

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO:**

**Curso temporal da liberação local de citocinas  
inflamatórias no modelo de dor pós incisional  
em ratos**

**Natália Monnerat de Souza**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Curso temporal da liberação local de citocinas inflamatórias no  
modelo de dor pós incisional em ratos**

**NATÁLIA MONNERAT DE SOUZA**

*Sob a Orientação da Professora*

**Magda Alves de Medeiros**

Seropédica, RJ

Julho de 2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Curso temporal da liberação local de citocinas inflamatórias no  
modelo de dor pós incisional em ratos**

**NATÁLIA MONNERAT DE SOUZA**

*Sob a Orientação da Professora*

**Magda Alves de Medeiros**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária na área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ

Julho de 2013

636.08979195

Souza, Natália Monnerat de, 1986-

S729c

Curso temporal da liberação local de

T

citocinas inflamatórias no modelo de dor pós  
incisional em ratos / Natália Monnerat de Souza.  
- 2013.

xvi, 56 f.: il.

Orientador: Magda Alves de Medeiros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária, 2013.

Bibliografia: f. 50-56.

1. Dor pós-operatória - Teses. 2. Citocinas -  
Teses. 3. Hiperalgesia - Teses. 4. Rato como  
animal de laboratório - Teses. 5. Medicina  
veterinária - Teses. I. Medeiros, Magda Alves  
de, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**NATÁLIA MONNERAT DE SOUZA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_/\_\_/\_\_\_\_

---

Prof.Dr Magda Alves de Medeiros (Ph.D) UFRRJ  
(Orientadora)

---

Prof.Dr. Frederico Argollo Vanderlinde(Ph.D), UFRRJ

---

Prof.Dr Maria Eline Matheus (Dr), UFRJ

## DEDICATÓRIA

Ao meu querido e saudoso avô Joel Monnerat.  
Meu maior exemplo e orgulho de lecionador, integridade, justiça e garra!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades, por estar sempre me amparando e protegendo.

Aos meus pais, Lúcia e Frederico, por deixarem que eu corresse atrás da realização deste sonho. Por todo apoio, pelas conversas, pelas dicas, por vibrarem comigo nos bons momentos e pelo consolo nos dias tristes, pelas vindas para Seropédica, pela torcida e por não medirem esforços nunca!

À minha orientadora Magda. Peça fundamental nessa jornada! Obrigada pela confiança, pelo estágio, pela orientação, pelas dicas e ensinamentos. Ser sua orientada é motivo de orgulho!

À minha irmã Cecella e ao meu cunhado Leonardo, pelas conversas, apoio e pelos momentos inesquecíveis de risadas e diversão que tornaram essa fase um pouco menos estressante.

À minha avó Édina por toda preocupação, pelas orações, pelos telefonemas, pelo carinho, enfim, obrigada por tudo!!!

À tia Ângela que me hospedou sempre que necessário, pelos conselhos, consolos, por estar sempre presente conversando e me ouvindo e à minha prima Lara que nos presenteou com a querida Ila que veio ao mundo em um dia interminável de experimento, deixando tudo melhor!

Ao tio Marco e família, pelo interesse, carinho, por serem pessoas tão boas e especiais!

Ao meu avô Papito e minha avó Júlia, por torcerem por mim, pelas oportunidades e pelo apoio!

Às minhas amigas Ligia, Raquel e Fonkas que estiveram sempre presentes e foram fundamentais nesse período! Obrigada pela ajuda com os experimentos, pelos ensinamentos e pelas conversas! Ao amigo Fábio por entender cada momento de dificuldade, pelas risadas e atenção! Aos meus estagiários Paula e Felipe, pessoas dedicadas e queridas!!!!Agradeço também todos os outros queridos amigos do DCF que tornaram a Rural ainda mais especial.

Às minhas queridas amigas do PPGMV Amanda, Júlia e Luciana! Sem dúvida deixaram os dias de Seropédica muito melhores. Amizade que levarei para sempre!

Carol, Lilian, Irene e Jú, da faculdade para vida toda! Mesmo com a distância aliviaram os momentos de estresse durante esses dois anos, tornando tudo mais leve.

A todos os funcionários do DCF que são essenciais!!!

À Lorena, sempre pronta e disposta a ajudar com a maior boa vontade do mundo.

Aos professores dessa universidade que tive o prazer de ser aluna e de crescer muito e aos professores do tempo de faculdade que fizeram com que esse sonho crescesse ainda mais em mim.

Agradeço a todos que de alguma forma torceram por mim, vibraram com as vitórias e que estiveram do meu lado todo esse tempo!

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

SOUZA, Natalia Monnerat de. **Curso temporal da liberação local de citocinas inflamatórias no modelo de dor pós incisional em ratos.** 2013 56 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A dor pós-operatória é uma forma comum e única de dor aguda e apesar dos avanços em seu estudo, permanece subtratada. As diferentes modalidades de dor são geradas e mantidas por diferentes mecanismos fisiopatológicos, devendo ser estudadas independentemente. Tem sido postulado que as citocinas possam desempenhar papel chave na dor pós-cirúrgica. Desta forma, analisamos o curso temporal da liberação local de citocinas inflamatórias no modelo de incisão plantar em ratos. Inicialmente analisamos o padrão de hiperalgesia mecânica e térmica através de testes nociceptivos de von Frey e no teste de Hargreaves, respectivamente. Nossos animais tiveram, em ambos os testes, 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, nós analisamos a liberação local das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 pelo método de quimiluminescência às 2, 6, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a incisão plantar. Nossos resultados mostram que a incisão plantar produziu um aumento significativo nas concentrações de IL-1 $\beta$  e de IL-6 seis e 8 horas após incisão, retornando a valores não significativamente diferentes do controle nos demais tempos estudados. As concentrações de TNF- $\alpha$  não apresentaram valores estatisticamente diferentes do controle em nenhum tempo estudo. As concentrações de IL-10 aumentaram significativamente 2 horas pós incisão, retornando a valores não significativamente diferentes do controle nos demais tempos estudados. Já os níveis de IL-4 se encontravam elevados no grupo controle, havendo redução da concentração desta citocina 24 e 48 h após a cirurgia. A manutenção da hiperalgesia não parece estar associada a uma aumento sustentado nas concentrações destas citocinas no local da incisão. Outros mecanismos e diferentes mediadores devem contribuir para a manutenção da hiperalgesia no modelo de dor pós-operatória.

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

## ABSTRACT

SOUZA, Natalia Monnerat de. **Time course of local release of inflammatory cytokines in a model of post-incisional pain in rats.** 2013 56 p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The postoperative pain is a common and single form of acute pain and despite advances in their study, remains undertreated. Different types of pain are generated and maintained by different pathophysiological mechanisms, therefore each type of pain should be studied independently. It has been postulated that cytokines may play a key role in post-surgical pain. Thus, we analyzed the time course of local release of inflammatory cytokines in the plantar incision model in rats. Initially we analyzed the pattern of thermal and mechanical hyperalgesia using the nociceptive tests of von Frey test and Hargreaves, respectively. Our animals had in both tests lower withdrawal thresholds 1 hour after incision, and this reduction could be observed until 96 hours after surgery as compared with animals without incision. Based on these results, we analyzed the local release of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  and anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4 by chemiluminescence at 2, 6, 8, 24, 48, 72 and 96 hours after the plantar incision. Our results show that plantar incision produced a significant increase in the concentrations of IL-1 $\beta$  and IL-6 six and 8 hours after incision, returning to values not significantly different from controls in the other periods studied. The concentrations of TNF- $\alpha$  were not statistically different from controls at any time study. The concentrations of IL-10 significantly increased 2 hours after incision, returning to values not significantly different from controls in the other periods studied. The levels of IL-4 were higher in the control group, with a significant reduction of the concentration of this cytokine 24 and 48 h after surgery. The maintenance of hyperalgesia does not appear to be associated with a sustained increase in the concentrations of these cytokines at the site of the incision. Different mechanisms and mediators must contribute to the maintenance of the hyperalgesia in this model of postoperative pain.

**Keywords:** postoperative pain, nociception, cytokine

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Figura 1: Esquema representando as vias nociceptivas.** As fibras A $\alpha$ , A $\beta$  e C têm 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 periaquidital (PAG), que se comunicam com o sistema límbico. Dessas regiões partem projeções descendentes para o núcleo do tronco encefálico como bulbo ventro medial rostral (RVM). Os núcleos da lâmina V (WDR) dirigem-se ao tálamo e se projetam para regiões corticais (Modificado de D’MELLO & DICKENSON, 2008). Pag. 8.

**Figura 2: Ativação imune e sensibilização nociceptor após a lesão.** Lesão inicia a liberação de mediadores que ativam TLRs em queratinócitos e mastócitos (MC) perto do terminal nervoso. Os vasodilatadores são também liberados, promovendo a adesão e transmigração das células do sistema, incluindo células T (T), neutrófilos (N) e monócitos (MN), e do recrutamento de macrófagos (M). Estas células, uma vez ativadas, lançam uma bateria de mediadores inflamatórios que atuam em receptores expressos em terminações nervosas nociceptores adjacentes, levando à sensibilização nociceptor periférico. Os alvos incluem receptores de citocinas (CYTR), receptores acoplados à proteína G (GPCR), canais dependentes de ligante-(LGC) e receptor tipo tirosina quinase 1 (TrkA). Três exemplos de interações entre células do sistema imunológico e terminais nervosos são retratados. (1) A desgranulação dos mastócitos requer contato direto entre mastócitos e terminações nervosas, mediada pelo N-caderina (N-cad). A metaloproteinase MMP-24 impede a desgranulação dos mastócitos pela digestão N-cad. (2) Liberação de TNF- $\alpha$  e IL-15 por nervos periféricos e células de Schwann ativa o MMP-9 e facilita o recrutamento de macrófagos. (3) terminais nervosos nociceptivos podem secretar substância P (SP) e CGRP através da ativação antidrômica de ramos terminais nervosos vizinhos (ver texto). Substância P e CGRP promovem vasodilatação e extravasamento de células imunes. Endopeptidase neutra (NEP) restringe a neuroinflamação induzida pela substância P e CGRP desgranulado (REN & DUBNER, 2010). Pag.11.

**Figura 3: A via do receptor Toll-like (TLR).** Ativação de TLR inicia a resposta imune inata, que está envolvido na cascata de citocinas que medeia a dor crônica. A ativação da sinalização TLR ocorre de por meio de uma família de proteínas de adaptador (“adaptor-proteins”, que inclui a proteína MyD88, o receptor de interleucina-1 associada a quinase, proteína de interação Toll, e a proteína adaptadora TRAF6. Estas proteínas ativam a quinase TAK1, que finalmente levam à ativação de cascatas de sinalização, incluindo fator nuclear kB e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) vias. A ativação destas vias pode então induzir a síntese de citocinas, tais como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6). Ambos os TLRs e receptores para IL-1 $\beta$  têm estruturas semelhantes e compartilham um motive citoplasmático. Ativação de ambos os tipos de receptores recruta um complexo “scaffolding” que levam à supra-regulação da produção de citocinas (MILLER et al., 2009). Pag. 17.

**Figura 4: Esquema ilustrando o protocolo experimental para avaliação da hiperalgesia.** As linhas verticais ilustram os tempos que foram realizados os testes de avaliação da hiperalgesia térmica e hiperalgesia mecânica antes e após a cirurgia de incisão plantar em ratos. Pag. 21.

**Figura 5: Esquema ilustrando o protocolo experimental para avaliação liberação de citocinas.** O esquema indica os momentos da coleta de tecido para dosagem da concentração de citocinas locais após a cirurgia de incisão plantar. Pag. 22.

**Figura 6: Procedimento cirúrgico descrito por Brennan et al.(1996) para indução do dor pós incisional (TEIXEIRA, 2010) Pag. 23.**

**Figura 7: Aparelho utilizado para realização dos testes de hiperalgesia mecânica- Von Frey.** A figura mostra o box de acrílico na superfície gradeada e o espelho que auxilia na inserção do transdutor de força pela grade ([www.insightltda.com.br](http://www.insightltda.com.br)). Pag. 24.

**Figura 8: Aparelho utilizado para realização dos testes de hiperalgesia térmica- Hargreaves.** A figura ilustra o local onde o animal permanece enquanto recebe o estímulo térmico através da superfície de vidro. Pag. 25.

**Figura 9:** Esquema dos procedimentos realizados pela técnica de quimiluminescência MILLIPLEX xMAP<sup>®</sup> technology para dosagem de citocina. Pag. 27.

**Figura 10:** Gráfico comparando os grupos não incisado (n=7) e incisado (n=7) submetidos aos testes de Von Frey. Os símbolos ● e ○ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de limiares da retirada da pata medida em gramas ao longo do tempo após a cirurgia. \* indica diferença entre o grupo incisado e não incisado. Pag. 29.

**Figura 11:** Gráfico comparando os grupos não incisado (n=7) e incisado (n=7) submetidos aos testes de Von Frey. Os símbolos ● e ○ e as barras representam a média e o erro padrão das variações de limiares da retirada da pata medida em segundos ao longo do tempo após a cirurgia. \* indica diferença entre o grupo incisado e não incisado. Pag. 30.

**Figura 12:** Gráfico comparando a concentração de IL-1 $\beta$  no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representa a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. \* indica grupos com diferença significativa. Pag. 31.

**Figura 13:** Gráfico comparando a concentração de IL-4 no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representa a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. \* indica grupos com diferença significativa. Pag. 32.

**Figura 14:** Gráfico comparando a concentração de IL-6 no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representa a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. \* indica grupos com diferença significativa. Pag. 33.

**Figura 15:** Gráfico comparando a concentração de IL-10 no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. \* indica grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle e + indica diferença significativa em relação ao grupo 24h. Pag. 34.

**Figura 16:** Gráfico comparando a concentração de IL-10 no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representa a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. Pag. 35.

**Figura 17:** Gráfico mostrando a correlação entre os valores dos testes de Hargreaves e Von Frey feitos no modelo de dor pós- incisional em ratos.. Pag. 36.

**Figura 18:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-1 $\beta$  e da citocina IL-6 locais no modelo de dor pós- incisional em ratos. Pag. 37.

**Figura 19:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-4 e da citocina IL-6 locais no modelo de dor pós- incisional em ratos. Pag. 38.

**Figura 20:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-4 e da citocina IL-10 locais no modelo de dor pós-incisional em ratos. Pag. 39.

**Figura 21:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-10 e da citocina IL-6 locais no modelo de dor pós- incisional em ratos. Pag. 40.

**Figura 22:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-10 e da citocina TNF- $\alpha$  locais no modelo de dor pós- incisional em ratos. Pag. 41.

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPC- Monofosfato cíclico de adenosina  
ANOVA- Análise de variância  
ATP- Adenosina trifosfato  
BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro  
g- Gramas  
CGRP- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
COX2- Cicloxigenase 2  
CYTR- Receptor de citocinas  
DRG- Gânglio da raiz dorsal  
ELISA- Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima  
GABA- Ácido gama-aminobutírico  
G-CSF- Fator estimulador de colônias granulocitárias  
GFAP- Proteína glial fibrilar ácida  
IASP- Associação internacional para estudos da dor  
IFN- $\gamma$  – Interferon gama  
IFN- $\alpha$ - Interferon alfa  
IL-1 $\beta$ - Interleucina 1beta  
IL-4- Interleucina 4  
IL-6- Interleucina 6  
IL-8- Interleucina 8  
IL-10- Interleucina 10  
JAK- Janus quinase  
LGG- Canais dependentes de ligantes  
M- Macrófagos  
MAPK- Proteína quinase ativada por mitógeno  
MC- Mastócitos  
MMP- Metaproteinase  
MN- Monócitos  
MTP- Metaloproteinase  
N- Neutrófilos  
N-cad- N-caderina

NEP- Endopeptidase neutra  
NF- $\kappa$ B- Fator  $\kappa$ B  
NGF- Fator de crescimento nervoso  
NMDA- N-Metil-D-Aspartato  
NPI- Sem incisão plantar  
PAG- Substância cinzenta periaquidutal  
PGE2- Prostaglandina E2  
PKC- Proteína quinase  
RNA- Ácido ribonucleico  
RNAm- Ácido ribonucleico mensageiro  
RT-PCR- Reação em cadeia de polimerase-transcriptase reversa  
SOCS- Supressoras de sinalização de citocinas  
s- segundos  
SA-PE- Estreptavidina- ficoeritina  
SP- Substância P  
STAT- Proteínas transdutoras do sinal e ativadoras da transcrição  
T- Células T  
TLR- Toll-Like  
TLRs- Receptores Toll-Like  
TNF $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa  
TNFR1- Receptor de TNF tipo 1  
TNFR2- Receptor de TNF tipo 2  
TrkA- Receptor tirosina quinase  
TRP- Receptor de potencial transiente  
TRPV1- Receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1  
TRPV4- Receptor de potencial transiente vanilóide tipo 4

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	vi
AGRADECIMENTOS .....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	x
LISTA DE TABELAS E FIGURAS .....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	xv
SUMÁRIO .....	1
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	6
3.1 DOR.....	6
3.2 DOR INCISIONAL .....	8
3.3 SENSIBILIZAÇÃO PERIFÉRICA.....	8
3.4 SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL .....	11
3.5 PAPEL DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA HIPERALGESIA.....	12
3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE DA DOR PÓS-INCISIONAL.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 ANIMAIS .....	20
4.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS.....	20
4.2.1 Avaliação da Hiperalgisia .....	20
4.2.2 Curso temporal da liberação de citocinas .....	21
4.3 MÉTODO DE INCISÃO NA PATA .....	21
4.4 TESTES NOCICEPTIVOS .....	23
4.4.1 Avaliação da Hiperalgisia Mecânica – TESTE DE VON FREY: .....	23
4.4.2 Avaliação da Hiperalgisia Térmica - TESTE DE HARGREAVES: .....	24

4.5 COLETA E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS .....	24
4.6 ANÁLISE DAS CITOCINAS PERIFÉRICAS .....	25
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
5. RESULTADOS .....	28
5.1 TESTES DE HIPERALGESIA MECÂNICA- <i>VON FREY</i> .....	28
5.2 TESTES DE HIPERALGESIA TÉRMICA- <i>HARGREAVES</i> .....	29
5.3 LIBERAÇÃO LOCAL DE IL-1B APÓS INCISÃO .....	30
5.4 LIBERAÇÃO DE IL-6 NO LOCAL DA INCISÃO .....	31
5.5 LIBERAÇÃO DE TNF $\alpha$ NO LOCAL DA INCISÃO .....	32
5.6 LIBERAÇÃO DE IL-10 NO LOCAL DA INCISÃO .....	33
5.7 LIBERAÇÃO LOCAL DE IL-4 APÓS INCISÃO .....	34
5.8 CORRELAÇÃO ENTRE OS TESTES DE HARGREAVES X VON FREY ...	35
5.9 CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE DIFERENTES CITOCINAS NO MODELO DE DOR PÓS INCISIONAL .....	36
5.9.1 Correlação entre a concentração de IL-1 $\beta$ e IL-6 .....	36
5.9.2 Correlação entre a concentração de IL-4 e IL-6 .....	37
5.9.3 Correlação entre as concentrações de IL-4 E IL-10 .....	38
5.9.4 Correlação entre as concentrações de IL-10 E IL-6 .....	39
5.9.5 Correlação entre as concentrações de IL-10 E TNF- $\alpha$ .....	40
6. DISCUSSÃO .....	41
6.1 HIPERALGESIA INDUZIDA PELO MODELO DE INCISÃO PLANTAR ...	41
6.2 LIBERAÇÃO LOCAL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO MODELO DE INCISÃO PLANTAR .....	43
6.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS .....	45
7. CONCLUSÕES .....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

A dor é um fenômeno multidimensional, envolvendo aspectos físico-sensoriais e aspectos emocionais. Sendo considerada pela Associação Internacional para Estudos da Dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com danos reais ou potenciais em tecidos, ou assim percebida como dano”. A dor apresenta dois componentes: um perceptivo-discriminativo, que permite ao organismo identificar o estímulo como doloroso, localizá-lo numa determinada região e discriminar sua intensidade; e um afetivo-motivacional, que compreende a associação de aspectos emocionais ao estímulo e uma série de respostas de defesa que inclui desde a retirada reflexa até o comportamento de fuga ou luta.

Lesão dos tecidos e nervos inicia uma resposta inflamatória que se destina a conter patógenos, tecidos danificados, limpar e promover a reparação. Como um dos cinco sinais cardinais da inflamação, a dor é inicialmente protetora e benéfica para a recuperação. No entanto, sob certas condições, a dor persiste e se torna crônica, mesmo após a cura da lesão. A dor crônica afeta milhões de pessoas e é difícil de tratar. Os mecanismos pelos quais a dor crônica surge após lesão aguda permanecem obscuros.

Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, pelo menos 30% dos indivíduos durante algum momento da sua vida é afetado pela dor e, em 10 a 40% deles, tem duração superior a um dia. É a causa principal de sofrimento, incapacitação para o trabalho e leva a graves consequências psicossociais e econômicas. Muitos dias de trabalho podem ser perdidos por causa da dor por aproximadamente 40% dos indivíduos. A incidência da dor crônica no mundo oscila entre 7 e 40% da população e como consequência da mesma, cerca de 50 a 60% dos que sofrem dela ficam parcial ou totalmente incapacitados de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida, sendo a razão da procura de clínicas médicas em um terço dos casos.

A dor pós-operatória é uma forma comum e única de dor aguda e uma analgesia eficiente além de fornecer conforto ao paciente é capaz de reduzir a morbidade e a mortalidade após a cirurgia. Nos Estados Unidos quase 100 milhões de cirurgias são realizadas por ano, e mais de 80% dos pacientes relatam dor pós-operatória, indicando que a dor aguda é subtratada podendo tornar-se uma condição crônica. Pode-se gastar com um paciente de 30 anos com dor crônica cerca de 1 milhão de dólares até o fim de sua vida.

Como as dores de diferentes etiologias apresentam mecanismos fisiopatológicos distintos, algumas estratégias terapêuticas somente são eficazes contra algumas formas de dor persistente. Desta forma, modelos clínicos e pré clínicos de dor pós cirúrgica tornaram-se de extrema importância para investigação desses mecanismos fisiopatológicos da dor e para avaliação de novas terapias analgésicas.

A injúria tecidual produzida pela incisão provoca hiperalgesia, que é o aumento da sensibilidade a dor no local da lesão, que inclui tanto a diminuição do limiar nociceptivo como o aumento da resposta a estímulos supralimiáres. A hiperalgesia é decorrente de mecanismos de sensibilização central e periférico. A sensibilização periférica ocorre no local da injúria e é decorrente da sensibilização de nociceptores, enquanto que a hiperalgesia secundária envolve alterações no processamento de informação sensorial no sistema nervoso central. A sensibilização de nociceptores é resultado da resposta inflamatória iniciada pela injúria tecidual. A lesão inicia a liberação de mediadores que ativam TLRs (Toll-like receptors) em queratinócitos e mastócitos próximos ao terminal nervoso. Substâncias vasodilatadoras são também liberadas, promovendo a adesão e transmigração das células do sistema imune, incluindo células T, neutrófilos e monócitos, e o recrutamento de macrófagos. É lançada uma bateria de mediadores inflamatórios como acetilcolina, bradicinina, interleucinas, prostaglandinas, substância P, leucotrienos, fator de ativação plaquetária, radicais ácidos, íons potássio, tromboxanos, e fator de crescimento nervoso que atuam em receptores expressos em terminações nervosas nociceptores adjacentes, levando à sensibilização nociceptor periférico. Diversas citocinas são liberadas durante este processo e desempenham um papel fundamental na geração e na manutenção da dor.

Apesar de grandes avanços no entendimento do papel das citocinas inflamatórias em outros modelos de dor, poucos estudos têm analisado o papel delas no modelo de dor pós-incisional em ratos. Desta forma o presente estudo propõe avaliar o curso temporal de liberação local de citocinas interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 4 (IL-4) até 96 horas após incisão plantar em ratos e relacionar este padrão de liberação com a manutenção da hiperalgesia térmica e mecânica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

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

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analisar a produção de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) no local da lesão em diferentes tempos.

Avaliar a relação entre a liberação de citocinas inflamatórias na pata e a manutenção da hiperalgesia causada pela incisão plantar em ratos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

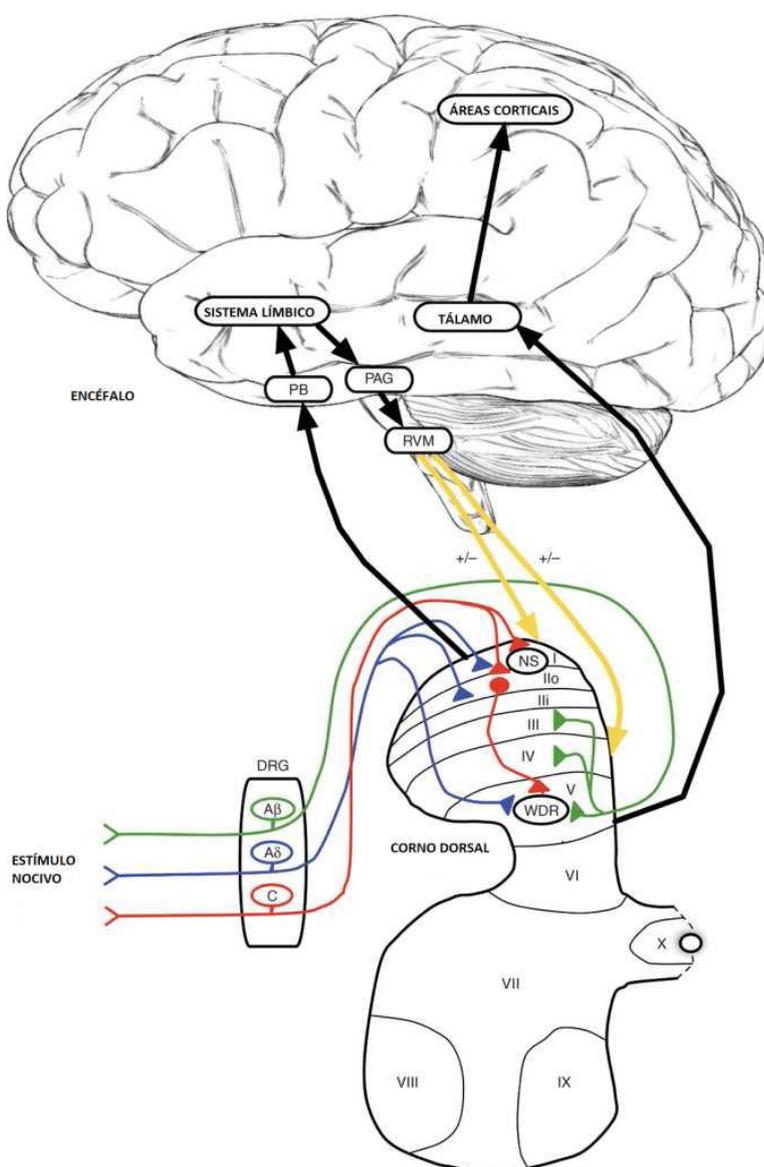
#### 3.1 DOR

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor pode ser definida uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial de tecidos (IASP, 2011). Essa sensação faz parte de todo o desenvolvimento da vida e pode ser percebida desde o nascimento até a morte (TURK & MELZACK, 1992). Pode se apresentar de duas formas: a dor fisiológica que possui função protetora e é sentida após se expor diversos estímulos; e a dor patológica decorrente de danos aos tecidos e nervos provocando mudanças no sistema nervoso sem função adaptativa e que contribui para morbidade do paciente (LAMONT, 2002).

A *nociceção* é o componente fisiológico da dor, e consiste nos processos de transdução do estímulo nocivo em sinais elétricos por nociceptores periféricos, condução dos sinais codificados por neurônios aferentes para o corno dorsal da medula espinhal e, subsequente transmissão e modulação de sinais neurais em níveis espinhais e supraespinhais (LEMKE, 2004). A percepção consciente da dor depende deste processo de nociceção (LAMONT et al., 2000). Desta forma, a nociceção refere-se a manifestações neurofisiológicas geradas por estímulos nocivos e dor envolve a percepção de um estímulo aversivo, que requer a capacidade assimilação e elaboração de impulsos sensoriais (ALMEIDA et al., 2004).

Estímulos potencialmente nocivos ativam os nociceptores, nas terminações de fibras fibras C e A $\delta$ . Estas fibras produzem sensações de dor distintas, uma vez que as fibras do tipo C são amielinizadas e as fibras do tipo A são mielinizadas, causando uma resposta bifásica à dor (BISHOP, 1958). O corpo celular destas fibras também chamados neurônios de primeira ordem estão no gânglio da raiz dorsal e seus axônios são projetados no corno dorsal da medula espinhal que é dividido em lâminas (TODD, 2002). A maior parte das fibras C e A $\delta$  terminam nas lâminas I e II e a menor parte nas lâminas mais profundas. As fibras A $\beta$  terminam nas lâminas III e IV (TODD, 2002). Os neurônios de segunda ordem, projetam axônios a partir das lâminas profundas III e IV cruzando para o lado oposto e se incorporam aos feixes espinotalâmicos na coluna anterolateral da medula espinhal. Os feixes espinotalâmicos ascendem pela medula espinhal até o tronco encefálico e formam o lemnisco

espinal junto às fibras nociceptivas do núcleo espinal trigêmeo. Os impulsos são emitidos ao tálamo, onde se localizam os núcleos de terceira ordem o qual os 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 periaquidutal, núcleo parabraquial e medula ventral medial rostral, onde há projeções descendentes de volta ao corno dorsal da medula espinal (TODD, 2002) (Figura 1). O caminho descendente é influenciado por regiões límbicas e pode ser incorporado o componente emocional na experiência dolorosa (D'MELLO & DICKENSON, 2008).



**Figura 1:** Esquema representando as vias nociceptivas. As fibras A $\delta$ , A $\beta$  e C têm corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) e transmitem os impulsos nervosos até o corno dorsal da medula espinal.

Neurônios de projeção da lâmina I (NS) inervam o núcleo parabraquial (PB) e substância cinzenta periaquidantal (PAG), que se comunicam com o sistema límbico. Dessas regiões partem projeções descendentes para o núcleo do tronco encefálico como bulbo ventro medial rostral (RVM). Os núcleos da lâmina V (WDR) dirigem-se ao tálamo e se projetam para regiões corticais (Modificado de D'MELLO & DICKENSON, 2008).

### **3.2 DOR INCISIONAL**

Uma analgesia eficiente é de extrema importância para fornecer conforto ao paciente e reduzir a morbidade e a mortalidade pós cirúrgica (BRENNAN et al., 1996), além de estudos focados em técnicas de analgesia é necessário estudar os mecanismos da dor causados pela incisão (BRENNAN et al., 2005).

A hiperalgesia causada pela incisão possui características únicas (POGATZKI & RAJA, 2003). Como as dores de diferentes etiologias apresentam mecanismos fisiopatológicos distintos, algumas estratégias terapêuticas somente são eficazes contra algumas formas de dor persistente (ZAHN et al., 2002).

A lesão tecidual provoca duas mudanças na resposta do sistema nociceptivo: a sensibilização periférica e a sensibilização central (BRENNAN et al., 2005).

### **3.3 SENSIBILIZAÇÃO PERIFÉRICA**

A sensibilização periférica conduz a 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. Tal sensibilização envolve as fibras aferentes primárias e é caracterizada pela redução do limiar de resposta, aumento na magnitude da resposta para estímulos supralimiais, aumento na atividade espontânea, bem como aumento da área em que estímulos geram potenciais de ação (BRENNAN et al., 2005).

Lesão dos tecidos e nervos inicia uma resposta inflamatória que se destina a conter patógenos, limpar tecidos danificados e promover a reparação. Após a lesão, a inflamação é desencadeada pela ativação imune inata de receptores de reconhecimento de padrões, incluindo os receptores Toll-like (TLR), que reconhecem e se ligam patógenos invasores ou moléculas endógenas liberadas a partir de células danificadas, como as proteínas *Heat-shock* entre outras. Os TLRs são expressos em células do sistema imune, incluindo monócitos ou macrófagos e células dendríticas e em células imuno-relacionadas, tais como queratinócitos.

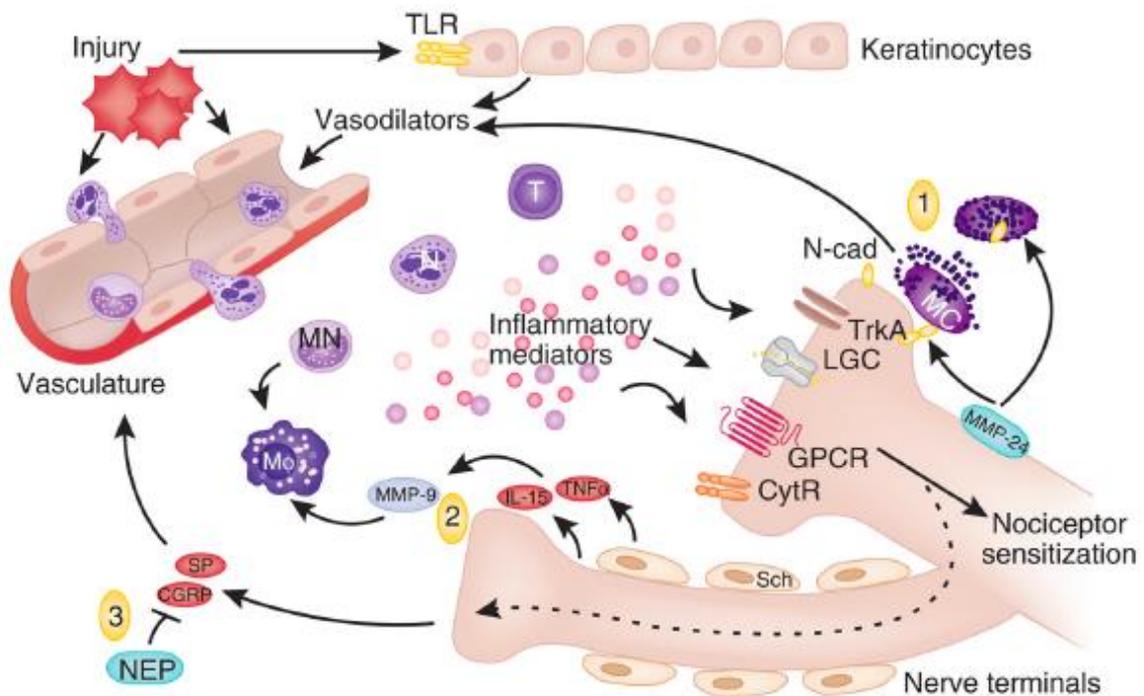
A ligação às TLRs é seguido pela ativação do fator-kB (NF-kB) de sinalização nuclear e a liberação de citocinas inflamatórias. Células imunes residentes, mastócitos e macrófagos também são ativados dentro de minutos após a lesão e liberam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de complemento (C3a e C5a) e vasodilatadores, incluindo aminas vasoativas e bradicinina. Células originárias do sangue como neutrófilos, monócitos e linfócitos T aderem às paredes dos vasos, extravasam e acumulam-se no local da lesão. Estas células imunes contribuem para a sensibilização nociceptiva periférica, liberando fatores solúveis e interagindo diretamente com nociceptores (REN & DUBNER, 2010).

Os mastócitos participam da resposta imune inata e de reações alérgicas e são degranulados em poucos minutos após uma reação inflamatória, resultando na liberação de histamina, bradicinina, prostaglandinas, fator de agregação plaquetária, substância P, leucotrienos entre outros que contribuem para vasodilatação (LAWRENCE et al., 2002). A degranulação dos mastócitos requer a interação direta entre os mastócitos e os terminais de nervo periférico, e esta interação é mediada pela molécula de adesão dependente de cálcio celular N-caderina 12. A N-caderina é expressa em mastócitos e em neurônios sensoriais primários e é clivada pela metaloproteinase MT5-MMP (MMP-24), que é expressa por neurônios (SUZUKI et al., 2004). Expressão de N-caderina é aumentada em camundongos deficientes de MT5-MMP, e isto dá origem a um aumento das interações entre mastócitos e os terminais de neurônios, aumentam a degranulação dos mastócitos e sensibilidade à dor térmica (hiperalgesia térmica) (REN & DUBNER, 2010).

O recrutamento de macrófagos após a lesão do nervo é mediada por várias citocinas inflamatórias. O TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), que é liberado a partir das células de Schwann, imediatamente após a lesão do nervo, ativa a MMP-9 (metaproteinase 9). Por sua vez, a MMP-9, promove a migração de macrófagos para o local ferido através de ruptura da barreira hemato-encefálica (SHUBAYEV, 2006; SHUBAYEV & MYERS, 2000). A interleucina 15 (IL-15), que atua sobre as células B, promove a proliferação de células T e é liberada em nervos algumas horas após a lesão. Consistente com o seu papel pro-nociceptivo, o TNF- $\alpha$  induz a sensibilização periférica do nociceptor, e a injeção intraplantar de IL-15 induz hiperalgesia mecânica (SORKIN, et al., 1997; VERRI et al., 2006). Após o recrutamento e ativação, os macrófagos contribuem para a sensibilização dos nociceptores, liberando vários mediadores solúveis (Figura 2).

Durante a inflamação neurogênica, os neurônios aferentes primários geram impulsos que se espalham através de terminações nervosas vizinhas, resultando na liberação de

neuropeptídeos vasoativos como o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP) em ramos periféricos. IL-1 também pode se ligar a terminais e induzir a liberação da substância P e migração de leucócitos. Notavelmente, a degranulação dos mastócitos é também facilitada pela substância P e CGRP. Interações neuroimunes são sinérgicas, onde vários mediadores solúveis podem amplificar a resposta e aumentar o recrutamento de células, facilitando a sensibilização e o surgimento de um estado de dor crônica (REN & DUBNER, 2010).



**Figura 2:** Ativação imune e sensibilização do nociceptor após a lesão. Lesão inicia a liberação de mediadores que ativam TLRs em queratinócitos e mastócitos (MC) perto do terminal nervoso. Os vasodilatadores são também liberados, promovendo a adesão e transmigração das células do sistema, incluindo células T (T), neutrófilos (N) e monócitos (MN), e do recrutamento de macrófagos (M). Estas células, uma vez ativadas, lançam uma bateria de mediadores inflamatórios que atuam em receptores expressos em terminações nervosas nociceptores adjacentes, levando à sensibilização nociceptor periférico. Os alvos incluem receptores de citocinas (CYTR), receptores acoplados à proteína G (CGRP), canais dependentes de ligante (LGC) e receptor tirosina quinase tipo 1 (TrkA). Três exemplos de interações entre células do sistema imunológico e terminais nervosos são retratados. (1) A degranulação dos mastócitos requer contato direto entre mastócitos e terminações nervosas, mediada pelo N-caderina (N-cad). A metaloproteinase MMP-24 impede a degranulação dos mastócitos pela digestão N-cad. (2) Liberação de TNF- $\alpha$  e IL-15 por nervos periféricos e células de Schwann ativa o MMP-9 e facilita o recrutamento de macrófagos. (3) terminais nervosos nociceptivos podem secretar substância P (SP) e CGRP através da ativação antidrômica de ramos terminais nervosos vizinhos (ver texto). Substância P e CGRP

promovem vasodilatação e extravasamento de células imunes. Endopeptidase neutra (NEP) restringe a neuroinflamação induzida pela substância P e CGRP desgranulado (REN & DUBNER, 2010).

Por outro lado, 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. Também, a ação da fosfolipase A na membrana celular provoca a liberação de ácido araquidônico. Este é metabolizado por três sistemas enzimáticos principais: a cicloxigenase, 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. Essas substâncias, sobretudo as prostaglandinas E2 (PGE2), também promovem diminuição do limiar de excitabilidade dos nociceptores (O'BANION, 1999).

### **3.4 SENSIBILIZAÇÃO CENTRAL**

Estímulos nocivos geram alterações no sistema nervoso central. A estimulação de nociceptores leva a dor espontânea, redução do limiar de sensibilidade e hiperalgesia. A sensibilização central provoca alterações como redução do limiar ou aumento da resposta a impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação de campos receptivos de neurônios do corno dorsal (ROCHA et al., 2007).

Após a lesão tecidual ocorre liberação de neurotransmissores como a substância P (SP), somatostatina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), neurocinina-A, aspartato e glutamato. Essas substâncias estão relacionadas com a ativação de potenciais pós sinápticos excitatórios e dos receptores N-metil-D- aspartato (NMDA) e não NMDA (JI et al., 2003).

A sensibilização central também é mediada pela facilitação de longo termo que envolve a ativação de fatores de transcrição e alterações na transcrição. Os fatores de transcrição modulam a relação entre o complexo receptor- neuromediador e as alterações na expressão gênica (SAND-KUHLER, 2000). O estímulo nociceptivo também aumenta a expressão de genes de resposta imediata c-fos, c-jun, de enzimas COX-2 e de genes de

resposta lenta que codificam a pródinorfina, o receptor NK1 e a trkB no corno dorsal da medula espinhal. Ocorre regulação ascendente das vias para síntese de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão.

As citocinas inflamatórias podem ser ativadas de maneira direta, ou seja, sem a participação de células gliais e astrócitos, através da ação da SP, Glutamato, Óxido Nítrico, Prostaglandinas, Fator de Crescimento Neural (NGF) e Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MARCHAND et al., 2005). Tanto a SP como a citocina G-CSF estimulam a produção de IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$  (MOSSNER et al., 2004).

A incisão induz o “*upregulation*” de 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 microglias e astrócitos na medula espinhal também contribui para a hipersensibilidade. A ativação glial estimula a produção de citocinas, como a IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ . As células gliais, quando inativadas, produzem a diminuição da hipersensibilidade mecânica, sendo um possível alvo de tratamento (OBATA et al., 2006).

### **3.5 PAPEL DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA HIPERALGESIA**

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas produzidas e liberadas por células inflamatórias (LIN et al., 2000). Uma mesma citocina pode ter diferentes ações dependendo do contexto biológico, podendo atuar em sinergismo ou antagonismo com outra citocina (KUMAR et al., 2010). São mediadores fundamentais para desenvolvimento da dor e inflamação. Quando secretadas podem atuar na resposta inflamatória como mediadores da inflamação, no crescimento e diferenciação celular (ROTHWELL & STRIJBOS, 1995).

As citocinas são pleiotrópicas, então podem apresentar funções diferentes. Podem exercer função de uma outra citocina em determinadas situações, por isso existe a dificuldade do bloqueio e desenvolvimento de terapias baseadas numa única citocina. Também podem ter interação sinérgica aumentando seus efeitos quando agem em conjunto ou podem até inibir ou anular umas às outras, fazendo um balanço entre elas (TURRIN & PLATA-SALAMÁN, 2000; RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012). Por isso a generalização do efeito de uma citocina de uma condição para outra pode ser perigosa.

Normalmente as citocinas agem aonde são produzidas, ou seja, possuem ação autócrina, agindo na mesma célula que a produziu. Também poder exercer função em uma

célula próxima (ação parácrina) e quando produzidas e secretadas em grandes quantidades podem entrar na circulação e ter uma função endócrina (GIBSON et al., 2004).

A maioria das citocinas pró-inflamatórias é regulada por intermédio da via JAK-STAT. Assim que a citocina se liga ao seu receptor é ativada a cascata de sinalização intracelular através da Janus quinase (JAK), fosforilando uma tirosina. Proteínas transdutoras do sinal e ativadoras da transcrição (STAT) se ligam ao local fosforilado através do domínio SH2, entrando no núcleo celular e ativando a transcrição de genes que respondem às citocinas (KISSELEVA et al., 2002). A regulação dessa resposta é obtida pela ativação de genes que levam à produção de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS). Essas proteínas podem agir se ligando diretamente ao receptor; reconhecendo a tirosina fosforilada e se ligando a Janus quinase impedindo sua ativação ou competindo pelo sítio de ação do receptor inibindo a STAT (NICOLA et al., 1999; SHUAI & LIU, 2003; STARR & HILTON, 1999).

As citocinas podem ser classificadas de várias formas. Uma classificação muito utilizada é baseada em seu efeito final: citocinas anti-inflamatórias, quando inibem a resposta inflamatória ou como pró-inflamatórias quanto estimulam a inflamação (RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012). A IL-1, TNF, IFN- $\gamma$  (interferon-gama), IL-12, IL-18 e de fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos são bem caracterizados como citocinas pró-inflamatórias, ao passo que a IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\alpha$  e fator de crescimento transformante- $\beta$  são reconhecidos como citocinas anti-inflamatórias (VITKOVIC et al., 2001; RUBIO-PEREZ & MORILLAS-RUIZ, 2012). Cavaillon (2001) discute que esta classificação entre pro e anti-inflamatória é muito simplista. Ele argumenta que a resposta inflamatória é uma interação de mediadores extremamente complexa cuja contribuição exata pode depender de muitos parâmetros. Neste caso, para aumentar a complexidade, não se deve esquecer que os seres humanos e os animais não são iguais em termos das suas respostas inflamatórias. Os conhecidos polimorfismos genéticos de diversas citocinas pró- e anti-inflamatórias são associados com a amplitude/intensidade do processo inflamatório. Adicionalmente, existe um outro polimorfismo em termos da reatividade das células de destino em resposta à sinalização de citocinas. Esta heterogeneidade individual também deve ser considerada no estudo da resposta inflamatória (CAVAILLON, 2001). Desta forma, a ação das citocinas deve ser discutida em cada modelo experimental especificamente.

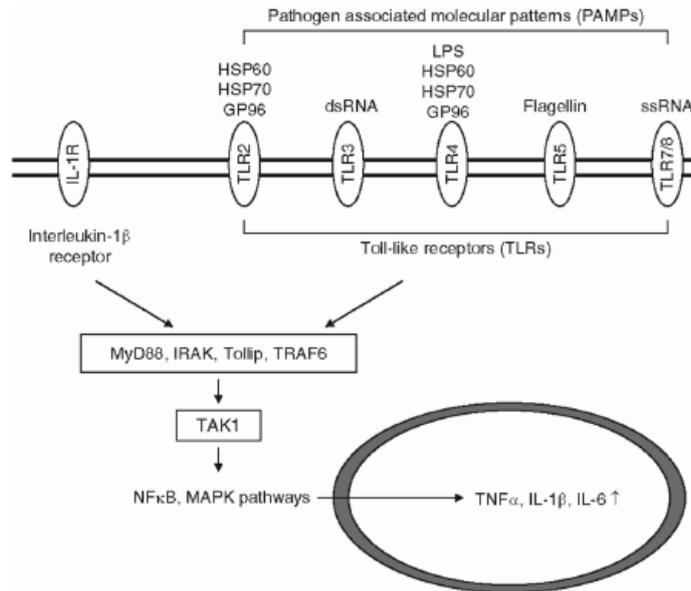
Um progresso considerável foi feito na identificação e no mecanismo de ação de citocinas pró-algésicas. Agora é claro que, em resposta a uma lesão ou infecção, as citocinas

podem ser produzidas tanto por neurônios como células da glia, e isto pode ocorrer tanto periférica como centralmente. As citocinas podem também ser produzidas por células do sistema imunológico que participam na resposta à lesão, infecção ou toxicidade. Uma vez sintetizados por estes diferentes tipos de células, as citocinas produzem efeitos de curto prazo e de longo prazo sobre a excitabilidade de neurônios sensoriais. Alguns destes efeitos são produzidos pelas próprias citocinas e alguns podem regular positivamente a síntese e liberação de mediadores sob o seu controle. Assim, a resposta de citocinas é uma série complexa de eventos que, finalmente, resulta em alterações a longo prazo no comportamento do nociceptor (MILLER et al., 2009). A sensibilização do nociceptor é resultado da ativação de uma "cascata" de produção de citocinas. Estas cascatas de citocinas parecem iniciar com a produção de certas citocinas chaves multifuncionais que iniciam e orquestram a produção subsequente de outras citocinas e de numerosos outros mediadores pró-algésicos. As primeiras citocinas ligadas à hipernocicepção inflamatória foram a IL-1 $\beta$  (FERREIRA et al., 1988) e TNF- $\alpha$  (CUNHA et al. 1992 ). Estas citocinas podem produzir efeitos diretos sobre os neurônios sensoriais e pode dar origem a novos mediadores, incluindo outras citocinas, quimiocinas, prostanóides, neurotrofinas, cininas, lipídios, ATP, e membros da via do complemento. A supra-regulação de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  representa um dos primeiros eventos observados nos nervos sensoriais em resposta ao trauma ou infecção. Por exemplo, após a lesão de constrição crônica do nervo ciático, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no nervo lesado aumentaram mais de dez vezes dentro de 1 h (UCEYLER et al., 2007). Ambas citocinas são capazes de suprarregular a síntese de numerosos mediadores e podem produzir comportamentos de hipersensibilidade a dor quando administradas localmente, sobre a pele, por via sistêmica, ou na medula espinal (OPREE & KRESS, 2000; SCHAFERS et al., 2003, MCMAHON et al., 2005). A síntese de citocinas locais parece ser suficiente para produzir todas as alterações moleculares subsequêntes que medeiam a dor crônica (WHITE et al., 2007). A inibição do TNF- $\alpha$  ou da ação de IL-1 $\beta$ , utilizando anticorpos neutralizantes ou estratégias semelhantes, inibe o desenvolvimento do comportamento de dor crônica numa variedade de modelos (SCHAFERS & SOMMER, 2007). Por exemplo, anticorpos de TNF- $\alpha$  atenuam o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e alodínia mecânica em vários modelos de dor neuropática (CUNHA et al 2007;. SASAKI et al., 2007; ZANELLA et al., 2008). Resultados como estes têm incentivado a visão de que a manipulação da síntese de citocinas num ponto no início do desenvolvimento do comportamento da dor crônica com reagentes

deste tipo pode ter um papel terapêutico no tratamento de síndromes de dor crônica (MILLER et al., 2009).

Apesar de uma enorme quantidade de estudos sobre a cascata de citocinas inflamatórias induzidas pelo estímulo e desenvolvimento de hipersensibilidade a dor, muito poucos grupos têm investigado os mecanismos de manutenção da dor crônica. O estágio inicial na manutenção da dor é dependente de cálcio, uma vez que o uso de um inibidor de calpaína pode diminuir os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  1 h após a lesão, enquanto que os inibidores da transmissão sináptica excitatória (por exemplo, com o bloqueador do receptor de NMDA, MK801) não afetam os níveis destas citocinas. Por outro lado, MK801 diminuiu com sucesso os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  durante 3 dias, enquanto os inibidores da calpaína não tiveram efeito (UCEYLER et al., 2007). Assim, é possível que a manutenção da dor crônica seja dependente da atividade inicial dos neurônios sensoriais.

Elucidar a sequência exata dos eventos celulares e moleculares que levam ao início de cascatas de citocinas relacionadas à dor é uma tarefa muito importante. Embora a resposta para esta questão não esteja completamente clara, há boas evidências de que os eventos iniciais são os mesmos que aqueles identificados na iniciação dos sinais que desencadeiam a resposta imune inata. Por exemplo, a ativação dos TLRs é um ponto de partida possível para a via das citocinas, que resulta na síntese de citocinas pleiotrópicas mestres como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e frequentemente também a interleucina-6 (IL-6). Os ligantes que ativam TLRs são epítomos associados a patógenos, ou "padrões moleculares associados a patógenos".



**Figura 3:** A via do receptor Toll-like (TLR). Ativação de TLR inicia a resposta imune inata, que está envolvida na cascata de citocinas que medeia a dor crônica. A ativação da sinalização TLR ocorre por meio de uma família de proteínas de adaptador (“adaptor-proteins”, que inclui a proteína MyD88, o receptor de interleucina-1 associada a quinase, proteína de interação Toll, e a proteína adaptadora TRAF6. Estas proteínas ativam a quinase TAK1, que finalmente levam à ativação de cascatas de sinalização, incluindo fator nuclear kB e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) vias. A ativação destas vias pode então induzir a síntese de citocinas, tais como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6). Ambos os TLRs e receptores para IL-1 $\beta$  têm estruturas semelhantes e compartilham um motive citoplasmático. Ativação de ambos os tipos de receptores recruta um complexo “scaffolding” que levam à supra-regulação da produção de citocinas (MILLER et al., 2009).

O TNF- $\alpha$  claramente produz alterações na excitabilidade de neurônios sensoriais numa variedade de níveis. Algumas das alterações a longo prazo no comportamento exigem alterações na transcrição de genes e expressão de proteínas. No entanto, também é claro que o TNF- $\alpha$  e outras citocinas podem produzir mudanças muito rápidas na excitabilidade neuronal que parecem não exigir alterações na transcrição de gene. Estas alterações na excitabilidade provavelmente podem ser efeitos diretos da sinalização de citocinas nas propriedades de canais iônicos, incluindo canais de sódio dependentes da voltagem e receptor de potencial transiente (TRP) expressos pelos nervos sensoriais (MILLER et al., 2009) (Figura 3).

TNF- $\alpha$  produz os seus efeitos através da ativação de dois subtipos de receptores de TNF- $\alpha$ , TNFR1 e TNFR2 (MACEWAN, 2002). TNFR1 é expresso exclusivamente em células neuronais e TNFR2 é principalmente expresso em macrófagos e / ou monócitos no DRG (gânglio da raiz dorsal) em condições inflamatórias (LI et al. 2004). Os efeitos dependentes de TNFR1 parecem ser os mais relevantes para o desenvolvimento de comportamentos porque a hiperalgesia mecânica induzida por TNF- $\alpha$  exógena ou por inflamação é reduzida em camundongos *knockout* de TNFR1, mas não em camundongos *knockout* de TNFR2, e anticorpos neutralizantes de TNFR1 bem como o anti-sense RNA contra o TNFR1 podem reduzir hiperalgesia induzida experimentalmente (SOMMER et al., 1998, PARADA et al., 2003). A ativação de receptores de TNF- $\alpha$  produz uma vasta gama de opções de sinalização, incluindo a ativação da via MAPK. Os efeitos rápidos do TNF- $\alpha$  podem envolver a ativação de TNFR1 expresso por nociceptores e produzir via fosforilação de p38 e induzir alterações na excitabilidade neuronal (aumento das correntes resistentes a Tetrodotóxina e a translocação de TRPV1, receptores tipo vaniloide 1) (MILLER et al., 2009).

Além disso, o efeito do TNF $\alpha$  na hipersensibilidade mecânica é inibido pela indometacina, atenolol e antagonistas de IL-1 $\beta$ , o que sugere que prostanóides, aminas simpáticas e a IL-1 $\beta$  são mediadores da nocicepção causada pelo TNF- $\alpha$  (CUNHA et al., 1992; POOLE et al., 1999).

Outras citocinas podem também produzir efeitos rápidos na sinalização excitatória em neurónios DRG. Por exemplo, sabe-se que os neurónios DRG podem expressar IL-1 $\beta$  e IL-6 em certas circunstâncias, assim como os componentes do complexo receptor da IL-6 e o IL-1R, o que sugere que estas duas citocinas podem também produzir efeitos diretos sobre a excitabilidade do neurónio DRG.

Em síntese, as principais citocinas que são rapidamente induzidas em associação com a resposta imune inata podem excitar neurónios DRG por uma variedade de mecanismos. Alguns destes mecanismos são demasiadamente rápidos para envolver efeitos sobre a transcrição de genes e provavelmente alteram, via a regulação de cinase, as condutâncias de correntes importantes como a de canais de sódio e TRP. Moléculas tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 podem ser rapidamente reguladas positivamente pela microglia na medula espinhal, e frequentemente por elementos periféricos, tais como os próprios neurónios sensoriais ou suas células gliais associadas. Qualquer que seja a fonte celular das citocinas produzidas em

resposta a uma lesão, o aumento da excitabilidade neuronal sensorial pode ser um dos primeiros efeitos induzidos pelas citocinas durante a dor crônica (MILLER et al., 2009).

Durante o curso da inflamação, citocinas pro- e anti-inflamatórias são produzidas, e o balanço entre elas determina a magnitude da resposta inflamatória. Para limitar as consequências deletérias da ação prolongada de citocinas pró-inflamatórias, a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  é acompanhada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1ra. Estas citocinas anti-inflamatórias modulam eventos inflamatórios e imunológicos na inibição da produção e na ação das citocinas pró-inflamatórias. É importante mencionar que a IL-4 e IL-13 não são apenas anti-inflamatórias, em situações alérgicas atuam como citocinas pró-inflamatórias (VERRI et al., 2006).

A interleucina 4 (IL-4) é produzida por linfócitos T ativados, mastócitos e células gliais (DE WALL MALEFYT et al., 1995). Esta citocina suprime a produção de outras citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-8 além de COX2 (FENTON et al., 1992). Também é capaz de diminuir a resposta à dor estimulada por bradicinina, carragenina, TNF $\alpha$  e ácido acético (CUNHA et al., 1999; VALE et al., 2003).

A IL-10 foi a primeira citocina anti-hipernociceptiva descrita e é liberada por células T ativadas, células B, macrófagos e mastócitos (UCEYLER et al., 2009). Tem sido demonstrado que a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias. Esta ação supressora imune foi demonstrada em camundongos deficientes de IL-10 que desenvolvem artrite induzida por colágeno. Uma resposta similar foi observada em ratos tratados com anticorpo anti-IL-10 (FIORENTINO et al., 1991, KASAMA et al., 1995). Diferentemente, a neutralização da IL-10 suprimiu significativamente a gravidade da artrite (TANAKA et al., 1996; VERRI et al., 2006)

Apesar de grandes avanços no entendimento do papel das citocinas na dor como um todo, poucos estudos discutem o padrão temporal da liberação de citocinas na dor pós-operatória. Em ratos submetidos à incisão torácica, foi observado aumento dos níveis de RNAm de IL-1 $\beta$  na medula espinhal a partir da primeira hora após a cirurgia com retorno aos níveis basais em 24 horas (FU et al., 2006). Loram e colaboradores (2007) usando um modelo de incisão na cauda observaram um aumento na liberação local de IL-1 $\beta$  e IL-6 iniciado no primeiro dia e mantido até o quarto dia após a incisão. Já as concentrações de TNF- $\alpha$  aumentaram no segundo dia pós incisão e foram mantidos por oito dias (LORAM et al., 2007b). Não encontramos estudos demonstrando a liberação citocinas anti-inflamatórias em modelos de dor pós-operatória.

### **3.6 MÉTODOS DE ANÁLISE DA DOR PÓS-INCISIONAL**

O desenvolvimento de modelos animais que simulem condições dolorosas, ajudam a compreender os processos que conduzem a sua percepção. Um pesquisador só pode avaliar a experiência dolorosa do animal usando indicadores comportamentais secundários. Como a dor não pode ser diretamente quantificada nos modelos animais, respostas comportamentais são avaliadas após sua indução experimental. Vários estímulos foram desenvolvidos para mensurar o comportamento nociceptivo a partir da retirada da região afetada indicando dor.

Durante o final de 1800, Von Frey desenvolveu um teste de sensação ao toque. Eram utilizados fios de cabelo e pêlos de cavalo com flexibilidade diferentes para medir os diversos limiares de pressão e tato (BELL- KROTOSKI, 1984). O teste de Von Frey é um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico muito utilizado clinicamente. Porém devido a sua eficácia passou a ser utilizado também em experimentos laboratoriais para avaliar o papel de diferentes medicamentos sobre a sensibilidade em animais (MÖLLER et al, 1998).

Outro método eficaz para avaliação nociceptiva é o método de Hargreaves que foi descrito em 1988 e consiste no aquecimento de uma pequena circunferência a partir de uma fonte de calor infravermelho crescente, onde é colocada a pata ou cauda do animal e observado em quanto tempo é feita a sua retirada (HARGREAVES, 1988).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

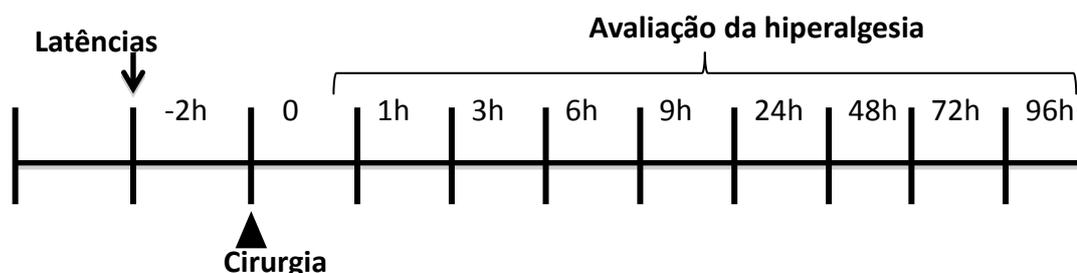
Foram utilizados ratos albinos (*Ratus norvegicus*) variedade Wistar, adultos, pesando entre 240g a 280g, fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Em todas as fases do experimento os animais ficaram em um ambiente com ciclo de claro- escuro de doze horas e receberam água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob protocolo número 23.083.000962/2011-52.

### 4.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS

#### 4.2.1 Avaliação da Hiperalgisia

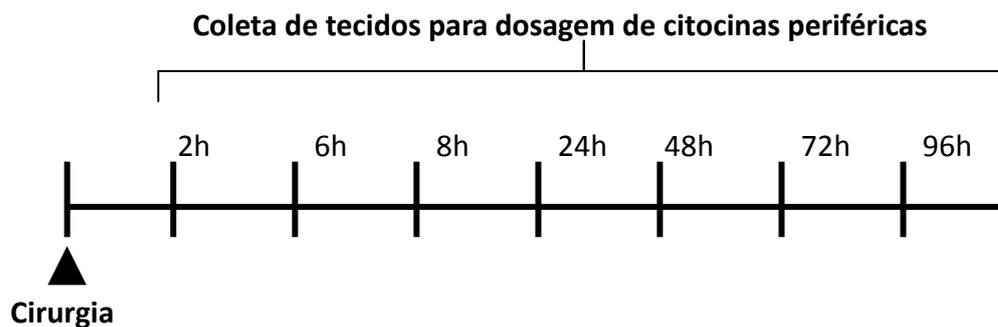
A hiperalgisia foi avaliada pelos métodos de Von Frey (hiperalgesia mecânica) e Hargreaves (hiperalgesia térmica). Todos os animais foram adaptados aos testes nos dias anteriores à cirurgia. No dia do experimento, os animais foram retirados do biotério de experimentação e deixados na sala de testes por uma hora sem manipulação para se adaptarem ao ambiente. Em seguida, foram feitas as medidas basais do método de Hargreaves e em seguida pelo método de Von Frey. Essa mesma sequência foi respeitada nos demais tempos de avaliação. Posteriormente os animais foram submetidos à cirurgia de incisão plantar e novos testes foram realizados nos tempos de 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96 horas (h) após a cirurgia (Figura 4). Após o fim dos experimentos os animais foram eutanasiados.



**Figura 4:** Esquema ilustrando o protocolo experimental adotado, as linhas verticais ilustram os tempos que foram realizados os testes de avaliação da hiperalgisia térmica e hiperalgisia mecânica antes e após a cirurgia de incisão plantar em ratos.

#### 4.2.2 Curso temporal da liberação de citocinas

Para avaliação do curso temporal de liberação de citocinas inflamatórias, fragmentos da pata de ratos submetidos a cirurgia de incisão plantar foram coletados nos tempos de 2, 6, 8, 24, 48, 72 e 96h (Figura5). As amostras das patas de animais não operados também foram coletadas para servir de controle.



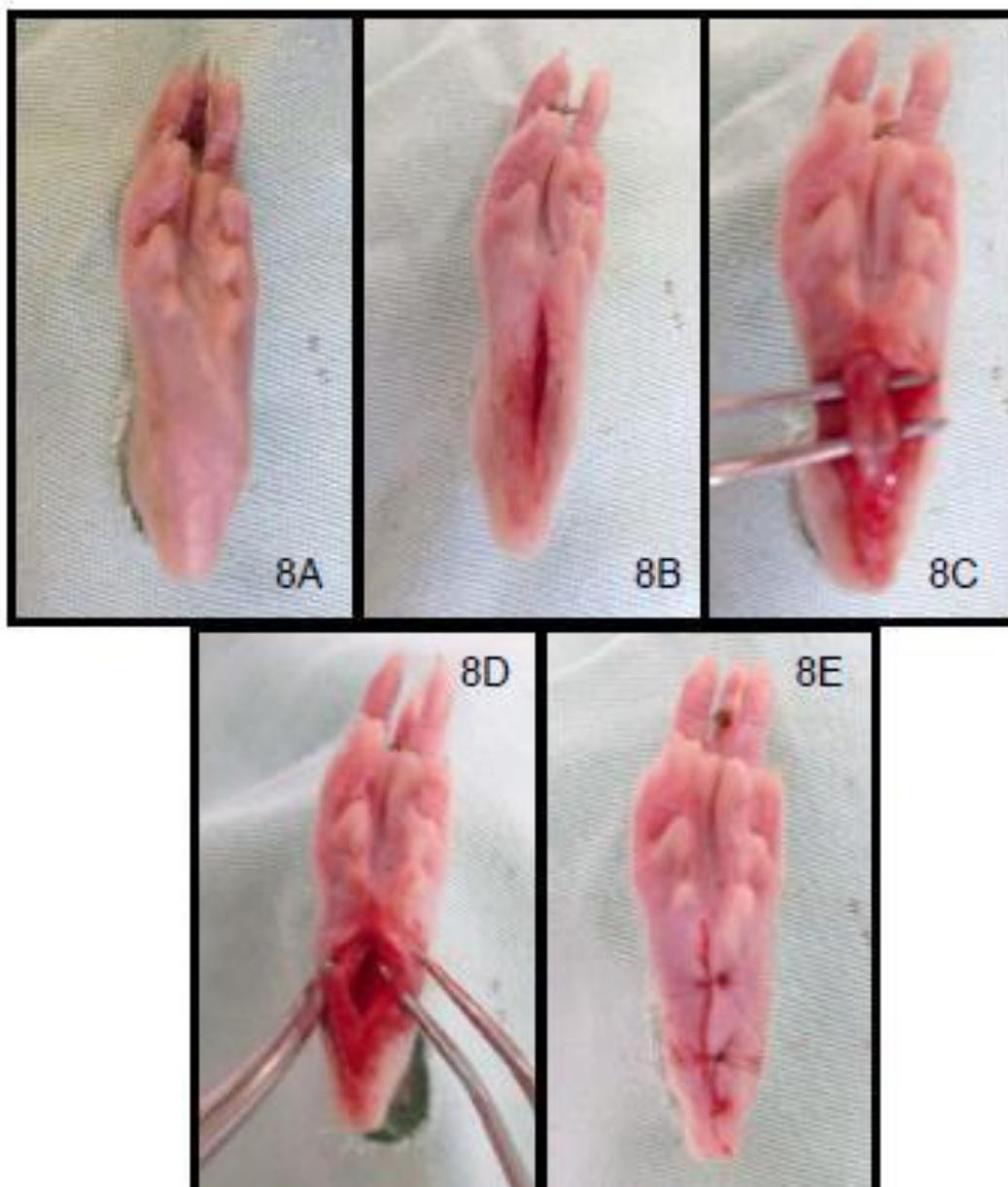
**Figura 5:** Esquema ilustrando a horas de coleta de tecido para dosagem da concentração de citocinas locais após a cirurgia de incisão plantar.

#### 4.3 MÉTODO DE INCISÃO NA PATA

A cirurgia foi realizada conforme descrito por Brennan e colaboradores (1996). Os animais foram anestesiados com uma associação de quetamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), administrados por via intraperitoneal. Após a verificação do plano anestésico, foram realizados procedimentos de antisepsia que consistiu na preparação da região plantar do membro posterior direito, com iodo- povidona 10% (Riodeíne®, laboratório Rioquímica).

Após o membro ser devidamente isolado em pano de campo estéril, foi feita uma incisão, de aproximadamente 1 cm através da pele e da fáscia da musculatura plantar, que teve início 0,5 cm da borda do calcanhar e se estendendo em direção aos dedos. Posteriormente, a musculatura plantar foi divulsionada e elevada para permitir sua incisão longitudinal e sua origem e inserção do músculo foi mantida intacta. O membro então foi pressionado delicadamente para promover hemostasia seguido de sutura da pele utilizando fio de sutura nylon 5-0(Figura 6). Após a cirurgia, em todos os animais, foi administrada uma dose de 0,5mL/Kg Pentabiótico veterinário Fort Dodge® (composição: benzilpenicilina benzatina–3.000.000UI, benzilpenicilina procaína–1.500.000UI, benzilpenicilina potássica–

1.500.000UI, diidroestreptomicina base -1.250, estreptomicina base -1.250), por via intramuscular. Posteriormente, os animais foram alojados em caixas para recuperação da anestesia e não receberam nenhum tipo de analgésico ou anti-inflamatório para que não houvesse interferências nos testes nociceptivos.



**Figura 6:** Procedimento cirúrgico descrito por Brennan et al.(1996) para indução do dor pós incisinal (TEIXEIRA, 2010).

## 4.4 TESTES NOCICEPTIVOS

### 4.4.1 Avaliação da Hiperálgia Mecânica – TESTE DE VON FREY:

O método de Von Frey consiste na aplicação de uma força mecânica crescente na superfície plantar do animal até uma resposta de retirada da pata ser observada (MÖLLER et al., 1998). Para isso os animais foram colocados numa caixa com a superfície gradeada e com a ajuda de um espelho o pesquisador toca delicadamente com uma ponteira na pata lesada do animal. Esta ponteira é acoplada num transdutor de pressão e a um contador digital de um analgesímetro digital (EFF 302, Insight). O aparelho fornece automaticamente o valor da força (latência em gramas (g), com precisão de 0,1g) que foi capaz de induzir a retirada da pata (Figura 7). O estímulo foi aplicado por até seis vezes, ou até que o animal apresentasse três medidas similares com uma clara resposta de retirada da pata. Foi respeitado intervalo mínimo de 5 minutos entre estímulos.

Os valores da latência de retirada da pata ao estímulo mecânico de cada animal em diferentes momentos foram calculados pela média de três valores das três leituras mais próximas.



**Figura 7:** Aparelho utilizado para realização dos testes de hiperálgia mecânica- Von Frey. A figura mostra o box de acrílico na superfície gradeada e o espelho que auxilia na inserção do transdutor de força pela grade ([www.insightltda.com.br](http://www.insightltda.com.br))

#### 4.4.2 Avaliação da Hiperálgia Térmica - TESTE DE HARGREAVES:

O teste de Hargreaves consiste na aplicação de calor radiante crescente na superfície plantar do animal e o tempo é quantificado em segundos, até que a pata seja retirada pelo animal ou que seja atingido o *cut-off* (HARGREAVES et al, 1988). A aparelhagem utilizada foi o Tail- Flick (7360 V-115, Ugo-Basile) (Figura 8). O pesquisador posiciona cuidadosamente a superfície plantar direita (incisada) do animal na emissão de radiação infravermelha crescente e que é possível contar o tempo necessário para que haja retirada da pata. O limite máximo permitido para exposição da pata ao raio infravermelho foi de 20 segundos, no sentido de evitar danos teciduais.

Duas medidas foram realizadas com um intervalo de tempo de 5 minutos e foi feita a média, que representou a latência de retirada da pata expressa em segundos, para os diferentes tempos da avaliação.



**Figura 8:** Aparelho utilizado para realização dos testes de hiperálgia térmica- Hargreaves. A figura ilustra o local onde o animal permanece enquanto recebe o estímulo térmico através da superfície de vidro.

#### 4.5 COLETA E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

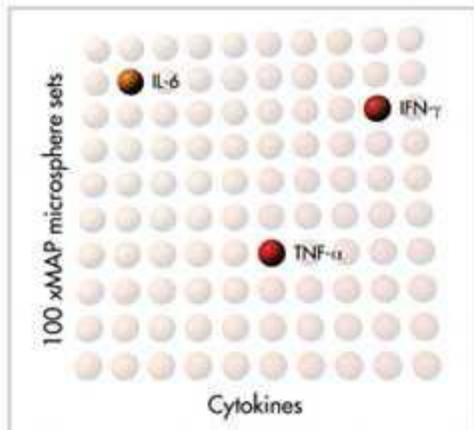
Nos tempos de 2, 6, 8, 24, 48, 72, 96 horas após a incisão, os animais foram eutanasiados utilizando-se a guilhotina. Logo após a eutanásia foi coletada a região da incisão da pata (borda da incisão de aproximadamente 0,3 cm). Os fragmentos coletados foram colocados em eppendorfs de 2mL e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-

196°C) e em seguida armazenados no freezer a -80°C até o processamento. Para quantificação das citocinas pelo método de quimiluminescência, utilizou-se um macerador de vidro e cada tecido congelado foi macerado em 200µL de solução formada por coquetel inibidores de protease (Composição: Antipain 0,5 µg/mL; Aprotinina 5µg/mL; Benzamidine 157µ/mL; Pepstatina A 0,1µg/mL e Phenylmethylsulfonyl fluoride 17µg/mL) e por tampão de lise, composta de 100mM de Tris- HCl com pH=6,8 contendo 1% de de Triton X-100 (1:100). Após a completa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM por 5 min a temperatura de 4°C. O sobrenadante (aproximadamente 100µg) foi coletado e congelado a -80°C.

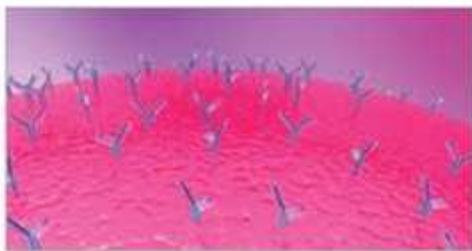
#### **4.6 ANÁLISE DAS CITOCINAS PERIFÉRICAS**

Todas as amostras processadas foram enviadas para o laboratório Genesis-SP para a análise das concentrações de citocinas. Os eppendorfs foram identificados e armazenados com gelo seco para garantir que a temperatura fosse mantida durante o tempo de envio. As citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-4 e IL-10 foram quantificadas pela técnica de quimiluminescência pelo método MILLIPLEX xMAP® (Milipore, EUA) composta por um painel que permite a dosagem de diferentes substâncias em uma única amostra (Figura 9).

Este equipamento utiliza a técnica de propriedades interna do código de cores de microesferas de poliestireno com dois fluorocromos diferentes. As microesferas são coradas para criar 100 tipos distintos de cores por combinação. Cada microesfera 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 microesfera marcando a molécula que se deseja analisar. As microesferas passam rapidamente através de um laser que excita os corantes internos que marcam o conjunto de microesferas. 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 microesfera 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 microesferas são coradas e geradas 100 cores distintas



2- As microesferas são revestidas por anticorpos



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



4- É adicionado um marcador fluorescente para detectar anticorpos



5- Um laser excita os corantes das microesferas e outro excita os corantes das microesferas.

**Figura 9:** Esquema dos procedimentos realizados pela técnica de quimiluminescência MILLIPLEX xMAP<sup>®</sup> technology para dosagem de citocina

## 4.7 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) de duas vias para medidas repetidas, admitindo-se os fatores tempo e grupos. Posteriormente foi feito o teste de comparações múltiplas Bonferroni e considerada a diferença significativa a partir de  $P < 0,05$ .

As concentrações de citocinas periféricas em diferentes tempos pós incisão e em relação não incisão foi analisada pela ANOVA de uma via seguida teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls e considerada a diferença significativa a partir de  $P < 0,05$ .

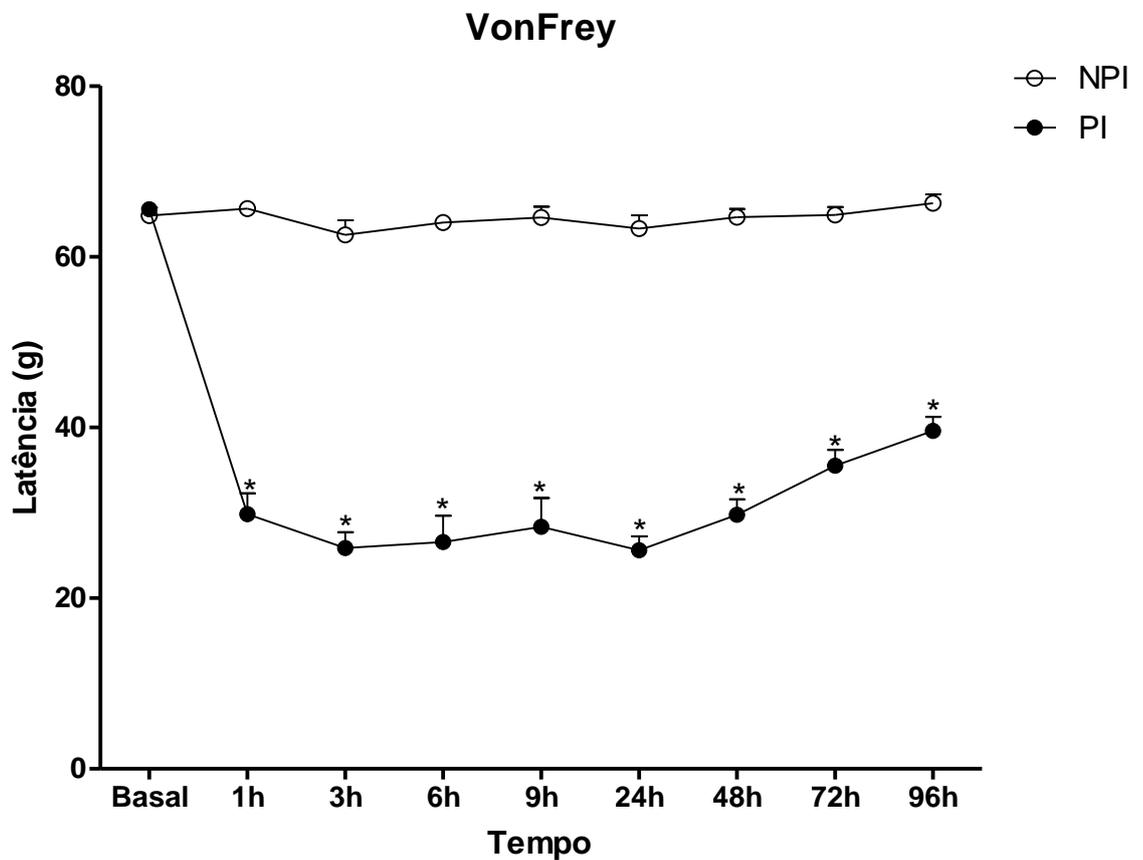
As correlações entre as latências no Von Frey e no Hargreaves e as correlações entre concentrações das diferentes citocinas estudadas foram realizadas pela correlação de Spearman, considerando-se significativo  $P < 0,05$ .

As análises dos dados dos testes comportamentais, quimiluminescência e correlações entre os dados foram feitas no programa GraphPad Prism 5.0, assim como obtenção de todas as apresentações gráficas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 TESTES DE HIPERALGESIA MECÂNICA- VON FREY

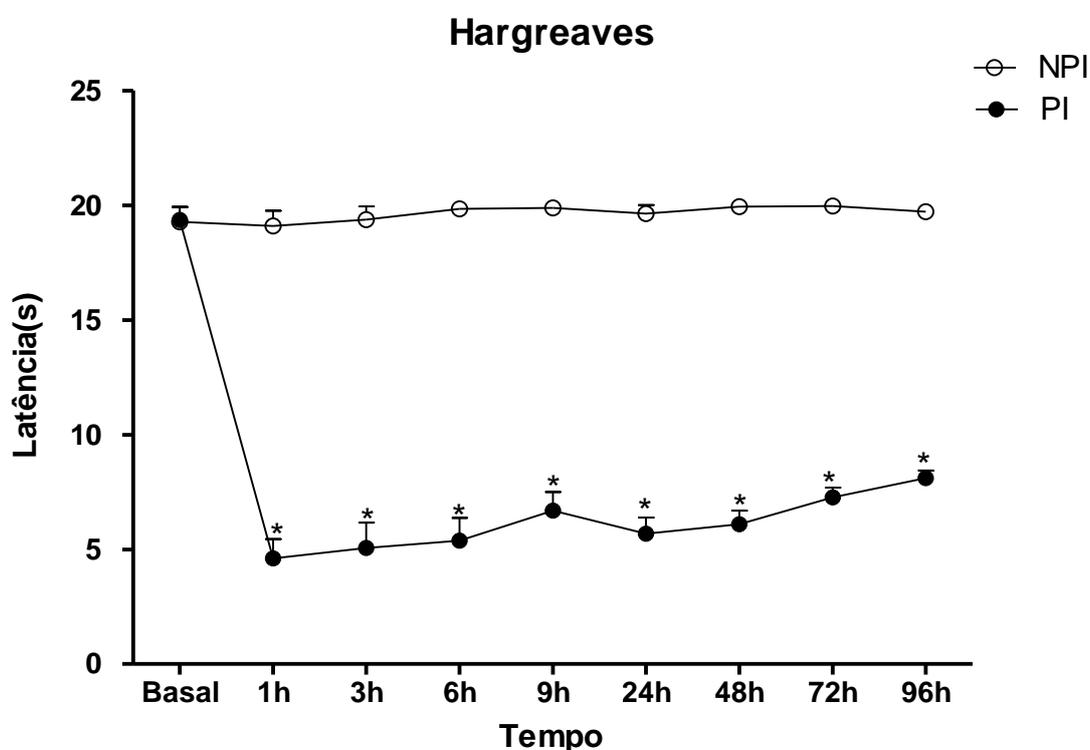
A cirurgia de incisão na região plantar direita provocou uma redução do limiar de retirada da pata incisada quando aplicado o estímulo mecânico. A ANOVA duas vias para medidas repetidas detectou significância nos fatores grupo ( $F_{1, 104}=341,86$ ;  $P<0,0001$ ), tempo ( $F_{8,104}=39,42$ ;  $P<0,0001$ ) e interação (grupo x tempo,  $F_{13,104}= 5,56$ ;  $P<0,0001$ ). O pos- test de Bonferroni detectou diferença entre os grupos NPI (não incisado) e PI (incisado) em todos os tempos analisados após a cirurgia ( $P<0,0001$ , Figura 10).



**Figura10:** Gráfico comparando os grupos não incisado (NPI, n=7) e incisado (PI, n=7) submetidos aos testes de Von Frey. Os símbolos ● e ○ e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de limiares da retirada da pata medida em gramas ao longo do tempo após a cirurgia. \* indica diferença entre o grupo incisado e não incisado nos diferentes tempos analisados.

## 5.2 TESTES DE HIPERALGESIA TÉRMICA- *HARGREAVES*

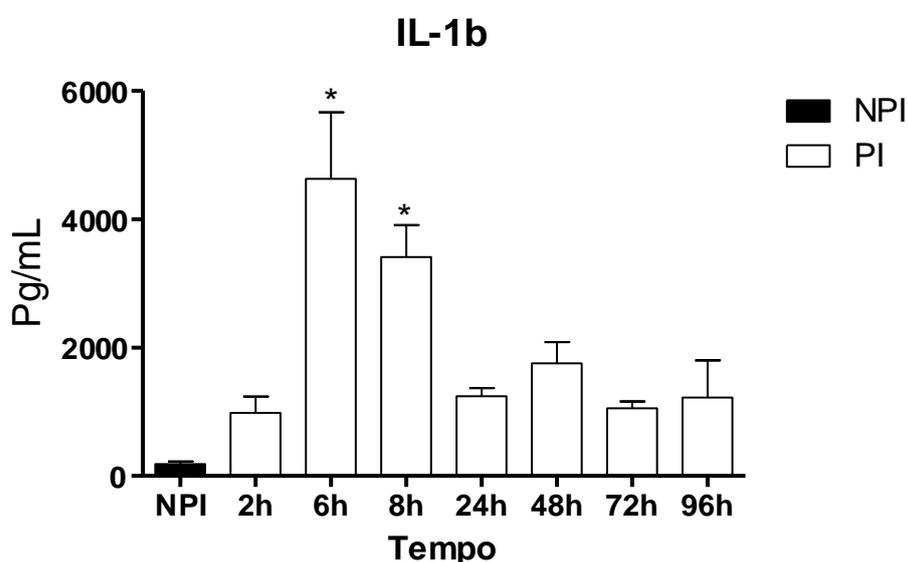
A cirurgia na região plantar direita provocou uma redução do limiar de retirada da pata incisada quando aplicado o estímulo térmico. A ANOVA bivariada para medidas repetidas detectou significância nos fatores grupo ( $F_{1,104}=428,73$ ), tempo ( $F_{8,104}=41,20$ ) e interação (grupo x tempo,  $F_{13,104}=6,27$ ;  $P<0,0001$ ). O pos-test de Bonferroni detectou diferença entre os grupos NPI (não incisado) e PI (incisado) em todos os tempos analisados após a cirurgia ( $P<0,0001$ ; Figura11).



**Figura11:** Gráfico comparando os grupos não incisado (n=7) e incisado (n=7) submetidos aos testes de Von Frey. Os símbolos ● e ○ e as barras representam a média e o erro padrão das variações de limiares da retirada da pata medida em segundos ao longo do tempo após a cirurgia. \* indica diferença entre o grupo incisado e não incisado nos diferentes tempos analisados.

### 5.3 LIBERAÇÃO LOCAL DE IL-1B APÓS INCISÃO

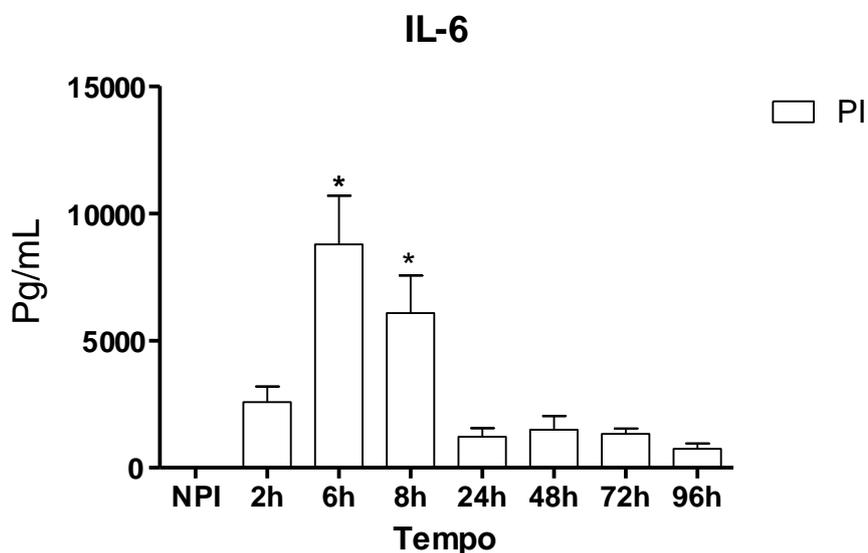
A cirurgia de incisão plantar produziu um aumento das concentrações de IL-1 $\beta$  no local da cirurgia, sendo este aumento significativo apenas nos tempos 6h e 8h após a incisão (ANOVA de uma via  $F_{7,36}=8,633$ ;  $P<0,0001$ , seguida de pós-teste de Newman-Keuls,  $p<0,05$ ). No entanto podemos notar mesmo que não estatisticamente significativo, ocorre um pequeno aumento das concentrações de IL-1 $\beta$  já 2h após a cirurgia e que após o pico ocorrido 6h e 8 horas, as concentrações se mantêm um pouco aumentadas em relação ao controle nos demais tempos analisados (Figura 12).



**Figura 12:** Gráfico comparando a concentração de IL-1 $\beta$  no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representa a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. \* indica grupos com diferença significativa.

## 5.4 LIBERAÇÃO DE IL-6 NO LOCAL DA INCISÃO

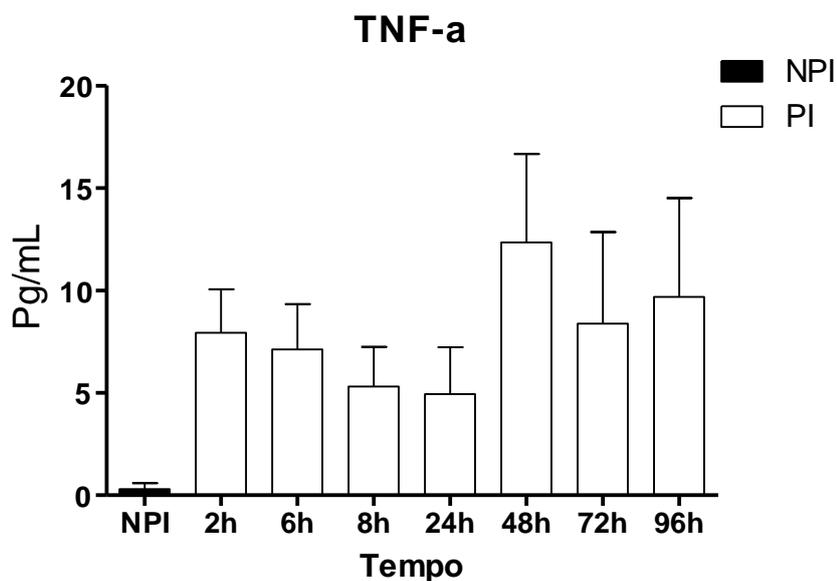
Semelhante ao observado na análise da IL1 $\beta$ , a cirurgia de incisão plantar produziu um aumento das concentrações de IL6 no local da cirurgia, sendo este aumento significativo apenas nos tempos 6h e 8h após a cirurgia (ANOVA de uma via  $F_{7,36}=9,606$ ;  $P<0,0001$ , seguida de pós-teste de Newman-Keuls,  $p<0,05$ ). No entanto podemos notar mesmo que não estatisticamente significativo, ocorre um pequeno aumento das concentrações de IL-6 já 2h após a cirurgia e que após o pico ocorrido 6h e 8 horas, as concentrações retornam a valores próximos ao basal nos demais tempos analisados (Figura 13).



**Figura 13:** Gráfico comparando a concentração de IL-6 no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representa a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. \* indica grupos com diferença significativa.

## 5.5 LIBERAÇÃO DE TNF $\alpha$ NO LOCAL DA INCISÃO

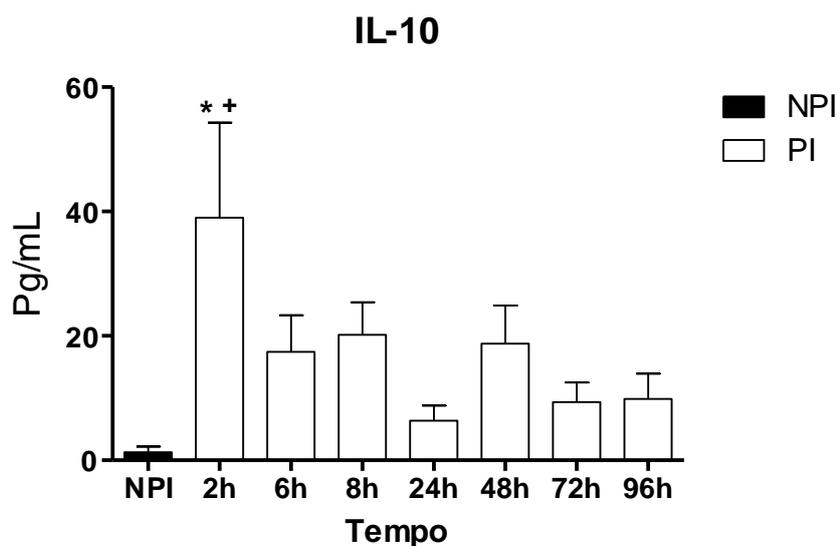
Apesar da cirurgia de incisão plantar produzir um aumento das concentrações de TNF- $\alpha$  no local da cirurgia, não houve diferença significativa entre os diferentes tempos estudados (ANOVA de uma via,  $F_{7,36} = 1,308$ ;  $P < 0,2817$ ), o que indica que a cirurgia de incisão plantar não foi capaz de alterar *estatisticamente* as concentrações de TNF- $\alpha$  em nenhum dos tempos analisados (Figura 14).



**Figura 14:** Gráfico comparando a concentração de IL-10 no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL.

## 5.6 LIBERAÇÃO DE IL-10 NO LOCAL DA INCISÃO

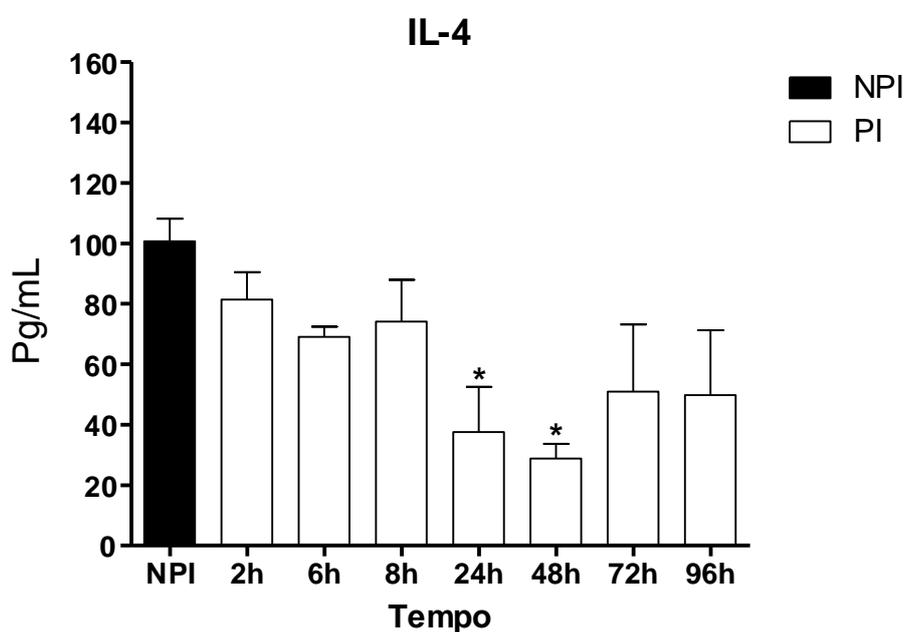
A cirurgia de incisão plantar produziu um aumento significativo das concentrações locais de IL-10 duas horas após a cirurgia (ANOVA de uma via  $F_{(7,36)}=2,580$ ;  $P<0,0339$ , seguida de pós-teste de Newman-Keuls,  $p<0,05$ ). Nos demais tempos estudados as concentrações de IL-10 não foram diferentes do controle (Figura 15).



**Figura 15:** Gráfico comparando a concentração de IL-10 no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. \* indica grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle e + indica diferença significativa em relação ao grupo 24h.

## 5.7 LIBERAÇÃO LOCAL DE IL-4 APÓS INCISÃO

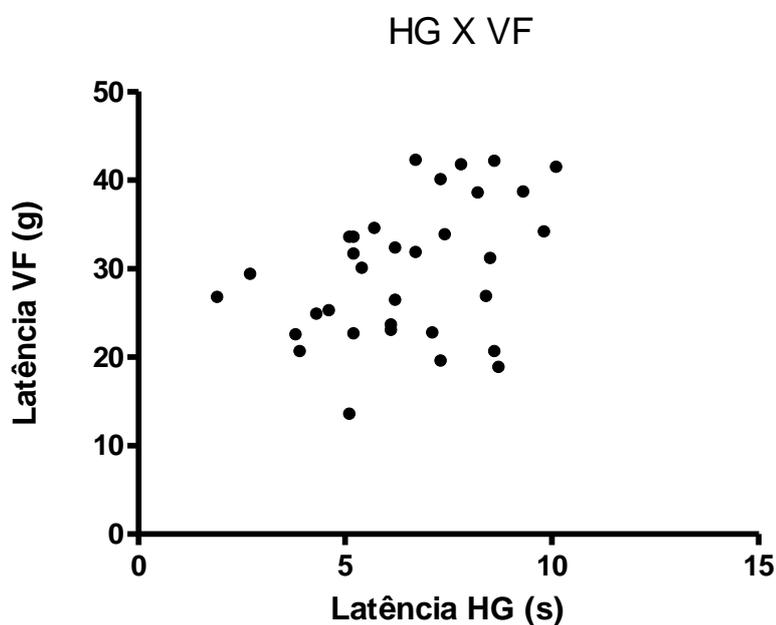
A cirurgia de incisão plantar produziu uma redução significativa das concentrações de IL-4 vinte e quatro e 48h após a incisão (ANOVA de uma via,  $F_{7,36}=3,328$ ;  $P=0,0100$  seguida de pós-teste de Newman-Keuls,  $P<0,05$ ). Apesar da manutenção de concentrações de IL-4 baixas nos tempos 72 e 96 horas pós incisão, as concentrações de IL-4 nestes tempos não são estatisticamente diferentes do controle não incisado (Figura 16).



**Figura 16:** Gráfico comparando a concentração de IL-4 no local da incisão plantar em ratos nos tempos de 2h, 6h, 8h, 24h, 48h, 72h, 96h após a cirurgia com ratos não incisados (NPI) (N=5 por grupo). As colunas e as barras verticais representa a média e o erro padrão das variações de concentração de citocinas expressa em Pg/mL. \* indica grupos com diferença significativa.

## 5.8 CORRELAÇÃO ENTRE OS TESTES DE HARGREAVES X VON FREY

O teste de correlação de Spearman detectou correlação positiva significativa entre os testes de Hargreaves (HG) e o de Von Frey (VF) ( $r= 0,38$ ;  $P= 0,027$ ). Estes resultados indicam que os valores obtidos nos testes nociceptivos são diretamente proporcionais, ou seja, quando a latência da avaliação da hiperalgesia pelo método de Hargreaves for alta a obtida pelo método de Von Frey também será (Figura 17).

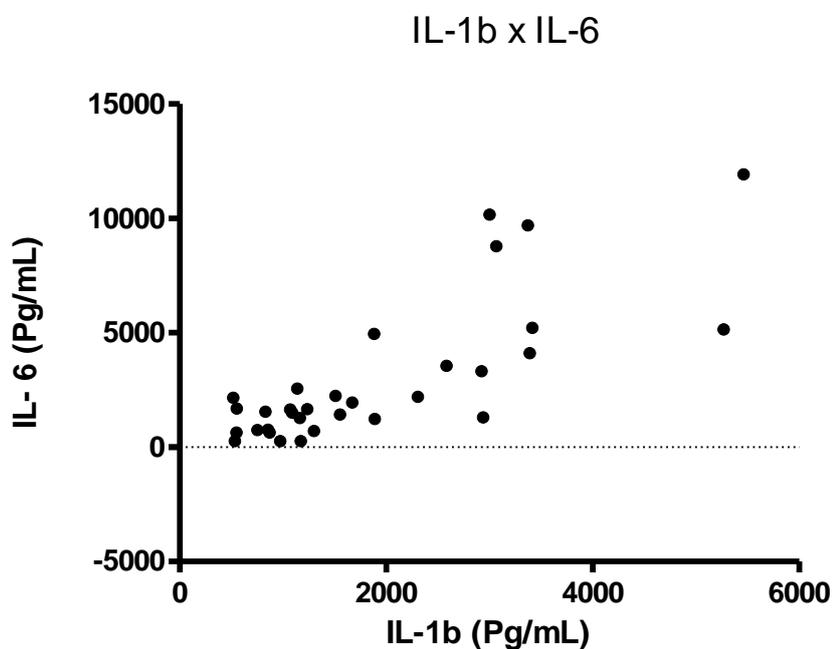


**Figura 17:** Gráfico mostrando a correlação entre os valores dos testes de Hargreaves e Von Frey no modelo de dor pós- incisional em ratos (n=33).

## 5.9 CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE DIFERENTES CITOCINAS NO MODELO DE DOR PÓS INCISIONAL

### 5.9.1 Correlação entre a concentração de IL-1 $\beta$ e IL-6

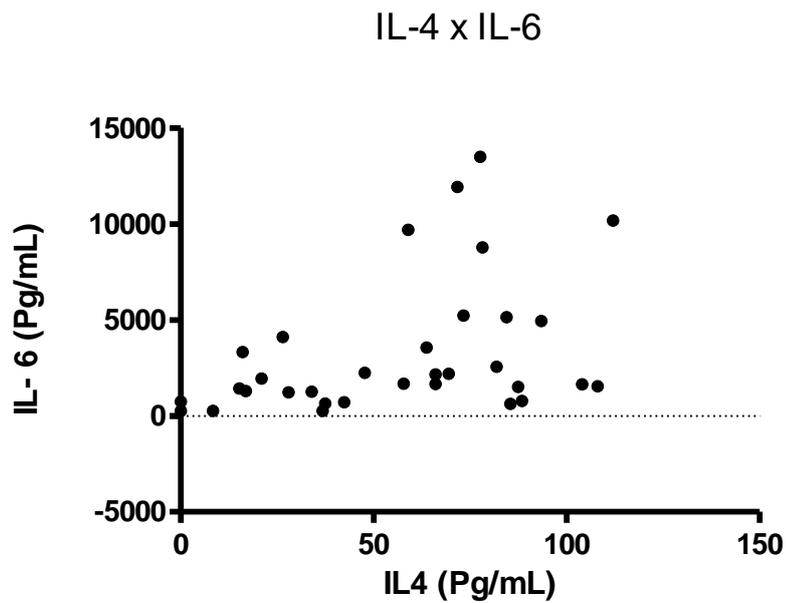
O teste de correlação de Spearman detectou correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre a concentração da citocina pró inflamatória IL-1 $\beta$  no local da lesão e a concentração da citocina também pró inflamatória IL-6 ( $r = 0,72$ ;  $P = < 0,0001$ ; Figura 18).



**Figura 18:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-1 $\beta$  e da citocina IL-6 locais no modelo de dor pós- incisional em ratos (n=33).

### 5.9.2 Correlação entre a concentração de IL-4 e IL-6

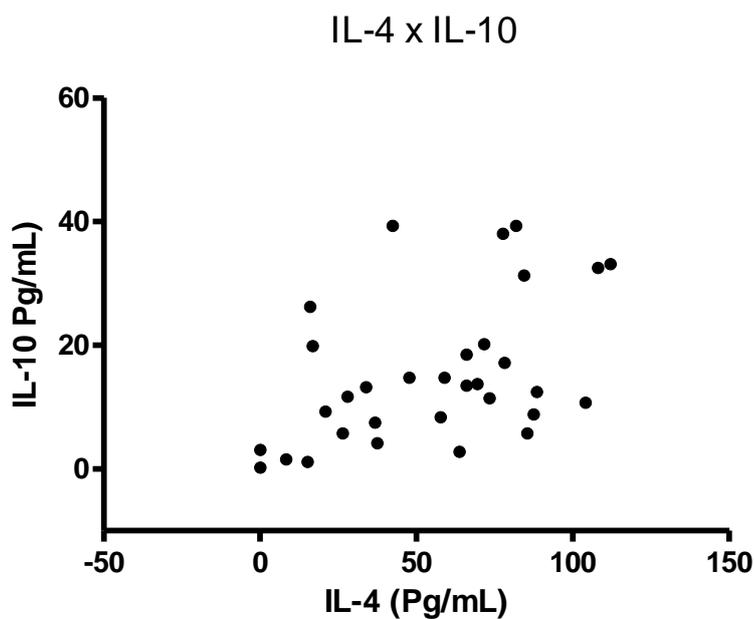
O teste de correlação de Spearman mostrou que existe correlação significativa entre a concentração da citocina anti- inflamatória IL-4 no local da lesão e a concentração da citocina pró inflamatória IL-6 ( $r= 0,42$ ;  $P= <0,01$ ; Figura 19).



**Figura 19:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-4 e da citocina IL-6 locais no modelo de dor pós- incisional em ratos (n=33).

### 5.9.3 Correlação entre as concentrações de IL-4 E IL-10

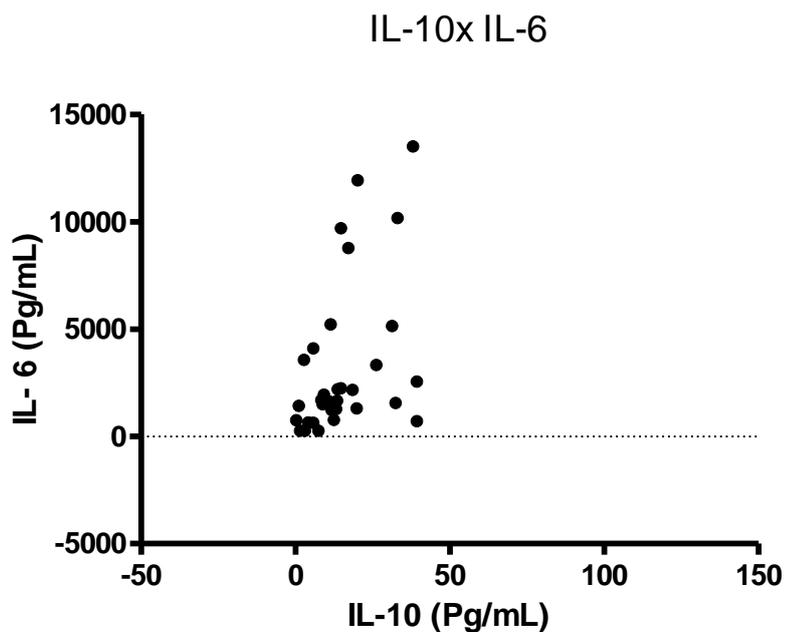
O teste de correlação de Spearman mostrou que existe correlação significativa ( $P < 0,05$ ) entre as concentrações locais das citocinas anti- inflamatórias IL-4 e IL-10 ( $r = 0,47$ ;  $P = < 0,006$ , Figura 20).



**Figura 20:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-4 e da citocina IL-10 locais no modelo de dor pós-incisional em ratos ( $n=33$ ).

#### 5.9.4 Correlação entre as concentrações de IL-10 E IL-6

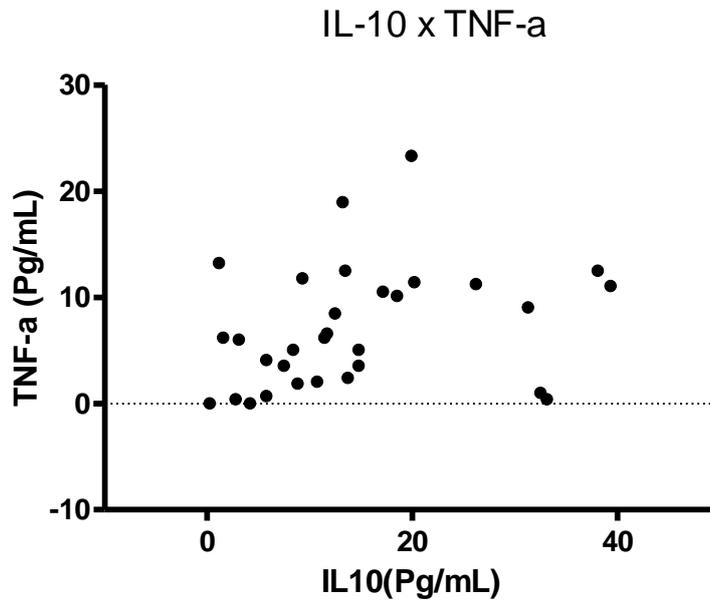
O teste de correlação de Spearman mostrou que existe correlação significativa entre as concentrações locais da citocina anti- inflamatória IL-10 e da citocina pró inflamatória IL-6 ( $r= 0,52$ ;  $P= <0,002$ , Figura 21).



**Figura 21:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-10 e da citocina IL-6 locais no modelo de dor pós- incisional em ratos (n=33).

### 5.9.5 Correlação entre as concentrações de IL-10 E TNF- $\alpha$

O teste de correlação de Spearman mostrou que existe correlação significativa entre as concentrações locais da citocina anti inflamatória IL-10 e da citocina pró inflamatória TNF- $\alpha$  ( $r= 0,36$ ;  $P= <0,0$ ; Figura 22).



**Figura 22:** Gráfico mostrando a correlação entre as concentrações da citocina IL-10 e da citocina TNF- $\alpha$  locais no modelo de dor pós- incisional em ratos (n=33).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 HIPERALGESIA INDUZIDA PELO MODELO DE INCISÃO PLANTAR

Nossos resultados mostram que houve uma redução das latências de retirada de pata ao estímulo mecânico e ao estímulo térmico em todos os tempos estudados após a cirurgia de incisão plantar. Estes resultados confirmam dados literatura que apontam o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e térmica uma hora após a cirurgia e que esta é mantida por pelo menos 96 pós-incisão. Neste estudo, não realizamos testes após o quarto dia, no entanto estudos anteriores do nosso grupo mostram que a hiperalgesia é mantida por 10 dias após a incisão plantar (TEIXEIRA, 2010).

O período de resolução da hiperalgesia difere segundo os autores. Brennan e colaboradores (1996), idealizadores do modelo de incisão plantar em ratos, mostraram que a hiperalgesia mecânica é observada já na primeira análise (2 horas após a cirurgia) e que é mantida apenas até o quarto dia após a cirurgia (BRENNAN et al., 1996). Whiteside e colaboradores (2004) demonstraram em seus estudos sobre a ação de diferentes fármacos nesse mesmo modelo, que as hiperalgesias mecânica e térmica avaliadas pelo método de Von Frey e Randall-Selitto são mantidas até o nono dia pós incisão (WHITESIDE et al., 2004). Estas diferenças no período de resolução da hiperalgesia podem estar relacionadas a diversos fatores. Segundo Brennan e colaboradores (1996), quando a força é aplicada em cima da incisão ou região lateral a esta gera respostas nociceptivas diferentes de quando esta é aplicada na região medial a incisão (BRENNAN et al., 1996). O lado medial da incisão plantar é inervado pelo nervo tibial, enquanto o lateral é inervado pelos nervos tibial e sural (LEEM et al., 1993). Brennan e colaboradores (1996) consideram a localização da aplicação do estímulo a principal causa de controvérsia de resultados. No nosso estudo o estímulo foi aplicado exatamente sobre a incisão (BRENNAN et al., 1996).

Outra controvérsia se dá pelo tipo de aparelho usado para realização do teste de Von Frey. Ao invés do Von Frey eletrônico, o mais utilizado pelos pesquisadores é o monofilamentado. Neste tipo de Von Frey (monofilamentado) existem várias ponteiros que emitem forças diferentes e são aplicados individualmente e em ordem crescente de força até que a pata seja retirada gerando uma resposta. Nós utilizamos a aparelhagem eletrônica que através do toque na pata já decodifica a força necessária para retirada da pata.

As condições de realização dos testes como horário de execução, número de pessoas envolvidas, movimentação no local de avaliação e manipulação dos animais, também são importantes para fidelidade dos resultados (BRENNAN et al., 1996). Situações estressantes podem levar a hipoalgesia por aumentar a atividade dos sistemas inibitórios da dor (GAGLIESE & MELZACK, 2000). A idade dos animais também é de extrema importância visto que, quanto maior a idade, mais lento é o retorno aos níveis basais em testes nociceptivos diante de um estímulo doloroso (GAGLIESE & MELZACK, 2000).

A hiperalgesia térmica também foi observada na primeira análise e se manteve até a última análise, 96 horas após a cirurgia. Tais resultados divergem dos obtidos por Reichl e colaboradores (2012) e Zhu e colaboradores (2006) que a hiperalgesia térmica se manteve apenas nas primeiras 24 e 48 horas respectivamente (REICHL et al., 2012; ZHU et al., 2006). O teste de Hargreaves apresenta limitações, uma vez que para manter a pata do animal sobre o local de irradiação de calor ele deve ser contido. Essa contenção pode gerar estresse ao animal, levando a uma sinalização duvidosa sobre a dor (LAVICH et al., 2005). No nosso estudo os animais foram adaptados ao ambiente da sala de experimentação e aos testes nociceptivos nos dias anteriores ao início do experimento, a fim de minimizar o estresse do animal durante a avaliação da dor.

A hiperalgesia, resposta exagerada a qualquer estímulo doloroso que provoca aumento na resposta a estímulos térmicos e mecânicos é gerada por mecanismos centrais e periféricos. A sensibilização periférica promove um aumento na resposta a estímulos supralimiais ou uma diminuição no limiar de resposta nociceptiva (TREEDE et al., 1992). A sensibilização de nociceptores é induzida pela liberação de mediadores inflamatórios, isquemia e acidose local (POGATZKI et al., 2007). Estes mediadores ativam canais iônicos ou receptores metabotrópicos na membrana do nociceptor resultando em uma descarga excitatória ou redução do limiar de ativação física, frequentemente acompanhada por um aumento da resposta dos nociceptores individuais ao estímulo térmico e mecânico (KRESS, 2010). Os estudos do papel dos mediadores no processo de sensibilização são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle da dor. No entanto devemos considerar que existem diversos modelos utilizados no estudo do mecanismo de hiperalgesia e seu tratamento, dentre eles a incisão plantar. A fisiopatologia da hiperalgesia destes diversos modelos é bastante distinta. Desta forma o estudo do papel de um mediador inflamatório nem sempre pode ser passado de um modelo para outro. Assim a importância do estudo das citocinas num modelo de dor pós operatória.

## **6.2 LIBERAÇÃO LOCAL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO MODELO DE INCISÃO PLANTAR**

Nossos resultados mostram que a incisão plantar produziu um aumento significativo nas concentrações de IL-1 $\beta$  e IL-6 no local da lesão 6h e 8h após a cirurgia. Nos demais tempos as concentrações desta citocinas tiveram um pequeno aumento, mas seus valores não foram significativos. Apesar de não ser estatisticamente significativo, a cirurgia de incisão plantar promoveu aumento das concentrações de TNF- $\alpha$  em todos os tempos de avaliação. A IL-10 apresentou um aumento significativo de suas concentrações 2 horas após a cirurgia, nas demais análises não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Já os níveis de IL-4 se encontravam elevados no grupo controle, e a cirurgia levou a uma redução significativa nos tempos de 24 e 48 h após a cirurgia.

Poucos estudos mostraram o padrão temporal de liberação de citocinas em modelos de dor pós-operatória. No entanto, em outros modelos de dor inflamatória, a ação da citocinas na sensibilização de nociceptores acontece dentro de minutos e pode representar um dos primeiros eventos observados nos nervos sensoriais em resposta ao trauma ou infecção. Por exemplo, após a lesão de constrição crônica do nervo ciático, os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no nervo lesado aumentaram mais de dez vezes dentro de 1 h (UCEYLER et al., 2007). No modelo de dor induzido por injeção de carragenina na cauda de ratos houve um aumento das concentrações locais de IL-1 $\beta$  e IL-6 seis horas após a injeção, seus níveis diminuíram 24 horas após, porém continuaram significativos. As concentrações de TNF- $\alpha$  se encontraram significativamente aumentadas somente na análise de 6 horas após o procedimento (LORAM et al., 2007a). Fu e colaboradores (2006) avaliaram a expressão de IL-1 $\beta$  na medula espinhal após incisão torácica. Os níveis de IL-1 $\beta$  mRNA se encontraram aumentados uma hora após a cirurgia, atingindo o valor máximo 6 horas depois. No terceiro dia a concentração já não era mais significativa quando comparada ao grupo controle (FU et al., 2006).

Desta forma, segundo a literatura espera-se que a incisão provoque um aumento rápido das citocinas “mestras” (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), e que este seria observado já nos primeiros tempos de análise (antes de 30 minutos pós estímulo). No entanto, no nosso estudo houve um aumento significativo de IL-1 $\beta$  e IL6 só 6 e 8 horas após a incisão. Já nas concentrações de TNF- $\alpha$ , foi observado um aumento já no primeiro tempo analisado (mesmo que não significativo). Estes resultados podem ser explicados pela grande variabilidade entre os animais o que dificultou a detecção de significância estatística. Uma hipótese seria que a

incisão produziu um aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL6 e TNF- $\alpha$  já nas primeira análise de 2h e provavelmente antes deste tempo, no entanto este aumento não foi suficientemente alto para ser estatisticamente significativo diante da grande variabilidade dos dados. Uma das hipóteses é que a liberação destas citocinas nos primeiros momentos após a incisão não precisariam ser necessariamente altos (tão altos quanto ao pico de 6 e 8 horas) para produzir a sensibilização de nociceptores.

Independente se os aumentos foram significativos ou não nas primeiras mensurações, ocorreu um pico de IL-1 $\beta$  e IL-6 seis e 8 horas após a incisão. E que o TNF- $\alpha$  apresentou um aumento não significativo estatisticamente, mas sustentado até o última análise. Estes dados são diferentes dos prévios de Loram e colaboradores (2007) que mostraram no modelo de incisão na cauda um aumento de IL-1 $\beta$  e IL-6 no local da incisão apenas 24 horas após a lesão retornando aos níveis basais em 4 dias. Já as concentrações de TNF- $\alpha$  aumentaram 48 horas a pós a cirurgia e retornaram aos níveis basais apenas após 8 dias. Neste estudo a hiperalgesia foi observada 2 horas após a incisão na cauda e se prolongou por até 6 dias. Outras citocinas não foram avaliadas no referido estudo (LORAM et al., 2007b). Vários fatores podem ter produzido resultados tão diferentes entre estes dois estudos como o tamanho da incisão; fenótipo dos animais e a sensibilidade do método de detecção. Apesar de mostrar um padrão sustentado de aumento de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, diferente do observado por nós, o estudo de Loram e colaboradores também mostra que não houve um aumento nas concentrações destas citocinas no primeiro tempo de análise (2horas), o que pode corroborar para a hipótese que estas citocinas não precisem ser liberadas em grande quantidade nos primeiros momentos após a incisão para produzirem efeitos.

Outra questão importante se relaciona com a necessidade de aumento sustentado nas concentrações de citocinas para a manutenção da hiperalgesia. No mesmo modelo de dor, resultados anteriores do nosso grupo mostraram que a incisão plantar produziu na medula espinhal um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e GFAP 6 horas após a incisão, sem alterar a liberação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-4. Neste sentido, a manutenção da dor pós-operatória não está associada a um aumento constante na medula espinhal da expressão gênica de TNF- $\alpha$ , ou de outra citocina estudada (CASTRO, 2012). Semelhante ao encontrado na medula espinhal, no local da incisão a manutenção da dor pós-operatória também não está associada a um aumento constante das concentrações de citocinas. Ou seja, apesar de reconhecermos o papel fundamental destas citocinas na sensibilização de nociceptores, a manutenção da hiperalgesia parece não depender de um aumento significativo e sustentado

das liberações de citocinas no local da incisão. Desta forma, a hiperalgesia deve ser mantida por outros mecanismos.

Quando analisamos a liberação citocinas ditas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4), observamos que a IL-10 apresentou um aumento significativo de 2h após incisão e enquanto que a IL-4, se manteve no mesmo nível do grupo controle, apresentando uma diminuição de sua concentração no tempo de 24 e 48h. O consenso na literatura aponta que as citocinas anti-inflamatórias são responsáveis pela modulação da resposta inflamatória. Segundo Lebedoer e colaboradores (2007), a IL-10 age inibindo a liberação e atuação das citocinas pró inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Também foi capaz de reverter a hiperalgesia no modelo de dor neuropática (LEBEDOER et al., 2007). Nesse modelo de dor a terapia com IL-10 promoveu uma redução da ativação glial (SODERQUIST et al., 2010). Por outro lado, a IL-4 também diminui a liberação IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , participando da modulação do processo inflamatório (LIN et al., 2000). No entanto, nossos dados apontam uma dissociação entre as concentrações de IL-10 e de IL-4 e a geração e manutenção da hiperalgesia. Semelhante ao discutido anteriormente para IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$ , a magnitude da hiperalgesia parece não depender de uma alteração sustentada nos níveis locais de IL-10 e de IL-4.

### **6.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS OBTIDOS**

No presente estudo as cinco citocinas estudadas foram analisadas pela técnica de quimiluminescência (método MULTIPLEX<sup>®</sup>) que permite a mensuração das concentrações de várias citocinas numa mesma amostra. Da mesma forma os testes de Von Frey e Hargreaves foram realizados nos mesmos animais. Esta condição possibilitou a verificação de correlações entre os dois testes de hiperalgesia e também entre as cinco citocinas estudadas. Não foi possível a correlação entre os testes de hiperalgesia e as citocinas porque a análise foi realizada em animais diferentes. Apresentamos os gráficos de todas as correlações positivas.

A correlação feita entre os testes nociceptivos de Von Frey e Hargreaves apontou uma correlação significativa baixa ( $r=0,38$ ). Este resultado sugere que se um animal apresentar latências altas no Von Frey este terá uma tendência a apresentar latências altas também no Hargreaves. No entanto isso não acontece com todos os animais. Estes resultados corroboram para a ideia que os mecanismos envolvidos na hiperalgesia térmica e mecânica são

parcialmente os mesmos. Neste sentido, neurônios sensoriais podem ser classificados como termorreceptores ou mecanorreceptores, mas além disso muitos desses receptores podem ser polimodais e respondem a uma variedade de estímulos nocivos. Alguns receptores de potencial transiente (TRP) térmicos podem ser sensibilizados por estímulos químicos, mecânicos ou osmóticos. Da família dos TRP vanilóides podemos citar o subgrupo TRPV1 (receptor de potencial transiente tipo 1) e o TRPV4 (receptor de potencial transiente tipo 4) que são ativados com o calor, mas também estão associados a sensibilidade mecânica (STEMKOWSKI & SMITH, 2012).

Entre as citocinas, detectamos uma correlação alta significativa entre a IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $r=0,72$ ), o que corrobora para o papel destas citocinas como “mestras” no desenvolvimento do processo de hiperalgesia. Apesar do TNF $\alpha$  também atuar como citocina “mestra”, não foi detectada correlação positiva entre o TNF $\alpha$  e as outras citocinas pro-inflamatórias estudadas (IL-1 $\beta$  e IL-6). Este fato pode ser explicado pela grande variabilidade das concentrações de TNF $\alpha$  entre os animais.

Outras correlações significativas encontradas podem ser consideradas moderadas: entre IL-6 e IL-4,  $r=0,42$ ; entre IL-4 e IL-10,  $r=0,47$  e entre IL-10 e IL-6,  $r=0,52$ ). Vale notar que as concentrações de IL-6 (pró-inflamatória) estão correlacionadas com as concentrações das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Da mesma forma, as concentrações de TNF- $\alpha$  apresentaram correlação significativa baixa com as concentrações de IL-10. Este resultado pode sugerir que citocinas pró e anti-inflamatórias podem compartilhar pelo menos em parte, os mesmos mecanismos de liberação, ou seja o estímulo que induz a liberação de citocinas pró pode também induzir a liberação de uma citocina anti-inflamatória. No entanto isto é uma hipótese que deve ser futuramente investigada no modelo de incisão plantar.

Porém mesmo com muitos estudos afirmando as propriedades exclusivamente pró ou anti-inflamatórias de determinada citocina, sabe-se que vários fatores podem ter influência neste papel. O desenvolvimento do diabetes é acelerado em ratos transgênicos com uma alta expressão de IL-10 nas ilhotas pancreáticas. Essa mesma citocina, intitulada como anti inflamatória acelerou a rejeição de transplantes e também foi capaz de aumentar a inflamação ocular no modelo de uveíte induzida por endotoxina. Neste sentido, a IL-4 e IL-10 quando agem em macrófagos inibe a produção de IL-8, mas quando atuam em células endoteliais estimulam a liberação desta mesma citocina (CAVAILLON, 2001). Desta forma, o papel das citocinas numa dada condição é determinado por uma grande variedade de fatores. Por isso a

generalização da função de uma citocina pode ser perigosa e este fato corrobora para a importância do estudo do papel destas citocinas em diferentes modelos experimentais.

## 7. CONCLUSÕES

A cirurgia de incisão plantar produziu hiperalgesia mecânica (Von Frey) e hiperalgesia térmica (Hargreaves) nos tempos de 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72 e 96 horas após a incisão.

A incisão plantar produziu um aumento das concentrações de IL-1 $\beta$  e IL-6 seis e 8 horas após a incisão, retornando a níveis não diferentes do controle nos demais tempos.

As concentrações de TNF- $\alpha$  aumentaram após a incisão, mas este aumento não foi estatisticamente significativo em nenhum tempo estudado.

A incisão plantar produziu um aumento das concentrações IL-10 duas horas após a incisão retornando a níveis não diferentes do controle nos demais tempos.

As concentrações de IL-4 foram reduzidas 24 e 48 horas após a incisão plantar.

A geração e a manutenção da hiperalgesia não parece depender de uma alteração sustentada nas concentrações das citocinas estudadas.

A hiperalgesia parece ser mantida por outros fatores, mas o papel das citocinas deve continuar a se investigado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT,S.; TUFICK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, v.128, p. 40-56, 2004.
2. BELL-KROTOSKI, J. Weinstein monofilament using for determingcutaneous light touch deep pressure sensation. *The Star*, v.44, n.2, p. 8-11, 1984.
3. BISHOP, G.H., LANDAU, W.M., JONES, M.H. Evidence for a double peripheral pathway for pain. *Science*, v.128 p. 712-714, 1958.
4. BRENNAN, T.J.; VANDERMEULEN. E.P.; GEBHART, G.F. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*, 64: 493-501, 1996.
5. BRENNAN, T.J.; ZAHN, P.K.; POGATZKI, E.M. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiology Clinicals of North America*, 23: 1-20, 2005.
6. CASTRO, L. L. *Manutenção da dor pós-operatória está dissociada da liberação de citocinas inflamatórias na medula espinhal em ratos*. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Departamento de Ciências Fisiológicas.
7. CAVAILLON, J.M. Pro-versus anti- inflammatory cytokines: mith or reality. *Cellular and Molecular Biology*, v. 47, 2001.
8. CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hiperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, v.107, p. 660-664, 1992.
9. 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.
10. CUNHA, T. M.;VERRI, W. A. JR.; FUKADA, S. Y.;GUERRERO, A. T.;SANTODOMINGO-GARZÓN, T.;POOLE. S.; PARADA, C. A.; FERREIRA S. H.; CUNHA, F. Q. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. *European Journal of Pharmacology*, v. 573, p. 221-229, 2007.
11. DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J. S.; ZURAWSKI, S. M.; LECRON, J. C.; MOHAN-PETERSON, S.; SANJANWALA, B.; BENNETT, B.; SILVER, J.; DE VRIES, J. E.; YSSEL, H. Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+

- and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *International Immunology*, v. 7, p. 1405-1416, 1995.
12. D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anesthesia*, v. 101, p. 8-16, 2008.
  13. FENTON, M.J.; BURAS, J.A.; DONNELLY, R.P. IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in humans monocytes. *Journal of Immunology*, v.149, p. 1283-1288, 1992.
  14. 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.
  15. FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*, v. 147, p. 3815-3822, 1991.
  16. FU, D.; GUO,Q.; AI,Y.; CAI, H.; YAN, J.; DAI, R. Glial activation and segmental upregulation of interleukin 1 beta (IL-1 Beta) in the rat spinal cord after surgical incision. *Neurochemical Research*, v. 31, p. 333-340, 2006.
  17. GAGLIESE, L.; MELZACK, R. Age difference in nociceptions and pain behaviours in the rat. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, v. 24, p. 843-854, 2000.
  18. GIBSON, R.M.; ROTHWELL, N.J.; LE FEUVRE, R. A. CNS Injury: the role of cytokine IL-1. *Veterinary Journal*, v. 168, p. 230-237, 2004.
  19. HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hiperalgesia. *Pain*, 32: 77-88, 1988.
  20. IASP- International Association for the Study of Pain. **IASP Taxonomy** May 2<sup>nd</sup>, 2013. Available from: <http://www.iasp-pain.org>.
  21. JI, R.R.; KOHNO, T.; MOORE, K.A. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.* 26: 696-705, 2003.
  22. KASAMA, T.; STRIETER, R, M.; LUKA, C. S. N. W.; LINCOLN, P. M.; BURDICK, M. D.; KUNKEL, S. L. Interferon gamma modulates the expression of neutrophil-derived chemokines. *J. Investig. Med.*, v. 43, p. 58-67, 1995.
  23. KISSELEVA, T.; BHATTACHARYA, S.; BRAUNSTEIN,J.; SCHINDLER,C.W. Signalingthrough the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, v. 285, p. 1-24, 2002.

24. KRESS, M. Nociceptor Sensitization by proinflammatory Cytokines and Chemokines. *The Open Pain Journal*, v.3, p. 97-107, 2010.
25. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. *Robbins and Cotran- Pathologic Basis of Disease*, 8<sup>th</sup> edition, 2010 Elsevier.
26. LAMONT, L.A.; TRANQUILLI, W.J.; KURT, A.G. Physiology of Pain. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v. 30, n.4, p. 703-728, 2000
27. LAMONT, L.A. Feline perioperative Pain Management. *The Veterinary Clinics: Small Animals Practice*, V.32, p. 747-763, 2002.
28. 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. 445-449, 2005.
29. LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.*; v. 2, p. 787–795. 2002.
30. 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.
31. LEEM, T. J.; WILLIS, W.D.; CHUNG, J.M. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *Journal of Neurophysiology*, v. 69, p. 1684-1699, 1993.
32. LEMKE, K. A. Understanding the pathophysiology of perioperative pain. *Can. Vet. J.*, v. 45, p. 405-413, 2004.
33. LI, A. H.; ZHANG, J. M.; XIE, Y.K. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/ skin-nerve complexes with enriched nerve endings. *Brain Research*, v. 1012, p. 154-159, 2004.
34. 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*.4:27, 2008.
35. LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and all response in surgery. *Surgery*, v. 127, n. 2, p. 117-126, 2000.

36. LORAM, L. C.; FULLER, A.; CARTMELL, T.; MITCHELL, B.; MITCHELL, D. Behavioural, histological and cytokine responses during hyperalgesia induced by carrageenan injection in the rat tail. *Physiology & Behaviour*, v. 92, p. 873-880, 2007.a
37. 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.b
38. MACEWAN, D. J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*, v. 6, p. 447-492, 2002.
39. MCMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.*, v. 194, p. 444-462, 2005.
40. MARCHAND, F.; PERRETI, M.; MC MAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6:521-532, 2005.
41. MILLER, J.R.; JUNG, H.; BHANGOO, S. K.; WHITE, F. A. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. *Handb. Exp. Pharmacol.*, v.38, p.445-451, 2009.
42. MÖLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *Journal of Neuroscience Methods*, 84: 41-47, 1998.
43. MOSSNER, R.; BECKMANN, I.; HALLERMANN, C.; NEUMANN, C.; REICH, K. Granulocyte colony-stimulating-factor-induced psoriasiform dermatitis resembles psoriasis with regard to abnormal cytokine expression and epidermal activation. *Exp Dermatol*, 13(6):340-346, 2004.
44. 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 SOCS proteins. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, v. 64, p. 397-404, 1999.
45. O'BANION, M.K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, 13: 45-82, 1999.
46. OBATA, H.; EISENACH, J.C.; HUSSAIN, H.; BYNUM, T.; VINCLER, M. Spinal Glial Activation Contributes to Postoperative Mechanical Hypersensitivity in the Rat. *The Journal of Pain*. 7(11): 816-822, 2006.
47. OPRÉE, A.; KRESS, M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia:

- effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *Journal of Neuroscience*, v. 20, p. 6289-6293, 2000.
48. PARADA, C. A.; YEH, J. J.; JOSEPH, E.K.; LEVINE, J.D. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci.*, v. 17, p.1847–1852, 2003.
  49. POGATZKI, E.M.; RAJA, S. N. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology*, v. 99, n.4, p. 1023-1027, 2003.
  50. POGATZKI, E.M.; ZAHN, P.K.; BRENNAN, T.J. Postoperative pain—clinical implications of basic research. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 21, (1): 3-13, 2007.
  51. 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. 649-656, 1999.
  52. 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.
  53. REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat. Med.*, v. 16, p. 1267-1276, 2010.
  54. 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. *Rev Bras Anesthesiol.* 57, (1): 94-105, 2007.
  55. ROTHWELL, N. J.; STRIJBOS, P. J. Cytokines in neuro degeneration and repair. *Int. J. Dev. Neuroscience*, v. 13, p. 179-185, 1995.
  56. RUBIO-PEREZ, J. M., MORILLAS-RUIZ, J.M.(2012) A review: inflammatory process in Alzheimers’s disease, role of cytokines. *Scientific World Journal*, ID 756357
  57. SANDKUHLER, J. Learning and memory in pain pathways. *Pain*. 88: 113-118, 2000.
  58. SASAKI, N.; KIKUCHI, S.; KONNO, S.; SEKIGUCHI, M.; WATANABE, K Anti-TNF-alpha antibody reduces painbehavioral changes induced by epidural application of nucleus pulposus in a rat model depending on the timing of administration. *Spine*, v. 32, p. 413–416, 2007.
  59. SCHAFERS, M.; SOMMER, C. Anticytokine therapy in neuropathic pain management. *Expert. Rev. Neurother.*, v. 11, p. 1613-1627, 2007.
  60. SCHAFERS, M.; SORKINS, L. S.; GEIS, C.; SHUBAYEV, V. I. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumour necrosis factor receptor 1 and 2 in injured and

- adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neuroscience Letters*, v. 347, p. 179-182, 2003.
61. SHUAI, K & LIU, B. Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, v.3, p.900-911, 2003.
  62. SHUBAYEV V. I.; MYERS R.R. Upregulation and interaction of TNF $\alpha$  and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Research*, v. 855, p. 83–89. 2000.
  63. SHUBAYEV V. I. TNF $\alpha$ -induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci.*, v. 31, p. 407–415, 2006.
  64. SODERQUIST, R. G.; SLOANE, E.M.; LORAM, L. C.; HARRISON, J. A.; DANGLER, E. C.; JOHNSON, S. M.; AMER, L. D.; YOUNG, C. S.; LEWIS, M. T.; POOLE, S.; FRANK, M. G.; WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MOHONEY, M. J. Release of plasmid DNA- encoding IL-10 from PLGA microparticles facilitates long term reversal of neuropathic pain following a single intrathecal administration. *Pharm. Res.*, v. 27, p. 841-854, 2010.
  65. SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp. Neurol.*, v. 151, p. 138-142, 1998.
  66. SORKIN L. S.; XIAO, W. H.; WAGNER, R.; MYERS, R. R. Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience*, v. 81, p. 255–262, 1997.
  67. STARR, R.; HILTON, D.J. Negative regulation of the JAK-STAT pathway. *Bioessays*, v. 1, p.47-52, 1999.
  68. STEMKOWSKI, P. L.; SMITH, P. A. Sensory Neurons, Ion Channels Inflammation and the onset of neuropathic pain. *Can. J. Neurol. Sci*, v. 39, p. 416- 435, 2012.
  69. SUZUKI, A.; SUZUKI, R.; FURUNO, T.; TESHIMA, R.; NAKANISHI, M. N-cadherin plays a role in the synapselike structures between mast cells and neurites. *Biol Pharm Bull*. v. 27, p. 1891–1894, 2004.
  70. TANAKA, Y.; OTSUKA, T.; HOTOKEBUCHI, T.; MIYAHARA, H.; NAKASHIMA, H.; KUGA, S.; NEMOTO, Y.; NIRO, H.; NIHO, Y. Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. *Inflamm. Res.*, v. 45, p. 283-288, 1996.
  71. TEIXEIRA, F.M. *Avaliação comparativa do efeito de fármacos anti-inflamatórios com a acupuntura no modelo de dor pós-incisional em ratos*. 2010. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Departamento de Ciências Fisiológicas.

72. 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.
73. TRACEY, I; MANTYH, P.W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, v.55, p.377-391,2007
74. TREED, R. D.; MEYER, R. A.; RAJA, S. N.; CAMPBELL, J. N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hiperalgesia. *Prog. Neurobiol.*, v. 38, p. 397-421, 1992.
75. TURRIN, N. P.; PLATA- SALAMAN, C. R. Cytokine- Cytokine Interactions and the brain. *Brain Res. Bull*, v.51, p. 3-9, 2000.
76. TURK, D. C.; MELZACK, R. The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain. In D. C. Turk & Melzack (eds). *Handbook of Pain Assessment*. Nova York, Guilford, pp 3-12, 1992.
77. UCEYLER, N.; TSCHARCKE, 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.
78. UCEYLER, N., SCHAFERS, M., SOMMER, C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Experimental Brain Research*, v. 196, p. 67-78, 2009.
79. 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.
80. VERRI, W. A. JR.; CUNHA, T.M.; PARADA, C. A.; POOLE, F. Q. C.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacology and therapeutics*, v. 112, p.116-138, 2006.
81. VITKOVIC, L.; MAEDA, S.; STERNBERG, E. Anti inflammatory cytokines: expression and activation in the brain. *Neuroimmunomodulation*, v.9, p. 295-312, 2001.
82. WHITE, FA.; MONAHAN, P.; LAMOTTE, RH. Chemokines and their receptors in the nervous system: a link to neuropathic pain. Watkins, LA.; DeLeo, JA.; Sorkin, L., editors. *Immune and glial activation in pain*. IASP, 2007.
83. WHITESIDE, G.T.; HARRISON, J.; BOULET, J.; MARK, L.; PEARSON, M.; GOTTSALL, S.; WALKER, K. Pharmacological characterization of a rat model of incisional pain. *British Journal of Pharmacology*, v. 14, p. 85-91, 2004.

84. ZAHN, P.K.; POGATZKI E.M.; BRENNAN, T.J. Mechanisms for pain caused by incisions. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 27(5): 514-516, 2002.
85. ZANELLA, J. M.; BURRIGHT, E. N.; HILDEBRAND, K.; HOBOT, C.; COX, M.; CHRISTOFERSON, L.; MCKAY, W. F. Effect of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. *Spine*, v. 33, p. 227-234, 2008.
86. 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, p. 43-52, 2006.

