cathepsin S and fractalkine contribute to chronic pain in the collagen-induced arthritis model. Arthritis Rheum. 2012; 64:2038-47.

Clark AK, Yip PK, Grist J, Gentry C, Staniland AA, Marchand F, Dehvari M, Wotherspoon G, Winter J, Ullah J, Bevan S, Malcangio M. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104:10655-60.

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.

Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. Circulation. 2003; 107:1009-16.

Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodero M, Pezard A, Lavalette S, Houssier M, Jonet L, Picard E, Debre P, Sirinyan M, Deterre P, Ferroukhi T, Cohen SY, Chauvaud D, Jeanny JC, Chemtob S, Behar-Cohen F, Sennlaub F. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. J Clin Invest. 2007; 117: 2920-28.

Da Silva MD, Bobinski F, Sato KL, Kolker SJ, Sluka KA, Santos ARS. IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. Molecular neurobiology. 2015;51(1):19-31.

de Medinaceli L, DeRenzo E, Wyatt RJ. Rat sciatic functional index data management system with digitized input. Computers and biomedical research. 1984; 17(2): 185-92.

de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. Experimental neurology. 1982; 77(3): 634-43.

DeLeo JA, Yezierski RP. The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. Pain. 2001; 90(1-2): 1-6.

Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. The Journal of Clinical Investigation. 2010;120(11):3760-72.

Fehrenbacher JC, Vasko MR, Duarte DB. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. Curr Protoc Pharmacol. 2012; 05: Unit5.4.

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.

Gordh T, Chu H, Sharma HS. Spinal nerve lesion alters blood-spinal cord barrier function and activates astrocytes in the rat. Pain. 2006; 124(1-2): 211-21.

Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L. Peripheral and central sensitization in musculoskeletal pain disorders: an experimental approach. Curr Rheumatol Rep. 2002; 4(4): 313-21.

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.

Grichnik KP, Ferrante FM. The difference between acute and chronic pain. Mt Sinai J Med. 1991;58(3):217-20.

Grigg P, Schaible HG, Schmidt RF. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. J Neurophysiol. 1986; 55(4): 635-43.

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.

Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, Wei F, Dubner R, Ren K. Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. J Neurosci. 2007; 27(22): 6006-18.

Hansson E, Ronnback L. Altered neuronal-glial signaling in glutamatergic transmission as a unifying mechanism in chronic pain and mental fatigue. Neurochem Res. 2004; 29(5): 989-96.

Hare GM, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, Hunter DA. Walking track analysis: a long-term assessment of peripheral nerve recovery. Plast Reconstr Surg. 1992 Feb;89(2):251-8.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain. 1988; 32: 77-88.

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.

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, Reuter R, de Freitas MF, Treede RD, Mense S. Injection of nerve growth factor into a low back muscle induces long-lasting latent hypersensitivity in rat dorsal horn neurons. Pain. 2013; 154(10): 1953-60.

Hoheisel U, Rosner J, Mense S. Innervation changes induced by inflammation of the rat thoracolumbar fascia. Neuroscience. 2015;300:351-9.

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.

Hughes PM, Botham MS, Frentzel S, Mir A, Perry VH. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. Glia. 2002; 37:314-27.

Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. Nature. 2001; 413(6852): 203-10.

Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. Mol Cell Biol. 2000; 20:4106-14.

Kandell ER, Schwartz JH. Pain and analgesia In: Jessell TM, Kelley KW, editors. Principles of neural science. Norwalk: Appletown & Lange; 1991. p. 385-99.

Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, Park JY, Zhuang ZY, Tan PH, Gao YJ, Roy K, Corfas G, Lo EH, Ji RR. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. Nat Med. 2008; 14(3): 331-6.

Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. Br J Anaesth. 2001; 87(1): 3-11.

Kim KW, Vallon-Eberhard A, Zigmond E, Farache J, Shezen E, Shakhar G, Ludwig A, Lira SA, Jung S.In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. Blood. 2011; 118: 156-67.

Kiyomoto M, Shinoda M, Okada-Ogawa A, Noma N, Shibuta K, Tsuboi Y, Sessle BJ, Imamura Y, Iwata K. Fractalkine signaling in microglia contributes to ectopic orofacial pain following trapezius muscle inflammation. J Neurosci. 2013;33(18):7667-80.

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.

Kumar, S. Biomechanics in Ergonomics. Taylor & Francis, Philadelphia. 1999; 36.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;15(227):680-5.

Larson A, Brown DR, El-Atrash S, Walser MM. Pain threshold changes in adjuvant-induced inflammation: A possible model of chronic pain in the mouse. Pharmacol. Biochem. Behav. 1986; 24: 49–53

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.

Leenaars PP, Koedam MA, Wester PW, Baumans V, Claassen E, Hendriksen CF. Assessment of side effects induced by injection of different adjuvant/antigen combinations in rabbits and mice. Lab Anim. 1998; 32(4): 387-406.

Leung A, Gregory NS, Allen LH, Sluka KA. Regular physical activity prevents chronic pain by altering resident muscle macrophage phenotype and increasing IL-10 in mice. Pain. 2015.

Lindia JA, McGowan E, Jochnowitz N, Abbadie C. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. J. Pain. 2005; 6: 434–38.

Liptan GL. Fascia: A missing link in our understanding of the pathology of fibromyalgia. J Bodyw Mov Ther. 2010;14(1):3-12.

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.

Lowdon IMR, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurement of the sciatic functional index of de Medinaceli. Journal of neuroscience methods. 1988; 24(3): 279-81.

Luber-Narod J, Kage R, Leeman SE. Substance P enhances the secretion of tumor necrosis factor-alpha from neuroglial cells stimulated with lipopolysaccharide. J Immunol. 1994; 152(2): 819-24.

Lyons A, Lynch AM, Downer EJ, Hanley R, O'Sullivan JB, Smith A, Lynch MA. Fractalkine induced activation of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway attentuates microglial activation in vivo and in vitro. J Neurochem. 2009;110:1547-56.

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.

Martin FC, Charles AC, Sanderson MJ, Merrill JE. Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. Brain Res. 1992; 599(1): 13-8.

McMahon SB, Malcangio M. Current challenges in glia-pain biology. Neuron. 2009; 64: 46-54.

Mense S, Meyer H. Bradykinin-induced modulation of the response behaviour of different types of feline group III and IV muscle receptors, J Physiol. 1988; 398: 49-63.

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: 2775-82.

Milligan ED, Sloane EM, Watkins LR. Glia in pathological pain: a role for fractalkine. J Neuroimmunol. 2008; 198(1-2): 113-20.

Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. Journal of Neuroscience. 2003; 23(3): 1026-40.

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.

Miranda H, Kaila-Kangas L, Heliövaara M, et al. Musculoskeletal pain at multiple sites and its effects on work ability in a general working population. Occup Environ Med. 2010; 67: 449–55.

Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. Brain Res. 2003; 979: 65-70.

Molander C, Xu Q, Grant G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. J Comp Neurol. 1984; 230(1): 133-41

Montague K, Malcangio M. The therapeutic potential of targeting chemokine signalling in the treatment of chronic pain. J Neurochem. 2017; 141(4): 520-31.

Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: A review. Veterinarni Medicina. 2013; 58: 187–205

Nieto FR, Clark AK, Grist J, Hathway GJ, Chapman V, Malcangio M. Neuron-immune mechanisms contribute to pain in early stages of arthritis. J Neuroinflammation. 2016; (1): 96.

Nishiyori A, Minami M, Ohtani Y, Takami S, Yamamoto J, Kawaguchi N, Kume T, Akaike A, Satoh M. Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? FEBS Lett. 1998; 429: 167-72.

Old EA, Nadkarni S, Grist J, Gentry C, Bevan S, Kim KW, Mogg AJ, Perretti M, Malcangio M. Monocytes expressing CX3CR1 orchestrate the development of vincristine-induced pain. J Clin Invest. 20014; 124: 2023–36.

Park HJ, Kim IT, Won JH, Jeong SH, Park EY, Nam JH. Anti-inflammatory activities of ent-16alphaH,17-hydroxy-kauran-19-oic acid isolated from the roots of Siegesbeckia pubescens are due to the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via NF-kappaB inactivation. Eur J Pharmacol. 2007; 558: 185–93.

Park H, Kim YH, Chang HW, Kim HP. Anti-inflammatory activity of the synthetic C-C biflavonoids. J Pharm Pharmacol. 2006; 58(12): 1661-7.

Perl ER, Kumazawa T, Lynn B, Kenins P. Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers, Prog Brain Res, 1976; 43: 263-77.

Posadas I., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L., Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. Br. J. Pharmacol. 2004; 142: 331–338.

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: Livingstone C, editor. Textbook of pain. London; 1999; 1-50.

Ren K, Dubner R. Inflammatory models of pain and hyperalgesia. ILAR Journal. 1999; 40(3): 111-18.

Ren K, Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. Nat Med. 2010; 16(11): 1267-76.

Rexed, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. Journal of Comparative Neurology. 1952; 96: 415-95.

Rosa AS, Freitas MF, Rocha IR, Chacur M. Gabapentin decreases microglial cells and reverses bilateral hyperalgesia and allodynia in rats with chronic myositis. Eur J Pharmacol. 2017; 799: 111-17.

Rosenberg NL, Ringel SP, Kotzin BL. Experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. Clin Exp Immunol. 1987; 68(1): 117-29.

Schoenen J, Faull RLM. Spinal cord: Cito-and Chemoarchitecture. In Paxinos G Mai JK Eds. The Human Nervous System. 2nd Ed. San Diego; Elsevier Academic Press. 2004: 190-232.

Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. Nat Neurosci. 2007; 10(11): 1361-8.

Schomburg ED, Steffens H, Pilyavskii AI, Maisky VA, Bruck W, Dibaj P, Sears TA. Long lasting activity of nociceptive muscular afferents facilitates bilateral flexion reflex pattern in the feline spinal cord. Neurosci Res. 2015; 95: 51-8.

Schreiber KL, Beitz AJ, Wilcox GL. Activation of spinal microglia in a murine model of peripheral inflammation-induced, long-lasting contralateral allodynia. Neurosci Lett. 2008; 440: 63–7

Shir Y, Seltzer Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. Neurosci. Lett. 1990; 115: 62–7

Sidman RL, Angevine, JB, Pierce ET. Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord. The Quarterly Review of Biology. 1972; (1): 121-22.

Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry. New York; 1981; 859.

Staniland AA, Clark AK, Wodarski R, Sasso O, Maione F, D'Acquisto F, Malcangio M. Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. J Neurochem. 2010; 114(4): 1143-57.

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.

Stills HF, Jr. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. ILAR J. 2005; 46(3): 280-93.

Sun JL, Xiao C, Lu B, Zhang J, Yuan XZ, Chen W, Yu LN, Zhang FJ, Chen G, Yan M CX3CL1/CX3CR1 regulates nerve injury-induced pain hypersensitivity through the ERK5 signaling pathway. J Neurosci Res. 2013; 91: 545-553.

Suzuki F, Nanki T, Imai T, Kikuchi H, Hirohata S, Kohsaka H, Miyasaka N. Inhibition of CX3CL1 (fractalkine) improves experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. J Immunol. 2005; 175(10): 6987-96.

Tarozzo G, Bortolazzi S, Crochemore C, Chen SC, Lira AS, Abrams JS, Beltramo M Fractalkine protein localization and gene expression in mouse brain. J Neurosci Res. 2003; 73: 81-8.

Teixeira MJ, Osaka M. História da Dor. São Paulo, Brasil: Casa Leitura Médica. 2010; 54.

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, Keinanen 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.

Urban MO, Gebhart GF. Supraspinal contributions to hyperalgesia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(14): 7687-92.

Vega-Avelaira D, Ballesteros JJ, Lopez-Garcia JA. Inflammation-induced hyperalgesia and spinal microglia reactivity in neonatal rats. Eur J Pain. 2013; 17(8): 1180-8.

Verge GM, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, Foster AC. (2004) Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. Eur. J. Neurosci. 2004; 20: 1150–60.

Walder RY, Rasmussen LA, Rainier JD, Light AR, Wemmie JA, Sluka KA. ASIC1 and ASIC3 Play Different Roles in the Development of Hyperalgesia Following Inflammatory Muscle Injury. The journal of pain : official journal of the American Pain Society. 2010; 11(3): 210-18.

Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, Heise C. Atlas of the mouse spinal cord. A Cristopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas. San Diego; Elsevier. 2008; 308-79.

Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. Adv Exp Med Biol. 2003; 521: 1-21.

Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(14): 7723-30.

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.

Yang JL, Xu B, Li SS, Zhang WS, Xu H, Deng XM, Zhang YQ. Gabapentin reduces CX3CL1 signaling and blocks spinal microglial activation in monoarthritic rats. Mol Brain. 2012; 5: 18

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 U S A. 1999; 96(23): 13496-500.

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.

Zhao XH, Zhang T, Li YQ. The up-regulation of spinal Toll-like receptor 4 in rats with inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant. Brain Res Bull. 2015; 111: 97-103.

Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, Ji RR. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury induced cleavage of fractalkine. Brain Behav. Immun. 2007; 21:642-51.

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

ANEXO

A - BOLSA DE ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR (PDSE)

Prof[a]. Marzia Malcangio
Neuropharmacology Professor
Wolfson CARD (Centre for Aged-Related Diseases)
King's College London
London. United Kingdom

Programa de Doutorado-Sanduíche no Exterior (PDSE)
Período de 08/010/2015 a 08/09/2016

Objetivo geral

Avaliar as alterações microgliais em animais transgênicos, com deleção do receptor de Fractalquina em modelos de dor inflamatória.

Objetivos específicos

• Análise do comportamento animal frente a dois modelos inflamatórios
• Análise da atividade microglial
• Análise da diferença sexual nestes modelos;

Wolfson CARD

Dr Marzia Malcangio
Professor of Neuropharmacology
Telephone: 0207 848 6092
Facsimile: 0207 848 6165
Email: marzia.malcangio@kcl.ac.uk

KING'S College LONDON

The Wolfson Wing
Hodgkin Building
Guys Campus
London SE1 1UL

London 16th December 2016

Dear Sir/Madam,

RE: Miss Milena Freitas

I have met Milena at the IASP meeting in Buenos Aires in October 2014 where we talked about her desire to join my lab in London. Milena has been very active during her application process and she updated me efficiently and timely. and she updated me efficiently and timely. She used to contact me with specific questions and forms which were easy to complete.

Milena's application for funding was successful and she received financial support from CAPES in Brazil. Milena joined us in October 2015 for a year and has been working on her project entitled: Role of microglia, inflammatory cytokines and chemokine in muscle pain model. Milena has performed immunohistochemical studies here in London and has gained confidence in experiment design, immunochemistry, image analysis, statistical analysis, along with writing and presentation skills.

In my laboratory she has specifically worked with CX3CR1 knockout mice to investigate the involvement of Fractalkine in two models of inflammatory pain. Milena has completed the experiments she proposed in time an obtained important results for her project. Also, she studied the importance of the differences between males and females in her models.

Milena has worked on her project with competence and has quickly gained his fellow colleagues' respect. Milena reads assiduously in maintaining her knowledge of her intimate field but is also driven to read by curiosity about more general areas of neuroscience. Indeed, Milena has presented at a journal club showing ability to integrate information which reflect on her work.

Milena has also sent an application to the European Pain School 2016, that was successfully accepted and enabled her to be part of this summer school. There she had present her results at my laboratory and discuss about it afterwards. Milena completed her task at the Pain School greatly and came back to us with more ideas for her project.

Milena is a pleasant person, easy to interact with, and active in maintaining good relationship with other colleagues in the laboratory. I believe Milena has gained experience and shared hers with my research group. The collaboration established has a great value for both our research groups and I am looking forward to keep this productive working relationship in the future.

Sincerely yours,