



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



BEATRIZ BOTASSO GOMES

**"HIPERALGESIA MUSCULAR PERSISTENTE: CARACTERIZAÇÃO DO
ENVOLVIMENTO DE CÉLULAS DA GLIA, RECEPTORES P2X4, P2X7 E
PPAR γ "**

LIMEIRA
2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Aplicadas



BEATRIZ BOTASSO GOMES

"Hiperalegsia muscular persistente: caracterização do envolvimento de células da glia, receptores P2X4, P2X7 e PPAR γ "

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo na área de Ciências do Esporte.

***Orientador(a):* Prof(a). Dr(a). Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO(A) ALUNO(A) BEATRIZ BOTASSO GOMES E
ORIENTADA PELO(A) PROF.(A). DR(A). MARIA CLÁUDIA GONÇALVES
DE OLIVEIRA FUSARO

LIMEIRA
2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Ana Luiza Clemente de Abreu Valério - CRB 8/10669

G585h Gomes, Beatriz Botasso, 1996-
Hiperalgnesia muscular persistente : caracterização do envolvimento de células da glia, receptores P2X4, P2X7 e PPAR-gama / Beatriz Botasso Gomes. – Limeira, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Neuroglia. 2. Exercícios físicos. 3. Hiperalgnesia. I. Fusaro, Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Persistent muscle hyperalgnesia : characterization of involvement of glial cells, P2X4, P2X7 and PPAR-gamma

Palavras-chave em inglês:

Neuroglia

Exercise

Hyperalgnesia

Área de concentração: Ciências do Esporte

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro [Orientador]

Marciane Milanski Ferreira

Diogo Francisco da Silva dos Santos

Data de defesa: 09-03-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0178-857>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8050536732622766>

Folha de Aprovação

Autor(a): Beatriz Botasso Gomes

Título: Hiperalegisia muscular persistente: caracterização do envolvimento de células da glia, receptores P2X4, P2X7 e PPAR γ

Natureza: Dissertação

Área de Concentração: Ciências do Esporte

Instituição: Faculdade de Ciências Aplicadas – FCA/Unicamp

Data da Defesa: Limeira-SP, 09 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr(a). Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro (orientador)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr(a). Marciane Milanski Ferreira (membro)
Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/Unicamp

Prof. Dr. Diogo Francisco da Silva dos Santos (membro externo)
Universidade de Pittsburgh

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Costumo ser muito reclamona e só nesses momentos quando paro para refletir sobre o que e a quem agradecer que percebo o quão abençoada, privilegiada e sortuda eu sou. Tenho muito a agradecer.

Primeiramente a Deus, Nossa Senhora, Santa Rita de Cássia e todos os outros santos que fiz promessa para conseguir finalizar o mestrado, apelei pra geral do céu e sempre fui atendida. Amo acreditar que existe uma força maior que zela e cuida de mim. Valeu, Deus! Te devo mais uma!

Aos meus pais que são tudo e mais um pouco pra mim, sem eles obviamente não teria conseguido, eles acreditam fielmente em mim e me apoiam muito, meu maior desejo é que um dia eu retribua pelo menos um pouco de tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos familiares mais próximos: minha vó que ligou pro padre na tv fazer oração ao vivo para eu passar na prova do mestrado, a minha tia bé que sempre me ajuda, a fran e a franchisesca que sempre se fazem presente, meu irmão que do jeito dele torce muito por mim já que ele fala pra todo mundo que tem uma irmã doutora, então se eu não for doutora ele sai de mentiroso.

Aos meus amigos, que são uma verdadeira família. Arianne e Juliana estão comigo desde a primeira série e eu não lembro como era a vida antes delas. São tudo pra mim. As pessoas que estão comigo em qualquer situação, me apoiam e são meu porto seguro. Certa vez me falaram sobre a necessidade de ter uma âncora na vida para aquelas situações que ficamos a deriva, sabe? Então, elas são as minhas âncoras. São os amores da minha vida e peço pra que Deus conserve elas na minha vida pra todo sempre. A vida mesmo quando parece insuportável é melhor com elas. A Thainá que apesar dos comentários dela pós desabafos se basearem em “difícil” “complicado” sempre se faz presente e nunca me deixa desistir e cada vez mais se torna figura fundamental na minha vida. Hayla, que era colega distante de laboratório (por minha causa), virou colega próxima, amiga e agora é uma irmã. Conto tudo pra ela, ela me ajuda em absolutamente tudo e considero ela um presente de Deus na minha vida. Esse

agradecimento ficaria muito melancólico se eu contasse uma parte de tudo que ela representou pra mim durante esse período do mestrado, mas uma coisa é certa, se não fosse ela na minha vida, eu não estaria escrevendo esses agradecimentos. Obrigada universo, Deus por ter colocado essa doida na minha vida. Gustavo, Marroni, Carrapicho, Vitão, Mariane, Samara, Lari, Ana, Maria Luísa, Rosana, tornam minha vida mais leve diariamente e fazem parte dessa conquista.

Aos professores da FCA, que sempre são muito solícitos e dispostos a nos ajudar. Em especial, a professora Adriana Torsoni que foi minha supervisora no PED e fez com que eu visse a docência com outros olhos, graças a essa experiência hoje eu tenho outra visão do 'ser professora'. E aos professores que aceitaram ser banca desse trabalho, obrigada por participarem desse momento tão importante para mim.

A todos os funcionários da FCA, da segurança a faxina, que tornam nosso dia a dia bem melhor.

A todos os animais utilizados nesse estudo.

Ao LABEDI, que é minha casa há 7 anos. A todos que passaram por lá: Bruna e Diogo, tiveram paciência pra ensinar a IC manusear os animais, coletar e fazer as demais atividades. Sempre vou ser grata. A Carolina que é a definição de coração, sempre me ajudou em tudo, parceira nos perrengues do dia a dia do lab e saudade de fazer festa de pequenas coisas, como montar um descarpack. A Graciana que tem minha gratidão eterna, me pegou pela mão desde o primeiro dia de lab, me ensinou absolutamente tudo, me ajudou em absolutamente tudo, é meu exemplo de ser humano e cientista. A gra mudou minha vida, se hoje eu tenho a possibilidade de ser mestra é porque ela me apresentou a ciência com os olhos dela e me apaixonei. E que sorte a minha em ter tido a gra como coorientadora por tanto tempo. Na verdade, é uma grande sorte ter a gra na vida.

A minha orientadora, Maria Cláudia, uma das pessoas que mais admiro na vida. Meu mestrado não foi um período pessoalmente fácil e afetou bastante o profissional, mas ela não me deixou desistir, me deu suporte e coragem para

seguir e conseguir. Chamo ela de chefe, chefinha, mas na verdade ela cumpre com maestria o papel de orientadora. Suas instruções para que eu seja uma pesquisadora ética, inteligente e de sucesso, refletem amplamente no meu pessoal e tenho me tornado aos poucos um ser humano melhor. Costumo dizer que ela é uma das poucas escolhas certas que já fiz na vida, uma das únicas que não me arrependo. Temos um doutorado ainda pela frente, mas por tudo que ela representa pra mim até aqui já é o suficiente para uma vida inteira de gratidão. Prometo que ainda darei muito orgulho para ela e que lembraremos dos períodos difíceis do mestrado rindo muito como uma lembrança distante.

E sendo bem sincera, agradeço a mim também por não ter desistido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001” e Processo nº 17/17919-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

EPÍGRAFE

*“Quero, terei;
Se não aqui;
Noutro lugar que ainda não sei.
Nada perdi;
Tudo serei”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Apesar da relevância clínica das dores musculares crônicas, os mecanismos subjacentes à sua cronificação ainda não estão completamente elucidados. Sabe-se que a modulação da dor pode ocorrer nível sistema nervoso periférico e sistema nervoso central, sendo que a medula espinhal é o local de transmissão da dor da periferia para o sistema nervoso superior, que pode sofrer influência das células ao seu redor de modo a modificar a comunicação sináptica, assim podendo induzir uma potencialização da dor. As células da glia, principalmente astrócitos e micróglias do corno dorsal da medula espinhal, desempenham um importante papel no sistema imunológico no sistema nervoso central e são associadas a diversas condições dolorosas crônicas. A expressão de receptores P2X4 e P2X7 em neurônios sensoriais e micróglias estão sendo amplamente investigados no contexto do desenvolvimento e manutenção da dor crônica. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o exercício físico é capaz de ativar receptores PPAR γ em células do sistema imune periférico de modo a modular o desenvolvimento da hiperalgesia persistente. Além disso, os receptores PPAR γ da medula espinhal estão envolvidos no processo de modulação de dores crônicas. Sendo assim, utilizando um modelo de hiperalgesia persistente que mimetiza um cenário onde ocorre a cronificação da dor, investigamos o envolvimento de astrócitos, micróglias, receptores P2X4, P2X7 e PPAR γ na fase de cronificação da dor. O presente estudo demonstrou que micróglias e astrócitos participam da indução e manutenção da dor no modelo de hiperalgesia muscular persistente. Em relação a participação dos receptores purinérgicos, P2X4 e P2X7, foi encontrado envolvimento desses receptores na fase aguda e persistente da hiperalgesia muscular. Além disso, foi visto que os receptores PPAR γ , ativados via exercício físico, também participam de ambas as fases da hiperalgesia muscular persistente.

Palavras-Chave: Hiperalgesia Muscular, Células da glia, Receptores purinérgicos, PPAR γ

ABSTRACT

Despite the clinical relevance of chronic muscle pain, the mechanisms underlying its chronicity are still not fully elucidated. It is known that pain modulation can occur at the peripheral nervous system and central nervous system levels, and the spinal cord is the site of pain transmission from the periphery to the superior nervous system, which may be influenced by the cells around it in a way to modify synaptic communication, thus being able to induce pain enhancement. Glial cells, primarily spinal cord dorsal horn astrocytes and microglia, play an important role in the immune system in the central nervous system and are associated with a number of chronic painful conditions. The expression of P2X4 and P2X7 receptors on sensory neurons and microglia is being widely investigated in the context of the development and maintenance of chronic pain. Recently, our research group demonstrated that physical exercise is capable of activating PPAR γ receptors in peripheral immune system cells in order to modulate the development of persistent hyperalgesia. In addition, spinal cord PPAR γ receptors are involved in the modulation process of chronic pain. Therefore, using a persistent hyperalgesia model that mimics a scenario where pain chronicity occurs, we investigated the involvement of astrocytes, microglia, P2X4, P2X7 and PPAR γ receptors in the chronic pain phase. The present study demonstrated that microglia and astrocytes participate in pain induction and maintenance in the persistent muscle hyperalgesia model. Regarding the participation of purinergic receptors, P2X4 and P2X7, involvement of these receptors was found in the acute and persistent phase of muscle hyperalgesia. Furthermore, it was seen that PPAR γ receptors, activated via physical exercise, also participate in both phases of persistent muscle hyperalgesia.

Key words: Muscle Hyperalgesia, Glial Cells, Purinergic Receptors, PPAR γ

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Dor Crônica	14
1.2 Micróglias, Astrócitos e Dor Crônica	16
1.3 Receptores purinérgicos – P2X4 e P2X7	20
1.4 Hipoalgesia induzido pelo exercício	22
1.5 Receptores PPAR γ e exercício	24
2. OBJETIVO GERAL	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Quantificação da hiperalgesia muscular	27
3.3 Modelo de hiperalgesia muscular persistente	27
3.4 Administração intramuscular de drogas	28
3.5 Administração intratecal de drogas	28
3.6 Natação	29
3.7 Análise Estatística	30
4. RESULTADOS	30
4.1 Envolvimento de micróglias no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente	30
4.2 Envolvimento de astrócitos no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente	33
4.3 Envolvimento de receptores P2X4 do corno dorsal da medula espinhal no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente	35
4.4 Envolvimento de receptores P2X7 do corno dorsal da medula espinhal no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente	37
4.5 Envolvimento de receptores PPAR γ ativados pelo exercício físico no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

Desde o período 800 a.C encontra-se relatos sobre dor, nos clássicos de Homero *Ilíada* e *Odisseia*, onde a personagem relata o uso de ópio para diminuir a dor (Rey,1993); e até a idade média muitas especulações a respeito do que era dor foram feitas, tais como: o coração sendo o centro de processamento da dor, o cérebro considerado o local onde a dor era sentida, a descrição dos cinco sinais cardinais da inflamação e a dor sendo considerada um castigo divino e uma prova de fé (Chen, 2011; Roby, 2016, Meldrum, 2011). No período renascentista começa a realização de autópsias e com isso a ideia de que o cérebro era o local onde a dor era interpretada ganhou força e foi estudada principalmente por Rene Descartes, o qual descrevia que o impulso doloroso era conduzido por uma via nervosa única “esticada por uma corda” que acionaria um “sino” (glândula pineal) no cérebro alertando sobre o risco de lesão tecidual (Moayedi e Davis, 2013) (Figura 1).

Figura 1 – Teoria da dor descrita por Descartes:



Fig 1. A imagem ilustra a via que Descartes descrevia. O ponto A representa o fogo, que em contato com a superfície do pé (B) se moviam pressionando a pele e puxando a fibrila (C) abrindo o poro onde termina a fibrila (D e E). Abrir o poro é semelhante a puxar uma corda presa a um sino, fazendo-o tocar. O poro aberto permite que os “espíritos animais”

fluissem da cavidade (F) para a fibrila; parte deles ativando os músculos para afastar o pé do fogo, parte deles ativando os músculos para virar os olhos e a cabeça em direção ao fogo para olhá-lo, e parte deles utilizada para trazer as mãos para protegê-lo. A imagem é reproduzida de Descartes (1664), fora dos direitos autorais; e o texto adaptado de: M. Moayedi e Davis, 2013.

Então, os conceitos de dor foram se modificando conforme o avanço da medicina e da ciência, em torno da comunicação periferia e cérebro. De 1800 até os dias atuais muitas teorias foram investigadas e trouxeram a luz novas possibilidades sobre o funcionamento da via dolorosa, entre elas a de Ronald Melzack que após se aprofundar nas teorias já existentes, nos trouxe uma proposta que descreveu as percepções sensoriais de um indivíduo como sendo baseadas em uma rede neuronal, compartilhada em vários locais do cérebro, conectadas entre si, além de serem determinada pela genética e sofrerem influência das vivências pessoais de cada indivíduo (Bell, 2018; Mendell, 2014). Por meio dessas ideias, a IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) segue discutindo a definição de dor que pode contemplar todas as vertentes envolvidas no contexto da condição dolorosa e atualmente essa definição é: “A dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial.”

Ainda assim, sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos no processamento da dor sabe-se que há ativação de diversas vias de sinalização neuronais dentro do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (Argoff, 2011). Sendo assim, o processamento começa através da ativação dos nociceptores, que são terminações nervosas livres dos neurônios de primeira ordem que se projetam de tecidos incluindo pele, musculo, articulações e visceras para a medula espinhal (Bell, 2018).

A ativação dos nociceptores se dá através de estímulos específicos na periferia e após sua ativação transmitem as informações através de um neurotransmissor excitatório, o glutamato (Voscopoulos e Lema, 2010). Além disso, ocorre a liberação de substâncias, como: globulinas e proteínas quinases, que quando liberadas do tecido podem produzir dor ativamente (Dubin e Patapoutian, 2010). O ácido araquidônico após liberado é convertido em

prostaglandinas e bloqueiam o efluxo de K^+ dos nociceptores, aumentando sua excitabilidade (Grace et al., 2014, Voscopoulos e Lema, 2010). Ocorre também liberação de histamina através dos mastócitos e do fator de crescimento do nervo (NGF) que influenciam na hiperexcitabilidade neuronal, reduzindo o limiar de ativação dos nociceptores e consequentemente resultando na transmissão da informação nociceptiva para o corno dorsal da medula espinhal, onde ocorre a primeira sinapse do neurônio aferente primário, a modulação e a integração de informações sensoriais antes de serem projetadas para o cérebro (Mense, Gerwin, 2010).

Na medula espinhal encontra-se uma importante divisão em lâminas, na qual a região do corno dorsal recebe a maior parte das aferências nociceptivas, nessa região há quatro componentes neurais básicos: terminais centrais de neurônios aferentes primários, interneurônios excitatórios e inibitórios, neurônios de projeção e axônios modulatórios descendentes (Todd, 2010). Sendo assim, a medula espinhal é uma importante estrutura envolvida no processamento da dor, uma vez que o estímulo nociceptivo é transmitido através dela para os centros superiores, onde ocorre a percepção dolorosa em si, para isso, os neurônios de projeção nociceptiva que estão concentrados principalmente na lamina I e espalhados pelas lâminas III-IV, ascendem para os tratos da substância branca espinhal e inerva várias núcleos talâmicos e o tronco encefálico. O tronco encefálico e os núcleos talâmicos que recebem projeções incluem: a medula ventrolateral, medula ventromedial, núcleo parabraquial, substância cinzenta periaquedutal, núcleo do trato solitário e o tálamo. Acredita-se que cada uma dessas áreas codifica dimensões específicas da experiência de dor, de modo que a medula ventrolateral e a substância cinzenta periaquedutal juntamente com outras áreas do tronco cerebral controlam poderosos estímulos descendentes para a medula espinhal; o núcleo parabraquial está relacionado aos componentes afetivo da dor, pois há uma conexão com a amígdala e o hipotálamo, enquanto o tálamo é associado aos aspectos discriminatórios da dor devido às suas conexões com o córtex somatossensorial. Por isso, a dor é uma condição multifatorial e completamente individual (Renn e Dorsey, 2005; Todd, 2010; Dinakar e Stillman, 2016)

1.1 Dor Crônica

A dor aguda é causada por estímulos nocivos e mediada através do processo de nocicepção, tem como objetivo prevenir danos graves ao organismo, sendo considerada um mecanismo de proteção. No entanto, a dor crônica pode ser definida como a dor que persiste além do tempo normal de cicatrização do tecido, na ausência de estímulos nociceptivos ou que é desproporcional à lesão e é considerada uma patologia de difícil tratamento. (Skaper et al. 2017), além de ser uma experiência sensorial e emocional complexa que varia amplamente entre as pessoas, dependendo do contexto e do significado da dor e do estado psicológico da pessoa.

As dores crônicas possuem uma alta prevalência, somando-se mais de 100 milhões de americanos acometidos pela doença, enquanto no Brasil foi visto que 28% da população apresenta algum tipo de dor muscular, sendo que, em 63% dos casos, a dor é classificada como crônica (IBOPE 2015). Apesar da sua alta prevalência não só no Brasil, mas no mundo, as dores crônicas não são tratadas adequadamente. Estima-se sucesso em torno de apenas 30% dos casos (Borsook et al., 2011).

As condições dolorosas crônicas possuem natureza variável, por isso o processo de transição de dor aguda para crônica não é completamente compreendido, no entanto, sabe-se que a habilidade de desenvolver plasticidade do SNC, como observado nos processos de sensibilização periférica e central, e as mudanças funcionais e estruturais nas vias da dor desempenham um papel importante no desenvolvimento da dor crônica (Pozek et al., 2016).

A sensibilização periférica é a responsável pela sensibilização inicial dos nociceptores. Após a lesão tecidual, as terminações nervosas livres dos nociceptores são ativadas através da liberação de mediadores inflamatórios liberados pelo tecido lesionado (Bradicinina, prostaglandinas, Óxido Nítrico, histamina, 5-HT, Acetilcolina, H^+ and K^+), das células do sistema imune (IL-1 β e TNF- α , NGF), substâncias liberadas pelas próprias fibras nervosas (Substância P, BDNF, CGRP). A maioria desses mediadores atua, principalmente, por meio de receptores metabotrópicos, acoplados a proteína G, e receptores tirosina-quinase. Esses receptores além de ativarem os nociceptores, induzem a fosforilação de receptores e canais iônicos, levando a uma redução do limiar de

ativação dos nociceptores, resposta aumentada a estimulação, modificações de permeabilidade, ativação espontânea e prolongada de terminações nervosas livres e mudanças na expressão gênica. Esse conjunto de alterações interferem de maneira significativa na transmissão do sinal doloroso, levando a uma resposta exagerada do estímulo nociceptivo (Voscopoulos e Lema, 2010, Wieseler-Frank et al., 2005, Grace et al., 2014)

A contínua transmissão de sinais dolorosos da periferia induz uma condição de sensibilização central. A liberação de neuropeptídeos como a substância P e o glutamato, interagem com os receptores de membrana neuronal induzindo a diminuição do limiar do potencial de ação dos neurônios de segunda ordem no corno dorsal. Além disso, ocorre uma redução na resposta descendente inibitória, devido a redução de GABA, ocasionando em hiperexcitabilidade neuronal. Os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) desempenham um papel crucial na sensibilização central, uma vez que estados de dor persistente estimulam uma regulação positiva desses receptores, assim facilitando a transmissão dos sinais ascendentes de dor com estímulo sublimiar, ou seja, estímulos com intensidades menores que o limiar, como toque leve e pressão evocam sensações dolorosas (Mifflin e Kerr, 2014; Pak et al., 2018 Pace et al., 2018).

Dessa forma, sabendo da importância de ambos os processos de sensibilização e devido a observações clínicas de que alguns tipos de dores crônicas como: síndrome da dor regional complexa tipo I, transtornos de estresse ocupacional repetitivo, podem ser iniciados através de um ou mais episódios de dor aguda transiente, foi desenvolvido um modelo que mimetiza os mecanismos relacionados a manutenção da dor crônica e os da dor aguda antecedente, de maneira isolada. O modelo foi desenvolvido inicialmente em tecido subcutâneo (Aley et al. 2000) e em seguida, no tecido muscular (Dina, Levine, and Green 2008) utilizando uma dose baixa do agente inflamatório, carragenina, que ocasionou uma hiperalgesia aguda e inflamação de curta duração, que se solucionou dentro de 4 dias. No entanto, quando a mesma região recebe um novo estímulo inflamatório, mesmo de um produto da inflamação que se administrado em um animal *naïve* ocasionaria apenas uma resposta dolorosa de poucas horas, como a Prostaglandina E2, é observado um aumento na

magnitude da hiperalgesia mesmo após semanas da resolução da inflamação inicial. Essa susceptibilidade latente em desenvolver uma hiperalgesia de longa duração mesmo após semanas do estímulo inicial é conhecido como Priming Hiperalgésico.

Figura 2 – Modelo de hiperalgesia persistente:

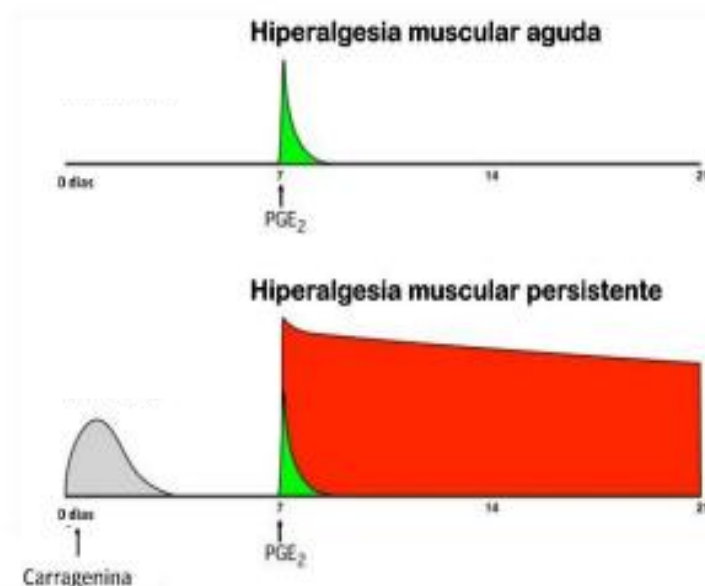


Fig 2. A injeção de carragenina na pata dos animais causa hiperalgesia transitória, com resolução em poucos dias. A injeção de PGE_2 no mesmo local induz hiperalgesia persistente. Adaptado de: Reichling e Levine, 2010

As investigações em torno dos mecanismos subjacentes ao Priming Hiperalgésico permite o estudo da plasticidade nas vias de sinalização em resposta ao mesmo estímulo. Além disso, traz a possibilidade de descobrir as estruturas que possam participar do processo de sensibilização periférica e central.

1.2 Micróglias, Astrócitos e Dor Crônica:

Nas últimas duas décadas tem sido identificadas mudanças celulares e moleculares na medula espinhal e no cérebro que podem ser consideradas cruciais no processo de transição de dor aguda para crônica (Coddou, et al., 2020). Modelos de dor inflamatória (Chacur et al., 2004), neuropática (Hains and Waxman, 2006; Raghavendra, et al., 2003, Zhang et al., 2003) e de câncer (Zhang et al., 2005), tem demonstrado a importância da glia reativa no processo

de cronificação da dor. As células da glia são classificadas principalmente em três populações: astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, sendo as micróglia e os astrócitos as células não neuronais mais estudadas no âmbito da dor crônica nos últimos anos (Coddou, et al., 2020).

As micróglia são células especializadas responsáveis pela fagocitose no SNC e constituem cerca de 5-20% de toda a população de células da glia (Saijo e Glass, 2011). Dentro de condições fisiológicas a micróglia desempenha diversas funções além de seu papel fagocítico, sendo elas: o monitoramento de regiões extrasinápticas (Tremblay et al. 2010), o controle da função sináptica através dos seus receptores de neurotransmissores (Salter e Beggs, 2014) e a maturação das sinapses estabelecidas (Paolicelli et al. 2011; Salter and Beggs 2014). Além disso, como as micróglia estão presentes no SNC desde a fase inicial de desenvolvimento embrionário, sendo assim desempenham um importante papel atuando na fagocitose dos neurônios em excesso que se formam durante o desenvolvimento (Marin-Teva et al. 2011) ou fagocitando os neurônios pré e pós sináptico que estão fazendo conexões inapropriadas (Salter e Beggs 2014; Stevens et al. 2007; Schafer et al. 2012). No SNC adulto as micróglia também participam da manutenção da plasticidade sináptica através da liberação de mediadores como TNF- α e TGF β (Butovsky et al. 2014).

Ainda em condições saudáveis, as micróglia se encontram em um estado de “repouso”, caracterizado morfologicamente pelo soma pequeno e seus processos ramificados (Nimmerjahn et al., 2005). Quando ocorre um estímulo não fisiológico, em decorrência de lesões do nervo, inflamação, infecção e etc, a micróglia sofre um processo de transição do estado de repouso para um estado de “ativação” na qual encontra-se alterações, como: aumento do soma, ramificação reduzida e processos retraídos (microgliose), proliferação microglial, alteração fenotípica para um estado clássico de ativação denominado M1, predominantemente pró-inflamatório. Importante ressaltar que essas alterações não precisam ocorrer ao mesmo tempo para que a micróglia desempenhe sua função modulatória (Ho et al., 2020). Evidências demonstram que as micróglia modulam positivamente condições patológicas através da liberação de mediadores biológicos ativos, entre eles: BDNF, TNF α , IL-1 β , IL-12, espécies

reativas de oxigênio (ROS), NO, PGs, e quimioquinas (Wang e Mullally, 2020; Liu et al., 2016),

A ativação microglial da medula espinhal tem sido investigada como um fator envolvido no processo de transição de dor aguda para crônica. (Tsuda, 2019). Em modelos de dor neuropática induzido pela transecção do nervo foi visto que animais knockout $CX_3CR1^{CreER/+};R26i^{DTR/+}$, que não expressam as microglias espinhais, tem uma redução completa do comportamento doloroso duas semanas após a cirurgia (Saijo e Glass, 2011). Além disso, outros estudos demonstram que a contribuição da micróglia para a transição de dor aguda para crônica ocorre de uma forma dependente do tempo, uma vez que a inibição microglial induzida no terceiro dia pós transecção do nervo reduziu significativamente a dor neuropática, enquanto a ablação dessas células 5 dias após a cirurgia causa apenas uma redução transiente (Bédard et al., 2007).

Ainda, há diferença no perfil microglial ao longo do tempo, sugerindo que a micróglia espinhal exerce diferentes funções ao longo do processo de progressão de dor aguda para crônica. No primeiro dia após indução da neuropatia, ou seja na fase inicial de desenvolvimento da dor crônica, foi encontrado genes envolvidos nos processos de quimiotaxia, metabolismo do succinato, via de sinalização mediada por citocinas, ciclo celular mitótico e regulação da morfologia celular. Na fase tardia, sete dias após intervenção, foram encontrados alterações relacionadas as vias mediadas pelo interferon I, respostas celulares mediadas pelo ion calcio, quimiotaxia e metabolismo fosfolipidico (Jeong et al., 2016).

Outros achados utilizando inibidores da ativação de micróglia, como a minociclina demonstraram que a utilização desse fármaco é capaz de prevenir a indução da dor patológica, mas não reverte a hiperalgesia estabelecida após inflamação (Deng et al., 2019), sugerindo que a ativação microglial da medula espinhal possui funções distintas de uma maneira dependente do tempo durante a cronificação da dor.

Os astrócitos representam cerca de 20-40% de todas as células da glia, sendo considerado o tipo mais abundante do SNC, são caracterizados por sua forma estrelar e apresentam soma celular, processos grandes e finos e a porção final desses processos contatam a lâmina basal ao redor dos vasos sanguíneos

(Reichenbach e Wolburg, 2005; Ventura e Harris, 1999). Suas funções homeostáticas desempenham um importante papel no suporte metabólico para os neurônios através da manutenção dos níveis extracelular de íons potássio, glutamato e água (Hansen e Malcangio, 2013). Os astrócitos se conectam uns aos outros formando 'gap-junctions', através de hemicanais, permitindo então a propagação de ondas de cálcio que contribui para a distribuição de moléculas sinalizadoras a uma longa distância (Bennett et al., 2003). Também desempenham um importante controle na formação, maturação, eliminação e manutenção sináptica através de moléculas de sinalização e de contato direto, ainda, seu contato próximo com as sinapses permite a regulação do ambiente químico e iônico intersticial durante o desenvolvimento e a transmissão sináptica (Mosli et al., 2012, Sutulovic et al., 2019).

Astroglíose é o termo utilizado para descrever os astrócitos reativos que são caracterizados por alterações morfológicas, moleculares e funcionais encontrados em diversos modelos de dor crônica, como: transecção da medula espinhal (Fujita et al., 2018), exposição crônica a opióides (Tsuboi et al., 2011), intraplantar ou intra-articular injeção de CFA (Tanga et al., 2004), câncer de osso e pele (Milligan et al., 2000), and HIV- induzido neuropatia (Bardoni et al., 2010). Em alguns modelos, os astrócitos reativos são encontrados no corno dorsal contralateral a lesão e em uma região muito maior do que a esperada em resposta a tal lesão, sugerindo que os astrócitos podem estar envolvidos na sensibilização de neurônios vizinhos (Hald et al., 2008; Quirion, 2002).

Após a ativação dos astrócitos ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL- β , que pode modular a transmissão sináptica excitatória na medula espinhal por aumentar a fosforilação do receptor NMDA e por reduzir as sinapses inibitórias. A IL-1 β também é liberada pelas micróglia, no entanto, em um estudo realizado com a aplicação de CFA no músculo masseter (Guo et al., 2007) foi visto que ocorre aumento de IL-1 β nos astrócitos 30 minutos após a injeção. Além disso, essa citocina também exerce parte de sua função através da ativação do fator de transcrição NF κ B, induzindo aumento da transcrição de outros mediadores de modo a gerar um feedback positivo de citocinas pró-inflamatórias (Ledebauer et al., 2005).

A adenosina, um subproduto do ATP, também pode regular a expressão neuronal de receptores NMDA, via receptor de adenosina 1 (A1R), e estimular a plasticidade sináptica (Tanga et al., 2005), além disso, os astrócitos são uma importante fonte de ATP, um estudo utilizando camundongos dnSNARE, um modelo de gliotransmissão que possui níveis reduzidos de adenosina, foi visto que ocorre uma redução na ativação de A1R e resulta na redução do limiar de dor basal desses animais, esse é o primeiro achado que demonstra o envolvimento de astrócitos medulares na modulação do comportamento fisiológico da dor através de gliotransmissores clássicos (Milligan et al., 2003).

Micróglia e astrócitos demonstram tempos de ativação diferentes entre si, apesar deste tempo depender de cada modelo, geralmente a ativação microglial precede a astrogliose. Em modelos de lesão nervosa periférica, as micróglia espinhais se proliferam e sofrem as alterações morfológicas logo na primeira semana após a lesão e dentro de 3 semanas já retorna a níveis normais. No entanto, a ativação de astrócitos é evidenciada uma semana após o procedimento e persiste por meses (Kawasaki et al., 2008; Dostrovsky 2000). Dessa maneira, astrócitos e micróglia desempenham papéis diferentes na indução, manutenção e resolução da dor crônica, sugerindo que as micróglia estão envolvidas no aparecimento da condição, enquanto a ativação de astrócitos ocorre nas fases seguintes.

1.3 Receptores purinérgicos – P2X4 e P2X7:

Existem diversas vias sinalizadoras que atuam na sinalização e manutenção da dor, entre elas, o ATP vem sendo considerado uma molécula central nesse processo, eventos associados a destruição celular promove um acúmulo exacerbado de ATP, que serve como um sinal para desencadear uma cascata inflamatória. Em condições de neuroinflamação, as micróglia liberam ATP que pode estimular os astrócitos a liberarem um neurotransmissor excitatório que atua no aumento da excitabilidade neuronal, o glutamato, assim aumentando a transmissão sináptica favorecendo a transmissão dolorosa (Pascual et al. 2012). Em tecidos inflamados cronicamente há excesso de ATP e adenosina por longos períodos, sugerindo que a sinalização purinérgica tem grande importância em condições crônicas. A sinalização ionotrópica de ATP

atua através da ativação de receptores excitatórios, conhecidos como receptores P2X, que estão relacionados na transmissão sináptica, contração muscular, secreção exócrina, inflamação, ativação de macrófagos e atualmente vem sendo amplamente associado com a geração e manutenção da dor crônica (Suurväli et al. 2017; Bernier, Ase, and Séguéla 2018). Dentre os receptores da família dos P2X, os receptores P2X4 possuem três subunidades permeáveis ao Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , com uma maior permeabilidade a esse último íon (Tsuda 2019).

Devido a essa alta permeabilidade ao Ca^{2+} , os receptores P2X4 permitem um influxo de cálcio que pode induzir a despolarização da membrana plasmática e ativação de vias intracelulares dependentes de Ca^{2+} , incluindo as vias nociceptivas (Lin et al. 2019). Especula-se que o ATP liberado pelos neurônios do corno dorsal sejam os responsáveis por ativar os P2X4 nas micróglia, quando ocorre a ligação da molécula de ATP à esses receptores, ocorre aumento do influxo de Ca^{2+} que leva a fosforilação da proteína quinase p38 (MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinase*) e atua através de uma via de sinalização dolorosa mediada de BDNF (Inoue e Tsuda 2018; Beggs, Trang, e Salter 2012). Esses receptores são expressos em neurônios (Lalisse et al. 2018), micróglia (Trang e Salter 2012), macrófagos. O estudo de Coul et al. 2005 foi o pioneiro na descoberta de que os receptores P2X4 microgliais alteram de maneira significativa o processo de nocicepção, através da injeção intratecal de ATP, a micróglia sofreu uma mudança na qual converteu a resposta evocada por GABA, um neurotransmissor com características inibitórias, de hiperpolarização para um perfil com características excitatórias, despolarizantes, nos neurônios do corno dorsal.

Os receptores têm sido amplamente associados ao desenvolvimento de dores crônicas, como a neuropatia, uma vez que há aumento da expressão desses receptores em micróglia após lesão nervosa, além disso, animais knockout para P2X4 não desenvolvem hiperalgesia mecânica após lesão nervosa. Em modelos de dor inflamatória, foi visto que animais knockout para esses receptores apresentam significativa redução na hiperalgesia mecânica induzida pela administração intraplantar de carragenina (Ulmann et al., 2010), na nocicepção induzida por pequenos volumes de formalina (Ulmann et al., 2010), e na hiperalgesia mecânica e no edema induzidos pela administração

intraplantar de CFA (Tsuda et al., 2009, Ulmann et al., 2010). Além disso, recentemente foi demonstrado aumento da expressão de P2X4 em neurônios sensoriais em resposta a inflamação periférica de longa duração induzida por CFA (Lalisse et al., 2018).

O subtipo de receptores purinérgicos, P2X7 são altamente expressos em alguns tipos de células do sistema imune, como macrófagos e microglias (Solle et al., 2001). A ativação desses receptores na micróglia é bem caracterizado em condições não fisiológicas, experimentos utilizando Liposacarídeo (LPS) que desencadeia uma resposta inflamatória, causa aumento da expressão de P2X7 na micróglia, induzindo liberação de óxido nítrico (ON), espécies reativas de oxigênio (Choi et al., 2007), altos níveis de ATP, formação do inflamassomo NLRP3, liberação de citocinas e quimiocinas (He et al., 2017; Takenouchi et al., 2009; Shieh et al., 2014). Uma consequência da ativação persistente de P2X7 ainda não compreendida completamente é a de formação de poros que tornam a membrana permeável a cargas altas de cátions (Di Virgilio et al., 2018) o que poderia estar relacionado com a citotoxicidade e viabilidade microglial (Seeland et al., 2015; Monif et al., 2016).

Estudos utilizando modelos animais que não expressam os receptores P2X7 demonstraram que não há hipersensibilidade dolorosa em modelos de inflamação e neuropatia (Chessell et al., 2005) e a utilização de antagonistas é capaz de reverter a alodínia mecânica em um modelo de dor neuropática (Nelson et al., 2006)

Evidências mostram que há uma interação estrutural e funcional entre os receptores P2X4 e P2X7 nas micróglias (Raouf et al. 2007), sendo que os P2X4 estão localizados nos lisossomos intracelulares, enquanto os P2X7 estão distribuídos na superfície celular, porém em micróglias ativas os receptores P2X4 trafegam para a membrana plasmática, assim podendo ocorrer uma interação entre ambos receptores (Tsuda, Tozaki-Saitoh e Inoue 2010).

1.4 Hipotalgesia induzido pelo exercício:

A atividade física regular tem sido relacionada a um menor risco de desenvolvimento de dores crônicas, uma vez que estudos populacionais com indivíduos fisicamente ativos mostram uma tendência significativamente menor

no surgimento dessas condições (Landmark et al., 2011). Com isso, a prática de exercícios regulares tem sido uma estratégia para o controle de doenças inflamatórias (Ikeda et al., 2013), no alívio de sintomas de quimioterapia em pacientes com câncer (Wonders e Drury, 2011), em modelos animais submetidos a protocolos de natação ou de corrida em esteira, já foi visto redução da dor em modelos de dor neuropática induzida por lesão nervosa, dor espontânea induzida por formalina, e redução de dores musculares agudas e crônicas (Ye et al, 2017; Azambuja et al., 2020; Azambuja et al., 2021).

O fenômeno pelo qual o exercício físico induz redução da dor é conhecido como Hipoalgesia Induzida pelo Exercício (HIE) e os mecanismos envolvidos nesse processo são amplamente investigados. Exercícios aeróbicos, de resistência dinâmica e isométrica são capazes de induzir HIE (Naugle et al., 2012). Em particular, o exercício aeróbio permite uma maior variabilidade de modalidades de atividade e por isso torna-se um tipo interessante, no entanto há vários fatores que interferem no efeito hipoalgésico de exercícios aeróbicos, como a intensidade (Polaski et al., 2019) e essa variável juntamente com a duração do exercício físico são extremamente importantes no processo de modulação endógena da dor.

Exercícios físicos realizados com intensidade alta, moderada ou baixa podem resultar em uma hipoalgesia eficiente (de Azambuja et al., 2018; Naugle et al., 2012; Vaegter et al., 2020). Entretanto, para os exercícios de intensidade baixa, durações diárias mais longas são necessárias para o desenvolvimento da hipoalgesia (Bement et al., 2008). Já para os exercícios de intensidades moderadas ou altas, um tempo mínimo também é necessário. Quando a intensidade do exercício é em torno de 75% do VO_2 máximo, a hipoalgesia ocorre após 30 minutos de exercício, mas não após 10 minutos (Hoffman et al., 2004). Além dos estudos em humanos, há vários estudos em animais experimentais demonstrando a modulação endógena da dor produzida pelo exercício físico (Bement and Sluka, 2005; de Azambuja et al., 2018; Korb et al., 2010; Shankarappa et al., 2011). Ainda, semelhante aos estudos em humanos, a modulação endógena da dor em animais experimentais é dependente da intensidade e duração do exercício físico (Stagg et al., 2011)

Tem sido descrito que o exercício físico é capaz de ativar, tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico, mecanismos clássicos de modulação da dor, como o sistema opióide (Mazzardo-Martins et al., 2010; Shankarappa et al., 2011; Stagg et al., 2011; Karlsson et al., 2014) e o sistema serotoninérgico (Kamiya et al., 2010; Mazzardo-Martins et al., 2010). Evidências demonstram também que o exercício físico regulariza, por ação direta em canais iônicos, a atividade das fibras nociceptivas, que está anormalmente aumentada em algumas condições dolorosas (Shankarappa et al., 2011; Sharma et al., 2010).

O exercício físico também pode induzir hipoalgesia via modulação do sistema imunológico periférico, diminuindo a concentração de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a concentração de citocinas anti-inflamatórias (Petersen et al., 2005; Ortega et al., 2012) e aumentando a presença de macrófagos com fenótipo M2 (Leung et al., 2016, Azambuja et al., 2021), além da modulação via sistema imunológico central, reduzindo a expressão de marcadores de ativação glial no corno dorsal, como: CD11b, Iba-1, e proteína glial fibrilar ácida (GFAP), (Cobianchi et al. 2010; Almeida et al. 2015; Lopez-A´lvarez et al. 2015) e diminuindo os níveis de IL-1 β , receptores de IL-6 e BDNF no corno dorsal da medula espinhal (Bobinski et al. 2011; Lo´pez- A´lvarez et al. 2015).

1.5 Receptores PPAR γ e exercício:

Os receptores PPAR γ são fatores de transcrição ativados por ligantes, formam uma superfamília de receptores nucleares (Berger and Moller, 2002), amplamente conhecido por seu papel no metabolismo lipídico e adipogênese. Além disso, ele é expresso em diversas células, incluindo macrófagos, monócitos, miócitos, fibroblastos (Greene et al., 1995, Braissant et al., 1996) micróglias (Tigue et al., 2007) e neurônios do sistema nervoso central (Moreno et al., 2004). Especificamente, os receptores PPAR γ localizados na medula espinhal estão relacionados ao processamento da dor (Kondo et al., 2018; Zhong et al., 2019) e tem sido apontado como um potente fator terapêutico para modelos de neuropatia, além disso seus agonistas promoverem efeitos

protetores contra comportamentos nociceptivos dependente de ativação microglial.

Estudos demonstram que o exercício físico, em função da demanda metabólica aeróbica, pode aumentar a expressão de receptores PPAR γ (receptores ativados por proliferador de peroxissoma) no músculo esquelético (Sasaki et al., 2014; Zizola et al., 2015). Recentemente, nosso grupo de estudos investigou o efeito do exercício físico no modelo de hiperalgesia muscular persistente, onde foi visto que o exercício é capaz de atenuar a fase aguda da dor e prevenir o desenvolvimento da fase persistente, sendo um dos mecanismos envolvidos nessa resposta hipoalgésica a ativação de receptores PPAR γ periféricos, também demonstramos que a ativação desses receptores por seu agonista 15dPGJ2, previne o aumento de macrófagos tipo M1 ou induzem aumento de M2, com características anti-inflamatórias. Além disso, a natação aumentou a concentração IL-10 tanto na fase aguda quanto crônica da dor muscular, mas na crônica, esse aumento ocorreu através dos receptores PPAR γ (de Azambuja et al., 2021)

Em situações patológicas do SNC tem sido demonstrado que a ativação de PPAR γ reduz significativamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF α) e interleucina-1 β (IL-1 β), iNOS, e melhora a sobrevivência neuronal (Schutz et al., 2005; Zhao et al., 2006). No cérebro e na medula espinhal sugere-se que há uma ação direta desses receptores, independente de ligantes, uma vez que foi visto que há regulação da expressão de PPAR γ no SNC pós lesão (Diab et al., 2002; Ou et al., 2006; Victor et al., 2006). Dessa maneira, sugere-se que os receptores PPAR γ desempenha um importante papel anti-inflamatório no SNC. No entanto, não há evidências do efeito da ativação desses receptores na medula espinhal via exercício físico.

2. OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral do presente estudo é verificar se a hiperalgesia muscular persistente é modulada pela ativação de células da glia, receptores purinérgicos P2X4 e P2X7 e PPAR γ no corno dorsal da medula espinhal.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar o envolvimento de células da glia no desenvolvimento da hiperalgesia persistente:

1a. Avaliar se micróglias participam do desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia muscular aguda e persistente;

1b. Avaliar se astrócitos estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia muscular persistente.

2. Analisar o envolvimento de receptores purinérgicos na hiperalgesia persistente:

2a. Analisar se os receptores P2X4 participam do desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente;

2b. Analisar o envolvimento dos receptores P2X7 no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente.

3. Analisar o envolvimento de receptores PPAR γ na hiperalgesia persistente:

3a. Avaliar se o exercício físico é capaz de ativar receptores PPAR γ no corno dorsal da medula espinhal e se ocorre a participação desses receptores no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Animais:

Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos machos Swiss (Mus Musculus) com 30 a 40 dias de idade ao início dos experimentos. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Pesquisas Biológicas (CEMIB/UNICAMP). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEUA-UNICAMP, sob protocolo número: 5244-1/2019), e os experimentos foram executados de acordo com as diretrizes do comitê de ética e pesquisa da Associação Internacional para o Estudo da Dor em Animais Conscientes e o Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal (CONCEA, Brasil). Todos os animais foram mantidos no biotério da FCA em gaiolas plásticas com ambiente enriquecido (cinco por gaiola), contendo maravalha, com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12hs) e ração e água *ad libitum*, exceto durante os procedimentos de exercício, injeções musculares e testes de

hiperalgesia muscular mecânica. As sessões foram realizadas na fase de ciclo claro, das 9h00 às 15h00, sempre em sala silenciosa com temperatura controlada ($\pm 23^{\circ}\text{C}$).

3.2 Quantificação da hiperalgesia muscular:

Para quantificar a hiperalgesia mecânica foi utilizado o método proposto por Randall & Selitto (1957) e adaptado para o tecido muscular de camundongos (Manjavachiet et al., 2010). Foi usado um analgesímetro digital (Insight, Brasil) cuja força mecânica linear com aumento gradual foi aplicada no ventre do músculo gastrocnêmio da pata traseira de camundongos. O registro do limiar hiperalgésico foi quantificado pela média de 3 medidas realizadas em intervalos de 5 minutos, observando a resposta do animal ao estímulo através de respostas como a alteração do ritmo respiratório, flinch de pata ou freezing, sendo quantificado nos pontos de tempo de 1h a 6 dias após injeção de carragenina/salina e novamente de 1h a 17 dias após injeção de PGE_2 . A hiperalgesia foi quantificada pela variação no limiar nociceptivo mecânico obtido pela subtração da média do limiar nociceptivo mecânico registrado em diferentes tempos após administração dos estímulos inflamatórios ou veículo com os valores registrados antes do início das injeções (baseline).

3.3 Modelo de hiperalgesia muscular persistente:

No presente estudo, foi utilizado o modelo experimental de hiperalgesia muscular persistente mecânica (Dina et al., 2008), padronizado para camundongos (Jorge et al., 2020). A hiperalgesia muscular aguda foi induzida por uma injeção intramuscular de carragenina ($100\text{ }\mu\text{g/músculo}$) no ventre do músculo gastrocnêmio e 10 dias depois, quando o limiar hiperalgésico retornou a níveis basais, foi administrado a PGE_2 ($1\text{ }\mu\text{g/músculo}$) no mesmo local para desencadear uma hiperalgesia muscular mais intensa e duradoura, referida como a hiperalgesia muscular crônica latente. A análise comportamental para avaliar o limiar hiperalgésico foi avaliado nos seguintes momentos: 1) antes da injeção muscular (basal); 2) após 1h, 3h e 6h da injeção no dia 0; 3) diariamente até o 6º dia; 4) antes da injeção de PGE_2 e após 1h e 4h (10º dia); 5) nos dias 11, 12 e 17.

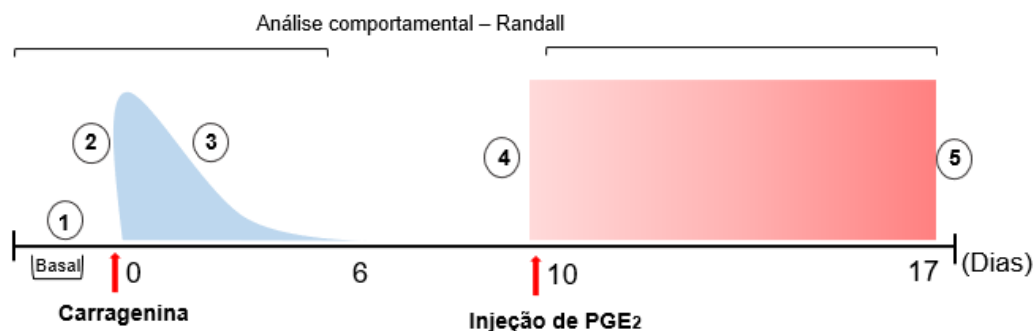


Figura 3. Linha temporal da hiperalgesia muscular crônica latente. A injeção de Carragenina no dia 0, induz uma dor transitória de poucos dias de duração, representado em azul. No décimo dia, quando não há mais vestígios da hiperalgesia mecânica, o tecido é exposto novamente a um insulto através da injeção de PGE₂ o qual é suficiente para gerar um aumento exacerbado da intensidade e da duração da hiperalgesia, representado em vermelho.

3.4 Administração intramuscular de drogas:

As injeções intramusculares foram injetadas diretamente no ventre do músculo gastrocnêmio dos camundongos com uma agulha 30-gauge, conforme previamente descrito (Schiavuzzo et al., 2015). A agulha foi conectada a um cateter de polietileno e a uma seringa Hamilton (50µl). Os animais foram brevemente contidos e o volume total da injeção foi de 20µl. As drogas e suas respectivas doses administradas foram: λ-carragenina (100 µg), prostaglandina E₂ (PGE₂, 1 µg).

3.5 Administração intratecal de drogas:

Para a injeção intratecal (i.t), os animais foram anestesiados com Isoflurano (5% para indução e 3% para manutenção em fluxo de O₂), em seguida eles foram posicionados em decúbito ventral para que fosse possível identificar manualmente o espaço intervertebral ao longo da linha medial entre a crista ilíaca, no espaço referente as vértebras L5-L6 (Figura 4). A agulha (27 gauge) foi inserida gentilmente de maneira vertical ou levemente em declive à 70-80° no plano sagital central, em seguida o angulo foi reduzido para 30° até encontrar o osso vertebral e então a droga foi injetada no espaço intradural. A injeção foi considerada bem sucedida quando os animais responderam com um movimento repentino e evidente na cauda (Li et al. 2019). As drogas e suas respectivas

doses administradas foram: Fluorocitrato (1ng e 3ng), A-438079 (15 µg e 50µg), minociclina (10µg e 30µg), 5BDBD (5-(3-bromophenyl)-1,3-dihydro-2H-benzofuro [3,2-e]-1,4- diazepin-2-um) (15 µg e 50µg), GW9662 (5 µg e 15µg). O volume injetado para todas as soluções foi de 5 µl.

Figura 4:

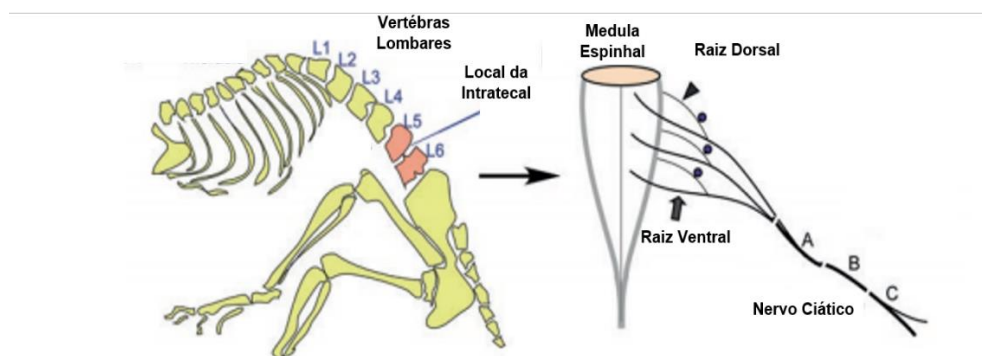


Figura 4. Ilustração sobre a injeção intratecal - Diagrama do esqueleto de camundongo demonstrando o local da injeção intratecal no espaço intervertebral L5-L6 (A). A identificação das vértebras L5-L6 pode ser feita por contagem a partir da última vertebra torácica (T13) e então a injeção pode ser aplicada no espaço identificado. Adaptado de: Woodhoo (2018).

3.6 Natação:

O protocolo de natação foi realizado por 15 dias antes da injeção de carragenina. Os procedimentos relacionados ao meio aquático foram realizados em tanques cilíndricos individuais com 100 cm de profundidade. A temperatura da água foi mantida em 31 ± 1 ° C. Para minimizar o estresse, 6 dias antes de iniciar o período de exercícios de natação, os camundongos foram submetidos a um período de adaptação ao meio líquido, com aumento progressivo da profundidade da água. Os animais permaneceram em repouso por 24 horas, antes do início do protocolo de exercícios físicos. O protocolo de treinamento foi dividido em três semanas, sendo que os animais treinavam 5 dias consecutivos e repousavam dois dias. Nos primeiros cinco dias, os animais realizaram sessões de natação com 4 minutos pausas passivas. No segundo período de 5 dias, foram utilizadas sessões de intervalo de pausa de 3 minutos, e nos últimos 5 dias os animais nadaram 50 minutos sem pausas. Quando o animal demonstrava alguma mudança drástica de comportamento de um movimento

contínuo para um movimento inadequado, como flutuando, escalando, mergulhando e/ou balançando, o animal foi retirado da água.

Figura 5:

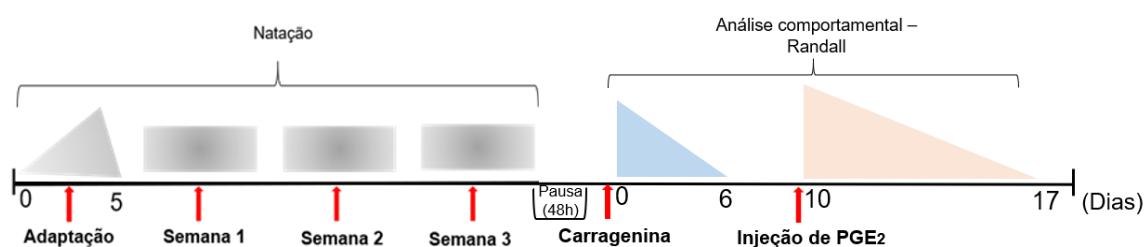


Figura 5. Linha temporal referente ao protocolo de natação. Os animais foram submetidos a adaptação ao meio líquido do dia 0 ao 6. O treinamento teve uma duração total de 3 semanas, após esse período, os animais permaneceram em repouso durante 48 horas e então receberam a injeção do agente inflamatório para a indução da hiperalgesia muscular crônica latente.

3.7 Análise Estatística:

Para a aplicação dos testes paramétricos, todos os dados seguiram uma distribuição normal (Gaussiana) de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados quantitativos foram analisados por análise de variância (ANOVA one-way e ANOVA two-way) ou teste t de Student (não pareado). Após as análises de ANOVA one-way e two-way foi realizado o post hoc com teste de Tukey para a análise das diferenças específicas encontradas nos grupos. A análise de Área sob a Curva ($AUC \pm$ erro padrão) foi realizada para os experimentos comportamentais a fim de avaliar os efeitos gerais das intervenções nas fases de hiperalgesia aguda e crônica. A AUC do período agudo foi considerada do dia 0 ao dia 3 após injeção de carragenina ($AUC \Delta$, $g \times 3$ dias) e a AUC do período crônico foi considerada a partir do dia 10 a 17 ($AUC \Delta$, $g \times 10 - 17$ dias). Os valores são expressos como: médias $\pm$ erro padrão da média. Todos os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 7.0. A ferramenta de calculadora outlier do site GraphPad foi aplicado a cada grupo. Para todos os testes, a significância foi estabelecida em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS:

4.1 Envolvimento de micróglia no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente:

Analizamos o envolvimento das micróglia no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente através do pré tratamento com minociclina, um inibidor da ativação microglial, durante três dias consecutivos antes da injeção de PGE₂ ou da carragenina. Verificamos que a administração da minociclina na dose de 10µg/5µl (i.t.) reduziu significativamente a intensidade da dor na fase persistente (entre os dias 10 e 17) quando comparado ao grupo carragenina/PGE₂ e ao grupo pré-tratado com a dose de 30µg/5µl (i.t., figura 5A, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey, $F(39, 280) = 13,67$, $n=5$). Como uma redução da hiperalgesia foi conseguida tanto com a dose de 10µg quanto de 30µg, optamos pela menor dose para realizar o experimento seguinte. Os animais que receberam o tratamento com minociclina (i.t., 3 dias, 10µg/5µl) previamente à administração de carragenina ou de PGE₂ apresentaram redução da hiperalgesia muscular na fase aguda (entre os dias 0 e 3) e na fase persistente (entre os dias 10 e 17) quando comparado ao grupo Carragenina/PGE₂ (figura 4A, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). As análises de AUC confirmaram os resultados anteriores (figura 5B, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey, pré Cg: $F(2, 14) = 284,4$; Fase persistente: $F(2, 14) = 404,8$, $n=3$; pré PGE₂ $F(2, 16) = 413$, $n=5$). Dessa maneira, nossos dados demonstram que as micróglia estão envolvidas no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia muscular aguda e persistente de origem inflamatória.

Figura 5:

A)

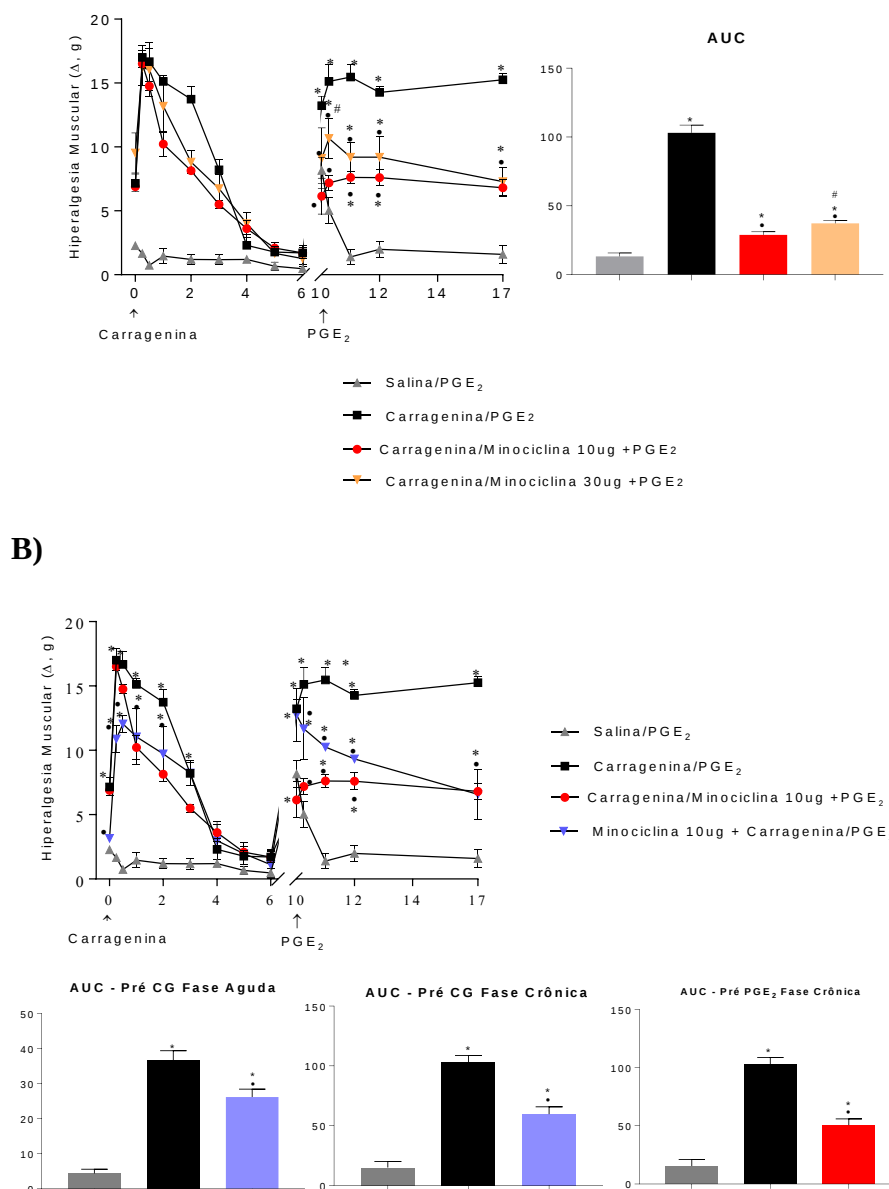


Fig 5. O pré-tratamento com minociclina em ambas as doses 10 μ g/5 μ l e 30 μ g/5 μ l reduziu a hiperalgia muscular persistente, no entanto a dose a dose de 10 μ g/5 μ l obteve diferença significativa quando comparada a de 30 μ g/5 μ l ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia da dose de 10 μ g/5 μ l em reduzir a hiperalgia muscular persistente ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, pós teste de Tukey) **B)** O pré-tratamento com minociclina (10 μ g/5 μ l) antes da injeção de carragenina ou de PGE₂ foi eficiente em reduzir a hiperalgia muscular persistente ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia do tratamento com minociclina em reduzir a intensidade da dor na fase aguda e persistente da hiperalgia muscular ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, pós teste de Tukey). Os símbolos “•” e “*” indicam diferença significativa com os grupos carragenina e salina, respectivamente. O símbolo “#” indica diferença entre as doses de minociclina.

4.2 Envolvimento de astrócitos no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente:

A avaliação da participação de astrócitos no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente foi realizado através do pré-tratamento com fluorocitrato, um inibidor metabólico de astrócitos, 30 minutos antes da administração da injeção de PGE₂ (i.t, 1nmol/5µl e 3nmol/5µl). Foi visto uma redução significativa na hiperalgesia muscular persistente quando comparado ao grupo Carragenina/PGE₂ (figura 6A, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). A análise de AUC demonstrou que ambas as doses de tratamento com fluorocitrato (1nmol/5µl e 3nmol/5µl) foram eficientes em reduzir a hiperalgesia persistente quando comparado ao grupo Carragenina/PGE₂. No entanto, quando comparado a eficácia das doses na redução da hiperalgesia persistente, foi visto que o grupo tratado com a dose de 1nmol/5µl apresentou uma maior redução da hiperalgesia quando comparado aos animais pré tratados com a dose de 3nmol/5µl de fluorocitrato (figura 6A, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey, (39, 264) = 15,09, $n=5$). Os animais tratados com fluorocitrato previamente a administração de carragenina (30 minutos antes, i.t, 1nmol/5µl) apresentaram redução na intensidade da hiperalgesia aguda (entre os dias 0 e 3) e na hiperalgesia persistente (entre os dias 10 e 17) comparado ao grupo Carragenina/PGE₂ (figura 6B, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). A AUC confirmou a redução da hiperalgesia persistente quando o pré tratamento com fluorocitrato foi realizado antes da injeção de carragenina ou de PGE₂ (figura 6B, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey, pré Cg: Fase aguda: $F(2, 16) = 584,6$; Fase persistente: $F(2, 16) = 541,1$, $n=5$, pré PGE₂ $F(2, 15) = 735,5$, $n=4$). Assim, sugere-se, que no modelo de hiperalgesia muscular persistente utilizada no presente estudo, os astrócitos participam da fase aguda e persistente da hiperalgesia muscular persistente.

Figura 6:

A)

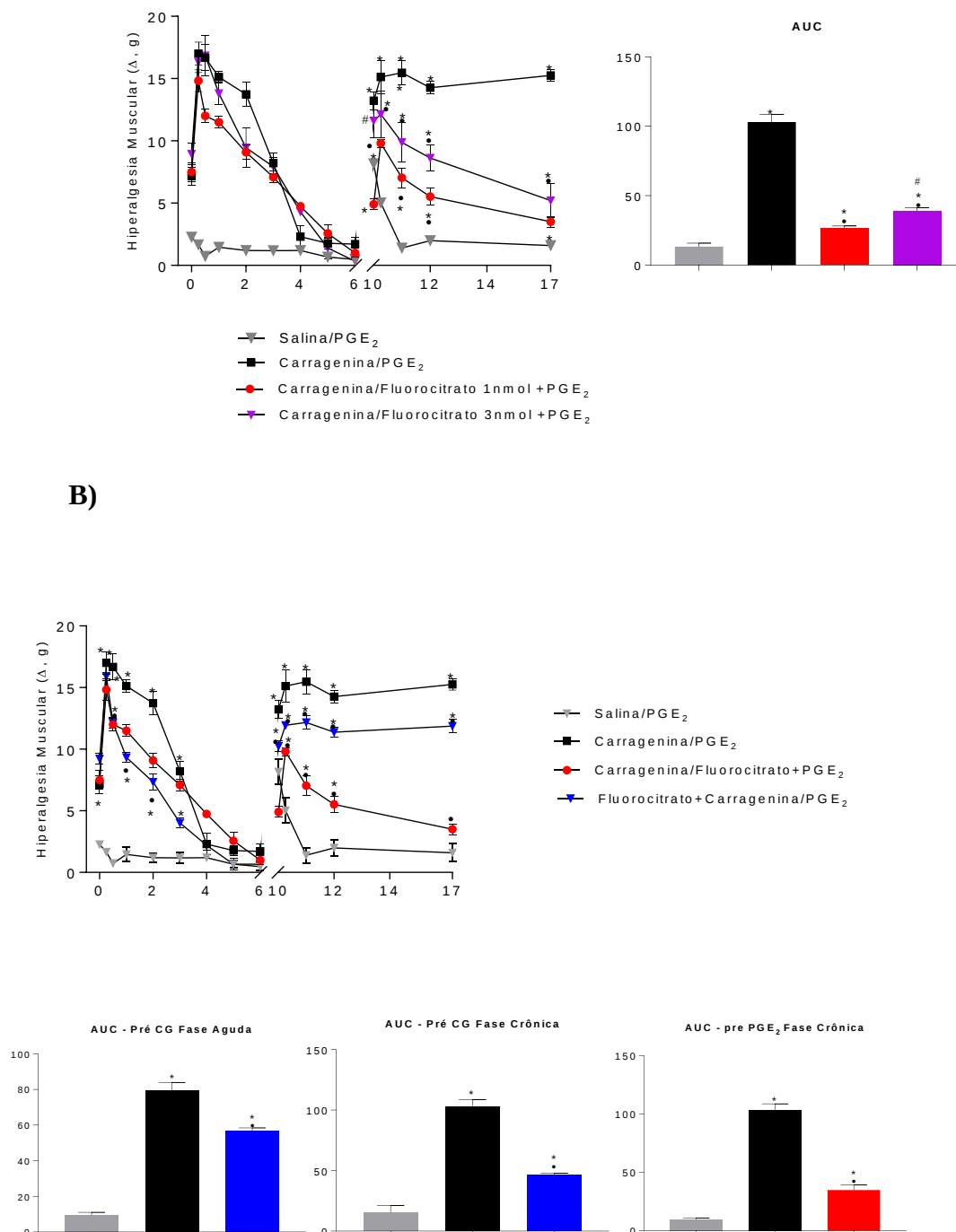


Figura 6. A) O pré-tratamento com fluorocitrato em ambas as doses 1ng/5 μ l e 3ng/5 μ l reduziu a hiperalgesia muscular persistente, no entanto a dose a dose de 1ng/5 μ l obteve diferença significativa quando comparada a de 3ng/5 μ l ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia da dose de 50 μ g/5 μ l em reduzir a hiperalgesia muscular persistente ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, pós teste de Tukey) **B)** O pré-tratamento com fluorocitrato (1ng/5 μ l) antes da injeção de carragenina ou de PGE_2 foi eficiente em reduzir a hiperalgesia muscular persistente ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós

teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia do tratamento com fluorocitrato em reduzir a intensidade da dor na fase aguda e persistente da hiperalgesia muscular ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, , pós teste de Tukey. Os símbolos “•” e “**” indicam diferença significativa com os grupos carragenina e salina, respectivamente. O símbolo “#” indica diferença entre as doses de fluorocitrato.

4.3 Envolvimento de receptores P2X4 do corno dorsal da medula espinhal no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente:

O pré-tratamento com o antagonista seletivo de receptores P2X4, 5BDBD, 15 minutos antes da injeção de PGE₂ (i.t., 15µg/5µl e 50µg/5µl) foi eficiente em reduzir a intensidade da hiperalgesia muscular persistente em relação ao grupo Carragenina/PGE₂ (figura 7A, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). A análise de AUC demonstrou que a dose de 50µg/5µl foi mais eficaz em reduzir a intensidade da dor na fase persistente comparado aos grupos Carragenina/PGE₂ e ao grupo tratado com a dose de 15µg/5µl (figura 7A, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey, $F(39, 265) = 11,74$, $n=5$). O tratamento com 5BDBD (15 minutos antes, i.t., 50µg/5µl) prévio a administração de carragenina reduziu a intensidade da dor na fase aguda (entre os dias 0 e 3) e na fase persistente (entre os dias 10 e 17) quando comparado ao grupo Carragenina/PGE₂ (figura 7B, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). A análise de AUC confirmou que o pré tratamento com 5BDBD, antes da administração da carragenina ou da PGE₂ é capaz de reduzir a intensidade da hiperalgesia muscular persistente (figura 6B, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey, Fase aguda: $F(2, 15) = 286,4$; Fase persistente: $F(2, 15) = 283,7$, $n=4$, pré PGE₂ $F(39, 265) = 11,74$, $n=5$). Os achados demonstram que há participação de receptores P2X4 do corno dorsal da medula no desenvolvimento da fase aguda e persistente da hiperalgesia muscular persistente.

Figura 7:

A)

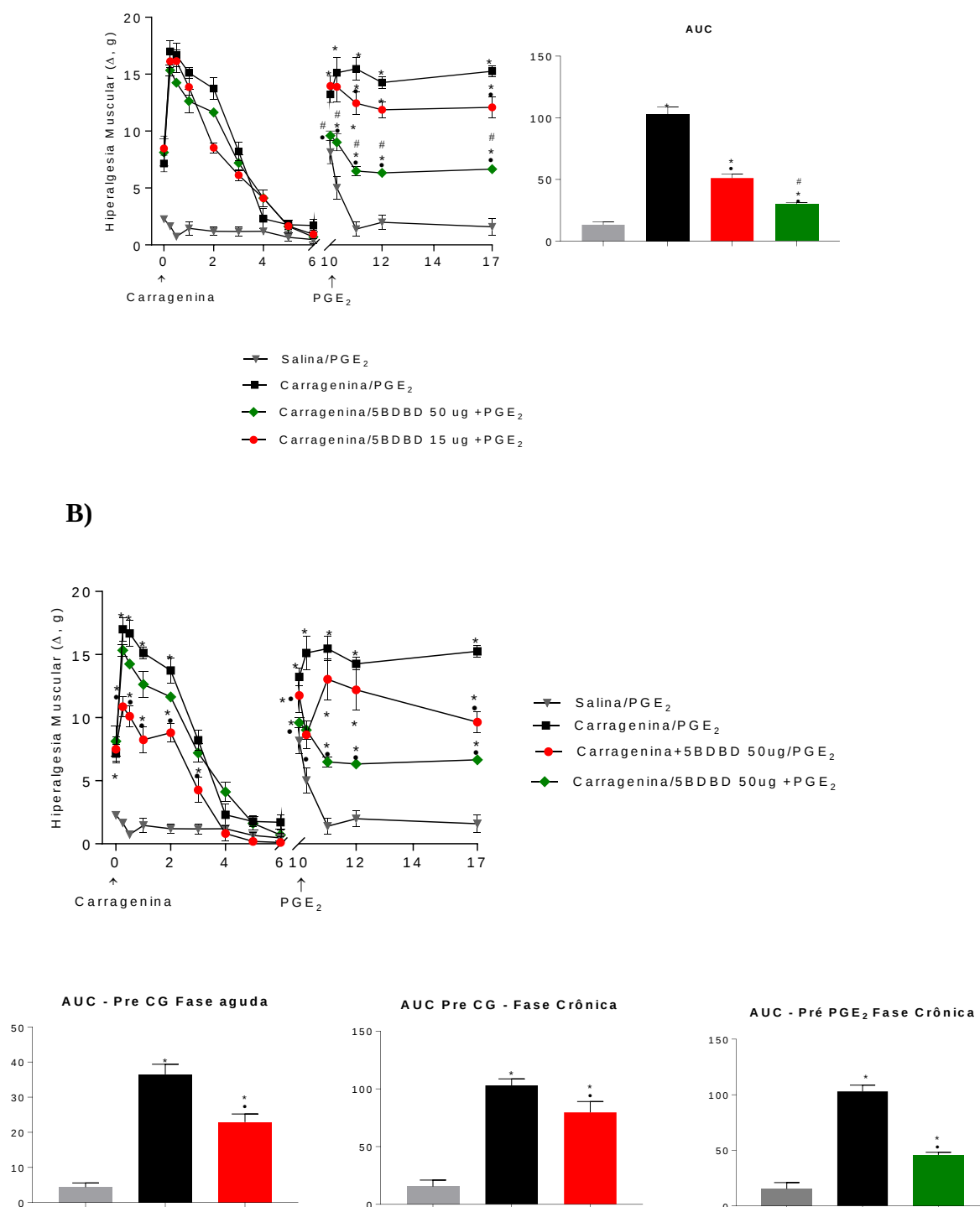


Figura 7. A) O pré-tratamento com 5BDBD em ambas as doses (15 μ g/5 μ l e 50 μ g/5 μ l) reduziu a hiperalgia muscular persistente, no entanto a dose a dose de 50 μ g/5 μ l obteve diferença significativa quando comparada a de 15 μ g/5 μ l ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia da dose de 50 μ g/5 μ l em reduzir a hiperalgia muscular persistente ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, , pós teste de Tukey) **B)** O pré-tratamento com 5BDBD (50 μ g/5 μ l) antes da injeção de carragenina ou de PGE₂ foi eficiente

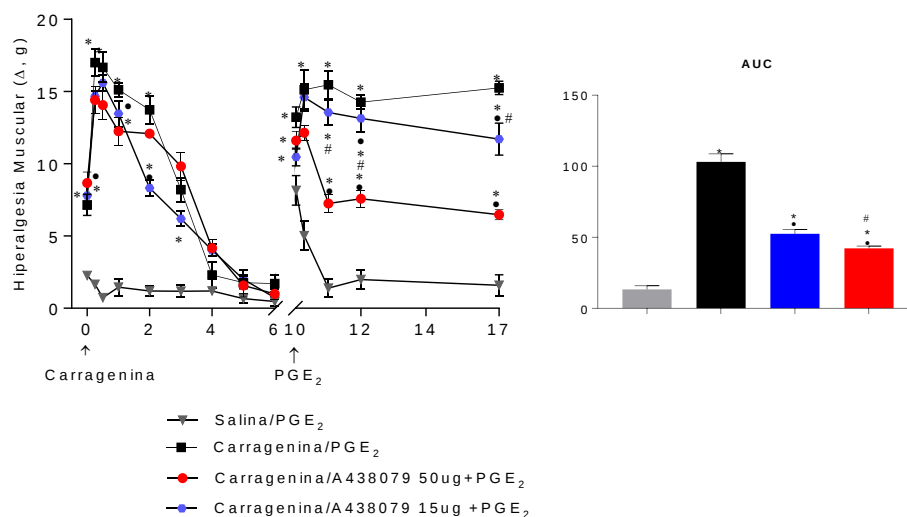
em reduzir a hiperalgesia muscular persistente ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia do tratamento com 5BDBD em reduzir a intensidade da dor na fase aguda e persistente da hiperalgesia muscular ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, , pós teste de Tukey). Os símbolos “•” e “*” indicam diferença significativa com os grupos carragenina e salina, respectivamente. O símbolo “#” indica diferença entre as doses de 5BDBD.

4.4 Envolvimento de receptores P2X7 do corno dorsal da medula espinhal no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente:

O pré-tratamento com o antagonista seletivo de receptor P2X7, A438079, 15 minutos antes da injeção de PGE₂ (i.t., 15µg/5µl e 50µg/5µl) reduziu a hiperalgesia muscular persistente quando comparado ao grupo Carragenina/PGE₂ (figura 8A, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). A análise da AUC demonstrou que a dose de 50µg/5µl apresentou mais eficiência em reduzir a intensidade da hiperalgesia persistente quando comparado ao grupo tratado com a dose de 15µg/5µl e ao grupo Carragenina/PGE₂ (figura 8A, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). Ao administrar o tratamento com A438079 antes da injeção de carragenina, houve uma redução na intensidade da dor na fase aguda (entre os dias 0 e 3) e na fase persistente (entre os dias 10 e 17) quando comparado ao grupo Carragenina/PGE₂ (figura 8B, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). A AUC confirmou os dados, demonstrando que o tratamento com antagonista de P2X7 antes da carragenina ou da PGE₂ é eficiente em reduzir a hiperalgesia muscular persistente (figura 8B, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey), sugerindo assim um possível envolvimento de receptores P2X7 do corno dorsal da medula espinhal medulares no desenvolvimento da fase aguda e persistente da hiperalgesia muscular persistente.

Figura 8:

A)



B)

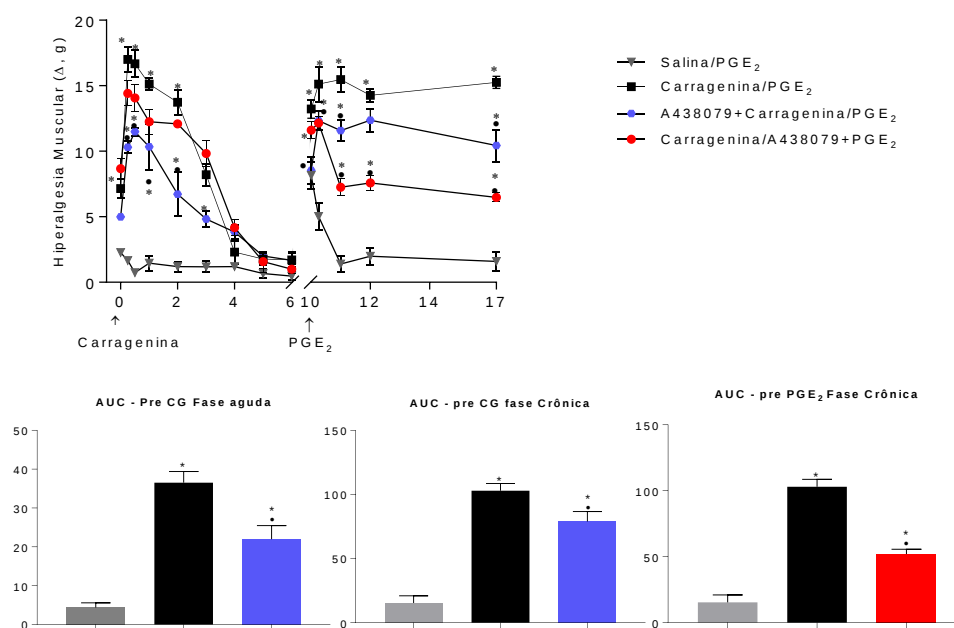


Figura 8. A) O pré-tratamento com A438079 em ambas as doses (15µg/5µl e 50µg/5µl) reduziu a hiperalgesia muscular persistente, no entanto a dose a dose de 50µg/5µl obteve diferença significativa quando comparada a de 15µg/5µl ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia da dose de 50µg/5µl em reduzir a hiperalgesia muscular persistente ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, pós teste de Tukey) **B)** O pré-tratamento com A438079 (50µg/5µl) antes da injeção de carragenina ou de PGE₂ foi eficiente em reduzir a hiperalgesia muscular persistente ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia do tratamento com A438079 em reduzir a intensidade da dor na fase aguda e persistente da hiperalgesia muscular ($p < 0,0001$, One Way ANOVA,

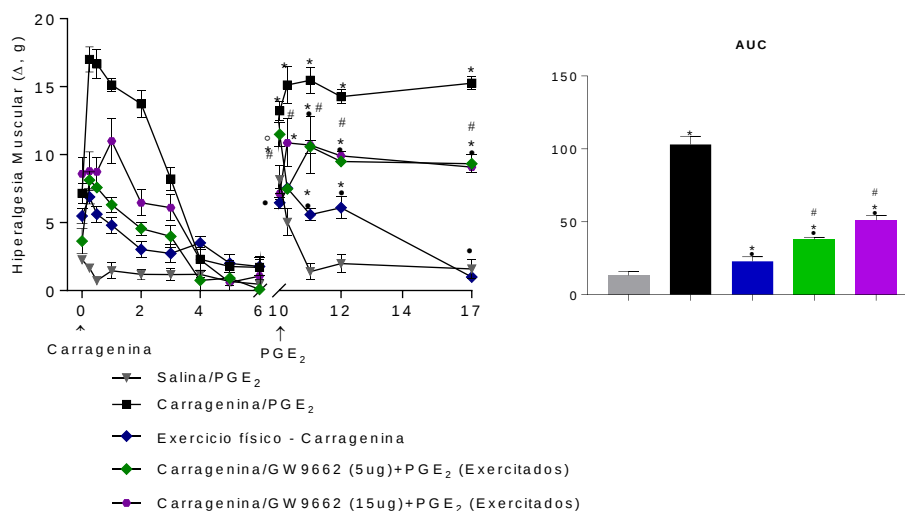
,pós teste de Tukey). Os símbolos “•” e “*” indicam diferença significativa com os grupos carragenina e salina, respectivamente. O símbolo “#” indica diferença entre as doses de A438079.

4.5 Envolvimento de receptores PPAR γ do corno dorsal da medula espinhal ativados pelo exercício físico no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente:

O protocolo de exercício físico realizado prévio a administração de carragenina (100 μ g/20 μ l, i.m) foi eficiente em prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente no grupo Carragenina/PGE₂ – Exercício Físico quando comparado aos animais Carragenina/PGE₂ (figura 10A, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). Os animais exercitados foram pré tratados com a administração intratecal de GW9662, um inibidor específico de PPAR γ , 15 minutos antes da injeção de PGE₂, os resultados demonstram que ambas as doses utilizadas (5 μ g/5 μ l e 15 μ g/5 μ l) foram eficientes em reverter a hipoalgesia induzida pelo exercício quando comparado ao grupo Carragenina/PGE₂ – Exercício Físico, ainda assim também diferem do grupo Carragenina/PGE₂ (figura 10A, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). A análise de AUC demonstrou que a dose de 15 μ g/5 μ l foi capaz de causar uma maior reversão da hipoalgesia induzida pelo exercício quando comparado aos animais pré tratados com a dose de 5 μ g/5 μ l e ao grupo Carragenina/PGE₂ – Exercício Físico (figura 8A, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey, $F(78, 542) = 10,38$, $n=5$). Quando o GW9662 (15 minutos, i.t, 15 μ g/5 μ l) foi administrado prévio a administração da carragenina, os animais exercitados, apresentaram reversão da hipoalgesia muscular na fase aguda (entre os dias 0 e 3) e na fase persistente (entre os dias 10 e 17) quando comparado ao grupo Carragenina/PGE₂ – Exercício Físico, no entanto, ainda difere da hiperalgesia do grupo Carragenina/PGE₂ (figura 10B, Two way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey). A AUC confirma os resultados demonstrando que o pré tratamento com GW9662 pré injeção de carragenina ou PGE₂ é capaz de reverter parcialmente o efeito hipoalgésico do exercício (figura 10B, One way ANOVA, $p < 0,0001$, teste de Tukey, pré Cg $F(3, 28) = 255,7$; Fase persistente: $F(3, 28) = 252,6$, $n=5$, pré PGE₂: $F(2, 15) = 449,6$). Desse modo, os resultados sugerem que há

envolvimento dos receptores PPAR γ do corno dorsal da medula espinhal na prevenção da cronificação da dor através do exercício físico.

A)



B)

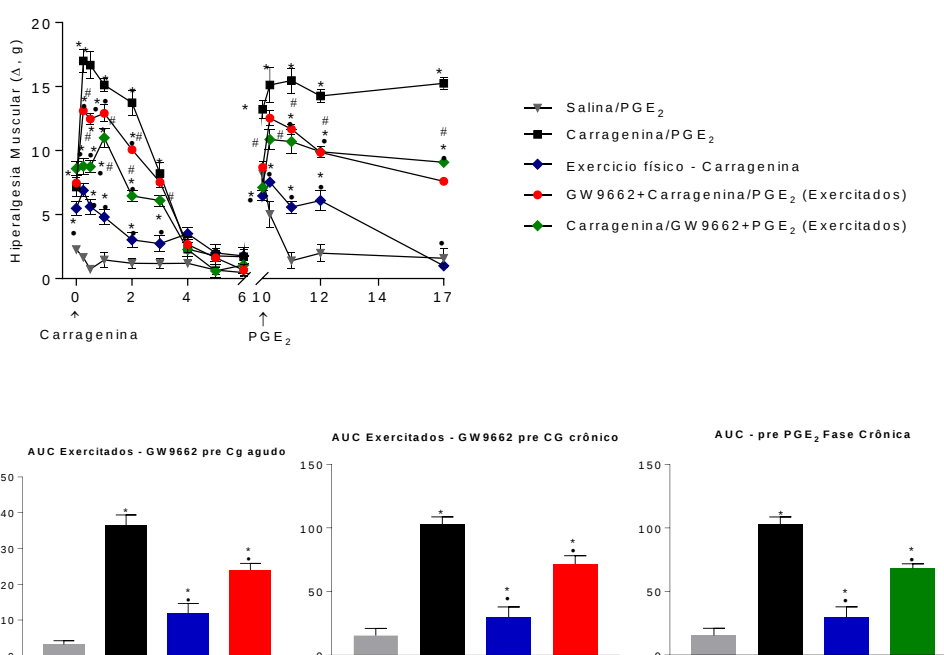


Figura 10. A) O pré-tratamento com GW9662 em ambas as doses (5 μ g/5 μ l e 15 μ g/5 μ l) foi capaz de reverter parcialmente a hipoalgesia induzida pelo exercício, no entanto a dose de 15 μ g/5 μ l obteve diferença significativa quando comparada a de 5 μ g/5 μ l ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia da dose de 15 μ g/5 μ l em

reduzir a hiperalgesia muscular persistente ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, , pós teste de Tukey **B**) O pré-tratamento com GW9662 ($15\mu\text{g}/5\mu\text{l}$) antes da injeção de carragenina ou de PGE_2 foi eficiente em reduzir a hiperalgesia muscular persistente ($p < 0,0001$, Two Way ANOVA, pós teste de Tukey). A AUC confirmou a eficácia do tratamento com GW9662 em reduzir a intensidade da dor na fase aguda e persistente da hiperalgesia muscular ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, ,pós teste de Tukey). Os símbolos “•” e “*” indicam diferença significativa com os grupos carragenina e salina, respectivamente. O símbolo “#” indica diferença entre as doses de GW9662.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento com inibidores da ativação de micróglia e astrócitos reduz a intensidade da dor na fase aguda e crônica da hiperalgesia persistente, sugerindo a participação dessas células na indução e manutenção da hiperalgesia muscular persistente. Os receptores P2X_4 e P2X_7 também demonstraram participar do desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente, uma vez que o bloqueio de ambos através de seus respectivos antagonistas, reduziu a hiperalgesia mecânica em ambas as fases. A natação se mostrou eficaz em prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia persistente, além disso, os animais pré tratados com GW9662, antagonista de receptores PPAR_γ , apresentaram uma reversão parcial da hiperalgesia induzida pelo exercício, sugerindo que esses receptores podem ter sido ativados através do exercício e que essa ativação desempenha um papel a ser investigado no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente.

O presente estudo demonstrou que o pré-tratamento intratecal com minociclina antes da carragenina reduz a hiperalgesia muscular mecânica aguda e persistente. Ainda, demonstramos que o pré-tratamento com minociclina previamente à PGE_2 também reduziu a hiperalgesia muscular persistente.

É conhecido que a administração de minociclina um agente semissintético, pertencente a classe de antibióticos tetraciclina, que possui efeitos distintos das funções clássicas de antibióticos, como a ação antimicrobiana (Tikka et al., 2001) é capaz de penetrar no SNC (Kobayash et al., 2016) e interromper o processo de ativação microglial, sem afetar diretamente a função neuronal e astrogliar (Raghavendra et al., 2003; Tikka et al., 2001). A utilização da minociclina tem se mostrado eficiente na redução da dor neuropática, uma

vez que o bloqueio da ativação da microglia em animais com lesão nervosa reduz a expressão de TLR4, de modo a reduzir a ativação microglial no corno dorsal da medula espinhal e assim, reduzindo a hiperresponsividade neuronal (Nazemi et al. 2015). Em modelo de dor lombar induzida por injeção de NGF no músculo multiífidus, a administração de minociclina quando feita antes da primeira injeção de NGF foi capaz de reduzir o estado de sensibilização letente, no entanto o tratamento com o inibidor de ativação microglial após a segunda injeção de NGF não foi eficiente em reverter a hipersensibilização neuronal, sugerindo que as micróglia participam da indução da cronificação mas não da manutenção (Zhang et al., 2017). Além disso, tem sido encontrado que a administração via intraperitoneal antes de injeção de salina ácida ou zymosan não impede o desenvolvimento da dor em resposta a inflamação periférica, no entanto, reduz a intensidade da dor neuropática em modelo de lesão nervosa (Padi et al., 2008). O estudo de Bastos et al., 2007 demonstrou que o tratamento com minociclina reduziu o edema da pata e as respostas dolorosas causadas pela injeção de carragenina e formalina, corroborando com os nossos achados.

Uma hipótese para que a redução da dor na fase persistente seja visivelmente mais expressiva após o estabelecimento da fase persistente, pode se dar ao fato de que a sensibilização periférica pode induzir um aumento na proliferação de micróglia em seu estado ativado na medula espinhal (Echeverry et al., 2018). Assim, quando ocorre o bloqueio da ativação dessas células dias antes do segundo insulto, a minociclina bloqueia uma maior quantidade de micróglia ativas, resultando nessa maior redução da intensidade dolorosa na fase persistente.

A principal função dos astrócitos envolve a recaptação de glutamato (neurotransmissor excitatório) e GABA na região sináptica através de transportadores astrocíticos (Danbolt, 2018). O glutamato citosólico pode ser convertido em glutamina, um aminoácido precursor de glutamato e GABA, através da enzima glutamina sintetase, assim a glutamina é transportada para os terminais neuronais para fornecer uma abundante quantidade de glutamato, auxiliando na facilitação da transmissão sináptica (Kanamori e Ross 2006), esse ciclo glutamato-glutamina é um mecanismo chave na sensibilização central e é uma atividade específica dos astrócitos (Hertz e Zielke 2004). De modo que,

tratamento com inibidores desse ciclo, afetam diretamente a produção da sensibilização central em condições de dor inflamatória aguda e crônica (Chiang, Sessle, e Dostrovsky 2012).

Nossos dados apontam um efeito positivo na redução da dor na fase aguda do modelo de hiperalgesia muscular persistente, quando administramos o fluorocitrato (1nmol) antes da injeção de carragenina, uma vez que difere significativamente dos animais não tratados com o inibidor (Figura 6B). Em relação ao pré-tratamento com fluorocitrato realizado antes do insulto com a PGE₂, houve uma redução significativa na hiperalgesia persistente.

A liberação de ATP dos astrócitos em resposta a lesão e a dos astrócitos vizinhos também pode aumentar a sinalização nociceptiva, de modo a sugerir uma importante função dessas células no processamento da dor (Wu et al. 2012). Estudos utilizando fluorocitrato, um inibidor de astrócitos que desempenha sua função ao entrar na célula glial e bloquear uma enzima específica chamada aconitase, que converte citrato em isocitrato interrompendo o metabolismo astroglial (Gao e Ji 2010; Wieseler-Frank, Maier, e Watkins 2005; Fonnum, Johnsen, e Hassel 1997) é capaz de reduzir a dor neuropática através da redução de quimiocinas e citocinas pró inflamatórias (Choi et al. 2019, Luo et al. 2016, Gruber-Schoffnegger et al. 2013), a dor subcutânea induzida por formalina também é reduzida com a injeção de fluorocitrato, sendo que um dos possíveis mecanismos é através da diminuição de INOS (Sun et al. 2009).

O estudo de Ledebøer et al. 2006 demonstrou que em um modelo de dor muscular induzido por salina ácida, a administração de fluorocitrato não foi eficiente em reduzir a dor, em contrapartida no modelo de dor lombar, foi visto a reversão da sensibilização latente existente (Zhang et al., 2018). com fluorocitrato realizado antes do insulto com a PGE₂, houve uma redução significativa na hiperalgesia persistente. Como citado anteriormente, as micróglia parecem participar da fase de indução da dor crônica, enquanto os astrócitos são envolvidos a manutenção da condição crônica (Cheng, et al., 2015 Zhang, et al., 2018), sugere-se que isso ocorra pelo fato de que as micróglia reagem mais rápido e induzem a ativação dos astrócitos, além de determinarem o destino dessas células, enquanto os astrócitos não são eficientes em induzir a ativação de micróglia mas é capaz de controlar funções microgliais através de

moléculas como o ATP (Jha et al., 2019). Dessa forma, os dados obtidos em relação ao modelo de hiperalgesia muscular persistente de caráter inflamatório corrobora com esses achados no que se relaciona a fase persistente, no entanto encontramos funcionalidade de ambas as células no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente na fase aguda em relação a resposta comportamental.

Averiguamos o envolvimento dos receptores P2X4 no modelo de hiperalgesia persistente crônica através da injeção intratecal do antagonista 5BDBD, cujo foi demonstrado exercer um efeito como antagonista alostérico e com uma alta especificidade para os receptores P2X4 (Abdelrahman et al. 2017; Coddou, Sandoval, and Stojilkovic 2020). A administração de 5BDBD intratecal antes da injeção de carragenina reduziu a fase aguda da hiperalgesia, no entanto na fase persistente a redução não se demonstrou tão expressiva, sugerindo que o bloqueio dos receptores P2X4 previamente à inflamação inicial não é suficiente para suprimir o desenvolvimento do priming hiperalgésico de modo que, após a sensibilização induzida pela PGE₂, a cronificação da dor se estabelece.

Quando administrado antes da PGE₂, o 5BDBD reduziu a intensidade da dor na fase de hiperalgesia persistente, dessa maneira sugere-se que os receptores P2X4 estão envolvidos na hiperalgesia muscular persistente. Na inflamação periférica foi observado que a ativação de P2X4 nos neurônios sensoriais induz liberação de BDNF no corno dorsal da medula espinhal durante a inflamação de longa duração, essa hipótese é suportada pelo fato de que vias dependentes de BDNF no corno dorsal são interrompidas em animais deficientes de P2X4 (Lalisse et al. 2018).

Diversos estudos demonstraram a ativação de receptores P2X4 na micróglia após indução da dor neuropática, com isso, foi possível começar a desvendar as possíveis vias por qual esse fenômeno ocorre (Beggs, Trang, and Salter 2012; (Tozaki-Saitoh et al. 2008). Entre as possibilidades foi visto que há liberação de BDNF da micróglia por estimulação dos receptores P2X4 (Trang e Salter 2012), o aumento da expressão de P2X4 está relacionado ao aumento de fibronectina (Tsuda et al. 2008), ligantes de TLR4 estimulam o aumento desses receptores indicando que a micróglia é capaz de identificar estímulos inflamatórios por diferentes mecanismos (Guo et al. 2006). Em modelo de artrite

reumatoide inflamatória o bloqueio com antisense do RNA dos receptores P2X4 suprime a produção de citocinas pró inflamatórias, além disso é capaz de inibir a ativação do inflamassomo NLRP1 melhorando a inflamação. Essa ação ocorre através da indução do influxo de Ca^{2+} que é necessária para a produção de IL-1 β e IL-6 via ativação de receptores P2X7 (Suurväli et al. 2017; Li et al. 2014; Sakaki et al. 2013).

No estudo de Lalisse et al., 2018 foi visto que em resposta a um estímulo inflamatório periférico os receptores P2X4 atuam liberando BDNF dos neurônios sensoriais de maneira independente da micróglia. Porém, no presente estudo ainda não foi possível averiguar de maneira biomolecular se o efeito obtido é através dos receptores P2X4 microgliais ou neuronais.

Sabendo-se da interação entre receptores P2X4 e P2X7 em micróglia e que animais que não expressam os receptores P2X7 não desenvolvem dor crônica inflamatória e neuropática através da redução da liberação de IL-1 β (Chessell et al. 2005) analisamos a hipótese de que o bloqueio dos receptores P2X7 do corno dorsal da medula espinhal previne o estabelecimento da cronificação da dor muscular. Encontramos que o pré-tratamento com o antagonista seletivo de receptores P2X7 antes da carragenina apresenta uma redução na intensidade da dor, porém o efeito que ocorre quando os animais são tratados com o mesmo antagonista antes da injeção de PGE_2 se mostra visivelmente mais expressivo. Uma possibilidade é a de que a ativação dos receptores P2X7 ocorra de maneira mais tardia quando comparado aos receptores P2X4, no entanto para averiguar essa hipótese é necessário analisar o efeito de ambos receptores de maneira conjunta no comportamento doloroso, além de investigar a expressão desses receptores nas micróglia e neurônios ao longo da curva temporal.

No presente estudo, utilizamos o exercício físico como estratégia para ativação de receptores PPAR γ na medula espinhal e analisamos essa hipótese através da administração intratecal do antagonista seletivo de PPAR γ , GW9662. Foi visto que o exercício induziu o efeito hipoalgesico de modo que ao fim da curva não há diferença entre os animais que receberam o veículo salina e os animais exercitados. O pré tratamento com GW9662 pré injeção de carragenina e de PGE_2 foi capaz de reverter parcialmente a hipoalgesia induzida pelo

exercício físico, sugerindo que o exercício físico é capaz de ativar os receptores PPAR γ da medula espinhal e que os mesmos desempenham um papel na indução e manutenção da hiperalgesia muscular persistente (Figura 9B). No entanto, não podemos afirmar que a ativação de PPAR γ ocorreu nas micróglia, visto que a ativação desses receptores em neurônios do corno dorsal também são eficientes em reduzir a dor (Fu et al., 2021). Por isso, investigaremos via imunofluorescência a localização desses receptores para uma análise mais profunda do mecanismo de atuação dos receptores PPAR γ ativados via exercício físico na medula espinhal.

Os receptores PPAR γ são fatores de transcrição com importantes funções metabólicas (Li et al. 2013). Estudos utilizando agonistas de PPAR γ demonstram efeitos neuroprotetivos e de diminuição da lesão em modelos de neuropatologia (Victor et al., 2006;Zhao et al., 2006). Na medula espinhal em modelo de neuropatia, o tratamento com agonistas desse receptor reduz a produção de TNF- α e IL-1 β através do bloqueio dos receptores TLR4 microgliais (Jia et al., 2016).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o exercício físico previne o desenvolvimento da hiperalgesia aguda induzida por carragenina e que esse mecanismo pode ser dependente de PPAR γ que contribuem com a modulação de CINC-1 nesse processo (Azambuja et al., 2020). Além disso, nossa linha de estudos demonstrou que o exercício por si só é capaz de prevenir o desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente através da modulação fenotípica de macrófagos, ademais a ativação de receptores PPAR γ via exercício também induz a polarização de macrófagos de M1 com características predominantemente inflamatórias para M2, anti-inflamatório, assim prevenindo o desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente e modula a liberação de IL-10 (Azambuja et al., 2021).

Especificamente na micróglia, os receptores PPAR γ também atuam na modulação fenotípica dessas células na medula espinhal, uma vez que a utilização de um lentivírus para induzir a superexpressão do gene de PPAR γ no corno dorsal, foi capaz de diminuir a expressão do marcador de micróglia M1, CD86, além de reduzir a quimiocina envolvida no processo de comunicação inflamatória, CX3CR1, e a fosforilação de p38MAPK e ERK (Li et al., 2021).

A luz dos dados apresentados sugere-se um importante envolvimento de células e receptores do corno dorsal da medula espinhal no desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente de origem inflamatória, no entanto o mecanismo de ação das células da glia, dos receptores purinérgicos e PPAR γ ainda precisa ser investigado.

6. CONCLUSÃO:

O presente estudo demonstrou que micróglias e astrócitos participam do desenvolvimento da hiperalgesia muscular persistente de origem inflamatória e que ambas células atuam na indução e manutenção da hiperalgesia persistente. Ainda, apresentou o envolvimento dos receptores purinérgicos P2X4 e P2X7 do corno dorsal da medula espinhal no modelo de hiperalgesia inflamatória, e também demonstrou que ambos participam da hiperalgesia aguda e persistente. Além disso, os receptores PPAR γ do corno dorsal da medula espinhal são ativados em animais exercitados e atuam na hiperalgesia muscular persistente. Dessa maneira, o estudo caracterizou células e receptores do corno dorsal da medula espinhal que participam da resposta comportamental do modelo de hiperalgesia muscular persistente. Sendo assim, iremos investigar as possíveis vias de comunicação entre as possibilidades encontradas no estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Aley, K. O., Robert O. Messing, Daria Mochly-Rosen, and Jon D. Levine. 2000. "Chronic Hypersensitivity for Inflammatory Nociceptor Sensitization Mediated by the ϵ Isozyme of Protein Kinase C." *Journal of Neuroscience* 20 (12): 4680–85. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-12-04680.2000>.

Argoff, Charles. 2011. "Mechanisms of Pain Transmission and Pharmacologic Management." *Current Medical Research and Opinion* 27 (10): 2019–31. <https://doi.org/10.1185/03007995.2011.614934>.

Azambuja, Graciana de, Beatriz Botasso Gomes, Leonardo Henrique Dalcheco Messias, Bruna de Melo Aquino, Carolina Ocanha Jorge, Fúlvia de Barros Manchado-Gobatto, and Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira-Fusaro. 2020. "Swimming Physical Training Prevented the Onset of Acute Muscle Pain by a Mechanism Dependent of PPAR γ Receptors and CINC-1." *Neuroscience* 427: 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.12.017>.

Azambuja, Graciana de, Carolina O. Jorge, Beatriz B. Gomes, Hayla R. Lourenço, Fernando M. Simabuco, and Maria Claudia G. Oliveira-Fusaro. 2021. "Regular Swimming Exercise Prevented the Acute and Persistent Mechanical Muscle Hyperalgesia by Modulation of Macrophages Phenotypes and Inflammatory Cytokines via PPAR γ Receptors." *Brain, Behavior, and Immunity* 95 (April): 462–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.05.002>.

Bardoni, Rita, Alessia Ghirri, Micaela Zonta, Chiara Betelli, Giovanni Vitale, Valentina Ruggieri, Maurizio Sandrini, and Giorgio Carmignoto. 2010. "Glutamate-Mediated Astrocyte-to-Neuron Signalling in the Rat Dorsal Horn." *Journal of Physiology* 588 (5): 831–46. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.180570>.

Bastos, Leandro Francisco S., Leonardo A. Merlo, Leonardo Tadeu S. Rocha, and Márcio M. Coelho. 2007. "Characterization of the Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Doxycycline and Minocycline in Different Experimental Models." *European Journal of Pharmacology* 576 (1–3): 171–79. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.07.049>.

Bedard, A, P Tremblay, A Chernomoretz, and L Vallières. 2007. "Advancing Equity, Equality and Non-Discrimination in Food Systems : Pathways to Reform." *Glia* 55: 777–89. <https://doi.org/10.1002/glia>.

Bell, A. 2018. "The Neurobiology of Acute Pain." *Veterinary Journal* 237: 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.05.004>.

Bennett, Michael V. L, Jorge E Contreras, F Bukauskas, Feliksas, and Juan C. Sáez. 2003. "New Roles for Astrocytes: Gap Junction Hemichannels Have Something to Communicate." *Trends in Neurosciences* 26 (11): 610–17. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2003.09.008>.New.

Bernier, Louis Philippe, Ariel R. Ase, and Philippe Séguéla. 2018. "P2X Receptor Channels in Chronic Pain Pathways." *British Journal of Pharmacology* 175 (12): 2219–30. <https://doi.org/10.1111/bph.13957>.

Borsook, David, and Lino Becerra. 2011. "How Close Are We in Utilizing Functional Neuroimaging in Routine Clinical Diagnosis of Neuropathic Pain?" *Current Pain and Headache Reports* 15 (3): 223–29. <https://doi.org/10.1007/s11916-011-0187-1>.

Butovsky, Oleg, Mark P. Jedrychowski, Craig S. Moore, Ron Cialic, Amanda J. Lanser, Galina Gabriely, Thomas Koeglspenger, et al. 2014. "Identification of a Unique TGF- β -Dependent Molecular and Functional Signature in Microglia (Nature Neuroscience (2014) 17 (131-143))." *Nature Neuroscience* 17 (9): 1286. <https://doi.org/10.1038/nn0914-1286d>.

Chen, Jun. 2011. "History of Pain Theories." *Neuroscience Bulletin* 27 (5): 343–50. <https://doi.org/10.1007/s12264-011-0139-0>.

Chessell, Iain P., Jonathan P. Hatcher, Chas Bountra, Anton D. Michel, Jane P. Hughes, Paula Green, Julie Egerton, et al. 2005. "Disruption of the P2X7 Purinoceptor Gene Abolishes Chronic Inflammatory and Neuropathic Pain." *Pain* 114 (3): 386–96. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.01.002>.

Chiang, C. Y., B. J. Sessle, and J. O. Dostrovsky. 2012. "Role of Astrocytes in Pain." *Neurochemical Research* 37 (11): 2419–31. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0801-6>.

Choi, Sheu Ran, Ho Jae Han, Alvin J. Beitz, and Jang Hern Lee. 2019. "Spinal Interleukin-1 β Inhibits Astrocyte Cytochrome P450c17 Expression Which Controls the Development of Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Neuropathic Pain." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12 (June). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00153>.

Coddou, Claudio, Rodrigo Sandoval, and Stanko S Stojilkovic. 2020. "Characterization of the Antagonist Actions of 5-BDBD at the Rat P2X4 Receptor Claudio." *Neuroscience Letters*, 219–24. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.047.Characterization>.

Coull, Jeffrey A.M., Simon Beggs, Dominic Boudreau, Dominick Boivin, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Claude Gravel, Michael W. Salter, and Yves De Koninck. 2005. "BDNF from Microglia Causes the Shift in Neuronal Anion Gradient Underlying Neuropathic Pain." *Nature* 438 (7070): 1017–21. <https://doi.org/10.1038/nature04223>.

Danbolt, Niels C. 2018. "Glutamate Uptake Niels." *Progress in Neurobiology* 65: 1–105. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.04.004>.

Deng, Guo Chuang, Ming Lu, Ya Yu Zhao, Ying Yuan, and Gang Chen. 2019. "Activated Spinal Astrocytes Contribute to the Later Phase of Carrageenan-

Induced Prostatitis Pain.” *Journal of Neuroinflammation* 16 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1584-3>.

Dina, Olayinka A., Jon D. Levine, and Paul G. Green. 2008. “Muscle Inflammation Induces a Protein Kinase C ϵ -Dependent Chronic-Latent Muscle Pain.” *Journal of Pain* 9 (5): 457–62. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.01.328>.

Dinakar, Pradeep, and Alexandra Marion Stillman. 2016. “Pathogenesis of Pain.” *Seminars in Pediatric Neurology* 23 (3): 201–8. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2016.10.003>.

Dostrovsky, Jonathan O. 2000. “Role of Thalamus in Pain.” *Progress in Brain Research* 129 (1999): 245–57. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)29018-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)29018-3).

Dubin, Adrienne E., and Ardem Patapoutian. 2010. “Nociceptors: The Sensors of the Pain Pathway.” *Journal of Clinical Investigation* 120 (11): 3760–72. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>.

Echeverry, Stefania, Xiang Qun Shi, Mu Yang, Hao Huang, Yichen Wu, Louis Etienne Lorenzo, Jimena Perez-Sanchez, Robert P. Bonin, Yves De Koninck, and Ji Zhang. 2017. “Spinal Microglia Are Required for Long-Term Maintenance of Neuropathic Pain.” *Pain* 158 (9): 1792–1801. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000982>.

Fujita, Atsushi, Hiroo Yamaguchi, Ryo Yamasaki, Yiwen Cui, Yuta Matsuoka, Ken ichi Yamada, and Jun ichi Kira. 2018. “Connexin 30 Deficiency Attenuates A2 Astrocyte Responses and Induces Severe Neurodegeneration in a 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Hydrochloride Parkinson’s Disease Animal Model.” *Journal of Neuroinflammation* 15 (1): 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1251-0>.

Grace, Peter M., Mark R. Hutchinson, Steven F. Maier, and Linda R. Watkins. 2014. “Pathological Pain and the Neuroimmune Interface Peter.” *Nat Rev Immunol* 14 (4): 217–31. <https://doi.org/10.1038/nri3621>.Pathological.

Hains, Bryan C., and Stephen G. Waxman. 2006. “Activated Microglia Contribute to the Maintenance of Chronic Pain after Spinal Cord Injury.” *Journal of Neuroscience* 26 (16): 4308–17. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0003-06.2006>.

Hald, Andreas, Signe Nedergaard, Rikke R. Hansen, Ming Ding, and Anne Marie Heegaard. 2009. “Differential Activation of Spinal Cord Glial Cells in Murine Models of Neuropathic and Cancer Pain.” *European Journal of Pain* 13 (2): 138–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.03.014>.

Hansen, Rikke Rie, and Marzia Malcangio. 2013. “Astrocytes - Multitaskers in Chronic Pain.” *European Journal of Pharmacology* 716 (1–3): 120–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.023>.

Ho, Idy H.T., Matthew T.V. Chan, William K.K. Wu, and Xiaodong Liu. 2020. "Spinal Microglia-Neuron Interactions in Chronic Pain." *Journal of Leukocyte Biology* 108 (5): 1575–92. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0520-695R>.

Inoue, Kazuhide, and Makoto Tsuda. 2012. "Purinergic Systems, Neuropathic Pain and the Role of Microglia." *Experimental Neurology* 234 (2): 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.016>.

Jeong, Heejin, Young Ji Na, Kihwan Lee, Yong Ho Kim, Yunsin Lee, Minho Kang, Bao Chun Jiang, et al. 2016. "High-Resolution Transcriptome Analysis Reveals Neuropathic Pain Gene-Expression Signatures in Spinal Microglia after Nerve Injury." *Pain* 157 (4): 964–76. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000470>.

Jorge, Carolina Ocanha, Graciana de Azambuja, Beatriz Botasso Gomes, Hayla Lourenço Rodrigues, Augusto Ducati Luchessi, and Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira-Fusaro. 2020. "P2X3 Receptors Contribute to Transition from Acute to Chronic Muscle Pain." *Purinergic Signalling* 16 (3): 403–14. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09718-x>.

Kanamori, Keiko, and Brian D. Ross. 2006. "Kinetics of Glial Glutamine Efflux and the Mechanism of Neuronal Uptake Studied in Vivo in Mildly Hyperammonemic Rat Brain." *Journal of Neurochemistry* 99 (4): 1103–13. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04152.x>.

Kawasaki, Yasuhiko, Ling Zhang, Jen Kun Cheng, and Ru Rong Ji. 2008. "Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1 β , Interleukin-6, and Tumor Necrosis Factor- α in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord." *Journal of Neuroscience* 28 (20): 5189–94. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3338-07.2008>.

Kobayashi, Masaaki, Hiroyuki Konishi, Akira Sayo, Toshiyuki Takai, and Hiroshi Kiyama. 2016. "TREM2/DAP12 Signal Elicits Proinflammatory Response in Microglia and Exacerbates Neuropathic Pain." *Journal of Neuroscience* 36 (43): 11138–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1238-16.2016>.

Lalisse, Sarah, Jennifer Hua, Manon Lenoir, Nathalie Linck, François Rassendren, and Lauriane Ulmann. 2018. "Sensory Neuronal P2RX4 Receptors Controls BDNF Signaling in Inflammatory Pain." *Scientific Reports* 8 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19301-5>.

Landmark, Tormod, Pål R. Romundstad, Petter C. Borchgrevink, Stein Kaasa, and Ola Dale. 2013. "Longitudinal Associations between Exercise and Pain in the General Population - The HUNT Pain Study." *PLoS ONE* 8 (6): 4–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065279>.

Ledeboer, Annemarie, Evan M. Sloane, Erin D. Milligan, Matthew G. Frank, John H. Mahony, Steven F. Maier, and Linda R. Watkins. 2005. "Minocycline Attenuates Mechanical Allodynia and Proinflammatory Cytokine Expression in Rat Models of Pain Facilitation." *Pain* 115 (1–2): 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.02.009>.

Lin, Xinyu, Dingping Bai, Zixi Wei, Ying Zhang, Yifan Huang, Hui Deng, and Xiaohong Huang. 2019. "Curcumin Attenuates Oxidative Stress in RAW264.7 Cells by Increasing the Activity of Antioxidant Enzymes and Activating the Nrf2-Keap1 Pathway." *PLoS ONE* 14 (5): 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216711>.

Liu, Chien Cheng, Yong Jing Gao, Hao Luo, Temugin Berta, Zhen Zhong Xu, Ru Rong Ji, and Ping Heng Tan. 2016. "Interferon Alpha Inhibits Spinal Cord Synaptic and Nociceptive Transmission via Neuronal-Glial Interactions." *Scientific Reports* 6 (September): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep34356>.

Manjavachi MN, Motta EM, Marotta DM, Leite DFP, Calixto JB (2010) Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. *Pain* 151:345–355. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.07.018>

Marín-Teva, José L., Miguel A. Cuadros, David Martín-Oliva, and Julio Navascués. 2012. "Microglia and Neuronal Cell Death." *Neuron Glia Biology* 7 (1): 25–40. <https://doi.org/10.1017/S1740925X12000014>.

Meldrum, Marcia L. 2003. "A Capsule History of Pain Management." *Journal of the American Medical Association* 290 (18): 2470–75. <https://doi.org/10.1001/jama.290.18.2470>.

Mendell, Lorne M. 2014. "Constructing and Deconstructing the Gate Theory of Pain." *Pain* 155 (2): 210–16. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.12.010>.

Mense S, and Gerwin RD. 2010. Muscle Pain. Understanding the Mecanisms.

Mifflin, Katherine A., and Bradley J. Kerr. 2014. "The Transition from Acute to Chronic Pain: Understanding How Different Biological Systems Interact." *Canadian Journal of Anesthesia* 61 (2): 112–22. <https://doi.org/10.1007/s12630-013-0087-4>.

Milligan, Erin D., and Linda R. Watkins. 2009. "Pathological and Protective Roles of Glia in Chronic Pain." *Nature Reviews Neuroscience* 10 (1): 23–36. <https://doi.org/10.1038/nrn2533>.

Moayed, Massieh, and Karen D. Davis. 2013. "Theories of Pain: From Specificity to Gate Control." *Journal of Neurophysiology* 109 (1): 5–12. <https://doi.org/10.1152/jn.00457.2012>.

Monif, Mastura, Christopher A. Reid, Kim L. Powell, Katherine J. Drummond, Terrence J. O'Brien, and David A. Williams. 2016. "Interleukin-1 β Has Trophic Effects in Microglia and Its Release Is Mediated by P2X7R Pore." *Journal of Neuroinflammation* 13 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0621-8>.

Mosli, Hisham A., Ahmed M. Al-Abd, Marwa A. El-Shaer, Alaa Khedr, Faten S. Gazzaz, and Ashraf B. Abdel-Naim. 2012. "Local Inflammation Influences Oestrogen Metabolism in Prostatic Tissue." *BJU International* 110 (2): 274–82. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10796.x>.

Naugle, Kelly M, Roger B Fillingim, and Joseph L Riley Iii. 2013. "A Meta-Analytic Review of the Hypoalgesic Effects of Exercise." *J Pain* 13 (12): 1139–50. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.09.006.A>.

Nazemi, Samad, Homa Manaheji, Syeed Mohammad Noorbakhsh, Jalal Zaringhalam, Mehdi Sadeghi, Mohammad Mohammad-Zadeh, and Abbas Haghparast. 2015. "Inhibition of Microglial Activity Alters Spinal Wide Dynamic Range Neuron Discharge and Reduces Microglial Toll-like Receptor 4 Expression in Neuropathic Rats." *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 42 (7): 772–79. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12414>.

Nimmerjahn, A., Frank Kirchhoff, and F. Helmchen. 2005. "Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo." *Neuroforum* 11 (3): 95–96. <https://doi.org/10.1515/nf-2005-0304>.

Pace, Maria Caterina, Maria Beatrice Passavanti, Lorenzo de Nardis, Fabio Bosco, Pasquale Sansone, Vincenzo Pota, Manlio Barbarisi, et al. 2018. "Nociceptor Plasticity: A Closer Look." *Journal of Cellular Physiology* 233 (4): 2824–38. <https://doi.org/10.1002/jcp.25993>.

Padi, Satyanarayana S.V., and Shrinivas K. Kulkarni. 2008. "Minocycline Prevents the Development of Neuropathic Pain, but Not Acute Pain: Possible Anti-Inflammatory and Antioxidant Mechanisms." *European Journal of Pharmacology* 601 (1–3): 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.018>.

Pak, Daniel J., R. Jason Yong, Alan David Kaye, and Richard D. Urman. 2018. "Chronification of Pain: Mechanisms, Current Understanding, and Clinical Implications." *Current Pain and Headache Reports* 22 (2). <https://doi.org/10.1007/s11916-018-0666-8>.

Paolicelli, Rosa C., Giulia Bolasco, Francesca Pagani, Laura Maggi, Maria Sciani, Patrizia Panzanelli, Maurizio Giustetto, et al. 2011. "Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development." *Science* 333 (6048): 1456–58. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>.

Pascual, Olivier, Sarrah Ben Achour, Philippe Rostaing, Antoine Triller, and Alain Bessis. 2012. "Microglia Activation Triggers Astrocyte-Mediated Modulation of Excitatory Neurotransmission." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (4). <https://doi.org/10.1073/pnas.1111098109>.

Pozek, John Paul J., David Beausang, Jaime L. Baratta, and Eugene R. Viscusi. 2016. "The Acute to Chronic Pain

Salter, Michael W., and Simon Beggs. 2014. "Sublime Microglia: Expanding Roles for the Guardians of the CNS." *Cell* 158 (1): 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.008>.

Schafer, P. D, E. K Lehrman, G Kautzman, A, R Koyama, A. R Mardinly, R Yamasaki, R. M Ransohoff, M. E Greenberg, B. A Barres, and B Stevens. 2012.

"Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner." *Neuron* 74 (4): 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>. Microglia.

Schiavuzzo JG, Teixeira JM, Melo B, da Silva dos Santos DF, Jorge CO, Oliveira-Fusaro MCG, Parada CA (2015) Muscle hyperalgesia induced by peripheral P2X3 receptors is modulated by inflammatory mediators. *Neuroscience* 285:24–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.020>

Seeland, Swen, Hélène Kettiger, Mark Murphy, Alexander Treiber, Jasmin Giller, Andrea Kiss, Romain Sube, Stephan Krähenbühl, Mathias Hafner, and Jörg Huwyler. 2015. "ATP-Induced Cellular Stress and Mitochondrial Toxicity in Cells Expressing Purinergic P2X7 Receptor." *Pharmacology Research and Perspectives* 3 (2): 1–13. <https://doi.org/10.1002/prp2.123>.

Shieh, Chu Hsin, Annette Heinrich, Tsvetan Serchov, Dietrich van Calker, and Knut Biber. 2014. "P2X7-Dependent, but Differentially Regulated Release of IL-6, CCL2, and TNF- α in Cultured Mouse Microglia." *Glia* 62 (4): 592–607. <https://doi.org/10.1002/glia.22628>.

Solle, Mike, Jeff Labasi, David G. Perregaux, Ethan Stam, Nina Petrushova, Beverly H. Koller, Richard J. Griffiths, and Christopher A. Gabel. 2001. "Altered Cytokine Production in Mice Lacking P2X7 Receptors." *Journal of Biological Chemistry* 276 (1): 125–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006781200>.

Stevens, Beth, Nicola J. Allen, Luis E. Vazquez, Gareth R. Howell, Karen S. Christopherson, Navid Nouri, Kristina D. Micheva, et al. 2007. "The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination." *Cell* 131 (6): 1164–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>.

Šutulović, Nikola, Željko Grubač, Sonja Šuvakov, Đurđa Jovanović, Nela Puškaš, Đuro Macut, Aleksandra Rašić Marković, Tatjana Simić, Olivera Stanojlović, and Dragan Hrnčić. 2019. "Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome Increases Susceptibility to Seizures in Rats and Alters Brain Levels of IL-1 β and IL-6." *Epilepsy Research* 153 (November 2018): 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.eplesyres.2019.03.014>.

Suurväli, Jaanus, Pierre Boudinot, Jean Kanellopoulos, and Sirje Rüütel Boudinot. 2017. "P2X4: A Fast and Sensitive Purinergic Receptor." *Biomedical Journal* 40 (5): 245–56. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2017.06.010>.

Tanga, F. Y., V. Raghavendra, and J. A. DeLeo. 2004. "Quantitative Real-Time RT-PCR Assessment of Spinal Microglial and Astrocytic Activation Markers in a Rat Model of Neuropathic Pain." *Neurochemistry International* 45 (2–3): 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.06.002>.

Tikka, Tiina M., and Jari E. Koistinaho. 2001. "Minocycline Provides Neuroprotection Against N-Methyl-D-Aspartate Neurotoxicity by Inhibiting Microglia." *The Journal of Immunology* 166 (12): 7527–33. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7527>.

Trang, Tuan, and Michael W. Salter. 2012. "P2X4 Purinoceptor Signaling in Chronic Pain." *Purinergic Signalling* 8 (3): 621–28. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9306-7>.

Tremblay, Marie Ève, Beth Stevens, Amanda Sierra, Hiroaki Wake, Alain Bessis, and Axel Nimmerjahn. 2011. "The Role of Microglia in the Healthy Brain." *Journal of Neuroscience* 31 (45): 16064–69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011>.

Tsuda, Makoto, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, and Kazuhide Inoue. 2010. "Pain and Purinergic Signaling." *Brain Research Reviews* 63 (1–2): 222–32. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.003>.

Tsuda, Makoto. 2019. "Microglia-Mediated Regulation of Neuropathic Pain: Molecular and Cellular Mechanisms." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 42 (12): 1959–68. <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00715>.

Vaegter, Henrik Bjarke, and Matthew David Jones. 2020. "Exercise-Induced Hypoalgesia after Acute and Regular Exercise: Experimental and Clinical Manifestations and Possible Mechanisms in Individuals with and without Pain." *PAIN Reports* 5 (5): e823. <https://doi.org/10.1097/pr9.0000000000000823>.

Ventura, Rachel, and Kristen M. Harris. 1999. "Three-Dimensional Relationships between Hippocampal Synapses and Astrocytes." *Journal of Neuroscience* 19 (16): 6897–6906. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-16-06897.1999>.

Virgilio, Francesco Di, Günther Schmalzing, and Fritz Markwardt. 2018. "The Elusive P2X7 Macropore." *Trends in Cell Biology* 28 (5): 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.005>.

Wang, Victor C., and William J. Mullally. 2020. "Pain Neurology." *American Journal of Medicine* 133 (3): 273–80. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.07.029>.

Wonders, Karen Y, and Daniel G Drury. 2011. "Exercise Intensity as a Determinant of Exercise Induced Hypoalgesia Exercise Intensity as a Determinant of Exercise Induced Hypoalgesia." *Journal of Exercise Physiology Online* 14 (August): 134–44.

Zhang, Juanjuan, Siegfried Mense, Rolf Detlef Treede, and Ulrich Hoheisel. 2017. "Prevention and Reversal of Latent Sensitization of Dorsal Horn Neurons by Glial Blockers in a Model of Low Back Pain in Male Rats." *Journal of Neurophysiology* 118 (4): 2059–69. <https://doi.org/10.1152/jn.00680.2016>.