



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

ADRIELE ALVES SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE DOR PÓS-INCISIONAL PERSISTENTE
PARA INVESTIGAÇÃO DA VIA KEAP1/NRF2/ELEMENTOS DE RESPOSTA
ANTIOXIDANTE**

BRASÍLIA, 2018

ADRIELE ALVES SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE DOR PÓS-INCISIONAL PERSISTENTE
PARA INVESTIGAÇÃO DA VIA KEAP1/NRF2/ELEMENTOS DE RESPOSTA
ANTIOXIDANTE**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof^a Dr^a Mani Indiana Funez

**Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas
Nascimento**

BRASÍLIA, 2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SAD243d Santos, Adriele Alves
Desenvolvimento de modelo de dor pós-incisional persistente para investigação da via keap1/nrf2/elementos de resposta antioxidante / Adriele Alves Santos; orientador Mani Indiana Funez; co-orientador Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento. -- Brasília, 2018.
41 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Dor. 2. Cirurgia. 3. Brusatol. 4. Persistente. I. Funez, Mani Indiana, orient. II. Nascimento, Paulo Gustavo Barboni Dantas, co-orient. III. Título.

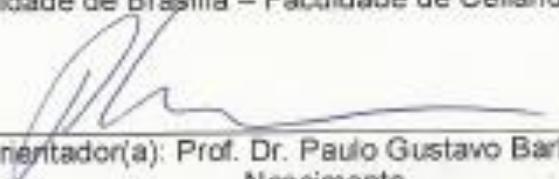
ADRIELE ALVES SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE DOR PÓS-INCISIONAL PERSISTENTE
PARA INVESTIGAÇÃO DA VIA VIA KEAP1/NRF2/ELEMENTOS DE RESPOSTA
ANTIOXIDANTE COMO ALVO DE PREVENÇÃO

BANCA EXAMINADORA



Orientador(a): Prof^o Dr^a Mani Indiana Funez
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)

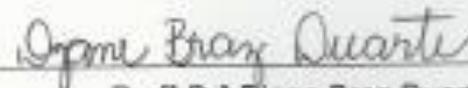


Co-Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas
Nascimento

(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)



Prof^o Dr^a Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia – UnB/FCE)



Prof^o Dr^a Djane Braz Duarte
(Universidade de Brasília – Faculdade de Ciências da Saúde –
UnB/FS)

BRÁSILIA, 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais que não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Mãe, obrigado por todos momentos dedicados a mim, pelo amor, pelo afeto, pela amizade. Saiba que nunca deixarei de te amar.

À Profª Drª Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza e Profª Drª Djane Braz Duarte, por aceitarem participar da banca examinadora.

Ao Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UnB, por ceder o espaço físico para a realização dos experimentos.

À Ana Luiza Sarkis Vieira, Rafael Rocha de Andrade e Herculy Lafite Silva Ribeiro pela boa vontade, simpatia e apoio técnico que prestam à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Prof. Dr Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento por me apresentar o projeto Dor On Line. O admiro profundamente e tenho uma grande estima pela sua pessoa.

Ao programa CNPq/PIBIC pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

À Thayná Gomes, Mariane Marques, Mirelle Falcão, quero agradecer a cada uma de vocês pelo esforço e dedicação que colocam no trabalho. Obrigado, equipe! Vocês são a prova de que o sucesso se alcança através de talento, determinação e trabalho duro.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Profª Drª Mani Indiana Funez, você é um exemplo de pessoa e professora, uma inspiração que sempre soube me motivar para aprender e despertar minha curiosidade.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, por meio de apoio, revisões e sugestões.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um novo modelo de dor pós-incisional persistente em ratos e indicar um fármaco que possa ser utilizado para investigar o possível papel protetor da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante na instalação desse quadro. Foram testados três protocolos de dor pós-incisional persistente, todos adaptados do modelo de Brennan; Vandermeulen; Gebhart (1996), evocados por um agente pró-inflamatório (carragenina) e incisão. A administração intraplantar de diferentes doses de brusatol, inibidor da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante, foi testada sobre a sensibilização inflamatória da carragenina e a resposta nociceptiva dos animais foi avaliada usando o Von Frey eletrônico. Dois dos três protocolos testados foram capazes de induzir a persistência da hipernocicepção, que durou por, pelo menos, 30 dias após o fim do tratamento. O único protocolo que não obteve sucesso contava com uma dose maior de carragenina (200 µg/pata/100µL) por três dias, enquanto os que desenvolveram a persistência foram sensibilizados por seis dias com uma dose menor (100 µg/pata/100µL). Esse resultado indica que a duração da sensibilização é mais importante do que a intensidade para a indução da persistência. O brusatol, em todas as doses testadas, aumentou a sensibilização gerada pela carragenina, efeito que pode decorrer da elevação do estresse oxidativo pela a inibição da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante. Dessa forma, o modelo desenvolvido neste trabalho pode ser utilizado como uma ferramenta para investigação dos mecanismos, prevenção e tratamento da dor crônica pós-operatória e a investigação do efeito do brusatol sobre esse processo de persistência pode ser útil para investigar o papel da via do Nrf2.

Palavras-chaves: Dor; Cirurgia; Brusatol; Persistente.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a new rat model of persistent post-incisional pain and indicate a drug that can be used to investigate the possible protective role of the Keap1/Nrf2 pathway in the establishment of this persistence. We tested three protocols of persistent post-incisional pain, all adapted from BRENNAN; VANDERMEULEN; GEBHART (1996), evoked by a proinflammatory agent (carrageenan) and incision. The intraplantar administration of different doses of brusatol, an inhibitor of the Keap1/Nrf2 pathway, was tested on the carrageenan-induced inflammatory pain and the withdrawal responses were measured using electronic Von Frey. Two of the three protocols tested were able to induce the persistence of hypernociception, which lasted for at least 30 days after the end of treatment. The only unsuccessful protocol included higher dose of carrageenan for three days, while those who developed persistence were sensitized for six days at a lower dose. This result indicates that the duration of sensitization is more important than the intensity for the induction of persistence. The brusatol at all the doses tested increased the carrageenan-induced sensitization, an effect that may result from the elevation of oxidative stress by the inhibition of the Keap1/Nrf2 pathway. Thus, the model developed in this study can be used as a tool to investigate the mechanisms, prevention and treatment of chronic postoperative pain and the investigation of the effect of brusatol on this process may be useful to investigate the role of the Nrf2.

Keywords: Pain; Postoperative; Brusatol; Persistent.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Regulação da via Keap/Nrf2/ARE.....	15
Figura 2 - Limiares nociceptivos mecânicos basais de animais <i>naïve</i> e sensibilizados com carragenina 200 µg	23
Figura 3 - Organização da mesa cirúrgica.....	24
Figura 4 - Procedimento cirúrgico.....	25
Figura 5 - Intensidade de hipernocicepção mecânica em resposta a incisão no músculo plantar.....	25
Figura 6 - Ilustração dos diferentes protocolos dor pós-incisional persistente testados.....	27
Figura 7 - Protocolos testados para indução de sensibilização persistente pós-incisional.....	29
Figura 8 - Curva dose-resposta do brusatol na presença de Carragenina em baixa dose.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 R's	Reduction, Refinement e Replacement
µg	Microgramas
µL	Microlitros
ANOVA	Análise de Variância
ARE	Antioxidant Response Element
C	Celsius
cm	Centímetro
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CFA	Complete Freund's Adjuvante
Cg	Carragenina
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CUL3	Complex of human cullin-3
EMP	Erro Padrão da Média
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FM	Faculdade de Medicina
g	Grama
HP-β	Hidroxipropil-β
IL-6	Interleucina 6
KEAP1	Kelch Like ECH Associated Protein 1
Kg	Kilograma
NF-Kb	Factor Nuclear Kappa B
MDA	Malondialdeído
mL	Mililitro
mg	Miligramas
mRNA	RNA mensageiro
NO	Óxido Nítrico
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RBX1	Ring Box Protein 1
SMaF	Small Musculoaponeurotic Fibrosarcoma

SUS	Sistema Único de Saúde
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral α
UnB	Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Revisão de literatura	12
1.2 Justificativa.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 METODOLOGIA	18
3.1 Animais	18
3.2 Padronização	18
3.2.1 Teste nociceptivo e sensibilização inflamatória com carragenina.....	19
3.2.2 Definição do protocolo de anestesia	19
3.2.3 Piloto do modelo de dor pós-incisional.....	20
3.3 Curva dose-resposta do brusatol sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina	20
3.4 Modelo de dor pós-incisional persistente.....	21
3.5 Análise estatística	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Padronização de medidas dos limiares nociceptivos de patas de ratos <i>naïve</i> ou sensibilizadas pelo agente pró-inflamatório carragenina	22
4.2 Definição de parâmetros da cirurgia	23
4.3 Persistência da dor pós-incisional	26
4.4 Brusatol aumenta a sensibilização mecânica induzida pela carragenina.....	30
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A dor aguda exerce uma função de proteção a danos teciduais, porém quando há uma adaptação incorreta gerada por fatores fisiopatológicos essa dor pode cronificar. Apesar de haver alguns pontos em comum, existem diversas manifestações clínicas de dor crônica (KUNER; FLOR, 2016), entre as quais se encontra a dor crônica pós-operatória, uma complicação cirúrgica grave, que diminui a qualidade de vida dos pacientes.

A dor crônica pós-operatória é definida como aquela que perdura por três meses ou mais após a cirurgia e que não apresenta outras causas aparentes, como infecção crônica ou metástase (WERNER; KONGSGAARD, 2014). Apesar de não serem esclarecidos por completo, os mecanismos de cronificação da dor pós-operatória estão associados a alterações a nível tanto periférico quanto central.

Moléculas que têm demonstrado um importante papel no processamento da dor crônica inflamatória e neuropática, a nível central e periférico, são as espécies reativas de oxigênio (ERO) (KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013). Essas moléculas contribuem para perpetuar doenças inflamatórias e resultam em resistência terapêutica e progressão da patologia (HASSLER; JOHNSON; HULSEBOSCH, 2014).

Um dos mecanismos mais importantes para o controle do estresse oxidativo e manutenção da homeostasia é a via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante (LU et al., 2016), sendo capaz de influenciar a expressão de mais de 100 genes relacionados com função antioxidante. Assim, a modulação dessa via tem se tornado um alvo interessante para o tratamento de diversas doenças, como câncer e doenças neurodegenerativas, onde também há atuação das espécies reativas de oxigênio (AHMED et al., 2017).

Entre as substâncias capazes de modular os níveis de Nrf2, encontra-se o brusatol, um *quassinóide* extraído das partes aéreas da *Brucea javanica*, planta tradicionalmente utilizada na medicina chinesa. A inibição de Nrf2 induzida pelo brusatol já foi evidenciada tanto *in vitro* como *in vivo* e as possíveis contribuições desse mecanismo à saúde vêm sendo exploradas (OLAYANJU et al., 2015; REN et al., 2011; XIANG et al., 2018).

Dessa forma, o estudo do papel da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta

antioxidante no desenvolvimento da dor crônica pós-operatória pode contribuir para o esclarecimento de mecanismos moleculares envolvidos na cronificação, assim, possibilitar estratégias para prevenção e agregar conhecimento a um campo de pesquisa ainda não muito explorado. Nossa hipótese é de que a via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante tenha papel protetor nesse processo. Este trabalho faz parte de um projeto maior, vinculado a iniciação científica e pós-graduação na Faculdade de Ceilândia.

1.1 Revisão de literatura

As cirurgias são um exemplo de situação que expõe o paciente à chance de desenvolver dor crônica, pois, por mais bem controladas que sejam, é inevitavelmente produzido durante o procedimento lesão tecidual, inflamação e dor aguda. No Brasil, somente no ano de 2017, foram realizados 4.566.350 procedimentos cirúrgicos financiados pelo SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

De acordo com a Sociedade Brasileira para o Estudos da Dor (SBED, 2017), cerca de 37% da população brasileira é acometida por dor crônica, que não representa somente um problema clínico, devido à redução da qualidade de vida, mas também um problema social e econômico. Em alguns países, o custo do tratamento de dor crônica é maior do que o tratamento de doenças cardiovasculares (STEYAERT; LAVAND'HOMME, 2018). Já a dor crônica pós-operatória demonstra uma incidência que varia de acordo com o tipo de cirurgia, porém a média é em torno de 10 a 50% (CHAPMAN; VIERCK, 2017; KRAYCHETE et al., 2016).

Atualmente são conhecidos alguns fatores de risco para o desenvolvimento da dor crônica pós-operatória, que envolvem questões pré (stresse, ansiedade, idade, dor pré-existente), intra (técnica anestésica, extensão da cirurgia, duração da cirurgia) e pós-cirúrgicas (manejo da dor pós-operatória). Estas contribuem para a adoção de medidas preventivas (CHAPMAN; VIERCK, 2017), como as intervenções farmacológicas pré-operatórias, mas não têm apresentado resultados eficazes na redução da incidência da cronificação (HENSCHKE; KAMPER; MAHER, 2015). Além disso, a análise de risco antes do procedimento cirúrgico também possui limitações devido a fatores intrínsecos do paciente.

O mecanismo periférico envolvido na cronificação da dor pós-operatória, elucidado até o momento, está relacionado à liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, histamina, citocinas, óxido nítrico (NO) e serotonina, pelo tecido lesado e por células do sistema imune como leucócitos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos. Esse conjunto de moléculas inflamatórias, por sua vez, ativa cascatas intracelulares que podem reduzir o limiar nociceptivo (CHAPMAN; VIERCK, 2017; KRAYCHETE et al., 2016).

Esse processo de sensibilização periférica também tem envolvimento de terminais nervosos simpáticos pela liberação de norepinefina e prostanóides. Dessa forma, a partir de α -adrenoceptores, os eferentes simpáticos se tornam capazes de ativar fibras nociceptivas (CHAPMAN; VIERCK, 2017).

O envolvimento direto das espécies reativas de oxigênio nesse processo de cronificação da dor pós-operatória ainda não foi relatado. Contudo, percebe-se o envolvimento do estresse oxidativo nos processos inflamatórios e lesão tecidual (MITTAL et al., 2014). ERO são potentes ativadoras de NF- κ B, responsável pelo aumento da expressão de genes associados a agentes pró-inflamatórios que estimulam a produção e liberação de citocinas (como IL-6 e TNF- α) e ativação de várias enzimas, dentre outros (MORGAN; LIU, 2011).

O envolvimento das espécies reativas de oxigênio na dor, tanto inflamatória quanto neuropática, já foi demonstrado em alguns estudos a partir do efeito antinociceptivo apresentado em modelos experimentais após administração de substâncias que diminuem as concentrações endógenas de ERO, e que níveis elevados dessas moléculas na medula espinhal são suficientes para gerar comportamento doloroso em roedores (HASSLER; JOHNSON; HULSEBOSCH, 2014; KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013).

Alguns exemplos do envolvimento de ERO com a dor são as evidências que indicam que essas moléculas podem contribuir para o desencadeamento e/ou manutenção de estados de hipersensibilização neuronal presentes no câncer, no diabetes mellitus tipo 2 na forma de polineuropatia, além de potencializar o estado inflamatório crônico de doenças neurodegenerativas (VINCENT et al., 2011).

Desta maneira, um ciclo de oxidação e inflamação exacerbada contribui para perpetuar doenças inflamatórias, resultando em resistência terapêutica e progressão

da patologia. Com isso, é possível indicar a possível influência de ERO na persistência da dor pós-operatória.

A via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante é um dos principais mecanismos para o combate ao excesso de ERO e em condições fisiológicas, o fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) se encontra no citoplasma ligado a um homodímero de Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) que intermedeia uma ligação com o complexo Cul3-Rbx1 para degradação proteossomal dependente de ubiquitina do Nrf2 (ITOH et al., 1999; LU et al., 2016). Keap 1 é uma proteína rica em grupamentos tiol, na forma de múltiplos resíduos de cisteína altamente reativos, que funciona como uma espécie de sensor para o estresse oxidativo.

Durante o estresse oxidativo, Keap1 é inativado e Nrf2 migra para o núcleo e forma um complexo com proteínas chamadas sMaf (small musculoaponeurotic fibrosarcoma), que por sua vez pode se associar aos elementos da resposta antioxidante (ARE), ou elementos da resposta eletrofílica, e assim iniciar o processo de transcrição. Porém, há outras formas que permitem a dissociação de Keap1/Nrf2, como a fosforilação por proteínas quinase (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017).

Esse mecanismo parece reduzir a intensidade da inflamação aguda e impede a transformação das condições patológicas agudas em doenças crônicas (MA, 2013). Sendo assim, da mesma maneira que existem evidências que indicam o papel de ERO na dor, há estudos que já buscam a modulação da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante para descoberta de novas formas de tratamento e manejo da dor.

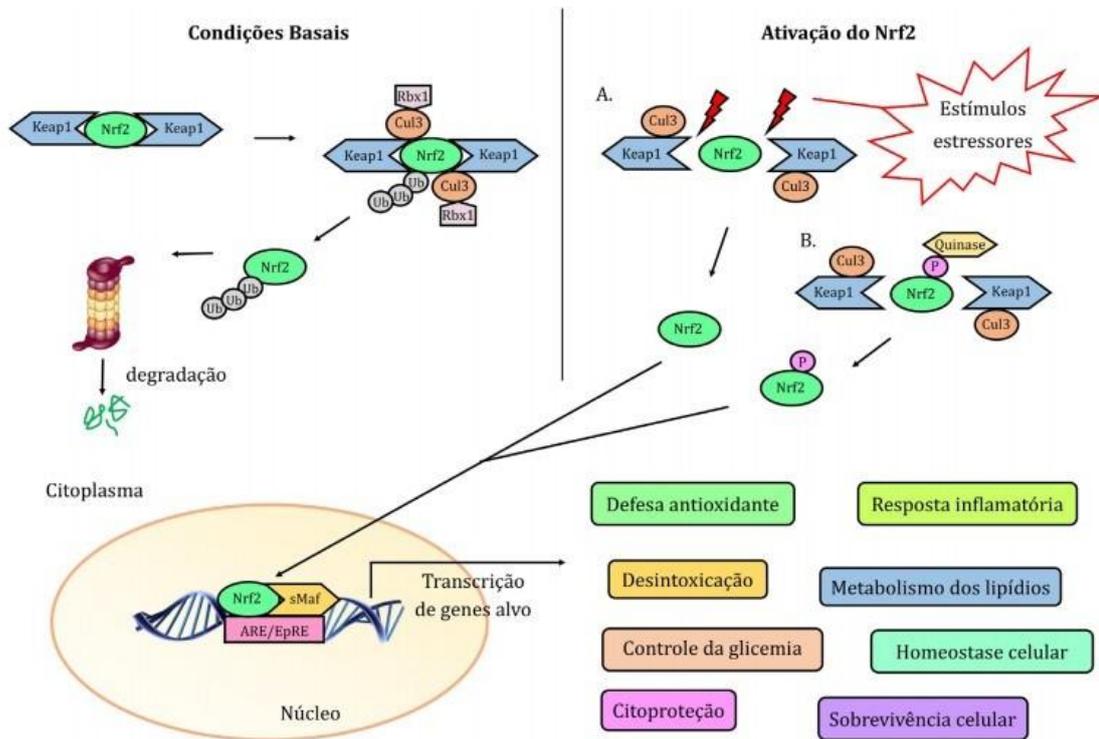


Figura 1: Regulação da via Keap/Nrf2/ARE. À esquerda é possível observar como se dá o controle dos níveis de Nrf2 em condições normais. À direita demonstra os possíveis caminhos para a dissociação de Nrf2 e sua atuação até a transcrição de molécula, que visam garantir a homeostasia celular. Fonte: Hahn; Oliveira; Bock (2017).

Apesar de poucos, existem dados que demonstram que indutores da sinalização da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante podem apresentar efeito analgésico no modelo de formalina (estímulo químico inflamatório) em camundongos (ROSA et al., 2008). Porém, em relação à dor crônica ainda há uma lacuna acerca do papel dessa via, sendo, até o momento, somente ligada a condições que envolvem dor crônica, como neuropatia diabética (NEGI et al., 2011).

1.2 Justificativa

Os estudos voltados à dor crônica, em sua maioria, buscam melhores abordagens de tratamento, tendo em vista o desafio do controle eficaz desse problema de saúde (GATCHEL et al., 2014). Desta forma, há um número menor de estudos voltados à prevenção, porém uma parcela da população, exposta a condições

que podem levar ao desenvolvimento de dor crônica, se beneficiaria de estudos que visam identificar um alvo para prevenção.

Como as medidas atuais para a prevenção do problema explorado por esta pesquisa não apresentam o desempenho necessário, a busca por novas formas preventivas é relevante. O passo inicial para o desenvolvimento dessas novas medidas de prevenção é justamente a elucidação de mecanismos moleculares e celulares envolvidos na instalação desse tipo de dor.

A realização deste estudo também contribuirá para elucidar outros fatores de risco e proteção da cronificação da dor pós-operatória e assim agregar conhecimento a um campo de pesquisa ainda não muito explorado. O estudo envolvendo o inibidor de Nrf2 justifica-se por se tratar de dados que não estão descritos na literatura até o momento e poder contribuir para o desenvolvimento de novos mecanismos de prevenção de dor crônica pós-operatória, tornando assim mais robustos os resultados encontrados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um novo modelo de dor pós-incisional persistente em ratos, além de indicar um fármaco que possa ser utilizado para investigar o possível papel protetor da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante na instalação desse quadro.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar de testes e procedimentos do projeto para realizar etapas necessárias a este trabalho.
- Definir um modelo de dor pós-incisional persistente.
- Realizar curva dose-resposta com um inibidor da via (brusatol) para observar seu efeito sobre a sensibilização inflamatória causada pela carragenina.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Para os procedimentos experimentais foram utilizados ratos heterogênicos machos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, com o peso entre 100 g e 300 g. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade de Brasília (UnB), em controle de temperatura na faixa de 20° – 25° C e ciclos claro-escuro fixos de 12/12 horas. Os animais receberam a dieta padrão e água filtrada ad libitum.

Os protocolos para uso de animais em experimentação foram seguidos de acordo com as “Normas Éticas para Investigações Envolvendo Dor Experimental em Animais Acordados” (ZIMMERMANN, 1983), com “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos” e com as “Diretrizes da Prática de Eutanásia” do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aplicando os Princípios de Russell-Burch (1959) de “*Reduction, Refinement e Replacement*” 3R’s. O estudo só teve início após aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA), da UnB número 53/2018.

3.2 Padronização

Após a capacitação de recursos humanos, execução orçamentária e obtenção de espaço físico, foi iniciada a padronização do teste comportamental nociceptivo mecânico (Teste de Von Frey), da sensibilização inflamatória com carragenina, do protocolo de anestesia inalatória e do modelo de dor pós-incisional, tendo como base os artigos que descreveram esses testes e modelos.

Para os tratamentos durante todos os experimentos foi utilizado o volume de 100µL/pata e as administrações feitas por via intraplantar por um pesquisador independente, diferente do que realizava a medida.

3.2.1 Teste nociceptivo e sensibilização inflamatória com carragenina

Com o intuito de avaliar o limiar nociceptivo dos animais, foi padronizado o Teste de Von Frey eletrônico (VIVANCOS et al., 2004), no qual os animais são acondicionados em caixas de acrílico sendo a parte inferior composta por uma rede de malha de arame que permite o acesso a pata do animal por meio de uma ponteira de polipropileno. Por meio da ponteira é possível impor uma pressão crescente nas patas traseiras até que seja desencadeada uma reação interpretada como nociceptiva, chamada flinch. Feito isso, o equipamento mensura qual foi a força em gramas necessária para ter a resposta. Os animais antes do início das medidas passavam por uma ambientação de 10 minutos e não eram manipulados durante os testes, tendo total liberdade de movimento. Em todos os experimentos foram realizadas três medidas similares, que permitem o cálculo da média e delta (subtração da média após a intervenção da média basal).

A sensibilização inflamatória com carragenina também foi padronizada na dose de 200 µg em um grupo de 10 animais divididos entre o grupo salina e experimental. A administração do fármaco foi feita por via intraplantar e as medidas do limiar nociceptivo, avaliadas pelo teste de Von Frey, foram realizadas 3 horas após a administração, pois é o momento de pico da atividade inflamatória gerada pelo fármaco.

3.2.2 Definição do protocolo de anestesia

Para a realização do procedimento cirúrgico foram testados dois protocolos de anestesia com meios de indução e manutenção diferentes. A técnica anestésica adequada para dar seguimento aos experimentos foi definida com base na apresentasse mais segurança.

3.2.3 Piloto do modelo de dor pós-incisional

O experimento piloto seguiu o modelo de Brennan; Vandermeulen; Gebhart (1996) quanto ao local da incisão tamanho do corte e sutura. Visou demonstrar a capacidade de reproduzir um modelo já existente e capacitar a equipe para realização do procedimento que consistia inicialmente na administração intermuscular de 0,2 mL terramicina no membro inferior oposto ao que receberia a incisão. Em seguida, o animal era posicionado em decúbito ventral, a pata traseira exposta e protegida por um campo cirúrgico estéril, a degermação e antisepsia da pele foram feitas com soluções de clorexidina degermante e alcóolica, respectivamente.

A incisão da pele, fáscia e músculo plantar foi feita com a lâmina número 11 realizada em sentido longitudinal com cerca de 1 cm, tendo início a 0,5 cm do calcanhar e seguindo em direção aos pododáctilos, feita sem afetar origem e inserção muscular. A hemostasia, sutura com fio nylon número (5-0) e higienização do corte com soro fisiológico encerravam o processo. As suturas foram removidas sob anestesia com isoflurano somente quando a cicatrização era evidenciada por inspeção visual pela ausência de edema, eritema e o tecido se encontrava condições similares as anteriores à incisão.

O monitoramento dos animais após o procedimento foi feito através do acompanhamento da temperatura e batimentos cardíacos; acompanhamento observacional das gaiolas nos dias seguintes. Os limiares de hipernocicepção foram realizados 2 horas e 24 horas após a cirurgia com o auxílio do teste de Von Frey nos 7 animais que haviam sido divididos no grupo falso-operado (recebeu a mesma dose de terramicina e foi anestesiado, porém não pelo procedimento) e experimental.

3.3 Curva dose-resposta do brusatol sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina

Foram distribuídos aleatoriamente 25 animais entre os grupos salina, 2 controles carragenina (Dilúente do brusatol +Cg 50 µg e Dilúente do brusatol +Cg 100 µg) e 3 doses de brusatol + carragenina 50 µg (7 µg, 20 µg e 60 µg). Todos os fármacos foram administrados localmente por via intraplantar. No momento T₀ foram

administradas as diferentes doses do inibidor ou diluente e após 1 hora a carragenina. O teste nociceptivo mecânico teve início após transcorridas 3 horas da aplicação de carragenina.

As doses de brusatol foram definidas a partir da conversão de via intraperitoneal para via intraplantar da dose utilizada por REN et al. (2011) em seu estudo. A solubilização do brusatol por sua vez foi feita com DMSO.

3.4 Modelo de dor pós-incisional persistente

Para avaliar o efeito causado pela inibição da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante na persistência da dor pós-incisional, foi utilizado um modelo adaptado de Brennan; Vandermeulen; Gebhart (1996). Foram testados 3 protocolos para se determinar qual era eficaz, todos utilizando carragenina (200 ou 100 µg) como mediador inflamatório 6 ou 3 dias antes da cirurgia.

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa "Graph Pad Prism 7.0, San Diego, EUA". Os resultados foram representados como média ± erro padrão da média (epm) do delta, que consiste na subtração da medida após a intervenção em relação a medida basal, o que reduz erros devido variações individuais. Desta forma, os resultados indicam a intensidade de sensibilização nociceptiva dos animais, variando conforme o protocolo experimental. Foram utilizadas a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), de uma via (one-way ANOVA) ou teste t e para se obter comparações pareadas foram realizados testes de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância estabelecido será de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização de medidas dos limiares nociceptivos de patas de ratos *naive* ou sensibilizadas pelo agente pró-inflamatório carragenina

O limiar mecânico de animais *naive* foi parâmetro para avaliação da padronização do teste nociceptivo. Os resultados demonstraram pouca variação entre as medidas realizadas em ambas as patas do mesmo animal e a ausência de significância na comparação entre as medidas individuais e no conjunto dos dados (Figura 2 A e B).

Além das medidas em animais *naive* também foram realizadas medidas após a administração do agente pró-inflamatório carragenina na dose de 200 μg , que permitiu avaliar uma condição de hipernocicepção. Como esperado, houve diferença quando comparou-se o grupo carragenina com o grupo salina ($p^* = <0,05$) (Figura 2 C). Assim, estes dados demonstram a capacidade do pesquisador de identificar respostas dos animais interpretadas como nociceptivas bem como alterações nos limiares nociceptivos de patas de ratos induzidas pela sensibilização inflamatória.

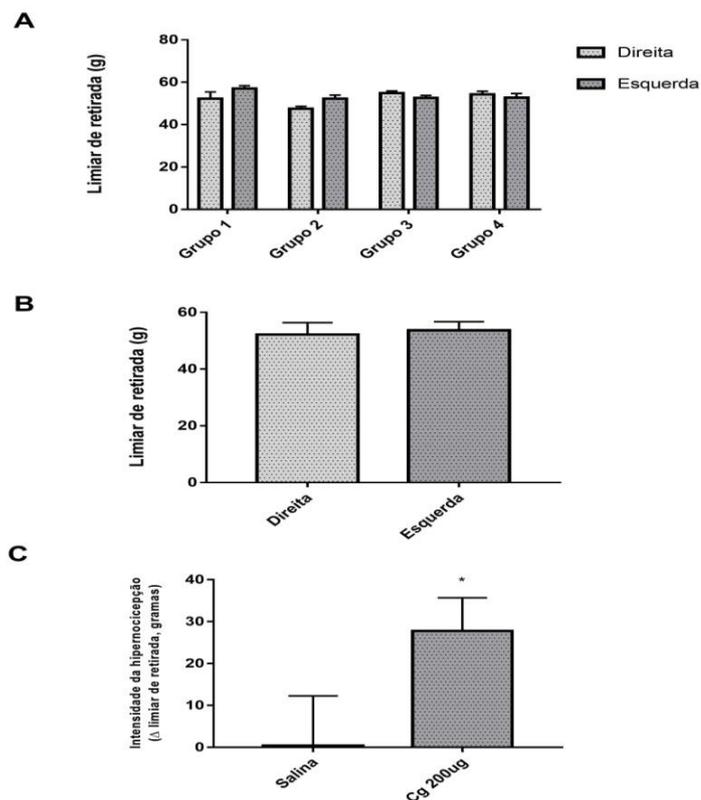


Figura 2: Limiares nociceptivos mecânicos basais de animais naive e sensibilizados com carragenina 200 µg. Painel A indica as medidas basais em valores absolutos \pm epm de ratos wistar, machos, pesando entre 100- 200 gramas divididos em grupos de 4 animais cada (ANOVA de 1 via $p=0,0704$). Painel B representa as médias gerais em valores absolutos \pm epm das patas de todos os animais do painel A (Teste t $p = 0,3390$). Painel C: Indica a intensidade de hipernociceção após 3 horas da administração de Cg 200 µg, o resultado está expresso em média do delta \pm epm de 5 animais (Teste t $*p = <0,05$).

4.2 Definição de parâmetros da cirurgia

O primeiro protocolo de anestesia testado consistia na indução por via intraperitoneal utilizando-se de acepromazina, em diferentes doses, combinado ao isoflurano inalatório, administrado em cone nasal. Entretanto, houve substituição, pois ocorreu uma taxa de mortalidade maior do que a esperada por parada cardiorespiratória.

Assim, um segundo protocolo da anestesia inalatória substituiu o cone nasal por equipamento para anestesia inalatória (Bonther) que possibilita a indução e manutenção da anestesia de forma inalatória com maior controle das taxas. Nesse

caso também foi utilizado o isoflurano por se tratar de anestésico amplamente utilizado na anestesia animal por apresentar menos efeitos tóxicos e melhor recuperação. Foi então estabelecido a taxa de 6% para indução e 4% na máscara para manutenção. A média do tempo gasto para indução foi de 5 minutos e o tempo de recuperação anestésica em torno de 2 minutos. Devido às vantagens, os experimentos seguiram pela indução unicamente inalatória, em geral com uma taxa de indução em 6% e manutenção em 4%, mas essas taxas eram ajustadas quando necessário devido variações de peso e nível de estresse.



Figura 3: Organização da mesa cirúrgica. Sistema de anestesia composto por administrador de anestesia, caixa de indução e cone nasal.

A padronização da cirurgia ocorreu satisfatoriamente em todas as etapas: diérese, exérese, hemostasia e síntese, como demonstrado na figura 4. A avaliação dos limiares nociceptivos mecânicos dos animais demonstrou hipernocicepção causada pela incisão significativamente diferente do grupo falso-operado, avaliada 2 e 24 horas após, sendo mais intensa nas primeiras 2 horas (Figura 5). Este dado está de acordo com a literatura (BRENNAN; VANDERMEULEN; GEBHART 1996).

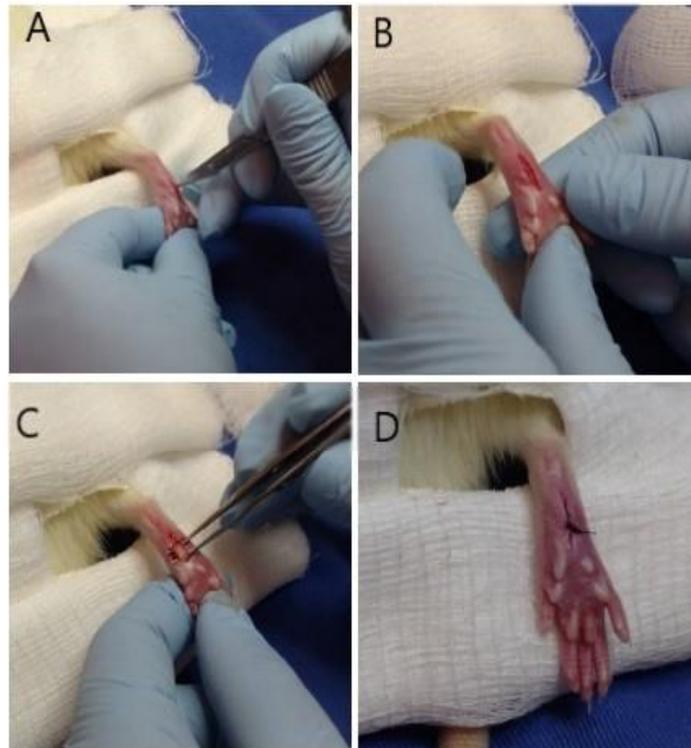


Figura 4: Procedimento cirúrgico. A e B) Diérese: rompimento de pele e fáscia. C) Exérese: exposição do nervo plantar seguida de realização de pequena lesão utilizando-se de bisturi e D) Síntese (sutura).

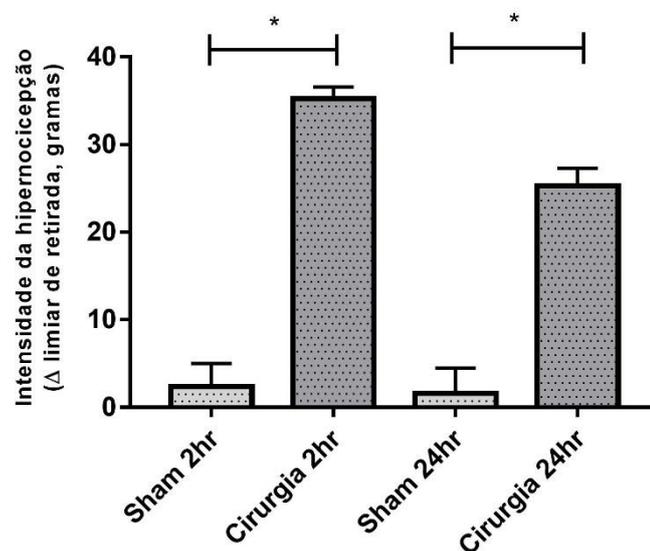


Figura 5: Intensidade de hipernocicepção mecânica em resposta a incisão no músculo plantar. Eixo Y: Delta do limiar de retirada dos animais em gramas, representando a intensidade de hipernocicepção. Eixo X: representação dos diferentes tratamentos, (grupo controle, falso-operado) e (grupo experimental). * $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. Ratos wistar, machos, pesando entre 100-250 gramas, $n=7$.

4.3 Persistência da dor pós-incisional

O primeiro modelo testado se caracterizou pela administração intraplantar uma vez ao dia de 200 µg de carragenina nos 3 dias, que antecederam a incisão, que foi conduzida em condições similares ao descrito por Brennan; Vandermeulen; Gebhart (1996). Para acompanhar os limiares nociceptivos, que indicariam a persistência, foi medida a terceira hora após a cada injeção de carragenina e 15 dias após a última intervenção. Neste caso as medidas ocorreram diariamente nos primeiros 11 dias e alternados a partir de então.

O segundo protocolo contou com a administração de carragenina 100 µg , uma vez ao dia intraplantar, pelos 6 dias que antecederam a incisão. As medidas dos limiares nociceptivos, no entanto, não foram feitas após 3 horas da administração do fármaco, mas sim da basal, ou seja, no dia seguinte à administração e seguiram por 30 dias após a última intervenção, inicialmente diária (0-8), intercalada (9-15) e, por fim, esporádica (15-30).

O terceiro protocolo consistia na administração de carragenina 100 µg por três dias, no quarto era realizada a cirurgia e nos 3 dias seguintes foi administrada carragenina na mesma dose da anterior. A avaliação do limiar nociceptivo seguiu o mesmo esquema do segundo protocolo e pelo mesmo período. O modelo de Brennan; Vandermeulen; Gebhart (1996) foi simulado como forma de controle, buscando demonstrar que o grupo só com a incisão, sem mediador pró-inflamatório, não persistisse e a sensibilização inflamatória gerada realmente permanecesse por 6 dias, como na referência.

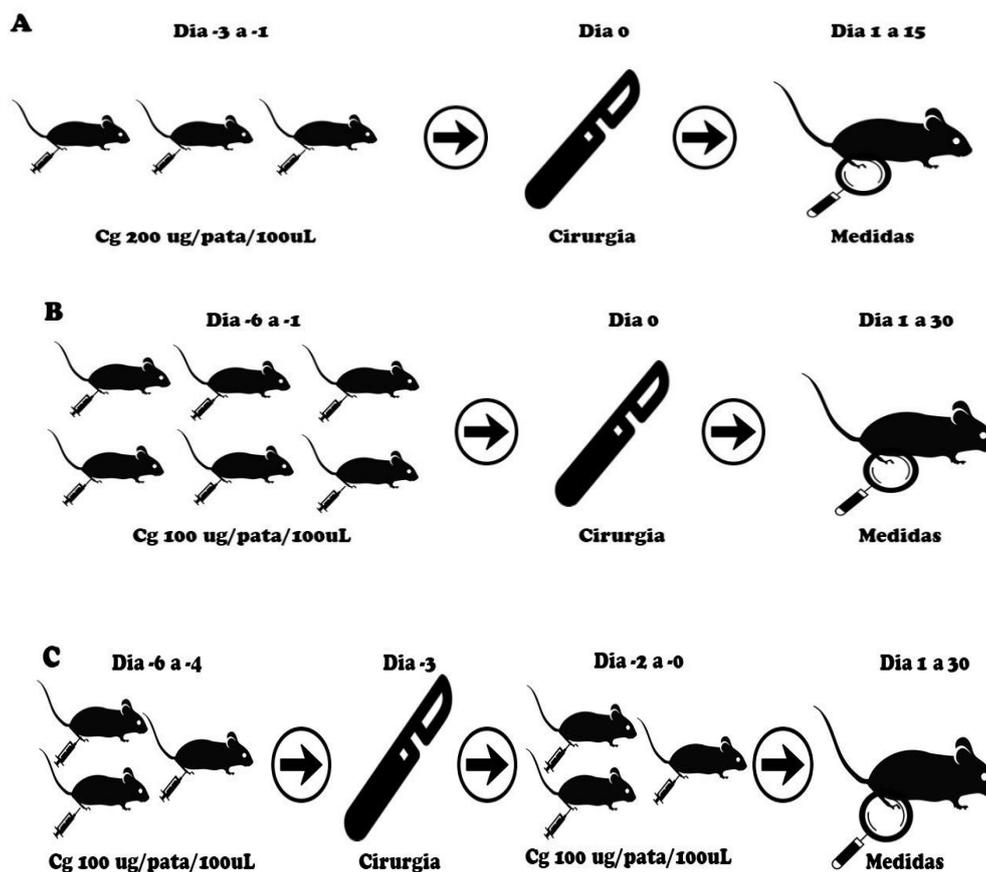


Figura 6: Ilustração dos diferentes protocolos dor pós-insicisional persistente testados. Fonte: Share.icon.net.

O modelo de Brennan; Vandermeulen; Gebhart (1996) reproduzido pelo grupo apresentou uma hipernocicepção mecânica significativa por seis dias, exatamente como descrito em 1996 (Figura 7 A), que representa o estado de dor aguda pós-operatória em humanos.

Entre os 3 modelos de cronificação testados, 2 geraram a persistência da hipernocicepção buscada. Tanto o segundo quanto o terceiro protocolo que contavam com a administração da carragenina 100 µg por 6 dias seguidos e intercalados pela cirurgia, respectivamente. Ao término do tratamento, geraram quadro de hipernocicepção mecânica persistente que permaneceu por até 30 dias (*p < 0,05) (Figura 7 C e D).

Nestes dois protocolos de sensibilização, a diferença significativa dos limiares em relação ao grupo salina só ocorreu após o terceiro dia de tratamento. Ao longo do tratamento a diferença aumentou, alcançando o pico no último dia (dia 0). Essa fase

de aumento da hipernocicepção mecânica durante o tratamento representa o período de instalação da hipernocicepção persistente. Já os 30 dias seguintes ao término do tratamento representam a fase de manutenção.

Para o primeiro protocolo testado, com 3 dias de administração de carragenina 200 µg, a hipernocicepção mecânica induzida durou somente 5 dias após o último tratamento. Ao sexto dia, os limiares nociceptivos das patas dos animais apresentavam valores similares ao grupo controle. Apesar da dose de mediador inflamatório ser maior (200 µg), o número de dias de tratamento era menor (Figura 7 B).

Ao longo dos dias, o delta do limiar do grupo controle se tornou negativo (Figura 7 A, C e D), associamos esse fenômeno ao aumento de peso dos animais durante o experimento, pois é esperado o aumento do limiar nociceptivo com o aumento do peso (Figura 7 E). Durante os dias avaliados, não houve diferença significativa no peso dos diferentes grupos, contudo em todo o processo houve em média um aumento de peso de 180 g.

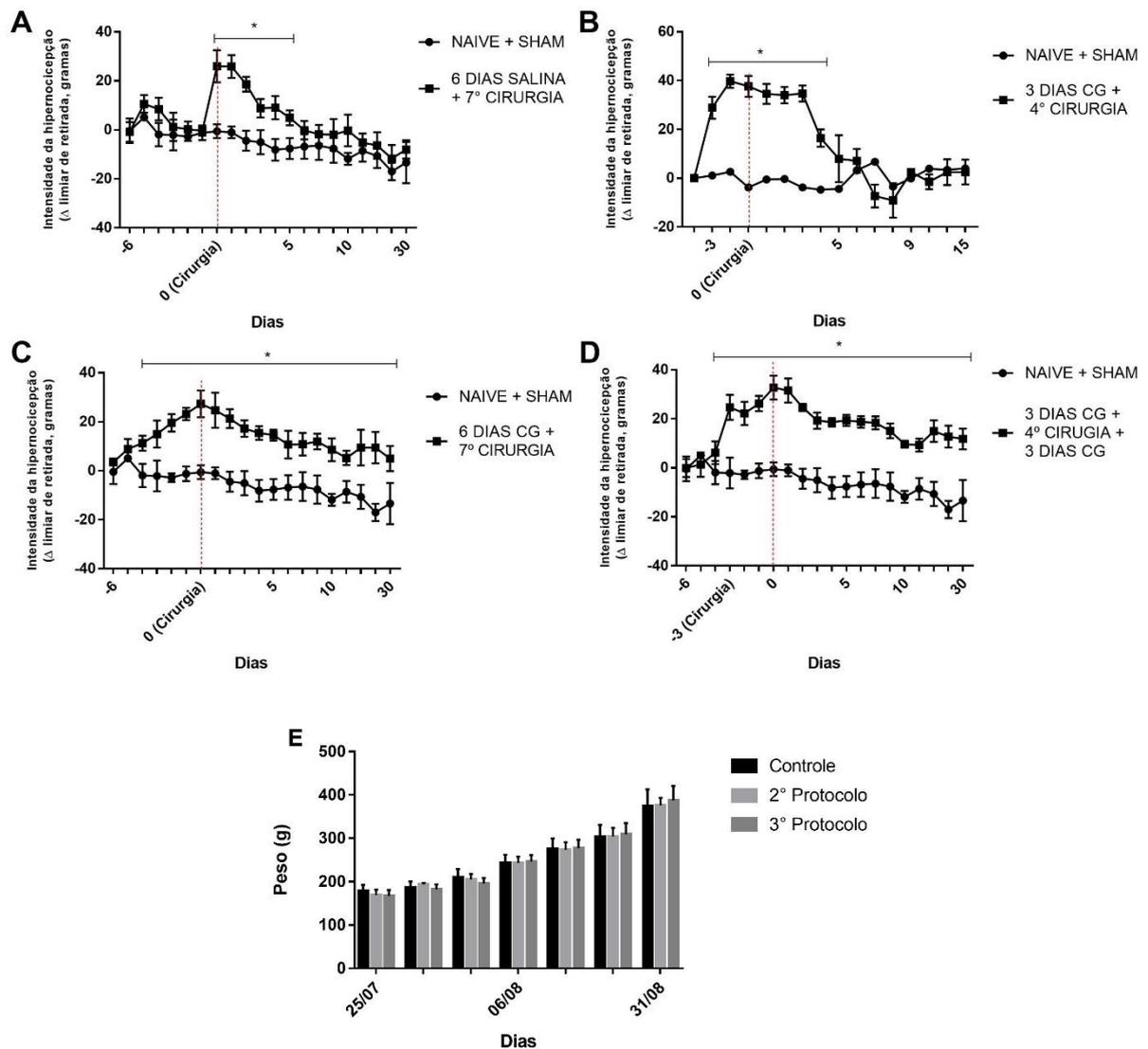


Figura 7: Protocolos testados para indução de sensibilização persistente pós-incisional. Eixo Y: indica a força em gramas aplicada nas patas dos ratos necessária para que cada animal apresentasse resposta caracterizada como nociceptiva. Eixo X: Dias de tratamento (< 0) e dias de acompanhamento (> 0). **Painéis A – D** indicam o delta ± epm de ratos *wistar*, machos, pesando entre 100-300 gramas, n= 21. **Painel A:** Reprodução do modelo de Brennan et al. (1996), com a administração de salina por seis dias via intraplantar e incisão na pele, fáscia e músculo planar ao sétimo dia. Manutenção da hipernociceção mecânica por 6 dias *p = <0,05; **Painel B:** Protocolo com 3 dias de administração de Cg 200 µg intraplantar e cirurgia ao quarto dia. Manutenção da hipernociceção mecânica por 5 dias pós-tratamento *p = <0,05; **Painel C:** Protocolo com 6 dias de administração de Cg 100 µg intraplantar e cirurgia ao sétimo dia. Manutenção da hipernociceção mecânica por 30 dias pós-tratamento *p = <0,05; **Painel D:** Protocolo com 6 dias de administração de Cg 100 µg intraplantar intercalado ao quarto dia com a cirurgia. Manutenção da hipernociceção mecânica por 30 dias pós-tratamento *p = <0,05. ANOVA de duas vias seguida do teste Tukey. **Painéis E:** indica o peso em gramas ao longo do tempo dos grupos que compunham os protocolos de cronificação.

4.4 Brusatol aumenta a sensibilização mecânica induzida pela carragenina

O brusatol, em todas as doses testadas (7, 20 e 60 μg), elevou significativamente a sensibilização mecânica gerada pela carragenina 50 μg ($*p = <0,05$) a níveis superiores aos gerados com o dobro da dose de carragenina (100 μg). No entanto, as diferentes doses de brusatol não apresentaram diferenças entre elas (Figura 8).

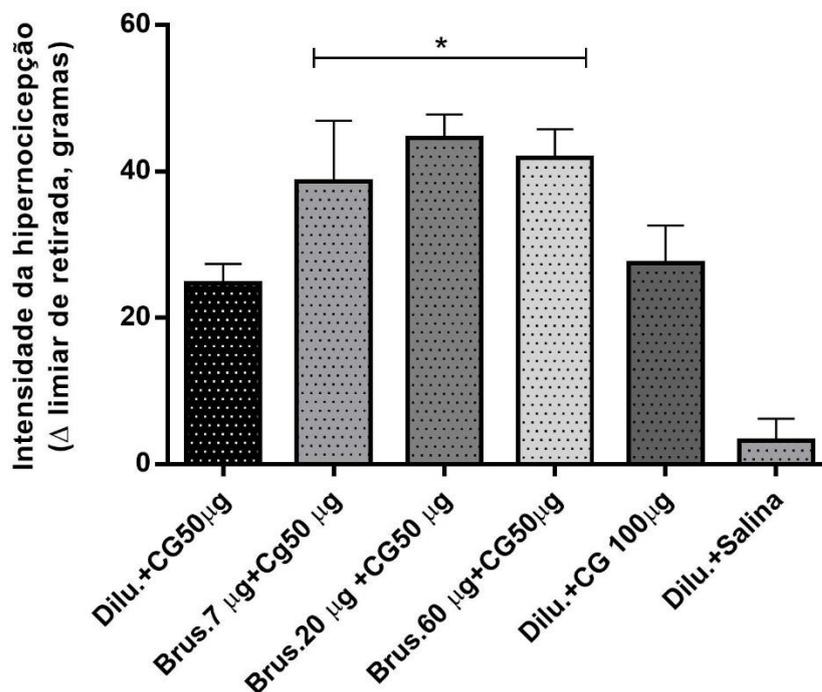


Figura 8: Curva dose-resposta do brusatol na presença de Carragenina em baixa dose. Eixo Y: delta do limiar de retirada dos animais em grammas, representando a intensidade de hipernociceção. Eixo X: representação dos diferentes tratamentos. $*p = <0,05$ do grupo Cg 50 μg comparado aos grupos que receberam brusatol. Grupo Cg 50 μg foi estatisticamente diferente do grupo salina ($*p = <0,05$). ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. $n = 25$ animais.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo contou com a padronização de testes comportamentais nociceptivos, protocolo de anestesia e modelo de dor pós-incisional aguda. Descreveu um novo modelo de dor pós-incisional persistente em ratos e demonstrou o aumento da sensibilização inflamatória induzida por carragenina pelo brusatol, um inibidor da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante.

A padronização com o aperfeiçoamento de modelos animais e testes aplicados alcançados neste trabalho contribui para aumentar o rigor dos métodos utilizados e, assim, produzir dados confiáveis e reproduzíveis, buscando mimetizar ao máximo as mesmas condições dos humanos e diminuir a lacuna entre estudos pré-clínicos e clínicos. Além de contribuir para o desenvolvimento de uma linha de pesquisa que visa elucidar mecanismos de proteção e de risco para a cronificação da dor pós-operatória, acrescenta-se conhecimento científico a uma lacuna na área de pesquisa básica em dor.

A padronização também auxiliou para aplicação do princípios dos 3 R's, *Reduction, Refinement e Replacement* (RUSSELL; BURCH, 1959), pois permitiu que com um reduzido número de animais fosse alcançado volume significativo de resultados, com intervalos adequados entre os experimentos. Garantiu também a utilização de técnicas precisas para a experimentação animal relacionada à dor e a capacitação adequada dos alunos antes da realização dos experimentos, que proporcionam um maior bem-estar do animal e redução do número de animais necessários.

Os protocolos de dor pós-operatória persistente desenvolvidos nesse trabalho tiveram como base o estudo de Brennan; Vandermeulen; Gebhart (1996), que por meio de uma incisão longitudinal de cerca de 1 centímetro na pele, fascía e músculo plantar da pata traseira de ratos estabeleceram um modelo de dor pós-incisional. Este processo gerou hipernocicepção mecânica por seis dias e pode contribuir para elucidação de mecanismos e tratamentos envolvendo a dor pós-operatória aguda.

Os modelos de sensibilização mecânica persistente induzida por mediadores inflamatórios e substâncias hiperalgésicas também influenciaram o desenho

experimental dos protocolos testados nesse trabalho. A administração de prostaglandina E₂ (PGE₂) por quatorze dias na dose de 100ng/50mL/pata leva a persistência do quadro hipernociceptivo, com redução do limiares nociceptivos por no mínimo 30 dias, efeito não observado com a administração da mesma substância e na mesma dose por um, três ou sete dias (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990; FUNEZ, 2008). A dopamina e isoprenalina administradas por duas semanas também apresentam efeitos semelhantes aos promovidos pela PGE₂ (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990).

Os modelos desenvolvidos nesse trabalho mesclaram os dois tipos de sensibilização descritos acima, incisional e inflamatória e obteve-se sucesso na instalação de um quadro de hipernocicepção mecânica persiste pós-incisional. Que teve início a partir do terceiro dia de tratamento e se manteve por 30 dias após o fim do mesmo.

Um notável dado observado a partir dos protocolos testados foi que o estímulo menos intenso (dose menor), contudo mais duradouro, do estímulo inflamatório é mais eficaz para indução da persistência do que uma dose maior por menos dias de administração. Como citado acima, outros modelos envolvendo estímulos inflamatórios como mediador para gerar uma sensibilização persistente contaram com um tratamento de 14 dias para serem eficazes, como no caso da PGE₂, dopamina e isoprenalina (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990; FUNEZ, 2008). Desta forma, esse achado pode indicar que a duração do estímulo/inflamação é mais relevante do que a intensidade para a indução da hipernocicepção persistente.

A dor pré-operatória é um fator de risco relevante para a persistência da dor pós-operatória em humanos, assim como o controle da dor após o procedimento cirurgico (CHAPMAN; VIERCK, 2017; KRAYCHETE et al., 2016). Os protocolos de indução da sensibilização persistente pós-incisional apresentados neste trabalho dispunham de uma condição dolorosa por seis ou três dias anteriores a incisão. Um dos protocolos também continha uma sensibilização após o procedimento cirurgico. Dessa forma, é possível mimetizar casos de existência prévia de processo inflamatório e conseqüentemente dor no tecido a ser operado e casos que não possuem um manejo adequado da dor pós-operatória ou ainda sua má resolução.

Como os protocolos testados que induziram a persistência da hipernocicepção demonstraram a fase de indução e manutenção de forma bem definida, eles podem ser utilizados para elucidação dos mecanismos envolvidos em cada uma dessas fases, assim como para avaliar o efeito da administração de fármacos nas diferentes etapas. Assim, poderão auxiliar em estudos que buscam elucidar os mecanismos envolvidos na indução dor crônica pós-operatória e, então, identificar possíveis alvos de atuação para prevenção.

As doses de carragenina entre os protocolos de dor pós-incisional persistente foram alteradas devido a investigação da hipernocicepção térmica. A dose de 200 µg foi adotada inicialmente com o objetivo de se trabalhar com o teste de Hargreaves para avaliação da sensibilização nociceptiva térmica, contudo os resultados indicaram sua ausência (dados não demonstrados e não publicados FUNEZ et al., 2018). Portanto, para os protocolos testados os animais não apresentaram hipernocicepção térmica. Em consideração ao bem-estar animal e o princípio dos 3 R's nos protocolos seguintes a dose de carragenina foi diminuída pela metade e investigado somente o limiar mecânico, tendo em vista que é possível estudar tal fenômeno com doses mais baixas de carragenina.

Em relação ao brusatol, diversos estudos já confirmaram a inibição de Nrf2 induzida por esse *quassinoide* tanto *in vitro* como *in vivo* (OLAYANJU et al., 2015; REN et al., 2011; XIANG et al., 2018). Esta molécula vem sendo estudada principalmente com relação à resistência à quimioterapia influenciada por Nrf2, reduzindo assim o crescimento tumoral, e sendo uma alternativa de adjuvante para sensibilização de células tumorais à quimioterapia (J.P. et al., 2017; REN et al., 2011).

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pela administração de carragenina em diferentes tecidos, como líquido peritoneal de camundongo e medula espinhal de ratos, já foi evidenciado anteriormente (BARTH et al., 2016; LAURO et al., 2016). Desta forma, a intensificação da sensibilização inflamatória gerada pelo brusatol sobre a carragenina, quando administrada em baixa dose, observada no presente estudo pode estar associada ao seu mecanismo de inibição da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante.

A relação entre o aumento do nível de ERO com o aumento da hiperalgesia também já foi avaliada. Lauro et al. (2016) estudaram a hiperalgesia térmica e o

estresse oxidativo gerados pela carragenina, avaliando o efeito de um tratamento prévio com Idebenona, um análogo sintético da coenzima Q10, associado à HP- β -cyclodextrinas. A carragenina aumentou significativamente a hiperalgesia térmica e os níveis de produção de Malondialdeído (MDA), e a Idebenona + HP- β -cyclodextrinas nas doses de 5 mg/Kg e 10 mg/Kg reduziu significativamente a hiperalgesia entre a 3^a de a 6^a hora após a sensibilização inflamatória, assim como a produção de MDA nesse mesmo período.

Na hiperalgesia causada pelo CFA (Complete Freund's Adjuvante) também foi demonstrada a participação de ERO, utilizando os testes de placa quente para sensibilização e 2',7' diacetato de diclorofluoresceína por citometria para análise de estresse oxidativo. Foi demonstrado que a hiperalgesia gerada pelo CFA coincidia com o aumento do estresse oxidativo e a utilização de uma substância com ação antioxidante, o resveratrol, o que levou à redução significativa dos dois parâmetros por até 48 horas (SINGH; VINAYAK, 2017).

Esses estudos reforçam a possibilidade de que o efeito observado para o brusatol sobre baixa dose de carragenina neste estudo decorre da elevação do estresse oxidativo devido à inibição de um dos principais mecanismos de seu controle, via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante. Apesar das diferentes doses do brusatol não apresentarem diferença significativa entre si, não podemos excluir a possibilidade das doses testadas ainda serem altas e por isso a diferença não ser evidenciada no teste comportamental.

Portanto, a investigação do efeito do brusatol sobre um dos protocolos de dor pós-incisional persistente padronizados nesse trabalho pode auxiliar no entendimento do papel da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante e do estresse oxidativo para a persistência de condições dolorosas.

As limitações desse trabalho consistem em não ter sido avaliado o efeito da administração da carragenina por seis dias, sem incisão. Este seria um dado importante tendo em vista que outros estudos já demonstraram que a manutenção de uma sensibilização com mediadores inflamatórios gera hipernocicepção persistente (FERREIRA; LORENZETTI; DE CAMPOS, 1990; FUNEZ, 2008). Acreditamos que não ocorrerá a persistência do quadro, pois, como mencionado anteriormente, estudos mostram que a administração por 7 dias de mediadores inflamatórios não é

capaz de induzi-la. No entanto, é um controle importante a ser realizado, pois assim, seria possível confirmar que a incisão teve um papel fundamental para a persistência desenvolvida em nossos modelos.

Já com relação ao brusatol, a realização de testes moleculares como PCR e Western blot para quantificação do Nrf2 e seu mRNA, assim como avaliar o nível de estresse oxidativo e marcadores inflamatórios, poderiam contribuir para nossa hipótese de que a hipernocicepção gerada pelo brusatol sobre a carragenina envolve o aumento de ERO e inibição da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante.

A ausência de laboratórios para o desenvolvimento da pesquisa no campus da Ceilândia, sendo necessário estabelecer parcerias intra e inter institucionais, sem garantia de instalação fixa, a inconstância no fornecimento de animais por diferentes instituições e atrasos para a liberação dos recursos por agências de fomento, foram algumas das dificuldades encontradas para a realização desse trabalho, mas que puderam ser superadas diante do suporte dos diversos profissionais envolvidos.

6 CONCLUSÃO

A padronização de modelo e testes comportamentais proposta por este trabalho foi alcançada e contribuirá para realização de estudos envolvendo hipernocicepção, não somente pós-operatória persistente, mas de diversas naturezas com resultados confiáveis, utilizando um número menor de animais e, conseqüentemente, em menor tempo e custo. Além disso, houve uma contribuição para a capacitação do aluno que teve a oportunidade de conhecer e colaborar para o desenvolvimento de uma linha de pesquisa.

Este estudo também permitiu a descrição de dois novos protocolos de dor pós-operatória persistente em patas de ratos gerada por meio de incisão e injeções de agente pró-inflamatório. A hipersensibilidade mecânica nos dois protocolos durou pelo menos 30 dias após o término do tratamento e pode ser utilizada como uma ferramenta para investigação dos mecanismos, prevenção e tratamento da dor crônica pós-operatória.

O brusatol apresentou efeito biológico ao aumentar a sensibilização inflamatória promovida pela carragenina, efeito que pode estar associado à inibição da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante e aumento dos níveis de ERO. Portanto, o brusatol pode ser um interessante fármaco para averiguação do papel da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante na persistência da dor pós-incisional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. M. U. et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 585–597, 2017.

BARTH, C. R. et al. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 964–970, 2016.

BRENNAN, T. J.; VANDERMEULEN, E. P.; GEBHART, G. F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 493–501, 1996.

CHAPMAN, C. R.; VIERCK, C. J. The Transition of Acute Postoperative Pain to Chronic Pain: An Integrative Overview of Research on Mechanisms. **Journal of Pain**, v. 18, n. 4, p. 359.e1-359.e38, 2017.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; DE CAMPOS, D. I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, v. 42, n. 3, p. 365–371, 1990.

FLATTERS, S. J. L. Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR). **Pain**, v. 135, n. 1–2, p. 119–130, 2008.

FUNEZ, M. I. Investigação dos mecanismos moleculares associados à indução da hipernocicepção persistente pela administração intraplantar de PGE2. 2008.

GATCHEL, R. et al. Interdisciplinary chronic pain management: international perspectives. **American Psychologist**, v. 69, n. 2, p. 119–30, 2014.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R. DE; BOCK, P. M. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (nrf2) no diabetes mellitus. **Clinical & Biomedical Research**, v. 37, n. 3, p. 203–213, 2017.

HASSLER, S. N.; JOHNSON, K. M.; HULSEBOSCH, C. E. Reactive oxygen species and lipid peroxidation inhibitors reduce mechanical sensitivity in a chronic neuropathic pain model of spinal cord injury in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 131, n. 4, p. 413–417, 2014.

HENSCHKE, N.; KAMPER, S. J.; MAHER, C. G. The epidemiology and economic consequences of pain. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 1, p. 139–147, 2015.

ITOH, K. et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. **Genes and Development**, v. 13, n. 1, p. 76–86, 1999.

J.P., E. et al. The Nrf2 inhibitor brusatol is a potent antitumour agent in an orthotopic mouse model of colorectal cancer. **Colorectal Disease**, v. 19, n. Supplement 4, p. 19, 2017.

KALLENBORN-GERHARDT, W. et al. NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, n. 3, p. 309–317, 2013.

KRAYCHETE, D. C. et al. Dor crônica persistente pós-operatória: o que sabemos sobre prevenção, fatores de risco e tratamento? **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 66, n. 5, p. 505–512, 2016.

KUNER, R.; FLOR, H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 20–30, 2016.

LAURO, F. et al. Pharmacological effect of a new idebenone formulation in a model of carrageenan-induced inflammatory pain. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 763–767, 2016.

LU, M. et al. The Keap1 – Nrf2 – ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target : An Update. **Medicinal Research Reviews**, v. 00, n. 0, p. 1–40, 2016.

MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 401–426, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018. Procedimentos Hospitalares Do SUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>. Acesso em: 15/04/2018.

MITTAL, MANISH; SIDDIQUI, MOHAMMAD RIZWAN; TRAN, KHIEM; REDDY, SEKHAR P.; MALIK, A. B. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury Manish. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 2014.

MORGAN, M. J.; LIU, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 103–115, 2011.

NEGI, G.; KUMAR, A.; S. SHARMA, S. Nrf2 and NF-κB Modulation by Sulforaphane Counteracts Multiple Manifestations of Diabetic Neuropathy in Rats and High Glucose-Induced Changes. **Current Neurovascular Research**, v. 8, n. 4, p. 294–304, 2011.

OLAYANJU, A. et al. Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity - Implications for therapeutic targeting of Nrf2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 78, p. 202–212, 2015.

POGATZKI, E. M.; NIEMEIER, J. S.; BRENNAN, T. J. Persistent secondary hyperalgesia after gastrocnemius incision in the rat. **European Journal of Pain**, v. 6, n. 4, p. 295–305, 2002.

REN, D. et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1433–1438, 2011.

ROSA, A. O. et al. Nrf2-mediated haeme oxygenase-1 up-regulation induced by cobalt protoporphyrin has antinociceptive effects against inflammatory pain in the formalin test in mice. **Pain**, v. 137, n. 2, p. 332–339, 2008.

RUSSELL, W. M.S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen, 1959.

SBED, Sociedade Brasileira Para Estudo da Dor. O mapa da dor crônica no Brasil. 2017. Disponível em: <http://www.sbed.org.br/lermais_materias.php?cd_materias=807&friurl=-O- mapa-da-dor-cronica-no-Brasil->. Acesso em: 16 abr. 2018.

SINGH, A. K.; VINAYAK, M. Resveratrol alleviates inflammatory hyperalgesia by modulation of reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes and ERK activation. **Inflammation Research**, v. 66, n. 10, p. 911–921, 2017.

STEYAERT, A.; LAVAND'HOMME, P. Prevention and Treatment of Chronic Postsurgical Pain: A Narrative Review. **Drugs**, v. 78, n. 3, p. 339–354, 2018.

VINCENT, A. M. et al. Diabetic neuropathy: Cellular mechanisms as therapeutic targets. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 10, p. 573–583, 2011.

VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 391–399, 2004.

WERNER, M. U.; KONGSGAARD, U. E. Defining persistent post-surgical pain: Is an update required? **British Journal of Anaesthesia**, v. 113, n. 1, p. 1–4, 2014.

XIANG, Y. et al. Brusatol Enhances the Chemotherapy Efficacy of Gemcitabine in Pancreatic Cancer via the Nrf2 Signalling Pathway. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 2360427, 2018.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. **Anesthesiology**, 1999.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109–110, 1983.

ANEXOS

Anexo A - Declaração de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA).


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 14 de junho de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"ESTUDO DOS MECANISMOS DE CRONIFICAÇÃO DA DOR PÓS-INCISIONAL: PAPEL DA VIA KEAP/NRF2."** Protocolo n.º 53/2018, sob responsabilidade da Professora Mani Indiana Funez foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (170 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 29/06/2018 a 29/06/2020.




Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.