



**Universidade de Brasília – UnB**

**Faculdade de Ceilândia – FCE**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde – PPGCTS**

Thayná Moreira Gomes Marra

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE DOR CRÔNICA PÓS-  
OPERATÓRIA**

Brasília

2019

Thayná Moreira Gomes Marra

## **DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE DOR CRÔNICA PÓS-OPERATÓRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologias da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Área de Concentração: Promoção, prevenção e intervenção em saúde.

Linha de pesquisa: Estratégias Interdisciplinares em Promoção, Prevenção e Intervenção em Saúde.

Orientador (a): Mani Indiana Funez

Brasília

2019

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

MM838d MOREIRA GOMES MARRA, THAYNA  
DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE DOR CRÔNICA PÓS  
OPERATÓRIA / THAYNA MOREIRA GOMES MARRA; orientador MANI  
INDIANA FUNEZ. -- Brasília, 2019.  
62 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências e  
Tecnologias em Saúde) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. SENSIBILIZAÇÃO NOCICEPTIVA. 2. DOR PÓS OPERATÓRIA. 3.  
KEAP1. 4. NRF2. 5. INCISÃO. I. FUNEZ, MANI INDIANA, orient.  
II. Título.

THAYNÁ MOREIRA GOMES MARRA

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE DOR CRÔNICA PÓS-OPERATÓRIA**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília - Faculdade de Ceilândia. Área de Concentração: Promoção, prevenção e intervenção em saúde

Data da aprovação: Brasília, 09 de Maio de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup> Mani Indiana Funez - Presidente

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

---

Prof.<sup>a</sup> Djane Braz Duarte – Membro efetivo

(Universidade de Brasília – Faculdade de Ciências da saúde – UnB)

---

Prof.<sup>a</sup> Kelb Bousquet Santos – Membro efetivo

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

---

Prof.<sup>a</sup> Claire Naim Lunard Gomes – Membro suplente

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

BRASÍLIA

2019

**AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, sem o qual não teria sido possível a realização deste projeto de pesquisa.

Agradeço à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mani Indiana Funez pelas críticas construtivas e conselhos que foram fundamentais durante todo o período em que trabalhamos juntas. Ao nosso grupo de pesquisa, composto pela Adriele, Mirele, Mariane. Em especial a Adriele, minha parceira de experimentos que hoje chamo por amiga.

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.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Djane Braz Duarte, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelb Bousquet Santos e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Claire Naim Lunard Gomes, por aceitarem participar da banca examinadora.

Agradeço imensamente a Ele. DEUS, agradeço sua imensa bondade e amor por mim e minha família.

Consciente de que é impossível listar todos que de alguma forma me acrescentaram durante essa jornada, agradeço, com todo meu amor, aos meus amados pais, Daniel Gomes e Eulina Gomes, aos quais eu devo tudo o que sou, a minha melhor, eterna, e única amiga, minha irmã Daniela Gomes, ao meu grande amor e parceiro de tudo, meu esposo Igor Vinícius, ao nosso querido dogfilho Fio, minha dogfilha Maria Flor, e ao nosso bebê, nosso novo grande amor.

Agradeço a minha segunda família, composta pelos meus sogros, Osmar Marra e Vera Marra, meus cunhados, Kauan Marra e Thana Lara Marra. Agradeço o carinho no qual vocês me tratam.

Agradeço ao meu amigo Henrique, que sempre me apoia, critica, elogia, que sempre é meu amigo.

## SUMÁRIO

RELAÇÃO FIGURAS .....	VII
RELAÇÃO DE TABELAS .....	VIII
RELAÇÃO DE ANEXOS .....	VIII
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SIMBOLOS.....	VIII
RESUMO.....	XI
OBJETIVOS .....	20
Objetivo Geral .....	20
Objetivos Específicos.....	20
METODOLOGIA.....	20
Aspectos Éticos e Animais.....	20
Fármacos e Tratamentos Farmacológicos.....	22
Sensibilização inflamatória com Carragenina .....	23
Definição do protocolo de anestesia .....	24
Sensibilização Pós-incisional aguda .....	24
Sensibilização Pós-incisional Persistente .....	25
Curva dose-resposta da Apigenina sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina e avaliação desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente .....	26
Curva dose-resposta do Brusatol sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina e avaliação desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente .....	27
Análise Estatística.....	28
RESULTADOS.....	28
Padronização do teste comportamental nociceptivo mecânico.....	28

Sensibilização inflamatória aguda induzida por Carragenina.....	29
Definição do protocolo de anestesia .....	30
Modelo de dor pós-incisional aguda.....	32
Modelo de dor pós-incisional persistente .....	35
Curva dose-resposta da Apigenina sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina .....	38
Curva dose-resposta do Brusatol sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina .....	39
Efeito de um indutor e de um inibidor da via Keap1/Nrf2/ARE no processo de desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente .....	41
DISCUSSÃO .....	46
CONCLUSÕES .....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53
ANEXOS .....	61

## RELAÇÃO FIGURAS

Figura 1 - Esquema da via de sinalização Keap/Nrf2/ARE _____	16
Figura 2 - Etapas do processo do 1º protocolo de persistência da dor pós-incisional _____	25
Figura 3 - Etapas do processo do 2º protocolo de persistência da dor pós-incisional _____	26
Figura 4 – Limiar nociceptivo mecânico basal de animais naive. Painel A: Limiar nociceptivo mecânico basal individual _____	29
Figura 5- Curva dose-resposta da Carragenina _____	30
Figura 6 - Mesa cirúrgica com primeiro protocolo de anestesia _____	31
Figura 7 - Mesa cirúrgica _____	32
Figura 8 - Procedimento cirúrgico _____	33
Figura 9 - Intensidade de hipernocicepção mecânica aguda em resposta a incisão no músculo plantar _____	34
Figura 10 - Intensidade de hipernocicepção térmica em resposta a incisão no músculo plantar _____	34
Figura 11 - Esquema do 1º protocolo de sensibilização pós-incisional persistente _	36
Figura 12 - Intensidade de hipernocicepção mecânica em resposta ao tratamento com Carragenina 200 µg/pata/100µL e Salina e incisão no músculo plantar _____	36
Figura 13 - Esquema do 2º protocolo de sensibilização pós-incisional persistente. t=tempo. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019. _____	37
Figura 14 - Sensibilização pós-incisional persistente induzida por Carragenina. ____	37
Figura 15 - Curva dose-resposta da Apigenina na presença de Carragenina 200 µg/pata/100 µL _____	39
Figura 16 - Curva dose-resposta do Brusatol _____	40
Figura 17 - Esquema do 1º protocolo de sensibilização pós-incisional persistente na presença da Apigenina. _____	41
Figura 18- Atuação da Apigenina administrada por 3 dias consecutivos _____	42
Figura 19 - Esquema do 2º protocolo de sensibilização pós-incisional persistente na presença do Brusatol _____	43
Figura 20 - Sensibilização pós-incisional persistente induzida por Brusatol _____	45



## RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos e Tratamentos Farmacológicos _____	22
--	----

## RELAÇÃO DE ANEXOS

ANEXO A - Declaração de aprovação da Comissão de ética _____	61
ANEXO B - Declaração de aprovação da Comissão de ética complementar _____	62

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU SIMBOLOS

3 R's	Reduction, Refinement e Replacement
µg	Microgramas
µL	Microlitros
ANOVA	Análise de Variância
APG	Apigenina
APS	American Pain Society
ARE	Antioxidant Response Element
BPA	Bisphenol A
cm	Centímetro
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
Cg	Carragenina
cPLA2	Cytosolic phospholipase A2
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DC	Dor crônica
DCPO	Dor crônica pós-operatória
Dil	Diluyente
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro Padrão da Média
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERK2	Extracellular signal-regulated kinase 2
FM	Faculdade de Medicina
g	Grama
IASP	International Association for Study of Pain
IESB	Educação superior de Brasília
iNOS	Induciblenitric oxide synthase
ip	Intraperitoneal
ipl	Intraplantar
IR	Intensidade do raio
KEAP1	Kelch Like ECH Associated Protein 1
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
mm	Milímetro
mL	Mililitro

mg	Miligramas
NO	Óxido Nítrico
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinases
SBED	Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor
SUS	Sistema Único de Saúde
UI	Unidades internacionais
UnB	Universidade de Brasília

## DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE DOR CRÔNICA PÓS-OPERATÓRIA

### RESUMO

**Introdução:** A dor crônica pós-operatória constitui um grave problema de saúde. Apesar de estudos e pesquisas terem sido desenvolvidos a respeito dos possíveis mecanismos da evolução da dor aguda pós-operatória para dor crônica, ainda não existem dados consistentes sobre sua prevenção e nem o completo entendimento dos mecanismos envolvidos na persistência do quadro doloroso. **Objetivos:** Esse estudo teve como objetivo desenvolver modelo de sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente e iniciar a investigação do papel da via de sinalização Keap1/Nrf2/ARE neste processo. **Metodologia:** Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, pesando entre 100-300 gramas. Esses foram tratados com agente pró-inflamatório Carragenina previamente ao procedimento cirúrgico nas patas traseiras. O limiar mecânico das patas traseiras dos animais foi avaliado utilizando-se um Analgesímetro Digital (Insight – Brasil). Para o desenvolvimento da sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente foi realizada uma adaptação do método descrito por Brennan *et al.*, (1996). Para estudo da via Keap1/Nrf2/ARE no processo de desenvolvimento da sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente foi utilizado o ativador da via Apigenina, e o inibidor da via Brusatol. **Resultados:** A sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente foi desenvolvida administrando-se Carragenina 100 µg/pata/100µL por seis dias consecutivos. No sétimo dia foi realizada a incisão cirúrgica. A intensidade de hipernocicepção permaneceu alterada por 30 dias, demonstrando que os animais que receberam esse tratamento apresentaram sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente. A Apigenina reduziu a hipernocicepção aguda, porém nos protocolos de cronificação os dados são inconclusivos. Por outro lado, o Brusatol foi capaz de induzir a sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente. **Conclusões:** Foi desenvolvido o modelo de dor crônica pós-operatória. A via Keap1/Nrf2/ARE se mostrou promissora para seguir os estudos investigando os mecanismos envolvidos na indução e possível prevenção da dor crônica pós-operatória.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sensibilização nociceptiva; Keap1; Nrf2; dor pós operatória; Incisão.

## **DEVELOPMENT OF POSTOPERATIVE CHRONIC PAIN MODEL**

### **ABSTRACT**

**Introduction:** Chronic postoperative pain is a serious health problem. Although studies and research have been developed regarding the possible mechanisms of the evolution of acute postoperative pain for chronic pain, there are still no consistent data on its prevention or complete understanding of the mechanisms involved in persistent pain. **Objectives:** This study aimed to develop a model of postoperative chronic pain in technical terms, persistent post-incisional nociceptive sensitization, and to initiate the investigation of the Keap1 / Nrf2 signalling pathway / antioxidant response elements in this process. **Method:** Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing between 100-300 grams were used. These were treated with pro-inflammatory agent Carrageenan prior to the surgical procedure on the hind paws. The mechanical threshold of the hind paws of the animals was evaluated using a Digital Analgesimeter (Insight - Brazil). For the development of persistent post-incisional nociceptive sensitization, an adaptation of the method described by Brennan *et al.* 1996. For the study of the Keap1 / Nrf2 pathway / antioxidant response elements in the process of development of persistent postoperative mechanical sensitization, the activator of the Apigenin pathway and the Brusatol pathway inhibitor were used. **Results:** Persistent post-incisional nociceptive sensitization was developed by administering Carragenine 100 µg / paw / 100 µL for six consecutive days. On the seventh day, a surgical incision was performed. The intensity of hyper nociception remained altered for 30 days, demonstrating that the animals that received this treatment had persistent post-incisional nociceptive sensitization. There was no persistent sensitization in the use of Apigenin. In contrast, there was persistent post-incisional nociceptive sensitization in the use of Brusatol. **Conclusions:** The postoperative chronic pain model was developed. The pathway was promising for the prevention of chronic pain management and further studies should be developed to investigate the mechanisms involved.

**KEY WORDS:** Nociceptive sensitization; Keap1; Nrf2; postoperative pain; Incision.



## INTRODUÇÃO

A dor é o sintoma físico costumeiramente mais apresentando na área da saúde. Este fato pode ser justificado pelo direcionamento das patologias a esse sintoma (1). A definição desse sintoma leva em consideração outros fatores, e por isso, segundo a *International Association for Study of Pain* (IASP, Associação Internacional Para Estudos da Dor, em tradução literal) a dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial dos tecidos, descrita em termos de tais lesões” (2). É uma experiência única e particular que envolve aspectos sensitivos e culturais, podendo ser alterada pelos cambiantes socioculturais e psíquicos do indivíduo e do meio (3). Essa definição enfatiza que a dor é uma experiência complexa que inclui múltiplas dimensões.

Ela já foi definida por conta de seu tempo de duração, e segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), a dor pode ser classificada em três tipos. São eles (4):

Dor aguda - Aquela que se manifesta transitoriamente durante um período relativamente curto, de minutos a algumas semanas, associada a lesões em tecidos ou órgãos, ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas. Normalmente desaparece quando a causa é corretamente diagnosticada e quando o tratamento recomendado pelo especialista é seguido corretamente pelo paciente.

Dor crônica - Tem duração prolongada, que pode se estender de vários meses a vários anos e que está quase sempre associada a um processo de doença crônica. A dor crônica pode também ser consequência de uma lesão já previamente tratada. Exemplos: Dor ocasionada pela artrite reumatoide (inflamação das articulações), dor do paciente com câncer, dor relacionada a esforços repetitivos durante o trabalho, dor nas costas e outras.

Dor recorrente - Apresenta períodos de curta duração que, no entanto, se repetem com frequência, podendo ocorrer durante toda a vida do indivíduo, mesmo sem estar associada a um processo específico. Um exemplo clássico deste tipo de dor é a enxaqueca.

Ressaltando o papel significativo da dor no estado fisiológico de um indivíduo, em 1996, a *American Pain Society* (APS) introduziu o conceito de dor como o quinto sinal vital (5).

A inflamação é uma resposta homeostática de tecidos vascularizados para remover agentes nocivos e restaurar suas funções normais (6). Porém, em alguns estados inflamatórios, a mediação desse processo pode ser alterada e assim, provocar dor. Uma das características dos estados inflamatórios é que os estímulos normalmente inócuos produzem dor, mecanismo conhecido por alodinia. Complementando esse conceito, o aumento da sensibilidade à dor causada por um estímulo que normalmente provoca dor, é definido como hiperalgesia (7).

A dor associada a lesões no tecido melhora quando a inflamação se resolve. Uma resposta inflamatória típica consiste em quatro componentes: indutores inflamatórios, os “sensores” que os detectam, os mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores e os tecidos-alvo afetados pelos mediadores inflamatórios (8). Fisiologicamente, a inflamação aguda é um importante processo de defesa do organismo (9). Há casos, no entanto, onde o estado inflamatório pode ser resolvido, mas um componente da dor persiste (10,11). Ademais, a inflamação aguda com resolução ineficaz também pode contribuir para a persistência do quadro doloroso (10,11), e por isso, intervenções realizadas antes/durante a inflamação podem auxiliar a prevenção e resolução dos quadros crônicos.

Um dos maiores desafios para a terapêutica analgésica é o controle eficaz de dores crônicas (DC) (1,12). Muitos esforços têm sido realizados para entender os mecanismos envolvidos na sua manutenção, e com isso, o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, pois além da dor representar um carga considerável para o paciente e para sociedade em geral, é o sintoma mais frequente e muitas vezes a principal queixa relacionada à saúde dos indivíduos (1,13). Logo, é inegável a importância de estudos que focalizem na busca por maior eficácia no controle da dor crônica, especialmente se considerarmos a estimativa de cerca de 37% da população brasileira sofrer tal condição (4).

As dores crônicas, durante sua fase de manutenção, não necessariamente são acompanhadas de causa aparente ou visível. De qualquer modo, para entender o desenvolvimento da maioria delas é preciso considerar que “toda dor crônica foi dor aguda em algum estágio” (14). A dor crônica pós-operatória (DCPO) exemplifica muito bem essa situação. No momento que o procedimento cirúrgico é realizado, a dor se apresenta como dor aguda. Apesar do procedimento ser bem controlado, ele causará



uma lesão tecidual com conseqüente inflamação e dor. Portanto, por mais que a evolução natural seja a remissão, há casos onde esse quadro persiste, modificando o caráter da dor, que pode vir a cronificar (15,16).

A cirurgia é reconhecida como uma das mais frequentes causas de dor crônica, como demonstrado por Crombie *et al.*, (1998) (17). Esses autores avaliaram 5.130 pacientes e mostraram que 22,5% deles (1154) desenvolveram dor crônica após procedimentos cirúrgicos. No Brasil, somente no período compreendido entre novembro de 2017 até novembro de 2018, foram realizados 681.681 procedimentos cirúrgicos financiados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (18). Esses inúmeros procedimentos cirúrgicos, a depender de variados fatores, podem estender o quadro de dor aguda até a sua cronificação. Dentre os fatores de risco para cronificação da dor pós-operatória estão incluídos, desde vulnerabilidade psicológica, até predisposição genética (19). No entanto, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos não estão totalmente elucidados e há fatores de risco que são inevitáveis, como a injúria tecidual.

Algumas moléculas têm se demonstrado com um importante papel no processamento da dor crônica, inflamatória e neuropática, a nível central e periférico. Dentre elas, estão as espécies reativas de oxigênio (ERO), geradas em consequência ao estresse oxidativo (EO) (20).

As ERO são produzidas no corpo em condições basais a partir do metabolismo interno e da exposição externa. Os oxidantes formados em resposta aos estímulos fisiológicos atuam como importantes moléculas sinalizadoras para regular processos inflamatórios (21). A produção descontrolada deles resulta em estresse oxidativo que prejudica as funções celulares e contribui para o desenvolvimento de várias doenças (22).

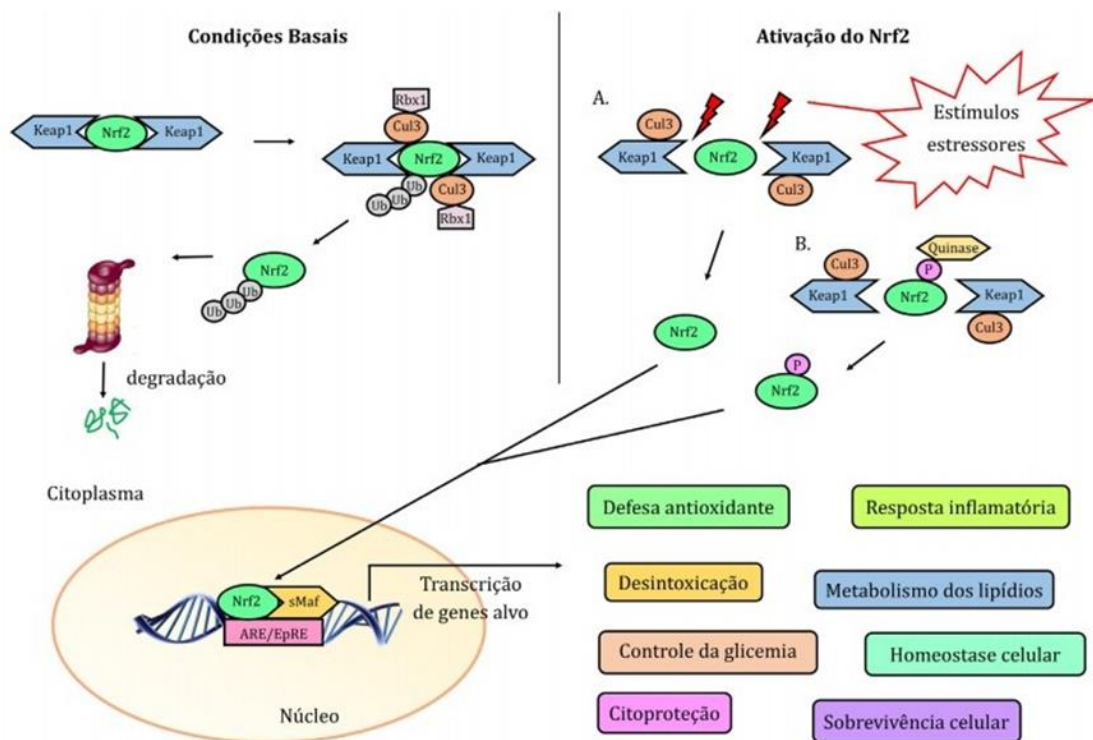
Dentre os diversos mecanismos de resposta ao EO do organismo, destaca-se a sinalização Keap1/Nrf2/ARE (*Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) - nuclear fator erythroid 2-related factor 2 - Nrf2 - Antioxidant Response Element (ARE)*) (23).

O fator nuclear (*erythroid-derived2)-like 2 (Nrf2)* é um fator de transcrição que desempenha papel central na defesa celular contra insultos oxidativos e

eletrofílicos. Em condições normais, Nrf2 é reprimido pela proteína derivada de células eritroides tipo Kelch, com proteína 1 associada à ECH 1 (Keap1) (24,25) que é uma proteína adaptadora para a degradação de Nrf2 (Fig. 1).

Durante o estresse oxidativo, incluindo a inflamação, o Nrf2 é ativado via dissociação com Keap1, o que ativa a transcrição de genes citoprotetores. O Nrf2 também é ativado pela fosforilação independente da via Keap1 em alguns tumores (26). Uma vez ativado, o Nrf2 é translocado para o núcleo e transativa seus genes-alvo (27).

Foi demonstrado também que a via de sinalização Nrf2/Keap1 contrabalança o estresse oxidativo hepático induzido por Bisfenol A (BPA) em camundongos machos (28), e também que possui efeitos hepatoprotetores (29). Em camundongos nocaute de Nrf2, a susceptibilidade às patologias oxidativas é aumentada (22).



**Figura 1 - Esquema da via de sinalização Keap/Nrf2/ARE.** À esquerda é representado o Nrf2 associado a duas moléculas de Keap1 e seus possíveis caminhos após sua dissociação em condições basais. À direita, sua dissociação frente a estressores, até o início do processo de transcrição. Fonte: Hahn; Oliveira; Bock (2017).

A via também parece aumentar a sobrevivência funcional de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo transplantadas em miocárdio infartado (30), inibir a fibrose pulmonar em ratos (31), prevenir a inflamação e o estresse oxidativo (32), reduzir a hipertrofia cardíaca (33), além de ser um importante mecanismo de defesa contra diabetes, doenças neuroinflamatórias, doenças neurodegenerativas e câncer, neste último caso com ressalva, já que a acumulação de Nrf2 nas células cancerígenas estimula o seu crescimento e protege-as contra o estresse oxidativo causando resistência a quimioterápicos (34).

Este sistema de sinalização parece reduzir a intensidade da inflamação aguda e tem potencial para impedir a transformação das condições patológicas agudas em doenças crônicas (35).

Dessarte, esta via pode ser um alvo atrativo para a prevenção e tratamento de doenças e condições relacionadas com o estresse oxidativo, incluindo o câncer, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, metabólicas e doenças inflamatórias (36). Esta via de resposta ainda é pouco explorada no estudo da dor, no entanto, existem dados demonstrando que indutores da sinalização podem apresentar efeito analgésico em camundongos (37). Além disso, existe um amplo campo de pesquisa ainda inexplorado que relacione o estudo de alterações que levam condições inflamatórias e/ou dolorosas agudas à persistência ou cronicidade.

Dentre as substâncias capazes de modular os níveis de Nrf2 está o Brusatol, um quassinóide de ocorrência natural extraído das partes aéreas da planta *Brucea javanica*, que demonstrou inibir o Nrf2 (38). Quassinóide é uma classe de substâncias encontradas quase que exclusivamente em plantas da família Simaroubaceae e, quimicamente são consideradas triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação, apresentando uma ampla faixa de atividade biológica (39).

O Brusatol induz a diminuição rápida e transitória de Nrf2 através de um mecanismo pós-transcricional que é independente de Keap1. A depleção de Nrf2 é dependente de concentração, e seus níveis basais são restaurados dentro de 12 horas da exposição inicial ao composto (38). Esse composto demonstra atividade inibitória sobre o aumento de espécies reativas de oxigênio (40). Ele é relatado como inibidor da via Nrf2/Keap1/ARE, pois reduz seletivamente o nível de proteína de Nrf2

através da ubiquitinação e degradação aumentada de Nrf2. Conseqüentemente, a expressão de genes de Nrf2 é reduzida e a resposta protetora dependente de Nrf2 é suprimida (41). O Brusatol também provoca o acúmulo de ERO em células humanas de câncer pancreático (42).

Além do Brusatol, outra substância que demonstrou modular a via Keap1/Nrf2/ARE é a Apigenina. A Apigenina (4',5,7-trihydroxyflavone, APG), é um bioflavonoide natural amplamente presente em muitas frutas e vegetais. Tem múltiplos efeitos bioativos e neuroprotetores, e exibe atividade anti-inflamatória (43). A Apigenina ativa a sinalização de Nrf2, e como consequência, vias de resposta ao estresse celular adaptativo, o que restaura a homeostase e inibe a citotoxicidade (44). Esse mecanismo parece reduzir a intensidade da inflamação aguda e impede a transformação das condições patológicas agudas em doenças crônicas (45,46). Ela apresenta atividade anti-inflamatória potente no edema de pata de ratos induzido por Carragenina (Cg) e hipersensibilidade de tipo retardada no camundongo (43). De modo geral, os estudos mostram que a Apigenina inibe a ligação de Keap1 e Nrf2, e portanto, impede a degradação de Nrf2 (47–49).

Um estudo realizado em 2016 mostrou que Apigenina ativa significativamente o sistema *Phosphoinositide 3-kinases* (PI3K) / Nrf2 / ARE, e essa ativação pode ser responsável por seus efeitos anti-inflamatórios. Além disso, esse mesmo estudo demonstrou que mediadores inflamatórios importantes como sintase do óxido nítrico induzível (*Inducible nitric oxide synthase* - Inos) e Fosfolipase A2 citosólica (*Cytosolic phospholipase A2* -cPLA2) foram suprimidos com utilização de Apigenina (50). Além disso, ela exerce propriedades antioxidantes potentes dependentes da ativação da sinalização de Nrf2 (51), e inibe o estresse oxidativo através das vias de sinalização *Extracellular signal-regulated kinase 2* (ERK2) / Nrf2 / ARE em hepatócitos primários de ratos (48).

Desse modo, dados da literatura apontam para as substâncias Brusatol e Apigenina como interessantes para estudar mecanismos da via Keap1/Nrf2/ARE, e sua influência no controle de dores crônicas. Por conseguinte, estudar o papel da via Keap1/Nrf2/ARE no desenvolvimento da dor crônica pós-operatória pode ser útil para o esclarecimento de mecanismos envolvidos na dor e sua cronificação. Além de

possibilitar estratégias para prevenção e tratamento, traz conhecimentos importantes poucos explorados para a comunidade científica.

Os estudos sobre dor crônica, em sua maioria, focam o tratamento desse sintoma. Poucos estudos, porém, abordam a prevenção dele. Por isso, estudos que focalizem ferramentas e mecanismos anteriores à cronificação da dor são muito importantes para a sociedade e para ciência.

Dada a importância desse tema, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain-IASP*) elegeu o ano de 2017 como o ano de luta contra a dor pós-operatória (52).

A proposta deste trabalho foi desenvolver um modelo de persistência da dor pós-incisional em patas de ratos, associado à inflamação prévia com auxílio de uma substância pró-inflamatória. Desse modo, será possível o estudo dos mecanismos envolvidos no processo de cronificação. Reforçando a proposta, vários trabalhos demonstram o papel da inflamação no processo de persistência da dor, e portanto, estudar esse mecanismo é plausível (53–56).

Para atender as necessidades do estudo foi utilizada uma substância classicamente associada à inflamação, Carragenina, administrada em regime diário anteriormente à incisão cirúrgica. Foram avaliados os limiares nociceptivos mecânicos das patas dos animais para verificar a existência, intensidade e a duração da sensibilização dolorosa. A mensuração dos limiares de retirada mecânica tem sido frequentemente utilizada. Com esse teste, podemos observar a intensidade de hipernocicepção.

Nossa hipótese é de que o estímulo inflamatório anterior a incisão cirúrgica facilita a persistência do quadro doloroso, além disso, a ativação da via Keap1/Nrf2/ARE pode ter papel protetor nestes quadros.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

1. Desenvolver modelo experimental de sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente em patas de ratos e investigar o papel da via de sinalização Keap1/Nrf2/ARE no processo de desenvolvimento da sensibilização mecânica.

### Objetivos Específicos

- 1.1. Padronizar teste nociceptivo mecânico e método de indução de sensibilização nociceptiva aguda pós-operatória em patas de ratos;
- 1.2. Avaliar o efeito do agente pró-inflamatório Carragenina sobre a resposta de sensibilização aguda, antes e após a incisão;
- 1.3. Estabelecer a melhor resposta de persistência da sensibilização nociceptiva como protocolo para seguir o estudo;
- 1.4. Avaliar o efeito de um indutor e de um inibidor da via keap1/Nrf2/ARE no processo de desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente.

## METODOLOGIA

Este trabalho foi escrito seguindo as diretrizes Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) (57).

Todos os experimentos foram realizados a luz do princípio 3R's (*Reduction, Refinement e Replacement*), utilizando um menor número de animais, no menor tempo, e como consequência, com o menor custo possível.

### Aspectos Éticos e Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com idade a partir de 3 meses e peso entre 100-300 gramas, obtidos no biotério do Instituto de Educação Superior de Brasília (IESB), e no biotério do Centro Universitário de Anápolis - UniEvangélica. Os animais foram mantidos em sala com temperatura e luminosidade controladas e acesso à água e comida *ad libitum*, durante todo o período

experimental, no biotério da Faculdade de medicina (FM) na Universidade de Brasília (UnB). Os experimentos foram realizados no período das 08h às 17h. Os protocolos para uso de animais em experimentação foram seguidos de acordo com as “Normas Éticas para Investigações Envolvendo Dor Experimental em Animais Acordados” (58), com a “Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos”(59) e com as “Diretrizes da Prática de Eutanásia” do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (60). A realização dos experimentos aqui citados foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da UnB (UnBDoc nº 10100/2014 e nº 10100/2014).

A unidade experimental utilizada pelo grupo para definição dos grupos foi “pata” ao invés de “animal”, já que, nos experimentos realizados utilizamos apenas uma pata, e após o período necessário para repouso do animal, de geralmente 1 semana, utilizamos a pata contralateral sempre que necessário (por exemplo para aumentar o número amostral e melhorar a qualidade dos dados). Destarte, nos animais utilizados no protocolo de sensibilização nociceptiva persistente utilizou-se somente uma pata, e ao final do experimento estes animais foram submetidos à eutanásia.

### **Vias de administração**

Para a realização deste estudo as drogas foram administradas por via local intraplantar-subcutânea (ipl) ou intramuscular (im). Também, as drogas anestésicas foram administradas por via inalatória (vi), e intraperitoneal (ip) no primeiro momento.

Nos experimentos onde houve a administração da substância inflamatória, a administração das diferentes doses ocorreu no momento  $T_0$  e após 3 horas da administração foi realizado o teste mecânico e/ou térmico, que é o tempo onde a inflamação atinge seu pico máximo na presença da substância inflamatória utilizada (61).

Do mesmo modo, nos experimentos onde houve a administração do inibidor ou ativador da via, estes foram administrados 1 hora antes da administração da substância inflamatória.

## Fármacos e Tratamentos Farmacológicos

**Tabela 1** - Fármacos e Tratamentos Farmacológicos. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019

Nome / Procedência	Dose / Via / Volume	Diluentes	Tempo	Comentários
Carragenina, Sigma, EUA	25, 50, 100, 200 µg / pata / 100µL ipl	NaCl 0,9%	3º hora	Diluído imediatamente antes da administração
Apigenina, Sigma, EUA	1, 3, 10, 30 e 100 µg / pata / 100µL / ipl	Solução estoque [5mg/mL] em DMSO; Diluição em NaCl 0,9%, solução final DMSO < 10%	1º hora	Diluído imediatamente antes da administração
Brusatol, Sigma, EUA	30,100 µg / pata / 100 µL / ipl	Solução estoque [5mg/mL] em DMSO; Diluição em NaCl 0,9%, solução final DMSO < 10%	1º hora	Diluído imediatamente antes da administração
Dipirona, Sigma, EUA	160 µg ipl 50 µL	Diluição em NaCl 0,9%	8 horas	Diluído imediatamente antes da administração
Isoflurano (Isoforine®), Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda.	3-4% indução 1-2% manutenção Via Inalatória	Diluição em NaCl 0,9%	Recuper. Rápida após o término do fornec.	Mantém as funções cardiovasc. Melhor que outros agentes inalatórios (62).
Cetamina + Xilazina+ Acepromazina	40 mg / kg (C) + 2,5 mg / kg (X) + 0,75 mg / kg (A)	-	25 minutos de anestesia.	-
DMSO (dimetilsulfóxido) Sigma, EUA	-	-	-	Utilizado como diluente
Terramicina / LA Pfizer	0,2 ml / kg	-	12 horas	-

Fonte consultada: Kohn DF. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Academic Press; 1997. 426 p.

### Padronização do teste comportamental

Foi padronizado o teste comportamental para avaliação do limiar nociceptivo mecânico dos animais. Nele, os animais foram acondicionados em caixas de acrílico, e não foram manipulados até que o experimento finalizasse, com total liberdade de movimento. O teste consistiu em expor as patas traseiras dos animais à fonte de



força, de intensidade conhecida, para avaliação do limiar nociceptivo mecânico. O limiar mecânico foi analisado utilizando-se o Teste de Von Frey eletrônico (Insigth Brasil). Durante a realização do teste mecânico, foi mensurada a força em gramas (g) necessária para que o animal retirasse a pata do estímulo provocado por um aparato não pontiagudo (63). Em uma sala silenciosa, os ratos foram colocados em gaiolas de acrílico (12×10×17 cm) com piso de grade, por pelo menos 10 minutos antes do início do teste. O teste consistiu em evocar um reflexo de flexão da pata traseira com um transdutor de força manual adaptado com uma ponta de plástico. A pressão na pata era interrompida quando o animal exibisse um quadro característico interpretado como reação de nocicepção (retirada da pata). Após a retirada da pata, a intensidade da pressão foi automaticamente registrada, e o valor final da resposta foi obtido pela média de três medidas. Neste teste, quanto menor a força, menor é o limiar doloroso.

Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo experimentador, e sempre que possível, confirmadas por um segundo experimentador, ambos ignorando o tratamento recebido pelo grupo de animais.

### **Sensibilização inflamatória com Carragenina**

A sensibilização inflamatória com Carragenina foi padronizada a partir das doses de 25, 50, 100 e 200 µg/pata/100µL, selecionadas a partir da experiência prévia do experimentador (61). A Carragenina foi solubilizada em solução salina 0,9%, e administrada com o auxílio de uma seringa de 1ml com agulha (13 x 0,45 mm). Foram utilizadas 25 patas distribuídas por aleatorização entre os grupos. A administração do fármaco foi feita por via intraplantar e as medidas dos limiares nociceptivos mecânicos foram realizadas 3 horas após a administração, pois é o momento no qual a atividade inflamatória da substância é mais expressiva (pico da ação) (61). Os dados foram representados pelo delta para que pudesse representar a diferença entre duas variáveis. No nosso caso, a diferença entre o limiar nociceptivo após o tratamento e o limiar nociceptivo pré-tratamento. Sendo assim, no dia anterior ao experimento foi necessário avaliar os limiares nociceptivos basais dos animais para que o delta fosse calculado.

## **Definição do protocolo de anestesia**

O protocolo de anestesia foi padronizado testando-se dois procedimentos com métodos de indução e manutenção distintos. O primeiro, no qual a indução foi realizada por via intraperitoneal (ip) com a utilização de Cetamina 40 mg/kg + Xilazina 2,5 mg/kg + Acepromazina 0,75 mg/kg (64) e a manutenção com Isoflurano via inalatória oferecida em cone com um algodão embebido na substância, e um segundo, no qual utilizamos uma máquina de anestesia (Bonther) (65) que possibilita a indução e manutenção da anestesia de forma inalatória com maior controle das taxas, onde a indução é realizada com uma taxa de Isoflurano de 5% a 6% e a manutenção com uma taxa de 3% a depender do peso do animal. 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 (66).

A técnica anestésica adequada para dar seguimento aos experimentos foi definida com base naquela que apresentou menos eventos adversos (parada cardiorrespiratória nos animais), associado à indução e recuperação anestésicas mais rápidas.

## **Sensibilização Pós-incisional aguda**

Este ensaio foi realizado de acordo com o descrito por Brennan *et al.*, (1996) (67). Para isso, os animais foram anestesiados com Isoflurano por via inalatória e foi administrada Terramicina/ LA por via intramuscular para evitar infecções bacterianas. Os animais foram posicionados em decúbito ventral e as patas traseiras foram expostas e protegidas por um campo cirúrgico estéril. Foi realizada a degermação e antissepsia da pele dos animais com solução de Digliconato de Clorexidina 2% com tensoativos e solução alcoólica de Digliconato de Clorexidina 0,5% (degermante e alcóolica), respectivamente. Em seguida, foi realizada a incisão da pele (1 cm longitudinalmente), fáscia e músculo plantar (sem afetar origem e inserção muscular); seguida de hemostasia e sutura com fio nylon (5-0); a ferida operatória foi higienizada com soro fisiológico não sendo necessária qualquer cobertura. Os animais se recuperaram do procedimento em caixas de acrílico. As suturas foram removidas sob

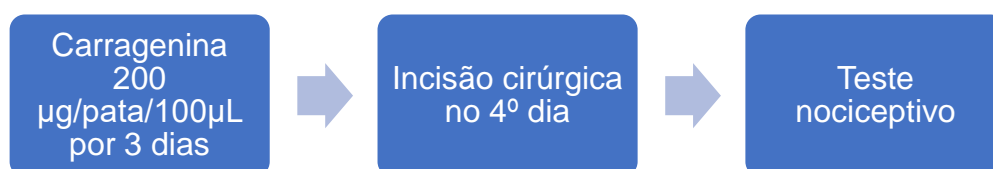
anestesia com Isoflurano e somente quando a cicatrização foi evidenciada por inspeção visual, que ocorreu normalmente 5-6 dias após os procedimentos citados.

A cirurgia foi realizada pelo mesmo experimentador em todo o grupo experimental.

O grupo Sham, em todos os experimentos, foi submetido às mesmas condições dos outros grupos, as quais sejam, manipulação, anestesia e administração de antibióticos. Porém, neste grupo, não foi realizada a incisão cirúrgica.

### Sensibilização Pós-incisional Persistente

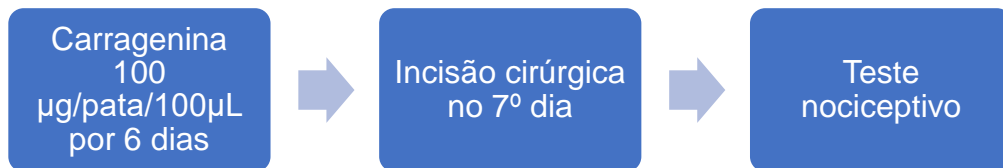
Para estabelecer a sensibilização pós-incisional persistente foram realizados dois protocolos. O primeiro, no qual foi administrada a substância pró-inflamatória Carragenina 200 µg/pata/100µL em regime de 3 dias seguido pela incisão das patas dos animais conforme o modelo descrito por Brennan *et al.*, (1996) (67). A cirurgia foi realizada pelo mesmo experimentador em todo o grupo experimental. Para acompanhar os limiares nociceptivos, que indicariam a persistência, no primeiro dia foi medido o limiar nociceptivo três horas após a administração de Carragenina, e no segundo e terceiro dia de administração foram medidos os limiares nociceptivos basais. Além disso, os limiares basais também foram acompanhados nos 15 dias que sucederam a última administração. Neste caso, foram realizadas medidas consecutivas nos primeiros 11 dias, e medidas alternadas do 11º ao 15º.



**Figura 2 - Etapas do processo do 1º protocolo de persistência da dor pós-incisional**

No segundo protocolo foi administrada a substância pró-inflamatória Carragenina 100µg/pata/100µL em um regime de 6 dias. Após a administração da substância, foi realizada a incisão das patas dos animais conforme modelo descrito por Brennan *et*

*al.*, (1996) (67). A presença, intensidade e duração da sensibilização mecânica pós-operatória em patas de ratos foi avaliada diariamente. As medidas dos limiares nociceptivos em todos os dias foram realizadas 24 horas após a administração do fármaco e foram continuadas por 30 dias após a última intervenção, inicialmente diária (0-8), intercalada (9-15) e, por fim, esporádica (15-30).



**Figura 3 - Etapas do processo do 2º protocolo de persistência da dor pós-incisional**

### **Curva dose-resposta da Apigenina sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina e avaliação desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente**

Para avaliar a atividade aguda da Apigenina sobre a sensibilização mecânica dos animais foi realizada uma curva dose-resposta na qual foi administrada a Apigenina nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100 µg/pata/100µL, selecionadas a partir da experiência prévia do experimentador (68), diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO) por via intraplantar em 35 patas, onde os animais foram distribuídos por aleatorização, seguida da administração de Carragenina 200 µg/pata/100µL por via intraplantar após uma hora da administração da Apigenina. Três horas após a administração da Carragenina foi realizada a medida do limiar mecânico e térmico.

Para avaliar o efeito da Apigenina no desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente, a administração da substância (juntamente com Carragenina) prosseguiu-se por três dias consecutivos. No quarto dia foi realizada a incisão cirúrgica e os valores dos limiares mecânicos e térmicos foram acompanhados pelos próximos 15 dias que sucederam a cirurgia.

## **Curva dose-resposta do Brusatol sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina e avaliação desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente**

Para avaliar a atividade aguda do Brusatol foram realizados dois protocolos, já que no primeiro, não foi obtida diferença estatística entre as doses. No primeiro foram distribuídos por aleatorização 30 patas de animais entre os grupos:

Diluyente do Brusatol + Salina

Diluyente do Brusatol + Cg 50 µg/pata/100µL

Diluyente do Brusatol + Cg 100 µg/pata/100µL

Brusatol 7 µg/pata/100µL + Cg 100 µg/pata/100µL

20 µg/pata/100µL + Cg 100 µg/pata/100µL

60 µg/pata/100µL + Cg 100 µg/pata/100µL

O Brusatol foi diluído em DMSO, em solução final menor que 10%. Em experimentos anteriores essa concentração não alterou o limiar nociceptivo dos animais. Todos os fármacos foram administrados localmente por via intraplantar. No momento T<sub>0</sub> foram administradas as diferentes doses do inibidor ou diluyente e após 1 hora a Carragenina. O teste nociceptivo mecânico teve início após transcorridas 3 horas da administração de Carragenina.

No segundo protocolo foram distribuídos por aleatorização 35 patas entre os grupos:

Diluyente do Brusatol + Cg 25 µg/pata/100µL

Cg 100 µg/pata/100µL

Brusatol 30ng/pata/100µL + Cg 25 µg/pata/100µL

Brusatol 100 ng/pata/100µL + Cg 25 µg/pata/100µL

Brusatol 300 ng/pata/100µL + Cg 25 µg/pata/100µL

Brusatol 1 µg/pata/100µL+ Cg 25 µg/pata/100µL

Brusatol 100 ng/pata/100µL + Salina

Para avaliar o efeito do Brusatol sobre o desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente, as intervenções farmacológicas foram realizadas por 6 dias consecutivos, no 7º dia foi realizada a intervenção cirúrgica, e o limiar nociceptivo foi acompanhado nos próximos 30 dias que sucederam a intervenção cirúrgica.

### **Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do software *Graph Pad Prism 5.0*, San Diego, EUA. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (epm) de dados brutos ou delta, conforme indicado em cada figura, de medidas realizadas nas patas dos animais. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas (two-way ANOVA) ou de uma via (one-way ANOVA), para a análise de dados repetidos ao longo do tempo ou não, respectivamente, seguida de comparações múltiplas pelo teste Turkey. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

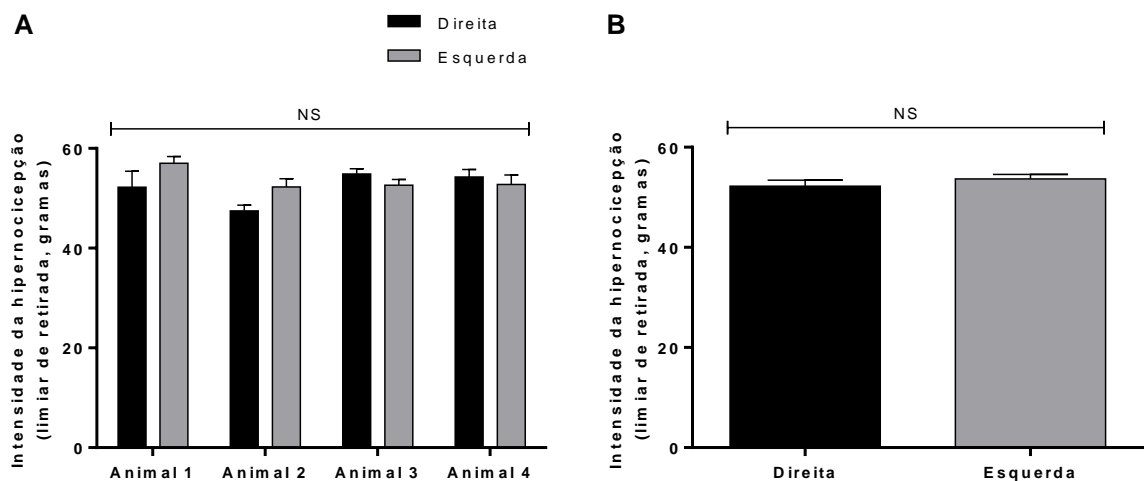
### **Padronização do teste comportamental nociceptivo mecânico**

A padronização do teste comportamental nociceptivo mecânico foi realizada demonstrando que o limiar de retirada dos animais em condições basais, para animais que pesam entre 100 e 300 gramas, encontra-se em torno de 40 (para animais mais leves) a 60 gramas (para animais mais pesados) (Fig. 2) consoante com dados encontrados por Vivancos, (63) e outros pesquisadores (69).

Na figura 2 painel A é possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa entre as medidas dos limiares nociceptivos das patas

direitas e esquerdas de cada animal, indicando que o valor médio observado entre os animais não difere, e que foram realizadas medidas adequadas quanto à lateralidade de cada pata.

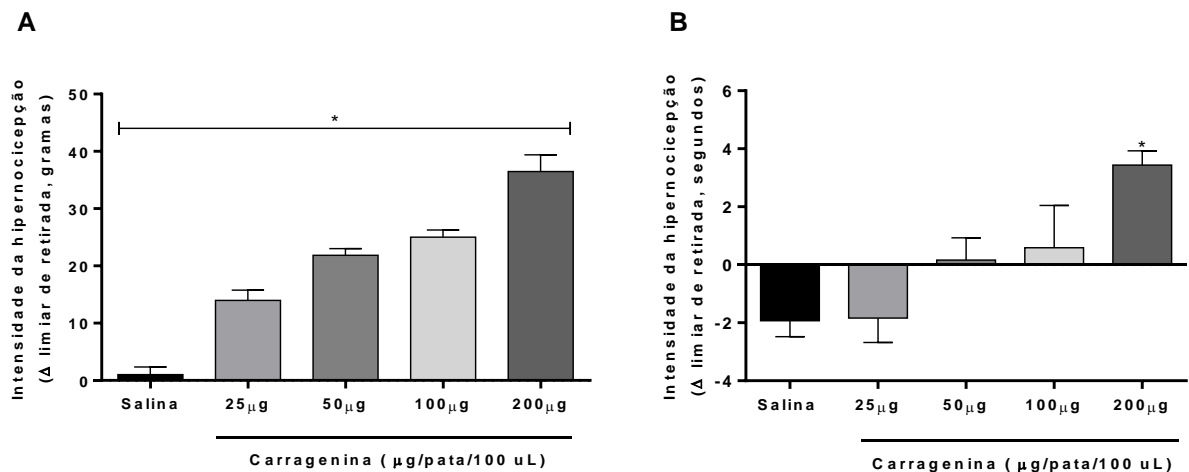
O painel B indica as medidas dos limiares basais mecânicos agrupados segundo à lateralidade, pata direita e pata esquerda. Mais uma vez, não foi encontrada diferença entre os valores de ambas patas, indicando que não há diferença entre o limiar das patas esquerdas e direitas, e que os experimentadores adquiriram habilidade para medir ambas patas sem que haja diferença entre elas.



**Figura 4 – Limiar nociceptivo mecânico basal de animais naive. Painel A: Limiar nociceptivo mecânico basal individual.** Eixo Y: indica a força em gramas necessária para que o animal retire a pata do estímulo mecânico. Eixo X: diferentes animais Naive. Os dados referem-se a médias  $\pm$  epm de ratos wistar, machos, pesando entre 100-300 gramas. ANOVA de duas vias seguida do teste Tukey.  $n=4$  animais. NS = Não significativo. NS= $p>0,05$ . **Painel B - Limiar nociceptivo mecânico basal do grupo.** Eixo Y: indica a força em gramas necessária para que o animal retire a pata do estímulo mecânico. Eixo X: Pata direita e pata esquerda de todos os animais agrupadas. Os dados referem-se às médias dos valores basais  $\pm$  epm de ratos wistar, machos, pesando entre 100- 300 gramas. NS = Não significativo. NS= $p>0,05$ . Teste t.  $n=4$ . Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

### Sensibilização inflamatória aguda induzida por Carragenina

A utilização da Carragenina como substância pró-inflamatória demonstrou que todas as doses induziram hipernocicepção mecânica e o efeito foi significativamente diferente do grupo Salina (Fig. 3A). Já para a sensibilização inflamatória térmica houve diferença significativa do grupo que recebeu Cg 200  $\mu$ g comparado ao grupo salina. Os demais grupos não diferiram do controle (Fig. 3B). Isso demonstra que há diferença na sensibilização mecânica e térmica causada por diferentes doses de Carragenina.



**Figura 5- Curva dose-resposta da Carragenina. Painel A: Intensidade de hipernociceção mecânica em resposta a diferentes doses de carragenina, em 3 dias de experimentos independentes.** Eixo Y: delta do limiar de retirada dos animais em grammas, representando a intensidade de hipernociceção. Eixo X: representação dos diferentes tratamentos. \* $p < 0,05$ , tratamentos versus salina. Os dados referem-se a médias  $\pm$  epm. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. **Painel B: Intensidade de hipernociceção térmica em resposta a diferentes doses de Carragenina.** Eixo Y: delta do limiar de retirada dos animais em segundos, representando a intensidade de hipernociceção. Eixo X: representação dos diferentes tratamentos. \* $p < 0,05$ , Carragenina 200 µg versus Salina. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey.  $n = 5 - 10$  animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

Foi selecionada a dose de 200 µg/pata/100µL para promover a sensibilização nociceptiva nos experimentos, já que essa se mostrou estatisticamente distinta das outras para ambos os testes, e inicialmente, e pretendia-se utilizar os dois testes. Posteriormente, as outras doses foram utilizadas, já que se optou por não realizar o teste térmico.

### Definição do protocolo de anestesia

O primeiro protocolo de anestesia, no qual a indução e manutenção foram realizadas com a utilização de Cetamina 40 mg/kg + Xilazina 2,5 mg/kg + Acepromazina 0,75 mg/kg por via intraperitoneal, e Isoflurano via inalatória oferecido em cone com um algodão embebido na substância (Fig. 4) (64), não atendeu as necessidades do grupo, tendo em vista o tempo maior necessário para indução e recuperação anestésica, de cerca de 40 minutos. Além disso, os animais apresentaram maior instabilidade autonômica, avaliada por meio de parada

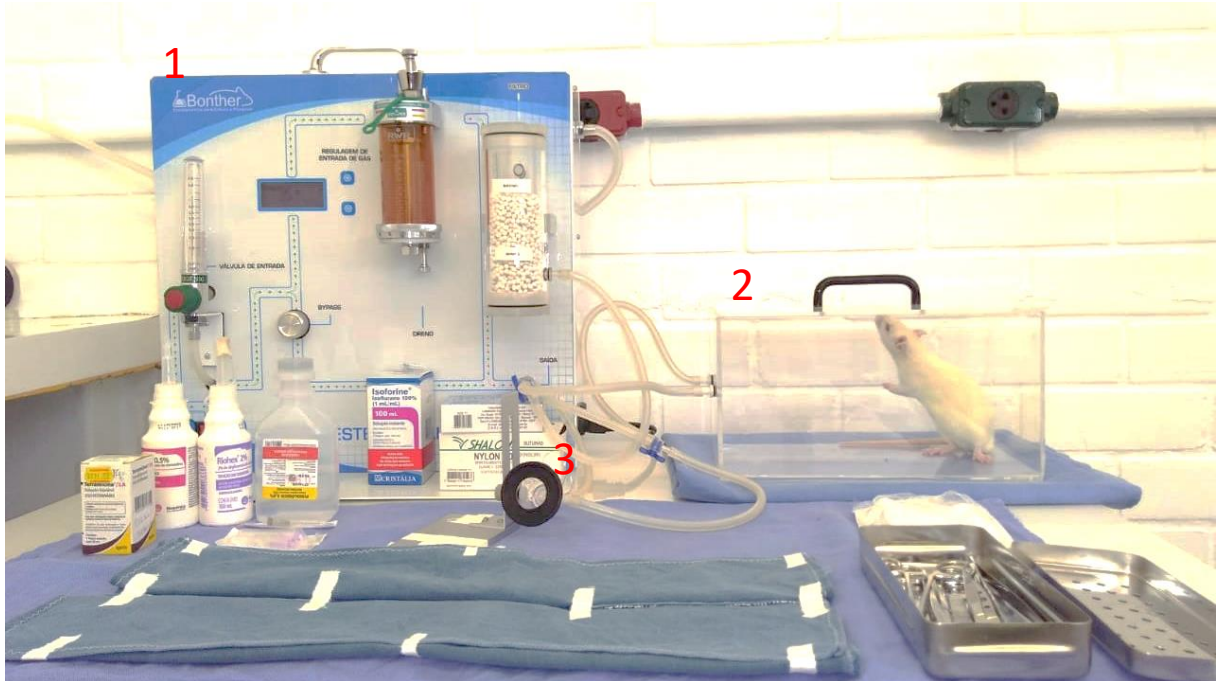


cardiorrespiratória, sendo sua reversão muitas vezes inviável. Estes fatores associados inviabilizaram seu uso pelo grupo.



**Figura 6 - Mesa cirúrgica com primeiro protocolo de anestesia.** Demonstração da manutenção anestésica pelo Isoflurano oferecido em cone com algodão embebido na substância. Indução via intraperitoneal pela utilização de Cetamina 40mg/kg + Xilazina 2,5mg/kg + Acepromazina 0,75mg/kg. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2018.

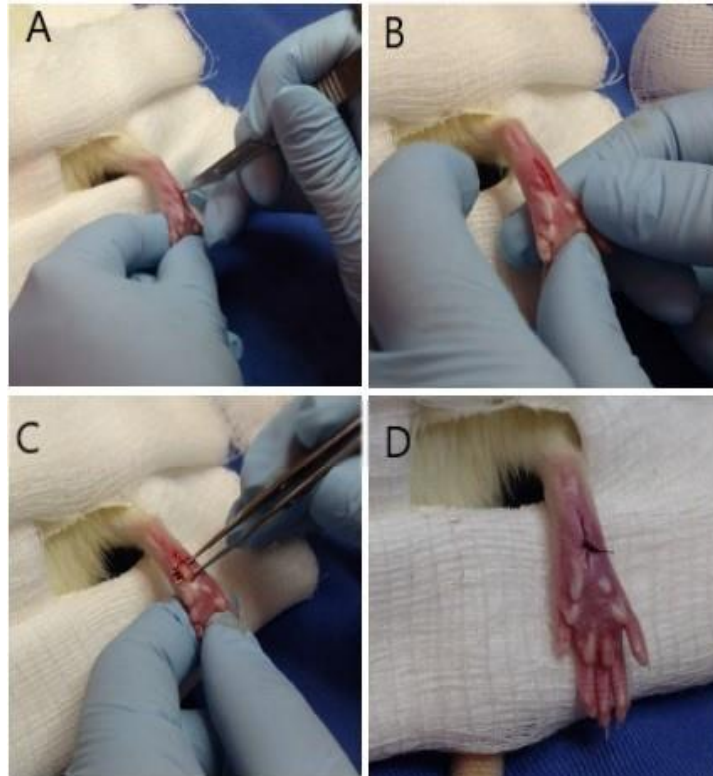
O segundo protocolo, já com a utilização do equipamento para anestesia inalatória em ratos (Fig. 5) foi realizado com o Isoflurano na taxa de 4% a 6% para indução anestésica e 2% a 4% para manutenção, a depender do peso do animal. Para este protocolo, observou-se diminuição da instabilidade autonômica e, ao ser detectada, esta pôde ser revertida rapidamente por meio da diminuição do fluxo de anestésico. O tempo médio necessário para indução anestésica nesse equipamento foi de 5 minutos. A recuperação anestésica se deu em torno de 2 minutos.



**Figura 7 - Mesa cirúrgica.** Para realizar o protocolo de anestesia foi utilizado o Sistema de Anestesia composto por administrador do anestésico (1), caixa de indução de anestesia (2) e cone nasal (3). Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

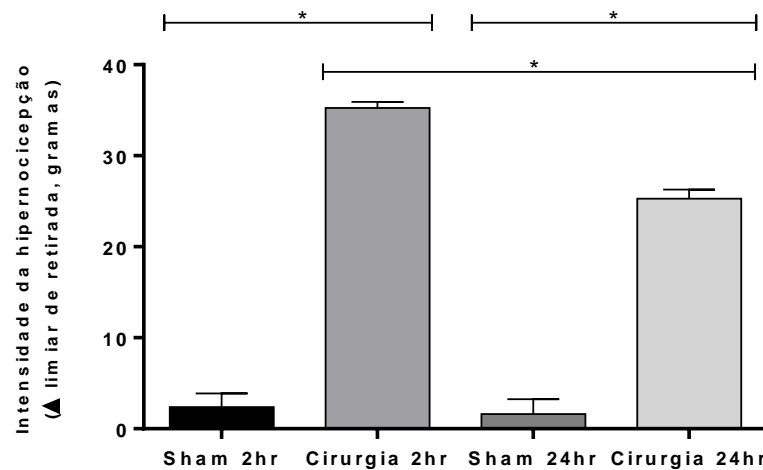
### Modelo de dor pós-incisional aguda

O modelo de dor pós-incisional aguda foi realizado conforme o estabelecido por Brennan *et al.*, (1996) (67). Todas as etapas foram padronizadas satisfatoriamente, as quais sejam: diérese (a separação dos tecidos possibilitou a abordagem da região), exérese (a incisão realizada no músculo plantar mimetizou a lesão causada pela cirurgia), hemostasia (a prevenção e detenção do sangramento foi realizada pela compressão) e síntese (as suturas foram realizadas adequadamente favorecendo o processo de cicatrização posterior), como demonstrado nas figuras 6 e 7.



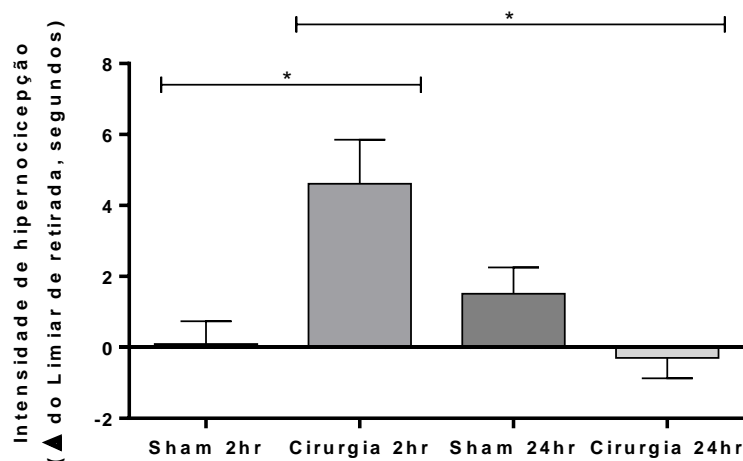
**Figura 8 - Procedimento cirúrgico.** A e B) Diérese: rompimento de pele e fáscia. C) Exérese: exposição do nervo plantar seguida de realização de pequena lesão utilizando-se de bisturi e D) Síntese (sutura). Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

Os limiares nociceptivos foram avaliados após 2 horas e após 24 horas da incisão. A avaliação dos limiares nociceptivos mecânicos dos animais demonstrou hipernocicepção causada pela incisão significativamente diferente do grupo Sham ( $p < 0,05$  para Sham 2h/24h versus Cirurgia 2h/24h). Além disso, também houve diferença para o grupo operado nas medidas realizadas 2h e 24h após a incisão cirúrgica, demonstrando maior intensidade da hipernocicepção, em ambos casos, nas primeiras 2 horas ( $p < 0,05$  para Cirurgia 2h versus Cirurgia 24h) (Fig. 7). Este dado está de acordo com o estudo realizado por Brennan e colaboradores no qual o método de incisão foi desenvolvido (67).



**Figura 9 - Intensidade de hipernociceção mecânica aguda em resposta a incisão no músculo plantar.** Eixo Y: Delta do limiar de retirada dos animais em gramas, representando a intensidade de hipernociceção. Eixo X: representação dos diferentes tratamentos. \* $p < 0,05$ , Sham 2hr versus Cirurgia 2hr e versus Cirurgia 24hr; Cirurgia 2hr versus Sham 24hr; Sham 24hr versus Cirurgia 24hr; Cirurgia 2hr versus Cirurgia 24hr. Os dados referem-se a médias  $\pm$  epm de ratos wistar, machos, pesando entre 100-300 gramas. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey.  $n = 3 - 4$  animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

Além disso, os limiares térmicos desses animais também se mostraram distintos nas 2 primeiras horas entre o grupo Sham ( $\Delta 0,1$  s) e o operado ( $\Delta 4,6$  s) demonstrando a capacidade da cirurgia em promover a hipernociceção aguda ( $p < 0,05$ ). Também houve diferença no grupo operado nas medidas realizadas 2 horas após o procedimento cirúrgico e 24 horas após o procedimento cirúrgico ( $p < 0,05$ ), o que demonstra que os efeitos da cirurgia isolada (sem presença de estímulos inflamatórios anteriores) apesar de promover a hipernociceção aguda, tende a diminuir já nas primeiras 24h após a cirurgia (Fig. 8).



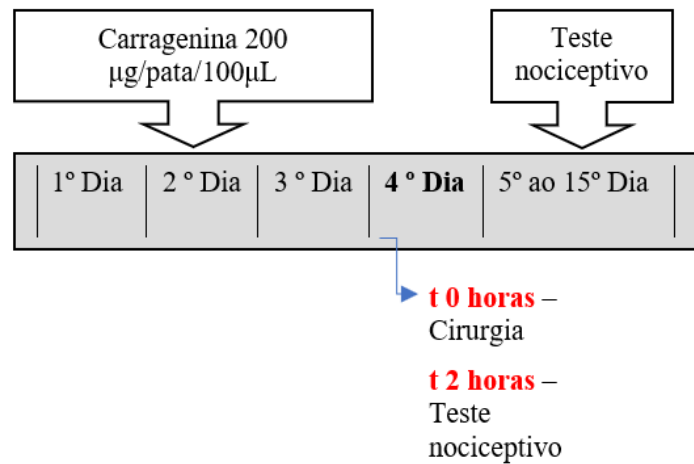
**Figura 10 - Intensidade de hipernociceção térmica em resposta a incisão no músculo plantar.** Eixo Y: Delta do limiar de retirada dos animais em segundos, representando a intensidade de

hipernocicepção. Eixo X: representação dos diferentes tratamentos. \* $p < 0,05$ , Sham 2hr versus Cirurgia 2hr; Cirurgia 2hr versus Cirurgia 24hr. Os dados referem-se a médias  $\pm$  epm de ratos wistar, machos, pesando entre 100-300 gramas. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey.  $n = 3 - 4$  animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

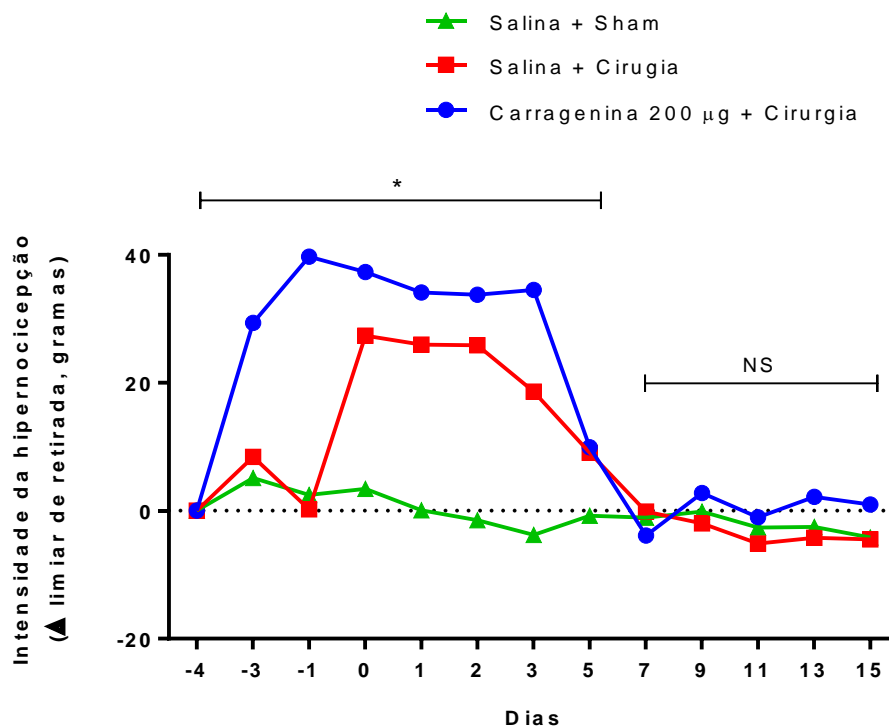
### **Modelo de dor pós-incisional persistente**

Para que fosse possível estudar os mecanismos envolvidos na persistência da dor pós-incisional foi desenvolvido um modelo no qual estas condições fossem mimetizadas. Assim, neste protocolo, os animais foram tratados com Carragenina na dose de 200  $\mu\text{g/pata}/100\mu\text{L}$  por três dias consecutivos, e no quarto dia foi realizado o procedimento cirúrgico (Fig. 8). Porém, observou-se que este protocolo não induziu a sensibilização pós-incisional persistente, conforme é demonstrado na figura 9. Nela pode-se observar que os limiares de todos os grupos retornaram aos valores basais a partir do sexto dia após o procedimento cirúrgico. Os limiares mecânicos foram acompanhados por 15 dias. De acordo com Brennan *et al.*, (1996) (67), no sexto dia após a intervenção cirúrgica, os limiares nociceptivos mecânicos dos animais retornam aos valores basais em situações onde não há persistência do estímulo doloroso (67). Nossos dados se assemelham ao resultado obtido por ele, já que, a partir do sexto dia, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores antes de iniciar o tratamento e 15 dias após o procedimento, e tampouco entre o grupo que recebeu Salina e o grupo que recebeu Carragenina. De todo modo, o grupo que recebeu a Salina + cirurgia teve seus limiares mais baixos que o grupo que recebeu a Carragenina + cirurgia. Naturalmente, o estímulo inflamatório nesse último grupo é mais intenso, e por isso o limiar é mais baixo.

Diante desse dado, foi realizado novo experimento no qual os animais receberam Carragenina por seis dias, ao invés de três, e na dose de 100  $\mu\text{g/pata}/100\mu\text{L}$ , ao invés de 200  $\mu\text{g/pata}/100\mu\text{L}$ , já que essa dose foi capaz de promover a hiperalgesia também.

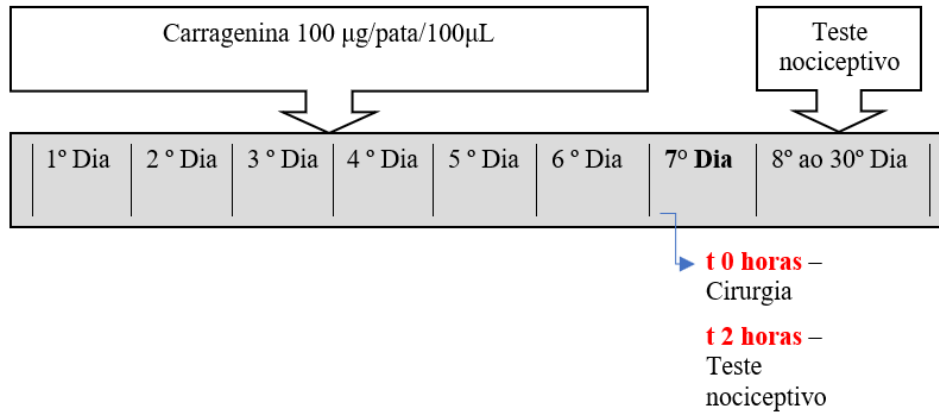


**Figura 11 - Esquema do 1º protocolo de sensibilização pós-incisional persistente.** t=tempo. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.



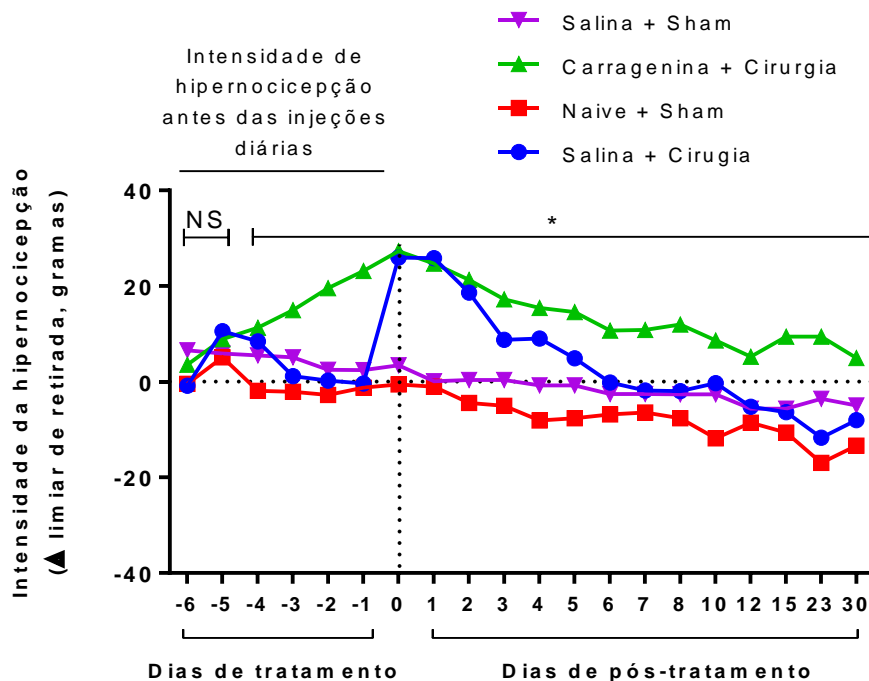
**Figura 12 - Intensidade de hipernocicepção mecânica em resposta ao tratamento com Carragenina 200 µg/pata/100µL e Salina e incisão no músculo plantar.** Os dados referem-se a médias ± epm de ratos wistar, machos, pesando entre 100-300 gramas. A) Eixo Y: Diferença, em grammas, entre o limiar de retirada dos animais antes de iniciarem os tratamentos e após o tratamento, representando a intensidade de hipernocicepção. Eixo X: Tempo, em dias, em que as medidas foram realizadas. No dia 0 foi realizada a incisão cirúrgica. A administração de Carragenina foi realizada nos 3 dias anteriores à cirurgia. \*p < 0,05, (DIA -3, -1) Carragenina 200 µg + Cirurgia versus Salina + Cirurgia e versus Salina + Sham; (DIA 0,1,2,3) Carragenina 200 mg + Cirurgia versus Salina + Cirurgia e versus Salina + Sham; Salina + Cirurgia versus Salina + Sham; (DIA 5) Carragenina 200 µg + Cirurgia versus Salina + Sham; Salina + Cirurgia versus Salina + Sham; NS = Não significativo. p > 0,05, (DIA 7, 9, 11, 13, 15). Os dados referem-se a médias ± epm. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. n = 5 animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

Sendo assim, os animais receberam Carragenina 100 µg/pata/100µL por seis dias consecutivos, e no sétimo dia foi realizada a incisão cirúrgica (Fig. 11).



**Figura 13 - Esquema do 2º protocolo de sensibilização pós-incisional persistente.** t=tempo. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

A dose de 200 µg/pata/100µL era inicialmente usada para que o limiar térmico pudesse ser mensurado uma vez que a dose de 100 não induz sensibilização térmica.



**Figura 14 - Sensibilização pós-incisional persistente induzida por Carragenina.** 6 dias de Carragenina consecutivos. Medidas basais da intensidade de hipernocicepção mecânica em resposta a administração de Carragenina 100 µg/pata/100µL e incisão no músculo plantar. Cada ponto é expresso como a média ± epm. A) Eixo Y: Diferença, em gramas, entre o limiar de retirada dos animais antes de iniciarem os tratamentos e após o tratamento, representando a intensidade de hipernocicepção. Eixo X: Tempo, em dias, em que as medidas foram realizadas. A administração de Carragenina ocorreu 1 vez ao dia, intraplantar, do dia 1 ao dia 6. No 7º dia foi realizada a incisão no músculo plantar. NS (DIA -6, -5); \*p<0,05, (DIA -4) Carragenina + Cirurgia versus Naive + Sham; (Dia

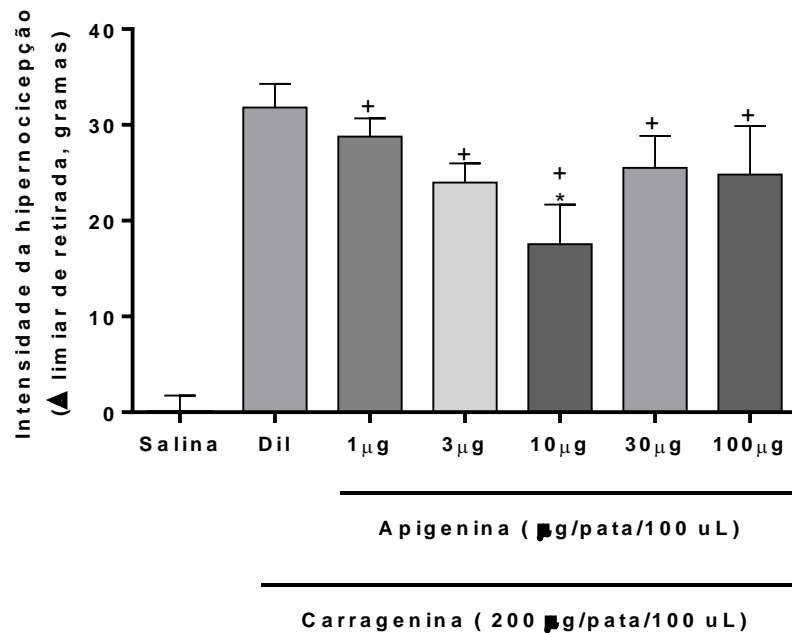
**-3, -2, -1)** Carragenina + Cirurgia versus Salina + Cirurgia e versus Naive + Sham e versus Salina + Sham; **(DIA 0)** Carragenina + Cirurgia versus Naive + Sham e versus Salina + Sham; **(DIA 1, 2)** Carragenina + Cirurgia versus Naive + Sham e versus Salina + Sham; **(DIA 3)** Carragenina + Cirurgia versus Salina + Cirurgia e versus Naive + Sham e versus Salina + Sham; **(DIA 4)** Carragenina + Cirurgia versus Naive + Sham e versus Salina + Sham; **(DIA 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 23, 30)** Carragenina + Cirurgia versus Salina + Cirurgia e versus Naive + Sham e versus Salina + Sham. ANOVA de duas vias seguida do teste Tukey. n=5 animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

Conforme demonstra a figura 12, os animais que receberam o estímulo inflamatório com Carragenina por 6 dias, e a incisão cirúrgica no 7<sup>o</sup> dia mantiveram seus limiares hipernociceptivos até o final do experimento. Sendo assim pode-se considerar que esses animais apresentaram sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente, pois o grupo que recebeu Carragenina + Cirurgia foi estatisticamente diferente até o 30<sup>o</sup> dia dos três grupos controles, e caso não houvesse a persistência, de acordo com os estudos disponíveis na literatura, o limiar nociceptivo deveria retornar aos valores basais após o sexto dia (67). Os limiares foram acompanhados até o 30<sup>o</sup> após a incisão cirúrgica (o grupo sempre esteve atento a duração mínima do experimento para evitar o sofrimento dos animais). Por conseguinte, o protocolo de sensibilização pós-incisional persistente foi padronizado por estímulo inflamatório com Carragenina por seis dias, seguido do sétimo dia com a incisão cirúrgica.

### **Curva dose-resposta da Apigenina sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina**

A curva dose-resposta da Apigenina foi realizada seguindo aos critérios pré-estabelecidos, no entanto, os dados não demonstraram diferenças estatísticas entre as doses testadas. Apesar de haver uma diferença visual entre a dose de 10 µg/pata/100 µL e as demais doses, ela não foi diferente estatisticamente, porém, foi diferente do grupo que recebeu o diluente. Não obstante, todas as doses foram estatisticamente distintas do grupo que recebeu a solução Salina.





**Figura 15 - Curva dose-resposta da Apigenina na presença de Carragenina 200 μg/pata/100 μL.** Eixo Y: delta do limiar de retirada dos animais em gramas, representando a intensidade de hipernocicepção. Eixo X: representação dos diferentes tratamentos. Os dados referem-se a médias ± epm. \*p= <0,05, Dil versus Apigenina 10 μg. +p= <0,05, Apigenina 1,3,10,30,100 versus salina. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. n= 5-8 animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

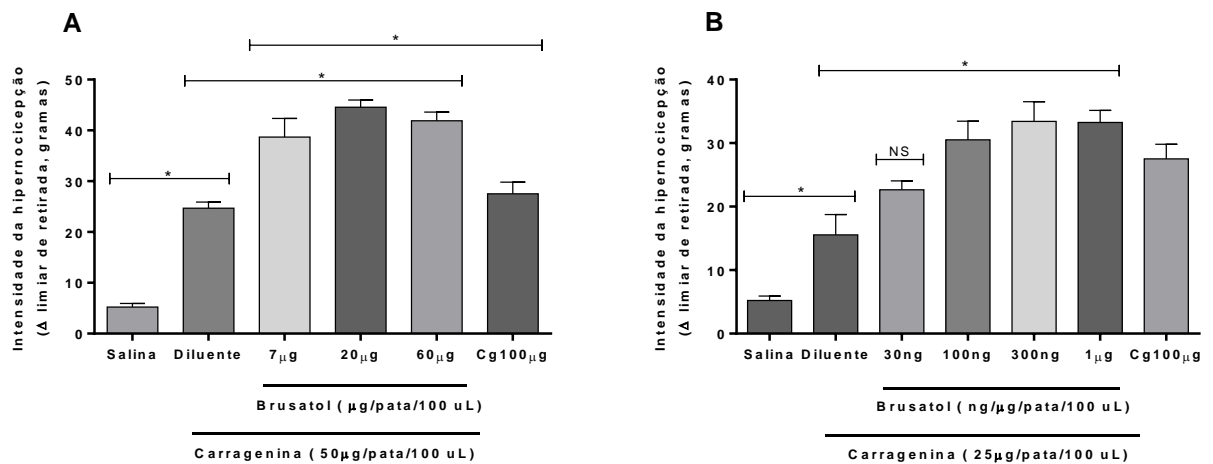
### Curva dose-resposta do Brusatol sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina

Inicialmente foi realizada uma curva dose-resposta do Brusatol sobre a sensibilização inflamatória induzida por Carragenina, pois em um processo inflamatório induzido por Carragenina, o Brusatol tenderia a aumentar a hiperalgesia. Foram selecionadas as doses de 7, 20, e 60 μg/pata/100μL mais a Carragenina 50 μg/pata/100μL, a partir da experiência prévia do experimentador (70).

Os grupos que receberam Brusatol nas doses 7, 20, e 60 μg/pata/100μL diferiram estatisticamente dos grupos que receberam diluente na presença da Carragenina 50 μg/pata/100μL, demonstrando que este provoca hipernocicepção (Fig. 14A).

Inicialmente foi utilizada a Carragenina 50 μg/pata/100μL, todavia, no protocolo seguinte ela foi substituída pela Carragenina 25 μg/pata/100μL. Essa dose apresenta

resposta nociceptiva, entretanto, de forma menos expressiva que as outras doses de Carragenina, evitando que ela mascare os possíveis efeitos do Brusatol. Por estarmos buscando visualizar um aumento da intensidade de hipernocicepção provocada pela inibição do Brusatol sobre a via Keap1/Nrf2/ARE, optou-se por essa diminuição.



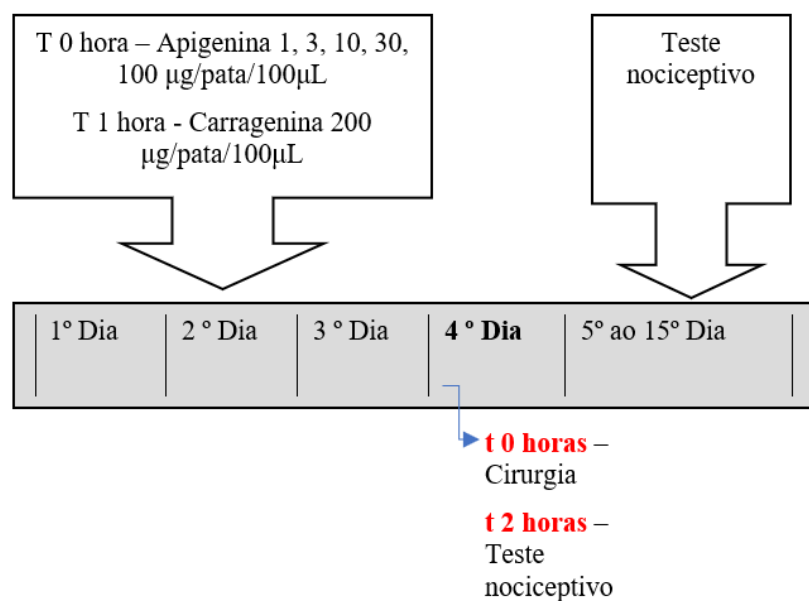
**Figura 16 - Curva dose-resposta do Brusatol.** Eixo Y: delta do limiar de retirada dos animais em grammas, representando a intensidade de hipernocicepção. Eixo X: representação dos diferentes tratamentos. Painel A: Curva dose-resposta do Brusatol na presença de Carragenina 50 µg/pata/100µL. \*p= <0,05, Salina versus Cg 50 µg; Cg 50 µg versus Brusatol 7 µg, 20 µg, e 60 µg; Brusatol 7 µg, 20 µg, e 60 µg versus Cg 100 µg. Não houve diferença entre Cg 50 µg versus Cg 100 µg. Painel B: Curva dose-resposta do Brusatol na presença de Carragenina 25 µg/pata/100µL. \*p= <0,05, Salina versus Cg 25 µg; Cg 25 µg versus Brusatol 100ng, 300 ng e 1 µg; Cg 25 µg versus Cg 100 µg. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. n= 5-20 animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

À vista disso, para dar continuidade ao estudo de doses menores de Brusatol, foi utilizada a Carragenina 25 µg/pata/100µL.

Neste experimento foi demonstrado que a dose de Brusatol 30 ng/pata/100µL não diferiu estatisticamente do grupo que recebeu o diluente, e que esse, diferiu de todas as outras doses. Sendo assim, para fazer o acompanhamento desses animais, utilizou-se a dose de 30 ng/pata/100µL, que não apresentou hiperalgesia e a dose de 100 ng/pata/100µL, que foi a menor dose capaz de promover hiperalgesia.

### Efeito de um indutor e de um inibidor da via Keap1/Nrf2/ARE no processo de desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente

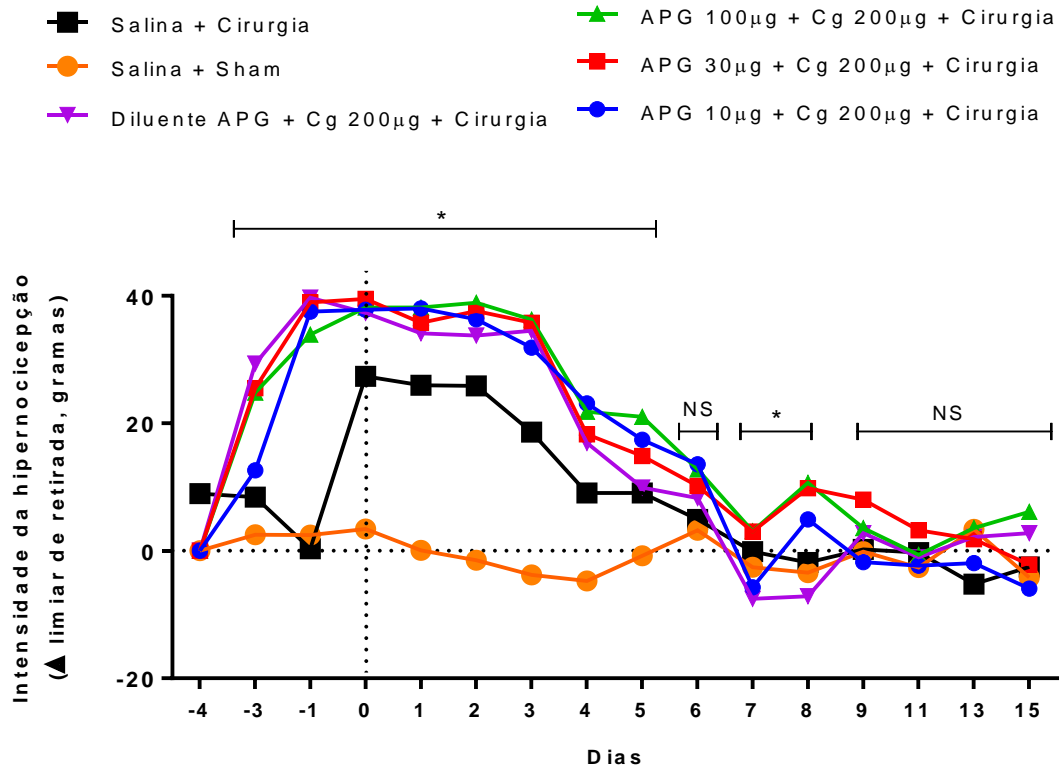
Para avaliar o efeito da possível ativação da via Nrf2/Keap1/ARE sobre a sensibilização pós-operatória persistente, foi utilizada a Apigenina, substância amplamente relatada por seus efeitos ativadores da via Nrf2/Keap1/ARE (44,47,49–51,71,72). Destarte, os animais foram tratados com o referido fármaco por 3 dias consecutivos, em 3 doses diferentes (10, 30, 100 µg/pata/100µL) acrescidos de Carragenina na dose de 200 µg/pata/100µL (Fig. 15). Essa dose de Carragenina foi escolhida pois no momento deste experimento as medidas mecânicas e térmicas estavam sendo avaliadas, e como descrito anteriormente, para causar sensibilização térmica, é necessário utilizar a dose de Carragenina de 200 microgramas. Além disso, as doses foram administradas por 3 dias consecutivos e não 6 dias consecutivos dado que o protocolo de cronificação não estava estabelecido.



**Figura 17 - Esquema do 1º protocolo de sensibilização pós-incisional persistente na presença da Apigenina.** t=tempo. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

Definidos estes parâmetros, os grupos foram acompanhados por 15 dias consecutivos, e a partir do sexto dia as medidas retornaram aos valores basais, estando de acordo com o que os estudos disponíveis na literatura afirmam quando não há sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente (67). Todavia, como o

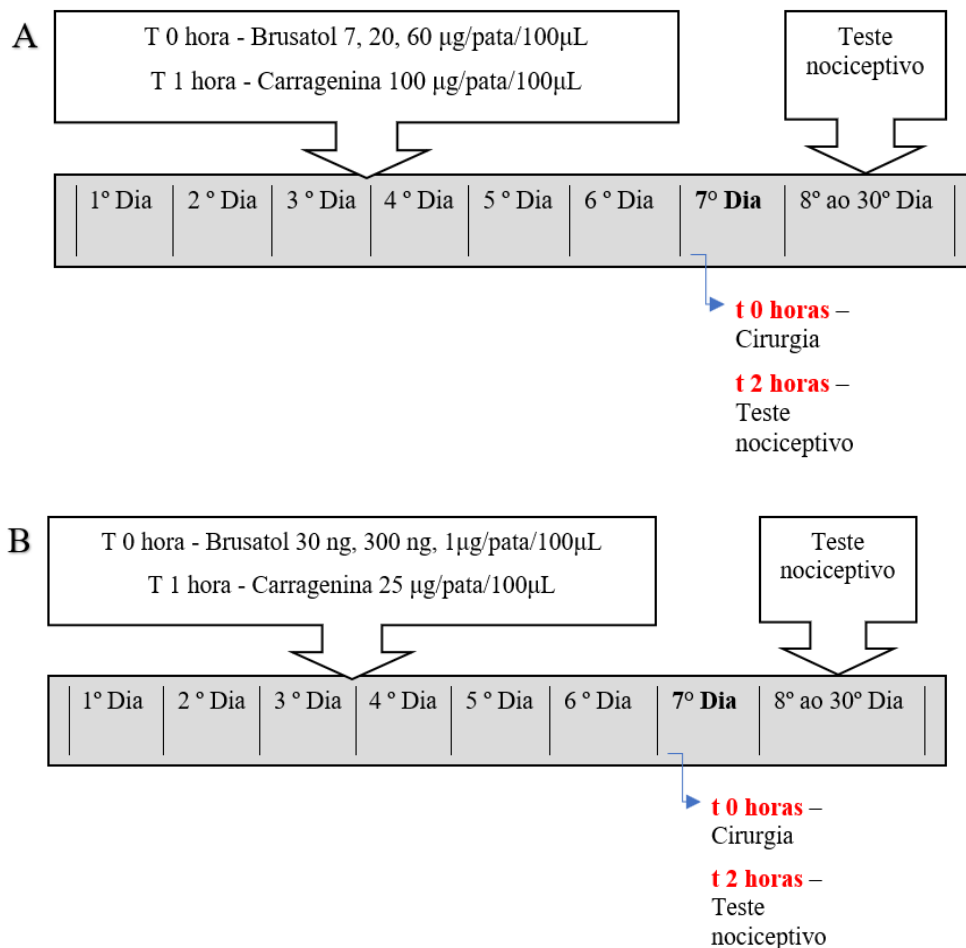
limiar nociceptivo retornou aos valores basais no 6º dia, permanecendo até o 15º, não se fez necessário acompanhar por 30 dias.



**Figura 18- Atuação da Apigenina administrada por 3 dias consecutivos.** Cada ponto é expresso como a média  $\pm$  epm. A) Eixo Y: Diferença, em grammas, entre o limiar de retirada dos animais antes de iniciarem os tratamentos e após o tratamento, representando a intensidade de hipernocicepção. Eixo X: Tempo, em dias, em que as medidas foram realizadas. No dia 0 foi realizada a incisão cirúrgica. A administração de Carragenina foi realizada nos 3 dias anteriores à cirurgia. \* $p < 0,05$ . **(DIA 6)** Não houve diferença entre os grupos; **(DIA 7)** APG 10/30µg + Cg 200 µg + Cirurgia versus Diluente APG +Cg 200 µg + Cirurgia; **(DIA 8)** APG 30/100 µg + Cg 200 µg + Cirurgia versus Salina + Cirurgia e versus Diluente APG +Cg 200 µg + Cirurgia; APG 10µg + Cg 200 µg + Cirurgia versus Diluente APG + Cg 200 µg + Cirurgia; **(DIA 9, 11, 13,15)** Não houve diferença entre os grupos. NS= Não significativo ANOVA de duas vias seguida do teste Tukey. n=5 animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

Do início do experimento ao 5º dia após o procedimento cirúrgico foi verificada diferença entre os grupos conforme figura 16. A partir do 6º dia não houve diferença estatística entre os grupos, com exceção no 7º e 8º dia, no qual foi verificada diferença entre os grupos APG 10/30µg + Cg 200 µg + Cirurgia versus Diluente APG +Cg 200 µg + Cirurgia e APG 30/100 µg + Cg 200 µg + Cirurgia versus Salina + Cirurgia, respectivamente. De todo modo, por ter sido uma diferença pontual a qual não se manteve nos dias posteriores, pode-se sugerir que os limiares tenham sido alterados por condições ambientais do dia em que foram realizadas as medidas (Calor, barulho,

experimentador). De forma geral, não houve diferença estatística entre os grupos que receberam Apigenina ou Carragenina e os grupos controle (Administração de Salina com cirurgia/Sham), e tampouco foi identificada a presença de sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente, já que a partir do sexto dia os limiares dos animais retornaram aos valores basais.



**Figura 19 - Esquema do 2º protocolo de sensibilização pós-incisional persistente na presença do Brusatol.** Painel A: Brusatol na presença de Carragenina 100 µg/pata/100µL. Painel B: Brusatol na presença de Carragenina 25 µg/pata/100µL. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

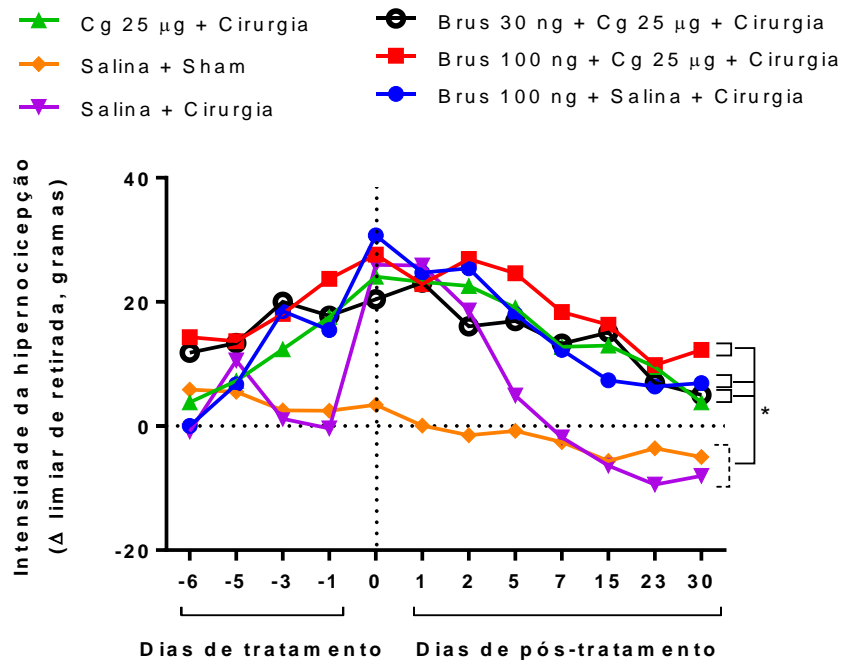
Da mesma forma, os grupos que receberam diferentes doses de Apigenina não foram diferentes do grupo controle Diluente + carragenina + cirurgia, após o sexto dia (com exceção do 7º e 8º). A partir deste dado pode-se sugerir que a Apigenina administrada localmente não possui efeito protetor sobre a sensibilização inflamatória mecânica induzida por carragenina e pela incisão cirúrgica. Porém, é fundamental testar o efeito da Apigenina no protocolo em que houve a persistência da hipernocicepção pós-incisional para se ter dados mais conclusivos.

Ao se avaliar o efeito do Brusatol, substância descrita como inibidor da via Keap1/Nrf2/ARE, por 6 dias consecutivos (Fig. 17), foi observado que as doses de Brusatol utilizadas com Carragenina foram suficientes para que o estímulo nociceptivo persistisse até o 30º dia. Apesar do demonstrado na figura 18 onde a dose de 30 ng/pata/100µL de Brusatol se mostrou distinta das demais, e por isso foi usada como controle, ela não apresentou diferença estatística da dose 100 ng/pata/100µL, e conforme é possível observar na figura 18, a dose de Brusatol de 30 ng/pata/100µL também foi capaz de promover a sensibilização pós-incisional persistente.

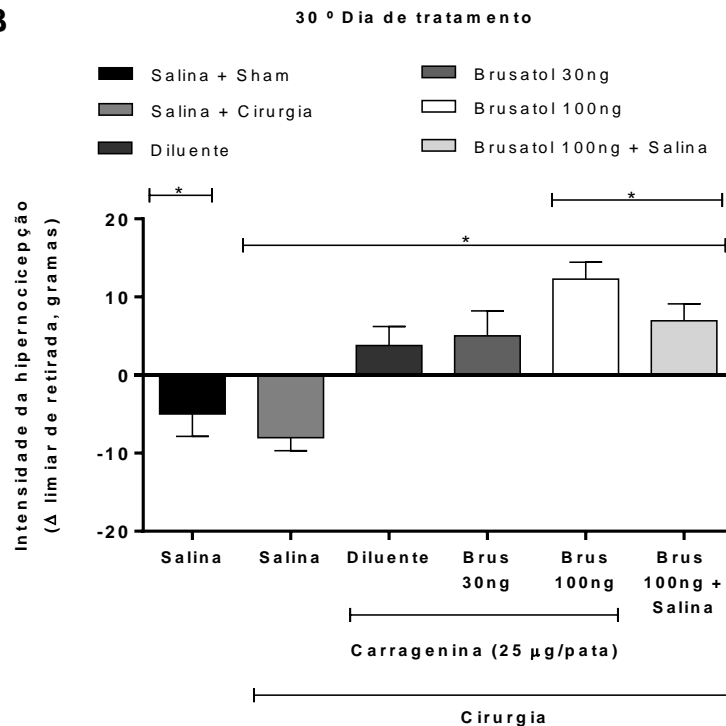
O protocolo foi realizado com a administração de Carragenina 25 µg/pata/100µL uma vez que, em doses maiores de Carragenina, não foi possível visualizar a resposta do Brusatol.

Conforme demonstra a figura 18, os grupos que receberam Brusatol diferiram igualmente dos grupos Salina + Sham e Salina + Cirurgia. Esse dado demonstra que ambas doses foram capazes de promover hiperalgesia nos animais. Além disso, o grupo que recebeu somente Carragenina 25 µg/pata/100µL por seis dias consecutivos também apresentou sensibilização pós-incisional persistente. Esperava-se que houvesse diferença estatística na resposta encontrada entre o grupo que recebeu Carragenina 25 µg/pata/100µL + a cirurgia e o que recebeu Brusatol 100ng + Cg 25 µg + Cirurgia, apesar disso, não houve diferença entre esses grupos. Outrossim, o grupo que recebeu Brusatol 100ng + Salina + Cirurgia (estímulo inflamatório ausente) também apresentou sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente. Os dados demonstram que esse grupo não difere dos outros grupos que receberam Brusatol, e, ao mesmo tempo, difere dos controles Salina + Sham e Salina + Cirurgia, demonstrando que há a presença da hipernocicepção no período de avaliação.

A



B



**Figura 20 - Sensibilização pós-incisional persistente induzida por Brusatol.** Cada ponto é expresso como a média  $\pm$  epm. A) Eixo Y: Diferença, em grammas, entre o limiar de retirada dos animais antes de iniciarem os tratamentos e após o tratamento, representando a intensidade de hipernocicepção. Eixo X: Tempo, em dias, em que as medidas foram realizadas. Painel A: **Sensibilização pós-incisional persistente induzida por Brusatol nos 30 dias.** No dia 0 foi realizada

a incisão cirúrgica. A administração de Carragenina foi realizada nos 6 dias anteriores à cirurgia. \*p < 0,05. **(DIA 30)** Brus 30 ng + Cg 25 mg + Cirurgia versus Salina + Cirurgia; Brus 100 ng + Cg 25 mg + Cirurgia versus Salina + Cirurgia e versus Salina + Sham; Brus 100 ng + Salina + Cirurgia versus Salina + Cirurgia e versus Salina + Sham; Cg 25 mg + Cirurgia versus Salina + Cirurgia. Não houve diferença estatística entre Brusatol 100ng + Cg 25 µg + Cirurgia versus Carragenina 25 µg + Cirurgia. ANOVA de duas vias seguida do teste Tukey. n=5 animais. Painel B: **Sensibilização pós-incisional persistente induzida por Brusatol no 30º dia de intervenção.** \*p < 0,05 para as seguintes comparações: Salina + Sham versus Brusatol 100ng; Salina + Sham versus Brusatol 100ng + Salina; Salina + Cirurgia versus Carragenina 100ng, diluente, Brusatol 100ng, Brusatol 100ng + Salina. n=5 animais. ANOVA de uma via seguida do teste Tukey. n=5 animais. Fonte: Elaborada pelo autor. Ano: 2019.

## DISCUSSÃO

A variação do limiar de retirada de acordo com o peso, existente na padronização do teste nociceptivo mecânico, se deve ao fato de que uma força maior é necessária quando o peso do animal é maior. Sendo assim, por haver animais que pesavam entre 100 e 300 gramas, as variações encontradas em torno de 40 e 60 gramas são esperadas.

Se tratando do limiar de retirada observado em patas distintas, apesar de haver estudos que relatem variabilidade entre as medidas de ambas as patas (73), nossos resultados demonstram semelhanças entre as medidas de ambas as patas, e estas não diferiram estatisticamente umas das outras. Isso demonstra que o experimentador desenvolveu habilidade de medir duas patas sem que haja variação entre as medidas, o que permite a realização de experimentos com ambas as patas, e assim, o número de animais utilizados em cada experimento pode ser minimizado, de acordo com o proposto pelo princípio 3 R's (74).

A substância pró-inflamatória Carragenina se mostrou eficaz em promover a inflamação no local da administração. A administração crônica por 6 dias se mostrou eficiente, juntamente com a incisão cirúrgica, em promover a sensibilização pós-operatória persistente. Essa substância foi escolhida devido as suas propriedades como agente pró-inflamatório (75). Na realização dos testes com Carragenina, foram realizados dois testes (mecânico e térmico) pois pretendia-se utilizar os dois equipamentos. Essa decisão foi substituída ao longo do projeto porque para a análise dos limiares no teste térmico foi observada a necessidade de doses mais altas dos reagentes, inviabilizando assim a realização dos dois testes ao mesmo tempo e



dobrando o número amostral do estudo. Assim, optou-se por dar seguimento ao estudo avaliando os limiares mecânicos dos animais.

O protocolo de anestesia utilizado pelo grupo atendeu às necessidades exigidas, e se demonstrou um protocolo eficiente para realização de cirurgias em animais de pequeno porte. Vale ressaltar a importância de estar presente um experimentador, além do cirurgião, que monitorará o animal durante todo o procedimento. Esse protocolo favorece a realização de experimentos com métodos mais humanos, favorecendo o conforto animal, e a utilização do menor número de animais possível, conforme o princípio 3 R's (74)

O modelo de dor pós-incisional aguda se demonstrou eficaz em mimetizar as condições da cirurgia demonstrado por Brennan e colaboradores, no qual o método de incisão foi desenvolvido (67). Nele, após o sexto dia da realização do procedimento, os animais não apresentavam sensibilização mecânica. No nosso experimento não foi diferente. Após o sexto dia, os limiares dos animais retornaram aos valores basais, demonstrando que apenas a cirurgia, na ausência de um estímulo inflamatório mais potente como a Carragenina, não é capaz de promover a sensibilização pós-operatória persistente mesmo na presença na lesão.

Se tratando do modelo de dor pós-incisional crônica, pode-se sugerir que o tempo em que o animal recebe o estímulo inflamatório é mais importante no processo de cronificação do que a intensidade do estímulo (54), já que primeiramente, observamos que um estímulo mais intenso por um período de tempo menor (200 µg/pata/100µL por 3 dias) não foi capaz de induzir a persistência do quadro doloroso. Por outro lado, um estímulo menos intenso por um período maior (100 e 25 µg/pata/100µL por 6 dias) foi capaz de induzir a sensibilização pós-operatória persistente. A diminuição da dose pode ser realizada pois, além de se mostrar suficiente para induzir a resposta, os testes se iniciaram com a dose de 200 µg/pata/100µL de Carragenina em razão de uma dose maior ser necessária para a detecção do limiar térmico. De todo modo, optou-se por prosseguir apenas com o teste mecânico pois este se mostrou mais adequado para os protocolos do projeto. Nesse teste, doses menores são suficientes para demonstrar a resposta.

Como controle dos grupos experimentais os animais receberam Salina seguido da cirurgia. Esse controle foi escolhido pois, desse modo, poderíamos observar os efeitos apresentados pela presença da cirurgia na ausência de um estímulo inflamatório. Destarte, a solução Salina foi administrada para que os animais pudessem ser corretamente comparados, já que, a lesão causada pela injeção, ou a quantidade de líquido injetado na pata poderiam interferir na resposta nociceptiva do animal. Sendo assim, a solução Salina simularia as mesmas condições dos grupos que receberam a substância inflamatória. Com esse grupo esperava-se demonstrar que em 6 dias a resposta nociceptiva retornaria aos valores basais, conforme demonstra a literatura (67). Além disso, visando demonstrar que somente a cirurgia não seria suficiente para promover sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente, o modelo de Brennan foi simulado (67). Desse modo, pode-se demonstrar que o grupo que recebeu apenas a incisão teve seus limiares retornados aos valores basais 6 dias após a realização do procedimento cirúrgico, conforme descrito na literatura (67).

Quanto à curva dose-resposta da Apigenina, esperava-se que doses mais altas de Apigenina fossem capazes de aumentar o limiar nociceptivo dos animais, ou seja, induzir efeito antinociceptivo já que essa substância demonstrou capacidade para ativar a via Keap1/Nrf2/ARE, conforme demonstra a literatura (47,50,51), e em uma curva dose-resposta convencional, doses crescentes de um fármaco geralmente apresentam efeitos mais intensos à medida que aumentam (76). Porém, os dados do presente estudo apresentaram um fenômeno de curva dose-resposta não monotônica em formato de "U" (76). Ademais, por ela ser um produto natural, a maioria dos relatos são de sua utilização via oral, entretanto, utilizamos a via intraplantar para economizar o fármaco, já que a pretendíamos visualizar apenas seu efeito local. Desse modo, por via local a dose poderia ser ainda menor, e talvez por esse motivo, poderia estar apresentando toxicidade.

Outrossim, o fenômeno de curva dose-resposta não monotônica em formato de "U" ocorre com algumas substâncias porque "existe a deficiência desses nutrientes para manter a homeostasia" (76). À medida que a dose aumenta, a homeostasia é obtida e é alcançado o fundo da curva dose-resposta em "U". À medida que a dose aumenta, ultrapassando a quantidade necessária para manter a homeostasia, pode ocorrer toxicidade por superdosagem. Portanto, os efeitos adversos são observados

tanto com doses baixas quanto com doses altas” (76). Sendo a Apigenina um flavonoide presente em diversos alimentos, é natural que esse efeito ocorra.

Na curva dose-resposta da Apigenina um fenômeno parecido ocorreu, pois tanto em doses baixas quanto em doses altas, a resposta foi similar. Diante do resultado encontrado, e com base na resposta encontrada semelhante ao visto em outras curvas dose-resposta não monotônicas, não se descarta a possibilidade de a substância apresentar um papel dual na via (inibidor/ativador) a depender a dose, local de ação, dentre outros. Essa conclusão pode ser reforçada por meio de um estudo realizado com culturas de células de carcinoma hepatocelular no qual a Apigenina não é apresentada como ativador da via Keap1/Nrf2/ARE, mas sim, uma substância capaz de reduzir drasticamente a expressão de Nrf2 (77), ao contrário do encontrado nos demais estudos que demonstraram o aumento nos níveis de Nrf2 provocado pela Apigenina (44,47,49–51,71,72). De todo modo, conforme proposto nos objetivos do experimento, o efeito da substância foi acompanhada por um período de 15 dias para avaliar seu efeito sobre a sensibilização pós-operatória persistente, e os dados encontrados demonstraram que a Apigenina possivelmente apresenta o papel de ativador da via, e não de inibidor, indo de acordo com a maioria dos estudos encontrados (44,47,49–51,71,72).

Por outro lado, não podemos afirmar que a substância pró-inflamatória Carragenina induziu o estresse oxidativo - apesar de haver estudos que mostrem esse efeito (78,79) - e por consequência, ativou a via Keap1/Nrf2/ARE. Desse modo, a substância ativadora da via não poderia apresentar seu efeito. Outros experimentos seriam necessários para saber se há ou não a presença do estresse oxidativo, e da ativação da via.

No processo de desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente com a utilização da Apigenina não houve a presença sensibilização persistente. Por partes, observamos que em sua ação aguda a dose de 10 µg/pata/100µL se mostrou distinta estatisticamente do grupo que recebeu a o diluente + Carragenina, ou seja, ela seria capaz de alterar a resposta nociceptiva aguda do animal, de modo que a intensidade da hipernocicepção na utilização da substância tenha sido menor que na ausência dela. Esse dado iria de encontro com o disponível na literatura, já que, por se tratar de uma substância conhecida por ativar a via Keap1/Nrf2/ARE, que por sua

vez está envolvida em processos inflamatórios, ela iria diminuir a intensidade da hipernocicepção. Semelhantemente, ao avaliar sua ação no processo de desenvolvimento da sensibilização pós-operatória persistente, foi observado que não há a presença da sensibilização pós-operatória persistente na utilização da substância. Poder-se-ia especular que a substância possui propriedades protetivas por intermédio da via, pois mesmo diante de um estímulo inflamatório aplicado por 3 dias consecutivos, os grupos que receberam a substância não apresentaram sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente. De todo modo, essa afirmativa apresentada deve ser feita com cautela ou evitada, pois no experimento em questão, nenhum grupo apresentou a sensibilização pós-operatória persistente. Isso pode haver ocorrido devido ao estímulo inflamatório não ter sido administrado por período suficiente para que houvesse sensibilização pós-operatória persistente nos casos onde não há a utilização da Apigenina, e, nos casos onde há a presença da Apigenina, pela substância realmente diminuir a intensidade da hipernocicepção devido sua atuação na via Keap1/Nrf2/ARE. Destarte, para caracterizar adequadamente a atuação da Apigenina sobre a sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente seria necessário realizar um experimento no qual o estímulo inflamatório fosse administrado pelo período suficiente para que houvesse sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente. À vista disso, a perspectiva futura do grupo envolve a realização de experimentos adicionais para que se possa estudar essa ação e confirmar ou não essa afirmativa.

Para o Brusatol, utilizou-se a dose de 100ng pois essa demonstrou efetividade na curva dose-resposta. Da mesma maneira, a dose Brusatol de 30ng foi utilizada como controle, já que na curva dose-resposta ela não apresentou diferença do grupo que recebeu apenas o diluente, e sendo assim, pode ser considerada como dose não efetiva. De todo modo, sobre a sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente elas não apresentaram diferença estatística. Além disso, também não apresentaram diferença estatística entre o grupo que recebeu Carragenina 25 µg/pata/100µL.

Vários fatores podem estar envolvidos. Primeiramente, para que houvesse a resposta esperada e o Brusatol aumentasse a intensidade de hipernocicepção em comparação com a Carragenina, precisaríamos estar lidando com um cenário onde a Carragenina promove a inflamação e estresse oxidativo, que por sua vez ative a via Keap1/Nrf2/ARE. O Brusatol, por sua vez, agiria inibindo essa via, e assim, a

intensidade da hipernocicepção seria aumentada. De todo modo, não podemos afirmar que esse cenário esteve presente. Entretanto o que podemos sugerir é que, a dose de Carragenina 25 µg/pata/100µL, Brusatol 30/100 ng/pata/100µL por seis dias consecutivos, seguida da incisão cirúrgica é capaz de promover a sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente.

Não menos importante, o grupo que recebeu Brusatol 100ng + Salina + Cirurgia também promoveu a sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente. Tendo em vista que esse grupo não recebeu o estímulo inflamatório como os outros, e mesmo assim induziu a persistência, pode-se sugerir que há uma ativação basal da via Keap1/Nrf2/ARE, e quando esta está inibida, poderá causar efeitos deletérios que facilitam a sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente.

Em alternativa, a lesão da cirurgia também pode ser suficiente para que haja a ativação da via em primeiro momento - já que há, inevitavelmente, uma lesão, seguido do processo inflamatório e geração de EO - e sua inibição em segundo momento pelo Brusatol. Esses dados reafirmam a importância da via Keap1/Nrf2/ARE nos processos inflamatórios. Ademais, demonstra que para indução da sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente a duração do estímulo é mais importante que a intensidade dele, tendo em vista que o protocolo de 3 dias de administração de Carragenina 200 µg não foi capaz de induzir a persistência, mas o estímulo inflamatório causado pela cirurgia, ou a atividade basal da via, seguida da administração do Brusatol por 6 dias consecutivos foram eficazes em promovê-la.

Essas características devem ser exploradas em experimentos adicionais, já que as substâncias se mostraram interessantes para o estudo da via Keap1/Nrf2/ARE e dos processos envolvidos na persistência do quadro doloroso.

Vale ressaltar que a incisão cirúrgica foi crucial no processo de sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente no grupo que recebeu apenas Carragenina 25 µg/pata/100µL, já que, apesar de não haver um grupo que tenha recebido Carragenina 25 µg/pata/100µL no qual a cirurgia esteja ausente, há um grupo que recebeu uma dose maior de Carragenina mas não recebeu a incisão cirúrgica, e esse não apresentou sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente. Por analogia, não haveria necessidade de realizar o mesmo controle com a dose de Carragenina 25

$\mu\text{g/pata}/100\mu\text{L}$  já que uma dose maior na ausência da cirurgia não apresentou sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente.

É importante ressaltar que não há na literatura dados que mostrem a administração de uma substância inflamatória juntamente com um procedimento cirúrgico para estudar os mecanismos envolvidos na dor crônica pós-operatória, tampouco da influência da via Keap1/Nrf2/ARE nesse processo. Nossos resultados contribuirão para realização de estudos envolvendo hipernocicepção, aguda ou crônica, além do estudo da dor de outras etiologias de forma segura, mais econômica e ao menor tempo, permitirá a elucidação de mecanismos essenciais para evolução da prevenção e tratamento da dor.

## **CONCLUSÕES**

Confirmando a hipótese apresentada, nossos dados sugerem que o estímulo inflamatório anterior à incisão cirúrgica facilita a persistência do quadro doloroso, e que a ativação da via Keap1/Nrf2/ARE pode ter papel protetor neste quadro. O modelo de dor pós-incisional persistente foi determinado demonstrando que a administração de Carragenina nas patas dos ratos por 6 dias consecutivos, acrescidos do procedimento cirúrgico no sétimo dia, são capazes de promover uma hipernocicepção persistente, que não se alterou nos 30 dias posteriores ao procedimento cirúrgico.

Nossos dados não permitem concluir sobre o papel da Apigenina no processo de cronificação. Em alternativa, o Brusatol se mostrou eficaz em promover a sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente em todas as doses avaliadas.

A realização de experimentos adicionais no qual a Apigenina seja administrada por 6 dias consecutivos se faz necessária para que se possa estudar a ação dela e caracterizar a sua atuação frente à sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente. Além disso, um grupo adicional no qual o Brusatol seja administrado por seis dias consecutivos na ausência da Carragenina e da cirurgia se faz necessário para que se possa verificar a atividade basal da substância sob a via Keap1/Nrf2/ARE. Com esse grupo pode-se verificar se haverá sensibilização nociceptiva pós-incisional persistente na ausência da cirurgia/estímulo inflamatório com Carragenina.

O modelo de dor crônica pós-operatória aqui desenvolvido permitirá o estudo e a elucidação de mecanismos essenciais para evolução da prevenção e tratamento da dor crônica pós-operatória em humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ting S, Schug S. The pharmacogenomics of pain management: Prospects for personalized medicine. *J Pain Res* [Internet]. 2016 Feb [cited 2017 Aug 7];9:49–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26929662>
2. Chapman CR, Nakamura Y. A passion of the soul: an introduction to pain for consciousness researchers. *Conscious Cogn* [Internet]. 1999 Dec [cited 2019 Jan 30];8(4):391–422. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10600241>
3. Duarte YA de O, Diogo MJD. Atendimento domiciliar : um enfoque gerontológico [Internet]. *Atheneu*; 2000 [cited 2019 Jan 30]. Available from: <http://www.editorametha.com.br/livros-de-nutricao/nutricao-e-saude-em-geriatria/atendimento-domiciliar-um-enfoque-gerontologico.html>
4. SBED - Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. Dor crônica atinge 37% dos brasileiros e pode piorar com uso de celulares e tabletes, aponta pesquisa, [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 4]. Available from: [http://www.sbed.org.br/lermais\\_materias.php?cd\\_materias=812&friurl=\\_-Dor-cronica-atinge-37-dos-brasileiros-e-pode-piorar-com-uso-de-celulares-e-tabletes-aponta-pesquisa-\\_](http://www.sbed.org.br/lermais_materias.php?cd_materias=812&friurl=_-Dor-cronica-atinge-37-dos-brasileiros-e-pode-piorar-com-uso-de-celulares-e-tabletes-aponta-pesquisa-_)
5. Pain: Current Understanding of Assessment, Management, and Treatments [Internet]. 2001 [cited 2019 Jan 30]. Available from: <https://www.npcnow.org/system/files/research/download/Pain-Current-Understanding-of-Assessment-Management-and-Treatments.pdf>
6. Rahmati M, Mobasheri A, Mozafari M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone* [Internet]. 2016 Apr [cited 2019 Feb 4];85:81–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812612>
7. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* [Internet]. 1999 Jun 5 [cited 2019 Mar 2];353(9168):1959–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10371588>
8. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2019 Jan 30];140(6):771–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303867>

9. Zaily, LC3pez Lazo S, Salazar DC-ez M. Consideraciones de la respuesta fisiológica al estrés quirúrgico [Internet]. Vol. 13. Sociedad Cubana de Anestesiología y Reanimación; 2014 [cited 2017 Aug 4]. 136–146 p. Available from: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-67182014000200005&lang=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-67182014000200005&lang=pt)
10. C. O. Hines. © 1972 Nature Publishing Group. Nature [Internet]. 1972 Dec 13 [cited 2017 Aug 4];239(102):73–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4629913>
11. Kraychete DC, Sakata RK, Lannes L de OC, Bandeira ID, Sadatsune EJ. Dor crônica persistente pós-operatória: O que sabemos sobre prevenção, fatores de risco e tratamento? Brazilian J Anesthesiol [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 4];66(5):505–12. Available from: [http://www.scielo.br/pdf/rba/v66n5/pt\\_0034-7094-rba-66-05-0505.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rba/v66n5/pt_0034-7094-rba-66-05-0505.pdf)
12. Posso MBS, Giaretta VM de A, Santanna ALG de, Ranzani RCM, Gouvea ÁL. Nurses ' perception of the management of chronic non-malignant pain with opioids. Rev Dor [Internet]. 2013 Mar [cited 2017 Aug 7];14(1):7–11. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-00132013000100003&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-00132013000100003&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)
13. Woolf CJ, American College of Physicians, American Physiological Society. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. Ann Intern Med [Internet]. 2004 Mar 16 [cited 2017 Aug 4];140(6):441–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15023710>
14. Sng BL, Sia ATH, Quek K, Woo D, Lim Y. Incidence and risk factors for chronic pain after caesarean section under spinal anaesthesia. Anaesth Intensive Care [Internet]. 2009 May 9 [cited 2017 Aug 4];37(5):748–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19402781>
15. Sallum AMC, Garcia DM, Sanches M. Dor aguda e crônica : revisão narrativa da literatura. Acta Paul Enferm [Internet]. 2012 [cited 2017 Aug 7];25(1):150–4. Available from: [http://www.scielo.br/pdf/ape/v25nspe1/pt\\_23.pdf](http://www.scielo.br/pdf/ape/v25nspe1/pt_23.pdf)
16. Neil MJE, Bannister J. When acute pain becomes chronic [Internet]. Vol. 70, Anaesthesia. 2015 [cited 2017 Jul 29]. p. 779–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/anae.13145>
17. Crombie IK, Davies HT, Macrae WA. Cut and thrust: antecedent surgery and trauma among patients attending a chronic pain clinic. Pain [Internet]. 1998 May [cited 2017 Aug 4];76(1–2):167–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696470>
18. TabNet Win32 3.0: Procedimentos hospitalares do SUS - por local de internação - Brasil [Internet]. [cited 2019 Jan 30]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>
19. Cousins MJ, Giamberardino MA, Jamison RN, Mcgrath PA, Rajagopal MR, Smith MT, et al. Upcoming Issues Chronic Pain after Surgery or Injury. 2011



- [cited 2017 Aug 4];XIX(1). Available from: [https://www.iasp-pain.org/files/Content/ContentFolders/Publications2/PainClinicalUpdates/Archives/PCU\\_19-1\\_for\\_web\\_1390260524448\\_6.pdf](https://www.iasp-pain.org/files/Content/ContentFolders/Publications2/PainClinicalUpdates/Archives/PCU_19-1_for_web_1390260524448_6.pdf)
20. Ruskin DN, Masino SA. The nervous system and metabolic dysregulation: Emerging evidence converges on ketogenic diet therapy [Internet]. Vol. 6, *Frontiers in Neuroscience*. Frontiers Media SA; 2012 [cited 2017 Aug 7]. p. 33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22470316>
  21. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* [Internet]. 2011 Jul 11 [cited 2019 Jan 30];194(1):7–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21746850>
  22. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2019 Jan 30];47(1):89–116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968214>
  23. Lu M-C, Ji J-A, Jiang Z-Y, You Q-D. The Keap1-Nrf2-ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update. *Med Res Rev* [Internet]. 2016 Sep [cited 2019 Jan 30];36(5):924–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27192495>
  24. Hahn GF, Oliveira JR de, Bock PM. Clinical and Biomedical Research. [Internet]. Vol. 37, *Clinical & Biomedical Research*. 2017 [cited 2019 May 4]. Available from: <https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/73884/pdf>
  25. Li S, Yang C, Fang X, Zhan G, Huang N, Gao J, et al. Role of Keap1-Nrf2 Signaling in Anhedonia Symptoms in a Rat Model of Chronic Neuropathic Pain: Improvement With Sulforaphane. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 30];9:887. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30135655>
  26. Kobayashi A, Kang M-I, Watai Y, Tong KI, Shibata T, Uchida K, et al. Oxidative and Electrophilic Stresses Activate Nrf2 through Inhibition of Ubiquitination Activity of Keap1. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2019 Jan 30];26(1):221–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354693>
  27. Martin D, Rojo AI, Salinas M, Diaz R, Gallardo G, Alam J, et al. Regulation of Heme Oxygenase-1 Expression through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway and the Nrf2 Transcription Factor in Response to the Antioxidant Phytochemical Carnosol. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Mar 5 [cited 2019 Jan 30];279(10):8919–29. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M309660200>
  28. Müller SG, Jardim NS, Quines CB, Nogueira CW. Diphenyl diselenide regulates Nrf2/Keap-1 signaling pathway and counteracts hepatic oxidative stress induced by bisphenol A in male mice. *Environ Res* [Internet]. 2018 Jul [cited 2019 Feb 4];164:280–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29554619>
  29. Ali FEM, Azouz AA, Bakr AG, Abo-youssef AM, Hemeida RAM.

- Hepatoprotective effects of diosmin and/or sildenafil against cholestatic liver cirrhosis: The role of Keap-1/Nrf-2 and P38-MAPK/NF- $\kappa$ B/iNOS signaling pathway. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2018 Oct [cited 2019 Feb 4];120:294–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30026087>
30. Wang Y, Li C, Cheng K, Zhang R, Narsinh K, Li S, et al. Activation of Liver X Receptor Improves Viability of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Attenuate Myocardial Ischemia Injury Through TLR4/NF- $\kappa$ B and Keap-1/Nrf-2 Signaling Pathways. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2014 Dec 20 [cited 2019 Feb 4];21(18):2543–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24915051>
  31. Liu L, Qian H, Yin H, He J, Zhang P, Wang Z. [Unsaturated fatty acid of *Actinidia chinensis* Planch seed oil enhances the antioxidative stress ability of rats with pulmonary fibrosis through activating Keap 1/Nrf 2 signaling pathway]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* [Internet]. 2016 Apr [cited 2019 Feb 4];32(4):479–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27053614>
  32. Wang J, Jiang C, Zhang K, Lan X, Chen X, Zang W, et al. Melatonin receptor activation provides cerebral protection after traumatic brain injury by mitigating oxidative stress and inflammation via the Nrf2 signaling pathway. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2019 Feb 4];131:345–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30553970>
  33. Padiya R, Chowdhury D, Borkar R, Srinivas R, Pal Bhadra M, Banerjee SK. Garlic Attenuates Cardiac Oxidative Stress via Activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 Pathway in Fructose-Fed Diabetic Rat. Peng T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 May 5 [cited 2019 Feb 4];9(5):e94228. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796753>
  34. Abdel-Magid AF. Therapeutic Potential for Modulation of Nrf2-Keap-1 Signaling Pathway as Treatment for Diabetes and Other Disorders. *ACS Med Chem Lett* [Internet]. 2016 Jul 14 [cited 2019 Feb 4];7(7):660–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27437072>
  35. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2013 Jan 6 [cited 2017 Aug 7];53(1):401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23294312>
  36. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents. *Med Res Rev* [Internet]. 2012 Jul [cited 2017 Aug 7];32(4):687–726. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22549716>
  37. Rosa AO, Egea J, Lorrio S, Rojo AI, Cuadrado A, López MG. Nrf2-mediated haeme oxygenase-1 up-regulation induced by cobalt protoporphyrin has antinociceptive effects against inflammatory pain in the formalin test in mice. *Pain* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2017 Aug 4];137(2):332–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964723>

38. Olayanju A, Copple IM, Bryan HK, Edge GT, Sison RL, Wong MW, 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 Radic Biol Med* [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Aug 19];78:202–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445704>
39. Arriaga AMC, De Mesquita AC, Pouliquen YBM, De Lima RA, Cavalcante SH, De Carvalho MG, et al. Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. 2002 [cited 2019 Feb 11];74(3):415–24. Available from: [www.scielo.br/aabc](http://www.scielo.br/aabc)
40. Liu X, Xu H, Zhang Y, Wang P, Gao W. Brusatol inhibits amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity in U-251 cells via regulating the Nrf2/HO-1 pathway. *J Cell Biochem* [Internet]. 2019 Jan 10 [cited 2019 Feb 4]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30629288>
41. Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, Wu T, Lau A, Toppin HA, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011;108(4):1433–8. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1014275108>
42. Xiang Y, Ye W, Huang C, Yu D, Chen H, Deng T, et al. Brusatol Enhances the Chemotherapy Efficacy of Gemcitabine in Pancreatic Cancer via the Nrf2 Signalling Pathway. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2018 [cited 2019 Feb 4];2018:2360427. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29849873>
43. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, et al. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* [Internet]. 1995 Aug [cited 2019 Jan 31];147(2):278–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7543732>
44. Wu P-S, Yen J-H, Kou M-C, Wu M-J. Luteolin and Apigenin Attenuate 4-Hydroxy-2-Nonenal-Mediated Cell Death through Modulation of UPR, Nrf2-ARE and MAPK Pathways in PC12 Cells. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2019 Jan 31];10(6):e0130599. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26087007>
45. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2013 Jan 6 [cited 2019 Jan 30];53(1):401–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23294312>
46. Suzuki T, Motohashi H, Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1–Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2013 Jun [cited 2019 Jan 30];34(6):340–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664668>
47. Jiang PY, Zhu XJ, Zhang YN, Zhou FF, Yang XF. Protective effects of apigenin on LPS-induced endometritis via activating Nrf2 signaling pathway. *Microb Pathog* [Internet]. 2018;123:139–43. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.031>
48. Huang C-S, Lii C-K, Lin A-H, Yeh Y-W, Yao H-T, Li C-C, et al. Protection by

- chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes. *Arch Toxicol* [Internet]. 2013 Jan 5 [cited 2019 Feb 3];87(1):167–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22864849>
49. Yang M, Jiang Z, Li C, Zhu Y, Li Z, Tang Y, et al. Apigenin prevents metabolic syndrome in high-fructose diet-fed mice by Keap1-Nrf2 pathway. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018 Sep [cited 2019 Feb 3];105:1283–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30021365>
  50. Paredes-Gonzalez X, Fuentes F, Jeffery S, Saw CL-L, Shu L, Su Z-Y, et al. Induction of NRF2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones apigenin and luteolin. *Biopharm Drug Dispos* [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 Feb 4];36(7):440–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25904312>
  51. Xu X, Li M, Chen W, Yu H, Yang Y, Hang L. Apigenin Attenuates Oxidative Injury in ARPE-19 Cells thorough Activation of Nrf2 Pathway. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 4];2016:1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27656262>
  52. Dor Crônica Pós-Operatória: Definição, Impacto e Prevenção. *Int Assoc Study Pain - IASP* [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 7];1–5. Available from: <https://www.iasp-pain.org/files/2017GlobalYear/FactSheets/Portuguese/4. Dor Crônica Pos-Operatoria.LavandHomme-Zahn-Pt.pdf>
  53. Duleh S, Wang X, Komirenko A, Margeta M. Activation of the Keap1/Nrf2 stress response pathway in autophagic vacuolar myopathies. *Acta Neuropathol Commun* [Internet]. 2016 Dec 31 [cited 2017 Aug 5];4(1):115. Available from: <http://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-016-0384-6>
  54. Mani Indiana Funez. Investigação dos mecanismos moleculares associados à indução da hipernocicepção persistente pela administração intraplantar de PGE2 [Internet]. 2008 [cited 2017 Aug 4]. Available from: [http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select\\_action=&co\\_obra=106341](http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=106341)
  55. Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation [Internet]. Vol. 1863, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2017 [cited 2017 Aug 5]. p. 585–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27825853>
  56. Crofford LJ. Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. *Trans Am Clin Climatol Assoc* [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug 4];126:167–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26330672>
  57. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. The ARRIVE Guidelines Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments. 2010 [cited 2018 Sep 20]; Available from: [www.nc3rs.org.uk/ARRIVE](http://www.nc3rs.org.uk/ARRIVE)

58. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* [Internet]. 1983 Jun [cited 2017 Aug 4];16(2):109–10. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0006396-198306000-00001>
59. Brasil C-M. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica - DBCA [Internet]. Resolução Normativa MCTI. 2016 [cited 2017 Aug 4]. Available from: [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0238/238684.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0238/238684.pdf)
60. Ministerio da Ciencia T e I. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA [Internet]. 2013 p. 1689–99. Available from: <http://www.ufrgs.br/ceua/normas/diretrizes-da-pratica-da-eutanasia-concea-2013>
61. WINTER CA, RISLEY EA, NUSS GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* [Internet]. 1962 Dec [cited 2019 Feb 6];111:544–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14001233>
62. Kohn DF. Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Academic Press; 1997. 426 p.
63. Vivancos GG, Verri WA, Cunha TM, Schivo IRS, Parada CA, Cunha FQ, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2018 Sep 9];37(3):391–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15060709>
64. Flecknell PA. Laboratory animal anaesthesia. 4<sup>o</sup> Ed. 2016. 350 p.
65. Equipamento para anestesia inalatória em ratos. - Bonther | Biotério, Gaiola Metabólica, Estereotáxico, Open Field, Labirinto, Y-Maze, T-Maze [Internet]. [cited 2019 Jan 2]. Available from: <https://www.bonther.com.br/saiba-mais/equipamento-para-anestesia-inalatoria-em-ratos>
66. Akimovna E, Rivera B. Anestesia em animais de experimentação [Internet]. Rio de Janeiro; 2002 [cited 2019 Jan 2]. 255–262 p. Available from: <http://books.scielo.org>
67. Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* [Internet]. 1996 Mar [cited 2017 Aug 4];64(3):493–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8783314>
68. Sadraei H, Asghari G, Khanabadi M, Minaiyan M. Anti-inflammatory effect of apigenin and hydroalcoholic extract of *Dracocephalum kotschy* on acetic acid-induced colitis in rats. *Res Pharm Sci* [Internet]. 2017 Aug [cited 2019 May 15];12(4):322. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28855944>
69. Shir Y, Seltzer Z. A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neurosci Lett* [Internet]. 1990 Jul 17 [cited 2019 Feb


- 6];115(1):62–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2216058>
70. Ren D, Villeneuve NF, Jiang T, Wu T, Lau A, Toppin HA, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Jan 25 [cited 2019 Feb 4];108(4):1433–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205897>
  71. Feng X, Yu W, Li X, Zhou F, Zhang W, Shen Q, et al. Apigenin, a modulator of PPAR $\gamma$ , attenuates HFD-induced NAFLD by regulating hepatocyte lipid metabolism and oxidative stress via Nrf2 activation. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2017;136:136–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.014>
  72. Sang Y, Zhang F, Wang H, Yao J, Chen R, Zhou Z, et al. Apigenin exhibits protective effects in a mouse model of d-galactose-induced aging via activating the Nrf2 pathway. *Food Funct* [Internet]. 2017 Jun 21 [cited 2019 Feb 4];8(6):2331–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28598487>
  73. Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J Neurosci Methods* [Internet]. 1999 Mar 1 [cited 2019 Feb 8];87(2):185–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230815>
  74. Fenwick N, Griffin G, Gauthier C. The Welfare of Animals Used in Science: How the “Three Rs” Ethic Guides Improvements. *Can Vet J La Rev Vet Can* [Internet]. 2009;50(5):523–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436640><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2671878><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436640><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2671878>
  75. Otterness IG, Moore PF. Carrageenan foot edema test. *Methods Enzymol* [Internet]. 1988 [cited 2019 Feb 8];162:320–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3226312>
  76. Laurence L. Brunton, PhD, Randa Hilal-Dandan, PhD, Björn C. Knollmann, MD P. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman - 13.ed* [Internet]. 13<sup>o</sup> edição. Artmed Editora, editor. 2018 [cited 2019 Feb 8]. 1760 p. Available from: [https://play.google.com/store/books/details?id=9WuADwAAQBAJ&rdid=book-9WuADwAAQBAJ&rdot=1&source=gbs\\_vpt\\_read&pcampaignid=books\\_books\\_earch\\_viewport](https://play.google.com/store/books/details?id=9WuADwAAQBAJ&rdid=book-9WuADwAAQBAJ&rdot=1&source=gbs_vpt_read&pcampaignid=books_books_earch_viewport)
  77. Gao AM, Ke ZP, Wang JN, Yang JY, Chen SY, Chen H. Apigenin sensitizes doxorubicin-resistant hepatocellular carcinoma BEL-7402/ADM cells to doxorubicin via inhibiting PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Carcinogenesis*. 2013;34(8):1806–14.
  78. Adefegha SA, Oyeleye SI, Okeke BM, Oboh G. Influence of eugenol on

oxidative stress biomarkers in the liver of carrageenan-induced arthritis rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* [Internet]. 2019 Mar 26 [cited 2019 Apr 14];30(2):185–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30422801>

79. Makni S, Tounsi S, Rezgui F, Trigui M, Bouassida KZ. Emex spinosa (L.) Campd. ethyl acetate fractions effects on inflammation and oxidative stress markers in carrageenan induced paw oedema in mice. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2019 Apr 24 [cited 2019 Apr 14];234:216–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30552992>


## ANEXOS

### ANEXO A - Declaração de aprovação da Comissão de ética




**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

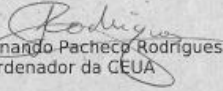
Brasília, 19 de março de 2014.



*DECLARAÇÃO*

Declaramos que o projeto intitulado “**DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DOS MECANISMOS DE CRONIFICAÇÃO DA DOR PÓS-OPERATÓRIA**”, UnBDOC n.º 10100/2014, sob responsabilidade da Professora Mani Indiana Funez foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.





Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues  
Coordenador da CEUA

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

## ANEXO B - Declaração de aprovação da Comissão de ética complementar

Brasília, 14 de junho de 2018.	 <b>Universidade de Brasília</b> Instituto de Ciências Biológicas Comissão de Ética no Uso Animal	
<b>DECLARAÇÃO</b>		
Declaramos que o projeto intitulado <b>"ESTUDO DOS MECANISMOS DE CRONIFICAÇÃO DA DOR PÓS-INCISIONAL: PAPEL DA VIA KEAP/NRF2."</b> 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: <i>Rattus norvegicus</i> (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.		