

**UFRRJ  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS  
INFLAMATÓRIAS NA MEDULA ESPINHAL DE RATOS NA DOR PÓS-  
INCISIONAL**

**LIGIA LINS DE CASTRO**

**2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CITOCINAS  
INFLAMATÓRIAS NA MEDULA ESPINHAL DE RATOS NA DOR PÓS-  
INCISIONAL**

**LIGIA LINS DE CASTRO**

*Sob a orientação da professora*

**Dra. Magda Alves de Medeiros**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências  
Fisiológicas** no Programa  
Multicêntrico de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas área de  
concentração em Fisiologia.

Seropédica, RJ  
Junho de 2012

617.9195

C355i

T

Castro, Ligia Lins de, 1987-

Investigação da participação de citocinas inflamatórias na medula espinhal de ratos na dor pós-incisional / Ligia Lins de Castro - 2012.  
42 f.: il.

Orientador: Magda Alves de Medeiros.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.  
Bibliografia: f. 34-42.


1. Dor pós-operatória - Tratamento - Teses. 2. Dor pós-operatória - Aspectos fisiológicos - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. Dor em animais - Teses. 5. Rato como animal de laboratório - Teses. I. Medeiros, Magda Alves de, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

LIGIA LINS DE CASTRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa Multicêntrico de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/07/2012.



---

Profa. Dra. Magda Alves de Medeiros – UFRRJ  
(Orientadora)



---

Profa. Dra. Rosalia Mendez Otero – UFRJ



---

Prof. Dr. Frederico Argolo Vanderlinde – UFRRJ

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe e à minha irmã Luiza pelo amor e incentivo diário. À minha segunda mãe, tia Heide, que sempre fez de tudo para que eu seguisse o meu sonho. Ao meu pai, pesquisador no qual me espelho e ao Alex, pessoa com quem estou construindo uma vida.*



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Magda Alves de Medeiros, que muito me ensinou, me fez crescer e sempre me apoiou.

Ao Prof. Thiago Matar Cunha por ter me estendido a mão e ter me recebido tão bem em Ribeirão Preto.

Ao Rafael Fais e à Natália Monnerat por terem se dedicado intensamente aos meus experimentos e pela amizade.

Ao Jhimmy pela ajuda em meus experimentos.

À Fabrícia por esses anos todos de amizade e por tornar tudo tão divertido! À Raquel Nascimento, companheira dos sufocos e dos “papos-cabeça”, outra grande amiga.

À Andrea, com quem cursei quase todos os meus créditos, outra grande amiga, que mesmo na UFRJ foi muito importante na minha vida acadêmica.

À professora Rosalia Mendez Otero, por ter se colocado a disposição para me ajudar no que fosse preciso.

Ao professor Frederico por permitir que eu continuasse com os experimentos do seu aluno e pela atenção que deu durante esse tempo.

Ao mestre Luis, pelos conselhos e por ensinamentos essenciais à minha vida. À professora Norma por ter me ajudado nos experimentos e à professora Silvia por ter me cedido seu espaço.

Aos demais professores Emerson, Wellington, Jairo, e Fabio, que junto aos mestres Luis e Fred contribuíram para a minha formação e aos professores Alba, Bruno e Michele que também têm se esforçado para o crescimento do Departamento.

Aos meus colegas do laboratório: Claudinho, Rafael, Raquel Teixeira, Robertinho, Marissa, Anderson, Claudinho e Fonkas. À Cema, por ser tão prestativa e pelos valiosos conselhos e ao Danilo, meu saudoso amigo.

Às pessoas que me acolheram tão bem em Ribeirão Preto: Ieda, Serginho e Marquinhos (os melhores técnicos do mundo) e aos alunos da pós-graduação da Farmacologia de Ribeirão: Guilherme, Flávia, David, Miriam, Gláucia, Rafael Poloni e Andreza. Nunca vou esquecer o apoio que todos me deram.

Aos funcionários do Departamento Franklin, Maria Rita, Dona Leni, Seu Nei, Juca e Seu Ambrósio.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Alex, meu noivo e melhor amigo, por me tornar uma pessoa melhor a cada dia e por esse amor tão bonito, por ser tão presente e por fazer parte de cada conquista da minha vida.

À minha tia Heide, por todo o amor e carinho que me dá e por dedicar parte da sua vida a mim.

Ao meu pai pelo carinho e pelos sábios conselhos científicos.

À minha mãe e minha irmã que seguraram tantas barras, por desejarem tanto meu sucesso e por me incentivarem, e ao Toby, meu irmão de quatro patas que eu amo tanto, por tornar meus dias mais alegres.



## RESUMO

CASTRO, Ligia. **Investigação da participação de citocinas inflamatórias na medula espinhal de ratos na dor pós-incisional.** 2012 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

As diversas modalidades de dor são geradas e mantidas por diferentes mecanismos fisiopatológicos, devendo ser estudadas independentemente. A dor pós-operatória é uma forma comum e única de dor aguda e apesar dos avanços em seu estudo, permanece subtratada. Por causa da persistência da dor mesmo após o uso de medicamentos antiinflamatórios e opioides, postulamos que as citocinas possam desempenhar papel chave na dor pós-cirúrgica. Por meio de dados obtidos de testes nociceptivos, analisamos a concentração de citocinas inflamatórias liberadas pelo segmento lombar da medula espinhal de ratos submetidos ao modelo de dor pós-operatória. No teste de von Frey e no teste de Hargreaves, utilizados para avaliar a hiperalgesia mecânica e térmica, respectivamente, os animais tiveram redução dos limiares de retirada 1 hora após a incisão plantar que pode observada até as 72 horas após a cirurgia, quando comparados com animais sem incisão. Com base nesses resultados, foram feitas análises da liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 liberadas pela região lombar da medula espinhal pelo método de quimiluminescência às 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a incisão plantar. Através da técnica de qRT-PCR, as expressões gênicas de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e GFAP também foram avaliadas nos tempos de 2, 6, 48 e 72 horas após a incisão. Não houve alteração da liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-4. Ocorreu diminuição significativa da liberação de IL-10 48 horas após a incisão quando comparado aos animais não incidados. Não houve alteração da expressão gênica de IL-1 $\beta$ , no entanto foi observado um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e GFAP 6 horas após a incisão quando comparados com animais não submetidos à incisão plantar. A incisão plantar não parece alterar a liberação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-4. A manutenção da dor pós-operatória não está associada a uma queda sustentada dos níveis de IL-10. O aumento da expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  condiz com o aumento da expressão de RNAm de GFAP e indica possível papel dos astrócitos na liberação da citocina. Porém, a manutenção da dor pós-operatória não está associada a um aumento constante da expressão gênica de TNF- $\alpha$ . O papel da liberação desta citocina na medula espinal no modelo de dor pós-operatória, assim como a confirmação da participação dos astrócitos necessitam ser investigados.

**Palavras-chave:** dor pós-operatória, nocicepção, citocinas

## ABSTRACT

CASTRO, Ligia. **Investigation of the involvement of inflammatory cytokines in rat spinal cord in incisional pain.** 2012. 42 p. Dissertation (Master Science in Physiological Sciences). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

The several types of pain are generated and maintained by different pathophysiological mechanisms, and should be studied independently. The postoperative pain is a common and single form of acute pain and despite advances in their study, remains undertreated. Because of persistent pain, even after the use of anti-inflammatory drugs and opioids, we postulated that cytokines may play a key role in post-surgical pain. By means of the data obtained from nociceptive tests, we analyzed the concentration of inflammatory cytokines released by the lumbar segment of spinal cord of rats submitted to the model of postoperative pain. In the von Frey test and Hargreaves test, used to evaluate the mechanical and thermal hyperalgesia, respectively, the animals had a reduction of paw withdrawal thresholds at 1 hour after plantar incision that can be observed until 72 hour after the surgery when compared to animals without incision. Based on these results, the releasing of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  and anti-inflammatory cytokines IL-10 e IL-4 released by the lumbar spinal cord were analyzed by the chemiluminescence method at 2, 4, 6, 8, 12, 24,48 and 72 hours after the plantar incision. Using the qPCR-RT technique, the gene expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and GFAP were also evaluated at 2, 6, 48 and 72 hours following incision. There was a significant decrease in the release of IL-10 48 hours after the incision when compared to not incised animals. There was no change in the gene expression of IL-1 $\beta$ , however, there was increased in the expression of TNF- $\alpha$  and GFAP 6 hours after the incision when compared to animals not submitted to plantar incision. The plantar incision does not alter the release of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-4. The maintenance of postoperative pain is not associated with sustained decrease in levels of IL-10. The increase of the expression of TNF- $\alpha$  mRNA is consistent to the increase of the expression of GFAP mRNA and indicates a possible role of astrocytes in the release of cytokines. However, the maintenance of postoperative pain is not associated with constant increase of gene expression of TNF- $\alpha$ . The role of spinal cord release of cytokine in model of postoperative, as well as confirmation of contribution of astrocytes needs investigation.

**Key Word:** postoperative pain, nociception, cytokines

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das vias nociceptivas. As fibras aferentes nociceptivas (A $\beta$ , A $\delta$  e C) têm os corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) e transmitem os impulsos nervosos até o corno dorsal da medula espinhal. Neurônios de projeção da lâmina I (NS) inervam o núcleo parabraquial (PB) e substância cinzenta periaquidutal (PAG), que se comunicam com o sistema límbico. Dessas regiões partem projeções descendentes que se dirigem a núcleos do tronco encefálico, como o bulbo ventro medial rostral (RVM). Os núcleos da lâmina V (WDR) dirigem-se ao tálamo, onde se projetam para as regiões corticais. p. 5

Figura 2 - Mecanismos de atuação da proteína SOCS. a. Estrutura da proteína SOCS. b. A proteína SOCS atua se ligando diretamente ao receptor, se ligando à Janus quinase ou inibindo a proteína STAT. SOCS1, SOCS3 e CIS fazem parte da família de proteínas SOCS, que é constituída por oito membros. p. 13

Figura 3 - Etapas do procedimento cirúrgico de incisão plantar, conforme descrito por Brenann et al. (1996). p. 15

Figura 4 - Aparelho utilizado para o teste de hiperalgesia mecânica - von Frey. A figura ilustra o box de acrílico amparado na superfície gradeada e o espelho que auxilia a inserção do transdutor de força através da grade. p. 16

Figura 5 - Aparelho utilizado para o teste de hiperalgesia térmica - Hargreaves. A figura ilustra o local aonde o animal permanece enquanto o estímulo térmico é emitido através da superfície de vidro (circunferência localizada no centro do aparelho). p. 17

Figura 6 - Esquema do procedimento de dosagem das citocinas centrais pela técnica de quimiluminescência do MILLIPLEX xMAP® technology. p. 19

Figura 7 - Escala temporal da avaliação da hiperalgesia mecânica e da hiperalgesia térmica dos animais submetidos à cirurgia de incisão plantar. p. 21

Figura 8 - Escala temporal da coleta do seguimento L4-L6 da medula dos animais submetidos à cirurgia de incisão plantar para a dosagem de citocinas centrais. p. 21

Figura 9 - Escala temporal da coleta do seguimento L4-L6 da medula dos animais submetidos à cirurgia de incisão plantar para a avaliação da expressão de RNAm de citocinas centrais e GFAP. p. 21

Figura 10 - Gráfico comparando os grupos não incisado (N=4) e incisado (N=7) submetidos ao teste de von Frey. Os símbolos ● e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de limiares de retirada de pata medida em gramas por grupo ao longo das horas após a cirurgia de incisão plantar em ratos. \* indica diferença entre o grupo incisado e o grupo não incisado. p. 23

Figura 11 - Gráfico comparando os grupos não incisado (N=4) e incisado (N=7) submetidos ao teste de Hargreaves. Os símbolos ● e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de latência de retirada de pata expressa em segundos por grupo ao longo das horas após a cirurgia de incisão plantar em ratos. \* indica diferença entre o grupo incisado e o grupo não incisado. p. 24

Figura 12 - Gráfico comparando a concentração de IL-1 $\beta$  liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 4 (N=4), 6 (N=4), 8 (N=3), 12 (N=4), 24 (N=3), 48 (N=3) e 72 (N=4) horas após a incisão plantar com ratos não operados (N=3). As colunas ● e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em pg/mL. p. 25

Figura 13 - Gráfico comparando a concentração de IL-6 liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 4 (N=4), 6 (N=4), 8 (N=3), 12 (N=3), 24 (N=3), 48 (N=3) e 72 (N=4) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=3). As colunas ● e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em pg/mL. p. 26

Figura 14 - Gráfico comparando a concentração de TNF- $\alpha$  liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 4 (N=3), 6 (N=4), 8 (N=3), 12 (N=4), 24 (N=3), 48 (N=3) e 72 (N=3) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=3). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em pg/mL. p. 27

Figura 15 - Gráfico comparando a concentração de IL-10 liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=3 em cada grupo). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em pg/mL.\* compara com o grupo analisado 72 horas, + compara com o grupo analisado 4 horas, # compara como grupo analisado as 8 horas e X compara com o grupo CTL. p. 28

Figura 16 - Gráfico comparando a concentração de IL-4 liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 4 (N=4), 6 (N=4), 8 (N=3), 12 (N=4), 24 (N=3), 48 (N=3) e 72 (N=4) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=3). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em pg/mL. p. 29

Figura 17 - Gráfico comparando a expressão de RNAm da IL-1 $\beta$  na medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 6 (N=3), 48 (N=4) e 72 (N=2) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=4). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da expressão de RNAm da IL-1 $\beta$  expressa em unidade arbitrária. p. 30

Figura 18 - Gráfico comparando a expressão de RNAm da TNF- $\alpha$  na medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 6 (N=3), 48 (N=4) e 72 (N=3) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=4). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da expressão de RNAm da TNF- $\alpha$  expressa em unidade arbitrária. \* compara o grupo analisado 6 horas após a incisão com os demais grupos. p. 31

Figura 19 - Gráfico comparando a expressão de RNAm de GFAP na região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=2), 6 (N=3), 48 (N=4) e 72 (N=4) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=4). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da expressão de RNAm de GFAP expressa em unidade arbitrária. \* compara o grupo analisado 6 horas após a cirurgia com o grupo analisado as 2 horas e # com o grupo analisado as 72 horas após a cirurgia. p. 32

## LISTA DE SIGLAS

A2AR	receptores de adenosina A2 (do inglês)
AINES	anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (do inglês)
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina (do inglês)
ANOVA	análise de variância
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês)
CGRP	peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina (do inglês)
CB <sub>1</sub>	receptor canabinoide do tipo 1
CB <sub>2</sub>	receptor canabinoide do tipo 2
cDNA	DNA complementar (do inglês)
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês)
CR3	receptor do fator complemento 3
CRPS	condição crônica intolerável (do inglês)
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase-2
EGF	fator de crescimento epidérmico (do inglês)
ELISA	ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do inglês)
GABA	ácido gama-aminobutírico (do inglês)
G-CSF	fator estimulador de colônias granulocitárias (do inglês)
GFAP	proteína glial fibrilar ácida (do inglês)
IBA-1	proteína adaptadora ligante de cálcio1 (do inglês)
IL-1	interleucina-1
IL-6	interleucina-6
IL-4	interleucina-4
IL-8	interleucina-8

IL-10	interleucina-10
iNOS	óxido nítrico sintase induzível (do inglês)
JAK	janus quinase (do inglês)
LTP	potencialização de longo termo (do inglês)
MAPK	proteína cinase ativadora de mitógeno (do inglês)
NGF	fator de crescimento nervoso (do inglês)
NK1	neurocinina 1 (do inglês)
NMDA	N-metil-D-aspartato (do inglês)
PGE2	prostaglandina E2
PKC	proteína quinase C (do inglês)
qRT-PCR	reação de cadeia em polimerase-transcriptase reversa quantitativa
SA-PE	estreptavidina-ficoeritina (do inglês)
SNC	sistema nervoso central
STAT	proteínas transdutoras do sinal e ativadoras da transcrição (do inglês)
SOCS	supressora da sinalização de citocinas (do inglês)
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral (do inglês)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 <i>Objetivos</i> .....	3
1.1.1 <i>Objetivo geral</i> .....	3
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 <i>Dor</i> .....	4
2.2 <i>Dor Pós-Operatória</i> .....	6
2.2.1 <i>Sensibilização periférica</i> .....	6
2.2.2 <i>Sensibilização central</i> .....	7
2.3 <i>Citocinas Inflamatórias</i> .....	9
3.1 <i>Animais</i> .....	12
3.2 <i>Procedimento Cirúrgico</i> .....	12
3.3 <i>Testes Nociceptivos</i> .....	12
3.3.1 <i>Teste de von Frey</i> .....	13
3.3.2 <i>Teste de Hargreaves</i> .....	14
3.4 <i>Coleta e Preparação dos Tecidos</i> .....	14
3.5 <i>Quantificação das Citocinas Centrais</i> .....	15
3.6 <i>Expressão de RNAm das Citocinas Centrais e GFAP</i> .....	17
3.7 <i>Delineamentos Experimentais</i> .....	17
3.7.1 <i>Avaliação da hiperalgesia</i> .....	17
3.7.2 <i>Curso temporal de liberação de citocinas centrais</i> .....	17
3.7.3 <i>Curso temporal da expressão de RNAm de citocinas centrais e GFAP</i> .....	18
3.8 <i>Análise Estatística</i> .....	18
3. RESULTADOS.....	19
4.1 <i>Teste de Hiperalgesia Mecânica-von Frey</i> .....	19
4.2 <i>Teste de Hiperalgesia Térmica-Hargreaves</i> .....	20
4.3 <i>Concentração de IL-1<math>\beta</math> na Medula Espinhal</i> .....	21
4.4 <i>Concentração de IL-6 na Medula Espinhal</i> .....	22
4.5 <i>Concentração de TNF-<math>\alpha</math> na Medula Espinhal</i> .....	23
4.6 <i>Concentração de IL-10 na Medula Espinhal</i> .....	24
4.7 <i>Concentração de IL-4 na Medula Espinhal</i> .....	25



4.8 Expressão do RNAm da IL-1 $\beta$ na Medula Espinhal .....	26
4.9 Expressão do RNAm de TNF- $\alpha$ na Medula Espinhal .....	27
4.10 Expressão do RNAm de GFAP na Medula Espinhal .....	28
5. DISCUSSÃO .....	29
5.1 Testes Nociceptivos .....	29
5.2 Análises das Concentrações de Citocinas Inflamatórias na Medula Espinhal .....	29
5.3 Análise da Expressão de RNAm de Citocinas Inflamatórias e GFAP na Medula Espinhal.....	31
6. CONCLUSÕES .....	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

# 1. INTRODUÇÃO

A dor é a percepção desagradável da sensação nociceptiva e envolve duas componentes: a nocicepção e a percepção. A percepção da dor é modulada pelas condições motivacionais e emocionais, enquanto a nocicepção resulta da ativação de subpopulações de neurônios sensoriais específicos que transmitem a informação nociceptiva para a medula espinhal, de onde será enviada para regiões supra-espinhais. A dor é a razão da procura de clínicas médicas num terço dos casos e está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam consultas médicas por outros motivos. O tratamento inadequado da causa da dor pode acarretar dor crônica, situação vivida por 28% dos brasileiros, segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor.

A dor pós-operatória é uma forma comum e única de dor aguda. Uma analgesia eficiente pode fornecer conforto ao paciente, reduzindo a morbidade e a mortalidade após a cirurgia. Entretanto, apesar dos avanços nas pesquisas clínicas e pré-clínicas contribuírem para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da dor, a dor pós-operatória continua ser um problema. Cerca de 40% dos pacientes recém-operados continuam a sentir dor moderada a extrema mesmo com o uso de medicamentos, indicando que a dor aguda é subtratada. Somente nos Estados Unidos, quase 100 milhões de cirurgias são realizadas anualmente, e mais de 80% dos pacientes relatam dor pós-operatória. A dor persistente se desenvolve em um de cada dez pacientes cirúrgicos e torna-se uma condição crônica intolerável (CRPS-like-Complex Regional Pain Syndrome-like) em uma de cada cem cirurgias, independente do tipo de intervenção realizada. Os gastos estimados com um paciente de 30 anos com dor crônica, até o final da vida, são estimados em 1 milhão de dólares.

Existem amplas evidências de que a dor causada pela inflamação, lesão de nervos ou pela incisão, esteja relacionada a diferentes mecanismos fisiopatológicos, explicando por que muitas estratégias terapêuticas são eficazes somente contra algumas formas de dor persistente.

Por ser um relevante problema terapêutico, modelos clínicos ou pré-clínicos de dor pós-cirúrgica tornaram-se extremamente importantes para investigação dos mecanismos fisiopatológicos da dor persistente e para a avaliação de novas terapias analgésicas. Estes modelos têm permitido também o entendimento dos mecanismos farmacológicos da analgesia pré-empitiva, por meio da comparação dos efeitos da administração dos componentes antes ou durante a cirurgia com a administração imediatamente após a cirurgia.

Sendo a sensibilização central um importante agravante da dor pós-incisional, alguns pesquisadores propõem que o bloqueio da entrada do estímulo nocivo na medula espinhal antes da lesão tecidual reduziria a dor pós-operatória de forma mais efetiva que o bloqueio após a lesão. Clinicamente, a dor pós-incisional é a maior causa do consumo crônico de opioides por pacientes, que por muitas vezes acabam utilizando doses muito maiores do que as prescritas, por não atingirem um nível de conforto ideal. Já o uso crônico pré-cirúrgico gera aumento de citocinas e da hiperalgesia mecânica em ratos, que pode persistir por até sete dias pós-incisão. A administração de morfina no momento da cirurgia também pode gerar sensibilização periférica excessiva.

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINES) são utilizados para a redução da hiperalgesia gerada pela dor pós-incisional. Atuam inibindo a síntese de mediadores da

reação inflamatória, tais como prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, responsáveis pelo estímulo dos nociceptores, e nos últimos anos vêm ganhando um interesse maior por sua analgesia ser equiparada, ou até ser superior, aos opioides em cirurgias ortopédicas. Porém, eles promovem alguns efeitos colaterais tais como alterações na função renal e gastrointestinal e inibição da agregação de plaquetas, aumentando o tempo para a coagulação sanguínea. Na dor inflamatória, a liberação de citocinas e quimiocinas precede a liberação de prostaglandinas e aminas simpáticas, podendo sensibilizar diretamente os nociceptores, e dessa maneira têm sido apontadas como possíveis alvos no desenvolvimento de novas drogas e terapias.

Devido à persistência da dor pós-operatória mesmo após o uso de medicamentos, postulamos que as citocinas também desempenham papel chave neste modelo de dor, sendo fundamental avaliar o curso de liberação de citocinas no momento pós-cirúrgico.

## ***1.1 Objetivos***

### ***1.1.1 Objetivo geral***

O objetivo desse estudo foi estudar a relação entre a manutenção da hiperalgesia e a liberação das citocinas inflamatórias na medula espinhal no modelo de dor pós-operatória em ratos.

### ***1.1.2 Objetivos específicos***

1 - Avaliar o curso temporal de hiperalgesia gerada pelo modelo de incisão plantar em ratos.

2 - Avaliar a concentração das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 na região lombar da medula espinhal liberadas em diferentes tempos após a cirurgia de incisão plantar em ratos pelo método de quimiluminescência.

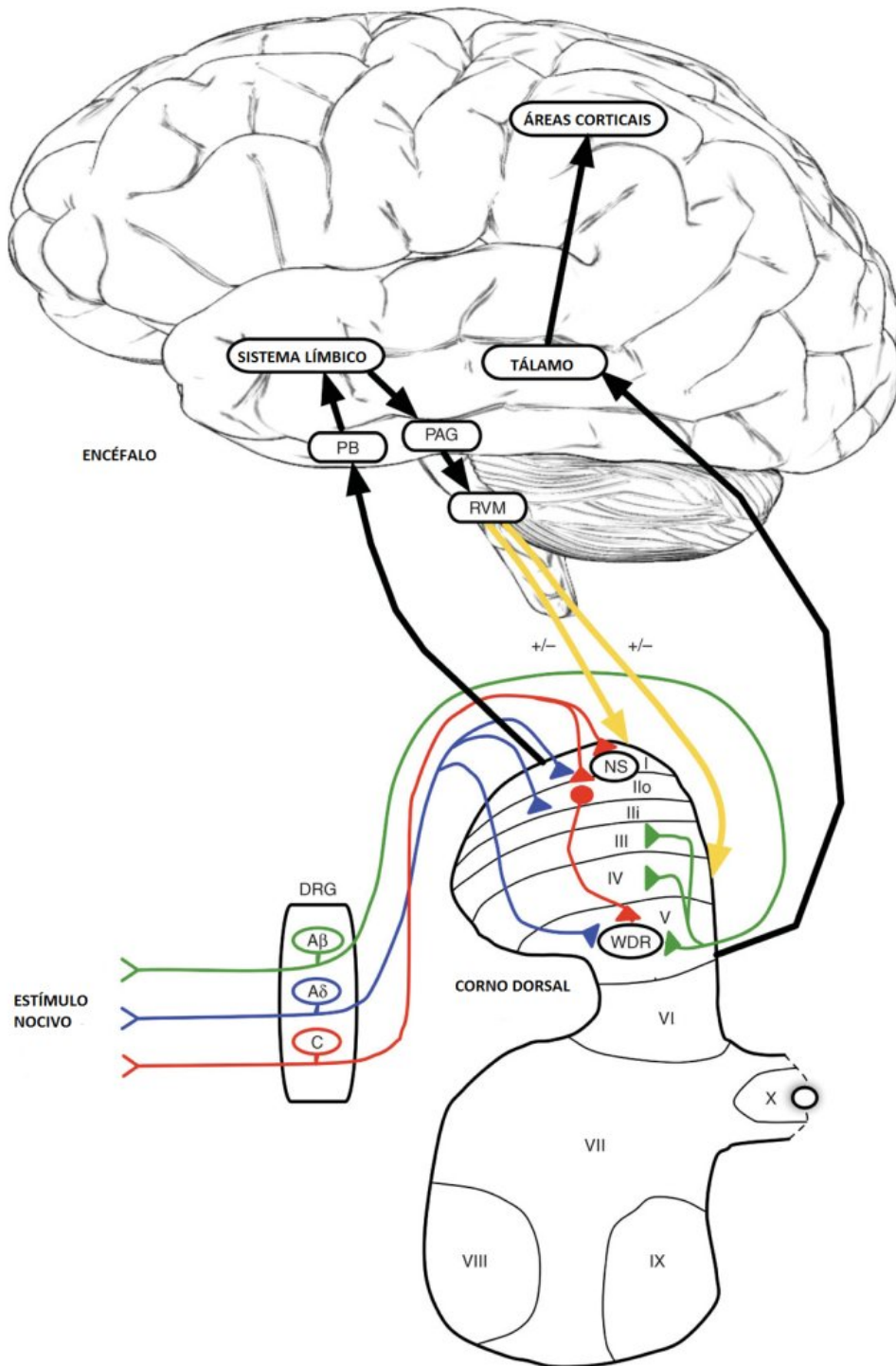
3 - Avaliar a expressão de RNAm das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e do marcador de astrócitos reativos, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), na região lombar da medula espinhal liberadas em diferentes tempos após a cirurgia de incisão plantar em ratos pelo método qRT-PCR.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Dor

Na experiência dolorosa, primeiramente ocorre a transformação do estímulo nocivo em potenciais de ação que ativam os nociceptores, nas terminações de fibras nervosas C, A $\delta$  e A $\beta$  (LOEWENSTEIN, 1971). BISHOP (1958) demonstrou que os sinais das fibras C e A $\delta$ - $\beta$  são sensações de dor distintas. Isto ocorre porque as fibras do tipo C são amielinizadas e as fibras do tipo A são mielinizadas, causando uma resposta bifásica à dor.

Os corpos celulares dos dois tipos de fibras nociceptivas, chamadas de neurônios de primeira ordem, estão contidos no gânglio da raiz dorsal e os seus axônios se projetam no corno dorsal da medula espinhal, que é organizado em diferentes lâminas (TODD, 2002). A maioria das fibras nociceptivas C e A $\delta$  terminam nas lâminas superficiais I e II e um pequeno número nas lâminas profundas, enquanto que as fibras A $\beta$  se comunicam com as lâminas III-VI (TODD, 2002). Os neurônios de segunda ordem da dor, chamados de neurônios de projeção, emitem axônios a partir das lâminas profundas III-VI dentro da medula espinhal que cruzam para o lado oposto e se incorporam aos feixes espinotalâmicos, localizados na coluna anterolateral da medula espinhal. Os feixes espinotalâmicos ascendem pela medula espinhal até o tronco encefálico, onde formam o lemnisco espinhal junto às fibras nociceptivas do núcleo espinhal do trigêmeo. Os impulsos são veiculados para o tálamo, onde estão os núcleos de terceira ordem, cujos axônios se projetam nos córtices somestésicos primários e secundários, ínsula, cíngulo anterior e córtex pré-frontal (TRACEY & MANTYH, 2007). Essa via fornece o componente sensorial da experiência dolorosa. Os neurônios de projeção que saem da lâmina I ascendem para a substância cinzenta periaquedutal, núcleo parabraquial e medula ventral medial rostral, onde há projeções descendentes de volta ao corno dorsal da medula espinhal (TODD, 2002). O percurso descendente pode ser influenciado por regiões límbicas e incorporar o componente emocional à experiência da dor (D'MELLO & DICKENSON, 2008) (Figura 1).



**Figura 1:** Representação esquemática das vias nociceptivas. As fibras aferentes nociceptivas (A $\beta$ , A $\delta$  e C) têm os corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) e transmitem os impulsos nervosos até o corno dorsal da medula espinhal. Neurônios de projeção da lâmina I (NS) inervam o núcleo parabraquial (PB) e substância cinzenta periaquidutal (PAG), que se comunicam com o sistema límbico. Dessas regiões partem projeções descendentes que se dirigem a núcleos do tronco encefálico, como o bulbo ventro medial rostral (RVM). Os núcleos da lâmina V (WDR) dirigem-se ao tálamo, onde se projetam para regiões corticais. Modificado de D’MELLO & DICKENSON, 2008.

## **2.2 Dor Pós-Operatória**

A lesão cirúrgica provoca duas mudanças na capacidade de resposta do sistema nociceptivo: a sensibilização periférica e a sensibilização central. Juntas, estas alterações contribuem para a dor aguda pós-incisional no processamento da informação nociceptiva e não-nociceptiva (BRENNAN et al., 2005).

### **2.2.1 Sensibilização periférica**

A sensibilização periférica conduz à hiperalgesia primária que é definida como uma resposta exagerada a um estímulo doloroso no local da lesão, provocando um aumento na resposta ao estímulo térmico e mecânico na área de incisão. Ela envolve as fibras aferentes primárias e é caracterizada pela redução do limiar de resposta, aumento na magnitude da resposta para estímulos supralimiares, aumento na atividade espontânea, bem como aumento da área em que estímulos geram potenciais de ação (BRENNAN et al., 2005).

Segundo POGATZKI et al. (2001), os nociceptores da fibra A $\delta$  e C são sensibilizados pela incisão, convertendo nociceptores mecanicamente latentes ou insensíveis em fibras ativas, com um importante papel na manutenção da hiperalgesia após a incisão. Um mecanismo importante de hipersensibilidade primária e sensibilização de nociceptores é induzido pela liberação de mediadores inflamatórios, vasodilatação e acidose local (POGATZKI et al., 2007).

A sensibilização de nociceptores e hiperalgesia após a incisão (CHAORAN et al., 2007; ROCHA et al., 2007) é decorrente da ação das seguintes substâncias algio gênicas presentes no ambiente tissular: acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrienos, substância P, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íons potássio, prostaglandinas, tromboxano, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento nervoso (NGF) e monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (BEDBROOK, 1976; CAMPBELL et al., 1989; PIOTROWSKI & FOREMAN, 1986). Há o desencadeamento de um processo inflamatório seguido de reparação do tecido (ROCHA et al., 2007).

As células lesadas liberam enzimas de seu interior, que no ambiente extracelular degradam ácidos graxos de cadeia longa e atuam sobre os cininogênios, dando origem à formação de cininas, como a calidina, que é convertida em bradicinina por enzimas teciduais. Uma vez formada, a bradicinina provoca intensa dilatação arteriolar e aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para a propagação da reação inflamatória (ROCHA et al., 2007).

Também, a ação da fosfolipase A na membrana celular provoca a liberação de ácido araquidônico. Este ácido é metabolizado por três sistemas enzimáticos principais: a ciclooxigenase, de cuja atuação obtém-se as prostaglandinas, os tromboxanos e as prostaciclina; a lipoxigenase, que provoca a produção de leucotrienos e lipoxinas; e o citocromo P-450, que origina os denominados produtos da via da epoxigenase. Estas substâncias, sobretudo as prostaglandinas E2 (PGE2), promovem diminuição do limiar de excitabilidade dos nociceptores (O'BANION, 1999).

Do mesmo modo, células inflamatórias, macrófagos e leucócitos liberam citocinas que vão contribuir para a migração de novas células para o local da lesão. Há produção e liberação de interleucina-1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), TNF- $\alpha$ , selectina, fatores quimiotáticos, óxido nítrico e substâncias oxidantes. Novos receptores, então, são recrutados

e passam a fazer parte do processo inflamatório. A substância P e a neurocinina A produzem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, contribuindo também para a manutenção do processo inflamatório (FERREIRA, 1995).

A bradicinina, a PGE<sub>2</sub>, o NGF e as interleucinas, contudo, parecem exercer papel fundamental na nocicepção periférica. As neurotrofinas aumentam a síntese, o transporte axonal anterógrado e quantidade de Substância P e peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina (CGRP) nas fibras C tipo 1 e reduzem a atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA), tanto nas terminações nervosas periféricas quanto nas centrais. As estimativas são de que 40% das fibras C e 30% das fibras A $\delta$  contribuem com nociceptores silentes. Após a liberação dos produtos químicos da lesão, esses receptores previamente silenciosos são ativados por estímulos térmicos e mecânicos e desenvolvem descargas espontâneas, tornando-se capazes de responder de maneira intensa a estímulos nociceptivos e não-nociceptivos (WOOLF, 1989; WOOLF & CHONG, 1993).

### ***2.2.2 Sensibilização central***

A entrada do estímulo nociceptivo pode aumentar a resposta dos neurônios relacionados à transmissão da dor no sistema nervoso central (SNC). Este fenômeno é definido como sensibilização central, sendo observado no prolongamento da excitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula por estímulos localizados fora da área da injúria (BRENNAN et al., 2005).

A sensibilização central leva à hiperalgesia secundária, definida como um aumento da resposta à dor gerada por estímulos adjacentes à lesão (ZAHN et al., 2002) e implica na redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do corno dorsal (ROCHA et al., 2007). A sensibilização do corno dorsal pode ser mediada por vários fenômenos, no entanto a atividade continuada e repetida de neurônios periféricos, tanto de fibras A $\delta$  e C como de fibras A $\beta$  produz a liberação de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), peptídeos e de neurotrofinas, como substância P, somatostatina, CGRP, neurocinina A no corno dorsal da medula espinhal. Estes mediadores produzem, por meio da abertura de canais de cálcio, prostaglandinas e óxido nítrico. Estas substâncias favorecerão uma maior liberação de glutamato, aspartato, substância P e CGRP, contribuindo para a ampliação do processo algico (JI et al., 2003).

Outro mecanismo que participa da sensibilização central é a potencialização de longo termo (LTP) que provoca a ativação de receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e neurocinina-1 (NK1) e de canais de cálcio, ocorrendo resposta pós-sináptica prolongada e excitatória, sobretudo em neurônios da lâmina I (RANDIC et al., 1993). Neste caso, os mecanismos que contribuem para o aumento da eficácia da transmissão sináptica são decorrentes da fosforilação dos receptores de membrana e das alterações do tempo de abertura dos canais iônicos, ou da formação e do transporte de substâncias excitatórias. Além disso, no corno dorsal da medula espinhal, as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) modulam a fosforilação dos receptores AMPA, amplificando a resposta nociceptiva, porém essa modulação da dor pós-operatória independe da ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (JI et al., 2002; ZAHN, 2002).



A sensibilização central também é mediada pela a facilitação de longo termo que envolve a ativação de fatores de transcrição e alterações na transcrição gênica. Os fatores de transcrição modulam a relação entre o complexo receptor-neuromediador e as alterações na expressão gênica (SANDKUHLER, 2000). O estímulo nociceptivo também provoca a expressão de genes de resposta imediata c-fos, c-jun, de ciclooxigenase-2 (COX-2) e de genes de resposta lenta que codificam a pró-dinorfina, o receptor NK1 e a trkB no corno dorsal da medula espinhal (HUNT et al., 1987).

A informação nociceptiva gerada pela incisão ocasiona mudanças no curso temporal de alguns nociceptores e receptores na medula espinhal, que são associados com a neuroplasticidade da dor pós-operatória (WANG et al., 2008). Em outros modelos de dor aguda, a liberação de noradrenalina tem curso de liberação temporal semelhante ao curso da hiperalgesia, porém no modelo incisão cirúrgica a noradrenalina continua sendo liberada em níveis elevados após a resolução da dor (WANG et al., 2008). Já a liberação de glutamato e aspartato no corno dorsal da medula espinhal ocorre por apenas 45 minutos após a incisão e retorna aos níveis basais apesar de ainda haver intensa hiperalgesia, diferente do que ocorre em outros tipos de dor (ZAHN et al., 2002). Em modelos de dor induzidos por formalina e carragenina (polissacarídeo obtido do extrato de rodófitas), ocorre aumento da liberação de GABA e suprarregulação dos receptores GABAérgicos (REICHL et al., 2012), porém após a incisão plantar em ratos, apesar dos receptores GABA-A e GABA-B estarem envolvidos no controle da hiperalgesia mecânica e térmica, não são suprarregulados após a incisão (REICH et al., 2012).

A liberação da ciclooxigenase-1 (COX-1) pela microglia é uma resposta tardia que pode ser conduzida pela ativação de fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento nervoso (NGF) em neurônios do corno dorsal da medula espinhal (KAPLAN et al., 1997). Ao contrário do que ocorre em outros modelos de dor, a dinorfina não estimula diretamente a expressão de COX-1 na microglia, sendo assim o aumento da expressão de dinorfina na medula espinhal logo após a incisão não se correlaciona com o curso temporal de hipersensibilidade mecânica (ZHU et al., 2006). Além disso, o tratamento com dinorfina intratecal não é capaz de reverter a hiperalgesia mecânica gerada pela incisão, o que não ocorre em modelos de dor neuropática (ZHU et al., 2006). Dessa maneira, a dinorfina não desempenha um papel-chave no controle da dor pós-operatória.

A incisão induz a suprarregulação de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal que contribui para a hipersensibilidade dolorosa (LI et al., 2008). Da mesma forma, a ativação de microglia e astrócitos na medula espinhal também contribui para a hipersensibilidade. Segundo OBATA et al. (2006), a ativação glial máxima acontece no terceiro dia após a incisão, e quando inativada produz a diminuição da hipersensibilidade mecânica, sendo um possível alvo de tratamento.

As citocinas inflamatórias podem ser ativadas de maneira direta, ou seja, sem a participação de células gliais e astrócitos, através da ação da substância P, glutamato, óxido nítrico, prostaglandinas, NGF e CGRP (MARCHAND et al., 2005). Tanto a substância P como o fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (MOSSNER et al., 2004).

### 2.3 Citocinas Inflamatórias

As citocinas inflamatórias foram primeiramente descritas em 1957 (ISAACS & LINDENMANN, 1957). São polipeptídeos de meia-vida curta e de baixo peso molecular, produzidos e liberados por células em resposta a um estímulo inflamatório ou a outra citocina. Elas são expressas na superfície da célula na forma precursora, que pode ser clivada para rápida liberação ou pode se difundir a uma curta distância para agir em outra célula, sendo consideradas proteínas mensageiras. A grande maioria delas age perto de onde são produzidas, na mesma célula que a secreta (ação autócrina), ou em uma célula próxima (ação parácrina). Quando em grandes quantidades, as citocinas podem entrar na circulação e atuar à distância do local de produção (ação endócrina).

As citocinas se ligam a seus receptores com altas afinidades, sendo assim, somente pequenas quantidades de uma citocina são necessárias para ocupar os receptores e desencadear os efeitos biológicos. A expressão dos receptores pode ser regulada pelas próprias citocinas, permitindo a amplificação positiva (citocinas pró-inflamatórias) ou o *feed-back* negativo (citocinas anti-inflamatórias), garantindo assim, que a resposta imune seja balanceada (STRLE et al., 2001).

A maioria das citocinas pró-inflamatórias é regulada ao nível da transcrição gênica por intermédio da via JAK-STAT (KISSELEVA et al., 2002). Ao se ligar ao seu receptor, a citocina ativa a cascata de sinalização intracelular através da Janus quinase (JAK), que faz parte da família das tirosinas quinases, fosforilando uma tirosina. Proteínas transdutoras do sinal e ativadoras da transcrição, as STATs (do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription) se ligam ao local fosforilado através do domínio SH2, se dimerizam e entram no núcleo celular, ativando a transcrição de genes que respondem às citocinas (KISSELEVA et al., 2002). A especificidade de sinalização em resposta a diferentes citocinas é conseguida por meio da utilização de diferentes combinações de JAKs e STATs. A regulação dessa resposta é obtida pela ativação de genes que levam à produção de proteínas supressoras da sinalização de citocinas, as SOCS (do inglês, Suppressors of Cytokine Signalling). Estas proteínas atuam de três maneiras distintas: se ligam diretamente ao receptor, inativando-o; por meio do domínio SH2, reconhecem a tirosina fosforilada e se ligam à Janus quinase, impedindo sua ativação; ou inibem a proteína STAT por competir pelo seu sítio de ligação ao receptor (Figura 2) (NICOLA et al., 1999; STARR & HILTON, 1999; SHUAI & LIU, 2003).

A interleucina-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, monócitos e células gliais (DINARELLO, 1998). A imediata liberação IL-1 $\beta$  no local da injúria pode ser mediada por calpaína, uma proteína sensível ao Ca<sup>+2</sup> (UCEYLER et al., 2007). Na medula espinhal aumentam as correntes induzidas pela ativação dos receptores AMPA e NMDA, enquanto diminuem as correntes induzidas pela ativação de GABA e glicina (KAWASAKI et al., 2008). As correntes induzidas pela ativação do receptor NMDA ocorrem através da ativação de proteína quinase C (PKC), que fosforila as subunidades NR1 e NR2B do receptor glutamatérgico (BRENNER et al., 2004; GUO et al. 2002). Ainda no SNC, a IL-1 $\beta$  atua induzindo aumento de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (LUCAS et al., 2006). Entretanto, antes da indução de isquemia cerebral em ratos, foi visto que a IL-1 $\beta$  tem efeito neuroprotetor e que reduz os déficits neurológicos na esclerose múltipla (HUITINGA et al., 2000). Esta citocina foi a primeira a ser correlacionada com a nocicepção por FERREIRA et al. (1988), que demonstrou que a injeção intra-plantar de baixas doses de IL-1 $\beta$  produz hiperalgesia mecânica, dependente da liberação de

prostaglandinas, que pode ser revertida com o pré-tratamento local de indometacina (inibidor de COX-2). Esta citocina também atua na produção de vários mediadores envolvidos na dor pós-operatória, como óxido nítrico (WHITESIDE et al., 2004), bradicinina (PERKINS & KELLY, 1994) e prostaglandinas (SPRANGER et al., 1990). O bloqueio genético e farmacológico da IL-1 $\beta$  é capaz de inibir o desenvolvimento da dor pós-operatória (WOLF et al., 2008). Em ratos submetidos à incisão torácica, foi visto que os níveis de RNAm de IL-1 $\beta$  aumentam na medula a partir da primeira hora após a cirurgia, sendo o pico em 6 horas e retorno aos níveis basais nas 24 horas seguintes à incisão, indicando que a medula espinhal tem papel importante nos estágios iniciais da dor pós-operatória (FU et al., 2006). Já a liberação de IL-1 $\beta$  no local da incisão acompanha o curso temporal da hiperalgesia mecânica, com o pico de liberação em 2 dias, quando a hiperalgesia é máxima (LORAM et al., 2007).

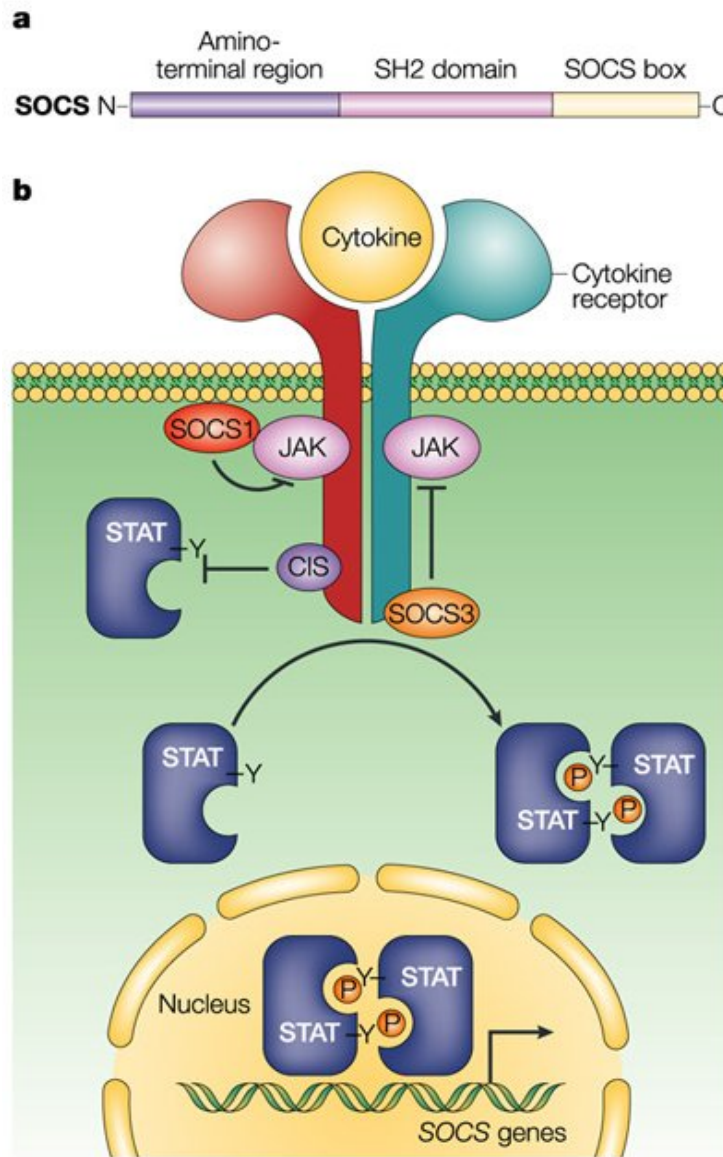
A IL-6 é liberada por mastócitos, macrófagos, linfócitos e células gliais (JORDAM et al., 1995; TILG et al., 1997). É uma citocina que pode ter efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios (DINARELLO, 1997; NAKA et al., 2002). Assim como a IL-1 $\beta$ , a administração de IL-6 produz hipersensibilidade mecânica em ratos que pode ser inibida pela indometacina (CUNHA et al., 1992), além disso, a IL-6 também pode ser inibida por antagonistas de IL-1 $\beta$  (CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2000) ou ativar a produção dessa citocina (MILLER et al., 1997; VAN DAMME et al., 1987). De maneira semelhante à IL-1 $\beta$ , a IL-6 apresentou curso de liberação local semelhante ao curso de hiperalgesia mecânica (LORAM et al., 2007), sugerindo papel pró-inflamatório. Não há relatos do papel central desempenhado por essa citocina em modelos de dor pós-incisional.

O TNF- $\alpha$  foi identificado primeiramente no soro de animais com endotoxemia por *E. coli*, responsável por causar necrose tumoral e caquexia nos animais, e por essa razão recebeu o nome de caquexina (CARSWELL et al., 1975; KAWAKAMI & CERAMI, 1981). Esta citocina é pró-inflamatória e é liberada por todas as células imunes e gliais próximas aos neurônios. Na medula espinhal, o TNF- $\alpha$  atua promovendo ampliação das correntes excitatórias pós-sinápticas através do aumento da expressão de receptores AMPA e NMDA (KAWASAKI et al., 2008) e da diminuição da expressão dos receptores GABA (STELLWAGEN et al., 2005). O TNF- $\alpha$  pode se ligar a dois receptores: TNFR1 e TNFR2, (CUNHA et al., 2005; SCHAFERS et al., 2003; SCHAFERS et al., 2008), sendo ambos responsáveis pela hipersensibilidade dolorosa. O efeito do TNF- $\alpha$  na hipersensibilidade mecânica pode ser inibido por antagonistas de IL-1 $\beta$ , pela indometacina e pelo atenolol (antagonista do receptor  $\beta$ ), sugerindo que a nocicepção induzida por esta citocina é mediada pela IL-1 $\beta$ , prostanóides e aminas simpáticas (CUNHA et al., 1992; POOLE et al., 1999). No modelo de dor pós-operatória, a liberação de TNF- $\alpha$  no local da incisão não acompanha o curso da hipersensibilidade mecânica, sendo liberada em altas concentrações apenas no segundo dia após a incisão e permanecendo até o oitavo dia, quando a hiperalgesia já está resolvida (LORAM et al., 2007). Não há relatos da liberação de TNF- $\alpha$  central neste modelo de dor.

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina pró-inflamatória liberada por células T ativadas, células B, macrófagos e mastócitos, além de células gliais (UCEYLER et al., 2009). Esta citocina inibe a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e NGF (KANAAN et al., 1998; POOLE et al., 1995), tendo papel no controle da hipersensibilidade mecânica e térmica nos modelos de dor inflamatória e neuropática (VALE et al., 2003; WAGNER et al., 1998). A ativação de receptores de adenosina A2 (A2AR) pode aumentar a expressão de IL-10 e diminuir a expressão de TNF- $\alpha$  (CSOKA et al., 2007; HASKO et al., 1996) e a administração central de inibidores de IL-10 pode causar surgimento da hipersensibilidade

dolorosa que pode ser abolida com a administração de antagonistas de A2AR (LORAM et al., 2009). A liberação central e periférica desta citocina ainda não foi descrita na dor pós-operatória.

A interleucina-4 (IL-4) é produzida por linfócitos T ativados, por mastócitos e por células gliais (AWATSUJI et al., 1993; CHAO et al., 1993; DE WALL MALEFYT et al., 1995; TUNON DE LARA et al., 2004). Esta citocina suprime a produção de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e interleucina- 8 (IL-8), além de inibir a produção de COX-2 e óxido nítrico induzível (iNOS) (FENTON et al., 1992; ONOE et al., 1996; VANNIER et al., 1992). A IL-4 é capaz de suprimir a resposta à dor estimulada por bradicinina, carragenina, TNF-  $\alpha$ , ácido acético e zimosan (*Saccharomyces cerevisiae*) (CUNHA et al., 1999; VALE et al., 2003). Não há relatos da liberação central ou periférica desta citocina em modelos de dor pós-operatória.



**Figura 2:** Mecanismos de atuação da proteína SOCS. a. Estrutura da proteína SOCS. b. A proteína SOCS atua se ligando diretamente ao receptor, se ligando à Janus quinase ou inibindo a proteína STAT. SOCS1, SOCS3 e CIS fazem parte da família de proteínas SOCS, que é constituída por oito membros. (SHUAI & LIU, 2003).

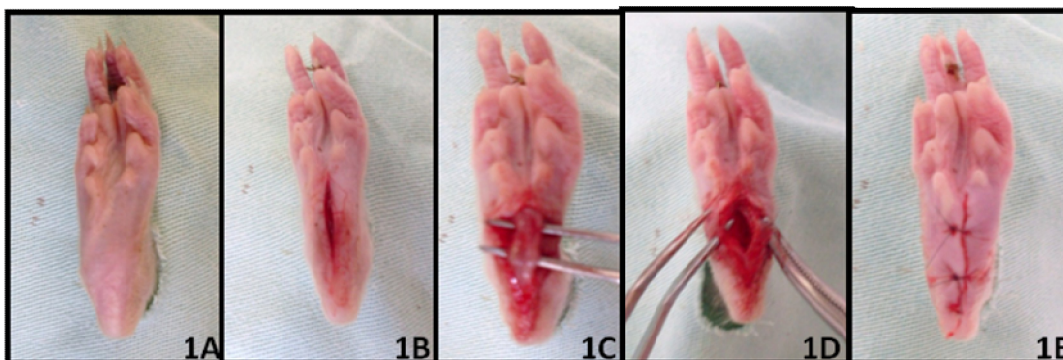
## MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos, da linhagem Wistar, machos, adultos jovens, pesando de 220 a 260 gramas, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os animais receberam água e comida ad libitum e foi mantido o ciclo de iluminação de claro/escuro de 12 /12 horas. Os experimentos foram desenvolvidos seguindo normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos com dor (ZIMMERMANN, 1983). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais usados e seu desconforto. A metodologia foi revisada e aprovada pela pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal da UFRRJ, sob protocolo número: 23083.000962/2011-52.

### 3.2 Procedimento Cirúrgico

A cirurgia foi realizada conforme descrito por BRENNAN et al. (1996). Os animais foram anestesiados com uma associação de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), administrados por via intraperitoneal. Em todos os animais, foi administrada no pré-operatório uma dose de 0,5 mL/kg de pentabiótico veterinário, por via intramuscular seguido por procedimentos de antisepsia que consistiu na preparação da região plantar do membro posterior direito, com iodo-povidona 10% (Riodeine®, laboratório Rioquímica). Após o membro ser devidamente isolado em pano de campo estéril (Figura 3A) foi feita uma incisão, de aproximadamente 1 cm através de pele e fáscia da musculatura plantar que se iniciou a 0,5 cm da borda do calcanhar e estendeu-se em direção aos dedos (Figura 3B). Posteriormente, a musculatura plantar foi divulsionada e elevada (Figura 3C) para permitir sua incisão longitudinal (Figura 3D) e manter intacta a origem e inserção do músculo. O membro foi então pressionado delicadamente para promover hemostasia seguido de sutura da pele com dois pontos simples. O fio cirúrgico utilizado foi de nylon 5-0 (Figura 3E). Após a cirurgia os animais foram alojados em caixas para recuperação da anestesia.



**Figura 3:** Etapas do procedimento cirúrgico de incisão plantar, conforme descrito por BRENNAN et al. (1996).

### 3.3 Testes Nociceptivos

Foram realizados o teste de von Frey, que avalia a hiperalgesia mecânica e o teste de Hargreaves, que avalia a hiperalgesia térmica.

### 3.3.1 Teste de von Frey

Para o teste de von Frey (MÖLLER et al., 1998) foi utilizado o Analgesímetro Digital (von Frey) (Insight, Brasil) (Figura 4). Neste teste cada animal foi colocado em um boxe de acrílico numa superfície gradeada e com o auxílio de um espelho foi aplicada uma força crescente em cima da incisão da superfície plantar direita de cada animal por meio de um transdutor de força até que o movimento de retirada de pata fosse observado. A força necessária para que isto ocorra fica registrada no aparelho. O *cutt-off* foi de 70 gramas. Foram realizadas de 3 a 6 medidas e feita uma média aritmética com as três medidas mais próximas. Cada animal permaneceu por 15 minutos no boxe antes do início do teste e entre cada medida houve um intervalo de 5 minutos.



**Figura 4:** Aparelho utilizado para o teste de hiperalgesia mecânica-von Frey. A figura ilustra o box de acrílico amparado na superfície gradeada e o espelho que auxilia a inserção do transdutor de força através da grade. ([www.insightltda.com.br](http://www.insightltda.com.br)).

### 3.3.2 Teste de Hargreaves

Para o teste de Hargreaves (HARGREAVES et al., 1988) foi utilizado o Tail Flick Tester (Ugo Basile, Itália) (Figura 5). Cada animal foi colocado em cima do aparato e o estímulo térmico foi emitido na superfície plantar direita por meio da emissão de uma radiação infravermelha através da superfície de vidro, sendo possível medir o tempo necessário para que o animal fizesse o movimento reflexo de retirada de pata. O *cut-off* foi de 20 segundos. Em cada momento analisado, foram realizadas de 2 a 4 medidas e feita uma média aritmética com as duas medidas mais próximas. Entre uma medida houve um intervalo de 5 minutos.



**Figura 5:** Aparelho utilizado para o teste de hiperalgesia térmica- Hargreaves. A figura ilustra o local aonde o animal permanece enquanto o estímulo térmico é emitido através da superfície de vidro (circunferência localizada no centro do aparelho). ([www.ugobasile.com](http://www.ugobasile.com)).

### 3.4 Coleta e Preparação dos Tecidos

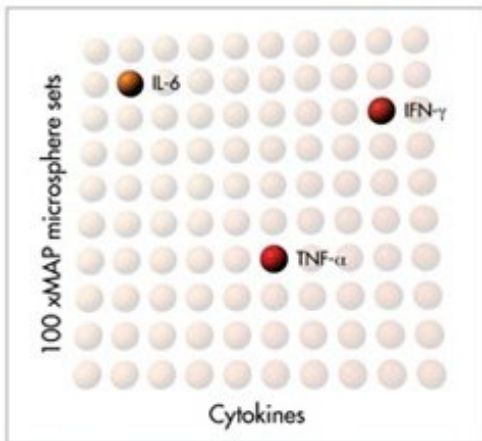
Para a avaliação da concentração e expressão de RNAm das citocinas inflamatórias e GFAP, os animais foram guilhotinados e o segmento L4-L6 da medula foi imediatamente coletado e congelado à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser processado (Romero-Sandoval & Eisenach, 2007, Romero-Sandoval et al., 2008). Para a avaliação pelo método de quimiluminescência, ao final da coleta, cada tecido foi macerado em  $200\ \mu\text{L}$  de solução formada por coquetel inibidor de protease (Complete, Sigma) e por tampão de lise, composta de  $100\ \text{mM}$  de Tris-HCl com  $\text{pH} = 6,8$ , contendo 1% de Triton X-100 (1:100). Após a completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a  $10.000\ \text{RPM}$  por 5 minutos à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e congelado à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### ***3.5 Quantificação das Citocinas Centrais***

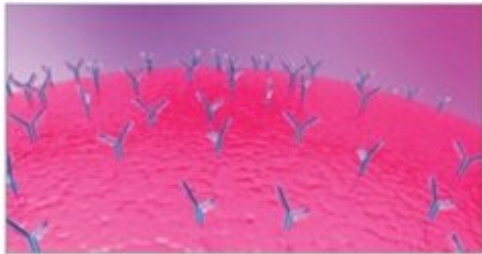
As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-10 foram quantificadas pela técnica de quimiluminescência do MILLIPLEX xMAP® (Milipore, EUA), composta por um painel que permite a dosagem de diferentes substâncias em uma única amostra (Figura 6). Este equipamento utiliza a técnica de propriedades interna do código de cores de microsferas de poliestireno com dois fluorocromos diferentes. As microsferas são coradas para criar 100 tipos distintos de cores por combinação. Cada microsfere é revestida com um anticorpo de captura específico para o que se deseja analisar. A amostra é então inserida e as substâncias de interesse são capturadas pelos grânulos de cor e por um anticorpo de detecção marcado com biotina, que faz marcação fluorescente. A mistura da reação é então incubada com o repórter estreptavidina-ficoeritina (SA-PE) conjugada, que amplifica o resultado para completar a reação na superfície de cada microsfere marcando a molécula que se deseja analisar. As microsferas passam rapidamente através de um laser que excita os corantes internos que marcam o conjunto de microsferas. Um segundo laser, excita a SA-PE e o corante fluorescente sobre a molécula marcada. Finalmente, a alta velocidade do sinal digital processado identifica cada microsfere individual e quantifica o resultado com base em sinais nas moléculas marcadas. Os anticorpos para detecção das citocinas utilizados para este bioensaio são próprios para o uso no aparelho MILLIPLEX xMAP® e específicos para ratos.

A concentração das citocinas no tecido foram expressas como pg/mg de tecido.

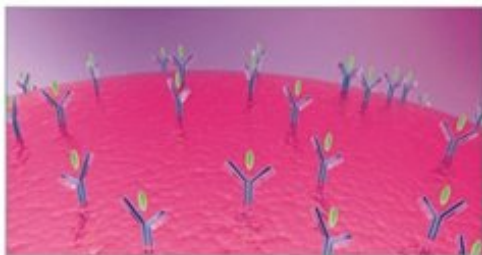




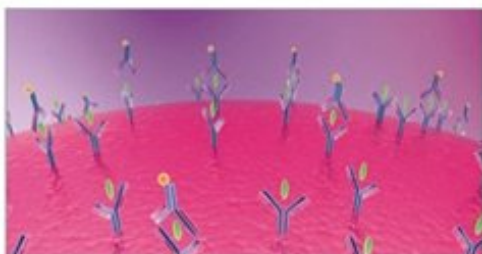
1- As microsferas são coradas para criar 100 cores distintas.



2- As microsferas são revestidas por anticorpos.



3- A amostra é adicionada nas microsferas e as citocinas a serem analisadas são capturadas.



4- Adicionado um marcador fluorescente para detectar os anticorpos.



5- Um laser excita os corantes das microsferas e outro laser excita os corantes dos anticorpos.

**Figura 6:** Esquema do procedimento de dosagem das citocinas centrais pela técnica de quimiluminescência do MILLIPLEX xMAP® technology. (Imagem modificada de [www.milipore.com](http://www.milipore.com)).

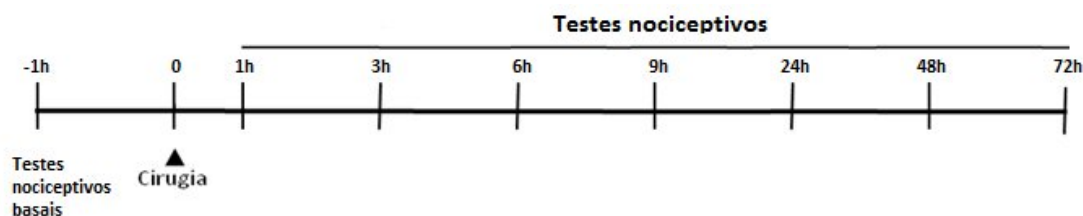
### 3.6 Expressão de RNAm das Citocinas Centrais e GFAP

A expressão de RNAm das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e de GFAP foram analisadas através da técnica de qPCR-RT. O RNA total das amostras que estavam estocadas a -80°C foi extraído através do reagente de Trizol (Invitrogen, EUA) de acordo com as normas do fabricante. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado 2  $\mu$ g do RNA total com 200U de Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, EUA). Para a amplificação do cDNA foi utilizado 1U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, EUA). O cDNA foi utilizado para servir de molde para o PCR. O PCR foi feito através de uma desnaturação inicial de 94°C por 10 minutos, seguida de outras a 94 °C por 45s, que foram intercaladas com o anelamento de 58°C por 45 segundos e extensão de 72°C por 10 minutos. A última extensão foi de 72°C por 10 minutos. Foram feitos 35 ciclos para IL-1 $\beta$  e GFAP, 33 ciclos para TNF- $\alpha$  e 26 ciclos para  $\beta$ -actina. Foi feita eletroforese em gel de agarose 1,5%, para a visualização através do marcador brometo de etídio (0,1  $\mu$ g/mL). Foi feito um controle negativo sem as amostras de cDNA na reação de amplificação. O gene da  $\beta$ -actina foi utilizado para verificar a integridade dos cDNAs, além de ser utilizado como normalizador das reações para padronizar as concentrações iniciais de cDNA de todas as amostras, uma vez que, é expresso de forma constitutiva em todas as células. A intensidade de cada banda do PCR foi analisada pelo método densitométrico usando o software de análise ImageJ (NIH, EUA) para comparar os níveis de expressão de RNAm das amostras com o controle ( $\beta$ -actina).

### 3.7 Delineamentos Experimentais

#### 3.7.1 Avaliação da hiperalgesia

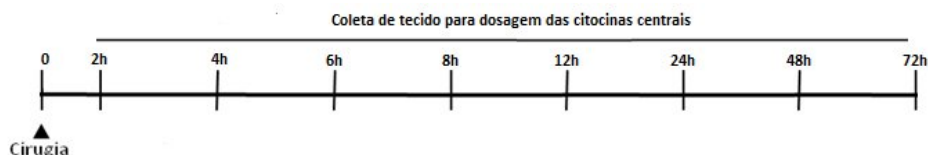
No grupo incisado, foi feita a cirurgia de incisão plantar e no grupo não incisado os animais foram apenas anestesiados e tratados com antibiótico. Os testes nociceptivos foram realizados antes do procedimento cirúrgico para obtenção dos valores basais e as 1, 2, 3, 6, 9, 24, 48 e 72 horas após a incisão plantar (Figura 7). Após os testes os animais foram eutanaziados.



**Figura 7:** Escala temporal da avaliação da hiperalgesia mecânica e da hiperalgesia térmica dos animais submetidos à cirurgia de incisão plantar.

#### 3.7.2 Curso temporal de liberação de citocinas centrais

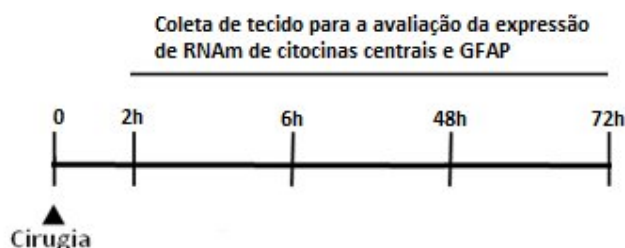
As medulas (L4-L6) foram coletadas as 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 horas após a incisão (Figura 8). As medulas de animais sem incisão foram coletadas para servir de controle.



**Figura 8:** Escala temporal da coleta do seguimento L4-L6 da medula dos animais submetidos à cirurgia de incisão plantar para a dosagem de citocinas centrais.

### 3.7.3 Curso temporal da expressão de RNAm de citocinas centrais e GFAP

As medulas (L4-L6) foram coletadas as 2, 6, 8, 48 e 72 horas após a incisão (Figura 9). As medulas de animais sem incisão foram coletadas para servir de controle.



**Figura 9:** Escala temporal da coleta do seguimento L4-L6 da medula dos animais submetidos à cirurgia de incisão plantar para a avaliação da expressão de RNAm de citocinas centrais e GFAP.

### 3.8 Análise Estatística

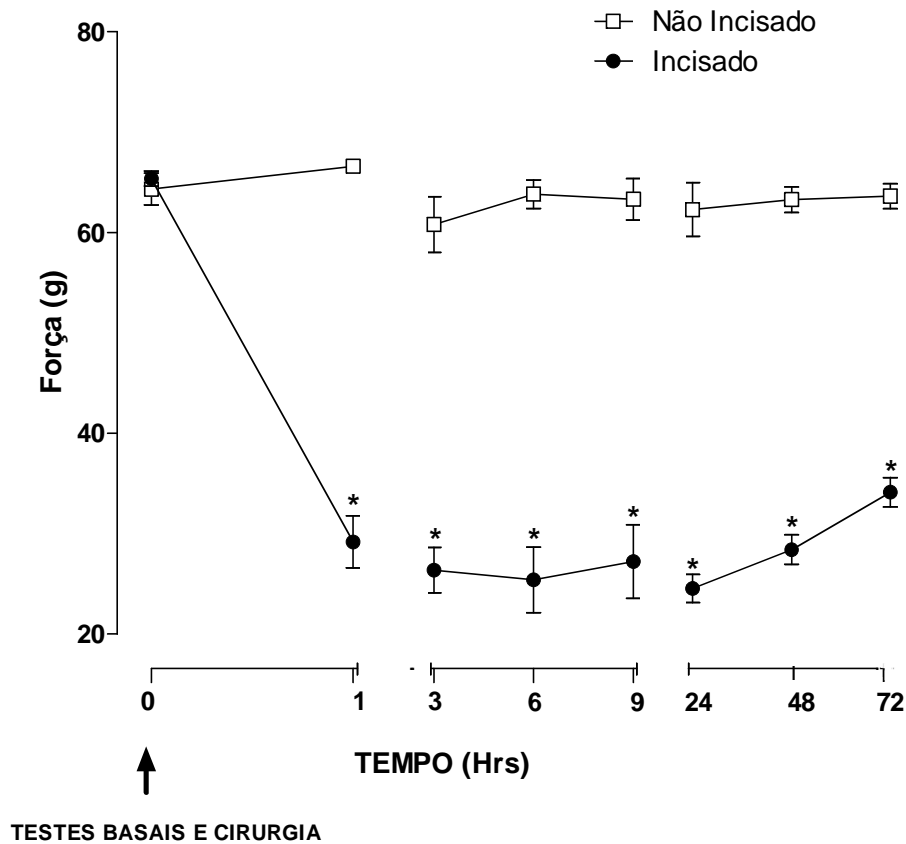
Todos os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais dos testes nociceptivos foram detectadas pela análise de variância (ANOVA) bivariada para medidas repetidas, admitindo-se os fatores tempo e grupos. Posteriormente, foi realizado o teste de comparações múltiplas, Bonferroni e considerada diferença significativa a partir de  $P < 0,05$ .

Para a análise estatística da concentração de citocinas centrais pelo método de quimiluminescência e da expressão de RNAm de citocinas centrais e GFAP por qPCR-RT foi feito o teste de Komolgorov-Smirnov para testar a normalidade da população amostrada. Para populações com distribuição gaussiana, posterior a ANOVA univariada foi realizado o post-test de Fisher nos dados referentes ao teste de quimiluminescência e o post-test de Bonferroni para os dados referentes ao qPCR-RT. Para amostras de populações com distribuição fora da curva normal, foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e o post-test Dunn para comparações múltiplas quando apropriado. Foi considerada diferença significativa a partir de  $P < 0,05$  em todos os casos. As análises estatísticas dos dados referentes aos testes comportamentais e a quimiluminescência foram feitas no programa SigmaStat 3.5 e dos dados referentes ao qPCR-RT no programa GraphPad Prism 5.0. Todas as apresentações gráficas dos resultados foram obtidas pelo programa GraphPad Prism 5.0.

### 3. RESULTADOS

#### 4.1 Teste de Hiperalgisia Mecânica-von Frey

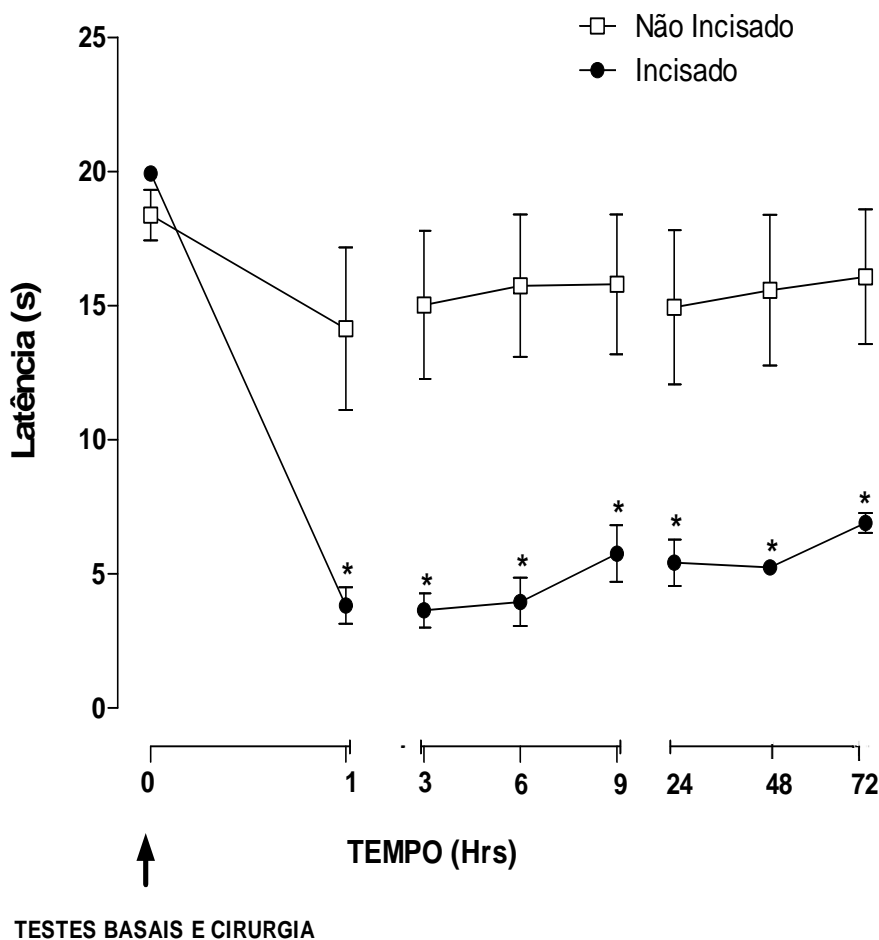
A incisão na superfície plantar direita provocou uma redução do limiar de retirada da pata lesionada quando aplicado o estímulo mecânico. A ANOVA bivariada para medidas repetidas detectou interação entre os fatores grupo ( $F_{1,63}=208,4$ ;  $P<0,0001$ ), tempo ( $F_{7,63}=25,05$ ;  $P<0,0001$ ) e grupo X tempo ( $F_{7,63}=21,99$ ;  $P<0,0001$ ). O post-test Bonferroni detectou diferenças em todos os tempos analisados após a cirurgia ( $P<0,001$ ) (Figura 10).



**Figura 10:** Gráfico comparando os grupos não incisado (N=4) e incisado (N=7) submetidos ao teste de von Frey. Os símbolos ● e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de limiares de retirada de pata medida em gramas por grupo ao longo das horas após a cirurgia de incisão plantar em ratos. \* indica diferença entre o grupo incisado e o grupo não incisado.

#### 4.2 Teste de Hiperálgia Térmica-Hargreaves

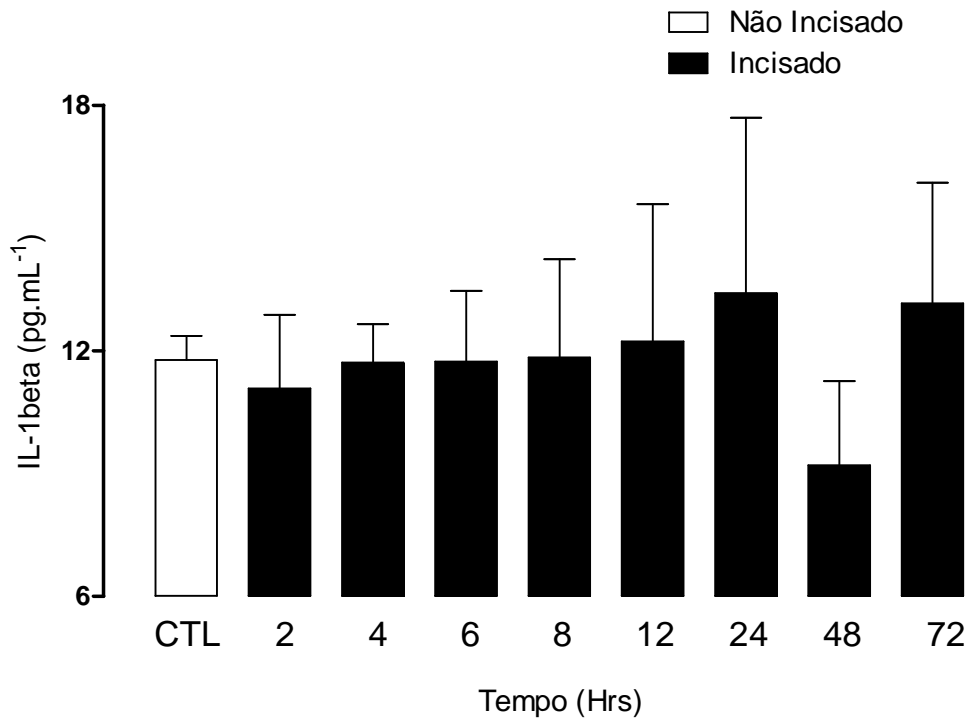
A incisão na superfície plantar direita provocou uma redução da latência de retirada da pata lesionada quando aplicado o estímulo térmico. A ANOVA bivariada para medidas repetidas detectou interação entre os fatores grupo ( $F_{1,63}=216,5$ ;  $P<0,0001$ ), tempo ( $F_{7,63}=23,78$ ;  $P<0,0001$ ) e grupo X tempo ( $F_{7,63}=27,80$ ;  $P<0,0001$ ). O post-test Bonferroni detectou diferenças em todos os tempos após a cirurgia ( $P<0,001$ ) (Figura 11).



**Figura 11:** Gráfico comparando os grupos não incido (N=4) e incido (N=7) submetidos ao teste de Hargreaves. Os símbolos ● e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de latência de retirada de pata expressa em segundos por grupo ao longo das horas após a cirurgia de incisão plantar em ratos. \* indica diferença entre o grupo incido e o grupo não incido.

### 4.3 Concentração de IL-1 $\beta$ na Medula Espinhal

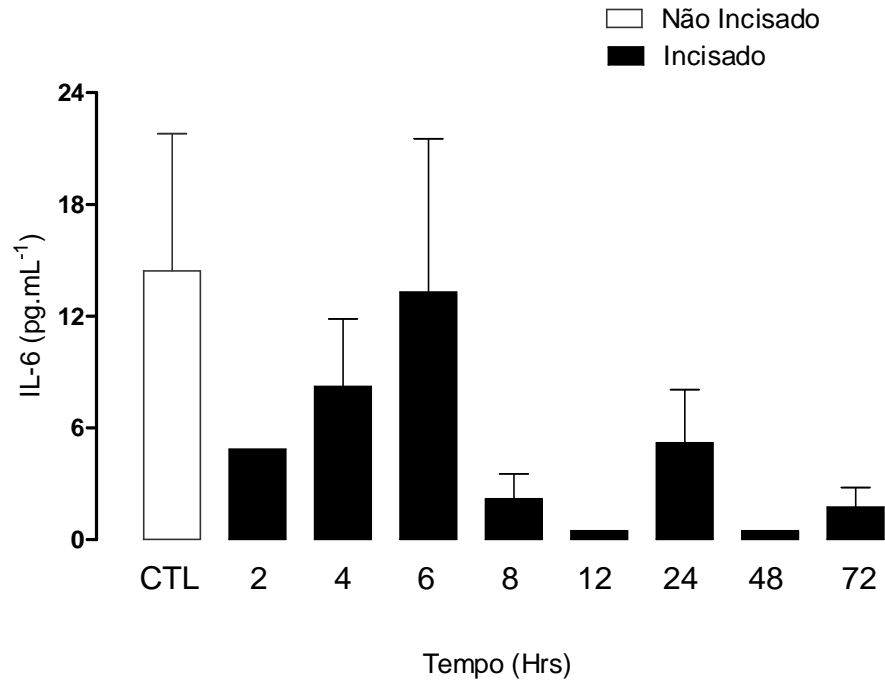
Os grupos não apresentaram distribuição normal ( $F=0,221$ ;  $P=0,983$ ) e não foi detectada diferença entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados através do teste de Kruskal-Wallis ( $K=1,864$ ;  $P=0,983$ ) (Figura 12). Isso indica que a cirurgia de incisão plantar não foi capaz de alterar a concentração de IL-1 $\beta$  em nenhum dos tempos estudados.



**Figura 12:** Gráfico comparando a concentração de IL-1 $\beta$  liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 4 (N=4), 6 (N=4), 8 (N=3), 12 (N=4), 24 (N=3), 48 (N=3) e 72 (N=4) horas após a incisão plantar com ratos não operados (N=3). As colunas  $\bullet$  e  $\square$  e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em pg/mL.

#### 4.4 Concentração de IL-6 na Medula Espinhal

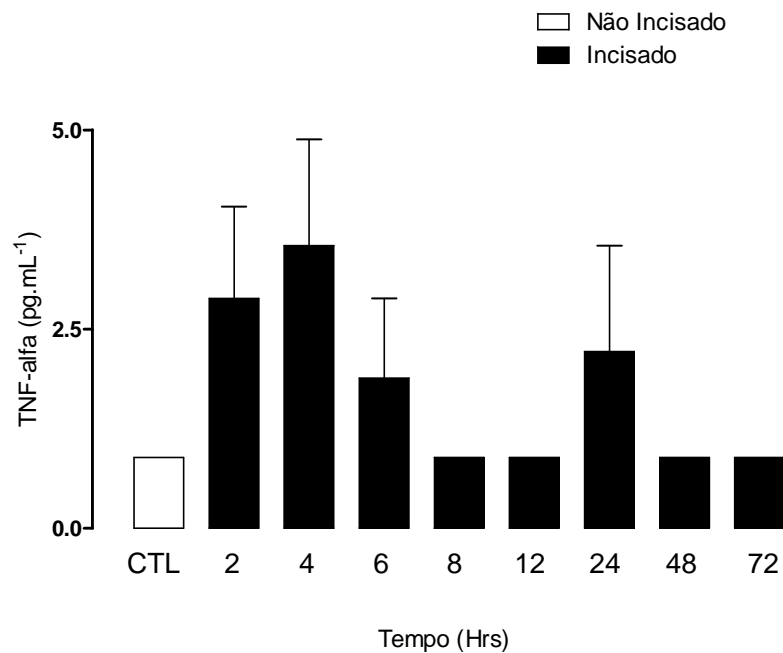
Os grupos não apresentaram distribuição normal ( $F=1,507$ ;  $P=0,211$ ). O teste de Kruskal-Wallis não detectou diferenças entre os grupos na liberação de IL-6 na região lombar da medula espinhal em nenhum dos tempos avaliados ( $K=10,56$ ;  $P=0,227$ ) (Figura 13). Isso indica que a cirurgia de incisão plantar não foi capaz de alterar a concentração de IL-6 em nenhum dos tempos estudados.



**Figura 13:** Gráfico comparando a concentração de IL-6 liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 4 (N=4), 6 (N=4), 8 (N=3), 12 (N=3), 24 (N=3), 48 (N=3) e 72 (N=4) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=3). As colunas ● e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em pg/mL.

#### 4.5 Concentração de TNF- $\alpha$ na Medula Espinhal

Os grupos não apresentaram distribuição normal ( $F=1,461$ ;  $P=0,229$ ). O teste de Kruskal-Wallis não detectou diferenças entre os grupos na liberação de TNF- $\alpha$  pela região lombar da medula espinhal ( $K=10,37$ ;  $P=0,01$ ) (Figura 14). Apesar de um aparente aumento dos valores as 2 e 4 horas após a cirurgia, os resultados indicam que a cirurgia de incisão plantar não foi capaz de alterar a concentração de TNF- $\alpha$  em nenhum dos tempos estudados.

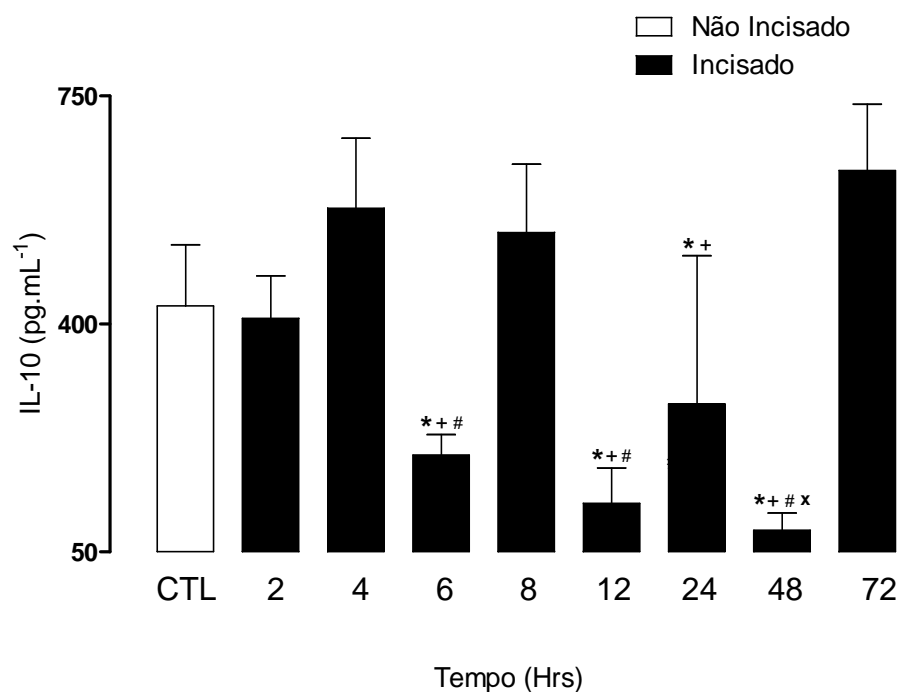


**Figura 14:** Gráfico comparando a concentração de TNF- $\alpha$  liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 4 (N=3), 6 (N=4), 8 (N=3), 12 (N=4), 24 (N=3), 48 (N=3) e 72 (N=3) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=3). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em  $\text{pg}/\text{mL}$ .



#### 4.6 Concentração de IL-10 na Medula Espinhal

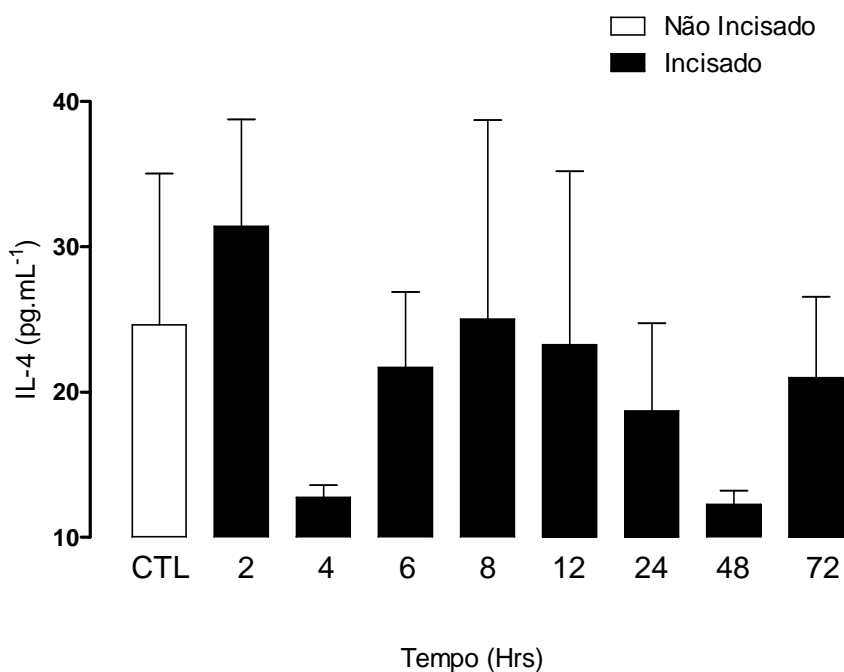
A Anova univariada detectou diferença entre os grupos ( $F_{(8,26)}=3,611$ ;  $P=0,011$ ). Através do teste de Fisher foi possível perceber que o grupo analisado 48 horas após a incisão foi diferente do grupo sem incisão (CTL) ( $P=0,035$ ). O grupo analisado 4 horas após a cirurgia de incisão plantar também foi diferente dos grupos analisados as 6 ( $P=0,021$ ), 12 ( $P=0,008$ ) e 48 ( $P=0,04$ ) horas após a cirurgia e teve uma tendência a ser diferente em relação ao grupo analisado as 24 horas após a cirurgia ( $P=0,061$ ). O grupo correspondente a 72 horas após a incisão plantar foi diferente dos grupos correspondentes a 6 ( $P=0,01$ ), 12 ( $P=0,003$ ), 24 ( $P=0,029$ ) e 48 ( $P=0,002$ ) horas após a cirurgia. O grupo analisado após 8 horas da incisão também foi diferente dos grupos incisados e avaliados as 6 ( $P=0,036$ ), 12 ( $P=0,013$ ) e 48 ( $P=0,007$ ) horas após a incisão plantar (Figura 15). A cirurgia de incisão plantar foi capaz de reduzir a liberação de IL-10 pela medula espinhal em algum dos momentos analisados.



**Figura 15:** Gráfico comparando a concentração de IL-10 liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=3 em cada grupo). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em pg/mL.\* compara com o grupo analisado 72 horas, + compara com o grupo analisado 4 horas, # compara como grupo analisado as 8 horas e X compara com o grupo CTL.

#### 4.7 Concentração de IL-4 na Medula Espinhal

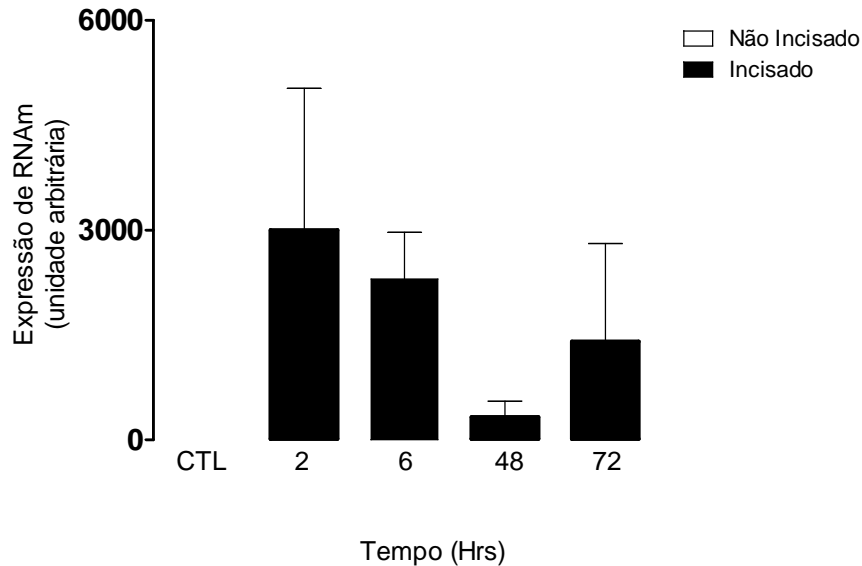
O teste de normalidade não detectou diferenças entre os grupos ( $F=0,599$ ;  $P=0,768$ ). O teste de Kruskal-Wallis não detectou diferenças entre os grupos na liberação de IL-4 pela região lombar da medula espinhal em nenhum dos tempos avaliados ( $K=10,37$ ;  $P=0,239$ ) (Figura 16). Isso indica que a cirurgia de incisão plantar não foi capaz de alterar a concentração de IL-4 em nenhum dos tempos estudados.



**Figura 16:** Gráfico comparando a concentração de IL-4 liberada pela região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 4 (N=4), 6 (N=4), 8 (N=3), 12 (N=4), 24 (N=3), 48 (N=3) e 72 (N=4) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=3). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da concentração da citocina expressa em  $\text{pg/mL}$ .

#### 4.8 Expressão do RNAm da IL-1 $\beta$ na Medula Espinhal

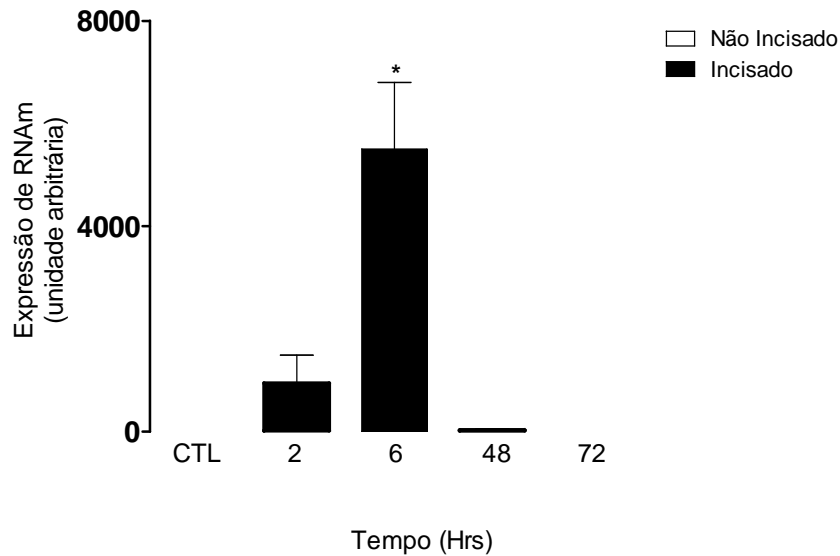
O teste de normalidade não detectou diferenças entre os grupos ( $F=1,334$ ;  $P=0,313$ ). O teste de Kruskal-Wallis não detectou diferenças entre os grupos na expressão de RNAm da IL-1 $\beta$  pela região lombar da medula espinhal em nenhum dos tempos avaliados ( $K=6,148$ ;  $P=0,188$ ) (Figura 17). Esses resultados confirmam os dados obtidos da liberação de IL-1 $\beta$  avaliados pelo método de quimiluminescência.



**Figura 17:** Gráfico comparando a expressão de RNAm da IL-1 $\beta$  na medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 6 (N=3), 48 (N=4) e 72 (N=2) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=4). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da expressão de RNAm da IL-1 $\beta$  expressa em unidade arbitrária.

#### 4.9 Expressão do RNAm de TNF- $\alpha$ na Medula Espinhal

A Anova univariada detectou diferença entre os grupos ( $F_{(4,17)}=1,696$ ;  $P<0,0001$ ). Através do post-test de Bonferroni foi possível perceber que o grupo analisado 6 horas após a incisão foi diferente dos grupos sem incisão (CTL) e dos grupos analisados 2, 48 e 72 horas após a incisão ( $P<0,001$ ) (Figura 18). Esses resultados indicam que ocorre maior expressão gênica de TNF- $\alpha$  as 6 horas após a cirurgia de incisão plantar.



**Figura 18:** Gráfico comparando a expressão de RNAm da TNF- $\alpha$  na medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=4), 6 (N=3), 48 (N=4) e 72 (N=3) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=4). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da expressão de RNAm da TNF- $\alpha$  expressa em unidade arbitrária. \* compara o grupo analisado 6 horas após a incisão com os demais grupos.

#### 4.10 Expressão do RNAm de GFAP na Medula Espinhal

O teste de normalidade não detectou diferenças entre os grupos ( $F=1,38$ ;  $P=0,296$ ). O teste de Kruskal-Wallis detectou diferenças entre os grupos na expressão de RNAm de GFAP pela região lombar da medula espinhal ( $K=15,10$ ;  $P=0,004$ ), sendo possível através do post-test de Dunn perceber diferenças do grupo analisado 6 horas com os grupos analisados as 2 e 72 horas após a incisão plantar ( $P<0,05$ ) (Figura 19). Isso indica que ocorre maior expressão gênica de GFAP 6 horas após a incisão plantar.

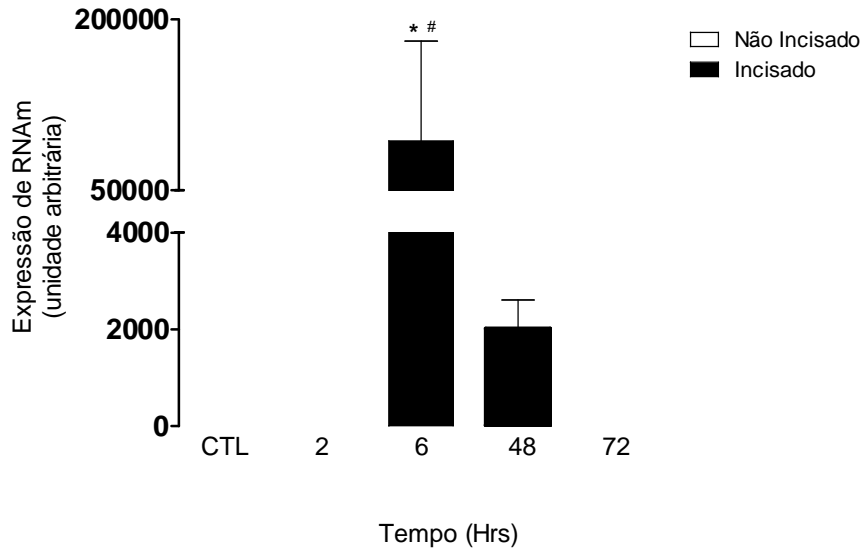


Figura 19: Gráfico comparando a expressão de RNAm de GFAP na região lombar da medula espinhal de ratos submetidos à cirurgia de incisão às 2 (N=2), 6 (N=3), 48 (N=4) e 72 (N=4) horas após a incisão plantar com ratos não operados (CTL) (N=4). As colunas ■ e □ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações da expressão de RNAm de GFAP expressa em unidade arbitrária. \* compara o grupo analisado 6 horas após a cirurgia com o grupo analisado as 2 horas e # com o grupo analisado 72 horas após a cirurgia.

## 5. DISCUSSÃO

### *5.1 Testes Nociceptivos*

Os resultados apresentados acima demonstraram que a hiperalgesia mecânica se desenvolveu logo após a cirurgia pós-operatória e que se manteve até às 72 horas, momento em que foi feita a última análise. Os dados obtidos no teste de hiperalgesia mecânica são semelhantes aos apresentados por BRENNAN et al. (1996), criadores do modelo de incisão plantar em ratos, que demonstraram que a hiperalgesia mecânica se resolve no quarto dia após a incisão, e àqueles apresentados por outros grupos (ITO et al., 2009; LI et al., 2008; WHITESIDE et al., 2004). Diferente do que visto por Brennan et al. (1996), WHITESIDE e colaboradores (2004) demonstraram que a hiperalgesia mecânica persiste até o nono dia pós-operatório. A principal causa de controvérsia já discutida pelo grupo do BRENNAN é o local aonde se aplica o estímulo mecânico. Quando a força é aplicada em cima ou lateral à incisão, gera respostas nociceptivas diferentes daquela aplicada medialmente (BRENNAN et al., 1996). Isso se deve ao fato de que o lado medial à incisão plantar é inervado pelo nervo tibial, enquanto que o lado lateral à incisão é inervado pelos nervos tibial e sural (LEEM et al., 1993). Nós aplicamos o estímulo sobre a incisão plantar. Outra causa de divergência entre os resultados é devido ao tipo de equipamento utilizado. A maioria dos pesquisadores utiliza o von Frey monofilamentado, ao invés do eletrônico. Neste tipo de von Frey, há vários pentes que emitem forças diferentes e eles são aplicados individualmente e em ordem crescente de força até que haja o reflexo de retirada da pata. Nós utilizamos o von Frey eletrônico. BRENNAN et al. (1996) repetiram os testes de hiperalgesia mecânica aplicando o estímulo em mesmo local e ainda assim houve variabilidade no grau de hiperalgesia. A justificativa dada para esta diferença de resultados foi a condição de performance do teste, como horário de execução, número de pessoas envolvidas, movimentação de pessoas no local de avaliação e manipulação dos animais (BRENNAN et al., 1996). Eventos estressantes podem aumentar a atividade dos sistemas inibitórios da dor, causando hipoalgesia (GAGLIESE & MELZACK, 2000). Outro aspecto importante a ser considerado é o peso/idade dos animais utilizados. Quanto maior a idade, mais lento é o retorno aos níveis basais em testes nociceptivos frente a um estímulo doloroso (GAGLIESE & MELZACK, 2000).

Os resultados aqui apresentados demonstram que ocorre hiperalgesia térmica até as 72 horas após incisão plantar e diverge do que apresentado por ZHU et al. (2006), onde a hiperalgesia térmica foi visualizada somente até dois dias depois da incisão e do que proposto por REICHL et al. (2012), que observou que ocorre hipersensibilidade somente durante o primeiro dia após a cirurgia de incisão plantar. O teste de Hargreaves não é muito utilizado neste modelo de dor devido à alta sensibilidade ao estresse, sendo um fator limitante do seu uso (LAVICH et al., 2005). Entretanto a hiperalgesia térmica e a hiperalgesia tátil são presentes na dor pós-operatória e são mediadas por populações de neurônios distintas (WOOLF et al., 1992).

### *5.2 Análises das Concentrações de Citocinas Inflamatórias na Medula Espinhal*

As análises das concentrações de citocinas liberadas pelo segmento lombar da medula espinhal foram feitas com base nos resultados obtidos nos testes nociceptivos. Até o

momento não há relatos de avaliação da concentração de citocinas na medula espinhal após a cirurgia de incisão plantar. A maioria das análises feitas até então se relacionam com a liberação dessas proteínas no local de incisão, sendo possível discutir apenas a sensibilização periférica (LIANG et al., 2008; LORAM et al., 2007).

Neste presente estudo, utilizamos a técnica de detecção de proteínas pelo método quimiluminescente, chamado também de Multiplex. TRUNE et al. (2011) testaram os aparelhos disponíveis no mercado, comparando os resultados obtidos entre eles, com o método de ELISA tradicional (ensaio de imunoabsorção ligado à enzima) e com a avaliação da expressão de RNAm através da técnica de RT-PCR (reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa), utilizando fragmento de orelha de camundongos após um estímulo inflamatório. Neste trabalho, eles demonstraram que houve grande diferença entre os dados obtidos de cada aparelho e que apenas dois dos quatro equipamentos testados apresentaram dados consistentes com a expressão gênica de cada citocina. Os outros dois aparelhos levaram a uma conclusão equivocada de que não houve aumento de citocinas. Apesar disso, a técnica de Multiplex é mais sensível do que a técnica de ELISA padrão e a provável explicação para isso é a otimização dos kits multiplex e a análise através da quimiluminescência. Essa técnica é de fácil e rápida execução e apresenta-se como a melhor alternativa para a análise da concentração de proteínas em tecidos onde não ocorre a liberação maciça de proteínas (TRUNE et al., 2011).

Não houve correlação entre a liberação de citocinas espinhais e a hiperalgesia térmica e mecânica gerada pela incisão plantar. Também não encontramos variações nas concentrações de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-4, diferenças significativas só foram detectadas nas concentrações de IL-10. AIL-10 foi liberada em altas concentrações pela medula espinhal em todos os grupos, sendo mais fácil detectar a variabilidade entre eles. O aumento do número de animais por grupo poderia diminuir o erro estatístico e gerar diferenças entre os tempos analisados de cada citocina, porém a quantidade de animais utilizada está de acordo com estudos anteriores que utilizaram a técnica de quimiluminescência (LEE et al., 2007; TRUNE et al., 2011).

Esta é a primeira vez que uma citocina anti-inflamatória é detectada na medula espinhal no modelo de dor pós-incisional. De acordo com os resultados apresentados, nos momentos de 6, 12, 24 e 48 horas após a incisão ocorre declínio da liberação de IL-10. Porém, a diferença estatística entre o grupo não incisado e incisado só ocorre após 48 de cirurgia.

Como já dito anteriormente, ocorre um equilíbrio entre a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias, tendo a IL-10 papel de inibir as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. A diminuição da liberação de IL-10 deveria produzir aumento das citocinas pró-inflamatórias, porém as deficiências da técnica de quimiluminescência podem ter prejudicado essa análise. Neste caso, uma análise da expressão de RNAm da IL-10 poderia confirmar cada resultado apresentado. A manutenção da hiperalgesia deveria depender de uma redução persistente da IL-10, porém ela retorna aos níveis basais apesar de haver hiperalgesia térmica e mecânica. Uma outra hipótese é de que a IL-10 não é liberada em quantidade suficiente para reverter a hiperalgesia apresentada. Na dor neuropática, a terapia intratecal com IL-10 é capaz de reverter a hiperalgesia mecânica e a indução da dor é capaz de produzir uma suprarregulação da expressão gênica desta citocina (LEDEBOER et al. 2007). No local da incisão, o TNF- $\alpha$  liberado após a resolução da dor, tem sido relacionado com a cicatrização da ferida cirúrgica (LORAM et al., 2007) e dessa maneira a IL-10 liberada pela medula espinhal após a incisão plantar possa desempenhar outra função que

não esteja relacionada com a manutenção da dor e que ainda seja desconhecida. Sendo assim, a diminuição dos níveis de liberação de IL-10 na dor pós-operatória necessita ser investigado.

### ***5.3 Análise da Expressão de RNAm de Citocinas Inflamatórias e GFAP na Medula Espinhal***

Não houve correlação entre a expressão gênica de citocinas espinhais e GFAP com a hiperalgesia térmica e mecânica gerada pela incisão plantar. De acordo com os resultados acima, não houve alteração da expressão gênica de IL-1 $\beta$  na medula espinhal dos animais após a cirurgia de incisão plantar. Houve aumento da expressão do RNAm de TNF- $\alpha$  as 6 horas após a cirurgia, coincidindo com o aumento da expressão de GFAP. De acordo com esses dados, há indícios de que o TNF- $\alpha$  possa ser liberado por astrócitos reativos da medula espinhal. Para confirmar essa hipótese é necessário co-localizar a citocina com a célula nervosa através de imunomarcção.

Esta é a primeira vez que as expressões gênicas das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e de GFAP são analisadas na medula espinhal no modelo de incisão plantar. FU et al. (2006) detectaram a expressão gênica de IL-1 $\beta$  no segmento torácico, mas não na região lombar da medula espinhal após a cirurgia de incisão torácica, sugerindo que a liberação da citocina é segmental. Uma hora após a cirurgia houve aumento da expressão gênica de IL-1 $\beta$  que se manteve até 24 horas após a incisão e teve pico 6 horas após a cirurgia. A possível explicação para a divergência dos resultados apresentados aqui com os resultados apresentados por FU et al. (2006) é que a incisão torácica é muito maior do que a incisão plantar e pode ter gerado maior expressão gênica de IL-1 $\beta$ , sendo mais fácil de detectar diferenças entre os momentos avaliados através da técnica de qRT-PCR. Este grupo não conseguiu co-localizar a IL-1 $\beta$  com a microglia, a principal responsável pela liberação de citocinas no SNC. O marcador utilizado para localizar a microglia foi o OX-42, que detecta o receptor do fator complemento 3 (CR3) e caracteriza a mudança morfológica da célula. O mesmo tipo de marcador já foi utilizado por ITO et al. (2009) que também não obtiveram sucesso na imunomarcção. Nestes trabalhos o uso deste marcador microglial foi criticado e proposto marcadores que avaliem a funcionalidade da microglia, com o anticorpo para Iba 1 (proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado), que é um peptídeo produzido pela microglia ativada ou com o marcador de p38 MAPK fosforilada que pode marcar microglia e astrócitos. O curso de hiperalgesia mecânica após a incisão plantar já foi relacionado com a liberação de microglia marcada com anticorpo para Iba1 (ROMERO-SANDOVAL & EISENACH, 2007). WEN et al. (2009) demonstraram que a fosforilação de p38 na microglia se inicia imediatamente após a cirurgia de incisão plantar e que o uso de inibidores da ativação de p38 inibem a hiperalgesia mecânica por até 2 dias após a administração, enquanto que a hiperalgesia térmica é brevemente atenuada. Estes dados sugerem que a proteína p38 se relaciona mais com o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica do que da hiperalgesia térmica. ALKAITS et al. (2010) também demonstraram o envolvimento de p38 MAPK fosforilado com o curso da hiperalgesia mecânica. O inibidor da ativação da proteína p38 é um potente anti-inflamatório, capaz de inibir a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (YAMAMOTO et al., 1996; YAMAMOTO et al., 1997), porém até o momento não foi feita a co-localização de citocinas com a microglia marcada por esses anticorpos em modelos de dor pós-operatória. ROMERO-SANDOVAL et al. (2008) sugere que os astrócitos são as primeiras células a responder à incisão periférica, seguidos pela ativação da microglia que é a responsável pela manutenção da dor pós-operatória.



Após a incisão plantar, as fibras nociceptivas aferentes são sensibilizadas e espontaneamente ativadas (POGATZKI et al., 2007), levando a uma subsequente sensibilização de neurônios espinhais, que através da ativação de receptores AMPA e kainato contribuem para a ativação da microglia. Por sua vez, a liberação de citocinas pró-inflamatórias pela microglia pode ser inibida pelo uso de antagonistas de receptores AMPA/Kainato (NODA et al., 2000). A administração intratecal de agonistas do receptor canabinoide do tipo 2 (CB<sub>2</sub>) reduz a hiperalgesia mecânica produzida pela incisão plantar, e o uso de antagonistas deste receptor reverte o efeito anti-nociceptivo provocado pelo uso do agonista (ROMERO-SANDOVAL & EISENACH, 2007). Já a administração de antagonista do receptor canabinoide do tipo 1 (CB<sub>1</sub>) não é capaz de produzir alterações na sensibilidade mecânica (ROMERO-SANDOVAL & EISENACH, 2007). A ativação do CB<sub>2</sub> ocorre em paralelo com a inibição da microglia, (ROMERO-SANDOVAL & EISENACH, 2007). Estes dados sugerem que a ativação central do CB<sub>2</sub> pode inibir indiretamente a liberação de citocinas centrais, por meio da inibição da ativação da microglia, e desta forma impedir que ocorra a sensibilização central no modelo de dor pós-operatória.

Em modelos de dor inflamatória, a ativação de CB<sub>2</sub> localizados em queratinócitos é capaz de reverter a hiperalgesia mecânica por estimular a liberação de  $\beta$ -endorfina, que ativa os receptores  $\mu$  opioides localizados nas fibras aferentes primárias (DA FONSECA PACHECO et al., 2008; IBRAHIM et al., 2005). A ativação de CB<sub>2</sub> no tecido inflamado também é capaz de reduzir a liberação e a expressão gênica de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (SU et al., 2012). Estudos recentes têm demonstrado que em modelos de dor inflamatória a acupuntura pode ativar os receptores CB<sub>2</sub> periféricos e reverter a hiperalgesia térmica e mecânica (CHEN et al., 2009; SU et al., 2012; ZHANG et al., 2010). Não há relatos de que a acupuntura possa atuar em receptores CB<sub>2</sub> centrais, porém a ativação destes receptores pode ser uma boa estratégia terapêutica para o controle da sensibilização central e periférica geradas pela incisão cirúrgica.

## 6. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo que avaliou a liberação de citocinas na medula espinhal, além de ser o primeiro a analisar citocinas anti-inflamatórias no modelo de incisão plantar. Também não há relatos anteriores de análises da expressão gênica de citocinas e GFAP na medula espinhal neste modelo de dor.

A cirurgia de incisão plantar produziu hiperalgesia mecânica e térmica, avaliadas pelos testes de von Frey e Hargreaves, respectivamente, nos tempos 1, 3, 6, 9, 24, 48 e 72 horas após a incisão.

A incisão plantar não alterou os níveis de liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-4 nos tempos 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a cirurgia, porém houve decréscimo da liberação de IL-10 após a cirurgia. Isto sugere que a IL-10 não é capaz de regular a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e que junto com a IL-4, estas citocinas não parecem estar envolvidas na hiperalgesia induzida por este modelo de dor.

Assim como os resultados obtidos na análise da liberação de IL-1 $\beta$ , não houve diferença significativa na expressão gênica dessa citocina na medula espinhal, indicando que o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  na medula espinhal não é necessário para manutenção da dor pós-operatória quando a incisão é feita na região plantar.

Ocorreu aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$  e GFAP na medula espinhal seis horas após a incisão plantar, indicando que houve sensibilização central e sugerindo papel dos astrócitos na liberação da citocina. Porém, nas horas seguintes, houve declínio da expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  e GFAP, indicando que eles não dependem da manutenção da hiperalgesia gerada pela incisão plantar.

A hiperalgesia secundária deve ser mantida por outros mecanismos que não envolvam necessariamente a liberação de citocinas centrais. No entanto o papel das citocinas neste fenômeno deve ser investigado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKAITIS, M.S.; SOLORZANO, C.; LANDRY, R. P.; PIOMELLI, D.; DELEO, J. A.; ROMERO-SANDOVAL, E.A. Evidence for a role of endocannabinoids, astrocytes and p38 phosphorylation in the resolution of postoperative pain. *PLoS One*, v. 5, p. 10891, 2010.

AWATSUJI, H.; FURUKAWA, Y.; HIROTA, M.; MURAKAMI, Y.; NII, S. M.; FURUKAWA, S.; HAYASHI, K. Interleukin-4 and -5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, v. 34, p. 539-545, 1993.

BEDBROOK, G.M. Injuries of the Thoracolumbar Spine with Neurological Symptoms, em: Vinken, P. J.; Bruyn, G. W. *Handbook of Clinical Neurology*, Amsterdam: North-Holland, 1976. p. 437 a 466.

BISHOP, G.H.; LANDAU, W.M.; JONES, M.H. Evidence for a double peripheral pathway for pain. *Science*, v. 128, p. 712-714, 1958.

BRENNAN, T.J.; VANDERMEULEN, E.P.; GEBHART, G.F. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*, v. 64, p. 493-501, 1996.

BRENNAN, T.J.; ZAHN, P.K.; POGATZKI, E.M. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiology Clinics of North America*, v. 23, p. 1-20, 2005.

BRENNER, G. J.; JI, R.R.; SHAFFER, S.; WOOLF, C.J. Peripheral noxious stimulation induces phosphorylation of the NMDA receptor NR1 subunit at the PKC-dependent site, serine-896, in spinal cord dorsal horn neurons. *European Journal of Neuroscience*, v. 20, p. 375-384, 2004.

CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N.; COHEN, R.H. Peripheral Neural Mechanisms of Nociception, em: Wall, P.D.; Melzack, R. *Textbook of Pain*, Edimburgo: Churchill Livingstone, 1989. p. 22 a 45.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 72, p. 3666-3670, 1975.

CHAO, C.C.; MOLITOR, T.W.; HU, S. Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *Journal of Immunology*, v. 151, p. 1473-1481, 1993.

CHAORAN, W.; BOUSTANY, L.; LIANG, H.; BRENNAN, T.J. Nerve Growth Factor Expression after Plantar Incision in the Rat. *Anesthesiology*, v. 107, p. 128-135, 2007.

CHEN, L.; ZHANG, J.; LI, F.; QIU, Y.; WANG, L.; LI, Y. H.; SHI, J.; PAN, H. L.; LI, M. Endogenous anandamide and cannabinoid receptor-2 contribute to electroacupuncture analgesia in rats. *Journal of Pain*, v. 10, p. 732-739, 2009.

CSÓKA, B.; NÉMETH, Z.H.; VIRÁG, L.; GERGELY, P.; LEIBOVICH, S.J.; PACHER, P.; SUN, C.X.; BLACKBURN, M.R.; VIZI, E.S.; DEITCH, E.A.; HASKÓ, G. A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to Escherichia coli. *Blood*, v. 110, p. 2685-2695, 2007.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, v. 107, p. 660–664, 1992.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; FERREIRA, S.H. Cytokine- mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. *British Journal of Pharmacology*, v. 126, p. 45–50, 1999.

CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, v. 130, p. 1418-1824, 2000.

CUNHA, T.M.; VERRI WA, J.R.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.102, p. 1755-1760, 2005.

DA FONSECA PACHECO, D.; KLEIN, A.; DE CASTRO PEREZ, A.; DA FONSECA PACHECO, C.M.; DE FRANCISCHI, J.N., DUARTE, I.D. The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, p. 1143-1149, 2008.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *International Review Immunology*, v. 16, p. 457-499, 1998.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*, v. 112, p. 321S-329S, 1997.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia*, v. 101. p. 8-16, 2008.

FENTON, M.J.; BURAS, J.A.; DONNELLY, R.P. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes. *Journal of Immunology*, v. 149, p. 1283-1288, 1992.

FERREIRA, S.H. Hiperalgésia inflamatória, óxido nítrico y control periférico del dolor. *Rev Latino Americana de Dolor*, v. 12, p. 6-17, 1995.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, v. 6184, p. 698-700, 1988.

FU, D.; GUO, Q.; AI, Y.; CAI, H.; YAN, J.; DAÍ, R. Glial activation and segmental upregulation of interleukin-1beta (IL-1beta) in the rat spinal cord after surgical incision. *Neurochemical Research*, v. 31, p. 333-340, 2006.

GAGLIESE, L.; MELZACK, R. Age differences in nociception and pain behaviours in the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 24, p. 843-854, 2000.

GUO, W.; ZOU, S.; GUAN, Y.; IKEDA, T.; TAL, M.; DUBNER, R.; REN, K.; Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *Journal of Neuroscience*, v. 22, p. 6208-6217, 2002.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F., FLORES, C., JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, v. 32, p. 77-88, 1988.

HASKO, G.; SZABO, C.; NEMETH, Z.H.; KVETAN, V.; PASTORES, S.M.; VIZI, E.S. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *Journal of Immunology*, v. 157, p. 4634-4640. 1996.

HUITINGA, I.; SCHMIDT, E.D.; VAN DER CAMMEN, M.J.; BINNEKADE, R.; TILDERS, F.J. Priming with inter- leukin-1beta suppresses experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 12, p. 1186-1193, 2000.

HUNT, S.P.; PINI, A.; EVAN, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, v. 328, p. 632-634, 1987.

IBRAHIM, M.; PORRECA, F.; LAI, J.; ALBRECHT, P.J.; RICE, F.L.; KHODOROVA, A.; DAVAR, G.; MAKRIYANNIS, A.; VANDERAH, T.W.; MATA, H.P.; MALAN JR, F. CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *PNAS*, v. 102, p. 3093-3098, 2005.

ISAACS, A. & LINDENMANN, J. Virus interference. I. The interferon. *Journal of Interferon Research*, v. 5, p. 429-438, 1957.

ITO, N.; OBATA, H., SAITO, S. Spinal microglial expression and mechanical hypersensitivity in a postoperative pain model: comparison with a neuropathic pain model. *Anesthesiology*, v. 111, p. 640-648, 2009.

JI, R.R.; SAMAD, T.A.; JIN, S.X. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, v. 36, p. 57-68, 2002.

JI, R.R.; KOHNO, T.; MOORE, K.A. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends of Neuroscience*, v. 26, p. 696-705, 2003.

JORDAN, M.; OTTERNESS, I.G.; NG, R.; GESSNER, A.; ROLLINGHOFF, M.; BEUSCHER, H.U. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist. *Journal of Immunology*, v. 154, p. 4081-4090, 1995.

KANAAN, S.A.; POOLE, S.; SAADE, N.E.; JABBUR, S.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Interleukin-10 reduces the endotoxin-induced hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroimmunology*, v. 86, p. 142-150, 1998.

KAWAKAMI, M.; CERAMI, A. Studies of endotoxin-induced decrease in lipoprotein lipase activity. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 154, p. 6319, 1981.

KAWASAKI, Y.; ZHANG, L.; CHENG, J.K.; JI, R.R. Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *Journal of Neuroscience*, v. 28, p. 5189-5194, 2008.

KAPLAN, M.D.; OLSCHOWKA, J.A.; O'BANION, M.K. Cyclooxygenase-1 behaves as a delayed response gene in PC12 cells differentiated by nerve growth factor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 534-537, 1997.

KISSELEVA, T.; BHATTACHARYA, S.; BRAUNSTEIN, J.; SCHINDLER, C. W. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, v. 285, p. 1-24, 2002.

LAVICH, T.R.; CORDEIRO, R.S.B.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A. A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 445-451, 2005.

LEDEBOER, A.; JEKICH B.M.; SLOANE, E.M.; MAHONEY, J.H.; LANGER, S.J.; MILIGAN, E.D. MARTIN, D.; MAIER, S.F.; JOHNSON, K.W.; LESLIE, A.; CHAVEZ, R.A.; WATKINGS, L.R. Intrathecal Interleukin-10 Gene Therapy Attenuates Paclitaxel Induced Mechanical Allodynia and Proinflammatory Cytokine Expression in Dorsal Root Ganglia in Rats. *Brain, Behaviour, Immunity*, v. 21, p. 686-698, 2007.

LEE S.R.; GUO, S.Z.; SCANNEVIN, R.H.; MAGLIARO, B.C.; RHODES, K.J.; WANG, X.; LO, E.H. Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neuroscience Letters*, v. 417, p. 1-5, 2007.

LEEM, J.W.; WILLIS, W.D.; CHUNG, J.M. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *Journal of Neurophysiology*, v. 69, p. 1684-1699, 1993.

LI, C.; XU, J.; LIU, D.; ZHANG, J.; DAI, R. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to the pain hypersensitivity following surgical incision in the rats. *Molecular Pain*, v. 4, p. 27, 2008.

LI, X.; ANGST, M.S.; CLARK, J.D. Opioid-induced hyperalgesia and incisional pain. *Anesthesia & Analgesia*, v. 93, p. 204-209, 2001.

LIANG, D.Y.; SHI, X.; QIAO, X.; ANGST, M.S.; YEOMANS C.D.; CLARK, J.D. Chronic morphine administration enhances nociceptive sensitivity and local cytokine production after incision. *Molecular Pain*, v. 4, p. 7, 2008.

LOEWENSTEIN, W.R. Mechano-Electric Transduction in the Pacinian Corpuscle: Initiation of Sensory Impulses in Mechanoreceptors. *Handbook of Sensory Physiology*, Berlin: Springer-Verlag, 1971, p. 267 a 290.

LORAM, L.C.; HARRISON, J.A.; SLOANE, E.M.; HUTCHINSON, M.R.; SHOLAR, P.; TAYLOR, F.R.; BERKELHAMMER, D.; COATS, B.D.; POOLE, S.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F.; RIEGER, J.; WATKINS, L.R. Enduring reversal of neuropathic pain by a single intrathecal injection of adenosine 2A receptor agonists: a novel therapy for neuropathic pain. *Journal of Neuroscience*, v. 29, p. 14015-14025, 2009.

LORAM, L.C.; THEMISTOCLEOUS, A.C.; FICK, L.G.; KAMERMAN, P.R. The time course of inflammatory cytokine secretion in a rat model of postoperative pain does not coincide with the onset of mechanical hyperalgesia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 85, p. 613-620, 2007.

LUCAS, S.M.; ROTHWELL, N.J.; GIBSON, R.M. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*, v. 147, p.S232-240, 2006.

MARCHAND, F.; PERRETI, M.; MC MAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. *Nature Reviews of Neuroscience*, v. 6, p. 521-532, 2005.

MILLER, A.J.; HOPKINS, S.J.; LUHESHI, G.N. Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *British Journal of Pharmacology*, v. 120, p. 1274-1279, 1997.

MÖLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 84, p. 41-47, 1998.

MOSSNER, R.; BECKMANN, I.; HALLERMANN, C.; NEUMANN, C.; REICH, K. Granulocyte colony-stimulating-factor-induced psoriasis form dermatitis resembles psoriasis with regard to abnormal cytokine expression and epidermal activation. *Experimental Dermatology*, v. 13, p. 340-346, 2004.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Research*, v. 4, p. S233-242, 2002.

NICOLA, N. A.; NICHOLSON, S.E.; METCALF, D.; ZHANG, J.G.; BACA, M.; FARLEY, A.; WILLSON, T.A.; STARR, R.; ALEXANDER, W.; HILTON, D.J. Negative regulation of cytokine signaling by the SOCS proteins. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, v. 64, p. 397-404, 1999.

NODA, M.; NAKANISHI, H.; NABEKURA, J.; AKAIKE, N. AMPA-kainate subtypes of glutamate receptor in rat cerebral microglia. *Journal of Neuroscience*, v. 20, p. 251-258, 2000.

O'BANION, M.K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Critical Reviews in Neurobiology*, v. 13, p. 45-82, 1999.

OBATA, H.; EISENACH, J.C.; HUSSAIN, H.; BYNUM, T.; VINCLER, M. Spinal Glial Activation Contributes to Postoperative Mechanical Hypersensitivity in the Rat. *Journal of Pain*, v. 7, p. 816-822, 2006.

ONOE, Y.; MIYAURA, C.; KAMINAKAYASHIKI, T.; NAGAI, Y.; NOGUCHI, K.; CHEN, Q. R.; SEO, H.; OHTA, H. NOZAWA, S. KUDO, I.; SUDA, T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *Journal of Immunology*, v. 156, p. 758-764, 1996.

PERKINS, M.N.; KELLY, D. Interleukin-1 beta induced-desArg9bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology*, vol. 5: p. 657-660, 1994.

PIOTROWSKI, W.; FOREMAN, J.C. Some effects of calcitonin gene-related peptide in human skin and on histamine release. *British Journal of Dermatology*, v. 114, p.37-46, 1986.

POGATZKI, E.M.; GEBHART, G.F.; BRENNAN, T.J. Characterization of A- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *Journal of Neurophysiology*, v. 87, p. 721-731, 2001.

POGATZKI, E.M.; ZAHN, P.K.; BRENNAN, T.J. Postoperative pain-clinical implications of basic research. *Best Practice & Research: Clinical Anaesthesiology*, v. 21, p. 3-13, 2007.

POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; SELKIRK, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *British Journal of Pharmacology*, v. 115, p. 684-688, 1995.

POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, v. 126, p. 649-56, 1999.

RANDIC, M. JIANG, M.C.; CERNE, R. Long-term potentiation and long term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, v. 13, p. 5228-5241, 1993.

REICHL, S.; AUGUSTIN, M.; ZAHN, P.K.; POGATZKI-ZAHN, E.M. Peripheral and spinal GABAergic regulation of incisional pain in rats. *Pain*, v. 153, p. 129-141, 2012.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 57, p. 94-105, 2007.

ROMERO-SANDOVAL, A.; CHAI, N.; NUTILE-MCMENEMY, N.; DELEO, J.A. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. *Brain Research*, v. 1219, p. 116-26, 2008.

ROMERO-SANDOVAL, A.; EISENACH, J.C. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology*, v. 106, p. 787-794, 2007.

SANDKUHLER, J. Learning and memory in pain pathways. *Pain*, v. 88, p. 113-118, 2000.

SCHAFERS, M.; SOMMER, C.; GEIS, C.; HAGENACKER, T.; VANDENABEELE, P.; SORKIN, L.S. Selective stimulation of either tumor necrosis factor receptor differentially induces pain behavior in vivo and ectopic activity in sensory neurons in vitro. *Neuroscience*, v. 157, p. 414-423, 2008.

SCHAFERS, M.; SORKIN, L.S.; GEIS, C. SHUBAYEV, V.I. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neuroscience Letters*, v. 347, p. 179-182, 2003.

SHUAI, K. & LIU, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, p. 900-911, 2003.

SPRANGER, M.; LINDHOLM, D.; BANDTLOW, C.; HEUMANN, R.; GNAHN, H. NTIER- NOE, M.; THOENEN, H. Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: comparison between the effects of interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and in vivo. *European Journal of Neuroscience*, v. 2, p. 69-76, 1990.

STARR, R. & HILTON, D.J. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays*, v. 1, p. 47-52, 1999.



STELLWAGEN, D.; BEATTIE, E.C.; SEO, J.Y.; MALENKA, R.C. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of Neuroscience*, v. 25, p. 3219–3228, 2005.

STRLE, K.; ZHOU, J.H.; SHEN, W.H.; BROUSSARD, S.R.; JOHNSON, R.W.; FREUND, G.G.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Interleukin-10 in the brain. *Critical Reviews in Immunology*, v. 21, p. 427–449, 2001.

SU, T.F.; ZHAO, Y.Q.; ZHANG, L.H.; PENG, M.; WU, C. H.; PEI, L.; TIAN, B., ZHANG, J.; SHI, J.; PAN, H.L.; LI, M. Electroacupuncture reduces the expression of proinflammatory cytokines in inflamed skin tissues through activation of cannabinoid CB2 receptors. *European Journal of Pain*, v. 16, p. 624-35, 2012.

TILG, H.; DINARELLO, C.A.; MIER, J.W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology*, v. 18, p. 428-432, 1997.

TODD, A.J. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Experimental Physiology*, v. 87, p. 245-249, 2002.

TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, v. 55, p. 377–391, 2007.

TRUNE, D.R.; LARRAIN, B.E.; HAUSMAN, F.A., KEMPTON, J.B., MACARTHUR, C.J. Simultaneous measurement of multiple ear proteins with multiplex ELISA assays. *Hearing Research*, v. 275, p. 1-7, 2011.

TUNON DE LARA, J.M.; OKAYAMA, Y.; MCEUEN, A.R.; HEUSSER, C.H.; CHURCH, M.K.; WALLS, A.F. Release and inactivation of interleukin-4 by mast cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 725, p.50-58, 2004.

UCEYLER, N., SCHAFERS, M., SOMMER, C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Experimental Brain Research*, v. 196, p. 67-78, 2009.

UCEYLER, N.; TSCHARKE, A.; SOMMER, C. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. *Brain Behaviour, Immunity*, v. 21, p. 553–560, 2007.

VALE, M.L.; MARQUES, J.B.; MOREIRA, C.A.; ROCHA, F.A.; FERREIRA, S.H., POOLE, S., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics*, v. 304, p. 102-108, 2003.

VAN DAMME, J.; CAYPHAS, S.; VAN SNICK, J.; CONINGS, R.; PUT, W.; LENAERTS, J. P.; SIMPSON, R. J.; BILLIAU, A. Purification and characterization of human fibroblast-derived hybridoma growth factor identical to T-cell-derived B-cell stimulatory factor-2 (interleukin-6). *European Journal of Biochemistry*, v. 168, p. 543-550, 1987.

VANNIER, E.; MILLER, L.C.; DINARELLO, C.A. Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America USA*, v. 89, p. 4076-4080, 1992.

WAGNER, R.; JANJIGIAN, M.; MYERS, R.R. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. *Pain*, v. 74, p. 35–42, 1998.

WANG, Y.; FENG, C.; WU, Z.; WU, A.; YUE, Y. Activity of the descending noradrenergic pathway after surgery in rats. *Acta Anaesthesiologica Scandinava*, v. 52, p. 1336-1341, 2008.

WEN Y.R.; SUTER, M.R.; JI, R.R., YEH, G.C.; WU, Y.S.; WANG, K.C.; KOHNO, T.; SUN, W.Z.; WANG, C.C. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. *Anesthesiology*, v. 110, p. 155-165, 2009.

WHITESIDE, G. T.; HARRISON, J.; BOULET, J.; MARK, L.; PEARSON, M.; GOTTSALL, S.; WALKER, K. Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. *British Journal of Pharmacology*, v. 14, p. 85-91, 2004.

WOLF, G.; LIVSHITS, D.; BEILIN, B.; YIRMIYA, R.; SHAVIT, Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. *Brain, Behaviour, and Immunity*, v. 22, p. 1072-1077, 2008.

WOOLF, C.J. Recent advances in the pathophysiology of acute pain. *British Journal of Anaesthesia*, v. 63, p. 139-146, 1989.

WOOLF, C.J.; CHONG, M.S. Preemptive analgesia – treating postoperative pain by prevention the establishment of central sensitization. *Anesthesia & Analgesia*, v. 177, p. 362-379, 1993.

WOOLF, C.J.; SHORTLAND, P.; COGGESHALL, R.E. Peripheral-nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, v. 355, p. 75-78, 1992.

YAMAMOTO, N.; SAKAI, F.; YAMAZAKI, H.; NAKAHARA, K.; OKUHARA, M. Effect of FR167653, a cytokine suppressive agent, on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *European Journal of Pharmacology*, v. 314, p. 137-142, 1996.

YAMAMOTO, N.; SAKAI, F.; YAMAZAKI, H.; SATO, N.; NAKAHARA, K.; OKUHARA, M. FR167653, a dual inhibitor of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha, ameliorates endotoxin-induced shock. *European Journal of Pharmacology*, v. 327, p. 169-174, 1997.

ZAHN, P.K.; POGATZKI, E.M.; BRENNAN, T.J. Mechanisms for pain caused by incisions. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, v. 27, p. 514-516, 2002.

ZHANG, J.; CHEN, L.; SU, T.; CAO, F.; MENG, X.; PEI, L.; SHI, J.; PAN, H. L.; LI, M. Electroacupuncture increases CB2 receptor expression on keratinocytes and infiltrating inflammatory cells in inflamed skin tissues of rats. *Journal of Pain*, v. 11, p. 1250-1258, 2010.

ZHU, X.; VINCLER, M.A.; PARKER, R.; EISENACH, J.C. Spinal cord dynorphin expression increases, but does not drive microglial prostaglandin production or mechanical hypersensitivity after incisional surgery in rats. *Pain*, v. 125, 43-52, 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals *Pain*, v. 16, p. 109-110, 1983.