



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**FLÁVIA OLIVEIRA DE LIMA**

**ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS QUINASES  
ATIVADAS POR MITÓGENO E DO FATOR DE  
TRANSCRIÇÃO KAPPA B EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE DOR MUSCULAR  
INFLAMATÓRIA E PÓS-OPERATÓRIA**

**FLÁVIA OLIVEIRA DE LIMA**

**ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS  
POR MITÓGENO E DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO  
NUCLEAR KAPPA B EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE  
DOR MUSCULAR INFLAMATÓRIA E PÓS-OPERATÓRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Flora Villarreal  
Co-orientador: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior

Dedico esta tese aos meus pais, João e Marlene, que sempre me incentivaram e acreditaram que eu fosse capaz de conquistar tudo o que desejasse.

## Agradecimentos

Muito esforço, dedicação e superação de obstáculos me trouxeram até aqui, mas todo este empreendimento não se realizaria sem o apoio, torcida e o carinho de pessoas muito especiais. Por essa razão, deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos:

À toda minha família, em especial a meus irmãos: **Patrícia e Rafael** pelo amor, força e constante incentivo ao longo desta jornada.

À Profa. Dra. **Cristiane Flora Villarreal** pela orientação e confiança em meu trabalho.

Ao Prof. Dr. **Waldiceu Aparecido Verri Jr.** pela disponibilidade e pelas discussões científicas.

À Profa. Dra. **Milena Botelho Pereira Soares** pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório.

Ao Prof. Dr. **Thiago Mattar Cunha** pelo incentivo e pelas discussões científicas durante estes anos.

Aos Profs. Dr. **Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida**, Dra. **Tania Tavares Rodriguez**, Dra. **Luciana Lyra Casais e Silva**, Dra. **Lidércia Calvacanti R. Silva**, Dra. **Maria José Pedreira Ramalho** e Dr. **Marcos André Vannier dos Santos** pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora, atenção, e principalmente pela maneira tão gentil que me atenderam.

Aos Profs. Dr. **Lain Carvalho Pontes** e Dr. **Alberto Noronha Dutra** pelas discussões científicas, como também pela gentileza de sempre dispor seu laboratório e reagentes para a realização dos trabalhos.

À **Lucyvera Imbroinise** pela amizade e excelente competência nas resoluções administrativas.

À **Carla Martins Kaneto** pelo auxílio técnico prestado nos experimentos de PCR com tanta boa vontade.

À **Márcio Coutinho, Márcio Santos e Juliana Vasconcelos** pelo apoio técnico experimental.

À **Gisele (clô), Nanachata e Kyoshi** pela amizade sincera e apoio em todos os momentos. Agradeço por conviver com pessoas tão sensatas e íntegras como vocês.

Aos **funcionários do biotério central** do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pelo manejo cuidadoso do biotério e dos animais experimentais.

Aos amigos que conquistei no **Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia** e que, com carinho, compreensão, amizade e favores prestados, contribuíram para a realização desta etapa da minha vida.

A todos do laboratório do **LPBI** que sempre me receberam com muito carinho.

À **Helton Ricardo Carneiro Jr.**, secretário do programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEFS, pela excelente assessoria técnico-administrativa.

À **Marcele, Nuna e Liu** pela amizade, companhia nas diversas aventuras vividas, apoio, força e conselhos despendidos nos momentos que necessitei.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho

À Deus que esteve sempre comigo, iluminando cada passo e por ter colocado ao meu redor pessoas tão dignas e merecedoras de menção.

## RESUMO

A dor crônica é frequentemente associada a alterações transcricionais-funcionais nos sistemas neuronais envolvidos na transmissão e modulação da informação nociceptiva. A transcrição de várias proteínas envolvidas na dor crônica é primorosamente regulada pelo fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Considerando que o NF $\kappa$ B é um importante alvo das MAPKs (proteína quinase ativada por mitógeno), investigamos a participação das MAPKs (p38, ERK e JNK) e NF $\kappa$ B em dois modelos experimentais de dor persistente: modelo de dor muscular inflamatória e modelo de dor pós-operatória. O pré-tratamento com inibidores do NF $\kappa$ B, das MAPKs p38, ERK e JNK inibiu a hipernocicepção muscular aguda, mas não a persistente. Em adição, a inibição farmacológica do NF $\kappa$ B ou da MAPK p38, mas não da ERK ou JNK, reduziu a hipernocicepção pós-operatória. Para investigar os mecanismos pelos quais o NF $\kappa$ B contribui para a hipernocicepção pós-operatória, analisamos o efeito do PDTC, inibidor do NF $\kappa$ B sobre a produção de mediadores inflamatórios e expressão de canais para sódio envolvidos na sensibilização nociceptiva. Após a incisão cirúrgica houve um aumento nos níveis do TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>, assim como aumento na expressão gênica de canais para sódio Nav 1.8 e 1.9 nos neurônios sensoriais, sendo esses efeitos prevenidos pelo PDTC. Esses dados nos permitem propor que possivelmente a incisão cirúrgica ativa a via MAPK p38/NF $\kappa$ B que induz aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>, responsáveis pelo aumento da expressão para canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 no neurônio sensorial, gerando hiperexcitabilidade e hipernocicepção pós-operatória. Estes resultados fornecem novas evidências sobre os distintos papéis do NF $\kappa$ B e das MAPKs no desenvolvimento da dor aguda e persistente, e indicam que o NF $\kappa$ B pode ser um alvo farmacológico interessante para o tratamento da dor pós-operatória.

**Palavras Chave:** MAPks. NF $\kappa$ B. Sinalização intracelular. Dor pós-operatória. Dor muscular. Dor crônica.

## ABSTRACT

Chronic pain is often associated with transcriptional and functional changes in neural systems involved in the transmission and modulation of nociceptive information. The transcription of several proteins involved in chronic pain is regulated by the transcription factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). Furthermore, NF $\kappa$ B is an important target of MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase). Therefore, it was investigated the involvement of MAPKs (p38, ERK and JNK) and NF $\kappa$ B in two experimental models of persistent pain: inflammatory muscle pain and postoperative pain models. Pre-treatment with inhibitors of NF $\kappa$ B and MAPKs (p38, ERK and JNK) reduced the acute muscle hypernociception, but not persistent hypernociception. In addition, pharmacological inhibition of NF $\kappa$ B or p38 MAPK but not ERK and JNK, reduced postoperative hypernociception. To investigate the mechanisms by which NF $\kappa$ B contributes to postoperative hypernociception, we analyzed the effect of PDTC, an NF $\kappa$ B inhibitor, on the production of inflammatory mediators and expression of sodium channels involved in nociceptive sensitization. The incision elevated the levels of TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub> as well as increased the expression of sodium channels Nav 1.8 and 1.9 in sensory neurons, these effects being were neutralized by PDTC. These data suggest that the surgical incision activates the p38 MAPK/NF $\kappa$ B pathway, which increases the expression of TNF- $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>, responsible for the up regulation of sodium channels Nav 1.8 and Nav 1.9 in sensory neuron resulting in neuronal hyperexcitability and postoperative hypernociception. These results provide new evidence on the distinct roles of NF $\kappa$ B and MAPKs in the development of acute and persistent pain, and indicate that NF $\kappa$ B may be an interesting pharmacological target for the treatment of postoperative pain.

**Keywords:** MAPks. NF $\kappa$ B. Intracellular signaling. Postoperative pain. Muscle pain. Chronic pain.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b>	<b>Efeito da administração intramuscular do CFA sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos.</b>	<b>57</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA</b>	<b>59</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor da p38 na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA</b>	<b>61</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor da JNK na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA</b>	<b>63</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor da ERK na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA</b>	<b>65</b>
<b>Figura 6</b>	<b>Efeito do tratamento com o inibidor do NFκB na hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA</b>	<b>67</b>
<b>Figura 7</b>	<b>Efeito do tratamento com os inibidores de MAPKs na hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA.</b>	<b>69</b>
<b>Figura 8</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB no modelo de dor pós-operatória.</b>	<b>72</b>
<b>Figura 9</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB na produção local de citocinas no modelo de dor pós-operatória.</b>	<b>74</b>
<b>Figura 10</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB na produção local da prostaglandina E<sub>2</sub> no modelo de dor pós-operatória.</b>	<b>76</b>
<b>Figura 11</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB sobre a expressão dos RNAm de IL-1β, TNF-α e PGE<sub>2</sub> nos gânglios das raízes dorsais (GRD) em modelo de dor pós-operatória.</b>	<b>78</b>
<b>Figura 12</b>	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB na expressão de canais para sódio Nav1.8 e Nav 1.9 nos gânglios das raízes dorsais (GRD) em modelo de dor pós-operatória.</b>	<b>81</b>
<b>Figura 13</b>	<b>Efeito do tratamento com os inibidores das MAPKs no modelo de dor pós-operatória.</b>	<b>84</b>
<b>Figura 14</b>	<b>Curva de dose-resposta do inibidor da p38 no modelo de dor pós-operatória.</b>	<b>86</b>



## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

$\mu\text{g}$  - micrograma

$\mu\text{L}$  - microlitro

A $\delta$  - A delta

AMPC - 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina

Anova - análise de variância

CCL3- quimiocina ligante 3

CFA - Adjuvante Completo de Freund

cg - carragenina

cm - centímetro

COX - ciclooxigenase

DMSO - dimetilsulfóxido

EPM - erro padrão da média

ERK - quinase regulada pelo sinal extracelular

FGF- fator de crescimento de fibroblastos

g - grama

GRD - gânglio da raiz dorsal

h - hora

IASP - International Association for Study of Pain (Associação Internacional para o Estudo da dor)

JNK - proteína quinase c-Jun N-terminal

IL-1 $\beta$  - interleucina 1 beta

IL-6 - interleucina 6

IL-8 - interleucina 8

IL-15 - interleucina 15

i.m.- intramuscular

i.p.- intraperitoneal

i.pl. - intraplantar

kg - kilograma

L4 - Lombar 4

L5 - Lombar 5

L6 - Lombar 6

MAPKs - proteínas quinase ativadas por mitógenos

mg - miligrama

min - minuto

mL - mililitro

mm - milímetro

m/s - metros por segundo

Na<sup>+</sup> - sódio

NFκB - fator nuclear kappa B

ng - nanograma

NO - óxido nítrico

ODN-AS - oligodeoxinucleotídeo antisense

P-ERK - ERK fosforilada

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDTC - Pirrolidina ditiocarbamato

PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub>

PGs - prostaglandinas

PKA - proteína quinase dependente de AMPc

PKC - proteína quinase C

RNA<sub>m</sub> - RNA mensageiro

s.c.- subcutâneo

TGF- fator transformador de crescimento

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

TTX-R - canais para sódio resistentes à tetrodotoxina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Dor</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Dor crônica</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Dor muscular</b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Dor pós-operatória</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais experimentais</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Modelo de dor pós-operatória</b>	<b>41</b>
<b>4.3</b>	<b>Modelo de dor muscular inflamatória</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação do limiar nociceptivo</b>	<b>43</b>
<b>4.5</b>	<b>Quantificação de citocinas</b>	<b>44</b>
<b>4.6</b>	<b>Determinação da produção de prostaglandina</b>	<b>45</b>
<b>4.7</b>	<b>Procedimento para retirada dos gânglios das raízes dorsais</b>	<b>45</b>
<b>4.8</b>	<b>Extração do RNA e análise PCR em Tempo Real</b>	<b>46</b>
<b>4.9</b>	<b>Protocolos experimentais</b>	<b>47</b>
<b>4.10</b>	<b>Drogas e diluentes</b>	<b>54</b>
<b>4.11</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>56</b>
	<b>5.1 Modelo de dor muscular de origem inflamatória</b>	
<b>5.1.1</b>	<b>Efeito da administração intramuscular do CFA sobre o limiar</b>	<b>56</b>

	<b>nociceptivo mecânico de camundongos</b>	
5.1.2	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA</b>	58
5.1.3	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor da p38 na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA</b>	60
5.1.4	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor da JNK na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA</b>	63
5.1.5	<b>Efeito do pré-tratamento com o inibidor da ERK na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA</b>	64
5.1.6	<b>Efeito do tratamento com o inibidor do NFκB na hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA</b>	66
5.1.7	<b>Efeito do tratamento com os inibidores das MAPKs na hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA</b>	68
	<b>5.2 Modelo de dor pós-operatória</b>	
5.2.1	<b>Efeito do inibidor do NFκB no modelo de dor pós-operatória em camundongos</b>	71
5.2.2	<b>Efeito do inibidor do NFκB sobre a produção local de citocinas no modelo de dor pós-operatória</b>	73
5.2.3	<b>Efeito do inibidor do NFκB sobre a produção local da PGE<sub>2</sub> no modelo de dor pós-operatória</b>	75
5.2.4	<b>Efeito do inibidor do NFκB sobre a produção do TNF-α e da COX-2 no GRD de camundongos no modelo de dor pós-operatória</b>	77
5.2.5	<b>Efeito do inibidor do NFκB sobre a expressão de canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 no GRD de camundongos em modelo de dor pós-operatória.</b>	80
5.2.6	<b>Efeito do tratamento com os inibidores das MAPKs no modelo de dor pós-operatória</b>	83
5.2.7	<b>Curva de dose-resposta da MAPK p38 no modelo de dor pós-operatória</b>	86
6	<b>DISCUSSÃO</b>	87
7	<b>CONCLUSÕES</b>	102
	<b>REFERÊNCIAS</b>	103

## 1. INTRODUÇÃO

A dor aguda é transitória e paradoxalmente representa um mecanismo fisiológico de defesa contra danos teciduais. A dor crônica, entretanto, pode ocorrer na ausência de dano tecidual e persistir mesmo após a resolução do processo inicial. Uma pesquisa publicada no início da década confirma no Brasil uma tendência mundial: a sociedade moderna padece de dor. No Brasil, 1/3 das consultas médicas ocorre devido à presença de dor, sintoma encontrado em 70% dos pacientes (TEIXEIRA et al., 2001). Na cidade de Salvador-Bahia, estima-se que 41,4% da população sofrem de dor crônica (SÁ et al., 2008), dado que demonstra a alta prevalência e coloca o Brasil como um dos países mais acometidos por esse problema (HARSTALL & OSPINA, 2003). Nos Estados Unidos, os números são impressionantes: mais de 116 milhões de pessoas sofrem de dor crônica, o que representa 700 milhões de dias de trabalho perdidos por ano com custo médio de 600 bilhões de dólares anuais (IOM, 2011). Embora a dor resulte em alta morbidade e elevado custo social ela permanece pobremente compreendida.

A dor crônica pode estar associada a mecanismos fisiopatológicos duradouros, os quais diferem muito daqueles decorrentes da dor aguda. Tratamento mais eficiente da dor crônica requer maior compreensão dos eventos que levam a cronificação. Atividade nociceptiva intensa ou repetida induz alterações funcionais duradouras nas vias nociceptivas que podem determinar a evolução de episódios de dor aguda para quadros de dor crônica (WOOLF & SALTER, 2000). Nesse contexto, a dor decorrente de eventos como incisões cirúrgicas e processos inflamatórios, inicialmente de fácil controle farmacológico, requer grande atenção, uma vez que pode evoluir para estados de dor crônica resistente aos tratamentos convencionais.

A dor crônica está frequentemente associada a alterações anatomo-funcionais do sistema nervoso central e periférico, como o aumento da excitabilidade neuronal e mudanças drásticas no fenótipo celular, com uma série de alterações neuroquímicas e de expressão gênica (REN & DUBNER, 1999). Dessa forma, é possível que a ativação contínua de proteínas quinases e consequente ativação de fatores de transcrição sejam responsáveis por alterações duradouras na transcrição gênica e síntese de proteínas que promovem facilitação nociceptiva e estados de dor crônica.

Evidências recentes indicam que as proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) estão envolvidas na patogênese da inflamação, plasticidade neuronal e sensibilização nociceptiva. As MAPKs são proteínas quinase ativadas pela fosforilação dos resíduos treonina/tirosina (WIDMANN et al., 1999), responsáveis pela transmissão dos sinais extracelulares para o núcleo, onde a transcrição de genes específicos é induzida pela fosforilação e ativação de fatores de transcrição (SEGER & KREBS, 1995). Há pelo menos três famílias distintas de MAPKs em mamíferos, incluindo as quinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK), quinase c-Jun N-terminal (JNK) e p38. As MAPKs foram inicialmente classificadas como reguladores de proliferação e diferenciação celular, mas evidências recentes indicam seu papel na sensibilização nociceptiva, hiperalgesia e dor crônica (KENNEY & KOCSIS, 1998; JI et al., 1999; SAMMONS et al., 2000; ALEY et al., 2001; JI et al., 2002; SVENSSON et al., 2003a,b; OBATA et al., 2004; SWEITZER et al., 2004; DOYA et al., 2005; MIZUSHIMA et al., 2005).

As MAPKs ativam diversos fatores de transcrição, entre eles o fator de transcrição nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), que regula a transcrição e síntese de diversas proteínas envolvidas na dor e inflamação. O NF $\kappa$ B funcionalmente ativo é um

heterodímero constituído de subunidades da família Rel (Rel A ou p65, p50, p52, c-Rel,  $\nu$ -Rel e Rel B). Quando inativo, o NF $\kappa$ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibidora, o I $\kappa$ B, que impede sua translocação para o núcleo (GHOSH et al., 1998). Diferentes estímulos causam a rápida fosforilação do I $\kappa$ B, principalmente pela ação da I $\kappa$ B quinase (IKK), liberando o NF $\kappa$ B. A dissociação do complexo I $\kappa$ B/ NF $\kappa$ B permite o transporte do NF $\kappa$ B para o núcleo celular onde induz, após sua ligação com o elemento  $\kappa$ B, a estimulação ou inibição de diversos genes, incluindo os genes envolvidos na dor inflamatória (BAEUEERLE & BALTIMORE, 1996).

O interesse crescente pelo estudo do NF $\kappa$ B provém da enorme quantidade de genes e de processos celulares por ele regulados, tais como desenvolvimento, plasticidade, transmissão sináptica, morte e defesa celular. Há substanciais evidências de que a ativação persistente do NF $\kappa$ B tem papel essencial na manutenção da dor inflamatória. Entre os genes regulados por este fator podemos citar vários envolvidos com a dor e a inflamação: proteinoquinases, óxido nítrico sintase, ciclooxigenase (COX), citocinas, moléculas de adesão, moléculas dos complexos de histocompatibilidade, proteínas de fase-aguda, dinorfina, entre outros (BARNES & ADCOCK, 1997; O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997). A observação de que o aumento na expressão do NF $\kappa$ B na medula espinal lombar ocorre paralelamente a hiperalgesia inflamatória periférica em ratos reforça esta idéia (CHAN et al., 2000).

De fato, a participação do NF $\kappa$ B na indução e manutenção da dor tem sido demonstrada. Diversos estudos demonstram que o tratamento com diferentes inibidores do NF $\kappa$ B ou IKK, assim como a sua deleção gênica reduz a hipernocicepção térmica e mecânica induzida por diferentes estímulos inflamatórios (LAUGHLIN et al., 2000; LEE et al., 2004; TEGEDER et al., 2004; NIEDERBERGER

et al., 2007; MÖSER et al., 2011). Além disso, foi demonstrado o envolvimento do NFκB no modelo de dor neuropática, uma modalidade de dor crônica. Ma & Bisby (1998) observaram que a ativação de NFκB está aumentada em gânglios das raízes dorsais (GRD) de ratos após a ligadura do nervo ciático. Em concordância com essa observação, à administração de um inibidor da via NFκB reduz a hiperalgesia causada por constrição crônica do nervo ciático (SAKAUE et al., 2001). Em adição, a regulação da síntese de citocinas pelo NFκB reforça seu envolvimento com dor crônica, uma vez que a sensibilização dos nociceptores pelos mediadores inflamatórios finais é secundária à liberação de citocinas pró-inflamatórias (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991), e que citocinas participam também da fisiopatologia da neuropatia (MA & BISBY, 1998; SAKAUE et al., 2001). Em conjunto, esses dados apontam importante contribuição do NFκB para a manutenção da dor persistente.

Entretanto, sabendo que a fisiopatologia da dor difere entre tecidos acometidos, estímulo e cronicidade, este trabalho tem como objetivo avaliar os mecanismos intracelulares envolvidos na geração e manutenção dos quadros da dor inflamatória muscular e da dor pós-operatória. A melhor compreensão dos aspectos fisiopatológicos poderá prover a base para o delineamento de tratamentos mais efetivos para essas condições, assim como para a identificação de alvos farmacológicos que favoreçam ao desenvolvimento de novos fármacos.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Dor

Do ponto de vista fisiológico, dor pode ser definida, de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos que sugerem tal dano” (MERSKEY, 1994). Portanto, dor é uma experiência complexa e subjetiva, que envolve a percepção dos estímulos nocivos pelo sistema nervoso central quando as vias sensoriais nociceptivas são estimuladas, mas que também depende de um componente emocional afetivo, incluindo a atenção e a aprendizagem (BONICA, 1990).

O componente emocional afetivo, em função da subjetividade, apresenta grande dificuldade de avaliação nos animais, por conseguinte o termo nocicepção é utilizado para definir a percepção do estímulo nociceptivo, na qual os receptores que detectam e sinalizam esses estímulos nocivos são classificados como nociceptores. Após um estímulo nocivo intenso ou persistente, alterações nos limiares nociceptivos podem ser detectadas sendo descritas como alodinia (dor decorrente de um estímulo que normalmente não provoca dor) e hiperalgesia (resposta exacerbada a um estímulo doloroso). Contudo, devido a grande controvérsia na literatura sobre a adequação da utilização desses termos na experimentação animal, foi sugerido o termo hipernocicepção para designar aumento da resposta nociceptiva comportamental em condições experimentais (PARADA et al., 2003). O termo hipernocicepção evita extrapolações diretas de resultados obtidos com

experimentação em animais para a clínica, e portanto, será utilizado no presente trabalho.

A dor inicia-se com um estímulo potencialmente nocivo ou destrutivo. A habilidade de detectar tais estímulos pelo sistema somatosensorial é um mecanismo de proteção muito importante que envolve a interação de vários mecanismos periféricos e centrais. A detecção destes estímulos é dependente da ativação de neurônios sensoriais especializados e da transmissão da informação nociceptiva para o sistema nervoso central. Os nociceptores são terminações nervosas livres de neurônios sensoriais primários, que são neurônios pseudo-unipolares não mielinizados (fibras C) ou pouco mielinizados (fibras A $\delta$ ), cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais e nos gânglios trigeminais (MILLAN, 1999). Em condições fisiológicas normais, os nociceptores possuem limiares de ativação específicos que os distinguem de outros tipos de receptores mecânicos e térmicos, uma vez que são excitáveis apenas por estímulos nociceptivos, como calor nocivo, pressão intensa ou substâncias químicas irritantes, mas não por estímulos não nocivos (JULIUS & BASBAUM, 2001). As fibras C são fibras finas, com velocidade de condução de cerca de 1 m/s e que respondem a estímulos nociceptivos de origem térmica, mecânica ou química; sendo, por isso chamadas de polimodais. Já as fibras A delta (A $\delta$ ) de velocidade de condução mais rápida, cerca de 5 a 30 m/s, respondem preferencialmente a estímulos nociceptivos térmicos e mecânicos e com menos intensidade a estímulos químicos (MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001). Outra classe de nociceptores, denominada de “nociceptores silenciosos”, tem sido descrita. Esta classe de nociceptores apresenta limiar de excitabilidade muito elevado e em situações normais não respondem a estímulos térmicos ou mecânicos. Entretanto, durante um processo inflamatório se tornam

excitáveis, aumentando o recrutamento de fibras envolvidas na sensação de dor, o que implica em uma diminuição do limiar nociceptivo do tecido inflamado (SCHAIBLE & SCHMIDT, 1988; MCMAHON & KOLTZENBURG, 1990).

O estímulo nociceptivo ativa os nociceptores, que convertem a informação nociceptiva em potenciais de ação que são conduzidos ao longo dos nervos espinais ou cranianos aos neurônios de segunda ordem e terceira ordem no sistema nervoso central. Os nociceptores que transmitem a informação nociceptiva de estruturas cranianas fazem sinapses diretamente com os neurônios secundários em núcleos do tronco cerebral. Já os localizados nos membros, tronco e vísceras conduzem a informação nociceptiva para o sistema nervoso central através da raiz dorsal da medula espinal, onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem. Os neurônios de segunda ordem podem ser interneurônios ou neurônios de projeção que cruzam a medula espinal e ascendem formando os tratos ascendentes de transmissão da dor. Os tratos ascendentes levam a informação de dor, direta ou indiretamente, ao tálamo, que posteriormente se projeta para o córtex cerebral, região responsável pela identificação de qualidade, intensidade e localização da dor e para o sistema límbico, onde os aspectos emocionais e afetivos são integrados na experiência da percepção da dor (NOBACK et al., 1996; LOESER & MELZACK., 1999).

Além das vias ascendentes de transmissão e do processamento da dor, existem vias descendentes de modulação da dor. Essas vias se originam em vários níveis do encéfalo, como tronco encefálico, hipotálamo, córtex e tálamo (MILLAN, 2002). As vias descendentes foram consideradas durante décadas como um sistema endógeno de analgesia. Entretanto, uma das descobertas mais interessantes a respeito da modulação descendente da dor é que essa pode tanto inibir quanto

facilitar a transmissão nociceptiva (JULIUS & BAUSBAUM, 2001; MILLAN, 2002), indicando que são vias envolvidas, paradoxalmente, tanto na analgesia endógena quanto na manutenção da dor crônica.

Em resumo, a transmissão de estímulos nociceptivos desde a periferia até os centros cerebrais é um processo complexo, onde circuitos em diferentes níveis têm a capacidade de modular a passagem dos impulsos nervosos alterando, portanto, a resposta à estimulação nociva. Assim, o balanço entre a atividade dos circuitos excitatórios e inibitórios determinará a amplitude da dor.

## **2.2 Dor crônica**

A dor pode ser classificada, de acordo com um critério temporal, em aguda e crônica. A dor aguda é uma resposta causada por uma lesão de tecido com consequente ativação dos nociceptores no local da lesão, caracterizando-se por ter duração equivalente ao tempo de resolução do processo causal. Além disso, a dor aguda é geralmente de fácil identificação e tratamento, possuindo também caráter protetor, através da limitação da movimentação e da sobrecarga de atividade sobre o tecido, para evitar maiores danos e facilitar a cicatrização (LOESER & MELZACK, 1999; BRENNAN et al., 2007). Por outro lado, a dor crônica geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, ou seja, esse tipo de dor pode não desaparecer mesmo quando a lesão inicial foi resolvida, persistindo por meses ou anos, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (LOESER, 2003; BRENNAN et al., 2007; COSTIGAN et al., 2009). A dor crônica nem sempre tem uma causa identificável, não tem função fisiológica óbvia e deixa de ser um sintoma para ser considerada a doença em si. De acordo com esses conceitos, fica claro que a

classificação da dor em aguda ou crônica reflete diferenças muito mais profundas do que apenas o curso temporal.

A dor crônica tem alta prevalência mundial, representando um problema de saúde pública com alto custo médico e social. Estima-se que 41,4% da população de Salvador-BA sofrem de dor crônica (SÁ et al., 2008), dado que demonstra a alta prevalência e coloca o Brasil como um dos países mais acometidos por esse problema (HARSTALL & OSPINA, 2003). No Brasil, estudo realizado em pacientes com dor crônica, verificou que 94,9% apresentavam comprometimento da atividade profissional, acarretando um sério prejuízo econômico e social (TEIXEIRA et al., 1995). Nos Estados Unidos, os números são impressionantes: mais de 116 milhões de pessoas sofrem de dor crônica, o que representa 700 milhões de dias de trabalho perdidos por ano com custo médio de 600 bilhões de dólares anuais (IOM, 2011). Entretanto, embora a dor resulte em alta morbidade e elevado custo social ela permanece pobremente compreendida.

A dor crônica está associada com alterações adaptativas em vários níveis do sistema nervoso. Pode-se destacar alterações de neuroplasticidade, tais como sensibilização, desinibição dos neurônios inibitórios do corno dorsal, reorganização do circuito neuronal do corno dorsal e alterações nos mecanismos de facilitação e inibição descendente da dor, que ocasiona respostas persistentes e exageradas à dor (PORRECA et al., 2002). Tendo em vista que estes eventos são dependentes da intensidade e da duração do estímulo, quanto mais persistente for o processo doloroso, mais difícil se torna seu controle (BESSON, 1999; WOOLF & SALTER, 2000; ZIMMERMANN, 2001).

Uma injúria tecidual, induzida por incisão cirúrgica ou substâncias químicas irritantes, produz aumento da sensibilidade das vias de detecção e condução da dor,

que poderá levar ao desenvolvimento de estados de dor persistente ou crônica. Do ponto de vista eletrofisiológico, esta sensibilização é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade neuronal necessário para a produção de potenciais de ação, pelo aumento de atividade espontânea e aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiais (RIEDEL & NEECK, 2001). A sensibilização dos nociceptores pode decorrer da produção e liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1 e IL-6), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), bradicinina e ATP, por células não neuronais (fibroblastos, mastócitos, neutrófilos, macrófagos) bem como pelas terminações dos neurônios sensoriais primários. Esses mediadores têm sido implicados no processo de sensibilização da dor e o seu mecanismo de ação tem sido intensivamente investigado (NICOL et al., 1992; WOOLF & COSTIGAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001; BHAVE & GEREAU, 2004; JI & STRICHARTZ, 2004; HUCHO & LEVINE, 2007; WOOLF & MA, 2007).

Dentre os mediadores considerados hiperalgésicos/hipernociceptivos finais da dor, pode-se destacar as prostaglandinas (PGs), que são substâncias produzidas pela ação da COX utilizando-se do ácido araquidônico como substrato (FERREIRA & VANE, 1967; FUNK, 2001; IVANOV & ROMANOVSKY, 2004). A habilidade das prostaglandinas em sensibilizar diretamente os nociceptores foi observada em humanos e animais, com a utilização de técnicas eletrofisiológicas e comportamentais (FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1978; MARTIN et al., 1987). Tem sido descrito que a liberação das PGs, geralmente, é precedida pela liberação de mediadores hiperalgésicos/hipernociceptivos intermediários (CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2005). Entre os mediadores intermediários destacam-se as citocinas como sendo os mediadores que possuem um papel melhor caracterizado na

hipernocicepção inflamatória (VERRI JR et al., 2006). Estes mediadores que, a princípio, pareciam ser importantes apenas no recrutamento de leucócitos (neutrófilos) para o local da lesão, mostraram-se relevantes também na gênese da dor.

As citocinas mais estudadas na hipernocicepção são TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (VERRI JR et al., 2006). Foi demonstrado, tanto em ratos, quanto em camundongos, que a inibição da ação dessas citocinas, seja por anticorpos, receptores solúveis ou proteínas ligadoras, ou ainda sua deleção gênica, diminui a hipernocicepção em modelos experimentais, indicando a relevância desses mediadores nos quadros agudos, sobretudo nos quadros de dor persistente (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991; 1992; MAIER et al., 1993; WOOLF et al., 1997; LORENZETTI et al., 2002; MILLIGAN et al., 2004; CUNHA et al., 2005; WOLF et al., 2008).

Atualmente acredita-se que a hipernocicepção induzida por mediadores inflamatórios seja mediada pela modulação de canais iônicos, que regulam a excitabilidade neuronal e propagação do potencial de ação, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da dor (BHAVE & GEREAU, 2004). Os canais para sódio dependentes de voltagem controlam a geração e propagação do potencial de ação. Vários tipos desses canais são expressos nos neurônios sensoriais. Farmacologicamente, eles são subdivididos em canais para sódio sensíveis à tetrodotoxina (TTX-S) e canais para sódio resistentes à tetrodotoxina (TTX-R). Os canais para sódio TTX-R, denominados Nav 1.8 e Nav 1.9, têm sido apontados como críticos na gênese de dores persistentes (AKOPIAN et al., 1996; DIB-HAJJ et al., 1998; BHAVE & GEREAU, 2004; WOOD et al., 2004). Ambos os canais são expressos essencialmente em neurônios sensoriais (KHASAR et al., 1998), e sua expressão e distribuição são alteradas em resposta a uma inflamação ou injúria do

nervo (CUMMINS & WAXMAN, 1997; NOVAKOVIC et al., 1998; AMAYA et al., 2000; FANG et al., 2002; DJOUHRI et al., 2003; GOLD et al., 2003). Foi observado que a deleção de genes Nav 1.8 e Nav 1.9 ou sua inibição farmacológica reduz marcadamente a hipernocicepção inflamatória (AKOPIAN et al., 1999; PRIEST et al., 2005; AMAYA et al., 2006; EKBERG et al., 2006; JARVIS et al., 2007) e neuropática (LAI et al., 2002; ROZA et al., 2003; PRIEST et al., 2005; AMAYA et al., 2006; JARVIS et al., 2007). Os canais para sódio Nav 1.8 e Nav. 1.9 participam da geração do potencial de ação (JEFTINIJA, 1994) e modulam a excitabilidade celular, e portanto, qualquer interferência na sua ativação pode contribuir para o desenvolvimento e manutenção da dor (LAI et al., 2002; TANAKA et al., 1998).

O aumento da função de canais iônicos, que contribui para a manutenção da dor, pode ocorrer rapidamente (em minutos) por regulação pós-translacional via fosforilação, e por regulação transcricional (em horas até mesmo dias) aumentando a transcrição do próprio canal ou de moléculas pró-nociceptivas que favorecem sua ativação. Ambas as regulações, pós-translacionais e transcricionais, nos neurônios sensoriais requerem a ativação de proteínas quinases via transdução de sinalização intracelular (JI et al., 2008).

As MAPKs são proteínas quinases ativadas pela fosforilação dos resíduos treonina/tirosina (WIDMANN et al., 1999), responsáveis pela transmissão dos sinais extracelulares para o núcleo, onde a transcrição de genes específicos é induzida pela fosforilação e ativação de fatores de transcrição (SEGER & KREBS, 1995). Portanto, as MAPKs representam uma família de moléculas sinalizadoras intracelulares, evolutivamente conservadas e compostas por três membros: quinases reguladas pelo sinal extracelular (ERK), proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK) e p38 (JOHNSON & LAPADAT, 2002). As MAPKs foram inicialmente



classificadas como reguladores de proliferação e diferenciação celular, mas evidências recentes indicam seu papel na sensibilização nociceptiva, hiperalgesia e dor crônica (KENNEY & KOCSIS, 1998; JI et al., 1999, 2002; SAMMONS et al., 2000; ALEY et al., 2001; SVENSSON et al., 2003a,b; OBATA et al., 2004; SWEITZER et al., 2004; DOYA et al., 2005; MIZUSHIMA et al., 2005).

A ERK foi a primeira MAPK identificada, a qual pode ser fosforilada por atividade neural persistente ou outros diversos estímulos patológicos (JI & WOOLF, 2001). Evidências demonstram o envolvimento da ERK na plasticidade neuronal e na hiperalgesia (JI et al., 1999). Diversos estímulos nocivos (térmicos e mecânicos) induzem a ativação (fosforilação) da ERK em neurônios do corno dorsal da medula espinal, sendo esta relacionada a atividade nociceptiva (JI et al., 1999). A intensidade e duração do estímulo nociceptivo é um determinante da indução da fosforilação da ERK, pois foi visto que o aumento da temperatura nociva de 45°C para 55°C está relacionada ao aumento dos neurônios marcados com a p-ERK (JI et al., 1999). Do mesmo modo, um breve estímulo mecânico nocivo (menor que 10 segundos) não é suficiente para ativar a ERK (WEI et al., 2006), enquanto estímulos nocivos persistentes produzidos por formalina (KARIM et al., 2001), CFA (JI et al., 2002 ; ADWANIKAR et al., 2004), veneno de escorpião (PANG et al., 2008) e monoartrite (CRUZ et al., 2005) induz a fosforilação da ERK, sugerindo assim que a ERK é ativada por estímulos nociceptivos persistentes. A ERK, de fato, parece participar do desenvolvimento e manutenção da dor persistente, já que o tratamento com inibidores da ativação da ERK inibe o comportamento nociceptivo em diversos modelos experimentais de dor persistente, como: dor neuropática (ZHUANG et al., 2005), dor inflamatória induzida pela injeção do Adjuvante Completo de Freund (CFA) (JI et al., 2002; ADWANIKAR et al., 2004) e monoartrite articular (CRUZ et al.,

2005). Provavelmente, a ERK tem importante papel no desenvolvimento e manutenção da dor pela regulação da transcrição gênica, que é importante para manutenção da sensibilização central. Foi verificado que a ERK é capaz de ativar fatores de transcrição e induzir a transcrição de genes que mantêm a plasticidade neural pela formação de novas sinapses e produzem mediadores pró-inflamatórios e nociceptivos tais como a PGE<sub>2</sub> (LONZE & GINTY, 2002).

A JNK, outra MAPK, também conhecida como proteína quinase ativada por estresse (SAPK), possui importante papel na neurodegeneração e apoptose, como também no desenvolvimento e na manutenção da dor crônica (ZHUANG et al., 2006). Diversos estímulos como, estresse, citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento (FGF e TGF) e ativação de receptores Toll-like (TLR-4 e TLR-9) induzem a ativação da JNK (WESTON & DAVIS, 2007) em neurônios sensoriais primários e na medula espinal (JI et al., 2006; POLLOCK et al., 2002). A ativação da JNK parece importante para o desenvolvimento da dor neuropática, já que o tratamento com o inibidor da JNK no GRD preveniu o desenvolvimento do comportamento nociceptivo mecânico induzido pela ligadura do nervo espinal (ZHUANG et al., 2006). Além da injúria do nervo, o processo inflamatório também pode causar a ativação da JNK. Foi observado que a injeção de capsaicina, o CFA e a endotelina-1 induzem hipernocicepção, sendo esta prevenida pelo tratamento com o inibidor da JNK (SP600125) (DOYA et al., 2005; MOTTA et al., 2006), sugerindo a participação da JNK na hipernocicepção inflamatória. O papel da JNK na sensibilização nociceptiva parece estar associado com o fato de que a ativação da JNK regula a transcrição gênica via ativação de fatores de transcrição. Consequentemente, a JNK pode regular a síntese de mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, óxido nítrico, PGE<sub>2</sub> que contribuem para o processo de

sensibilização periférica e central (WATKINS & MAIER, 2003; FALSIG et al., 2004; JI & STRICHARTZ, 2004; KAWASAKI et al., 2007).

A p38 é um membro da família de MAPK envolvida em amplas funções celulares e frequentemente associada a condições patológicas. A p38 é uma serina/treonina quinase que transduz estímulos extracelular em respostas transcricional e pós-translacional intracelular (WIDMANN et al., 1999; ONO & HAN, 2000). Estudos têm demonstrado que a p38 possui importante papel no processamento da dor pela regulação da sensibilização periférica e espinal iniciada por estímulos inflamatórios (JI et al., 2002; SVENSSON et al., 2003a,b) e neuropático (JIN et al., 2003; SVENSSON et al., 2003; OBATA et al., 2004; TSUDA et al., 2004).

Diferentes laboratórios tem demonstrado aumento da ativação da p38 na medula espinal após ligadura do nervo espinal (JIN et al., 2003; TSUDA et al., 2004; KATSURA et al., 2006), lesão de nervo (WEN et al., 2007), ligadura parcial do nervo ciático (CLARK et al., 2007), injúria da medula espinal (HAINS & WAXMAN, 2006) e incisão cirúrgica (WEN et al., 2009). Além disso, o tratamento com inibidores da p38 atenua o comportamento nociceptivo em diferentes modelos de dor persistente, como diversos modelos de dor neuropática (JIN et al., 2003; MILLIGAN et al., 2003; SCHAFERS et al., 2003; TSUDA et al., 2004; HAINS & WAXMAN, 2006) e de dor pós operatória (WEN et al., 2009). A p38 parece contribuir no processo de sensibilização através do aumento da expressão de diversos mediadores, como IL-1 $\beta$  (JI & SUTER, 2007), iNOS (SUNG et al., 2005), COX-2 e PGE<sub>2</sub> (SVENSSON et al., 2003), possivelmente por ativação de fatores de transcrição.

Como vimos acima, as MAPKs exercem seus efeitos sobre a sensibilização nociceptiva em parte por ativar fatores de transcrição. Estudos têm demonstrado que

as MAPKs ativam o fator de transcrição nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), que regula a transcrição e síntese de diversas proteínas envolvidas na dor e inflamação (GOEBELER et al., 2001; TAMURA et al., 1998). O NF $\kappa$ B funcionalmente ativo é um heterodímero constituído de subunidades da família Rel (Rel A ou p65, p50, p52, c-Rel,  $\nu$ -Rel e Rel B). Quando inativo, o NF $\kappa$ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, o I $\kappa$ B, que impede a translocação para o núcleo (GHOSH et al., 1998). Várias isoformas de I $\kappa$ B foram caracterizadas, sendo a mais abundante e estudada a I $\kappa$ B $\alpha$ . Diferentes estímulos causam a rápida fosforilação do I $\kappa$ B, principalmente pela ação do I $\kappa$ B quinase (IKK), liberando o NF $\kappa$ B. A dissociação do complexo I $\kappa$ B/ NF $\kappa$ B permite o transporte do NF $\kappa$ B para o núcleo celular onde induz, após sua ligação com o elemento  $\kappa$ B, a estimulação ou inibição de diversos genes, incluindo os genes envolvidos na sensibilização e na dor (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996).

O interesse crescente pelo estudo do NF $\kappa$ B provém da enorme quantidade de genes e processos celulares por ele regulados, tais como desenvolvimento, plasticidade, transmissão sináptica, morte e defesa celular. Há substanciais evidências de que a ativação persistente de NF $\kappa$ B tem papel essencial na manutenção da dor inflamatória. Entre os genes regulados por este fator podemos citar vários envolvidos com dor e inflamação: proteinoquinases, óxido nítrico sintase, ciclooxigenase, citocinas, moléculas de adesão, moléculas dos complexos de histocompatibilidade, proteínas de fase-aguda, dinorfina, entre outros (BARNES & ADCOCK, 1997; O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997). A observação de que o aumento na expressão de NF $\kappa$ B na medula espinal lombar ocorre paralelamente a hiperalgesia inflamatória periférica em ratos reforça esta idéia (CHAN et al., 2000). A partir da observação de que glicocorticóides medeiam, pelo menos em parte, seus

efeitos anti-inflamatórios pela inibição de NF $\kappa$ B (AUPHAN et al., 1995), o qual está envolvido na inflamação crônica, este fator tem emergido como um interessante alvo farmacológico para controle da inflamação e da dor (D'ACQUISTO et al., 2002). De fato, a via NF $\kappa$ B já foi identificada como alvo para a ação analgésica e anti-inflamatória de agentes como aspirina e salicilatos (YIN et al., 1998; ROSSI et al., 2000; CRONSTEIN et al., 1999). Vários relatos recentes demonstraram, com a utilização de diferentes procedimentos experimentais, que o bloqueio específico da via NF $\kappa$ B resulta em efeito benéfico em várias patologias inflamatórias e inibidores de NF $\kappa$ B têm sido usados com sucesso no controle clínico da inflamação aguda e crônica (CUZZOCREA et al., 2002). Além do efeito antiinflamatório, o efeito antinociceptivo da inibição de NF $\kappa$ B foi também demonstrado. Tegeder et al. (2004) demonstraram que injeções intraperitoneais do inibidor de I $\kappa$ B quinase, que reduz a translocação e ativação de NF $\kappa$ B, reduz a hipernocicepção inflamatória induzida pela injeção intraplantar de zimosan em ratos. O tratamento intratecal com diferentes inibidores de NF $\kappa$ B, reduz a hipernocicepção térmica e mecânica induzida pela administração intratecal de dinorfina em camundongos (LAUGHLIN et al., 2000) ou intraplantar de CFA em ratos (LEE et al., 2004). O envolvimento do NF $\kappa$ B na dor neuropática, outra modalidade de dor crônica, também foi descrito. Ma & Bisby (1998) observaram que a ativação de NF $\kappa$ B está aumentada em GRD de ratos após a ligadura do nervo ciático. Em concordância com essa observação, injeções endoneuriais de um inibidor da via NF $\kappa$ B na região lesionada do nervo ciático por constrição crônica reduz a hiperalgesia (SAKAUE et al, 2001). Em adição, a regulação da síntese de citocinas pelo NF $\kappa$ B reforça seu envolvimento na dor crônica, uma vez que a sensibilização dos nociceptores pelos mediadores inflamatórios finais é secundária à liberação de citocinas pró-inflamatórias

(FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991), e que citocinas participam também da fisiopatologia da neuropatia (MA & BISBY, 1998; SAKAUE et al, 2001). Em conjunto, esses dados apontam importante contribuição do NFκB para a manutenção da dor persistente. Entretanto, a real contribuição desse fator de transcrição nos eventos que determinam a transição da dor aguda para os estados de dor crônica, não foi ainda determinada.

O tratamento mais eficiente da dor crônica requer maior compreensão dos eventos que levam a cronificação. A atividade nociceptiva intensa ou repetida induz alterações funcionais duradouras nas vias nociceptivas que podem determinar a evolução de episódios de dor aguda para quadros de dor crônica (WOOLF & SALTER, 2000). Nesse contexto, a dor decorrente de eventos como incisões cirúrgicas e processos inflamatórios, inicialmente de fácil controle farmacológico, requer grande atenção uma vez que pode evoluir para estados de dor crônica resistente aos tratamentos convencionais. Nessa categoria se encaixam as dores pós-operatórias e musculares, que representam tipos prevalentes de dores crônicas na clínica e cujos mecanismos fisiopatológicos são pouco compreendidos.

### **2.3 Dor muscular**

A dor de origem muscular é um sintoma com alta prevalência, atingindo uma importante parcela da população economicamente ativa, tornando-se assim um problema econômico, além de social e de saúde pública. Diante disso, a IASP lançou em outubro de 2009 o Ano Mundial Contra a Dor Muscular. Esta campanha representou um importante passo para o estudo científico da dor muscular, já que objetivou gerar uma maior consciência entre os pesquisadores de saúde, os líderes

governamentais e o público em geral sobre a dor muscular e seu impacto substancial sobre os pacientes em todo o mundo (GEBHART, 2009).

Uma característica dos diversos tipos de dor muscular é a presença da sensibilidade muscular (MENSE et al., 1993). O desenvolvimento da sensibilidade muscular decorre da sensibilização dos nociceptores musculares (HOHEISEL et al., 2005), por mediadores inflamatórios endógenos, como bradicinina, serotonina, histamina e prostaglandinas (MENSE et al., 1996). Uma vez sensibilizados, os nociceptores passam a exibir aumento da atividade espontânea, diminuição do limiar de ativação e aumento da responsividade à estimulação nociva (DUBNER & BENNETT, 1983). Estas modificações melhoram o desempenho das vias nociceptivas aumentando a sensibilidade para estímulos nocivos (hiperalgesia) e permitem que estímulos inócuos passem a ser interpretados como dolorosos (alodinia). As alterações funcionais podem persistir mesmo após a finalização da lesão ou estímulo nocivo, caracterizando estados de dor crônica. De fato, clinicamente é observado que pacientes com mialgia (dor muscular) apresentam um aumento da sensibilidade à palpação e ao movimento muscular, indicativo de redução do limiar nociceptivo mecânico, sendo, portanto um critério utilizado para o diagnóstico de certas síndromes de dor muscular, incluindo fibromialgia e síndrome de dor miofacial (LAUTENBACHER et al., 1994).

Estudos recentes demonstraram que as fibras musculares são capazes de produzir várias citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, e IL-15, em resposta à lesão muscular resultante de intensas contrações musculares após a realização do exercício físico, atividade intimamente relacionada com o desenvolvimento da dor muscular (STEENBERG et al., 2000; ROSENDAL et al., 2005; PEDERSEN et al., 2007; GERDLE et al., 2008). Além disso, altos níveis de citocinas inflamatórias foram

observados em muitas condições musculares dolorosas, incluindo miopatia inflamatória (LEPIDI et al., 1998; LUNDBERG, 2000) e fibromialgia (MAES et al., 1999; WALLACE et al., 2001). Em função desses achados clínicos, diversos trabalhos realizados em roedores buscaram demonstrar o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na nocicepção muscular (SCHÄFERS et al., 2003; LORAM et al., 2007; DINA et al., 2008; MANJAVACHI et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que injeção intramuscular de estímulos inflamatórios inespecíficos, como por exemplo a carragenina (cg), induz hipernocicepção muscular pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (LORAM et al., 2007; ONO et al., 2007). De fato, a participação de citocinas pró-inflamatórias na hipernocicepção muscular foi comprovada pelo fato de que injeção intramuscular de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, são capazes de diminuir o limiar nociceptivo dos animais (BEYREUTHER et al., 2007; DINA et al., 2008; MANJAVACHI et al., 2010). Corroborando esses dados, recentemente Manjavachi et al. (2010) relataram que a injeção intramuscular de IL-6 induz hipernocicepção muscular pela ativação de células residentes e aumento de migração de neutrófilos, com consequente liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8.

Atualmente, acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela liberação e produção dos mediadores finais, PGs e aminas simpáticas. O TNF- $\alpha$ , induz a produção de IL-6 e IL-1 $\beta$ , que estimulam a formação de produtos da COX através da indução enzimática da COX-2, resultando principalmente na produção de PGE<sub>2</sub>. O TNF- $\alpha$  também é capaz de induzir a liberação de quimiocinas como IL-8 em humanos, que estimulam a liberação/produção das aminas simpáticas (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991,1992; LORENZETTI et al., 2002; POOLE et al., 1999). Esse achado também foi demonstrado em modelo de dor muscular



inflamatória por Manjavachi et al. (2010), que observaram uma redução da hipernocicepção inflamatória muscular após tratamento com inibidores de COX ou agente bloqueador simpaticomimético, reforçando assim a hipótese de que as PGs e as aminas simpáticas exercem efeito importante na sensibilização de nociceptores durante a dor muscular.

Com relação às vias de sinalização intracelulares, poucos estudos abordando dor muscular estão disponíveis. Recentemente, a participação das MAPKs na hipernocicepção muscular foi sugerida. Manjavachi et al. (2010) demonstraram com o uso de inibidores seletivos que a cascata de MAPK dependente de Ras está envolvida na hipernocicepção muscular induzida por IL-6, entretanto esses dados não foram reforçados em novos estudos. Tendo em vista a necessidade de fortalecer o conhecimento sobre os mecanismos de dor muscular, nossa proposta foi investigar a participação de MAPKs e NFkB na gênese da hipernocicepção muscular aguda e crônica.

## **2.4 Dor pós-operatória**

A dor pós-operatória resultante de injúrias cirúrgicas representa um problema clínico significativo. Acredita-se que 30-40% dos pacientes submetidos à toracotomia, cirurgia de revascularização do miocárdio, correção de hérnia inguinal, cesariana, amputações de membros, de mama e vesícula biliar ou cirurgias de pulmão sofrem de dor moderada a grave durante o período pós-operatório, apesar do uso de diversos medicamentos disponíveis (PERKINS & KEHLE, 2000). Normalmente, os pacientes relatam dor em repouso, sendo esta exacerbada por tosse, deambulação e estímulo mecânico (MOINICHE et al., 1997). Recentemente,

foi feito uma correlação que revela que a intensidade da dor aguda pós-operatória prediz o aparecimento de dor crônica (PERKINS & KEHLE, 2000), complicando frequentemente o processo de recuperação após a cirurgia (PAVLIN et al., 2002), prolongando a hospitalização e predispondo a uma maior morbidade e mortalidade após a cirurgia (BRENNAN et al, 1996). Portanto, otimizar o controle da dor pós-operatória torna-se importante.

A fisiopatologia da dor pós-operatória ainda é mal compreendida. Estudos revelam que diferentes mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos na dor causada por inflamação, lesão de nervos ou pela incisão, explicando porque muitas estratégias terapêuticas são eficazes somente contra algumas formas de dor persistente (ZAHN et al., 2002). Assim, com a finalidade de compreender melhor a fisiopatologia da dor pós-operatória, foi desenvolvido um modelo experimental de dor pós-operatória, que consiste de uma incisão na região plantar da pata de ratos (BRENNAN et al., 1996), que foi posteriormente adaptado para camundongos, já que camundongos transgênicos são instrumentos poderosos para a pesquisa experimental (POGATZKI & RAJA, 2003). Esse modelo experimental é caracterizado por aumento da sensibilidade mecânica após incisão cirúrgica com duração de vários dias e é correspondente à dor pós-operatória em humanos. Vários estudos utilizando este modelo de dor pós-operatória têm sugerido que o aumento de sensibilidade mecânica depois da incisão possui características únicas, que diferem de outros modelos patológicos de dor (HONORE et al, 2006; POGATZKI & RAJA, 2003; ZAHN & BRENNAN, 1998).

Estudos experimentais e clínicos demonstram que na dor pós-operatória ocorre o aumento da sensibilidade mecânica, o qual envolve os fenômenos de hiperalgesia primária e secundária, sugerindo envolvimento de sensibilização

periférica e central (RICHMOND et al., 1993; TVERSKOY et al., 1994; BRENNAN et al., 1996; STUBHAUG et al., 1997). A sensibilização periférica conduz aos fenômenos de alodinia, onde estímulos inócuos passam a ser interpretados como dolorosos, e hiperalgesia primária, aumento da sensibilidade para estímulos nociceptivos no local da lesão, provocando aumento na resposta ao estímulo térmico e mecânico na área da incisão. Ela envolve as fibras aferentes primárias e é caracterizada pela redução do limiar de ativação dos nociceptores, aumento da magnitude da resposta para estímulos supralimíares e aumento da atividade espontânea (DUBNER & BENNETT, 1983; BRENNAN et al, 2005). Essas alterações na sensibilidade dos nociceptores ocasionadas pela lesão tecidual associada ao procedimento cirúrgico podem levar à sensibilização central, que pode ser definida como um aumento da excitabilidade de neurônios da medula espinal, o qual contribui para o aparecimento do fenômeno de hiperalgesia secundária, aumento da sensibilidade para estímulos dolorosos gerados em locais adjacentes a lesão, e pode contribuir para severidade da dor pós-operatória (ZAHN et al., 2002; BRENNAN et al, 2005). Por ser a sensibilização central, um importante agravante da dor pós-operatória, alguns pesquisadores e clínicos propõem que o bloqueio da transmissão do estímulo nocivo na medula espinal antes da lesão tecidual reduziria a dor pós-operatória de forma mais efetiva do que o bloqueio após a lesão (ZAHN et al., 2002), por reduzir a sensibilização. Entretanto, a identificação do melhor tratamento pré-operatório permanece indefinido, porque os mecanismos específicos que conduzem a maior sensibilidade à dor (alodinia e hiperalgesia) no pós-operatório ainda são incertos.

Os nociceptores das fibras A $\delta$  e C são sensibilizados pela injúria tecidual decorrente da incisão e desempenham um importante papel na manutenção da

hiperalgesia após a incisão cirúrgica (POGATZKI et al., 2002). Em diversos modelos de dor, as PGs, mediadores produzidos pela ação da enzima COX sobre o ácido araquidônico (FERREIRA & VANE, 1967), têm sido consideradas responsáveis pela sensibilização dos nociceptores (FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1978, 1990; NAKAMURA & LICO, 1986; NAKAMURA & FERREIRA, 1987). De fato, parece que as PGs participam da sensibilização dos nociceptores pós-incisão, já que o tratamento com inibidores da COX atenuam a dor pós-operatória (KOKKI, 2003; ROMSING & MOINICHE, 2004; CHEN et al., 2004; GAJRAJ & JOSHI, 2005). Entretanto, não há um consenso na literatura sobre qual isoforma de COX participa da dor pós-operatória (YAMAMOTO & SAKASHITA, 1999; YAMAMOTO et al., 2000; KROIN et al., 2002; ZHU et al., 2003; KAMERMAN et al., 2007).

Durante a inflamação, as PGs se ligam a receptores específicos e estimulam uma via intracelular promovendo a fosforilação, e conseqüente ativação de canais para sódio resistentes à tetrodotoxina (TTX-R), alterando a excitabilidade neuronal (GOLD, 1999). Os canais TTX-R, Nav 1.8 e Nav 1.9, são expressos essencialmente em neurônios sensoriais (KHASAR et al., 1998), e em condições fisiológicas participam da geração do potencial de ação (JEFTINIJA, 1994). Após estímulos nociceptivos intensos ou repetidos, os canais TTX-R tornam-se mais ativos produzindo hiperexcitabilidade celular e contribuindo para a hipernocicepção (TANAKA et al., 1998; LAI et al., 2002). Uma maior expressão dos canais para sódio TTX-R tem sido vista em paciente com hiperalgesia crônica (COWARD et al., 2000, 2001; YIANGOU et al., 2000). Ma et al. (2008) verificaram que o tratamento com celecoxib, inibidor seletivo da COX-2, reduz a dor pós-operatória por diminuição da densidade da corrente iônica dos canais para sódio TTX-R em neurônios do GRD. Esses resultados confirmam que as PGs modulam a atividade dos canais TTX-R e

indicam que esses canais são importantes para a manutenção da dor pós-operatória. Por outro lado, analisando a contribuição do canal de sódio Nav 1.8 na dor pós-operatória, Joshi et al. (2006) observaram que o tratamento dos animais com oligodeoxinucleotídeo antisense (ODN-AS) para Nav 1.8 não reduziu a hipernocicepção. Assim, provavelmente outro canal de sódio TTX-R, Nav 1.9, deve contribuir para a indução e a manutenção da dor pós-operatória.

Recentemente, tem sido demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela liberação de prostaglandinas. Atualmente, acredita-se que TNF- $\alpha$ , induz a produção de IL-6 e IL-1 $\beta$ , que estimulam a formação de produtos da COX através da indução enzimática da COX-2, resultando principalmente na produção de PGE<sub>2</sub> (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991,1992; POOLE et al., 1999; LORENZETTI et al., 2002).

No local da ferida cirúrgica, observa-se o aumento de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, CCL3, em decorrência da lesão tecidual resultante da incisão (BUVANENDRAN et al., 2006; LORAM et al., 2007). Esses mediadores têm importante papel na cura da ferida cirúrgica, no combate à infecção, mas por outro lado parecem contribuir para a dor pós-operatória (LORAM et al., 2007), provavelmente por induzir a expressão de PGs (FERREIRA et al., 1988, 1993; CUNHA et al., 1991,1992; POOLE et al., 1999; LORENZETTI et al., 2002). Entretanto, o papel dessas citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento e manutenção da dor pós-operatória ainda é pobremente compreendido.

Apesar das evidências sobre a contribuição de mediadores inflamatórios para a dor pós-operatória, muito pouco se sabe sobre as vias de sinalização intracelulares envolvidas na sensibilização nociceptiva durante esses quadros de dor. Assim, nossa proposta é investigar possíveis mecanismos moleculares

envolvidos no processo de sensibilização da dor pós-operatória, visando melhor compreensão de sua fisiopatologia e identificar alvos farmacológicos que favoreçam o desenvolvimento de fármacos mais eficazes para o seu controle.

Sabendo que diferentes vias de sinalização intracelular contribuem para os distintos estados de dor e tendo em vista que a fisiopatologia da dor difere entre tecidos acometidos e cronicidade, este trabalho tem como objetivo avaliar a participação das MAPKs e do fator de transcrição NFκB na geração e manutenção dos quadros da dor inflamatória muscular e da dor pós-operatória. A melhor compreensão dos aspectos fisiopatológicos poderá prover a base para o delineamento de tratamentos mais efetivos para essas condições, assim como para a identificação de alvos farmacológicos que favoreçam o desenvolvimento de novos fármacos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar as vias de sinalização intracelulares envolvidas em modelos experimentais de dor persistente.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar o perfil dose e tempo resposta da hipernocicepção mecânica desencadeada pela injeção de adjuvante completo de Freund no músculo gastrocnêmio de camundongos.
- ✓ Investigar a participação da cascata de sinalização intracelular das MAPKs (p38, ERK e JNK) em modelo de dor muscular inflamatória.
- ✓ Investigar a participação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB) em modelo de dor muscular inflamatória.
- ✓ Investigar a participação da cascata de sinalização intracelular das MAPKs (p38, ERK e JNK) em modelo de dor pós-operatória.
- ✓ Investigar a participação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB) em modelo de dor pós-operatória.
- ✓ Investigar o efeito da inibição do NFκB sobre a produção das citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), e da prostaglandinas E<sub>2</sub> no modelo de dor pós-operatória.
- ✓ Investigar a participação de canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 em neurônios aferentes primários no modelo de dor pós-operatória.

- ✓ Investigar o efeito da inibição do NFκB sobre a expressão de canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 em neurônios aferentes primários no modelo de dor pós-operatória.



## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Animais experimentais**

Os experimentos foram realizados utilizando-se de camundongos Swiss machos (22 a 28 g), provenientes do biotério central do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM). Os camundongos permaneceram cerca de dois dias no biotério de experimentação do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, sob condições de temperatura (22-24°C) e umidade (55-60%) controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso à ração e água, antes de serem submetidos aos ensaios biológicos.

Todos os procedimentos para manejo, uso e acondicionamento dos camundongos estão de acordo com as recomendações da IASP para estudo da dor em animais de experimentação (ZIMMERMANN, 1983) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPqGM, sob protocolos 026/2009 e 011/2011. O número de animais e a intensidade dos estímulos foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

### **4.2 Modelo de dor pós- operatória**

O procedimento para incisão plantar foi adaptado de Pogatzki & Raja (2003). Os camundongos foram anestesiados inicialmente numa câmara de anestesia contendo uma mistura de 3% de oxigênio e 2% de isoflurano. Após a perda do reflexo de endireitamento, os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal e a anestesia foi mantida com 1,5% de isoflurano aplicado com máscara inalatória

para camundongos. Depois da indução da anestesia, foi realizada antissepsia com iodo povidona a 10% na pele glabra da superfície plantar do membro posterior direito do animal. Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal de 0,8 mm com lâmina de bisturi número 11, abrangendo pele e fáscia da região plantar da pata traseira direita. A incisão foi iniciada a 2 mm da borda do calcanhar e estendida em direção aos dedos. Posteriormente, o músculo plantar foi elevado, com uma pinça curva, preservando a origem e a inserção muscular. A pele do tecido plantar foi reposicionada, pressionada delicadamente para promover hemostasia, seguido imediatamente de sutura da pele com dois pontos com fio cirúrgico 6-0 acoplado a agulha 1,3 cm. O tempo total de duração da cirurgia foi de aproximadamente 3 minutos. Após o procedimento cirúrgico, a anestesia foi interrompida e os camundongos foram alojados em caixas para a recuperação da anestesia. Os grupos controle foram submetidos aos mesmos procedimentos, entretanto não foi realizada a incisão.

O limiar nociceptivo foi avaliado pelo método *up and down*, conforme previamente descrito por Chaplan (1994) em todos os grupos experimentais antes (basal) e em diversos tempos após a indução do modelo.

### **4.3 Modelo de dor muscular inflamatória**

Para indução do modelo de dor músculo-esquelética inflamatória, os camundongos receberam uma única injeção de Adjuvante Completo de Freund (CFA; 3, 10, 30  $\mu$ L) ou salina (30  $\mu$ L) no músculo gastrocnêmio direito. Todas as injeções foram realizadas em camundongos anestesiados com isoflurano 2%.

O limiar nociceptivo foi avaliado pelo método *up and down*, conforme previamente descrito por Chaplan (1994) em todos os grupos experimentais antes (basal) e em diversos tempos após a indução do modelo.

#### **4.4 Avaliação do limiar nociceptivo**

O limiar de resposta ao estímulo mecânico foi medido com filamentos de von Frey, que consistem de segmentos de fio de nylon cuja rigidez à tensão é previamente determinada em gramas pelo fabricante (Stoelting, Chicago, EUA). Foram utilizados sete filamentos correspondentes às seguintes forças em gramas: 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 0,6; 1; 1,4; 2 e 4, sendo o filamento de partida aquele correspondente a 0,6 gramas. Os camundongos foram postos em caixas de acrílico transparente, elevadas sobre um espelho, com fundo em tela de arame galvanizado que permite acesso à superfície plantar da pata. Os camundongos permaneceram nas caixas para adaptação por um período de trinta minutos. O método de leitura por filamentos de von Frey foi feito conforme previamente descrito por Chaplan *et al.* (1994). Esse método é denominado *up and down*, por considerar um total de seis respostas consecutivas iniciando, após o estímulo mecânico com o filamento, em que o animal muda do comportamento não responsivo (negativo), interpretado como não nociceptivo, ao comportamento responsivo (positivo), detectado pelo movimento de retirada da pata ou *flinch*. A partir desta resposta negativa/positiva foram registradas mais quatro respostas, respeitando-se sempre o princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo (filamento) inferior, enquanto que uma resposta negativa é sempre seguida por um estímulo (filamento) superior.

Nessa técnica, cada filamento é utilizado por seis segundos e apenas quando o animal está ativo. Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 17:00 h.

O resultado obtido considera o valor logaritmo da força proporcionada pelo último filamento ( $X_f$ ), o valor obtido de acordo com cada padrão de respostas positivas e negativas ( $k$ ) e a média da diferença entre os estímulos em unidades logarítmicas ( $\delta$ ), sendo expresso como 50% do limiar nociceptivo em gramas, ou seja, a força do filamento no qual o animal responde em 50% das apresentações, conforme fórmula a seguir:

$$50\% \text{ gramas Limiar} = \frac{(10^{[X_f + k\delta]})}{10.000}$$

#### **4.5 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

As concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme previamente descrito (DE LIMA et al., 2011). Para isso, 2, 4, 24, 48 horas após a indução do modelo de dor pós-operatória, os camundongos foram profundamente anestesiados e o tecido plantar foi removido. Em seguida, o tecido foi homogeneizado em 500  $\mu$ L de tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20, 0,1 mM de fluoreto de feniltimetilsulfonil (PMSF), 0,1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 0,01 mg/ml de aprotinina A, e centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e estocado para posterior análise (-70 °C). Os níveis teciduais de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram quantificados utilizando-se de kits de ELISA (R&D System, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as placas de

microtitulação foram recobertas e incubadas com os respectivos anticorpos de captura diluídos em PBS durante 15-18h a 4°C. Após esse período de incubação, as placas foram lavadas com PBS + 0,1% Tween 20 e bloqueadas durante 1h à temperatura ambiente com BSA 1%. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por um período de 12h à 4°C com as amostras e suas respectivas curvas padrão.

Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas com o respectivo anticorpo de detecção por 1h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e 50 µL de avidina-HRP foi adicionado a cada poço, sendo incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas e adicionados 50 µL do substrato dihidroclorato 1,2 fenilodiamina diluído em tampão fosfato contendo 0,4µg/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Após 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 490 nm. Como controle, as concentrações dessas citocinas foram determinadas em camundongos não manipulados (naive).

#### **4.6 Determinação da produção de prostaglandina E<sub>2</sub>**

As amostras dos tecidos plantares foram coletadas 4h após a incisão em 0,5 mL de tampão contendo inibidores de enzima e inibidor da cicloxigenase (indometacina). Depois de homogeneizar as amostras com auxílio do Polytron, estas foram centrifugadas (20 min, 2000 g, 4 °C), e o sobrenadante foi analisado por radio imunensaio para determinar a concentração de PGE<sub>2</sub> (WALLACE et al., 1988).

#### **4.7 Procedimento para retirada dos gânglios das raízes dorsais**

Os camundongos foram anestesiados (Tiopental sódico, 50 mg/Kg, i.p.) para retirada dos GRD (L4, L5). Após anestesia, foram colocados em mesa cirúrgica própria e realizado tricotomia da região dorso-lombar seguido de assepsia e anti-sepsia da região com iodo povidona. Foi feita incisão póstero-mediana, seguida de abertura por planos até a lâmina óssea e feita laminectomia para expor e visualizar a medula espinal e os GRDs na sua emergência. Depois de retirados, os GRDs foram imediatamente congelados em gelo seco e posteriormente processados, para análise de PCR em tempo real.

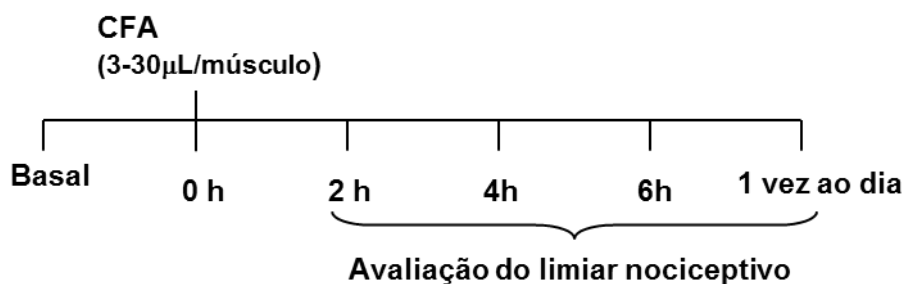
#### **4.8 Extração de RNA e análise de PCR em Tempo Real**

Materiais plásticos e soluções livres de RNase foram usados em todo o procedimento. Os GRDs foram homogeneizados em 1mL de reagente Trizol (Gibco - BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y.) e a extração do RNA total foi realizada de acordo com as orientações do fabricante e a concentração foi determinada por medição fotométrica utilizando o aparelho NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Em seguida 1 mg do RNA total foi transcrito por ação da enzima transcriptase reversa utilizando-se do kit *High Capacity Reverse Transcription* (Applied Biosystems). O cDNA assim obtido foi usado para análise da expressão quantitativa dos genes TNF- $\alpha$  (Mm 00443258\_m1), IL-1 $\beta$  (Mm 00434228\_m1), COX-2 (Mm 01307329\_m1), *Nav 1.8* (Mm 00501467\_m1) e *Nav 1.9* (Mm 00449377\_m1 ) em reações de PCR em Tempo Real. À reação de amplificação de qRT-PCR contendo 20 ng da amostra de cDNA, 5,0  $\mu$ L Taqman Master Mix (Applied Biosystems) foram adicionadas as sondas de hidrólise Taqman (Applied Biosystems) acima indicadas em quantidade suficiente para completar o volume final de 10  $\mu$ L. Todas as reações foram

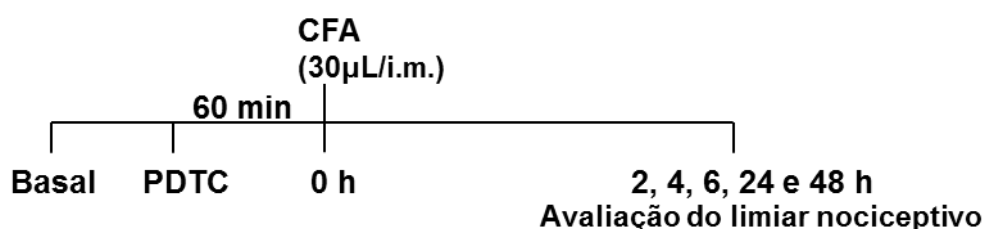
realizadas em duplicata no Sistema de Detecção ABI7500 Sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sob condições do padrão de ciclagem térmica. Os valores médios de Ct (Cycle threshold) foram usados para calcular a expressão do gene estudado, com normalização ao controle interno (*GAPDH* - Mm 9999915\_g1) usando a fórmula  $2^{-DCt}$ . Amostras com coeficiente de variação maior que 5% foram excluídas. Um controle sem amostra (NTC) e outro sem a enzima para transcrição reversa (No-RT) também foram incluídos. Devido às pequenas dimensões dos GRDs os estudos foram feitos em pools de gânglios coletados de 4 camundongos.

#### 4.9. Protocolos Experimentais

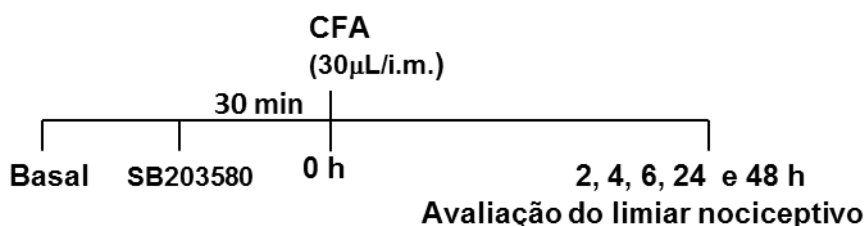
**4.9.1 Indução do modelo de dor muscular inflamatória:** Os camundongos receberam injeções de CFA no músculo gastrocnêmio direito, em volumes de 3, 10 e 30  $\mu\text{L}$ . O limiar nociceptivo foi avaliado antes (basal), 2, 4 e 6 horas após a injeção de CFA, e em seguida a cada 24h até o retorno do limiar nociceptivo aos valores basais. Como controle os camundongos receberam solução salina 0,9% intramuscular (i.m.).



**4.9.2 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB, PDTC, no modelo de dor muscular inflamatória:** Os camundongos foram pré-tratados (1 hora antes da administração de CFA) com injeções intraperitoneais (i.p.) do inibidor do NFκB (PDTC; 11, 33 e 100 mg/kg; 200 μL em salina 0,9%). O grupo controle recebeu 200 μL de solução salina 0,9% i.p. O limiar nociceptivo foi avaliado antes (basal), 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção de CFA.

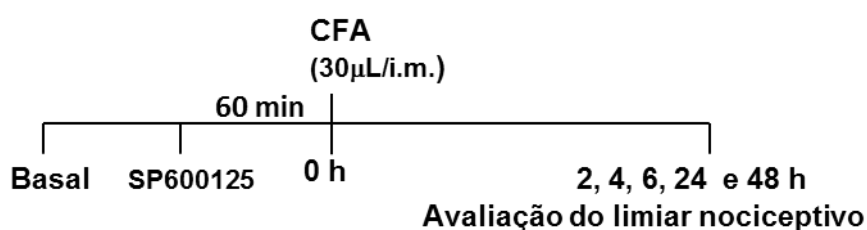


**4.9.3 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor da MAPK p38, SB203580, no modelo de dor muscular inflamatória:** Os camundongos foram pré-tratados (30 minutos antes da administração de CFA) com injeções i.p. do inibidor da MAPK p38 (SB203580; 2,5, 5 e 10 mg/kg; 200 μL em salina 0,9% + 2,5% de DMSO). O grupo controle recebeu 200 μL de solução salina 0,9% + 2,5% de DMSO por via i.p. O limiar nociceptivo foi avaliado antes (basal), 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção de CFA.

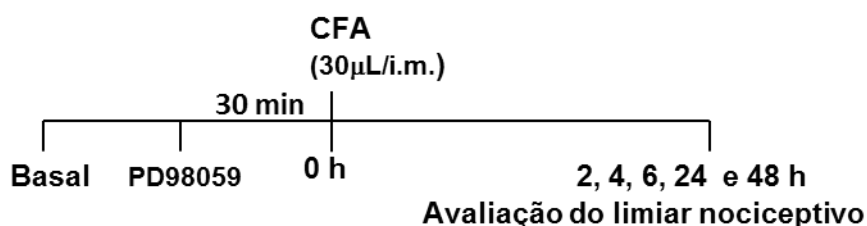




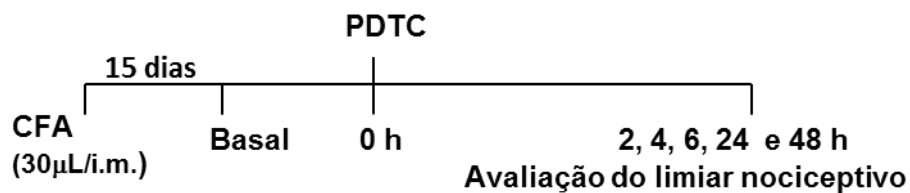
**4.9.4 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor da MAPK JNK, SP600125, no modelo de dor muscular inflamatória:** Os camundongos foram pré-tratados (60 minutos antes da administração de CFA) com injeções subcutâneas (s.c.) do inibidor da MAPK JNK (SP600125; 3, 10 e 30 mg/kg; 200  $\mu$ L em salina 0,9% + 2,5% de DMSO). O grupo controle recebeu 200  $\mu$ L de solução salina 0,9% + 2,5% de DMSO por via s.c. O limiar nociceptivo foi avaliado antes (basal), 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção de CFA.



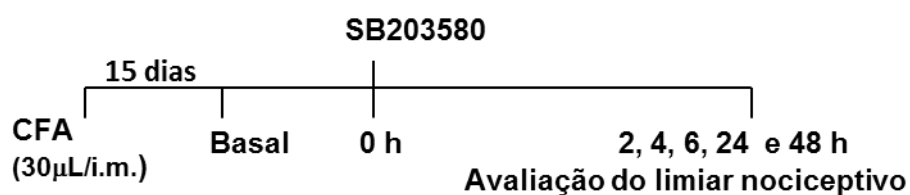
**4.9.5 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor da MAPK ERK, PD98059, no modelo de dor muscular inflamatória:** Os camundongos foram pré-tratados (30 minutos antes da administração de CFA) com injeções s.c. do inibidor da MAPK ERK (PD98059; 0,3, 1 e 3 mg/kg; 200  $\mu$ L em salina 0,9% + 2,5% de DMSO). O grupo controle recebeu 200  $\mu$ L de solução salina 0,9% + 2,5% de DMSO por via s.c. O limiar nociceptivo foi avaliado antes (basal), 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção de CFA.



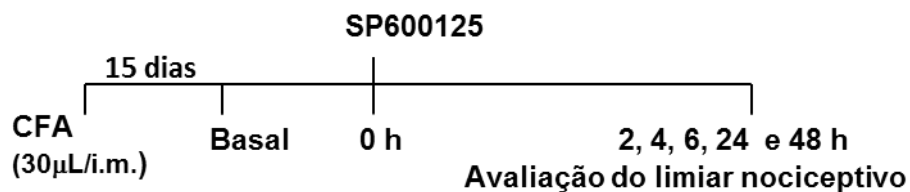
**4.9.6 Avaliação do efeito do tratamento com o inibidor do NFκB, PDTC, no modelo de dor muscular inflamatória crônica:** Os camundongos foram tratados com injeção intraperitoneal do inibidor do NFκB (PDTC; 100mg/kg; 200 μL em salina 0,9%), 15 dias após a administração intramuscular de CFA. O grupo controle recebeu 200 μL de solução salina 0,9% por via i.p. O limiar nociceptivo foi avaliado antes do tratamento com PDTC (basal), 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção do PDTC.



**4.9.7 Avaliação do efeito do tratamento com o inibidor da MAPK p38, SB203580, no modelo de dor muscular inflamatória crônica:** Os camundongos foram tratados com injeção i.p. do inibidor do MAPK p38 (SB203580; 10mg/kg; 200 μL em salina 0,9% + 2,5% de DMSO), 15 dias após a administração i.m. de CFA. O grupo controle recebeu 200 μL de solução salina 0,9% + 2,5% de DMSO por via intraperitoneal. O limiar nociceptivo foi avaliado antes do tratamento com SB203580 (basal), 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção do SB203580.



**4.9.8 Avaliação do efeito do tratamento com o inibidor da MAPK JNK, SP600125, no modelo de dor muscular inflamatória crônica:** Os camundongos foram tratados com injeção s.c. do inibidor do MAPK JNK (SP600125; 30mg/kg; 200  $\mu$ L em salina 0,9% + 2,5% de DMSO), 15 dias após a administração i.m. de CFA. O grupo controle recebeu 200  $\mu$ L de solução salina 0,9% + 2,5% de DMSO por via s.c. O limiar nociceptivo foi avaliado antes do tratamento com SP600125 (basal), 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção do SP600125.



**4.9.9 Avaliação do efeito do tratamento com o inibidor da MAPK ERK, PD98059, no modelo de dor muscular inflamatória crônica:** Os camundongos foram tratados com injeção s.c. do inibidor do MAPK ERK (PD98059; 3mg/kg; 200  $\mu$ L em salina 0,9% + 2,5% de DMSO), 15 dias após a administração i.m. de CFA. O grupo controle recebeu 200  $\mu$ L de solução salina 0,9% + 2,5% de DMSO por via s.c. O limiar nociceptivo foi avaliado antes do tratamento com PD98059 (basal), 2, 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção do PD98059.



**4.9.10 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB, PDTC, no modelo de dor pós-operatória:** Os camundongos foram pré-tratados (1 hora antes do procedimento cirúrgico) com injeção i.p. do inibidor do NFκB (PDTC; 25, 50 e 100 mg/kg; 200 μl em solução salina 0,9%). O grupo controle recebeu 200 μL de solução salina 0,9% por via i.p. O limiar nociceptivo foi avaliado antes do tratamento com PDTC (basal), 2 h, 6 h, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias após a incisão.



**4.9.11 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB, PDTC, na concentração de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β na pata de camundongos no modelo de dor pós-operatória:** Os camundongos foram pré-tratados (1 hora antes do procedimento cirúrgico) com injeção i.p. do inibidor do NFκB (PDTC; 25, 50 e 100 mg/kg; 200 μl em solução salina 0,9%). O grupo controle recebeu 200 μL de solução salina 0,9% por via i.p. Nos tempos de 2, 4, 24 e 48 horas após a indução do modelo de dor pós-operatória, os camundongos foram anestesiados e o tecido plantar foi removido.

**4.9.12 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB, PDTC, na concentração de prostaglandina E<sub>2</sub> na pata de camundongos no modelo de dor pós-operatória:** Os camundongos foram pré-tratados (1 hora antes do procedimento cirúrgico) com injeções i.p. do inibidor do NFκB (PDTC; 25, 50 e 100

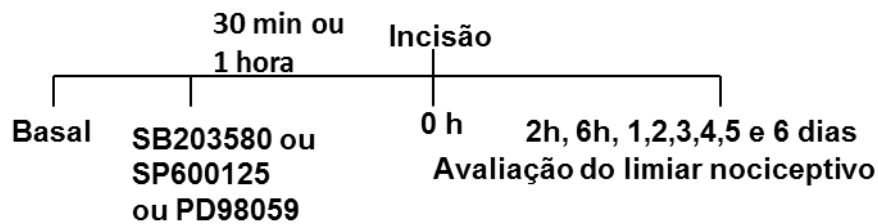
mg/kg; 200 µl em solução salina 0,9%). O grupo controle recebeu 200 µL de solução salina 0,9% por via i.p. Quatro horas após a indução do modelo de dor pós-operatória, os camundongos foram anestesiados e o tecido plantar foi removido.

**4.9.13 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB, PDTC, na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β e da COX-2 no GRD no modelo de dor pós-operatória:** Os camundongos foram pré-tratados (1 hora antes do procedimento cirúrgico) com injeção i.p. do inibidor do NFκB (PDTC; 25, 50 e 100 mg/kg; 200 µl em solução salina 0,9%). O grupo controle recebeu 200 µL de solução salina 0,9% por via i.p. Nos tempos de 4, 24 e 48 horas e 4 dias após a indução do modelo de dor pós-operatória, os camundongos foram anestesiados e os GRDs L4 e L5 foram removidos.

**4.9.14 Avaliação do efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB, PDTC, na expressão de canais para sódio TTX-R Nav1.8 e Nav.1.9 no GRD no modelo de dor pós-operatória:** Os camundongos foram pré-tratados (1 hora antes do procedimento cirúrgico) com injeção i.p. do inibidor do NFκB (PDTC; 25, 50 e 100 mg/kg; 200 µl em solução salina 0,9%). O grupo controle recebeu 200 µL de solução salina 0,9% por via i.p. Nos tempos de 4, 24 e 48 horas e 4 dias após a indução do modelo de dor pós-operatória, os camundongos foram anestesiados e os GRDs L4 e L5 foram removidos.

**4.9.15 Avaliação do efeito do pré-tratamento com os inibidores das MAPKs no modelo de dor pós-operatória:** Os camundongos foram pré-tratados com inibidores das MAPKs: inibidor da MAPK p38 (SB203580; 10mg/kg, i.p.), ou inibidor

da MAPK JNK (SP600125; 30mg/kg, s.c.) ou inibidor da MAPK ERK (PD98059; 3mg/kg, s.c.). No grupo controle os camundongos receberam solução salina 0,9% + 2,5% de DMSO. O limiar nociceptivo foi avaliado antes (basal), 2 h, 6 h, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dias após a incisão.



#### 4.10 Drogas e diluentes

- CFA (Adjuvante completo de Freund) – Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA).
- DMSO (dimetilsulfóxido)- LGC Biotecnologia (São Paulo, Brasil).
- Iodo Povidona a 10% - Rioquímica (São Paulo, Brasil).
- Isoflurano - Cristália (São Paulo, Brasil).
- PDTC (Pirrolidina ditiocarbamato; inibidor do NFκB) – Sigma Chemical (St Louis, Mo, USA).
- PD98059 (inibidor da ERK MAPK) – Tocris Bioscience (Bristol, UK).
- SB203580 (inibidor da p38 MAPK) – Tocris Bioscience (Bristol, UK).
- SB600125 (inibidor da JNK MAPK) – Tocris Bioscience (Bristol, UK).
- Tiopental sódico - Cristália (São Paulo, Brasil).

#### 4.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 5-6 animais por grupo. A análise das curvas obtidas foi feita por meio de análise de variância ANOVA TWO-WAY seguido do Teste Bonferroni para as comparações múltiplas. Já a análise dos resultados da dosagem de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e prostaglandinas E<sub>2</sub>, como também os resultados de PCR foram realizados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. O nível de significância foi de  $p < 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

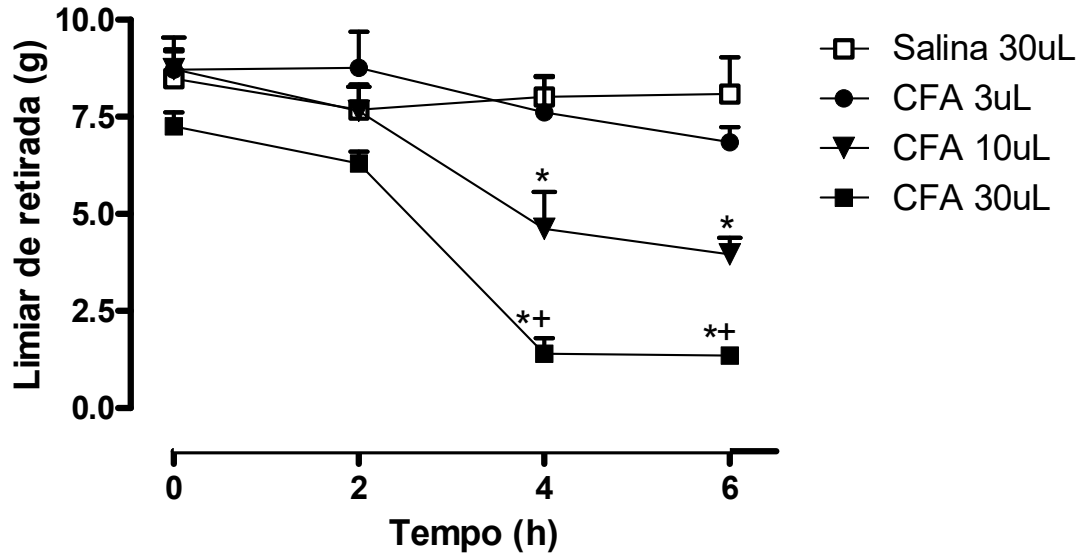
### **5.1 Modelo de dor muscular de origem inflamatória**

#### **5.1.1 Efeito da administração intramuscular do CFA sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos.**

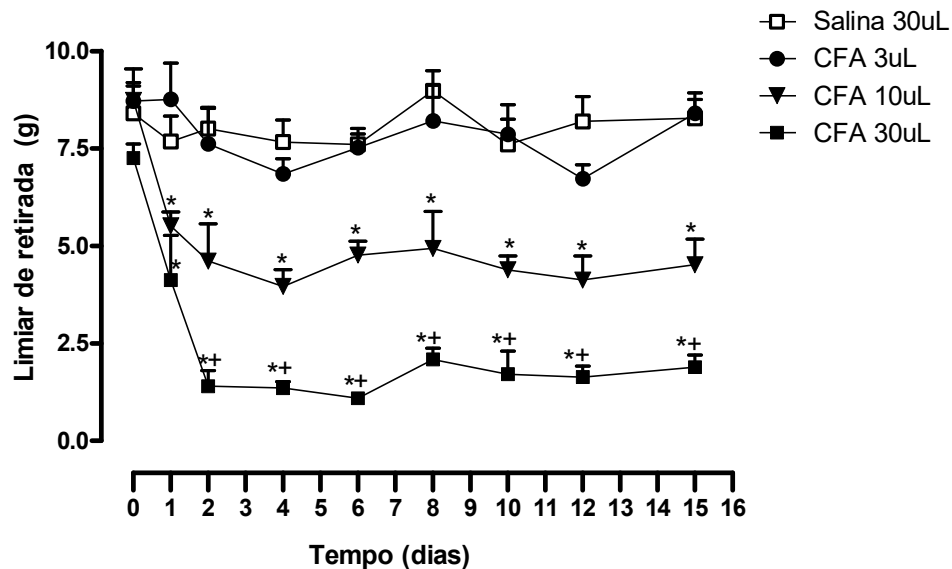
O primeiro experimento realizado teve como objetivo estabelecer o padrão comportamental de hipernocicepção no modelo de dor muscular inflamatória induzida pelo CFA. A injeção intramuscular do CFA (3, 10, 30  $\mu$ L) induziu hipernocicepção mecânica de modo dose-dependente, caracterizada pela redução do limiar de retirada da pata após a estimulação mecânica com filamentos de von Frey. As doses de 10  $\mu$ L e 30  $\mu$ L do CFA apresentaram diferenças significante em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação a dose de 3  $\mu$ L de CFA ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ , respectivamente), na 4<sup>a</sup> h após a administração, sendo que essa diferença persistiu por pelo menos 15 dias ( $p < 0,05$ ). Também foi observada diferença significativa entre as doses de 10 e 30  $\mu$ L de CFA ( $p < 0,05$ ). Como a dose de 30  $\mu$ L do CFA foi capaz de induzir efeitos consistentes com menor variação, esta dose foi escolhida para os experimentos seguintes.



A



B



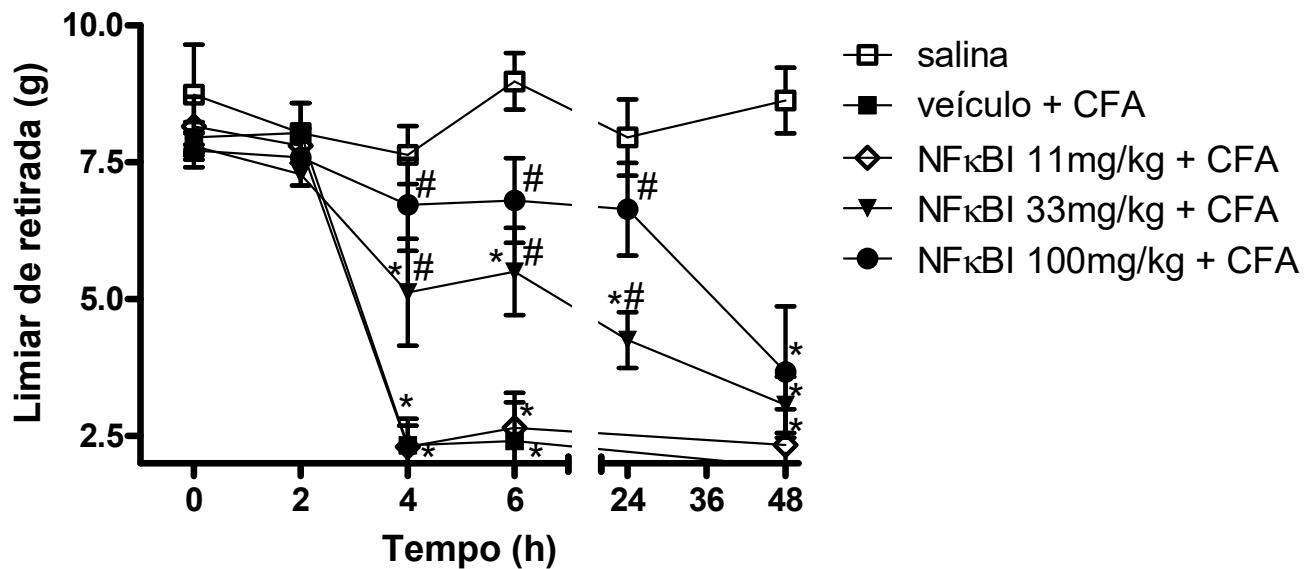
**Figura 1: Efeito da administração intramuscular do CFA sobre o limiar nociceptivo mecânico de camundongos.**

Curva dose-tempo resposta da hipernocicepção mecânica induzida por injeção intramuscular do CFA (3, 10 e 30 $\mu$ L). Como controle os camundongos receberam solução salina intramuscular (grupo Salina). (A) Horas após injeção do CFA ou salina (B) Dias após a injeção do CFA ou salina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente dos grupos salina e CFA 3  $\mu$ L; + significativamente diferente do grupo CFA 10  $\mu$ L. ANOVA two-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

### **5.1.2 Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA**

Para verificar o envolvimento do NFκB, o efeito do inibidor farmacológico de NFκB (PDTC) sobre a hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA foi avaliado.

O pré-tratamento com o PDTC nas doses de 33 e 100 mg/kg inibiu significativamente e de modo dose-dependente a hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA, na 4<sup>a</sup> (p<0,05; p<0,001, respectivamente), 6<sup>a</sup> (p<0,01; p<0,001, respectivamente) e 24<sup>a</sup> (p<0,01; p<0,001, respectivamente) h após a administração do estímulo. O PDTC não alterou o limiar nociceptivo mecânico quando administrado em camundongos não tratados com o CFA. Os dados sugerem que o NFκB está envolvido na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA.



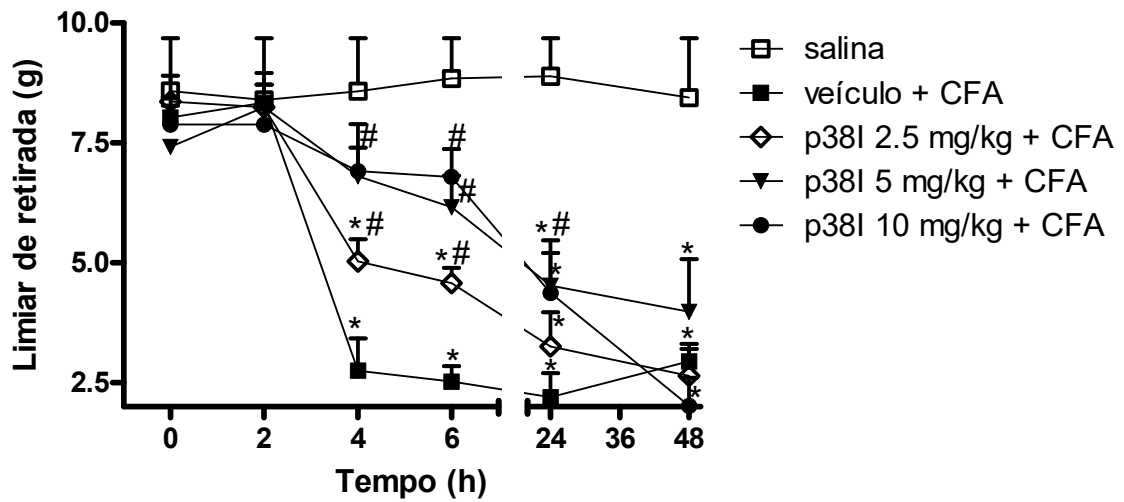
**Figura 2: Efeito do pré-tratamento com o inibidor de NFκB na hipernociceção muscular aguda induzida pelo CFA**

Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor de NFκB PDTC (NFκBI; 11-100 mg/kg/i.p.) ou com veículo (salina, 200 μL; grupo veículo+CFA) 1 hora antes da injeção intramuscular com CFA (30 μL). Como controle negativo, os camundongos receberam solução salina intramuscular (30 μL, grupo salina). O comportamento nociceptivo foi avaliado antes e até 48 hs após a injeção intramuscular. Os resultados estão expressos como média ± EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo salina; # significativamente diferente em relação ao grupo veículo+CFA. ANOVA two-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

### **5.1.3 Efeito do pré-tratamento com o inibidor da p38 na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA.**

Para verificar o envolvimento da MAPK p38, o efeito do inibidor de p38 (SB203580), sobre a hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA foi avaliado.

O pré-tratamento com SB203580 nas doses de 5 e 10 mg/kg inibiu significativamente a hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA, na 4<sup>a</sup> ( $p < 0,001$ ), 6<sup>a</sup> ( $p < 0,001$ ) e 24<sup>a</sup> ( $p < 0,05$ ) horas após a administração do estímulo. SB203580 na dose de 2,5 mg/kg também revelou-se capaz de inibir a hipernocicepção mecânica muscular na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> h após a injeção do CFA ( $p < 0,05$ ). SB203580 não alterou o limiar nociceptivo mecânico, quando administrado em camundongos não tratados com o CFA. Os dados sugerem que a MAPK p38 está envolvida na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA.



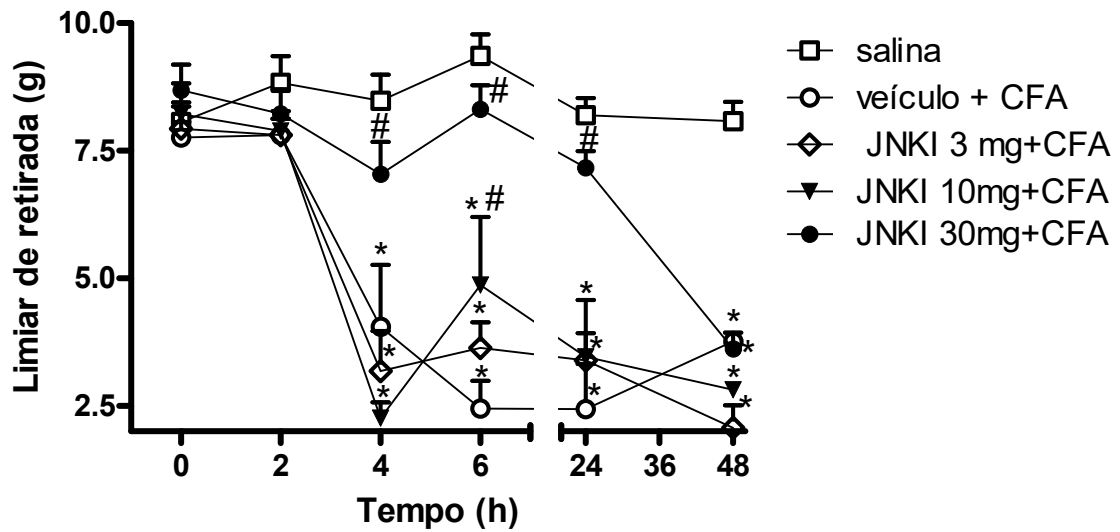
**Figura 3: Efeito do pré-tratamento com o inibidor da p38 na hipernociceção muscular aguda induzida pelo CFA**

Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor da p38 SB203580 (p38i; 2,5-10 mg/kg/i.p.) ou com veículo (salina + 2,5% de DMSO, 200  $\mu$ L; grupo veículo+CFA) 30 minutos antes da injeção intramuscular com CFA (30  $\mu$ L). Como controle negativo, os camundongos receberam solução salina intramuscular (30  $\mu$ L; grupo salina). O comportamento nociceptivo foi avaliado antes e até 48hs após a injeção intramuscular. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo salina; # significativamente diferente em relação ao grupo veículo+CFA. ANOVA two-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

#### **5.1.4 Efeito do pré-tratamento com o inibidor da JNK na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA.**

Para verificar o envolvimento da MAPK JNK, o efeito do inibidor farmacológico da JNK (SP600125) sobre a hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA foi avaliado.

O pré-tratamento com SP600125 na dose de 30 mg/kg inibiu significativamente a hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA, na 4<sup>a</sup> ( $p < 0,01$ ), 6<sup>a</sup> ( $p < 0,001$ ) e 24 ( $p < 0,001$ ) horas após a administração do estímulo. SP600125 na dose de 10 mg/kg também inibiu a hipernocicepção mecânica muscular aguda na 6<sup>a</sup> h após a injeção de CFA ( $p < 0,05$ ). Entretanto, a dose de 3 mg/kg não foi capaz de alterar a hipernocicepção muscular mecânica induzida pelo CFA. SP600125 não alterou o limiar nociceptivo mecânico quando administrado em camundongos não tratados com CFA. Os dados sugerem que a MAPK JNK está envolvida na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA.



**Figura 4: Efeito do pré-tratamento com o inibidor da JNK na hipernociceção muscular aguda induzida pelo CFA**

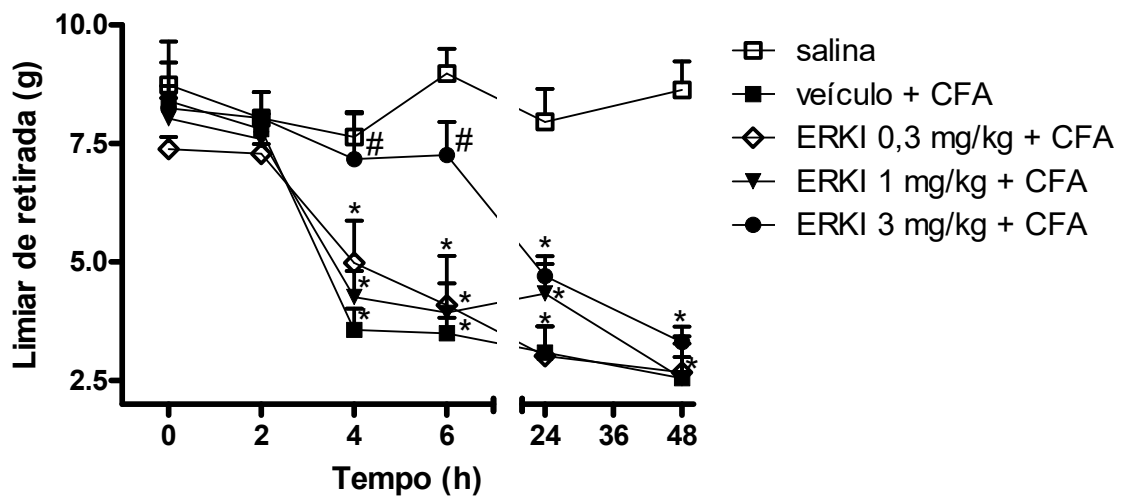
Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor da JNK SP600125 (JNKI; 3-30 mg/kg/s.c.) ou com veículo (salina + 2,5% de DMSO, 200  $\mu$ L; grupo veículo+CFA) 60 minutos antes da injeção intramuscular com CFA (30  $\mu$ L). Como controle negativo, os camundongos receberam solução salina intramuscular (30  $\mu$ L). O comportamento nociceptivo foi avaliado antes e até 48hs após a injeção intramuscular. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo salina e # significativamente diferente em relação ao grupo veículo+CFA. ANOVA two-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

### **5.1.5 Efeito do pré-tratamento com o inibidor da ERK na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA**

Para verificar o envolvimento da MAPK ERK, o efeito do inibidor farmacológico da ERK (PD98059) sobre a hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA foi avaliado.

O pré-tratamento com PD98059 na dose de 3 mg/kg inibiu significativamente a hipernocicepção muscular aguda induzida por CFA, na 4<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> h após a administração do estímulo ( $p < 0,001$ ). Entretanto, as doses de 0,3 e 1 mg/kg não alteraram a hipernocicepção muscular induzida pelo CFA. PD98059 não alterou o limiar nociceptivo mecânico quando administrado em camundongos não tratados com o CFA. Os dados sugerem que a MAPK ERK está envolvida na hipernocicepção muscular aguda induzida pelo CFA.



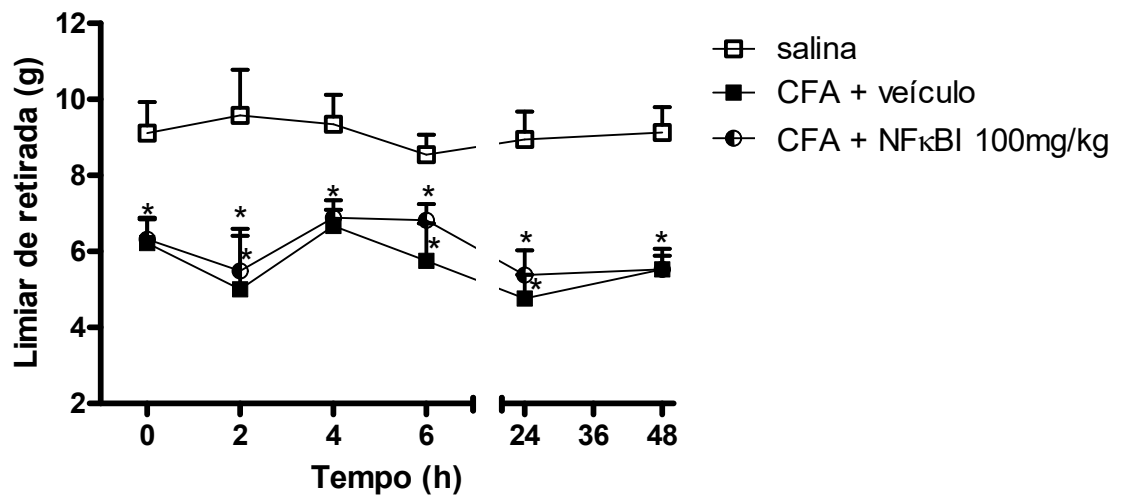


**Figura 5: Efeito do pré-tratamento com o inibidor da ERK na hipernociceção muscular aguda induzida pelo CFA**

Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor de ERK PD98059 (ERKI; 0,3-3 mg/kg/i.p.) ou com veículo (salina + 2,5% de DMSO, 200  $\mu$ L; grupo veículo+CFA) 30 minutos antes da injeção intramuscular com CFA (30  $\mu$ L). Como controle negativo, os camundongos receberam solução salina intramuscular (30  $\mu$ L). O comportamento nociceptivo foi avaliado antes e até 48hs após injeção intramuscular. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo salina; # significativamente diferente em relação ao grupo veículo+CFA. ANOVA two-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

### **5.1.6 Efeito do tratamento com o inibidor do NFκB na hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA.**

Para verificar a participação do NFκB na hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA, o efeito do inibidor do NFκB (PDTC), sobre a manutenção da hipernocicepção muscular foi avaliado 15 dias após a indução do modelo. O tratamento com 100 mg/kg de PDTC, dose que produziu máxima inibição da hipernocicepção aguda, não foi capaz de inibir a hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA. Os dados sugerem que o fator de transcrição NFκB não está envolvido na manutenção da hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA.



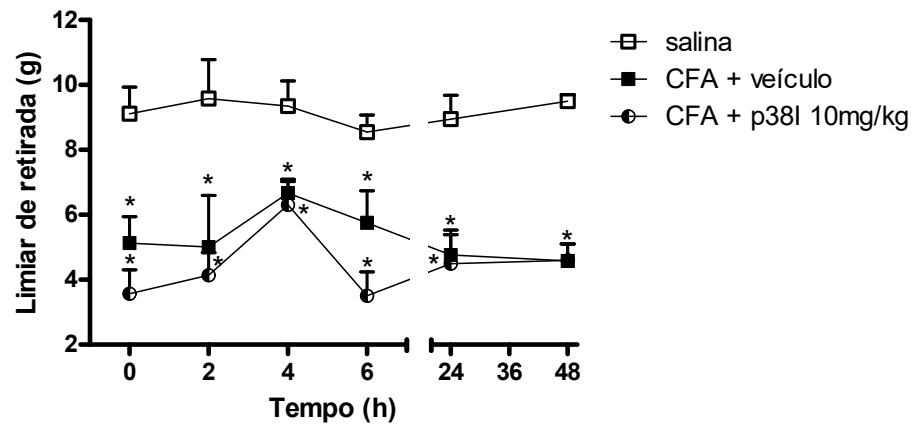
**Figura 6: Efeito do tratamento com o inibidor do NFκB na hipernociceção muscular crônica induzida por CFA**

Os camundongos foram tratados com o inibidor do NFκB PDTC (NFκBI; 100 mg/kg/i.p.) ou com o veículo (salina, 200 μL; grupo veículo+CFA) 15 dias após a injeção intramuscular de CFA (30 μL). Como controle negativo, os camundongos receberam solução salina intramuscular (30 μL; grupo salina). O comportamento nociceptivo foi avaliado antes e até 48hs após a injeção do PDTC. Os resultados estão expressos como média ± EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo salina. ANOVA two-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

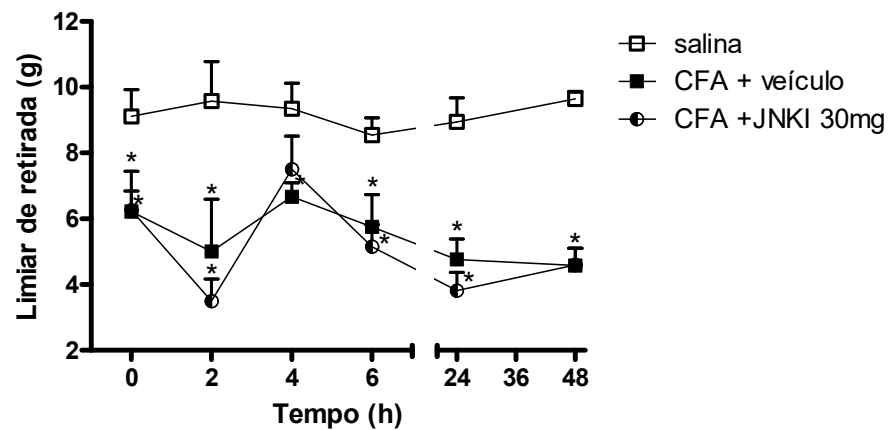
### **5.1.7 Efeito do tratamento com os inibidores de MAPKs na hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA.**

Para verificar o papel das MAPKs na hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA, os camundongos foram tratados com os inibidores da p38 (SB203580; 10 mg/kg, i.p.), da JNK (SP600125; 30 mg/kg, s.c.) ou da ERK (PD98059; 3 mg/kg, s.c.), nas doses que produziram máxima inibição da hipernocicepção aguda, 15 dias após a administração intramuscular do CFA (30  $\mu$ L). A inibição farmacológica da p38 (Fig.7A), da JNK (Fig.7B) ou da ERK (Fig.7C) não foi capaz de reduzir a hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA. Os dados sugerem que as MAPKs não participam da manutenção da hipernocicepção muscular crônica induzida pelo CFA.

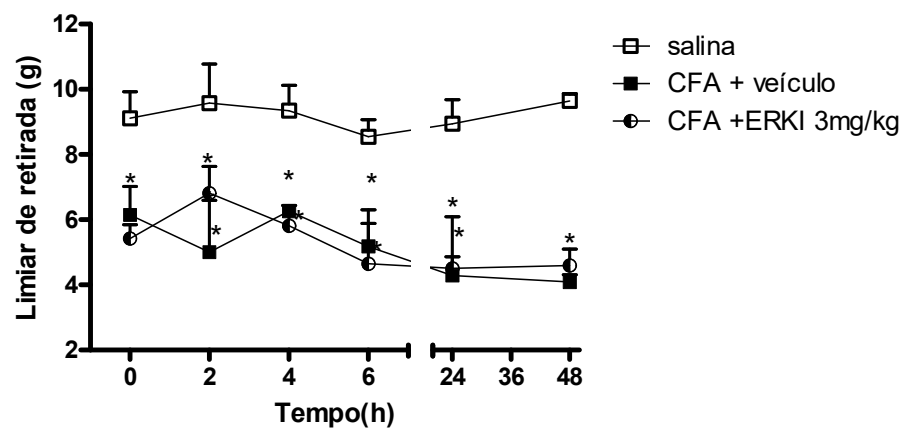
A



B



C



**Figura 7: Efeito do tratamento com os inibidores das MAPKs na hipernociceção muscular crônica induzida pelo CFA.** Os camundongos foram tratados com o inibidor seletivo da p38 (SB203580, 10 mg/kg, i.p., painel A), da JNK (SP600125, 30 mg/kg, s.c., painel B), da ERK (PD98059, 3 mg/kg/i.p., painel C), ou com o veículo (salina + 2,5% de DMSO, 200 $\mu$ L; grupo

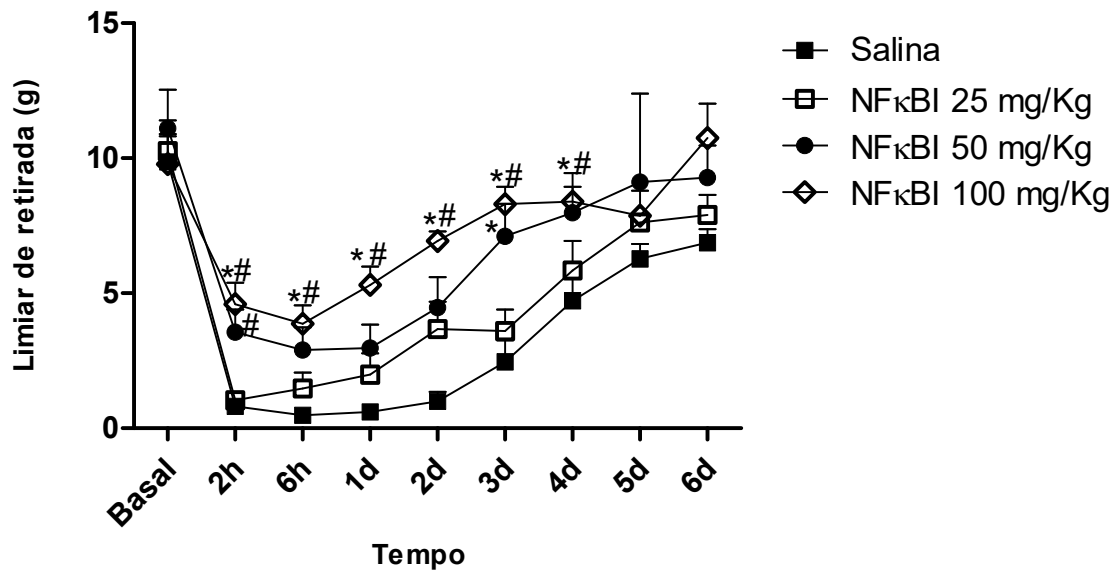
CFA+veículo) 15 dias após a injeção intramuscular com o CFA (30 µL). Como controle negativo, os camundongos receberam solução salina intramuscular (30 µL; grupo salina). O limiar nociceptivo foi avaliado antes e até 48hs após a administração dos inibidores. Os resultados estão expressos como média ± EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo salina. ANOVA two-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

## **5.2 Modelo de dor pós-operatória**

### **5.2.1 Efeito do inibidor do NFκB no modelo de dor pós-operatória em camundongos.**

Para verificar a participação do NFκB no modelo de dor pós-operatória, o efeito do inibidor farmacológico do NFκB (PDTC) sobre a hipernocicepção pós-operatória foi avaliado.

O pré-tratamento com o PDTC na dose de 100 mg/kg preveniu significativamente a hipernocicepção pós-operatória, 2 h ( $p<0,05$ ), 6 h ( $p<0,05$ ), 1 dia ( $p<0,01$ ), 2 dias ( $p<0,001$ ), 3 dias ( $p<0,001$ ) e 4 dias ( $p<0,05$ ) após a indução do modelo. O grupo que recebeu a dose de 50 mg/kg apresentou diferença significativa em relação ao controle, até 3 dias após a indução do modelo ( $p<0,05$ ). Os dados sugerem que o NFκB está envolvido na indução da hipernocicepção pós-operatória. Como a dose de 100 mg/kg do PDTC apresentou maior efeito antinociceptivo, esta dose foi escolhida para os experimentos seguintes.



**Figura 8: Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB no modelo de dor pós-operatória.**

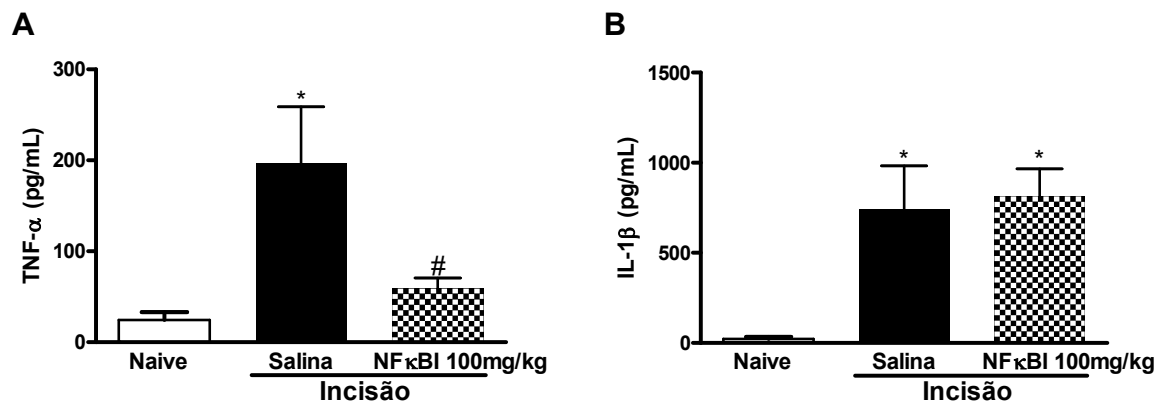
Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor do NFκB PDTC (NFκBI; 25-100 mg/kg/i.p.) ou com o veículo (salina, 200 μL; grupo salina) 1 hora antes da incisão plantar (tempo zero). O comportamento nociceptivo foi avaliado antes e após a incisão nos tempos indicados na figura em horas (h) ou dias (d). Os resultados estão expressos como média ± EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo salina; # significativamente diferente em relação ao grupo NFκBI 25 mg/kg. ANOVA two-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .



### **5.2.2 Efeito do inibidor do NFκB sobre a produção local de citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-1β no modelo de dor pós-operatória.**

Para investigar se a redução do limiar nociceptivo mediado pelo NFκB no modelo de dor pós-operatória decorre da produção e liberação local de citocinas pró-inflamatórias, amostras de tecido plantar de camundongos tratados ou não com o inibidor de NFκB, PDTC, foram coletadas 2 horas após a incisão plantar para quantificação de citocinas.

Observamos um aumento significativo das citocinas TNF-α e IL-1β, 2 horas após a incisão plantar comparado ao grupo controle (naive) ( $p < 0,05$ ). O pré-tratamento com o PDTC na dose de 100 mg/kg inibiu significativamente a produção de TNF-α ( $p < 0,05$ ), mas não alterou a produção de IL-1β no tecido plantar. Esses dados indicam uma possível participação do TNF-α na hipernocicepção pós-operatória.



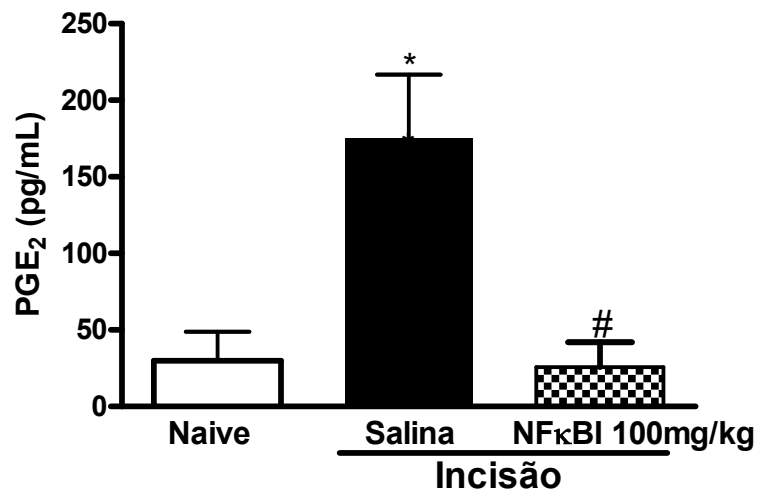
**Figura 9: Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NF $\kappa$ B na produção local de citocinas no modelo de dor pós-operatória.**

Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor do NF $\kappa$ B PDTC (NF $\kappa$ BI; 100 mg/kg/i.p.) ou com o veículo (salina, 200  $\mu$ L; grupo salina) 1 h antes da incisão plantar. O grupo controle (naive) foi submetido aos mesmos procedimentos, entretanto não foi realizada a incisão. As amostras de tecido plantar foram coletadas 2h após a incisão para quantificação das citocinas TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B) por ELISA. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo naive; # significativamente diferente em relação ao grupo salina. As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn;  $p < 0,05$ .

### **5.2.3 Efeito do inibidor do NFkB sobre a produção local da PGE<sub>2</sub> no modelo de dor pós-operatória.**

Para investigar se a redução do limiar nociceptivo mediada pelo NFkB no modelo de dor pós-operatória, decorre da produção e liberação local de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), amostras de tecido plantar de camundongos tratados ou não com o inibidor do NFkB, PDTC, foram coletadas 2 horas após a incisão plantar para quantificação da PGE<sub>2</sub>.

Observamos um aumento significativo da PGE<sub>2</sub> 2 horas após a incisão plantar comparado ao grupo controle (naive) ( $p < 0,05$ ). O pré-tratamento com o PDTC na dose de 100 mg/kg inibiu significativamente a produção da PGE<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ), sugerindo uma possível participação desse prostanóide no modelo de dor pós-operatória.



**Figura 10: Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB na produção local da prostaglandina E<sub>2</sub> no modelo de dor pós-operatória.**

Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor do NFκB PDTC (NFκBI; 100 mg/kg/i.p.) ou com o veículo (salina, 200μL; grupo salina) 1 h antes da incisão plantar. O grupo controle (naive) foi submetido aos mesmos procedimentos, entretanto não foi realizada a incisão. As amostras de tecido plantar foram coletadas 4h após a incisão para quantificação da prostaglandina E<sub>2</sub>. Os resultados estão expressos como média ± EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo naive; # significativamente diferente em relação ao grupo salina. As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; p<0,05.

#### **5.2.4 Efeito do inibidor do NFκB sobre a expressão gênica do TNF-α e da COX-2 no GRD de camundongos no modelo de dor pós-operatória.**

O próximo passo foi verificar se a redução do limiar nociceptivo mediada pelo NFκB no modelo de dor pós-operatória, está associada a alterações transcricionais no gânglio da raiz dorsal. Foram avaliados importantes mediadores envolvidos na dor e na sensibilização nociceptiva, como o TNF-α, a IL-1β e a COX-2. Os gânglios das raízes dorsais (GRD L-4 e L-5) foram coletados em diversos tempos (4h, 24h, 48h e 4d) após a incisão plantar, de camundongos tratados com o inibidor do NFκB (PDTC100 mg/kg; i.p.), ou salina para análise da expressão gênica por PCR em tempo Real.

Observamos uma tendência de aumento da expressão gênica do TNF-α (24 horas), IL-1 β (4 horas) e COX-2 (24 horas e 4 dias) no GRD após a incisão plantar, entretanto, esse aumento foi estatisticamente significativo apenas para o TNF-α ( $p < 0,05$ ). No tempo de 24 h após a incisão, ocorreu uma inibição significativa da expressão gênica do TNF-α e da COX-2 ( $p < 0,05$ ) no GDR de camundongos pré-tratados com o PTDC. Os resultados sugerem a participação de TNF-α e COX-2 na hipernocicepção pós-operatória, e ainda que o efeito antinociceptivo da inibição de NFκB pode decorrer da redução da síntese do TNF-α e da COX-2.

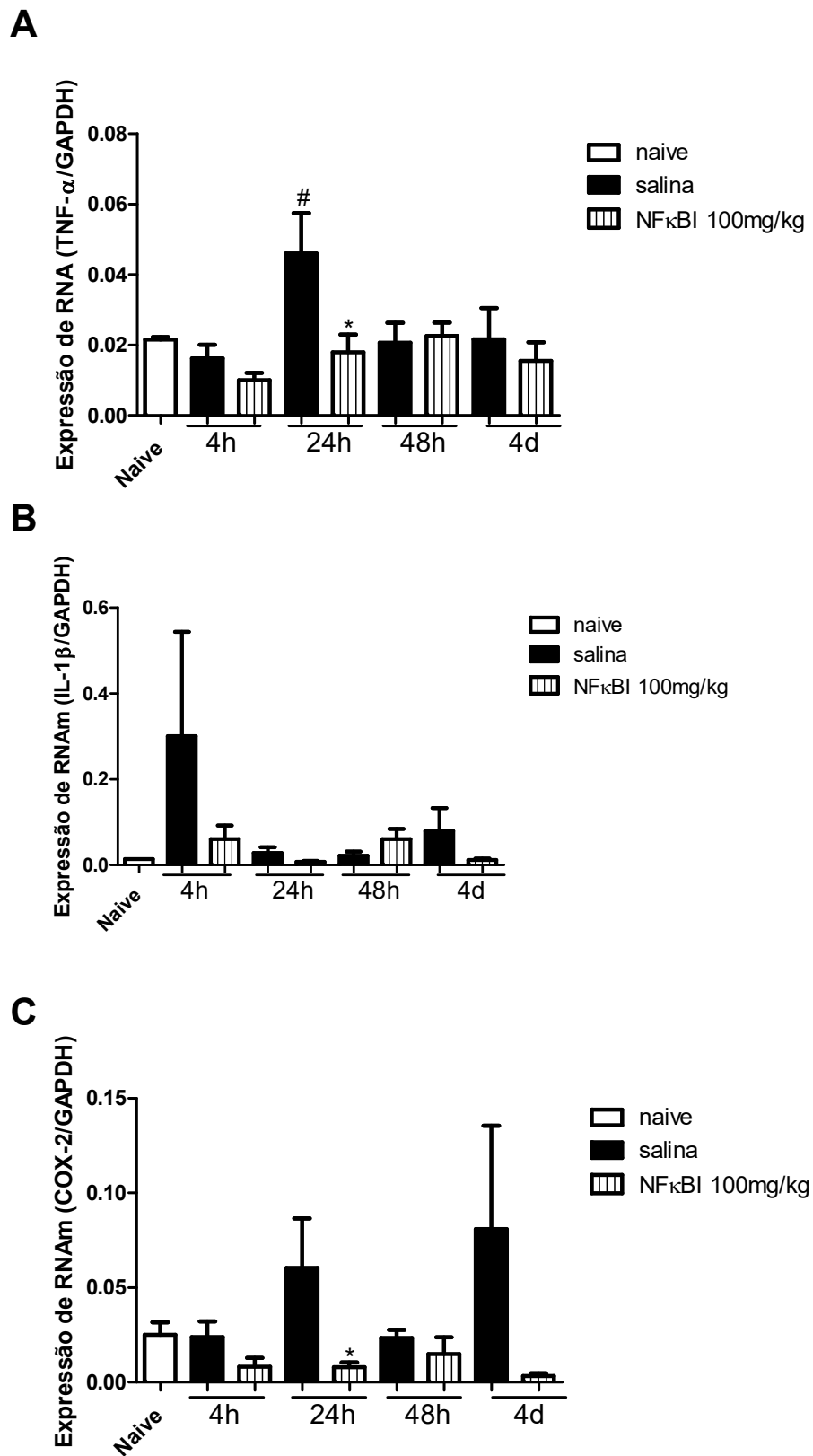


Figura 11: Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NF $\kappa$ B sobre a expressão de RNAm da IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE $_2$  nos gânglios das raízes dorsais (GRD) em modelo de dor pós-operatória.

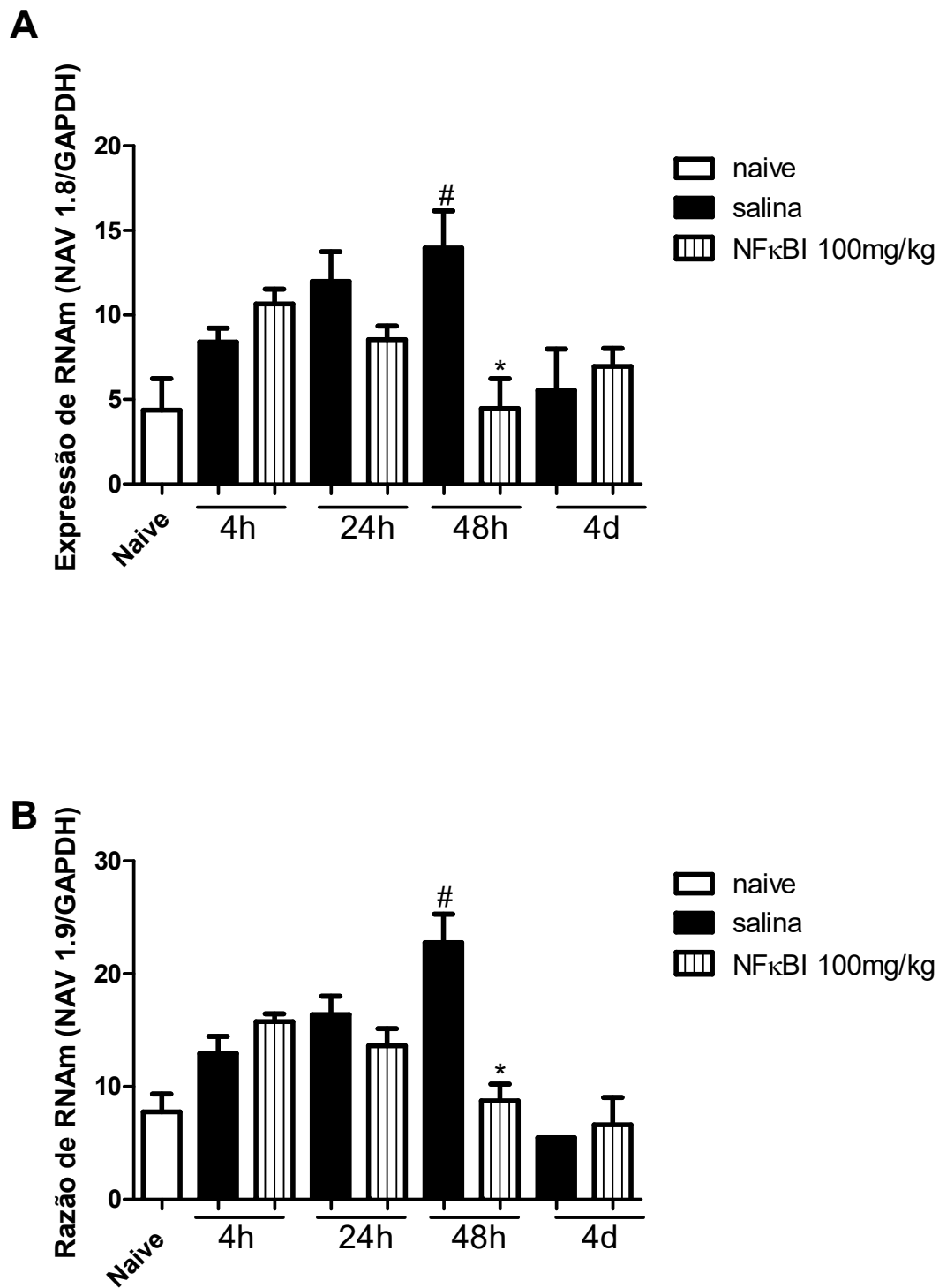
Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor do NFκB PDTC (NFκBI; 100 mg/kg/i.p.) ou com o veículo (salina, 200μL; grupo salina) 1 h antes da incisão plantar. O grupo controle (naive) foi submetido aos mesmos procedimentos, entretanto não foi realizada a incisão. Os GRDs L4 e L5 foram coletados 4h, 24h, 48h e 4 dias após a incisão para quantificação do TNF-α (painel A), IL-1β (painel B) e PGE<sub>2</sub> (painel C) por PCR em Tempo Real. Os resultados estão expressos como média ± EPM de 3 pools de GRD . \* significativamente diferente em relação ao grupo salina; # significativamente diferente em relação ao grupo naive. As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; p<0,05.

### **5.2.5 Efeito do inibidor do NFκB sobre a expressão gênica de canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 no GRD de camundongos em modelo de dor pós-operatória.**

A seguir, o envolvimento de canais para sódio TTXR Nav 1.8 e Nav 1.9 com a hipernocicepção pós-operatória foi avaliado. Em adição, verificamos se a redução do limiar nociceptivo mediada pelo NFκB no modelo de dor pós-operatória, está associada com alterações na expressão desses canais no gânglio da raiz do dorsal.

Os gânglios das raízes dorsais (GRD L-4 e L-5) foram coletados em diversos tempos (4h, 24h, 48h e 4d) após a incisão plantar, de camundongos tratados com o inibidor do NFκB, PDTC (100 mg/kg; i.p.) ou salina para análise da expressão dos canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 por PCR em tempo Real. Observamos um aumento significativo da expressão gênica dos canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9, 48 horas após incisão plantar comparado ao grupo naive (sem incisão) ( $p < 0,05$ ). Além disso, o pré-tratamento com PDTC (100 mg/kg, i.p.) foi capaz de diminuir significativamente o aumento da expressão gênica desses canais induzido pela incisão ( $p < 0,05$ ).





**Figura 12:** Efeito do pré-tratamento com o inibidor do NFκB na expressão gênica de canais para sódio Nav1.8 e Nav 1.9 nos gânglios das raízes dorsais (GRD) em modelo de dor pós-operatória.

Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor do NFκB PDTC (NFκBI; 100 mg/kg/i.p.) ou com o veículo (salina, 200μL; grupo salina) 1 h antes da incisão plantar. O grupo controle (naive) foi submetido aos mesmos procedimentos, entretanto não foi realizada a incisão. Os GRD L4 e L5

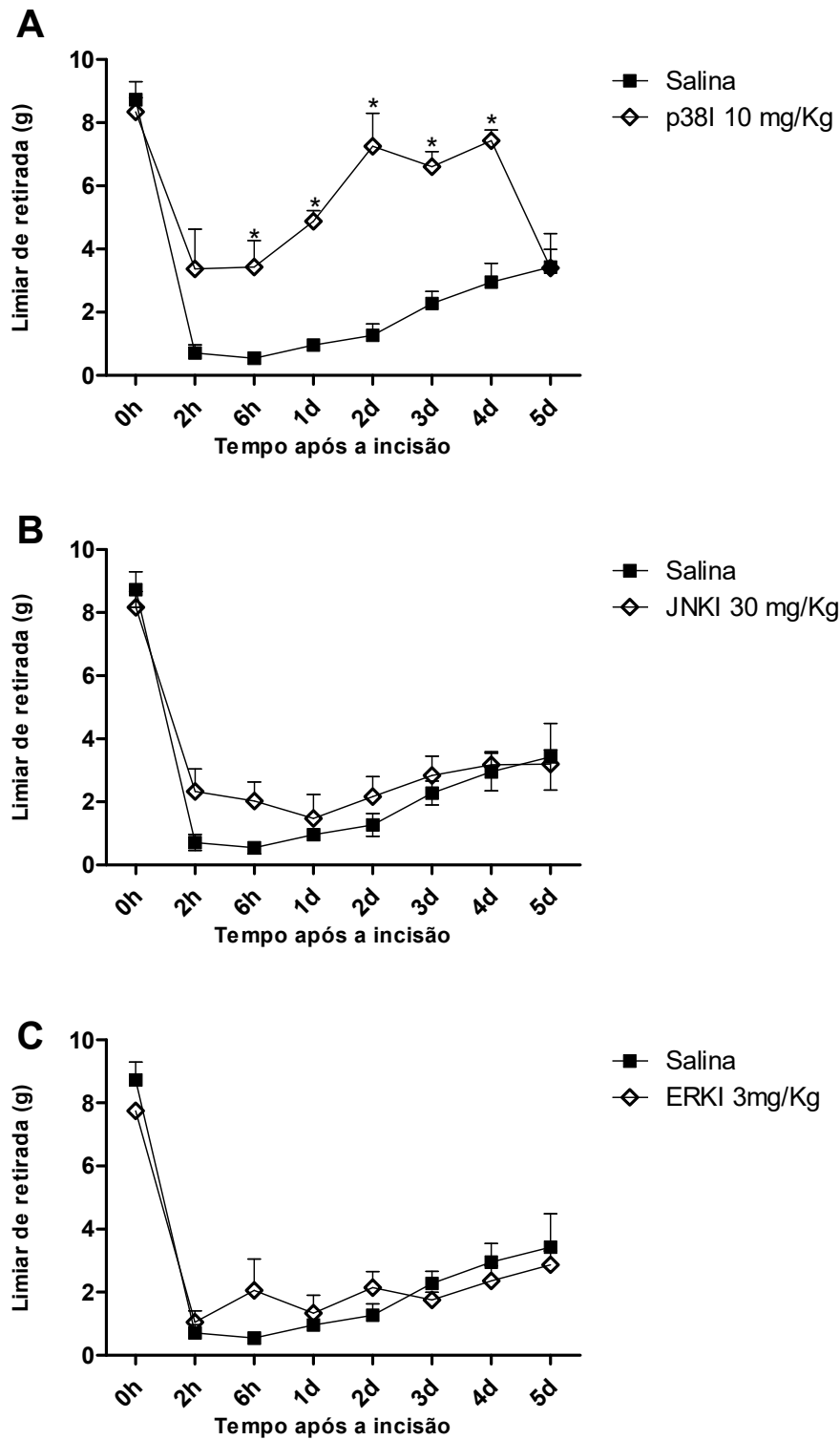
foram coletadas 4h, 24h, 48h e 4 dias após a incisão para análise da expressão do RNAm dos canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 por PCR em Tempo Real. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 4 pools de GRD. # significativamente diferente em relação ao grupo naive; \* significativamente diferente em relação ao grupo salina. As diferenças estatísticas foram determinadas por Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn;  $p < 0,05$ .

### **5.2.6 Efeito do tratamento com os inibidores das MAPKs no modelo de dor pós-operatória.**

Como está bem estabelecido que MAPKs ativam diversos fatores de transcrição, entre eles o NF $\kappa$ B, o próximo passo foi investigar a participação das MAPKs no modelo de dor pós-operatória.

Os camundongos foram pré-tratados com os inibidores seletivos da p38 (SB203580; 10mg/kg), da JNK (SP600125; 30mg/kg) e da ERK (PD98059; 3 mg/kg), em doses que, no presente estudo, apresentaram efeito inibitório máximo no modelo de dor muscular.

Nem o pré-tratamento com o inibidor da JNK, nem tampouco com o inibidor da ERK foi capaz de inibir a hipernocicepção pós-operatória. Entretanto, o pré-tratamento com o inibidor da p38 aumentou significativamente o limiar nociceptivo no modelo de dor pós-operatória ( $p < 0,05$ ). Nenhum dos inibidores alterou *per se* o limiar nociceptivo mecânico. Os dados sugerem que a p38 é a única MAPK que participa da indução da hipernocicepção em modelo de dor pós-operatória.



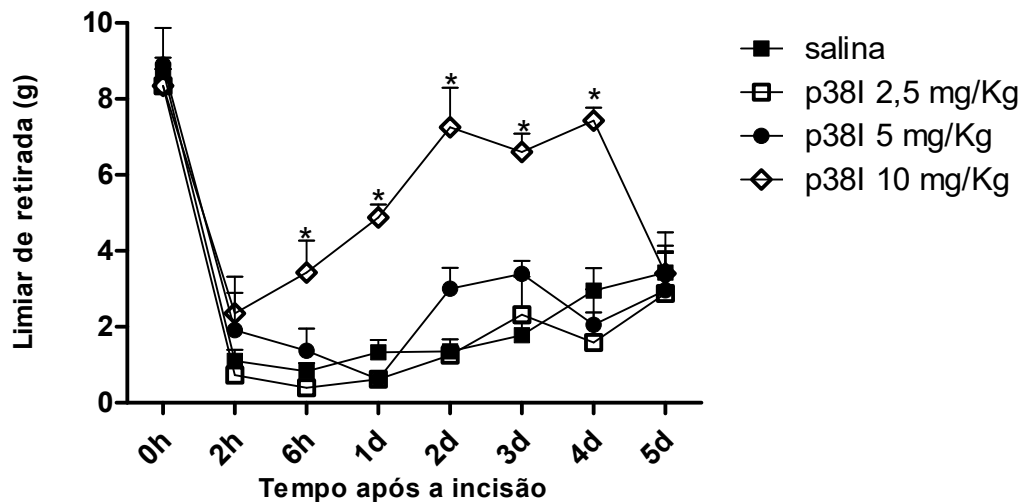
**Figura 13: Efeito do tratamento com os inibidores de MAPKs no modelo de dor pós-operatória.**

Os camundongos foram pré-tratados com os inibidores seletivos das MAPKs p38 SB203580 (p38I, 10mg/kg, i.p., painel A), de JNK SP600125 (JNKI, 30mg/kg, s.c.; painel B), de ERK MAPK PD98059 (ERKI, 3mg/kg/s.c.; painel C), ou com o veículo (salina + 2,5% de DMSO, 200 $\mu$ L; grupo salina) antes da incisão plantar. O comportamento nociceptivo foi avaliado antes e após a incisão nos tempos

indicados na figura em horas (h) ou dias (d). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 camundongos. \* significativamente diferente em relação ao grupo salina. ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

### 5.2.7 Curva de dose-resposta da MAPK p38 no modelo de dor pós-operatória.

Para melhor caracterizar o efeito do inibidor da p38 (SB20358) no modelo de dor pós operatória, uma curva de dose-resposta para esse inibidor foi realizada. O pré-tratamento com SB203580 na dose de 10 mg/kg produziu efeito antinociceptivo no modelo de dor pós-operatória ( $p < 0,05$ ). O tratamento com inibidor da p38 não alterou per si o limiar nociceptivo mecânico.



**Figura 14: Curva de dose-resposta do inibidor da p38 no modelo de dor pós-operatória.**

Os camundongos foram pré-tratados com o inibidor da p38 SB203580 (p38I; 2,5-10mg/kg/i.p.) ou com veículo (salina +2,5% de DMSO, 200 $\mu$ L; grupo salina) 30 minutos antes da incisão plantar. O comportamento nociceptivo foi avaliado antes e após a incisão nos tempos indicados na figura em horas (h) ou dias (d). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 5-7 camundongos. \*significativamente diferente em relação aos demais grupos. ANOVA one-way seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni;  $p < 0,05$ .

## **6 Discussão**

### **6.1 Envolvimento das MAPKs e NFκB na dor muscular experimental**

A injúria tecidual do sistema músculo-esquelético desencadeia a dor muscular, que é um sintoma frequente, para o qual a assistência médica é muito solicitada, tornando-se assim um problema econômico, além de social e de saúde pública. A relevância deste problema motivou a IASP lançar em outubro de 2009 o Ano Mundial Contra a Dor Muscular. Entretanto, apesar dos crescentes estudos, os mecanismos que participam na iniciação e perpetuação deste tipo de dor ainda são pobremente compreendidos. No presente estudo avaliamos possíveis vias de sinalização intracelular envolvidas nas fases aguda e crônica da dor muscular experimental, visando contribuir para a compreensão da fisiopatologia da dor muscular e apontar potenciais alvos farmacológicos para o seu controle.

Primeiramente, adaptamos para camundongos um modelo de dor muscular induzido pela injeção do CFA no músculo gastrocnêmio, inicialmente descrito em ratos (CHACUR et al., 2009). A injeção i.m. do CFA produziu hipernocicepção mecânica de modo dose-dependente, com o início na 4<sup>a</sup> h após o estímulo persistindo durante os próximos 15 dias do período experimental. Esse modelo experimental apresenta boa equivalência clínica, e tem se mostrado útil para o estudo da dor muscular (CHACUR et al., 2009). Isso pode ser justificado por duas observações. Primeiro, porque a hipernocicepção mecânica detectada neste modelo simula o aumento da sensibilidade mecânica à palpação, indicativo de redução do limiar nociceptivo mecânico, observado clinicamente em pacientes com síndromes de dor muscular, incluindo fibromialgia e síndrome de dor miofacial

(LAUTENBACHER et al., 1994). Segundo, porque sendo associado à redução persistente do limiar nociceptivo permite estudar os quadros de dor muscular aguda e crônica, e comparar os mecanismos envolvidos nesses diferentes estados de dor de origem muscular. Esse aspecto é fundamental tendo em vista que, atualmente um dos grandes desafios do conhecimento sobre dor é entender como episódios de dor aguda evoluem para quadros de dor crônica, associados a alterações funcionais duradouras nas vias nociceptivas.

Evidências recentes indicam que um importante fator de transcrição envolvido na patogênese da inflamação, plasticidade neuronal e sensibilização nociceptiva é o NF $\kappa$ B (MAKAROV, 2000). O interesse crescente pelo estudo do NF $\kappa$ B provém da enorme quantidade de genes por ele regulados, envolvidos com dor e inflamação: proteinoquinas, óxido nítrico sintase, ciclooxigenase, citocinas, moléculas de adesão, moléculas dos complexos de histocompatibilidade, proteínas de fase-aguda, dinorfina, entre outros (BARNES & ADCOCK, 1997; O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997). Desta forma, a ativação do NF $\kappa$ B pode amplificar e perpetuar a resposta inflamatória, induzindo alterações fenotípicas e de expressão gênica, que podem contribuir para a sensibilização e facilitação da transmissão da dor. De fato, um grande número de estudos tem demonstrado que o NF $\kappa$ B é importante para o desenvolvimento da dor em modelos de dor neuropática (TEGEDER et al., 2004; SUN et al., 2006; MEUNIER et al., 2007; NIEDERBERGER et al., 2007; FU et al., 2010) e dor inflamatória (LAUGHLIN et al., 2000; SAKAUE et al., 2001; LEE et al., 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que o tratamento com o PDTC, inibidor do NF $\kappa$ B, reduz a hipernocicepção térmica e mecânica induzida em diversos modelos de dor neuropática (MEUNIER et al., 2007; NIEDERBERGER et al., 2007; FU et al.,



2010) e dor inflamatória (LAUGHLIN et al., 2000; LEE et al., 2004). O PDTC é um inibidor do NF $\kappa$ B, altamente eficaz, que atua interrompendo a translocação do NF $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo através do bloqueio da fosforilação do I $\kappa$ B (inibidor natural do NF $\kappa$ B). Dessa forma, o PDTC impede que o NF $\kappa$ B se ligue em locais específicos do DNA celular e induza transcrição de genes relevantes para o processo de sensibilização (KARIN & DELHASE, 2000; TERGAONKAR, 2006). No presente estudo, o PDTC foi capaz de bloquear a hipernocicepção muscular aguda, de modo dose-dependente, sugerindo assim a importância do NF $\kappa$ B para o processo de hipernocicepção muscular aguda. Por outro lado, nossos resultados sugerem que o NF $\kappa$ B não participa da hipernocicepção muscular crônica, já que o tratamento com PDTC não foi capaz de bloquear a hipernocicepção mecânica induzida 15 dias após a indução do modelo. Apesar do NF $\kappa$ B não participar da hipernocicepção muscular crônica, estudos demonstram o envolvimento do NF $\kappa$ B em outros modelos de dor crônica (MA & BISBY, 1998; CHAN et al., 2000; SAKAUE et al, 2001; LEE et al., 2004). Tem sido mostrado que o NF $\kappa$ B é ativado em modelos de dor persistente, como o modelo de dor neuropática (MA & BISBY, 1998) e modelo de dor inflamatória induzida pelo CFA (CHAN et al., 2000). Em concordância com essa observação, foi visto que o tratamento com diferentes inibidores da via do NF $\kappa$ B reduz a hipernocicepção persistente térmica e mecânica em diversos modelos experimentais (MA & BISBY, 1998; CHAN et al., 2000; LAUGHLIN et al., 2000; SAKAUE et al, 2001; LEE et al., 2004). Esses dados reforçam a ideia de que existem diferentes mecanismos fisiopatológicos da dor causada por inflamação, lesão de nervos ou pela incisão e explica porque muitas estratégias terapêuticas são eficazes somente contra algumas formas de dor persistente.

A fosforilação das MAPKs pode ativar diversos fatores de transcrição, como o NF $\kappa$ B, e regular a expressão de genes que contribuem para a indução da dor aguda e o estabelecimento da dor persistente. (TAMURA et al., 1998; GOEBELER et al., 2001). As MAPKs são uma família de moléculas sinalizadoras intracelulares, composta por três membros principais: p38, JNK e ERK. As MAPKs exercem papel importante na transdução de sinais intracelulares e desempenham um papel fundamental na regulação da plasticidade neural e respostas inflamatórias (JI et al., 2009). Nos últimos anos, constatam-se inúmeros estudos indicando a participação das MAPKs na geração e manutenção da dor em diferentes modelos experimentais (KENNEY & KOCSIS, 1998; JI et al., 1999, 2002; SAMMONS et al., 2000; ALEY et al., 2001; SVENSSON et al., 2003; OBATA et al., 2004; SWEITZER et al., 2004; DOYA et al., 2005; MIZUSHIMA et al., 2005). Sabendo que diferentes vias de sinalização intracelular contribuem para os distintos mecanismos fisiopatológicos da dor causada por inflamação, lesão de nervos ou pela incisão, tivemos como objetivo investigar a contribuição das MAPKs (ERK, JNK e p38) nos quadros agudos e crônicos de dor muscular.

Inicialmente investigamos a participação da MAPK p38 na hipernocicepção muscular aguda. A p38 representa um grupo de enzimas da família MAPK que são fosforiladas e ativadas por uma variedade de estímulos químicos e físicos (OBATA et al., 2000). Uma vez ativada, a p38 fosforila alvos citoplasmáticos e nucleares, que regulam respostas como diferenciação celular, apoptose e inflamação (SHI & GAESTEL, 2002). Evidências indicam que a ativação da p38 na medula espinal e no gânglio da raiz dorsal contribui para o desenvolvimento e a manutenção da dor em diversos modelos experimentais, incluindo de injúria do nervo (KIM et al., 2002b; JIN et al., 2003; TSUDA et al., 2004), inflamação (KIM et al., 2002b; SVENSSON et al.,

2003) e incisão (WEN et al., 2009). No presente estudo, observamos que a ativação de p38 participa da fase aguda da dor muscular experimental, já que o bloqueio farmacológico da p38 preveniu de modo dose-tempo dependente a hipernocicepção muscular aguda. Corroborando nossos dados, recentemente, Manjavachi et al. (2010) demonstraram que a MAPK p38 está envolvida com a dor muscular induzida por IL-6. Por outro lado, quando o tratamento foi administrado 15 dias após a indução do modelo, e portanto durante o estado de manutenção da hipernocicepção crônica, o inibidor de p38 não foi capaz de inibir a hipernocicepção mecânica. Schäfers et al. (2003), também verificaram que a hipernocicepção mecânica induzida pela ligadura do nervo espinal não é atenuada pelo inibidor da p38, quando administrado 7 dias após a indução do modelo. Esses dados indicam que provavelmente a p38 participa da indução da dor muscular, mas não é importante na manutenção da dor crônica. No entanto, é possível que a ativação da MAPK p38 contribua para outros estados de dor crônica.

Assim como a p38, a JNK tem sido associada à geração e manutenção da dor em diversos modelos experimentais de dor inflamatória e neuropática (OBATA et al., 2004; DOYA et al., 2005; ZHUANG et al., 2006; CAO et al., 2007). Estudos prévios verificaram que o pré-tratamento com o inibidor da JNK (SP600125) aboliu a hipernocicepção térmica induzida pelo CFA, fator de crescimento do nervo (DOYA et al., 2005) e veneno de abelha (CAO et al., 2007). Entretanto, o SP600125 não foi capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica induzida pelo veneno de abelha (CAO et al., 2007). Já no modelo de dor neuropática induzida pela ligadura do nervo espinal, a administração de inibidores da JNK reduziu a hipernocicepção mecânica (ZHUANG et al., 2006). No presente trabalho demonstramos que o inibidor seletivo de JNK (SP600125) foi capaz de prevenir a hipernocicepção muscular aguda,

sugerindo assim a participação da JNK na dor muscular experimental. Dessa forma, o sistema de transdução mediado pela JNK pode ou não estar envolvido na geração da hipernocicepção mecânica a depender do modelo experimental. Em adição, a participação da JNK parece depender também da persistência da dor, pois o inibidor da JNK não foi capaz inibir a hipernocicepção muscular crônica, 15 dias após sua indução.

A ERK, outro membro da família da MAPK, é ativada pela atividade neuronal e está envolvida na plasticidade neuronal, incluindo aprendizagem, memória e hipersensibilidade da dor (IMPEY et al., 1999; JI et al., 1999, 2002; ZHUANG et al., 2005). Estudos prévios sugeriram um papel seletivo da ERK na sensibilização nociceptiva, já que o pré-tratamento com inibidor seletivo da ERK (PD98059) reduz a dor apenas na segunda fase do teste de formalina (JI et al., 1999; KARIM et al., 2001). A inibição da ativação da ERK também foi capaz de diminuir a resposta hipernociceptiva induzida pela carragenina e pelo fator de crescimento do nervo (SAMMONS et al., 2000). No presente trabalho, observamos que o inibidor da ERK reduziu a hipernocicepção muscular aguda, mas não a crônica. Além disso, verificamos que o efeito antinociceptivo do inibidor da ERK na hipernocicepção muscular aguda foi menos duradouro quando comparado aos efeitos dos inibidores da p38 e da JNK. Esses resultados estão de acordo com a observação de Manjavachi et al. (2010), que verificaram uma rápida fosforilação da ERK no tecido muscular em modelo de dor muscular induzido por IL-6, comparado com a fosforilação da JNK e da p38. Em conjunto, esses dados indicam que a ativação de MAPK contribui para a indução da hipernocicepção aguda em modelo de dor muscular, mas não para a manutenção da hipernocicepção muscular crônica.

Resumindo, nossos resultados sugerem que as MAPKs (p38, JNK e ERK) e o NF $\kappa$ B contribuem para a instalação da hipernocicepção muscular aguda. É possível que as MAPKs ativem o NF $\kappa$ B, contribuindo, assim, para a instalação da hipernocicepção muscular aguda, mas dados adicionais são necessários para confirmar essa hipótese. Entretanto, nem as MAPKs nem o NF $\kappa$ B parecem participar da hipernocicepção muscular crônica. Este é o primeiro estudo que verificou a contribuição do fator de transcrição NF $\kappa$ B na hipernocicepção muscular.

## **6.2 Envolvimento das MAPKs e NF $\kappa$ B no modelo de dor pós-operatória**

Injúrias cirúrgicas levam ao aparecimento da dor pós-operatória aguda, caracterizada por hipersensibilidade mecânica. Normalmente, a dor pós-operatória aguda é de curta duração, entretanto, 10-50% dos pacientes evoluem para os quadros de dor pós-operatória persistente, sendo 2-10% dos pacientes portadores de dor crônica severa (KEHLET et al., 2006). As evidências atuais sugerem que a dor aguda mal controlada é uma das causas da dor pós-operatória crônica, entretanto, os mecanismos fisiopatológicos da dor pós-operatória ainda são pouco compreendidos.

O NF $\kappa$ B ativado regula a transcrição e síntese de diversas proteínas envolvidas na imunidade, na inflamação e na dor (TAMURA et al., 1998; GOEBELER et al., 2001). Como descrito anteriormente, diversas evidências indicam a participação do NF $\kappa$ B no desenvolvimento da dor. Rinaldi et al. (2006) observaram a ativação do NF $\kappa$ B após a injúria cirúrgica. No presente trabalho analisamos parâmetros bioquímicos e comportamentais para investigar a possível contribuição de NF $\kappa$ B na dor pós-operatória experimental.

Demonstramos inicialmente que o pré-tratamento com o PDTC, inibidor do NFκB, inibiu de modo consistente e duradouro a hipernocicepção induzida pela incisão, sugerindo assim a participação do NFκB no desenvolvimento da dor pós-operatória experimental. Após uma única administração, a atividade antinociceptiva do PDTC foi significativa por até quatro dias após a indução, ou seja, durante todo o período experimental. O efeito antinociceptivo apresentado pelo PDTC dificilmente é obtido com a utilização dos analgésicos atualmente disponíveis, e sugere que ele atue prevenindo ou reduzindo eventos envolvidos na sensibilização nociceptiva, responsáveis pela persistência da dor.

A sensibilização nociceptiva é resultante da liberação de mediadores químicos por vários tipos celulares residentes e migratórios no local da lesão tecidual. Do ponto de vista eletrofisiológico, esta sensibilização é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade neuronal necessário para a produção de potenciais de ação e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiais (RIEDEL & NEECK, 2001). Dentre os mediadores responsáveis pela sensibilização dos nociceptores, podemos destacar os metabólitos da COX, as PGs. A habilidade das PGs em sensibilizar os nociceptores foi demonstrada tanto por modelos experimentais como em humanos, utilizando-se técnicas eletrofisiológicas e/ou comportamentais (FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1978, 1990; NAKAMURA & LICO, 1986; NAKAMURA & FERREIRA, 1987). Recentemente, tem sido demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela liberação de prostaglandinas. Atualmente, acredita-se que TNF-α, induz a produção de IL-6 e IL-1β, que estimulam a formação de produtos da COX através da indução enzimática da COX-2, resultando principalmente na produção de PGE<sub>2</sub> (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1992; POOLE et al., 1999).

Assim, para investigar a hipótese de que o efeito antinociceptivo apresentado pelo PDTC decorre da redução de mediadores envolvidos na sensibilização nociceptiva, responsáveis pela persistência da dor, passamos então a avaliar a capacidade do PDTC em modular a produção desses mediadores. No local da ferida cirúrgica, observa-se o aumento de mediadores inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> sintetizados e liberados em decorrência da lesão tecidual resultante da incisão (BUVANENDRAN et al., 2006; LORAM et al., 2007). Sabendo que o NF $\kappa$ B modula a expressão de diversos mediadores pró-inflamatórios, dentre eles o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (BARNES & KARIN, 1997; O' NEILL & KALTSCHMIDT, 1997), que contribuem para sensibilização dos nociceptores (CUNHA et al., 1991,1992, 2005; FERREIRA et al., 1988; POOLE et al., 1999), resolvemos investigar se o efeito antinociceptivo do inibidor do NF $\kappa$ B decorre da redução da síntese desses mediadores no local da incisão. Observamos que o tratamento com PDTC reduziu a expressão de TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>, mas não de IL-1 $\beta$ , no local da incisão. Nossos dados sugerem que provavelmente TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>, mas não IL-1 $\beta$ , liberados localmente participam da hipernocicepção mecânica induzida pela incisão plantar. De acordo com essa idéia, Honore et al. (2006), utilizando camundongos "knock out" para IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  verificaram que apesar de IL-1 $\beta$  ser importante para geração e manutenção da dor em diversos modelos de dor inflamatória e neuropática, não é importante para o desenvolvimento e manutenção da dor pós-operatória. Por outro lado, Wolf et al. (2008) relataram que IL-1 $\beta$  participa da dor pós-operatória em camundongos, já que o bloqueio dessa citocina inibiu o desenvolvimento da dor pós-operatória. Esses dados conflitantes podem ser atribuídos a diferenças genéticas entre as espécies utilizadas, como também na técnica da incisão.

Nossos resultados sugerem que a sensibilização na dor pós-operatória pode decorrer da ativação do NFκB e sua modulação sobre a produção de TNF-α, já que o PDTTC produziu antinocicepção paralela à inibição da produção local de TNF-α. Corroborando nossos dados, recentemente, Andrade et al. (2011) verificaram que o aumento da dor pós-operatória está correlacionado a altos níveis de TNF-α e seu receptor TNFR1 em pacientes com hérnia de disco lombar. Além disso, Sahbaie et al (2009) observaram que animais “knock out” para substancia P apresentam redução da hipernociceção térmica e mecânica em modelo de dor pós-incisional, e redução de TNF-α no local da incisão. Sabendo que a substância P é capaz de ativar NFκB (LIEB et al., 1997), os dados de Sahbaied corroboram a nossa hipótese.

Além do papel do TNF-α, é provável que a PGE<sub>2</sub> também participe da sensibilização nociceptiva mediada pelo NFκB na dor pós-operatória, uma vez que uma redução da PGE<sub>2</sub> local acompanhou a antinocicepção do PDTTC. Diversos estudos têm relatado que as PGs participam da sensibilização dos nociceptores pós-incisão, já que o tratamento com inibidores não seletivos da COX, que inibem a síntese de PGs, atenuam a dor pós-operatória (KOKKI, 2003; CHEN et al., 2004; ROMSING & MOINICHE, 2004; GAJRAJ & JOSHI, 2005). De fato, PGs e aminas simpatomiméticas sensibilizam diretamente o nociceptor sendo, portanto, consideradas mediadores hipernociceptivos finais (NAKAMURA & FERREIRA, 1987; DUARTE et al., 1988), liberados secundariamente à liberação de citocinas (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1991). Entre essas citocinas, destaca-se o TNF-α, que estimula a produção de PGs e aminas simpáticas, contribuindo dessa forma para a sensibilização dos nociceptores (FERREIRA, 1972; FERREIRA et al., 1978, 1990; NAKAMURA & LICO, 1986; NAKAMURA & FERREIRA, 1987; CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2005). Em conclusão, de acordo com os nossos



resultados e os dados de literatura, podemos propor que a sensibilização nociceptiva periférica após a incisão plantar, envolve a ativação do fator de transcrição NFκB, com consequente produção de TNF-α e PGE<sub>2</sub>.

Estímulo nociceptivo intenso, mantido ou repetido está associado com alterações do perfil de expressão gênica no neurônio aferente primário, contribuindo para a hiperexcitabilidade neural que se manifesta clinicamente como hiperalgesia e alodinia (SONG et al., 2003; CALCUTT & BACKONJA, 2007). O aumento da produção de mediadores inflamatórios no GRD, induzido por lesão tecidual, processo inflamatório ou injúria no nervo contribui para geração de atividade ectópica de neurônios sensoriais, envolvida na manutenção da dor (HU & MCLACHLAN, 2002; SONG et al., 2003; DETLOFF et al., 2008; JANCÁLEK et al., 2010; HASEGAWA et al., 2010; VALLEJO et al., 2010). Em linha com essa idéia, alguns estudos revelaram que a ativação de NFκB no GRD está associada à hipernocicepção em modelo de dor neuropática (MA & BISBY, 1998; CHAN et al., 2000;). Em adição, Sun et al.(2006) demonstraram que o tratamento com antisense para subunidade p65 do NFκB diminui a hipernocicepção neuropática. Esses trabalhos indicam que a ativação do NFκB no GRD é importante para a geração e manutenção da dor neuropática, entretanto, não há dados que comprovem essa hipótese na dor pós-operatória. Assim, nosso próximo passo foi investigar se a redução da hipernocicepção decorrente do bloqueio da atividade do NFκB é acompanhada pela redução da produção de mediadores hipernociceptivos no GRD no modelo de dor pós-operatória. O PDTC, em doses antinociceptivas, reduziu a expressão do RNAm do TNF-α e COX-2 no GRD após a incisão. Esses resultados indicam que, a inibição do NFκB diminui a hipernocicepção pós-operatória, em parte, por limitar a produção de mediadores pró-inflamatórios associados à

hiperexcitabilidade neuronal no GRD. O aumento da sensibilidade à estimulação mecânica é um importante achado clínico da dor pós-operatória. A sensibilização de neurônios do GRD como resultado da hiperexcitabilidade das fibras A $\delta$  e C podem contribuir diretamente para o desenvolvimento da dor pós-operatória (HAMALAINEN et al., 2002; POGATZKI et al., 2002). Estudos têm demonstrado que os canais para sódio estão envolvidos na gênese da hiperexcitabilidade neuronal, sendo componentes importantes da geração e manutenção da dor (TANAKA et al., 1998; LAI et al., 2002). Os canais para sódio resistentes à tetrodotoxina (TTX-R) Nav 1.8 e Nav 1.9 possuem alto limiar de ativação e são expressos seletivamente nas fibras C e A $\delta$  do GRD (STUCKY & LEWIN, 1999; WU & PAN, 2004), tornando-se interessantes alvos para o controle da dor (MCCLESKEY & GOLD, 1999). De fato, canais Nav 1.8 e Nav 1.9 contribuem para o desenvolvimento da dor inflamatória e neuropática, já que a depleção de genes Nav 1.8 ou Nav 1.9 ou ainda sua inibição farmacológica reduz a hipernocicepção em diversos modelos de dor inflamatória (AKOPIAN et al., 1999; PRIEST et al., 2005; AMAYA et al., 2006; JARVIS et al., 2007) e dor neuropática (LAI et al., 2002; ROZA et al., 2003; PRIEST et al., 2005; AMAYA et al., 2006; JARVIS et al., 2007).

Vários estudos relataram que mediadores inflamatórios, como a PGE<sub>2</sub>, podem aumentar a expressão de RNAm de canais para sódio TTX-R e aumentar a corrente iônica por esses canais no GRD (GOLD et al., 1996, 1999; ENGLAND et al., 1996; KHASAR et al., 1998). A importância desses canais na sensibilização nociceptiva induzida pela PGE<sub>2</sub> foi evidenciada com uso de camundongos “knock out” e “knock down” (KHASAR et al., 1998; VILLARREAL, et al., 2005; AMAYA et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que, em modelos de dor neuropática, o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão de canais para sódio Nav 1.8 no GRD (HE et al., 2010) e

amplifica a corrente iônica por esses canais em neurônios do GRD (CHEN et al., 2011), aumentando a excitabilidade neuronal, contribuindo dessa forma para a manutenção da dor neuropática. Como verificamos um aumento de TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> no tecido plantar e no GRD após a incisão, investigamos a seguir se a incisão cirúrgica modula a expressão gênica dos canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 no GRD. Interessantemente, houve aumento significativo de RNAm de canais Nav 1.8 e Nav 1.9 48 horas após a incisão, indicando que esses canais podem contribuir para a hiperexcitabilidade neuronal e sensibilização nociceptiva na dor pós-operatória. Por outro lado, Joshi et al. (2006) observaram que o tratamento com oligonucleotídeos antisense para Nav 1.8 não reduziu a hipernocicepção induzida pela incisão plantar em ratos, sugerindo assim que o canal de sódio Nav 1.8 não está envolvido na dor pós-operatória. Entretanto, considerando que é possível uma ação sinérgica entre os canais Nav 1.8 e Nav 1.9 na dor pós-operatória, a inibição apenas do canal Nav 1.8 pode não ser suficiente para reduzir a hipernocicepção no modelo de dor pós-operatória.

Recentemente foi descrito que o NF $\kappa$ B modula a transcrição de canais para sódio (ZANG et al., 2010). Assim, para avaliar a hipótese de que a ativação do NF $\kappa$ B é responsável pelo aumento da expressão dos canais Nav 1.8 e Nav 1.9 no modelo de dor pós-operatória, investigamos o efeito da inibição farmacológica de NF $\kappa$ B sobre a expressão de canais Nav 1.8 e Nav 1.9 no GRD. O tratamento com o PDTC preveniu o aumento da expressão desses canais no GRD induzido pela incisão cirúrgica. Esses dados indicam que, possivelmente, a incisão cirúrgica ativa o NF $\kappa$ B que induz a transcrição de canais Nav 1.8 e Nav 1.9 em neurônios nociceptivos, aumentando a excitabilidade desses neurônios, o que mantém a hipernocicepção. Zang et al. (2010) verificaram que o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão dos canais para

sódio Nav 1.3 em cultura de neurônios do GRD e que este efeito é bloqueado com o PDTC, sugerindo assim que o aumento da expressão de canais para sódio Nav 1.3 no neurônio sensorial é dependente da ativação do NFκB. Nossos resultados estão de acordo com essa idéia, pois demonstramos que após a incisão cirúrgica há ativação do NFκB com o aumento de TNF-α, e da expressão dos canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 no GRD, gerando hiperexcitabilidade neuronal e sensibilização nociceptiva.

Como as MAPK são importantes para os eventos de sensibilização nociceptiva e manutenção da dor (KENNEY & KOCSIS, 1998; JI et al., 1999, 2002; SAMMONS et al., 2000; ALEY et al., 2001; SVENSSON et al., 2003; OBATA et al., 2004; SWEITZER et al., 2004; DOYA et al., 2005; MIZUSHIMA et al., 2005), e exercem seus efeitos em parte pela ativação de fatores de transcrição como o NFκB (TAMURA et al., 1998; GOEBELER et al., 2001), investigamos se as MAPKs estão envolvidas na dor pós-operatória experimental. O tratamento com o inibidor seletivo da p38, mas não da ERK ou da JNK, foi capaz de reduzir a hipernocicepção induzida pela incisão plantar. Esses dados corroboram os resultados de estudo prévio que demonstrou que a ativação da p38 espinal tem papel no desenvolvimento da hipernocicepção mecânica pós-operatória (WEN et al., 2009). A importância da p38 na dor pós-operatória foi reafirmada por um estudo clínico recente, que evidenciou pela primeira vez os efeitos analgésicos do inibidor da p38 na dor pós-operatória dental (TONG et al., 2011).

Com base nos dados da literatura e em nossos resultados, acreditamos que a injúria tecidual decorrente da incisão plantar gera liberação de mediadores inflamatórios que fosforilam a MAPK p38 que por sua vez ativa o NFκB. A ativação de NFκB promove aumento da transcrição de TNF-α e PGE<sub>2</sub> no GRD, que induzem,

respectivamente, aumento da expressão e da condutância dos canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9, gerando hiperexcitabilidade neuronal que favorece ao desenvolvimento e manutenção da dor pós-operatória.

Analisados em conjunto, os resultados do presente trabalho demonstram diferenças nos mecanismos moleculares envolvidos no processo de sensibilização da hipernocicepção pós-operatória e dos quadros agudos e crônicos da hipernocicepção muscular. Entretanto, como o fator de transcrição NF $\kappa$ B participa no desenvolvimento dos dois modelos experimentais avaliados, acreditamos que o NF $\kappa$ B pode ser um interessante alvo farmacológico para o tratamento da dor pós-operatória e da dor muscular.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos nossos resultados, podemos concluir que:

- ✓ As MAPKs (p38, JNK e ERK) e o fator de transcrição NFκB participam dos quadros agudos da hipernocicepção muscular, mas não nos quadros crônicos.
- ✓ A p38 MAPK e o fator de transcrição NFκB contribuem para o desenvolvimento da hipernocicepção pós-operatória. Entretanto, não há participação da ERK e JNK no desenvolvimento desse modelo de dor persistente.
- ✓ A incisão cirúrgica ativa o NFκB, que aumenta a produção do TNF-α e da PGE<sub>2</sub>, como também a expressão de canais para sódio Nav 1.8 e Nav 1.9 em neurônios aferentes primários, contribuindo desta forma para a hiperexcitabilidade neuronal, envolvida na manutenção da hipernocicepção pós-operatória.

## REFERÊNCIAS

ADWANIKAR, H.; KARIM, F.; GEREAU, R. W. T. Inflammation persistently enhances nocifensive behaviors mediated by spinal group I mGluRs through sustained ERK activation. **Pain**, v. 111, n. 1-2, p. 125-135, 2004.

AKOPIAN, A. N.; SIVILOTTI, L.; WOOD, J. N. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. **Nature**, v. 379, n. 6562, p. 257-262, 1996.

AKOPIAN, A. N. et al. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 6, p. 541-548, 1999.

ALEY, K. O. et al. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. **J Neurosci**, v. 21, n. 17, p. 6933-6939, 2001.

AMAYA, F. et al. Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. **Mol Cell Neurosci**, v. 15, n. 4, p. 331-342, 2000.

AMAYA, F. et al. The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. **J Neurosci**, v. 26, n. 50, p. 12852-12860, 2006.

ANDRADE, P. et al. Tumor necrosis factor-alpha levels correlate with postoperative pain severity in lumbar disc hernia patients: Opposite clinical effects between tumor necrosis factor receptor 1 and 2. **Pain**, v. 152, n. 11, p. 2645-2652, 2011.

AUPHAN, N. et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. **Science**, v. 270, n. 5234, p. 286-290, 1995.

BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13-20, 1996.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 18, n. 2, p. 46-50, 1997.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med**, v. 336, n. 15, p. 1066-1071, 1997.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

BEYREUTHER, B. K. et al. Antihyperalgesic efficacy of lacosamide in a rat model for muscle pain induced by TNF. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 5, p. 1312-1317, 2007.

BHAVE, G.; GEREAU, R. W. T. Posttranslational mechanisms of peripheral

sensitization. **J Neurobiol**, v. 61, n. 1, p. 88-106, 2004.

BONICA, J. J. Evolution and current status of pain programs. **J Pain Symptom Manage**, v. 5, n. 6, p. 368-374, 1990.

BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: a fundamental human right. **Anesth Analg**, v. 105, n. 1, p. 205-221, 2007.

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

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

BUVANENDRAN, A. et al. Upregulation of prostaglandin E2 and interleukins in the central nervous system and peripheral tissue during and after surgery in humans. **Anesthesiology**, v. 104, n. 3, p. 403-410, 2006.

CALCUTT, N. A.; BACKONJA, M. M. Pathogenesis of pain in peripheral diabetic neuropathy. **Curr Diab Rep**, v. 7, n. 6, p. 429-434, 2007.

CAO, F. L. et al. Different roles of spinal p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways in bee venom-induced multiple pain-related behaviors. **Neurosci Lett**, v. 427, n. 1, p. 50-54, 2007.

CHACUR, M. et al. Role of spinal microglia in myositis-induced central sensitisation: an immunohistochemical and behavioural study in rats. **Eur J Pain**, v. 13, n. 9, p. 915-923, 2009.

CHAN, C. F. et al. Activation of transcription factors of nuclear factor kappa B, activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, v. 402, n. 1-2, p. 61-68, 2000.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994.

CHEN, L. C.; ELLIOTT, R. A.; ASHCROFT, D. M. Systematic review of the analgesic efficacy and tolerability of COX-2 inhibitors in post-operative pain control. **J Clin Pharm Ther**, v. 29, n. 3, p. 215-229, 2004.

CHEN, X. et al. TNF-alpha enhances the currents of voltage gated sodium channels in uninjured dorsal root ganglion neurons following motor nerve injury. **Exp Neurol**, v. 227, n. 2, p. 279-286, 2011.

CLARK, J. E.; SARAFRAZ, N.; MARBER, M. S. Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease. **Pharmacol Ther**, v. 116, n. 2, p. 192-206, 2007.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, n., p. 1-32,



2009.

COWARD, K. et al. Plasticity of TTX-sensitive sodium channels PN1 and brain III in injured human nerves. **Neuroreport**, v. 12, n. 3, p. 495-500, 2001.

COWARD, K. et al. Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states. **Pain**, v. 85, n. 1-2, p. 41-50, 2000.

CRONSTEIN, B. N.; MONTESINOS, M. C.; WEISSMANN, G. Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFkappaB. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 11, p. 6377-6381, 1999.

CRUZ, C. D. et al. Inhibition of ERK phosphorylation decreases nociceptive behaviour in monoarthritic rats. **Pain**, v. 116, n. 3, p. 411-419, 2005.

CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. **J Neurosci**, v. 17, n. 10, p. 3503-3514, 1997.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol**, v. 104, n. 3, p. 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUZZOCREA, S. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 135, n. 2, p. 496-510, 2002.

D'ACQUISTO, F.; MAY, M. J.; GHOSH, S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. **Mol Interv**, v. 2, n. 1, p. 22-35, 2002.

DE LIMA, F. O. et al. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of 7-hydroxycoumarin. **J Nat Prod**, v. 74, n. 4, p. 596-602, 2011.

DETLOFF, M. R. et al. Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. **Exp Neurol**, v. 212, n. 2, p. 337-347, 2008.

DIB-HAJJ, S. D. et al. NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 15, p. 8963-8968, 1998.

DINA, O. A.; GREEN, P. G.; LEVINE, J. D. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. **Neuroscience**, v. 152, n. 2, p. 521-525, 2008.

DJOUHRI, L. et al. The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. **J Physiol**, v. 550, n. Pt 3, p. 739-752, 2003.

DOYA, H. et al. c-Jun N-terminal kinase activation in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 335, n. 1, p. 132-138, 2005.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 21, n. 2, p. 341-343, 1988.

DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annu Rev Neurosci**, v. 6, n., p. 381-418, 1983.

EKBERG, J. et al.  $\mu$ O-conotoxin MrVIB selectively blocks Nav1.8 sensory neuron specific sodium channels and chronic pain behavior without motor deficits. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 45, p. 17030-17035, 2006.

ENGLAND, S.; BEVAN, S.; DOCHERTY, R. J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. **J Physiol**, v. 495 ( Pt 2), n., p. 429-440, 1996.

FALSIG, J. et al. Specific modulation of astrocyte inflammation by inhibition of mixed lineage kinases with CEP-1347. **J Immunol**, v. 173, n. 4, p. 2762-2770, 2004.

FANG, X. et al. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. **J Neurosci**, v. 22, n. 17, p. 7425-7433, 2002.

FERREIRA, S. H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat New Biol**, v. 240, n. 102, p. 200-203, 1972.

FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v. 334, n. 6184, p. 698-700, 1988.

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

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; DE ABREU CASTRO, M. S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 16, n. 1, p. 31-37, 1978.

FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature**, v. 216, n. 5118, p. 868-873, 1967.

FU, E. S. et al. Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. **Pain**, v. 148, n. 3, p. 509-518, 2010.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.

GAJRAJ, N. M.; JOSHI, G. P. Role of cyclooxygenase-2 inhibitors in postoperative pain management. **Anesthesiol Clin North America**, v. 23, n. 1, p. 49-72, 2005.

GEBHART GF. Global year against musculoskeletal pain. Disponível em [http://www.iaspain.org/AM/Template.cfm?Section=2009\\_2010\\_Musculoskeletal\\_Pain\\_Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=9310](http://www.iaspain.org/AM/Template.cfm?Section=2009_2010_Musculoskeletal_Pain_Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=9310). Acesso em: 10 de novembro 2010.

GERDLE, B. et al. Biochemical alterations in the trapezius muscle of patients with chronic whiplash associated disorders (WAD)--a microdialysis study. **Eur J Pain**, v. 12, n. 1, p. 82-93, 2008.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 16, n., p. 225-260, 1998.

GOEBELER, M. et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 46-55, 2001.

GOLD, M. S. Inflammatory mediator-induced modulation of TTX-R INa: an underlying mechanism of inflammatory hyperalgesia. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 42, n., p. 111-112, 1999.

GOLD, M. S. et al. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 3, p. 1108-1112, 1996.

GOLD, M. S. et al. Redistribution of Na(V)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. **J Neurosci**, v. 23, n. 1, p. 158-166, 2003.

HAINS, B. C.; WAXMAN, S. G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 26, n. 16, p. 4308-4317, 2006.

HAMALAINEN, M. M.; GEBHART, G. F.; BRENNAN, T. J. Acute effect of an incision on mechanosensitive afferents in the plantar rat hindpaw. **J Neurophysiol**, v. 87, n. 2, p. 712-720, 2002.

HARSTALL C.; OSPINA M. How prevalent is chronic pain? **Pain Clin Updates**. v. 11, n. 2, p. 1-4, 2003.

HASEGAWA, S. et al. Role of PAF receptor in proinflammatory cytokine expression in the dorsal root ganglion and tactile allodynia in a rodent model of neuropathic pain. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10467, 2010.

HE, X. H. et al. TNF-alpha contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 266-279, 2010.

HOHEISEL, U.; UNGER, T.; MENSE, S. Excitatory and modulatory effects of inflammatory cytokines and neurotrophins on mechanosensitive group IV muscle afferents in the rat. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 168-176, 2005.

HONORE, P. et al. Interleukin-1alpha gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. **Behav Brain Res**, v. 167, n. 2, p. 355-364, 2006.

HU, P.; MCLACHLAN, E. M. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 23-38, 2002.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 365-376, 2007.

IMPEY, S.; OBRIETAN, K.; STORM, D. R. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. **Neuron**, v. 23, n. 1, p. 11-14, 1999.

IOM. Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education and Research. National Academies Press, 2011, 349 p.

IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. **Front Biosci**, v. 9, n., p. 1977-1993, 2004.

JANCALEK, R. et al. Bilateral changes of TNF-alpha and IL-10 protein in the lumbar and cervical dorsal root ganglia following a unilateral chronic constriction injury of the sciatic nerve. **J Neuroinflammation**, p. 7-11, 2010.

JARVIS, M. F. et al. A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 20, p. 8520-8525, 2007a.

JARVIS, M. F. et al. A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 20, p. 8520-8525, 2007b.

JEFTINIJA, S. The role of tetrodotoxin-resistant sodium channels of small primary afferent fibers. **Brain Res**, v. 639, n. 1, p. 125-134, 1994.

JI, R. R. et al. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 12, p. 1114-1119, 1999.

JI, R. R. et al. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. **J Neurosci**, v. 22, n. 2, p. 478-485, 2002.

JI, R. R. et al. MAP kinase and pain. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 135-148, 2009.

Jl, R. R. et al. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. **Neuron Glia Biol**, v. 2, n. 4, p. 259-269, 2006.

Jl, R. R. et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2002.

Jl, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Sci STKE**, v. 2004, n. 252, p. reE14, 2004.

Jl, R. R.; SUTER, M. R. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. **Mol Pain**, v. 3, n., p. 33, 2007.

Jl, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol Dis**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2001.

Jl, Y. H.; LIU, T. The study of sodium channels involved in pain responses using specific modulators. **Sheng Li Xue Bao**, v. 60, n. 5, p. 628-634, 2008.

JIN, S. X. et al. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. **J Neurosci**, v. 23, n. 10, p. 4017-4022, 2003.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.

JOSHI, S. K. et al. Involvement of the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in inflammatory and neuropathic, but not post-operative, pain states. **Pain**, v. 123, n. 1-2, p. 75-82, 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KAMERMAN, P.; KOLLER, A.; LORAM, L. Postoperative administration of the analgesic tramadol, but not the selective cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib, abolishes postoperative hyperalgesia in a new model of postoperative pain in rats. **Pharmacology**, v. 80, n. 4, p. 244-248, 2007.

KARIM, F.; WANG, C. C.; GEREAU, R. W. T. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. **J Neurosci**, v. 21, n. 11, p. 3771-3779, 2001.

KARIN, M.; DELHASE, M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. **Semin Immunol**, v. 12, n. 1, p. 85-98, 2000.

KATSURA, H. et al. Activation of Src-family kinases in spinal microglia contributes to

mechanical hypersensitivity after nerve injury. **J Neurosci**, v. 26, n. 34, p. 8680-8690, 2006.

KAWASAKI, T. et al. Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger. **Glia**, v. 55, n. 13, p. 1325-1333, 2007.

KEHLET, H.; JENSEN, T. S.; WOOLF, C. J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1618-1625, 2006.

KENNEY, A. M.; KOCSIS, J. D. Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia In vivo. **J Neurosci**, v. 18, n. 4, p. 1318-1328, 1998.

KHASAR, S. G.; GOLD, M. S.; LEVINE, J. D. A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. **Neurosci Lett**, v. 256, n. 1, p. 17-20, 1998.

KIM, B. S. et al. Involvement of p38 MAP kinase during iron chelator-mediated apoptotic cell death. **Cell Immunol**, v. 220, n. 2, p. 96-106, 2002a.

KIM, S. Y. et al. Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury. **Neuroreport**, v. 13, n. 18, p. 2483-2486, 2002b.

KOKKI, H. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for postoperative pain: a focus on children. **Paediatr Drugs**, v. 5, n. 2, p. 103-123, 2003.

KROIN, J. S. et al. Cyclooxygenase-2 inhibition potentiates morphine antinociception at the spinal level in a postoperative pain model. **Reg Anesth Pain Med**, v. 27, n. 5, p. 451-455, 2002.

LAI, J. et al. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. **Pain**, v. 95, n. 1-2, p. 143-152, 2002.

LAUGHLIN, T. M. et al. Cytokine involvement in dynorphin-induced allodynia. **Pain**, v. 84, n. 2-3, p. 159-167, 2000.

LAUTENBACHER, S.; ROLLMAN, G. B.; MCCAIN, G. A. Multi-method assessment of experimental and clinical pain in patients with fibromyalgia. **Pain**, v. 59, n. 1, p. 45-53, 1994.

LEE, K. M. et al. Spinal NF-kB activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Eur J Neurosci**, v. 19, n. 12, p. 3375-3381, 2004.

LEPIDI, H. et al. Local expression of cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 24, n. 1, p. 73-79, 1998.

LIEB, K. et al. The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. **J Immunol**, v. 159, n. 10, p. 4952-4958, 1997.

LOESER, J. D. What's to be done? Comments on Grabow et al. **Clin J Pain**, v. 19, n. 6, p. 384, 2003.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LONZE, B. E.; GINTY, D. D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. **Neuron**, v. 35, n. 4, p. 605-623, 2002.

LORAM, L. C. et al. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **J Pain**, v. 8, n. 2, p. 127-136, 2007a.

LORAM, L. C. et al. The time course of inflammatory cytokine secretion in a rat model of postoperative pain does not coincide with the onset of mechanical hyperalgesia. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, n. 6, p. 613-620, 2007b.

LORENZETTI, B. B. et al. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur Cytokine Netw**, v. 13, n. 4, p. 456-461, 2002.

LUNDBERG, I. E. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. **Curr Rheumatol Rep**, v. 2, n. 3, p. 216-224, 2000.

MA, K. et al. TTX-R Na<sup>+</sup> current-reduction by celecoxib correlates with changes in PGE(2) and CGRP within rat DRG neurons during acute incisional pain. **Brain Res**, v. 1209, n., p. 57-64, 2008.

MA, W.; BISBY, M. A. Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. **Brain Res**, v. 797, n. 2, p. 243-254, 1998.

MAES, M. et al. The immune-inflammatory pathophysiology of fibromyalgia: increased serum soluble gp130, the common signal transducer protein of various neurotrophic cytokines. **Psychoneuroendocrinology**, v. 24, n. 4, p. 371-383, 1999.

MAIER, S. F. et al. Interleukin-1 mediates the behavioral hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. **Brain Res**, v. 623, n. 2, p. 321-324, 1993.

MANJAVACHI, M. N. et al. Mechanisms involved in IL-6-induced muscular mechanical hyperalgesia in mice. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 345-355, 2010.

MARTIN, H. A. et al. Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high-threshold C- and A-delta mechanonociceptors in the hairy skin of rat hindlimbs. **Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 651-659, 1987.

MAKAROV SS. NF-kappaB as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. **Mol. Med. Today**, , v. 6, n. 11, p. 441-448, 2000.

- MCCLESKEY, E. W.; GOLD, M. S. Ion channels of nociception. **Annu Rev Physiol**, v. 61, n., p. 835-856, 1999.
- MCCMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurones in pain. **Pain**, v. 43, n. 3, p. 269-272, 1990.
- MCCMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci**, v. 13, n. 6, p. 199-201, 1990.
- MENSE, S. Group III and IV receptors in skeletal muscle: are they specific or polymodal? **Prog Brain Res**, v. 113, n., p. 83-100, 1996.
- MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. **Pain**, v. 54, n. 3, p. 241-289, 1993.
- MERSKEY, H. Logic, truth and language in concepts of pain. **Qual Life Res**, v. 3 Suppl 1, n., p. S69-76, 1994.
- MEUNIER, A. et al. Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat. **Mol Ther**, v. 15, n. 4, p. 687-697, 2007.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.
- MILLIGAN, E. D. et al. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. **J Neurosci**, v. 23, n. 3, p. 1026-1040, 2003.
- MILLIGAN, E. D. et al. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 9, p. 2294-2302, 2004.
- MIZUSHIMA, T. et al. Activation of p38 MAPK in primary afferent neurons by noxious stimulation and its involvement in the development of thermal hyperalgesia. **Pain**, v. 113, n. 1-2, p. 51-60, 2005.
- MOINICHE, S. et al. Time course of subjective pain ratings, and wound and leg tenderness after hysterectomy. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 41, n. 6, p. 785-789, 1997.
- MOSER, C. V. et al. The protein kinase IKKepsilon is a potential target for the treatment of inflammatory hyperalgesia. **J Immunol**, v. 187, n. 5, p. 2617-2625, 2011.
- MOTTA, E. M.; CALIXTO, J. B.; RAE, G. A. Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 6, p. 1141-1145, 2006.



NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**, v. 135, n. 2, p. 145-153, 1987.

NAKAMURA, M.; LICO, M. C. Mechanism of peripheral pain in the conscious guinea pig: effect of propranolol. **Braz J Med Biol Res**, v. 19, n. 3, p. 451-453, 1986.

NICOL, G. D.; KLINGBERG, D. K.; VASKO, M. R. Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. **J Neurosci**, v. 12, n. 5, p. 1917-1927, 1992.

NIEDERBERGER, E. et al. Impaired acute and inflammatory nociception in mice lacking the p50 subunit of NF-kappaB. **Eur J Pharmacol**, v. 559, n. 1, p. 55-60, 2007.

NOBACK, C.R., STROMINGER, N.L., DMAREST, R.J. The human nervous system: structure and function. *Pain and temperature*. 5a ed., New York: Williams & Wilkins, 1996 p. 123-137.

NOVAKOVIC, S. D. et al. Distribution of the tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. **J Neurosci**, v. 18, n. 6, p. 2174-2187, 1998.

OBATA, K. et al. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. **J Neurosci**, v. 24, n. 45, p. 10211-10222, 2004.

OBATA, T.; BROWN, G. E.; YAFFE, M. B. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. **Crit Care Med**, v. 28, n. 4 Suppl, p. N67-77, 2000.

O'NEILL, L. A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 6, p. 252-258, 1997.

ONO, K.; HAN, J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. **Cell Signal**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2000.

ONO, T. et al. Muscle contraction accelerates IL-6 mRNA expression in the rat masseter muscle. **Arch Oral Biol**, v. 52, n. 5, p. 479-486, 2007.

PANG, X. Y. et al. Activation of spinal ERK signaling pathway contributes to pain-related responses induced by scorpion *Buthus martensi* Karch venom. **Toxicon**, v. 51, n. 6, p. 994-1007, 2008.

PARADA, C. A. et al. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to Nav1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 5, p. 2923-2928, 2003.

PAVLIN, D. J. et al. Pain as a factor complicating recovery and discharge after ambulatory surgery. **Anesth Analg**, v. 95, n. 3, p. 627-634, table of contents, 2002.

PEDERSEN, B. K. et al. Role of myokines in exercise and metabolism. **J Appl Physiol**, v. 103, n. 3, p. 1093-1098, 2007.

PERKINS, F. M.; KEHLET, H. Chronic pain as an outcome of surgery. A review of predictive factors. **Anesthesiology**, v. 93, n. 4, p. 1123-1133, 2000.

POGATZKI, E. M.; GEBHART, G. F.; BRENNAN, T. J. Characterization of Adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. **J Neurophysiol**, v. 87, n. 2, p. 721-731, 2002.

POGATZKI, E. M.; RAJA, S. N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 1023-1027, 2003.

POLLOCK, J. et al. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca<sup>2+</sup> mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. **Neuropharmacology**, v. 42, n. 1, p. 93-106, 2002.

POOLE, S. et al. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 3, p. 649-656, 1999.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 319-325, 2002.

PRIEST, B. T. et al. Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 26, p. 9382-9387, 2005.

REN, K.; DUBNER, R. Central nervous system plasticity and persistent pain. **J Orofac Pain**, v. 13, n. 3, p. 155-163; discussion 164-171, 1999.

RICHMOND, C. E.; BROMLEY, L. M.; WOOLF, C. J. Preoperative morphine pre-empted postoperative pain. **Lancet**, v. 342, n. 8863, p. 73-75, 1993.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatol**, v. 60, n. 6, p. 404-415, 2001.

RINALDI, B. et al. Inflammatory events in a vascular remodeling model induced by surgical injury to the rat carotid artery. **Br J Pharmacol**, v. 147, n. 2, p. 175-182, 2006.

ROMSING, J.; MOINICHE, S. A systematic review of COX-2 inhibitors compared with traditional NSAIDs, or different COX-2 inhibitors for post-operative pain. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 48, n. 5, p. 525-546, 2004.

ROSENDAL, L. et al. Increase in interstitial interleukin-6 of human skeletal muscle with repetitive low-force exercise. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 2, p. 477-481, 2005.

ROSSI, A. et al. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 103-108, 2000.

- ROZA, C. et al. The tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. **J Physiol**, v. 550, n. Pt 3, p. 921-926, 2003.
- SA, K. N. et al. Chronic pain and gender in Salvador population, Brazil. **Pain**, v. 139, n. 3, p. 498-506, 2008.
- SAHBAIE, P. et al. Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision. **Pain**, v. 145, n. 3, p. 341-349, 2009.
- SAKAUE, G. et al. NF-kappa B decoy suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. **Neuroreport**, v. 12, n. 10, p. 2079-2084, 2001.
- SAMMONS, M. J. et al. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. **Brain Res**, v. 876, n. 1-2, p. 48-54, 2000.
- SCHAFERS, M. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. **J Neurosci**, v. 23, n. 7, p. 2517-2521, 2003.
- SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. **J Physiol**, v. 403, n., p. 91-104, 1988a.
- SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **J Neurophysiol**, v. 60, n. 6, p. 2180-2195, 1988b.
- SEGER, R.; KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. **Faseb J**, v. 9, n. 9, p. 726-735, 1995.
- SHI, Y.; GAESTEL, M. In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. **Biol Chem**, v. 383, n. 10, p. 1519-1536, 2002.
- SONG, X. J. et al. Somata of nerve-injured sensory neurons exhibit enhanced responses to inflammatory mediators. **Pain**, v. 104, n. 3, p. 701-709, 2003.
- STEENBERG, A. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **J Physiol**, v. 529 Pt 1, n., p. 237-242, 2000.
- STUBHAUG, A. A new method to evaluate central sensitization to pain following surgery. Effect of ketamine. **Acta Anaesthesiol Scand Suppl**, v. 110, n., p. 154-155, 1997.
- STUBHAUG, A. et al. Mapping of punctuate hyperalgesia around a surgical incision demonstrates that ketamine is a powerful suppressor of central sensitization to pain

following surgery. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 41, n. 9, p. 1124-1132, 1997.

STUCKY, C. L.; LEWIN, G. R. Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. **J Neurosci**, v. 19, n. 15, p. 6497-6505, 1999.

SUN, T. et al. Alleviation of neuropathic pain by intrathecal injection of antisense oligonucleotides to p65 subunit of NF-kappaB. **Br J Anaesth**, v. 97, n. 4, p. 553-558, 2006.

SUNG, C. S. et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates interleukin-1beta-induced thermal hyperalgesia and inducible nitric oxide synthase expression in the spinal cord. **J Neurochem**, v. 94, n. 3, p. 742-752, 2005.

SVENSSON, C. I. et al. Spinal p38 MAP kinase is necessary for NMDA-induced spinal PGE(2) release and thermal hyperalgesia. **Neuroreport**, v. 14, n. 8, p. 1153-1157, 2003a.

SVENSSON, C. I. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia is a critical link in inflammation-induced spinal pain processing. **J Neurochem**, v. 86, n. 6, p. 1534-1544, 2003b.

SWEITZER, S. M. et al. Peripheral and central p38 MAPK mediates capsaicin-induced hyperalgesia. **Pain**, v. 111, n. 3, p. 278-285, 2004.

TAMURA, D. Y. et al. p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on human pulmonary microvascular endothelial cells. **Surgery**, v. 124, n. 2, p. 403-407; discussion 408, 1998.

TANAKA, M. et al. SNS Na<sup>+</sup> channel expression increases in dorsal root ganglion neurons in the carrageenan inflammatory pain model. **Neuroreport**, v. 9, n. 6, p. 967-972, 1998.

TEGEDER, I. et al. Specific Inhibition of IkappaB kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. **J Neurosci**, v. 24, n. 7, p. 1637-1645, 2004.

TERGAONKAR, V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, n. 10, p. 1647-1653, 2006.

TEIXEIRA MJ, TEIXEIRA WGJ, SANTOS FPS, ANDRADE DCA, BEZERRA SL, FIGUEIRÓ B, OKADA M. Epidemiologia clínica da dor músculo-esquelética. **Rev Med**. v. 80,p. 1-21, 2001.

TONG, S. E. et al. Novel p38{alpha} Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor Shows Analgesic Efficacy in Acute Postsurgical Dental Pain. **J Clin Pharmacol**, v.9, 2011.

TSUDA, M. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. **Glia**, v. 45, n. 1, p. 89-95, 2004.

- TVERSKOY, M. et al. Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia. **Anesth Analg**, v. 78, n. 2, p. 205-209, 1994.
- VALLEJO, R. et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Pract**, v. 10, n. 3, p. 167-184, 2010.
- VERRI, W. A., JR. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol Ther**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.
- VILLARREAL, C. F. et al. The role of Na(V)1.8 sodium channel in the maintenance of chronic inflammatory hypernociception. **Neurosci Lett**, v. 386, n. 2, p. 72-77, 2005.
- WALLACE, D. J. et al. Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. **Rheumatology (Oxford)**, v. 40, n. 7, p. 743-749, 2001.
- WALLACE, J. L. et al. Effects of sucralfate on gastric prostaglandin and leukotriene synthesis: relationship to protective actions. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 66, n. 5, p. 666-670, 1988.
- WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 12, p. 973-985, 2003.
- WEI, F. et al. Calcium calmodulin-stimulated adenylyl cyclases contribute to activation of extracellular signal-regulated kinase in spinal dorsal horn neurons in adult rats and mice. **J Neurosci**, v. 26, n. 3, p. 851-861, 2006.
- WEN, Y. R. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. **Anesthesiology**, v. 110, n. 1, p. 155-165, 2009.
- WEN, Y. R. et al. Nerve conduction blockade in the sciatic nerve prevents but does not reverse the activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve injury model. **Anesthesiology**, v. 107, n. 2, p. 312-321, 2007.
- WESTON, C. R.; DAVIS, R. J. The JNK signal transduction pathway. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 142-149, 2007.
- WIDMANN, C. et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 143-180, 1999.
- WOLF, G. et al. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 7, p. 1072-1077, 2008.
- WOOD, J. N. et al. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. **J Neurobiol**, v. 61, n. 1, p. 55-71, 2004.
- WOOLF, C. J. et al. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor alpha. **Br J Pharmacol**, v. 121, n. 3, p.

417-424, 1997.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 14, p. 7723-7730, 1999.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-364, 2007.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-1769, 2000.

WU, Z. Z.; PAN, H. L. Tetrodotoxin-sensitive and -resistant Na<sup>+</sup> channel currents in subsets of small sensory neurons of rats. **Brain Res**, v. 1029, n. 2, p. 251-258, 2004.

YAMAMOTO, T.; SAKASHITA, Y. The role of the spinal opioid receptor like1 receptor, the NK-1 receptor, and cyclooxygenase-2 in maintaining postoperative pain in the rat. **Anesth Analg**, v. 89, n. 5, p. 1203-1208, 1999.

YAMAMOTO, T.; SAKASHITA, Y.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Anti-allodynic effects of oral COX-2 selective inhibitor on postoperative pain in the rat. **Can J Anaesth**, v. 47, n. 4, p. 354-360, 2000.

YIANGOU, Y. et al. SNS/PN3 and SNS2/NaN sodium channel-like immunoreactivity in human adult and neonate injured sensory nerves. **FEBS Lett**, v. 467, n. 2-3, p. 249-252, 2000.

YIN, M. J.; YAMAMOTO, Y.; GAYNOR, R. B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. **Nature**, v. 396, n. 6706, p. 77-80, 1998.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Lack of effect of intrathecally administered N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in a rat model for postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 88, n. 1, p. 143-156, 1998.

ZAHN, P. K.; POGATZKI, E. M.; BRENNAN, T. J. Mechanisms for pain caused by incisions. **Reg Anesth Pain Med**, v. 27, n. 5, p. 514-516, 2002.

ZANG, Y. et al. Inhibition of NF-kappaB prevents mechanical allodynia induced by spinal ventral root transection and suppresses the re-expression of Nav1.3 in DRG neurons in vivo and in vitro. **Brain Res**, v. 1363, n., p. 151-158, 2010.

ZHU, X.; CONKLIN, D.; EISENACH, J. C. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord plays an important role in postoperative pain. **Pain**, v. 104, n. 1-2, p. 15-23, 2003.

ZHUANG, Z. Y. et al. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 149-159, 2005.

ZHUANG, Z. Y. et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks

mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. **J Neurosci**, v. 26, n. 13, p. 3551-3560, 2006.

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

ZIMMERMANN, M. Management of patients with chronic pain syndromes--deficits and perspectives. **Schmerz**, v. 15, n. 2, p. 85-91, 2001.