



Envolvimento do ciclo estral de camundongos fêmeas na modulação da dor muscular crônica pela IL-1 β liberada no corno dorsal da medula espinhal

Palavras-chave: hiperalgesia, medula espinhal, dimorfismo sexual.

Pesquisador responsável: Isabelle Caetano, RA 207057

Orientadora: Dra. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira

Co-Orientadora: Ms. Beatriz Botasso Gomes

Co-autora: Hayla Lourenço Rodrigues

Instituição sede: Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) da Unicamp – Limeira

Vigência: 2024/2025

Resumo:

Recentemente demonstramos que o bloqueio da IL-1 β liberada no músculo gastrocnêmio de camundongos machos durante a fase aguda da hiperalgesia muscular reduz o desenvolvimento da hiperalgesia muscular crônica. Além disso, estudos ainda não publicados pelo nosso laboratório demonstram que a IL-1 β liberada no corno dorsal da medula espinhal de camundongos machos parecem exercer o mesmo efeito sobre a hiperalgesia muscular crônica. Esses estudos sugerem que a IL-1 β liberada na periferia ou no sistema nervoso central exerce um papel na transição de dor muscular aguda para crônica. Sabe-se que existe dimorfismo sexual em diferentes condições dolorosas. No entanto, poucos estudos exploram o papel do ciclo estral na transição da dor muscular aguda em crônica. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o envolvimento do ciclo estral de camundongos fêmeas na modulação da dor muscular crônica pela IL-1 β liberada no corno dorsal da medula espinhal. Caso os resultados sejam positivos, avaliaremos se há aumento do receptor de IL-1 β , IL-1R1, no corno dorsal da medula espinhal após estímulo inflamatório no músculo gastrocnêmio de fêmeas e se esse processo também é modulado pelo ciclo estral.

Introdução:

As dores agudas e crônicas representam um grande problema de saúde mundial. De todas as dores que acometem o ser humano ao longo da sua existência, as dores musculares crônicas são uma das mais prevalentes. Acometem mais de 40% da população, são responsáveis por 29% das faltas ao trabalho e, muitas vezes, dificultam a movimentação funcional para as atividades de vida diárias.

Mulheres sentem dor crônica mais frequentemente que os homens assim como apresentam menores limiares de dor. As constantes flutuações nos hormônios ovarianos ao longo do ciclo menstrual, especialmente durante a idade reprodutiva, representam um grande impacto nas funções fisiológicas femininas, incluindo a neurofisiologia da dor. Existem evidências de que o dimorfismo sexual modula diferentes mecanismos neurofisiológicos associados à dor. Ainda, diversos medicamentos para o tratamento da dor crônica apresentam mecanismos de ação diferentes em ambos os sexos. Apesar disso, a maior parte dos estudos pré-clínicos ainda são realizados em homens e animais experimentais machos, o que impacta negativamente na eficiência dos tratamentos atualmente disponíveis para dor crônica.

Para possibilitar a investigação das estruturas envolvidas no processo de cronificação da dor, padronizamos um modelo experimental que nos permite isolar a fase aguda e crônica da dor muscular. O primeiro insulto consiste na administração de carragenina intramuscular, que é capaz de ativar e induzir migração de células do sistema imune, liberação de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e aminas simpatomiméticas causando uma hiperalgesia aguda que dura poucos dias. Após o limiar nociceptivo ter retornado ao normal, a administração de PGE₂ no mesmo local induz uma hiperalgesia muscular mais intensa e duradoura do que a primeira, evidenciando a sensibilização neuronal induzida pelo estímulo inflamatório inicial.

Recentemente, demonstramos que durante a fase aguda da hiperalgesia muscular há aumento da interleucina IL-1 β no músculo gastrocnêmio de camundongos machos. Além disso, em dados não publicados do nosso grupo de pesquisa, observamos que o bloqueio intratecal dos receptores de IL1, através da IL1ra administrada 48h após a carragenina, reduziu a hiperalgesia muscular aguda e crônica em machos, sugerindo que a IL-1 β liberada do corno dorsal da medula espinhal também participa da transição da dor muscular aguda em crônica.

Evidências apontam que a IL-1 β pode ser produzida pelas micróglias no corno dorsal da medula espinhal e atuar no aumento da transmissão nociceptiva no mesmo local, uma vez que a aplicação de LPS em machos induz uma rápida secreção de IL-1 β por micróglias ativadas do corno dorsal da medula espinhal. Apesar dessas evidências, não se sabe se o mesmo processo acontece em fêmeas.

Considerando o exposto acima, o objetivo geral do presente estudo é avaliar o envolvimento do ciclo estral de camundongos fêmeas na modulação da dor muscular crônica pela IL-1 β liberada no corno dorsal da medula espinhal. Para isso, utilizamos um modelo de transição da hiperalgesia muscular aguda em crônica, análise de ciclo estral e técnicas de biologia molecular.

Metodologia

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (com 2 meses de idade) provenientes do CEMIB/UNICAMP. O número de aprovação do comitê de ética foi 6014-1/2022. Carragenina (Cg, 100 μ g) foi injetada no músculo gastrocnêmio para induzir hiperalgesia muscular aguda e, 10 dias depois, PGE2 (1 μ g) foi injetada no mesmo local para evidenciar a hiperalgesia muscular crônica. O teste comportamental Randall-Selitto foi utilizado em diferentes momentos dos períodos agudo e crônico para quantificação do limiar hiperalgésico. Para determinar o ciclo estral, foi utilizada a técnica de lavagem vaginal. O envolvimento da IL-1 β foi avaliado por meio de injeção de IL-1ra, um antagonista do receptor de IL-1, 48 horas após a injeção de carragenina, na medula espinhal (L5-L6, 100 pg) e no músculo gastrocnêmio (10 ng). A análise estatística foi realizada pela Área Sob a Curva (AUC), utilizando ANOVA de uma via e o teste post-hoc de Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados e discussão:

A administração intratecal de IL-1ra (100 pg) 48h após a administração de carragenina no músculo gastrocnêmio não reduziu o desenvolvimento da hiperalgesia muscular crônica ($p > 0,05$, Two Way ANOVA, $n=5-6$, Figura 1A), mas reduziu sua manutenção ($p < 0,05$, Two Way ANOVA, Tukey pós teste, $n=5-6$, Figura 1A). A análise de AUC confirmou esses resultados ($p < 0,05$, OneWay ANOVA, Tukey pós teste, Figura 1B).

Figura 1.

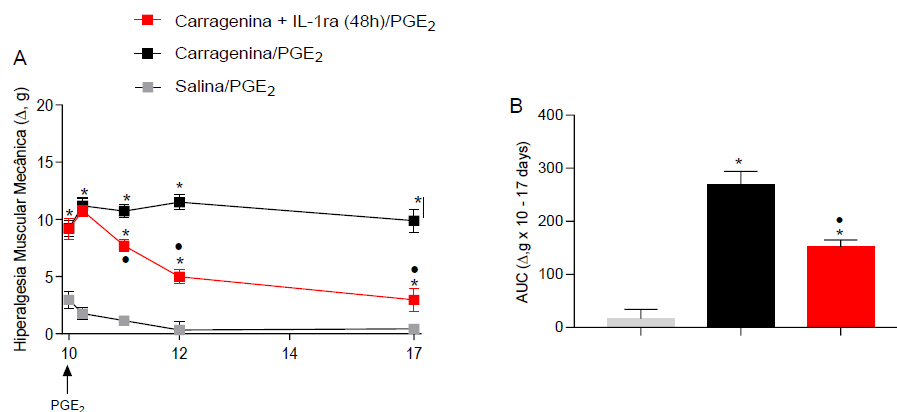


Figura 1. Tratamento intratecal com IL-1ra reduz a manutenção da hiperalgesia muscular crônica em fêmeas. A) Gráfico de linha demonstrando as respostas comportamentais induzidas pelo tratamento com IL-1ra. (B) Área sob a Curva (AUC) da fase crônica. O símbolo “*” indica diferença com grupo Salina e “●” indica diferença com grupo Carragenina. N=5-6 para todos os grupos.

Quando separamos as fêmeas pelo ciclo estral, observamos que não há diferença nas respostas comportamentais entre os ciclos analisados – estro e proestro, exceto pelo fato de que as fêmeas em estro parecem apresentar maior redução da hiperalgesia muscular crônica na fase de manutenção ($p>0,05$, Two Way ANOVA, $n=5-6$, Figura 2). Importante esclarecer que, nesses experimentos, apenas observamos os ciclos estrais em que se encontraram as fêmeas em experimento, ou seja, não separamos os ciclos para iniciar os experimentos. Isso justifica o número amostral ser baixo para alguns ciclos e não existir fêmeas tratadas nas fases em diestro e metaestro.

Figura 2.

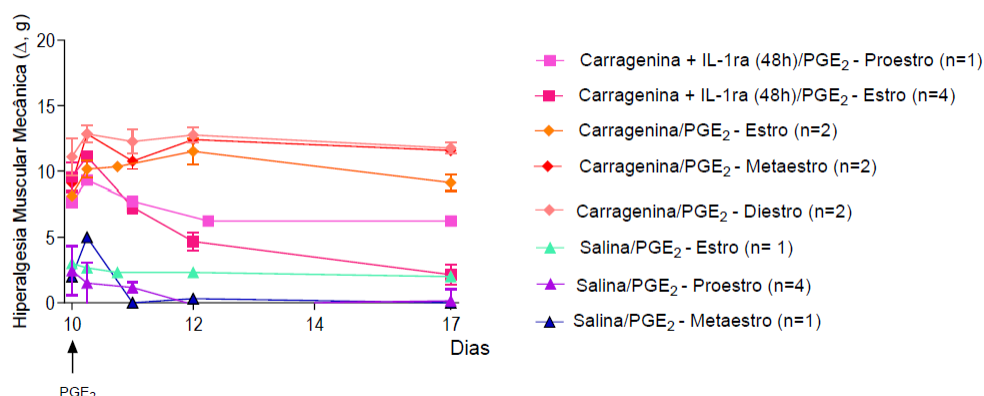


Figura 2. O tratamento com IL1ra em fêmeas não é modulado pelo ciclo estral. Gráfico de linha demonstrando as respostas comportamentais induzidas pela IL1ra nos diferentes ciclos estrais

de fêmeas. N=5-6 para todos os grupos (IL-1ra + Cg; sal; cg). O número amostral de cada ciclo estral está entre parênteses.

Conclusão:

Nossos dados sugerem que a IL-1 β liberada no corno dorsal da medula espinhal está envolvida na manutenção da hiperalgesia muscular inflamatória crônica em fêmeas, independentemente do ciclo estral.

Referências

Azambuja, G. de, Jorge, C. O., Gomes, B. B., Lourenço, H. R., Simabuco, F. M., & Oliveira-Fusaro, M. C. G. (2021).

Brain, Behavior, and Immunity, 95, 462-476. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.05.002>.

Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL 3rd. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. J Pain. 2009;10(5):447-85.

Dina et al., 2008; Ferrari et al., 2013 . <https://doi.org/10.1590/S0034-70942007000100011>

Mogil J.S (2020) Qualitative sex differences in pain processing: Emerging evidence of a biased literature. Nat. Rev. Neurosci. 21:353–365.

Jorge CO, de Azambuja G, Gomes BB, Rodrigues HL, Luchessi AD, de Oliveira-Fusaro MCG (2020) P2X3 receptors contribute to transition from acute to chronic muscle pain. Purinergic Signal 16:403–414.

Rusman T., van Vollenhoven R.F., van der Horst-Bruinsma I.E (2018) Gender Differences in Axial Spondyloarthritis: Women Are Not So Lucky. Curr. Rheumatol. Rep. 20:35.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (1983) Pain. Jun;16(2):109-110

Ferrari LF, Bogen O, Levine JD (2013) Role of Nociceptor CaMKII in Transition from Acute to Chronic Pain (Hyperalgesic Priming) in Male and Female Rats. J Neurosci 33:11002-11011.

Dina OA, Levine JD, Green PG (2008) Muscle inflammation induces a protein kinase Cepsilon-dependent chronic-latent muscle pain. J Pain 9:457–462.