

UFU

Universidade Federal de Uberlândia

Guilherme Gomes Silva

Desenvolvimento de um modelo de dor
persistente induzido por carragenina na pata
de ratos

Uberlândia- MG

2023

Guilherme Gomes Silva

Desenvolvimento de um modelo de dor
persistente induzida por carragenina na pata
de ratos

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado à
Universidade Federal de
Uberlândia - UFU como
requisito parcial para obtenção
de Título de Bacharel em
Biomedicina.

Área de concentração: Neurofisiologia e
Farmacologia

Orientadora: Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Coorientador(a): Dra. Tais de Campos Lima

Uberlândia- MG

2023

Guilherme Gomes Silva

Desenvolvimento de um modelo de dor persistente induzida por carragenina na pata de ratos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal de Uberlândia - UFU como requisito parcial para obtenção de Título de Bacharel em Biomedicina.

Uberlândia, dezembro de 2023.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

DEFIS-ICBIM/UFU

Prof. Dr. Marcos Luiz Ferreira Neto

DEFIS - ICBIM/UFU

Prof. Dr. Rodrigo Molini Leão

DEFAR - ICBIM/UFU

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 2023	<p>Silva, Guilherme Gomes, 1999- Desenvolvimento de um modelo de dor persistente induzida por carragenina na pata de ratos [recurso eletrônico] / Guilherme Gomes Silva. - 2023.</p> <p>Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo. Coorientadora: Taís de Campos Lima. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biomedicina. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Ciências médicas. I. Lotufo, Celina Monteiro da Cruz, 1975-, (Orient.). II. Lima, Taís de Campos, 1989-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biomedicina. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 61</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Esse trabalho foi desenvolvido pensando no avanço da ciência e longevidade humana, por isso dedico esse trabalho a todos aqueles que sobre os pilares do saber repousam seus pés e desfrutam dos seus frutos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe pelos cuidados, apoio financeiro e emocional. Seu amor me sustentou até aqui e sempre me deu forças para batalhar pelos meus sonhos e buscar minha melhor versão sempre. Nada disso seria possível sem você e seu amor incondicional, meu maior exemplo de garra e perseverança na vida.

Ao meu pai pela presença, apoio financeiro e emocional. Seu amor e cuidado me orientou até aqui, me ensinou virtudes, princípios que valem mais que todas as riquezas materiais. E sempre será meu herói.

À Prof.^a Dr.^a. Celina Monteiro Da Cruz Lotufo pelas orientações e ensinamentos, sua perspicácia, doçura e genialidade me ensinaram o lado majestoso da ciência dentro e fora do laboratório.

Aos meus irmãos que me acompanham nessa trajetória, confiam e acreditam no meu potencial, todas minhas decisões são pensando em nós.

Aos amigos leais e verdadeiros, juntos criamos memórias que embelezam a vida, dividimos experiências felizes e tristes e ofereceram apoio emocional.

À minha avó, em memória, que me ensinou o que é amar e zelar pela vida de alguém, me educou e protegeu, todas conquistas até aqui e as que virão dedico a você.

À Universidade Federal de Uberlândia pela educação riqueza intelectual e sediar a realização de um sonho.

“Porque o Senhor dá a sabedoria, e da boca vem a inteligência e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos; é escudo para os que caminham na sinceridade, guarda as veredas do juízo e conserva o caminho dos seus santos. Então entenderás justiça, juízo e equidade, todas as boas veredas. Porquanto a sabedoria entrará no teu coração e o conhecimento será agradável à tua alma.”

- Provérbios 2.6

Resumo

Introdução: As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), de acordo com a Organização Mundial da Saúde [OMS] entre 2000 e 2019 foram a causa de 74% das mortes mundiais. Muitas vezes, as DCNT estão relacionadas à dor crônica, que causa sofrimento, estresse físico, emocional e perda de qualidade de vida à cerca de 35,7% em adultos e 47,32% em idosos de brasileiros. A dor inflamatória é marcada pela sensibilização dos nociceptores após exposição prolongada aos mediadores inflamatórios. As prostaglandinas (PGE₂), provocam a hiperalgesia primária no local da lesão, o que gera um aumento da resposta a estímulos infraliminares e redução do limiar de excitabilidade nociceptiva. O modelo animal de dor crônica ou nociplástica, inicialmente descrito por Ferreira et al. (1990), induziu um estado de hiperalgesia inflamatória persistente pela injeção subcutânea diária de PGE₂ por 14 dias. A λ -carragenina (CGN) é um polissacarídeo extraído da parede celular de algas marinhas utilizada para desencadear resposta inflamatória aguda local em condições experimentais. **Objetivos:** Desenvolver um modelo de hipersensibilidade periférica persistente induzida por inflamação da pata de ratos por injeções de CGN. Avaliar o efeito da manutenção da hiperalgesia inflamatória por 7 ou 14 dias sobre a sensibilidade mecânica e o edema na pata de ratos; e avaliar o potencial de repouso e a ativação de receptores TRPV1 em culturas de neurônios obtidos de animais controle e animais com hiperalgesia persistente. **Metodologia:** Foram utilizados ratos da linhagem Wistar machos de 180 a 250g, distribuídos em três grupos experimentais contendo 6 animais por grupo: controle de 14 dias, inflamação por 7 dias e inflamação por 14 dias. Todos 18 animais foram submetidos a injeções intraplantares de CGN ou solução salina na pata direita traseira, de forma a induzir ou não uma inflamação de baixa a moderada intensidade. O edema e a sensibilidade mecânica foram avaliados por meio de pletismografia e Von Frey eletrônico, respectivamente, durante o tratamento e até 14 dias após o término das injeções. Os animais foram eutanasiados e os gânglios da raiz dorsal da medula foram colhidos para realização de culturas primárias de neurônios. As culturas foram utilizadas para avaliar o potencial de repouso e a despolarização induzida por capsaicina ao TRPV1, por meio de microscopia confocal. **Resultados:** Os resultados mostram que os animais tratados com CGN por 7 dias ($30,81 \pm 2,04$) ou 14 dias ($25,87 \pm 1,5$) apresentaram uma redução percentual significativa do limiar nociceptivo de retirada da pata (14,34%) e um aumento percentual do edema inflamatório (11,11%), em comparação com os animais controle ($39,91 \pm 0,87$). A hiperalgesia inflamatória do grupo CGN por 14 dias persistiu até 14 dias após o término das injeções, indicando a cronificação da hiperalgesia dependente da duração do tratamento. As culturas de neurônios dos animais com hiperalgesia persistente por 14 dias apresentaram um potencial de repouso diminuído em comparação com as culturas dos animais controle (16,69%), sugerindo uma maior excitabilidade e sensibilização dos nociceptores. **Conclusão:** Os resultados obtidos mostram que o modelo de hipersensibilidade periférica persistente induzido por CGN na pata de ratos é capaz de reproduzir aspectos clínicos e histológicos da dor crônica ou nociplástica. O trabalho também destaca a importância de estudar os eventos e alterações que causam a cronificação da dor, visando o desenvolvimento de estratégias preventivas e de intervenções em saúde pública mais eficazes.

Palavras-chave: hipersensibilidade crônica; carragenina; dor crônica; dor nociplástica; hiperalgesia; Inflamação.

ABSTRACT

Introduction: Non-communicable chronic diseases (NCDs), according to the World Health Organization [WHO], between 2000 and 2019 were the cause of 74% of global deaths. Often, NCDs are related to chronic pain, which causes suffering, physical stress, emotional stress, and loss of quality of life for about 35.7% of adults and 47.32% of elderly Brazilians. Inflammatory pain is marked by the sensitization of nociceptors after prolonged exposure to inflammatory mediators. Prostaglandins (PGE₂) cause primary hyperalgesia at the injury site, which increases the response to infraliminal stimuli and reduces the nociceptive excitability threshold. The animal model of chronic or nociplastic pain, initially described by Ferreira et al. (1990), induced a state of persistent inflammatory hyperalgesia by daily subcutaneous injection of PGE₂ for 14 days. λ -carrageenan (CGN) is a polysaccharide extracted from the cell wall of marine algae used to trigger local acute inflammatory response under experimental conditions. **Objectives:** Develop a model of persistent peripheral hypersensitivity induced by inflammation of the rat's paw by CGN injections. Evaluate the effect of maintaining inflammatory hyperalgesia for 7 or 14 days on mechanical sensitivity and edema in the rat's paw and evaluate the resting potential and activation of TRPV1 receptors in neuron cultures obtained from control animals and animals with persistent hyperalgesia. **Methodology:** Male Wistar rats weighing 180 to 250g were used and distributed into three experimental groups: 14-day control, 7-day inflammation, and 14-day inflammation. The animals were subjected to intraplantar injections of CGN or saline solution in the right hind paw to induce or not a low to moderate intensity inflammation. Edema and mechanical sensitivity were evaluated by plethysmography and electronic Von Frey, respectively, during treatment and up to 14 days after the end of the injections. The animals were euthanized, and the dorsal root ganglia were harvested for primary neuron cultures. The cultures were used to evaluate the resting potential and capsaicin-induced depolarization to TRPV1 through confocal microscopy. **Results:** The results show that the animals treated with CGN for 7 days ($30,81 \pm 2,04$) or 14 days ($25,87 \pm 1,5$) had a significant reduction in the nociceptive withdrawal threshold of the paw (14,34%), and an increase in inflammatory edema (11,11%), compared to the control animals ($39,91 \pm 0,87$). The inflammatory hyperalgesia of the 14-day CGN group persisted up to 14 days after the end of the injections, indicating the chronification of hyperalgesia dependent on the duration of treatment. The neuron cultures of the animals with persistent hyperalgesia for 14 days showed a decreased resting potential compared to the cultures of the control animals (16,69%), suggesting greater excitability and sensitization of the nociceptors. **Conclusion:** The results show that the persistent peripheral hypersensitivity model induced by CGN in the rat's paw can reproduce clinical and histological aspects of chronic or nociplastic pain. The work also highlights the importance of studying the events and changes that cause the chronification of pain, aiming at developing preventive strategies and more effective public health interventions.

Keywords: chronic hypersensitivity; carrageenan; chronic pain; nociplastic pain; hyperalgesia; Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Mediadores em tecidos orofaciais envolvidos na sensibilização periférica após a inflamação _____	17
Figura 2: Vias ascendentes e descendentes da dor em humanos. _____	19
Figura 3: Efeito hiperalgésico de injeções intraplantares diárias de prostaglandina E2 e DbcAMP _____	21
Figura 4: Efeito persistente da hiperalgesia induzida por carragenina _____	31
Figura 5: Medida de edema inflamatório por Pletismômetro (alterações no volume da pata) _____	32
Figura 6 Efeito persistente da carragenina sobre o potencial de repouso de neurônios sensoriais primários _____	33
Figura 7: Avaliação do potencial de repouso neuronal em culturas de gânglios da raiz dorsal da medula de ratos induzidos a hiperalgesia inflamatória persistente _____	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
IL-1 α	Interleucina-1-alfa
IL-1 β	Interleucina-1-beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
IL-6	Interleucina-6
IL-17	Interleucina-17
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
PKA	Proteína Quinase A
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
ASIC	Canal Iônico Sensível ao Ácido
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
GIRK	Canais de Potássio Retificadores Internos Acoplados a proteínas G
5-HT	Serotonina
iGluR	Receptores Iônicos de Glutamato
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
μ	Receptor Opioide mu
M2	Receptor Muscarínico
mGluR,	Receptor Metabotrópico de Glutamato
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
PKC	Proteína Cinase C
SSTR2A	Receptor 2A de Somatostatina
TrkA	Receptor de Tirosina Quinase A
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório vaniloide tipo 1
TTXr	Canal de Sódio Resistente à Tetrodotoxina
PGE ₂	Prostaglandinas

SNC	Sistema Nervoso Central
RVM	Medula Ventral Rostral
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
Enk	Encefalina
DA	Dopamina
NA	Noradrenalina
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
Ca ⁺	Cálcio
CFA	Adjuvante Completo de Freund
DbcAMP	Dibutyryl-cAMP
PKCε	Proteína Cinase C épsilon
CGN	Carragenina
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
OMS	Organização Mundial da Saúde
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
REBIR	Rede de biotérios de Roedores – UFU
GRD	Gânglios da Raiz Dorsal
CO ₂	Dióxido de Carbono
DiBAC4	(3) Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol
Fluo-3 AM	Indicador de Ca ⁺ membrana permeável não fluorescente
KCl	Cloreto de Potássio
LNRP	Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata
COX	Ciclooxigenases
DEM	Dose Eficaz Mínima
PROPP	Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-graduação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Dor inflamatória - sensibilização dos nociceptores	16
1.2. A nocicepção.....	18
1.3 Dor persistente ou Nociplástica.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral.....	24
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Aspectos éticos	24
4.2 Animais	24
4.3 Experimentos <i>in vitro</i>	28
4.3.1 Coleta de gânglios da raiz dorsal da medula	28
4.3.2 Cultura celular primária.....	28
4.3.3 Delineamento experimental	24
4.3.4 Microscopia Confocal.....	29
4.4 Experimentos <i>in vivo</i>	25
4.4.1 Teste de hiperalgesia inflamatória.....	25
4.4.2 Análise da indução de hiperalgesia persistente	26
4.4.3 Análise do edema inflamatório	26
4.5 Análise estatística	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Experimentos <i>in vivo</i>	30

5.1.1 Teste de hiperalgesia inflamatória.....	30
5.1.2 Análise do edema inflamatório	31
5.2 Experimentos in vitro.....	32
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÕES	39
8. REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

A dor crônica é um problema de saúde pública mundial, sempre relacionada a elevado estresse físico e emocional. Além de extremamente onerosa, é a causa de sofrimento e perda de qualidade de vida de 1 a cada 5 de pessoas no mundo e 1 a cada 10 são diagnosticadas com dor crônica a cada ano, aproximadamente 807 milhões de pessoas, correspondendo a cerca de 10% da população mundial. Os estudos mais recentes estimaram que a prevalência nacional de dor crônica foi de (35,7%) em adultos e (47,32%) em idosos (SANTIAGO et al., 2023). Segundo a definição atual da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2020), a dor é definida como "Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada, ou semelhante à associada a danos teciduais reais ou potenciais" (FIDLER, 2022). A dor aguda é um importante mecanismo biológico de preservação da integridade do indivíduo frente alerta à ocorrência de injúrias ao organismo. Ao contrário da dor crônica, um distúrbio complexo e angustiante, que por definição é aquela que persiste após três meses além do tempo habitual de cura de uma lesão, ou que está associada à processos patológicos crônicos, que causam dor contínua ou recorrente (SANTIAGO et al., 2023).

A dor persistente é um fenômeno multidimensional frequente no ambiente hospitalar e ambulatorial, que envolve aspectos físicos, psicológicos e impactos à saúde e bem-estar do indivíduo, serviços de saúde e possui diversos empecilhos no tratamento. Segundo o estudo observacional epidemiológico mundial de mortalidade e incapacitação publicado pela Global Burden of Disease que inspeciona 369 doenças em mais de 204 países, a dor crônica é o desafio de maior prioridade à saúde pública e aos sistemas de saúde devido manejo inadequado da dor (SOUSA; MENDES, 2019).

A automedicação com analgésicos é praticada por 78,4% dos pacientes com dor crônica, com preferência pelo uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e glicocorticoides, porém, insatisfatória no alívio da dor persistente. Outra intervenção medicamentosa disponível, os opioides, não podem ser utilizados em tratamentos crônicos devido ao risco de desenvolvimento de tolerância e

dependência. (PIOVEZAN et al., 2022). Dentre os principais fatores atrelado a estas enfermidades, talvez o mais importante, é a inflamação.

1.1 Dor inflamatória - sensibilização dos nociceptores

A inflamação é uma sequência de eventos temporários desencadeados pelo sistema imune inato envolvendo diversos fatores como prostaglandinas (PGE₂), as citocinas IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, e IL-17, histaminas, espécies reativas de oxigênio e enzimas, em resposta a presença de patógenos, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou qualquer tipo de injúria externa ou simplesmente manutenção do equilíbrio do organismo (ROCHA et al., 2007). O processo inflamatório é caracterizado pelos sinais cardinais da inflamação, rubor, calor, edema, distúrbios funcionais e dor. Apesar do seu importante papel na manutenção das funções fisiológicas é também a principal causa de desequilíbrio à homeostase a nível sistêmico e molecular (CAMPOS-SÁNCHEZ et al., 2021).

A cascata de eventos inflamatórios é seguida pelo aumento da permeabilidade capilar e compressão das células endoteliais, permitindo o acesso de muitas macromoléculas solúveis ao local da inflamação. O próximo e principal evento da cascata é o recrutamento de leucócitos (granulócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos-macrófagos) dos capilares sanguíneos para os tecidos circundantes e posteriormente para o local da inflamação devido ao agrupamento de quimiocinas e moléculas de adesão liberadas pelas células endoteliais (VERGNE-SALLE; BERTIN, 2021). Os mediadores inflamatórios são produzidos por células residentes e células que migraram para o sítio inflamatório e são essenciais para a sensibilização inflamatória, ou hiperalgesia, que é a diminuição do limiar de ativação dos nociceptores.

A redução do limiar de excitabilidade dos neurônios nociceptivos quando sensibilizados parece ocorrer por modulações em canais iônicos na membrana neuronal. Estudos sugerem que a fosforilação pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) dos canais de sódio e de potássio, modificam o limiar de ativação dos potenciais de ação e o potencial de repouso neuronal, respectivamente (ARAUJO; PAULA; FRACETO, 2008)

A sensibilização dos nociceptores é mediada por substâncias químicas liberadas no interstício, como a acetilcolina, bradicinina, histamina, substância P,

PGEs, interleucinas, óxido nítrico e fator de crescimento neural (NGF). A liberação de citocinas pelos macrófagos e leucócitos contribuem para a migração de mais células ao local da lesão. A substância P e a bradicinina aumentam a permeabilidade vascular e promovem vasodilatação que juntas contribuem para a manutenção do processo inflamatório.

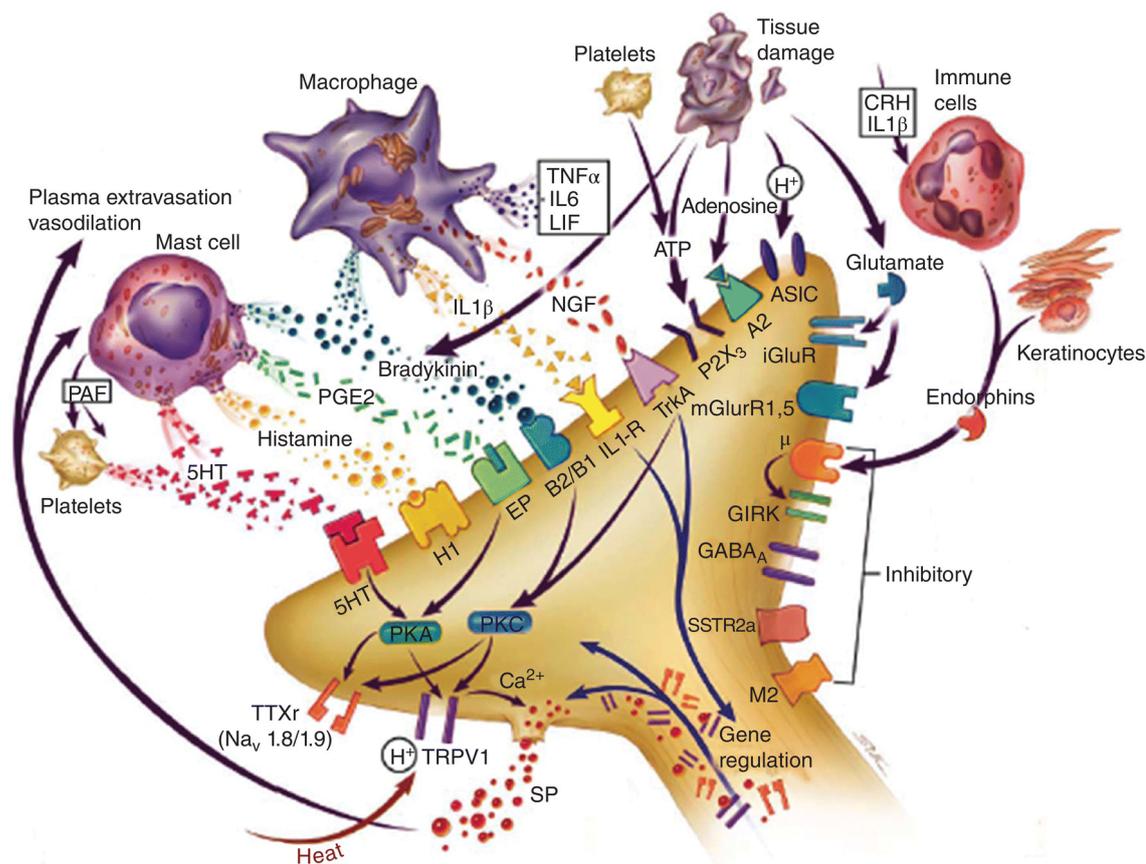


Figura 1: Mediadores em tecidos orofaciais envolvidos na sensibilização periférica após a inflamação. A inflamação leva à liberação de numerosos produtos químicos de macrófagos, mastócitos, células imunes e células lesionadas que atuam em canais iônicos ou receptores de membrana nas terminações nervosas aferentes nociceptivas periféricas e, assim, podem alterar a sensibilidade das terminações. Alguns desses mediadores podem aumentar a excitabilidade das terminações aferentes nociceptivas (ou seja, sensibilização periférica); outros podem exercer efeitos inibitórios. Vários desses mediadores são mostrados. ASIC, canal iônico sensível ao ácido; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; GIRK, canal de potássio retificador interno acoplado a proteína G; 5-HT, serotonina; iGluR, receptor inotrópico de glutamato; IL-1β, interleucina-1-beta; IL-6, interleucina-6; LIF, fator inibidor de leucemia; μ, receptor opioide mu; M2, receptor muscarínico; mGluR, receptor metabotrópico de glutamato; NGF, fator de crescimento nervoso; PAF, fator ativador de plaquetas; PGE2, prostaglandina E2; PKA, proteína quinase A; PKC, proteína cinase C; SSTR2A, receptor 2A de somatostatina; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; TrkA, receptor de tirosina quinase A; TRPV1, potencial receptor transiente vaniloide 1; TTXr, canal de sódio resistente à tetrodotoxina. Adaptado de HAND; FRANK, (2015).

A persistência da ação desses mediadores inflamatórios, principalmente as prostaglandinas (PGE2), que são produtos do metabolismo do ácido araquidônico,

causam modificações fenotípicas e bioquímicas no sistema nervoso periférico, elas desempenham um papel importante na inflamação e na sensibilidade à dor, devido sua ação direta dos nociceptores e sinergismo com os outros mediadores supracitados. No entanto, após a exposição prolongada às PGE₂, os nociceptores ficam sensibilizados, provocando a hiperalgesia primária no local da lesão, o que gera um aumento da resposta a estímulos infraliminares e redução do limiar de excitabilidade nociceptiva (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016).

1.2. A nocicepção

O fenômeno da nocicepção se inicia a partir da transformação dos estímulos nocivos de natureza térmica, química ou mecânica em potenciais de ação pelas terminações nervosas das fibras A δ mielinizadas e as fibras C não mielinizadas, que inervam a pele, músculos, articulações e órgãos viscerais. As fibras A δ , são de grande e médio calibre, transmitem o pulso do estímulo doloroso de forma rápida aos gânglios das raízes dorsais (GRD), até as lâminas 1 e 2 do corno dorsal da medula, enquanto as fibras C são de fino calibre, não mielinizadas, e responsáveis pela transmissão lenta da dor até as lâminas 1 e 5 do corno dorsal da medula. Os nociceptores recebem esses impulsos e após traduzi-los, os transmitem ao segundo neurônio sensorial localizado no corno posterior da medula espinal, conduzidos até os centros superiores do sistema nervoso central (SNC), integrados no córtex somatossensorial e interpretados no córtex cerebral e áreas subjacentes como dor (ROCHA et al., 2007).

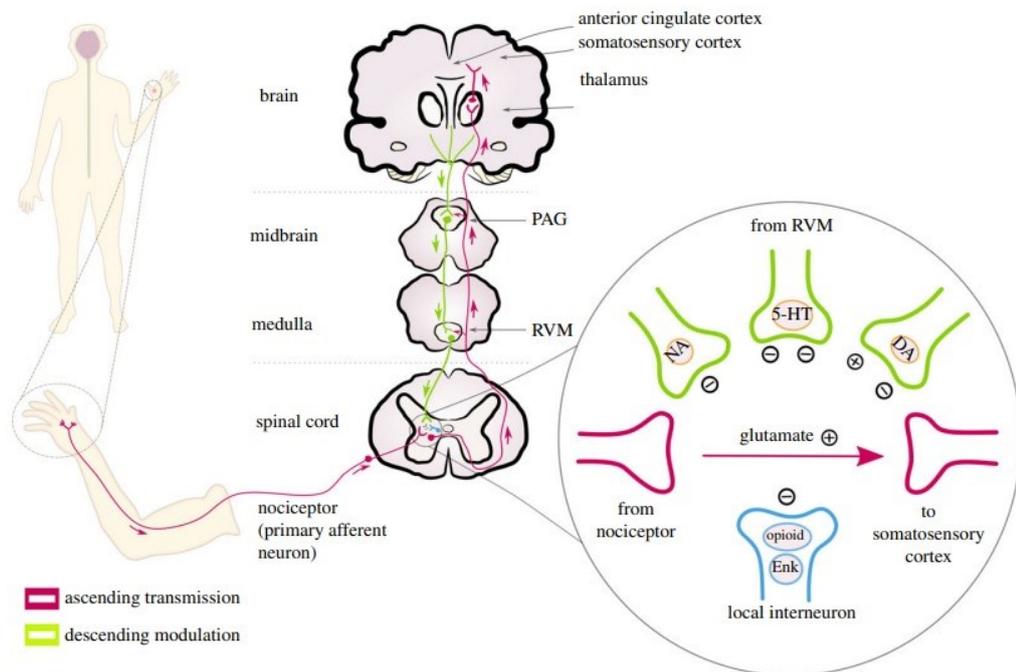


Figura 2: Vias ascendentes e descendentes da dor em humanos. Projeção de neurônios aferentes aos neurônios secundários no corno dorsal da medula espinal. Projeção de neurônios dos axônios de segunda ordem para o tálamo, a medula ventral rostral (RVM) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG) com seus corpos celulares no tálamo, os neurônios de terceira ordem projetam para o córtex somatossensorial para codificar os aspectos sensoriais-discriminativos da dor. Eles também projetam para outras áreas, como o córtex cingulado anterior, que está envolvida no aspecto afetivo da dor. Essas áreas oferecem entrada para a PAG, que se comunica com a RVM para enviar projeções modulatórias para a medula espinal. Tais neurônios influenciam interneurônios de encefalina (Enk) que podem inibir a transmissão de nocicepção através de neurônios aferentes primários. As vias monoaminérgicas, incluindo serotonina (5-HT), dopamina (DA) e noradrenalina (NA), também têm efeitos modulatórios facilitadores e/ou inibitórios. Adaptado de GIBBONS; SARLAK; CHITTKA (2022).

Os neurônios sensoriais primários nos gânglios da raiz dorsal e trigeminal são responsáveis pelo sensoriamento mecânico e térmico, bem como a detecção de dano tecidual. Esses neurônios expressam uma quantidade significativa de proteínas G acopladas (GPCRs), as principais moléculas transdutoras da sinalização extracelular. A classe das proteínas-G heterotrimérica é definida pela sua subunidade alfa, Gs, Gi ou Gq. A sinalização da classe excitatória Gs, promove um aumento dos níveis intracelulares de AMPc e Ca⁺ intracelular, que contribuem para a sensibilização inflamatória e nociceptiva (YUDIN; ROHACS, 2018).

Além destes canais, evidências indicam a participação do canal TRPV1 (*Transient receptor potential vanilloid type 1*) na sensibilização dos nociceptores. O TRPV1 é um canal catiônico, não seletivo, homo-tetramérico que participa da

transdução de sinais térmicos e mecânicos em potenciais de ação no sistema nervoso central e periférico. Esse canal é abundantemente expresso em neurônios sensoriais envolvidos na percepção somatossensorial e monitoramento do corpo no tempo e espaço; onde são ativados por temperaturas entre 40°C e 45°C, causando a sensação de dor e queimação. Além do calor nocivo, os canais TRPV1 podem ser ativados por ácidos, capsaicina (composto que dá ardência das pimentas vermelhas) e outros agentes inflamatórios, por isso, desempenham um papel crucial na hiperalgesia inflamatória (HAGYMÁSI, 2022). O TRPV1 é considerado um integrador molecular de estímulos nocivos e um potencial alvo para o desenvolvimento de novos analgésicos, uma vez que, os ratos TRPV1-*knockout* apresentam menor sensibilidade à dor inflamatória.

Os canais TRPV1 estão associados com o desenvolvimento da hiperalgesia primária e secundária. Quanto ao seu potencial terapêutico, os antagonistas de TRPV1 são hábeis em reduzir a hiperalgesia mecânica em aproximadamente 50% durante a fase aguda (30 a 120 min), da dor persistente induzida por injeção intraplantar de Adjuvante Completo de Freund (CFA) (BTESH et al., 2013). Tendo isso em vista, estudos clínicos têm demonstrado que o potente e seletivo antagonista ABT-102, pode reduzir a dor pós-operatória em pacientes de câncer ósseo e osteoartrite causada por sensibilização central e sensibilização periférica desses canais (OHASHI et al., 2023). No entanto, o bloqueio de TRPV1 pode causar hipertermia transitória (HONORE et al., 2009).

1.3 Dor persistente ou Nociplástica

A dor nociplástica é um conceito recente, proposto em 2017 pela IASP, para descrever a dor que resulta de alterações adaptativas na nocicepção que não se relacionam com dano tecidual real ou doença ou lesão do sistema somatossensorial. Essas alterações podem causar sinais clínicos de hipersensibilidade à dor em pacientes que sofrem de dor crônica, como dores de cabeça, fibromialgia e dor lombar. A dor nociplástica é um fenômeno de alta complexidade e ainda pouco compreendido pela ciência. Há muitas controvérsias quanto a sua definição e os seus mecanismos associados. Por isso, é necessário mais estudo para esclarecer os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da dor nociplástica (BUŁDYŚ et al., 2023). Os modelos animais são de grande importância para o

estudo de mecanismos celulares e moleculares envolvendo o desenvolvimento da dor crônica ou nociplástica.

Um modelo de dor nociplástica, na época denominada de dor persistente, foi descrito por Ferreira et al. (1990). Neste modelo, foi instaurado, *in vivo*, um modelo de hiperalgesia crônica persistente induzida pela administração diária de PGE₂ ou dopamina (DA) por via intraplantares na pata de ratos durante 7 e 14 dias. Nos animais tratados durante 7 dias, o estado hiperalgésico perdurou por pouco mais de 3 dias após abolição das injeções de PGE₂, já aqueles tratados durante 14 dias, seu estado hiperalgésico se manteve por ao menos mais 30 dias após a descontinuação das injeções.

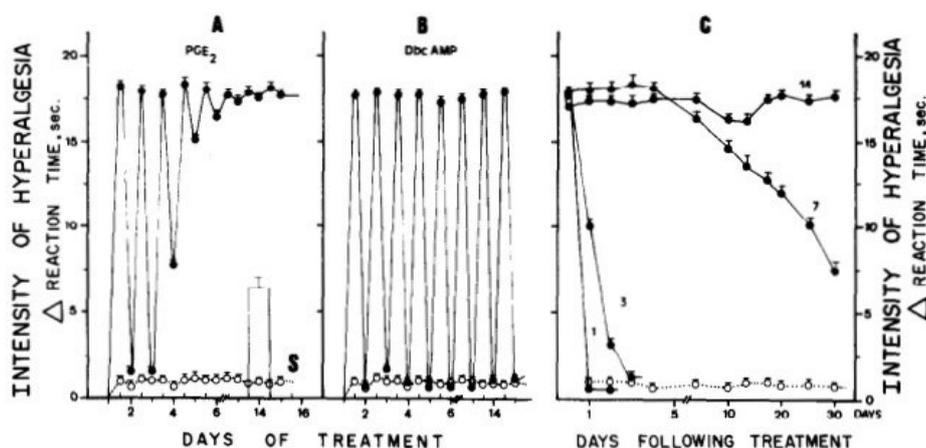


Figura 3: Efeito hiperalgésico de injeções intraplantares diárias de prostaglandina E2 e DbcAMP. Fig.1. **A**, os efeitos de injeções intraplantares diárias de PGE₂ (100 ng). **B**, de doses equipotentes de DbcAMP, um análogo sintético de AMPC (100 μg). **C**, mostra a evolução temporal do estado hiperalgésico persistente após interrupção do tratamento. Linhas pontilhadas e círculo aberto representam o grupo controle com solução salina (100 μL). A Indometacina (2 mg/Kg) foi administrada em todos os grupos. A barra D14 representa o grupo controle solução salina sem indometacina. Adaptado de FERREIRA, LORENZETTI e DE CAMPOS (1990).

Esses resultados apontam que o estado hiperalgésico está relacionado ao traço periférico de hiperalgesia decorrente de longos períodos de sensibilização dos receptores nociceptivos por processos inflamatórios prolongados. A duração do estado de hiperalgesia persistente depende do tempo de manutenção do processo inflamatório. Estado esse, capaz de ser restaurado de forma direta ou indireta por um único estímulo hiperalgésico menor, mesmo após abolição de longa duração por analgésicos de ação periférica, como a dipirona e N-Metil morfina. Esse estudo apresenta uma abordagem inovadora para compreender os mecanismos

subjacentes à transição da dor aguda para a crônica. No entanto, o método utilizado apresenta algumas limitações que podem comprometer a sua aplicabilidade. Embora enriquecedor, ainda carece de um modelo que reproduz os aspectos clínicos e histológicos dessa condição na realidade, seguindo do fluxo espontâneo de ocorrência dos fenômenos envolvidos na cronificação da dor inflamatória (FERREIRA, LORENZETTI e DE CAMPOS, 1990).

Apesar do modelo de dor persistente ser interessante, na clínica, as dores persistentes ou nociplástica dificilmente vão ser causadas por efeito de um único mediador inflamatório, no caso, a PGE2. Os nociceptores possuem receptores para diversos mediadores inflamatórios que parecem ser importantes para a sensibilização e cronificação da dor (TEIXEIRA, 2022). Estudos de outros autores indicam que a administração de carragenina na pata de ratos causa um efeito a longo prazo que facilita a sensibilização de nociceptores. Este processo foi denominado de “*priming*” e depende da liberação de TNF-alfa e da ativação persistente da Proteína Cinase C épsilon (PKC ϵ) nos nociceptores (PARADA et al., 2003).

A carragenina (CGN) é um polissacarídeo extraído da parede celular de algas marinhas da classe *Rhodophyceae*. A fim de adaptar suas propriedades físico-químicas, sensoriais e estender a vida útil dos bens de consumo não duráveis, são amplamente utilizados na indústria alimentícia como aditivo alimentar emulsificante, estabilizador, agente gelificante e suspensor de proteínas. Tais aplicações abrangem o processamento industrial de geleias, recheios de tortas, laticínios, bebidas, carnes e peixes, incluindo até produtos de cuidados pessoais e comidas para animais domésticos. Sua aplicabilidade mais recente abrange excipientes de pílulas e revestimento de encapsulados, entre outras coisas mais (WEINER, 2014).

A carragenina é uma molécula grande e pesada, sua estrutura é construída por D-galactose e subunidades alternadas de 3,6-anidrogalactose ligadas por ligações glicosídicas por α -(1,3) e β -(1,4). O processo de extração da CGN produz 6 formas distintas de CGN: teta (θ)-CGN, nu(ν), mu(μ), lambda(λ), kappa(κ) e iotta (ι), sendo os três últimos de maior relevância comercial, são classificadas quanto a sua massa molecular e distribuição dos grupos fosfato conforme sua empregabilidade tecno funcional. Sendo a, λ -carragenina a principal e mais utilizada isoforma para desencadear resposta inflamatória aguda local em roedores (CAMPOS-SÁNCHEZ et al., 2022).

Este mucopolissacarídeo, em destaque à isoforma λ -carragenina, possui alto peso molecular e porções sulfatadas que podem ser reconhecidas pelas células do sistema imunológico como um agente estranho e desencadeia localmente uma série de reações em cascata (inflamação aguda) no prazo de minutos ou horas, com o objetivo de cessar os danos e restaurar o equilíbrio do organismo. Em certas condições, a inflamação em humanos pode persistir por longos períodos (inflamação crônica), possibilitando o desenvolvimento de graves patologias como as doenças crônicas não transmissíveis (CAMPOS-SÁNCHEZ et al.,2022).

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), classificadas em câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e doença cerebrovascular, e de acordo com a Organização Mundial da Saúde [OMS], 7 das 10 principais causas de mortes entre 2000 e 2019 foram graças às doenças crônicas não transmissíveis, totalizando 74% das mortes em todo o mundo. Certamente, sua prevalência é exorbitantemente elevada, e reflete profundo impacto na funcionalidade e qualidade de vida das pessoas afetadas (OMS, 2020). Para acompanhar a evolução dos pacientes e fazer os ajustes necessários no tratamento, é fundamental avaliar a dor e registrar sua intensidade de forma sistemática e periódica.

Assim, nosso estudo provou ser relevante para fornecer o conhecimento dos possíveis mecanismos de ação responsáveis por frustrar o manejo medicinal e discutir a real patofisiologia da dor persistente de forma fidedigna ao que de fato ocorre nos organismos vivos. Foi necessário elaborar um modelo que sirva de prognóstico da atividade de drogas analgésicas, avaliar potenciais drogas eficazes e para determinação da dose eficaz mínima (DEM) aos pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

Diante disso, visando proporcionar um direcionamento para o emprego de estratégias preventivas e de intervenções em saúde pública mais eficazes, buscamos desenvolver um modelo que nos permita estudar os eventos e alterações que causam a cronificação da dor. O entendimento dos mecanismos de cronificação são essenciais para que possamos avançar na prevenção e tratamento de dores crônicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um modelo de hipersensibilidade periférica persistente induzida por carragenina em pata de ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da manutenção de um processo inflamatório induzido por carragenina durante 7 dias sobre a sensibilidade mecânica e o edema na pata de ratos.
- Avaliar o efeito da manutenção de um processo inflamatório induzido por carragenina durante 14 dias sobre a sensibilidade mecânica e o edema na pata de ratos.
- Avaliar o potencial de repouso e a ativação de receptores TRPV1 em culturas de neurônios obtidos de animais controle e animais com hiperalgesia persistente.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O protocolo 23/17-05496/2023-24 do estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais – (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), conforme adequação às premissas da lei.

4.2 Animais

Para os experimentos comportamentais de hiperalgesia inflamatória foram utilizados 18 ratos da linhagem Wistar machos de 180 a 250g. Os animais foram mantidos no biotério central da Rede de Biotérios de Roedores – REBIR – da UFU, climatizado em 25 °C (temperatura ambiente), receberam livre acesso à água e ração (*ad libitum*) e ciclo de luminosidade controlada em 12h claro e 12h escuro (luzes acesas às 18:00 horas e apagada às 06:00). Os procedimentos de cuidado e manuseio dos animais foram realizados de acordo com as diretrizes da *International Association for the Study of Pain* (IASP) sobre o uso de animais na pesquisa da dor e o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.3 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais.

Grupo 1) Controle de 14 dias. Os animais foram tratados com injeções de solução salina estéril na pata nos mesmos momentos das injeções de carragenina dos grupos 2 e 3. O edema e a sensibilidade mecânica foram avaliados durante o tratamento até o 28º dia após início do tratamento, os animais foram eutanasiados e os gânglios da raiz dorsal colhidos para realização de culturas primárias.

Grupo 2) Inflamação por 7 dias - Os animais foram tratados com injeções de carragenina na pata de forma a manter uma inflamação por 7 dias. O edema e a sensibilidade mecânica foram avaliados durante o tratamento até o 28º dia após início do tratamento, os animais foram eutanasiados e os gânglios da raiz dorsal colhidos para realização de culturas primárias.

Grupo 3) Inflamação por 14 dias - Os animais foram tratados com injeções de carragenina na pata de forma a manter uma inflamação por 14 dias. O edema e a sensibilidade mecânica foram avaliados durante o tratamento até o 28º dia após início do tratamento, os animais foram eutanasiados e os gânglios da raiz dorsal colhidos para realização de culturas primárias.

As culturas primárias de neurônios obtidos de gânglios da raiz dorsal de animais dos três grupos experimentais foram utilizadas para avaliação do potencial de repouso e da despolarização induzida por ativação de receptores TRPV1 por administração de capsaicina.

4.4 Experimentos in vivo

4.4.1 Teste de hiperalgesia inflamatória

A sensibilidade mecânica foi avaliada por meio de um Anestesiômetro eletrônico (Von Frey eletrônico Insight), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão à pata dos animais é realizado por meio de uma ponteira Universal Tips10mL (T-300, Axygen) adaptada ao aparelho. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura. Espelhos são posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a

visualização das plantas das patas dos animais. Foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do rato até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como sacudida (*flinches*) da pata estimulada. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo (Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata - LNRP). A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na pressão obtida antes e após o experimento, em gramas. O LNRP foi avaliado antes e após 2 horas da administração intraplantar de carragenina (pata direita traseira utilizando uma seringa BD Ultra-fine II; 100 µg/ 50 µL). O LNRP da pata traseira esquerda também foi avaliado em todos os animais como forma de controle e da avaliação de uma possível sensibilização central. Para redução do stress, os ratos serão habituados ao equipamento 1 dia antes do início da execução dos experimentos.

4.4.2 Análise da indução de hiperalgesia persistente

A indução de hiperalgesia persistente foi realizada por meio de injeções intraplantares subcutâneas de 200 µg de carragenina em 50 µl de solução salina. O edema e a sensibilidade mecânica induzida pela carragenina foi avaliada após 2 horas da injeção e novamente após 24 horas. A injeção de carragenina foi repetida após 24 horas apenas quando a sensibilidade mecânica na pata do animal tivesse reduzido para menos de 50% da diferença observada após 2 horas da injeção de CGN. O objetivo é manter por 7 ou 14 dias uma inflamação de intensidade baixa a moderada na pata dos animais. O efeito das injeções sobre a cronificação da hiperalgesia foi testado avaliando-se o edema e a sensibilidade mecânica por 14 dias após o término das injeções de carragenina. Os grupos tratados com carragenina foram comparados com um grupo controle no qual foram realizadas injeções de salina nos mesmos momentos das injeções de carragenina.

4.4.3 Análise do edema inflamatório

Para avaliar o edema, foi utilizado a pletismografia. Com a imersão da pata do animal no Pletismômetro, ocorre o movimento da água, assim, os milímetros de água deslocados são quantificados e demonstram o volume referente ao edema nas patas traseiras do animal. Todos os grupos de animais foram testados antes, 2 e

24h após a injeção de carragenina. Os dados obtidos são expressos em mililitros (mL) de água e comparados com o grupo de controle de injeção de solução salina.

4.4.4 Substâncias

Foram utilizados 200 µg de λ-carrageenan da marca Sigma-Aldrich® tipo IV, CAS: 9064-57-7, EC:232-953-5, diluída em 50 µl de solução salina para cada animal. A carragenina foi fornecida pelo laboratório de pesquisas em neurofisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICIBIM).

4.4.5 Aparatos/Equipamentos



Figura 4: Anestesiômetro eletrônico (Von Frey eletrônico). Imagens de autoria do autor.



Figura 5: Pletismômetro. **A** compartimento tubular onde a pata do animal será imersa. **B** compartimento de igual volume de A contendo o transdutor de volume alterado em A. Imagens de autoria do autor

4.5 Experimentos *in vitro*

4.5.1 Coleta de gânglios da raiz dorsal

Os gânglios da raiz dorsal (GRD) foram colhidos das regiões lombares nos níveis de L5 e L6 do lado direito (2 gânglios por animal). Esses gânglios foram selecionados por possuírem os corpos celulares da maior parte dos neurônios que inervam a porção plantar da pata direita dos animais, a qual foi tratada durante os experimentos *in vivo*. Para isso, primeiramente os animais foram anestesiados em ambiente fechado com o anestésico geral Isoflurano 5% por via inalatória através do sistema de anestesia inalatória da Bonther, em seguida decapitados e colocados em posição vertical para a exsanguinação. Com a retirada da pele do dorso do animal, exposição da coluna vertebral e secções das vértebras, os gânglios foram coletados e colocados em placas de cultura em solução salina de Hank's estéril com 10 mM de tampão HEPES.

4.5.2 Cultura celular primária

As culturas de GRD seguiram o protocolo descrito por Linhart e colaboradores (2003), entretanto com algumas alterações. As células foram dissociadas enzimaticamente por incubação a 37°C durante 60 minutos em solução

Hanks/Hepes contendo 0,28 U/ml de colagenase e depois por 20 minutos em solução contendo 0,25 mg/ml de tripsina. Os gânglios foram lavados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 mL de penicilina/estreptomicina. As células foram dissociadas mecanicamente utilizando uma pipeta Pasteur de vidro, e então cultivadas em placas de cultura cobertas com Matrigel e mantidas em estufa de cultura com atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C por 12-24h.

4.5.3 Microscopia Confocal

Após 12-24 horas, as culturas foram incubadas por 25 minutos com indicador fluorescente para avaliação de potencial de membrana (DiBAC4(3), 10 µM. O indicador DiBAC4(3) permaneceu na solução de trabalho durante todo o experimento, pois o movimento da molécula através da membrana, devido ao seu gradiente eletroquímico, indica as variações do potencial de membrana (YAMADA *et al.*, 2001). Posteriormente as culturas foram levadas para o microscópio confocal (LSM 510 meta, Zeiss) situado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM) vinculada à Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-graduação (PROPP) da UFU. Foram avaliadas as fluorescências basais e a resposta à 100 nM de capsaicina. A administração das drogas foi realizada através da adição de 10 µl de uma solução com 10X a concentração final desejada em um volume de 90 µl de solução na placa de cultura. A fluorescência emitida pelas células foi avaliada através de séries temporais de 3 minutos de duração obtidas através da microscopia confocal. As imagens foram registradas para serem analisadas utilizando o software de imagens livre e gratuito ImageJ (NIH).

4.6 Análise estatística

Para os testes *in vitro* foram avaliadas as variações máximas de fluorescência em cada neurônio. Para os testes *in vivo* os resultados foram comparados como média e erro padrão da média, resultantes da análise da hiperalgesia mecânica e edema. As curvas temporais obtidas pela avaliação da sensibilidade mecânica e do edema de pata foram comparadas através do uso de ANOVA de duas vias, por contarem com duas variáveis independentes categóricas e incorporarem mais variância no modelo, seguida de teste de Bonferroni. A comparação entre as médias

de fluorescência nos testes *in vitro* foi realizada através do nível de significância. Estabelecido em $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Experimentos in vivo

5.1.1 Teste de hiperalgesia inflamatória

Foram realizados ensaios para avaliar o potencial da λ -carragenina em causar alterações persistentes no limiar nociceptivo produzido pelos animais. Anova de duas vias seguida de teste de Bonferroni mostrou que houve uma diferença significativa ($P < 0,05\%$) no limiar de sensibilidade mecânica entre os grupos de animais estudados (14,34%). A variação total do limiar nociceptivo ao longo do tempo e da experimentação foi de 31,63%. O grupo que recebeu carragenina por 7 dias ($30,81 \pm 2,04$) diferiu do grupo controle ($39,91 \pm 0,87$). O grupo que recebeu carragenina por 14 dias ($25,87 \pm 1,5$) também diferiu do grupo controle ($39,91 \pm 0,87$). A indução e manutenção do processo inflamatório por um período de 14 dias na pata de ratos instaurou um estado de hiperalgesia que persistiu por longa data após a descontinuação das injeções. Enquanto o grupo controle não mostrou alterações na sensibilidade nociceptiva. A duração do estado de hiperalgesia persistente foi diretamente dependente da duração do tratamento hiperalgésico. O estado de hiperalgesia inflamatória mantido por 7 dias causou um estado hiperalgésico de curta duração (1 - 4 dias), já quando o estado hiperalgésico é mantido por 14 dias, ele se manteve por até o 30º dia de experimentação. **Figura 1**, a manutenção de um estado inflamatório induzido pela carragenina instaura um estado de hiperalgesia mecânica periférica persistente na pata de ratos.

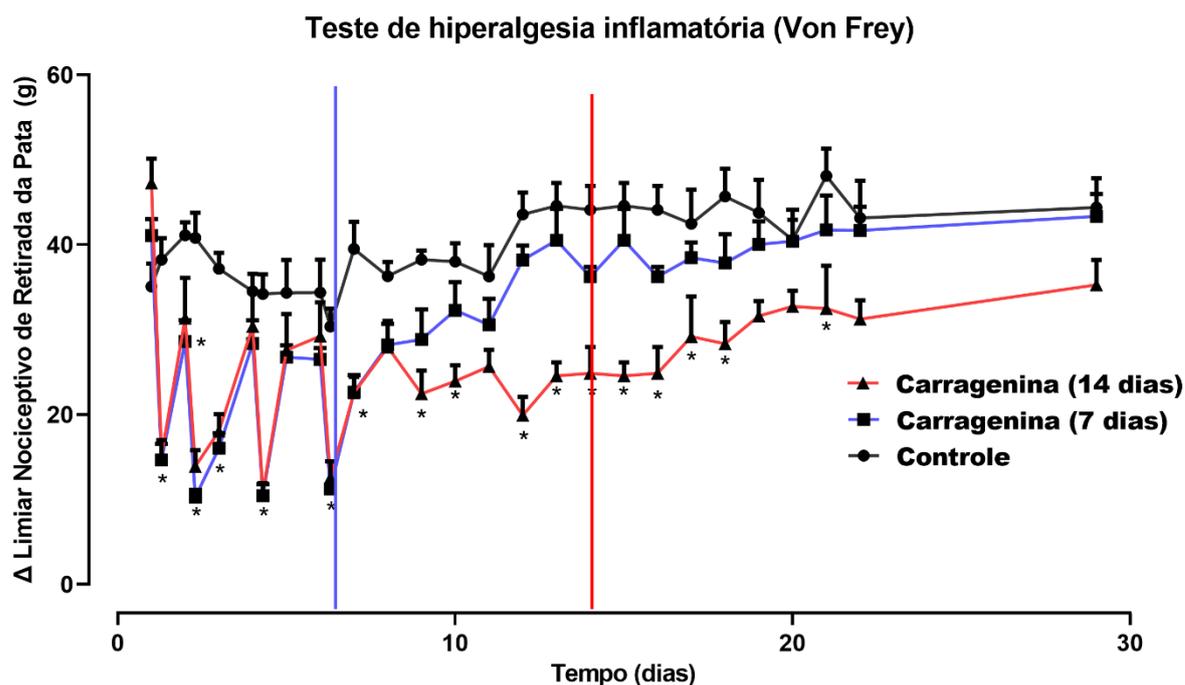


Figura 6: Efeito persistente da hiperalgesia induzida por carragenina. O limiar de retirada da pata, ou Δ limiar nociceptivo mecânico, foi avaliado em dois momentos: Basal e 2 horas após a administração intraplantar de carragenina (200 μ g em 50 μ l). Durante 21 dias consecutivos seguidos de uma medida isolada no 28º dia. A administração de salina (50 μ l) no grupo controle (n=6) representado em preto, não gerou diferença significativa no limiar de retirada da pata. Grupo CGN por 7 dias (n=6) representado em azul. Grupo CGN por 14 dias (n=6) representado em vermelho. Está sendo mostrada a média e EPM. ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni. * Significativamente diferente do grupo controle no mesmo dia. (* p<0,001).

5.1.2 Análise do edema inflamatório

Os animais induzidos e mantidos em estado hiperalgésico inflamatório por 7 e por 14 dias, exibiram diferença significativa ($P < 0,05\%$) de 11,11% no percentual total de variância do volume da pata 2 horas após a administração da carragenina em contraste com os animais do grupo controle, que receberam injeções de solução salina. animais que receberam injeções de carragenina por 7 dias tiveram variações significativas no volume da pata ($1,8 \pm 0,03$) em relação ao grupo controle ($1,53 \pm 0,02$). O grupo que recebeu carragenina por 14 dias ($1,93 \pm 0,04$) também diferiu do grupo controle ($1,53 \pm 0,02$). A variação total ao longo do tempo e da experimentação de 19,89%, permanentes mesmo após interrupções das injeções.

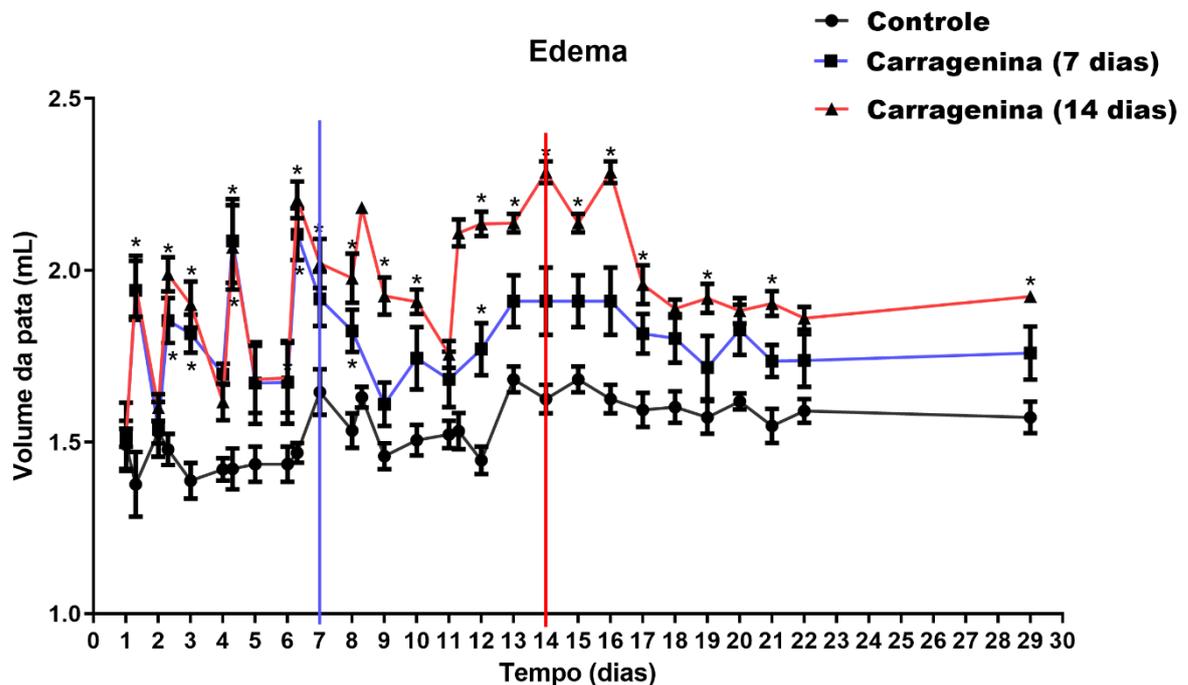


Figura 7: Medida de edema inflamatório por Pletismômetro (alterações no volume da pata). O edema inflamatório foi avaliado em dois momentos: Basal e 2 horas após a administração intraplantar de carragenina (200 µg em 50 µl) ou salina. Durante 21 dias consecutivos seguidos de uma medida isolada no 28º dia. A administração de salina (50 µl) no grupo controle (n=6), representado em preto, não gerou diferença significativa no volume da pata (mL). Grupo CGN por 7 dias (n=6) representado em azul. Grupo CGN por 14 dias (n=6) representado em vermelho. Está sendo mostrada a média e EPM. ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni. * Significativamente diferente do grupo controle no mesmo dia. (* p<0,001).

5.2 Experimentos in vitro

A cultura primária dos GRD retirados do lado direito dos níveis L5 e L6 de dois animais de cada grupo experimental no momento da microscopia confocal. Nossa análise revelou que o potencial de repouso dos neurônios nociceptivos apresentaram variações significativas do potencial de membrana dos neurônios nociceptivos primários. Deste modo, o potencial de repouso é marcado pela intensidade da fluorescência conforme a entrada do indicador DiBAC4(3), que por ser carregado negativamente, adentra a célula à medida que sua membrana é despolarizada durante o intervalo de captura da microscopia confocal (**Figura 8**).

Efeito persistente da Carragenina sobre o potencial de repouso de neurônios nociceptivos primários

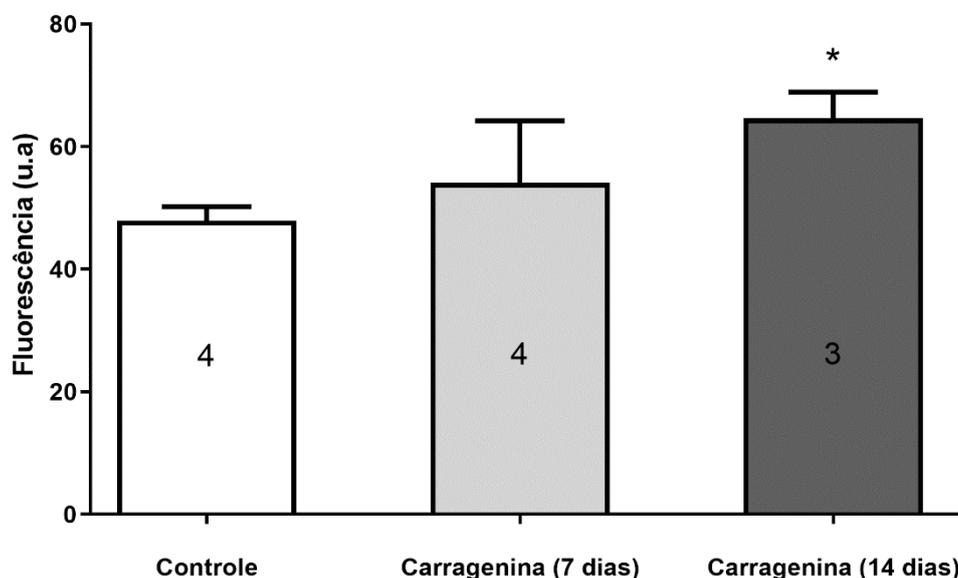


Figura 8: Efeito da hiperalgesia inflamatória persistente sobre o potencial de repouso de neurônios sensoriais primários. O potencial de repouso neuronal foi avaliado através de mudanças na fluorescência emitida pelo indicador DiBAC4(3). O grupo controle (n=4) que recebeu administração de solução salina representado em branco. O grupo CGN por 7 dias (n=4) representado em cinza. O grupo CGN por 14 dias (n=3) representado em preto. A população amostral (n) está representada pelo número de neurônios. Dados mostrados como média \pm EPM seguida por teste de Dunnett's.* Significativamente diferente do grupo controle (* $p < 0,001$).

Os testes de múltipla comparação de Dunnett's mostraram que houve uma diminuição significativa do potencial de repouso neuronal (16,69%), ou seja, uma despolarização, indicado pela alteração de fluorescência do grupo tratado com CGN por 14 dias, em relação ao grupo controle (**Fig.9**). O grupo tratado com CGN por 7 dias não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Importante ressaltar que a cultura primária foi realizada após 28 dias do início do experimento, 14 dias após o término do tratamento para induzir inflamação na pata.

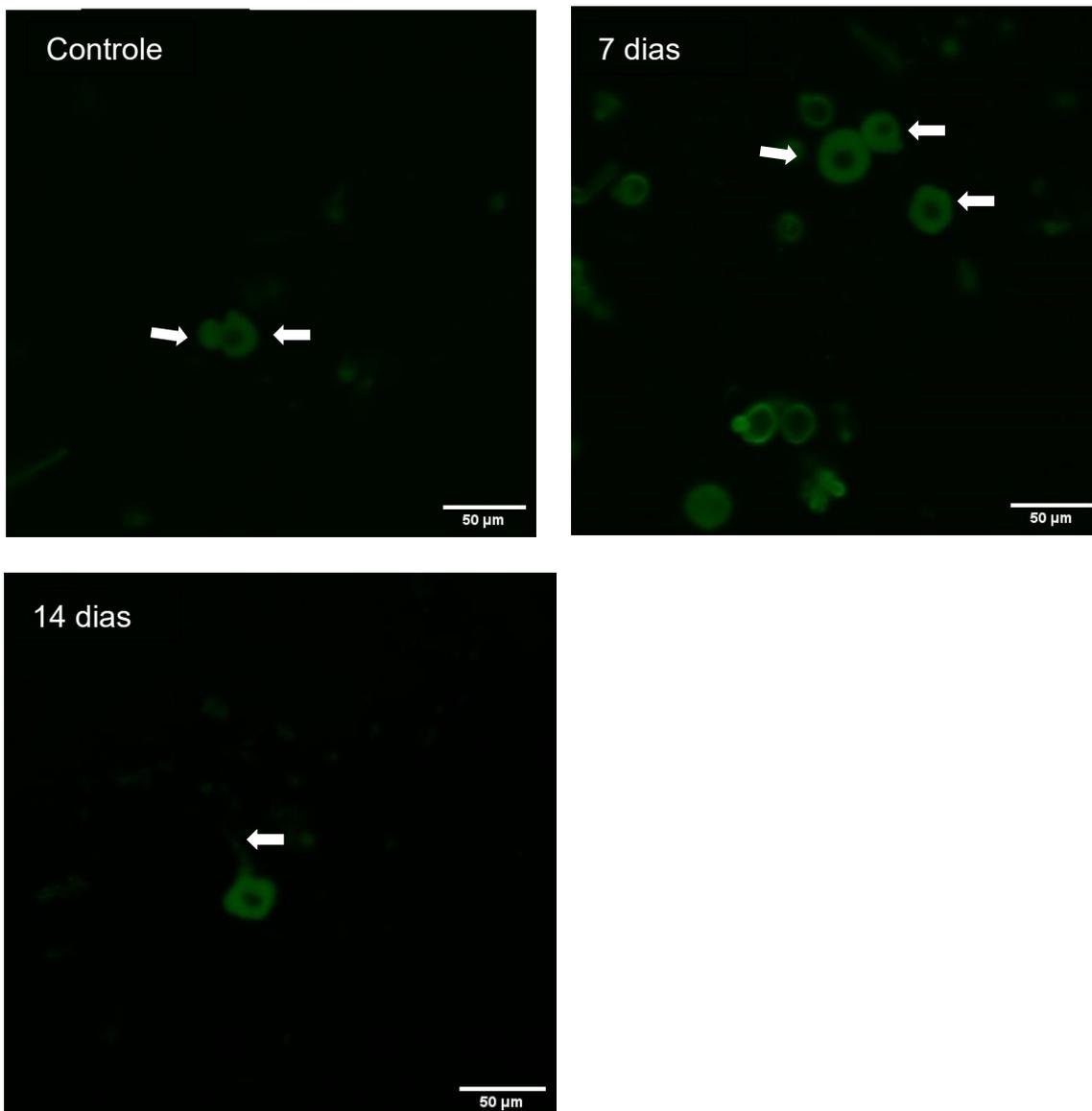


Figura 9: Avaliação do potencial de repouso neuronal em culturas de gânglios da raiz dorsal de ratos induzidos a hiperalgisia inflamatória persistente. Foram realizadas culturas dos gânglios retirados do lado direito dos níveis L5 e L6 de dois animais de cada grupo experimental, grupo controle, grupo inflamação na pata por 7 dias e grupo inflamação na pata por 14 dias. O potencial de repouso foi avaliado utilizando o indicador fluorescentes DiBAC(4)3 e as imagens obtidas através de microscopia confocal. Dados mostrados como média \pm EPM. * $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo, ANOVA seguida por teste de Dunnett's.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou o desenvolvimento de um modelo de hiperalgisia inflamatória periférica persistente induzida por carragenina em pata de roedores por 7 e 14 dias. A hiperalgisia persistente foi avaliada através de testes comportamentais para determinação da sensibilidade mecânica da pata de ratos e em culturas celulares para avaliar o potencial de repouso neuronal. Com o intuito de estudar os eventos fisiológicos, aspectos clínicos, celulares e alterações persistentes

envolvidas na cronificação da dor. A carragenina é uma droga originalmente descrita por WINTER; RISLEY; NUSS (1962), na área da medicina experimental para induzir uma resposta inflamatória hiperalgésica aguda, não imunogênica e altamente reprodutível (MORRIS, 2003). Era esperado notar diferença de forma aguda na sensibilidade nociceptiva, pois há dados na literatura demonstrando que a inflamação induzida por carragenina reduz o limiar nociceptivo nos animais tratados com essa substância.

E diante do achado que a sensibilização inflamatória causa uma alteração tecidual localizada, diminuindo o limiar de ativação dos nociceptores, foi confirmada a hipótese (**Fig. 6**) de que a existência de um traço de dor inflamatória periférica é mantida por 7 ou 14 dias e edema na pata dos animais (**Fig.7**), sendo capaz de instaurar um estado de hiperalgisia persistente. Em comparação à estudos anteriores a carragenina induz uma resposta inflamatória aguda mais intensa que a administração de PGE₂, embora não tenha sido avaliado no modelo de PGE₂ para comparação, certamente, o edema leve a moderado causado pela CGN é ideal para simular experimentalmente condições de dor crônica persistente induzido por inflamação. Era esperado também que a duração do estado de hiperalgisia persistente fosse dependente da duração do tratamento hiperalgésico, e com base na nossa análise experimental aqueles animais tratados durante 7 dias, o estado hiperalgésico perdurou por pouco mais de 3 dias após abolição das injeções de CGN, tal como ocorreu no modelo (FERREIRA, LORENZETTI e DE CAMPOS, 1990) com a administração de PGE₂. Os animais tratados com carragenina por 14 dias desenvolveram e mantiveram um estado de hiperalgisia persistente por pelo menos 21 dias.

O teste apropriado para mensurar a nocicepção em roedores é o teste de Von Frey eletrônico, que possui alta aplicabilidade, é reprodutível e confiável para simular condições clínicas com sensibilidade cutânea aumentada. Em nosso modelo, o teste de Von Frey indicou uma diminuição do limiar da resposta nociceptiva em todos os grupos tratados com carragenina, quando comparado com o grupo de controle. O modelo animal de animais intactos nos permite estudar a natureza fisiopatológica multidimensional da dor. Por isso, todos os testes comportamentais foram realizados entre 16h00 e 20h00, a linhagem de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), foi escolhida por possuir mais de 80% de similaridade genética como DNA humano, e ratos ao invés de camundongo é apropriada para ensaios experimentais comportamentais e

teste de drogas, são calmos e dóceis, e também possuem o tamanho adequado às análises realizadas (MATTARAIA; MOURA, 2012).

Embasado na literatura científica, o uso da carragenina como modelo provou ser útil na compreensão da dor inflamatória aguda e que provavelmente imita condições associadas a lesões teciduais, como entorses, distensões e miosite, e o modelo de hiperalgesia inflamatória persistente induzida por 14 dias na pata de ratos se provou útil em reproduzir condições fisiopatológicas semelhantes às vistas em doenças crônicas. Nós sugerimos que a dor, por ser uma experiência multidimensional, múltiplos resultados comportamentais devem ser usados para obter melhor entendimento do potencial de utilidade do tratamento.

Estudo anterior afirma que o edema após a injeção de carragenina é resultado da ação de vários mediadores inflamatórios que agem sequencialmente para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial da inflamação gerada pela carragenina, observa-se o aparecimento do edema pela ação da histamina, serotonina (5 HT) e da bradicinina, enquanto as prostaglandinas, especialmente do tipo E, estão presentes na fase tardia da inflamação (SOUZA; CASAIS-E-SILVA; AGUIAR, 2020). Isso corrobora com a ideia de uma amplificação da sensibilização inflamatória induzida por mediadores.

Estudos recentes mostraram que os níveis de expressão do mRNA da quimiocina CXCL1, foram significativamente aumentados (*up-regulation*) em células gliais satélites depois de injeções seguidas de carragenina e PGE2. Que indica um papel como contribuinte fundamental na transição da dor neuropática inflamatória em ratos hiperalgésicos. Além disso, a CXCL1 está envolvida no aumento da produção de Proteína Cinase C épsilon, importante mediador neuroinflamatório, enfatizando seu papel no desenvolvimento do modelo de hiperalgesia persistente (DU et al., 2023). A compreensão das alterações celulares e moleculares que participam do desenvolvimento da dor persistente, pode levar ao desenvolvimento de melhores tratamentos e de prevenção da cronificação da dor. Estudos anteriores do nosso grupo também sugerem um papel importante para as células gliais satélites na dor aguda e inflamatória (Ferrari et al., 2014, Lemes et al., 2018). O desenvolvimento de um modelo de dor inflamatória persistente irá possibilitar estudos posteriores para avaliação do papel da comunicação entre neurônios e células gliais neste processo.

O estudo descrito por ARAÚJO; PAULA; FRACETO (2008) corrobora com os nossos resultados e sugerem que a fosforilação dos canais de sódio e de potássio, pela PKA modifica o limiar de ativação dos potenciais de ação e o potencial de repouso neuronal, respectivamente. Evidenciando que os principais mecanismos subjacentes à transição da dor aguda para a crônica, são aqueles que induzem alterações bioquímicas e consequentemente transcricionais, com perfis diversificados de sinalizadores celulares, principalmente, os que atuam em vias que envolvam a ativação de moléculas intermediárias, chamadas de segundos mensageiros. Pois assim, amplificam suas respostas celulares e alteram a expressão de fatores de transcrição. Como nosso trabalho demonstra, o intervalo entre estímulos sucessivos e a duração total dos estímulos, geram alterações persistentes na sensibilização por estímulos que normalmente não seriam dolorosos (alodínia), ou respostas exageradas a um estímulo doloroso, sem causa ou indício de lesão aparente.

O Pletismômetro mensura diretamente mudanças no volume da pata do animal pelo deslocamento do volume de água em dois tubos verticais de acrílico interligados, um mensura a alteração de volume após inserção da pata, e o outro, possui o transdutor de dados (MORRIS, 2003). Em condições normais, é esperado que o volume da pata do animal retorne ao seu estado fisiológico após a descontinuação das injeções sem alterações, ou resquícios causados pela manutenção da hiperalgesia (FLETCHER; KAYSER; GILBAUD, 1996).

Estudo desenvolvido por SOUZA; CASAIS-E-SILVA; AGUIAR (2020) mostrou que o modelo de hiperalgesia persistente produzido pela administração prolongada de CGN no músculo masseter de ratos, produz danos teciduais associados, por essa razão, é indicado apenas para estudos em animais. Nossos resultados demonstram que ocorrem alterações significativas (**Fig.7**) na recuperação do edema na pata dos animais após 14 dias de inflamação induzida por CGN, possivelmente por formação de tecido fibroso no local da inflamação, diferente do grupo controle, que permaneceu sem alterações. A formação de tecido fibroso no modelo apresentado no presente estudo, deverá ser investigado e provavelmente interferiu na mensuração da sensibilidade mecânica da pata de animais, visto que tal tecido não apresenta inervação sensorial. No entanto, os resultados observados nos testes de sensibilidade mecânica e nos testes em cultura indicam que ocorreu

sensibilização persistente nos neurônios nociceptivos de forma que o modelo pode ser útil para estudos da neuroplasticidade envolvida na cronificação da dor.

No estudo de Ferreira et al, 1990 todos os animais receberam indometacina, um inibidor não seletivo de ciclooxigenases (COX) e foram tratados com injeções de apenas um mediador inflamatório, a PGE₂. Apesar da PGE₂ desempenhar um papel importante na hiperalgesia persistente inflamatória, no entanto, ela sensibiliza diretamente os nociceptores sem induzir resposta inflamatória associada. A administração de PGE₂ não afeta os demais mediadores, canais proteicos como o TRPV1, quimiocinas como a CXCL1, leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, citocinas como a TNF- α e outros fatores envolvidos na inflamação. O desenvolvimento de um modelo de hiperalgesia persistente inflamatória irá permitir a influência de múltiplos fatores, células, quimiocinas e citocinas na cronificação da dor, além de possibilitar um estudo das alterações neuronais resultantes deste processo.

SARTORI et al. (2020) em outro estudo, avaliou o desenvolvimento da hiperalgesia persistente utilizando o modelo desenvolvido por Ferreira et al. (1990) com injeções de PGE₂ durante 14 dias consecutivos em camundongos. Neste estudo, foi avaliado o efeito do livre acesso a roda de corrida por 28 dias. Seus resultados demonstraram que a prática voluntária de exercício físico tem efeitos terapêuticos e preventivos significativos, reduzindo a intensidade da hiperalgesia persistente. Seus efeitos, sinergicamente, induzem adaptações à nível sistêmico em diversos tecidos, principalmente nervoso e sistema imune. Tal tipo de abordagem é interessante e deve ser reproduzida em outros modelos para que possa ser seguramente indicado como intervenção clínica não-farmacológica, para o alívio dos sintomas e prevenção da dor crônica. Especialmente no caso em que o tratamento farmacológico é insuficiente, considerando a complexidade da dor crônica patológica, além dos consideráveis efeitos colaterais, abuso do uso e dependência.

Em resumo, investigamos os efeitos da inflamação induzida por carragenina, mantida por 7 ou 14 dias. Nossos resultados mostraram que a carragenina induz um modelo de hiperalgesia inflamatória persistente, caracterizado por um aumento significativo do edema na pata, da hiperalgesia mecânica e da excitabilidade neuronal, evidenciados por um aumento do potencial de repouso basal. Esses achados sugerem que o modelo testado provoca alterações persistentes na função neuronal periférica, que podem contribuir para o desenvolvimento e a manutenção

da dor inflamatória crônica/nociplástica. O avanço da pesquisa é necessário para entender melhor os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da hiperalgesia nociplástica persistente, que pode ser usada para determinar padrões de tratamento e melhorar a qualidade de vida em pacientes com dores crônicas.

7. CONCLUSÕES

- A manutenção de inflamação induzida por carragenina por 7 dias resulta em alterações teciduais que provocaram uma alteração persistente no volume da pata, mas não parece ser capaz de provocar uma sensibilização persistente nos neurônios nociceptivos.
- A manutenção de inflamação induzida por carragenina por 14 dias resultou em uma sensibilização que durou por pelo menos 21 dias. A aferição do volume da pata mostrou que ocorreram também alterações teciduais persistentes com aumento do volume da pata por mais de 21 dias.
- A avaliação do potencial de repouso neuronal após 28 dias do início do tratamento mostrou uma despolarização do potencial de repouso dos neurônios sensoriais em cultura retirados de animais que tiveram a pata inflamada por 14 dias comparando com neurônios obtidos de animais do grupo controle. Este resultado sugere um aumento de excitabilidade persistente que pode indicar um processo de neuroplasticidade.

O modelo de hiperalgesia inflamatória persistente desenvolvido neste estudo pode ser útil em estudos posteriores para avaliação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da dor crônica.

8. REFERÊNCIAS

ARAUJO, D. R. DE; PAULA, E. DE; FRACETO, L. F. Anestésicos locais: interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Química nova**, v. 31, n. 7, p. 1775–1783, 2008.

BTESH, J. et al. Mapping the binding site of TRPV1 on AKAP79: Implications for inflammatory hyperalgesia. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 33, n. 21, p. 9184–9193, 2013.

BUŁDYŚ, K. et al. What do we know about nociplastic pain? **Healthcare (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 12, p. 1794, 2023. DOI: 10.3390/healthcare11121794.

CAMPOS-SÁNCHEZ, J. C. et al. (2021) "In silico and gene expression analysis of the acute inflammatory response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) after subcutaneous administration of carrageenin." **Fish physiology and biochemistry**, 47(5), pp. 1623–1643. doi: 10.1007/s10695-021-00999-6.

DU, J. et al. Satellite glial cells drive the transition from acute to chronic pain in a rat model of hyperalgesic priming. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 16, 2023. 10.3389/fnmol.2023.1089162.

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. DOI: 10.1016/0304-3959(90)91149-d.

FERRARI, L. F.; LOTUFO, C. M.; ARALDI, D.; RODRIGUES, M. A.; MACEDO, L. P.; FERREIRA, S. H.; PARADA, C. A. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 51, p. 18363-8, 2014. doi: 10.1073/pnas.1420601111. Epub 2014 Dec 8. PMID: 25489099; PMCID: PMC4280647.

FLETCHER, D.; KAYSER, V.; GILBAUD, G. Influence of timing on the analgesic effect of bupivacaine and epinephrine infiltration in carrageenan injected rats. **Anaesthesiology**, v. 84, p. 1020–1026, 1996.

FIDLER, S. K. (2022) "Comprehensive evaluation for chronic pain." **Primary care**, 49(3), pp. 375–385. doi: 10.1016/j.pop.2022.02.001.

GIBBONS, M.; SARLAK, S.; CHITTKA, L. Descending control of nociception in insects? **Proceedings. Biological sciences**, v. 289, n. 1978, 2022.

HAGYMÁSI, K. The nobel prize in physiology or medicine — 2021. **Structural chemistry**, v. 33, n. 3, p. 987–990, 2022.

HAND, A. R.; FRANK, M. E. **Fundamentals of oral histology and physiology**. 1. ed. Nashville, TN: John Wiley & Sons, 2015. Capítulo 12.

HONORE, P. et al. Repeated dosing of ABT-102, a potent and selective TRPV1 antagonist, enhances TRPV1-mediated analgesic activity in rodents, but attenuates antagonist-induced hyperthermia. **Pain**, v. 142, n. 1, p. 27–35, 2009.

LEMES, J. B. P.; DE CAMPOS LIMA, T.; SANTOS, D. O.; NEVES, A. F.; DE OLIVEIRA, F. S.; PARADA, C. A.; DA CRUZ LOTUFO, C. M. Participation of satellite glial cells of the dorsal root ganglia in acute nociception. **Neurosci Lett**, v. 676, p. 8-12, 2018. doi: 10.1016/j.neulet.2018.04.003. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29626652.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: **Inflammation Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2003. p. 115–122.

MATTARAIA, V. G. de M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência rural**, v. 42, n. 8, p. 1490–1496, 2012.

OHASHI, Y. et al. Mechanisms of peripheral and central sensitization in osteoarthritis pain. **Cureus**, v. 15, n. 2, p. e35331, 2023. DOI: 10.7759/cureus.35331.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. DE; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, 2016.

PIOVEZAN, M. et al. Consumo e prescrição de opioides no Brasil: revisão integrativa. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 5, n. 4, 2022.

PARADA, C. A. et al. Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. **The European journal of neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 1847–1852, maio 2003. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2003.02626.x.

ROCHA, A. P. C. et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista brasileira de anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94–105, 2007.

SANTIAGO, B. V. M. et al. Prevalência de dor crônica no Brasil: uma revisão sistemática e meta-análise. **Clinics (São Paulo, Brasil)**, v. 78, n. 100209, p. 100209, 2023.

SARTORI, C. R. et al. Running wheel exercise induces therapeutic and preventive effects on inflammatory stimulus-induced persistent hyperalgesia in mice. **PloS one**, v. 15, n. 10, p. e0240115, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0240115.

SOUSA, P.; MENDES, W. Segurança do paciente: conhecendo os riscos nas organizações de saúde. **SciELO - Editora FIOCRUZ**, 2019. DOI: 10.7476/9788575416419.

SOUZA, K. B. R. de; CASAIS-E-SILVA, L. L.; AGUIAR, M. C. O modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina como estratégia para avaliar a ação de drogas sobre a dor miofascial. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 507, 2020.

TEIXEIRA, Manoel Jacobsen; FORNI, José Eduardo. Fisiopatologia da dor. In: **Neurocirurgia funcional e estereotáxica**. São Paulo: Atheneu, 2019. p. 25-36.

The top 10 causes of death. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

VASCONCELOS, F. H.; ARAÚJO, G. C. DE. Prevalência de dor crônica no Brasil: um estudo descritivo. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 1, n. 2, 2018.

VERGNE-SALLE, P. and Bertin, P. (2021) "Chronic pain and neuroinflammation." **Joint, bone, spine: revue du rhumatisme**, 88(6), p. 105222. doi: 10.1016/j.jbspin.2021.105222.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 111, n. 3, p. 544–547, 1962.

YUDIN, Y.; ROHACS, T. Inhibitory Gi/O-coupled receptors in somatosensory neurons: Potential therapeutic targets for novel analgesics. **Molecular pain**, v. 14, p. 1744806918763646, 2018.