

Milena Fernandes de Freitas

**Avaliação do envolvimento de células microgлияis 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

RESUMO

Freitas, MF. Avaliação do envolvimento de células microgлияis 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 algico 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-1 β 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 microgлияis, 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 microgлияis 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 an 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-1 β 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. Allodynia. Glial cells. Interleukins. Fractalkine.

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 nociceção são caracterizadas como fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, denominadas fibras C e A δ . 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 A δ 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 A δ , 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 diencefalo (Millan, 1999). Dentre as principais projeções supraespinais da via nociceptiva estão os tratos espinomesencefálico, espinoreticular, espino-hipotalâmico e espinotalâmico, sendo este último o mais proeminente na condução do impulso nocivo (Kandell, Schwartz, 1991) (Figura 1).

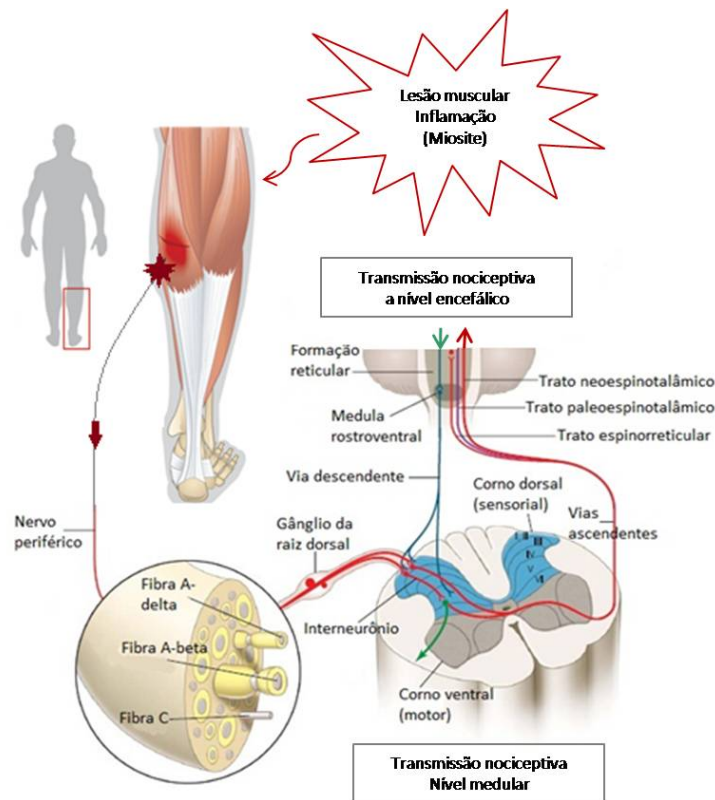


Figura 1 - Modelo de transmissão nociceptiva. A estimulação das fibras do tipo C, por lesão muscular produz dor espontânea e/ou dor provocada por toques leves no local da lesão (hiperalgesia primária). Quando ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, os nociceptores conduzem impulsos aferentes na direção da medula espinhal, através de diferentes fibras (A- δ delta, A-beta ou C). A coluna posterior (ou corno dorsal) da medula espinhal 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 experienciou ou ainda vai experienciar 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 tiveram 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, fibras e cada célula muscular individualmente. Esse tecido conectivo está ligado aos músculos e se estende para tendões e perióstio. 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). Esta 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 completa 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 da fibra aferente nociceptiva 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 periféricamente provoca a liberação local de mediadores inflamatórios 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 emulsificada 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 um único nociceptor 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 PGE₂ (Perl et al., 1976). Histamina e serotonina aumentam a excitabilidade mecânica de fibras mielinizadas da pele, enquanto que PGE₂ 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 (TNF α) no efeito nociceptivo induzido pela injeção de CFA no músculo gastrocnêmio de ratos, mimetizando um modelo de neurite 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 células 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; Ledebner 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-1 β (IL-1 β) e TNF α , 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 algícas 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 TNF α , 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 TNF α no músculo esquelético pode induzir a ativação de receptores para TNF α e/ou estimular a produção de outras citocinas pró-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 mioosite crônica (Hoheisel et al., 1998). Além disso, a mioosite 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 CX₃CL1, 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 CX₃C, 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, CX₃CR1 (Kim et al., 2011). Atualmente é sabido que os neurônios são as células que mais expressam a FKN em comparação 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 CX₃CR1 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 algôgenicos, 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.

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. Disponível 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.html

- 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, Yeziarski 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 attenuates 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. *Veterinari 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-16 α H,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- κ B 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

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.
- Taves S, Berta T, Liu DL, Gan S, Chen G, Kim YH, Van de Ven T, Laufer S, Ji RR. Spinal inhibition of p38 MAP kinase reduces inflammatory and neuropathic pain in male but not female mice: Sex-dependent microglial signaling in the spinal cord. *Brain Behav Immun.* 2016; 55: 70-81.
- 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.
- Wolf 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.