



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ROBERTA GIUSTI SCHRAN

**EFEITO NOCICEPTIVO E EDEMATOGÊNICO DO TLR2 EM UM
MODELO DE NOCICEPÇÃO PÓS-OPERATÓRIA EM
CAMUNDONGOS**

Florianópolis
2020

ROBERTA GIUSTI SCHRAN

**EFEITO NOCICEPTIVO E EDEMATOGÊNICO DO TLR2 EM UM
MODELO DE NOCICEPÇÃO PÓS-OPERATÓRIA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schran, Roberta Giusti
EFEITO NOCICEPTIVO E EDEMATOGÊNICO DO TLR2 EM UM MODELO DE NOCICEPÇÃO PÓS-OPERATÓRIA EM CAMUNDONGOS / Roberta Giusti Schran ; orientador, Juliano Ferreira, 2020.
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Receptor do tipo toll 2. 4. Dor pós-cirúrgica. I. Ferreira, Juliano. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. III. Título.

Roberta Giusti Schran

Título: Efeito nociceptivo e edematogênico do TLR2 em um modelo de nocicepção pós-operatória em camundongos.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. Fernando Spiller
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof(a). Dra. Sara Marchesan Oliveira
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Prof(a). Dra. Helena Iturvides Cimarosti
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em farmacologia.

Prof. Dr. Rui Daniel Schroeder Prediger
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. Juliano Ferreira
Orientador(a)

Florianópolis, 2020.

DEDICO ESTE TRABALHO

À todos aqueles que de alguma forma foram impossibilitados de concretizar seus sonhos e à todos aqueles que facilitaram meu percurso até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Juliano, por me orientar durante esse processo. Muito obrigada por compartilhar comigo seu conhecimento, incentivo, ensinamentos e discussões científicas ao longo desse tempo. Agradeço pela paciência e por aceitar me guiar nesse caminho.

Às minhas colegas de laboratório, as quais tenho o privilégio de chamar de amigas. Muito obrigada por me ensinarem grande parte do que eu sei. Lhes admiro pela ética profissional, amor pela ciência e tamanho cuidado com os animais; com vocês aprendi a ter resiliência diante das dificuldades e a pensar criteriosamente antes de tudo, para agir com mais eficiência. Mas também aprendi que as alegrias devem ser somadas e a tristeza dividida, e é claro, que é importante ter uma aventurinha de vez enquanto. Muito obrigada pelos desabafos, pelo apoio e encontros pós-expediente tomando aquela cervejinha. É muito importante ter com quem contar em momentos decisivos. Ana, Marcella, Débora e Fernandinha, vocês são incríveis.

Aos meus amigos, por tornarem esse processo mais leve e descontraído, muitíssimo obrigada pela compreensão, apoio e noites memoráveis nada disso seria possível sem vocês. Aos meus amigos do apartamento 34, meu refúgio em meio à tempestade, Ana Carolina e Zé e muitíssimo obrigada pelas risadas e por aceitar e entender meu jeito maluquinha de ser. Em especial, Vanessa, obrigada por sempre me acompanhar e ficar ao meu lado nas dificuldades, mesmo que nem sempre perto, sempre presente, e por ser uma ótima mãe pra nossas filhas pets Amélia Catarina e Amelie *in memoriam*. À Marcella, minha amiga mais sensata, me faltam palavras pra te agradecer imensamente por me estender a mão, me ouvir e acreditar em mim, você é o balanço perfeito entre cérebro e coração.

À minha colega de apartamento e melhor amiga Letícia, obrigada por dividir comigo absolutamente tudo, sei que juntas conseguiremos ir sempre mais longe, obrigada pelo incentivo, por acreditar em mim, por me ensinar ser cada dia melhor. Muito obrigada por ser tão paciente, por me animar, me escutar, me aceitar, me compreender e estar sempre presente, você é incrível, nunca duvide disso.

Aos meus familiares, pelo apoio e amor incondicional que me dão, sei que muitas vezes mesmo sem compreender muito bem, estão ao meu lado na minha jornada. Obrigada por nunca duvidar de mim e sempre me incentivar a buscar o melhor. Dedico essa conquista aos meus pais Eliana e Evandro, e à minha irmã Emiliana.

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, e ao CNPq pelo suporte financeiro.

"All that we have to decide is what to do with the
time that is given to us"

-Gandalf, the gray.

RESUMO

A dor pós-operatória é desenvolvida após procedimentos comuns e afeta milhões de pessoas por ano no mundo todo. Esse processo é iniciado pela dor aguda de difícil controle que se torna persistente rapidamente, entretanto, o progresso do desenvolvimento de tratamentos mais seguros, específicos e com poucos efeitos colaterais permanece bastante limitado. Dentro desse contexto, o dano tecidual decorrente das cirurgias libera de padrões moleculares associados aos danos (DAMPs), os quais são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que orquestram uma resposta imune específica geradora de inflamação e dano neuronal responsável pela dor pós-operatória. O receptor do tipo toll 2 (TLR2) é um importante receptor no reconhecimento de padrões moleculares e já foi implicado na dor crônica e inflamatória, onde os DAMPs acarretam uma importante resposta inflamatória. Embora a dor pós-operatória seja mais prevalente em mulheres o efeito do dimorfismo sexual para respostas nociceptivas não foi ainda estudado para o receptor TLR2. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo investigar o envolvimento do receptor TLR2 na nocicepção pós-operatória aguda e persistente no modelo da incisão plantar em camundongos machos e fêmeas através de testes comportamentais para avaliação da nocicepção e edema em animais selvagens C57BL/6 e nocautes para TLR2 e TLR4. O TLR4 já foi implicado como importante para o desenvolvimento da dor pós-operatória e o efeito do tratamento local com o antagonista seletivo ortho-o-vanilina no momento da cirurgia também já foi relatado. Nesse estudo demonstramos que o modelo da incisão plantar caracterizado por nós causa hiperalgesia que persistente durante três fases distintas, e que o nocaute TLR2 é importante para o desenvolvimento da dor pós-operatória de maneira sexualmente dimórfica. Da mesma forma, o tratamento com o antagonista, é um alvo importante e potencial para tratamento da dor pós-operatória ainda a ser explorado além de desfechos comportamentais.

Palavras-chave: Incisão plantar; Dor persistente; ortho-o-vanilina; Hiperalgesia mecânica.

ABSTRACT

Postoperative pain is developed after common procedures and affects millions of people each year worldwide, this process is initiated by acute pain that is difficult to control and that quickly becomes persistent, however, the progress in the development of safer, more specific and with few side effects it remains quite limited. Within this context, tissue damage resulting from surgeries releases damage-associated molecular patterns (DAMPs), which are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) that orchestrate a specific immune response that generates inflammation and neuronal damage responsible for postoperative pain. The toll-like receptor 2 (TLR2) is an important receptor in the recognition of molecular patterns and has already been implicated in chronic and inflammatory pain, where DAMPs cause an important inflammatory response. Although postoperative pain be more prevalent in women, the effect of sexual dimorphism for nociceptive responses has not yet been studied for the TLR2 receptor. Thus, the present study aimed to investigate the involvement of the TLR2 in acute and persistent postoperative nociception on the animal model of plantar incision in both male and female mice through behavioral tests to assess nociception and edema in wild animals C57BL / 6 and knockouts for TLR2 and TLR4, which has already been implicated as important for the development of postoperative pain and the effect of local treatment with the selective antagonist ortho-o-vanillin at the time of surgery. In this study, we demonstrated that the plantar incision model characterized by us causes persistent hyperalgesia in three different phases, and that the TLR2 knockout is important for the development of postoperative pain in a sexually dimorphic way, as well as treatment with the antagonist, being a potential target for treatment of it still to be explored in addition to behavioral outcomes.

Keywords: plantar incision, persistent pain, ortho-o-vanillin, mechanical hyperalgesia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização e sinalização celular do TLR2 e TLR4.....	24
Figura 2 – Modelo de dor pós-operatória por incisão plantar em camundongo.....	30
Figura 3 – Desenho Experimental I.....	34
Figura 4 – Desenho experimental II.....	35
Figura 5 – Decurso temporal da hiperalgesia pós-operatória em animais machos e fêmeas demonstrada pela queda no limiar de retirada da pata 50% (g) pelo teste de von Frey após cirurgia em animais machos e fêmeas C57BL/6.....	38
Figura 6 – Decurso temporal das respostas afetivo-motivacionais (RAM) após cirurgia em animais machos e fêmeas C57BL/6.....	40
Figura 7 – Decurso temporal do comportamento de nocicepção espontânea ao longo do tempo após cirurgia em animais machos e fêmeas C57BL/6.....	41
Figura 8 – Caracterização do efeito edematogênico ocasionado pela cirurgia ao longo do tempo em animais machos e fêmeas C57BL/6.....	43
Figura 9 – Participação do TLR2 na hiperalgesia pós-operatória no modelo de nocicepção envolvendo diérese de pele e músculo em animais selvagens (WT) em comparação com animais com deleção gênica para TLR2 e TLR4 em fêmeas (A) e machos (B) obtidos pelo teste de hiperalgesia mecânica de von Frey.....	45
Figura 10 - Efeito da deleção gênica do TLR2 ou TLR4 da resposta afetiva motivacional (RAM) após a aplicação dos filamentos de von Frey na pata operada em animais (WT) em comparação com animais com deleção gênica para TLR2 e TLR4 em fêmeas e machos.....	47
Figura 11 - Efeito do TLR2 na redução da dor espontânea mensurado através da caracterização do decurso temporal da nocicepção espontânea (comportamento de guarda da pata operada) após cirurgia em animais (WT) em comparação com animais com deleção gênica para TLR2 e TLR4 em fêmeas e machos.....	49
Figura 12 - Papel do TLR2 no desenvolvimento do edema pós-operatório. Mensuração do edema da pata operada ao longo do decurso temporal da nocicepção após cirurgia em animais (WT) em comparação com animais com deleção gênica para TLR2 e TLR4 em fêmeas e machos.....	50
Figura 13 – Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local na nocicepção pós-operatória em fêmeas demonstrada pelo limiar de retirada da pata 50% (g) pelo teste de von Frey e em machos ao longo de 24 horas após administração das drogas.....	52
Figura 14 – Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local na nocicepção evocada pós-operatória em fêmeas demonstrada pelo somatório de respostas afetivas motivacionais e em machos ao longo de 24 horas após administração das drogas.....	54
Figura 15 – Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local na nocicepção espontânea em machos e fêmeas ao longo de 24 horas após administração das drogas.....	56

Figura 16 - Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local no edema pós-operatório ocasionado pela incisão na pata em fêmeas e machos demonstrada pela mensuração em delta/milímetros de espessura da pata ao longo de 24 horas após administração das drogas.....	58
Figura 17 - Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local na intensidade do sangramento decorrente da cirurgia e no pós-operatório em fêmeas e machos.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos adversos da administração intraplantar pré-operatória de ortho-o-vanilina, bupivacaína e combinação em camundongas e camundongos.....	59
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais
- ANOVA – Análise de variância, do inglês, *Analyses of variance*
- ARRIVE – Pesquisa Animal e Relato de Experimentos in vivo, do inglês, *Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*
- ATP – Adenosina trifosfato
- CEUA – Comitê de ética no uso de animais
- CD-14 - Cluster of differentiation 14
- COX-2 - Ciclo-oxigenase 2
- DAMPS – Padrões moleculares associados aos danos, do inglês, *damage-associated molecular pattern*
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DRG – Gânglio da raiz dorsal, do inglês, *dorsal root ganglia*
- HMGB1 – High mobility group box 1
- HSP-70 – Proteína de choque térmico 70, do inglês, *heat shock protein 70*
- IL-1 β – Interleucina 1 beta
- IL 6 – Interleucina 6
- iNOS - Enzima óxido nítrico-sintase induzida
- IFN-I - Interferon tipo 1
- LAFEX - Laboratório de Farmacologia Experimental
- LIDI - Laboratório de Imunobiologia das Doenças Infecciosas
- LPS - Lipopolisacarídeo
- LTA - Ácido lipoteicóico, do inglês, *lipoteichoic acid*
- MyD88 – Proteína de resposta primária da diferenciação mielóide 88, do inglês, *myeloid differentiation protein 88*
- “N” – Número amostral
- NF-KB – Fator nuclear kappa B, do inglês, *nuclear factor kappa B*
- NLRP3 - Domínio pirina da família NLR contendo proteína 3, do inglês, *NOD-LRR- and pyrin domain-containing protein 3*
- PAMPs - Padrões moleculares associados patógenos, do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*
- PBS - Solução tampão fosfato, do inglês, *phosphate-buffered saline*
- PVPI - Iodopovidona
- PRRs – Receptores de reconhecimento padrão, do inglês, *pattern recognition receptors*

RAM – Resposta afetiva motivacional

SHAM – Animais falso operados

SNPs - Polimorfismos de único nucleotídeo, do inglês, *single nucleotide polymorphism*

TLR2 - Receptor do tipo toll 2, do inglês, *toll like receptor 2*

TLR2-/- - Nocaute para o receptor do tipo toll 2

TLR4 - Receptor do tipo toll 2, do inglês, *toll like receptor 4*

TLR4-/- - Nocaute para o receptor do tipo toll 4

TRIF - Domínio TIR contendo adaptador indutor de interferon β , do inglês, *TIR-domain containing adapter-inducing interferon- β*

TNF- α – Fator de necrose tumoral - α , do inglês, *tumor necrosis factor α*

TRPV1 – Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 1, do inglês, *the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*

TRPA1 – Receptor de Potencial Transitório relacionado à proteína anquirina 1, do inglês, *the transient receptor potential ankyrin 1*

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VAS - Escala visual análoga de avaliação da dor, do inglês, *visual analogue scale*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 DOR-OPERATÓRIA	15
1.2 TRATAMENTO DA DOR PÓS OPERATÓRIA.....	16
1.3 PATOLOGIA DA DOR PÓS-OPERATÓRIA	18
1.4 LIBERAÇÃO DE DAMPS POR CIRURGIAS	20
1.5 SINALIZAÇÃO VIA TLR2.....	23
1.6 TLR2 COMO UM ALVO TERAPÊUTICO NA DOR.....	25
2 HIPÓTESE.....	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1 ANIMAIS	29
4.2 MODELO DA INCISÃO PLANTAR.....	30
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO E EDEMA.....	31
4.3.1 Avaliação da nocicepção espontânea	31
4.3.2 Teste de <i>von Frey</i> para detecção dos limiares de retirada e das respostas afetivas-motivacionais (RAM)	32
4.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA	33
4.5 DETECÇÃO DOS EFEITOS ADVERSOS.....	33
4.6 FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS E DESENHOS EXPERIMENTAIS.....	33
4.6.1 Avaliação da nocicepção e edema pós-operatórios em animais machos e fêmeas selvagens ou nocautes para os receptores TLR2 e TLR4.	33
4.6.3 Efeito do antagonista TLR2 e combinação com anestésico local	34
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36

5 RESULTADOS	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA EM ANIMAIS C57BL/6 MACHOS E FÊMEAS.....	37
5.1.1 Modelo de dor pós-operatória produz hiperalgesia mecânica persistente, que pode ser determinada por 3 fases distintas.....	37
5.1.2 modelo de dor pós-operatória também induz respostas afetivos-motivacionais (RAM) persistentes.....	38
5.1.3 – Modelo de dor pós-operatória também induz nociceção espontânea persistente.	40
5.1.4 – Caracterização do edema em animais C57BL/6 machos e fêmeas no modelo de dor pós-operatória.....	41
5.2 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DO TLR2 NAS DIFERENTES FASES DA NOCICEÇÃO PÓS-OPERATÓRIA.....	43
5.2.1 Deleção gênica do TLR2 reduz hiperalgesia pós-operatória com dimorfismo sexual em diferentes fases da hiperalgesia.....	43
5.2.2 Redução das respostas afetivo-motivacionais (RAMs) pela deleção gênica TLR2 ocorre transitoriamente somente em machos.....	45
5.2.3 A redução na nociceção espontânea pós-operatória animais nocautes para TLR2 é sexualmente dimórfico e fase-dependente.....	47
5.2.4 Efeitos anti-edematogênico relacionado à deleção gênica do TLR2 também possui dimorfismo sexual.....	49
5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTAGONISTA TLR2 SOBRE A DOR PÓS-OPERATÓRIA.....	51
5.3.1 Efeito da administração intraplantar de o-vanillina, bupivacaína ou sua combinação na hiperalgesia pós-operatória em fêmeas e machos C57BL/6.....	51
5.3.2 Efeito da administração intraplantar de o-vanillina, bupivacaína ou sua combinação nas respostas afetivo-motivacionais induzidas pela cirurgia em fêmeas e machos C57BL/6.....	53
5.3.3 Efeito da administração intraplantar de o-vanillina e a combinação o-vanillina+bupivacaína na nociceção espontânea induzidas pela incisão na pata em fêmeas e machos C57BL/6.....	55

5.3.4 Efeito da administração intraplantar de o-vanillina, bupivacaína ou sua combinação no edema da pata operada após a cirurgia em fêmeas e machos C57BL/6.....	57
5.3.5 Avaliação de efeitos adversos da administração intraplantar de o-vanilina, bupivacaína ou sua combinação.....	58
7 CONCLUSÃO.....	68
8 PERSPECTIVAS.....	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR-OPERATÓRIA

Considerando diversos tipos de procedimento cirúrgicos, mais de 300 milhões de pessoas são operadas a cada ano no mundo (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; ZAHN, 2018). Um dos sintomas mais comum após esses procedimentos é a dor aguda, que é quase onipresente após a cirurgia. É surpreendente que o manejo da dor pós-operatória permaneça insuficiente em um grande número de pacientes, embora muitos esforços tenham sido feitos para melhorar a situação. Além de problemas organizacionais relacionados ao manejo da dor no pós-operatório, a principal razão para o manejo da dor frequentemente ser mal sucedido após a cirurgia, é a falta de conhecimento sobre os mecanismos subjacentes à dor no pós-operatório. As opções de tratamento atuais não são específicas, produzem efeitos colaterais e geralmente são insatisfatórias e arriscadas (KEHLET; JENSEN; WOOLF, 2006; WEISER et al., 2016).

Mais de 80% dos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos podem experimentar dor aguda no pós-operatório e aproximadamente 75% daqueles com dor no pós-operatório relatam a gravidade como moderada, grave ou extrema. As evidências sugerem que menos da metade dos pacientes submetidos à cirurgia relatam alívio adequado da dor no pós-operatório. A dor inadequadamente controlada afeta negativamente a qualidade de vida, a função e a sua recuperação funcional, além disso aumenta o risco de complicações pós-cirúrgicas e de dor pós-cirúrgica crônica (CHOU et al., 2016).

A dor pós-operatória aguda, se bem manejada terapêuticamente, pode resolver dentro de uma semana para muitos pacientes submetidos a cirurgias (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019). Porém, a dor aguda tratada inadequadamente pode rapidamente evoluir para persistente, que ocorre quando a dor continua 3 meses após a realização do procedimento e, não esta relacionada a infecção ou doença pré-existente (JAMES, 2017; POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017; VAN DENKERKHOF et al., 2012).

Após procedimentos cirúrgicos, a taxa de evolução para dor crônica pode chegar à 80% naqueles casos que provocam lesões nervosas (KRAYCHETE et al., 2016). O contínuo aumento desses números, demonstram que o desenvolvimento da dor persistente é um problema

cl clinicamente relevante, mas mesmo assim, o progresso no tratamento e manejo da dor pós operatória continua sub-ótimo. Apesar do avanço na pesquisa básica, os fatores de risco associados à persistência da dor após procedimentos cirúrgicos continuam crescendo (LAVAND’HOMME, 2017). Alguns fatores de risco já identificados são a presença de dor pré-operatória, transtornos de ansiedade, duração longa dos procedimentos e a técnica cirúrgica empregada, além disso a cronicidade da dor pós-operatória é mais prevalente em adultos jovens e mulheres (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019).

1.2 TRATAMENTO DA DOR PÓS OPERATÓRIA

Diretrizes baseados em meta-análises, como a da Sociedade Americana de Dor (CHOU et al., 2016), recomendam o uso da analgesia multimodal (variedade de analgésicos e técnicas cirúrgicas que agem por diferentes mecanismos de ação no sistema nervoso periférico e/ou central) combinadas à métodos não farmacológicos (p.ex. estimulação elétrica transcutânea) para o manejo da dor pós-operatória. Dependendo do tipo de cirurgia, a analgesia multimodal prevê o uso desde anestesia local (p.ex. infiltração de anestésicos locais no local da incisão), passando por técnicas anestésicas regionais/neuroaxiais (p.ex. opioide intratecal), chegando ao uso sistêmico de fármacos (incluindo opioides, anti-inflamatórios não esteróides, gabapentinoídes e cetamina).

O uso de opioides no período pós operatório está relacionado não apenas à ocorrência de efeitos adversos comumente encontrados, mas também ao mal uso desses fármacos. Frequentemente a prescrição inadequada e desnecessária que acaba levando ao abuso, tolerância e dependência dessa importante classe de fármacos. Estima-se que 80% das cirurgias de baixo risco recebem opioides, é estimado que 65% do uso abusivo, foi prescrito por médicos. Os efeitos adversos incluem uma multiplicidade de sintomas que vão de sedação, depressão respiratória, delírio, íleo paralítico, até mesmo a piora da dor em altas dosagens. O mecanismo primário envolvido na fatalidade por esses fármacos envolve depressão respiratória, hipóxia, hipercapnia e parada cardiorrespiratória. Além disso, há a ocorrência de comorbidades ou uso de outras medicações que limitam o uso desses fármacos no transoperatório. Quanto ao uso crônico, além do potencial abuso, pode estar associado a características psicossociais como impedimento da retomada à função normal e atraso na recuperação cirurgica, além de tolerância (JAMES, 2017; NEUMAN; BATEMAN; WUNSCH, 2019; STASIOWSKA et al., 2015). Na

última década, houve uma dependência de analgésicos opioides para o tratamento da dor pós-operatória tanto aguda quanto crônica, e este fator está diretamente associado com o aumento das prescrições desses fármacos que trazem efeitos adversos consideráveis bem elucidados na literatura (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019).

Analgésicos não opioides também apresentam efeitos adversos, nesse caso é necessário balancear a eficácia clínica com os efeitos adversos, mas na maior parte dos medicamentos disponíveis, os efeitos indesejáveis são sobressalentes. Os AINES são conhecidamente utilizados no bloqueio da dor e inflamação tanto aguda como crônica, atuam mantendo um nível constante de inibição das prostaglandinas ao longo do período pós-operatório, além de não apresentar risco de abuso. A preocupação com os riscos e efeitos indesejáveis acerca do uso de AINES é o limitante principal do seu emprego na redução da dor pós-operatória. Mesmo que os seletivos para COX-2 sejam mais seguros que os não seletivos, não são indicados para longos tratamentos, devido ao risco de apresentar efeitos indesejáveis em longo prazo. Na sua maior parte, os efeitos a longo prazo são gastrointestinais como ulcerações da mucosa; risco de complicações cardiovasculares em pacientes cirúrgicos, injúria renal aguda por interferência na função renal; supressão da angiogênese em anastomoses venulares; interferência negativa na função plaquetária que é importante no processo cicatricial pós-operatório (GUPTA; BAH, 2016; POGATZKI-ZAHN; CHANDRASENA; SCHUG, 2014; STASIOWSKA et al., 2015).

O uso de infiltração subcutânea e/ou intra-articular de anestésicos locais de ação prolongada no local cirúrgico demonstrou ser eficaz como componente da analgesia em vários procedimentos cirúrgicos (CHOU et al., 2016). Porém esta modalidade de analgesia é limitada pela sua curta duração, sua contraindicação para anestesia de membros distais e pelo risco de efeitos adversos locais (p.ex. sangramento) ou sistêmicos (p.ex. convulsões). Salienta-se ainda que cada fármaco em regimes multimodais pode ter efeitos diferentes, sob diferentes condições. Por exemplo, um estudo clínico randomizado demonstrou que o celecoxib é mais eficaz em mulheres enquanto a oxicodona é mais eficaz em homens para tratamento da dor pós-operatória após cirurgia descompressiva lombar (KIM et al., 2019). Desta forma, é importante estudo do dimorfismo sexual não somente na intensidade e na duração da dor pós-operatória, mas também no seu tratamento.

Alguns fatores predisponentes da ocorrência de dor pós operatória já foram determinados, como por exemplo dor antes do procedimento, dor severa nas primeiras 24 horas após cirurgia, além de algumas comorbidades, como ansiedade (LAVAND'HOMME, 2017). Além disso, estudos indicam que a efetividade de tratamentos analgésicos possui diferenças intersexuais, além de estar claro que alterações neuroendócrinas e hormonais ao longo da vida são importantes contribuintes para a transição da dor aguda para a crônica. Mesmo assim, os mecanismos e fatores que influenciam na alta prevalência de cronicidade da dor em mulheres, por muito tempo foram ignorados (PRICE et al., 2018).

Apesar do desenvolvimento de novos medicamentos e técnicas analgésicas aprimoradas, a dor pós-operatória ainda permanece sub-avaliada e seu tratamento bastante limitado (POGATZKI-ZAHN; ZAHN; BRENNAN, 2007; PRICE et al., 2018). Uma razão importante para esse dilema é a falta de conhecimento sobre a fisiopatologia da dor no pós-operatório. Conforme sugerido para vários estados clínicos de dor, uma terapia baseada em mecanismo pode melhorar seu gerenciamento (POGATZKI-ZAHN; ZAHN; BRENNAN, 2007). Dos tratamentos disponíveis no mercado, a maioria apresenta uma ampla gama de efeitos adversos, e com isso, enfrentamos a necessidade do desenvolvimento de medicamentos com menores efeitos adversos e com alvos mais específicos, principalmente no que tange a segurança em casos que necessitam usos prolongados (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017).

1.3 PATOLOGIA DA DOR PÓS-OPERATÓRIA

O trauma e a inflamação decorrentes da manipulação tecidual no momento cirúrgico são geradores de estímulo nociceptivo, que é traduzido em impulsos elétricos e transmitido pelos nociceptores ao gânglio da raiz dorsal. No DRG, do inglês, *dorsal root ganglia*), onde estão contidos os corpos celulares das fibras sensoriais A δ (A delta) e C, que respondem ao estímulo doloroso vindo da periferia. Então, o estímulo alcança proporções centrais, na medula espinhal esses neurônios aferentes primários fazem sinapse com os secundários no corno dorsal, e é levado aos grandes centros pela via espinotâlamica e espinoreticular alcançando projeções corticais que após o processamento central leva a experiência dolorosa (BRENNAN; ZAHN; POGATZKI-ZAHN, 2005; REDDI; CURRAN, 2014). A transmissão do estímulo nervoso no pós-operatório envolve interações muito complexas, incluindo o envolvimento da pele, fáscia

e de estruturas mais profundas. No pós-operatório a dor ocorre mesmo em repouso, mas também ocorre frente à estímulos normalmente inócuos, como movimentação (BRENNAN; ZAHN; POGATZKI-ZAHN, 2005).

A injúria tecidual cirúrgica causa dois eventos no sistema nociceptivo, a sensibilização periférica e a central. A participação da sensibilização central ocorre através da resposta de neurônios de segunda ordem, que contribuem significativamente para a ocorrência de hiperalgesia secundária e sensibilização central, que são importantes para cronicidade do processo doloroso. A hiperalgesia primária responde a estímulos mecânicos e térmicos na área da incisão, na sua maior parte ocasionada pela sensibilização de fibras sensoriais aferentes primários enquanto a secundária corresponde à sensibilização da área adjacente à ferida cirúrgica causada pela sensibilização central de neurônios do corno dorsal medular. Ambas as sensibilizações periférica e central estão envolvidas na manutenção da dor após a cirurgia, juntamente ao risco da cronificação e intensidade da dor pós cirúrgica, para tanto, estudos de substâncias anti-hiperalgésicas se fazem necessários como estratégias de tratamento na analgesia multimodal (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; ZAHN, 2018; REDDI; CURRAN, 2014).

No caso da sensibilização periférica, o estímulo é conduzido através de fibras aferentes primárias, responsáveis pela dor espontânea local e pela hiperalgesia primária. Clinicamente, a sensibilização periférica é o evento mais relevante no desenvolvimento de dor aguda peri-operatória (BRENNAN; ZAHN; POGATZKI-ZAHN, 2005). Os mediadores inflamatórios liberados no local, após a lesão tecidual, causam estimulação e sensibilização direta dos nociceptores localizados nas fibras nervosas dos neurônios aferentes primários nos tecidos periféricos. Dessa forma, a ocorrência de inflamação periférica aguda está intimamente ligada ao desenvolvimento da dor pós operatória (XING et al., 2018).

A sensibilização nociceptiva periférica também pode ser induzida por migração e ativação de células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos e mastócitos, além de isquemia tecidual e mediadores oriundos do tecido lesado que levam à sensibilização neuronal aferente primária e células satélites da glia no DRG, facilitando a geração de hipersensibilidade e desenvolvimento de hiperalgesia após a incisão (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; ZAHN, 2018). De acordo com James (2017), em eventos cirúrgicos traumáticos, os estímulos dolorosos

agudos dão início a uma cascata de eventos periféricos e centrais. Os quais, culminam na expressão de genes envolvidos na resposta imunológica, expressão de citocinas pró-inflamatórias e na regulação da resposta de receptores específicos. Na transição da dor aguda, inflamatória, para a persistente ocorrem alterações nociplásticas nos nociceptores que são produzida pela inflamação ou por danos traumáticos em nervos, dando uma característica neuropática ao processo. Portanto, podemos caracterizar a dor pós cirúrgica como contendo um componente inflamatório inicial e um componente neuropático mais tardio.

A lesão extensiva em territórios de inervação durante a cirurgia tem papel fundamental na plasticidade neuronal, que aliado à outros fatores como a interação do sistema nervoso com o sistema imune em estados de dor persistente, resultam em um processo dinâmico de fatores importantes na perpetuação do estímulo doloroso (PRICE et al., 2018). Após a incisão, também ocorrem mudanças nos neurônios aferentes primários do DRG, tal acontecimento é tempo dependente e determinante para da persistência da dor. Tanto no DRG quando em nível medular, ocorre um aumento da expressão mediadores críticos para a neuroplasticidade que leva à subseqüente dor persistente, mantida pela sensibilização central, e trazendo como consequência, a hiperalgesia pós-operatória persistente (RICHEBÉ; CAPDEVILA, CYRIL-RIVAT, 2013).

Mostrando a dinamicidade do processo, Lavand'homme (2017) indica que um único pico de dor severa no pós operatório está diretamente associado ao aumento do risco da persistência da mesma. Dessa forma, chama atenção da pesquisa para a conduta, manejo e avaliação da dor nos momentos peri e pós-operatório, como importantes marcadores clínicos na detecção da transição da dor. Esses mecanismos envolvidos na dinamicidade da patogenia da dor pós operatória persistente apresentam diversos aspectos não esclarecidos, principalmente a caracterização do momento em que a dor aguda se torna persistente, e com isso, a necessidade do esclarecimento de mecanismos endógenos capazes de reverter o curso e otimizar o tratamento (PRICE et al., 2018).

1.4 LIBERAÇÃO DE DAMPS POR CIRURGIAS

A cirurgia fere tecidos periféricos, resultando em um estímulo doloroso com um componente fisiopatológico distinto da inflamação per-se. A inflamação pode ser induzida de forma estéril, a qual é caracterizada por liberação de mediadores inflamatórios e recrutamento

de células inatas na ausência de patógenos. O sistema imune inato não é apenas a primeira linha de defesa contra patógenos, também está envolvido em processos de remodelação tecidual após dano, desenvolvimento, transporte de lipídeos e remoção de células apoptóticas. Os DAMPs são um heterogêneo grupo de moléculas que servem como sinais endógenos originados de vários compartimentos celulares e extracelulares capazes de desencadear a resposta inflamatória após interação com PRRs. Apesar da diversidade estrutural entre os DAMPs, eles possuem a capacidade de se ligar e ativar PRRs e estimular a resposta imune. Estes, são liberados do espaço intracelular ou extracelular após injúrias, estresse tecidual ou morte celular; podem ser derivados da matriz extracelular que após liberação proteolítica de seus componentes solúveis, atuam como DAMPs e iniciam a resposta inflamatória rápida que culmina na ativação de macrófagos e células residentes pelas citocinas. Ainda, podem ser componentes intracelulares liberados após autofagia e morte celular, como no caso das mitocôndrias, DNA, ATP e HMGB1, ou produzidos pelo tecido lesado ou necrótico, citosólico como ácido úrico (SCHAEFER, 2014).

Os DAMPs são liberados do espaço extracelular ou intracelular após lesão tecidual ou morte celular, vários DAMPs já foram detectados no local ou sistemicamente, após diferentes tipos de cirurgias, incluindo a proteína de choque térmico 70 (HSP-70), a proteína HMGB1, proteínas S100A, histonas e defensinas (DYBDAHL et al. 2002; DARRABIE et al., 2018; HOETZENECKER et al., 2014). A liberação de DAMPs está relacionada especialmente com o risco de infecções ou resposta inflamatória sistêmica relacionada a cirurgias (DYBDAHL et al., 2002; HOETZENECKER et al., 2014), no entanto não foi investigada sua relação com a indução e manutenção da dor pós-operatória.

Esses DAMPs são reconhecidos por vários tipos celulares e suas respostas biológicas são desencadeadas por diferentes vias, incluindo os receptores tipo toll (TLRs) (do inglês, *toll-like receptors*). O reconhecimento de DAMPs por TLRs depende da localização celular dos subtipos de receptores envolvidos na sinalização específica, que podem ser classificados em 2 subgrupos, os receptores transmembranares: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 e intracelulares TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. Diferem entre si em termos de especificidade quanto aos ligantes, padrões de expressão e na expressão de genes alvo. Após o reconhecimento dos seus ligantes, os TLR recrutam moléculas adaptadoras como MyD88 (proteína de resposta

primária da diferenciação mielóide 88, do inglês, *myeloid differentiation protein 88*) e TRIF (domínio TIR contendo adaptador indutor de interferon β , do inglês - *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) e iniciam eventos intracelulares que vão culminar em secreção de citocinas inflamatórias, IFN-I (interferon tipo 1), quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (KAWAI; AKIRA, 2010; MEDZHITOV; JANEWAY, 2002).

Sinais endógenos ativadores dos TLRs causam a ativação subsequente de uma ampla variedade celular, como células do sistema imune, células da glia, fibroblastos, células endoteliais e neurônios, mediando processos dolorosos e também a coceira (LACAGNINA; WATKINS; GRACE, 2018). Observamos, portanto, que a sinalização iniciada pelos receptores TLRs é uma via de mão dupla, em um lado, leva à eliminação de patógenos pela detecção dos seus padrões moleculares, noutra, causa uma resposta prolongada e exagerada ao dano tecidual (LIANG et al., 2011). Na sensibilidade dolorosa, a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias via antagonismo de receptores TLR resulta na redução da expressão de genes reguladores da expressão de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a sensibilidade dolorosa (JIN; JIN; ZHOU, 2018).

Dentre os TLRs, somente o TLR4 foi adequadamente investigado quanto a sua relação com a dor pós-operatória. Um estudo clínico com 60 pacientes submetidos à substituição da articulação dos membros inferiores demonstrou que o potencial de ativação do TLR4 das amostras de plasma teve um efeito significativo para explicar o aumento dos escores de dor (XIE et al., 2018). Este dado sugere que a lesão de tecido induzida pela cirurgia libera DAMPs que podem ativar o TLR4 e mediar a dor pós-operatória.

Evidências pré-clínicas também indicam a participação do TLR4 na dor pós operatória. Xing et al. (2018) demonstraram que após a incisão plantar em ratos houve um aumento da expressão de TLR4 no tecido plantar e no DRG (de 2 horas a 3 dias após cirurgia), e que a administração local ou intratecal de um antagonista TLR4 reduz a expressão de NF-KB, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), além de atenuar a hiperalgesia aguda pós-operatória. Além disto, em um modelo dor pós-operatória persistente (incisão e retração de pele e músculo em ratos) ocorreu expressão sustentada do TLR4 no DRG e em células gliais da medula e redução da hiperalgesia persistente pelo tratamento intratecal com antagonista do TLR4 (SUN et al., 2015; CHEN et al., 2015)

Curiosamente, muitos DAMPs que ativam o TLR4 também ativam outros TLRs, especialmente o TLR2, indicando a possível participação de outros TLRs nos mecanismos de

indução e manutenção da dor pós-operatória. De fato, polimorfismos genéticos do TLR2 estão diretamente associado ao alto consumo de morfina por pacientes com dor severa no período pós-operatório (SOMOGYI et al., 2016). Assim, o TLR2 parece também ser um alvo importante para a indução e manutenção da dor pós-operatória. Apesar de não existirem estudos que comprovem diretamente esta hipótese, algumas evidências pré-clínicas indicam a participação do TLR2 em modelos de dor inflamatória ou neuropática.

1.5 SINALIZAÇÃO VIA TLR2

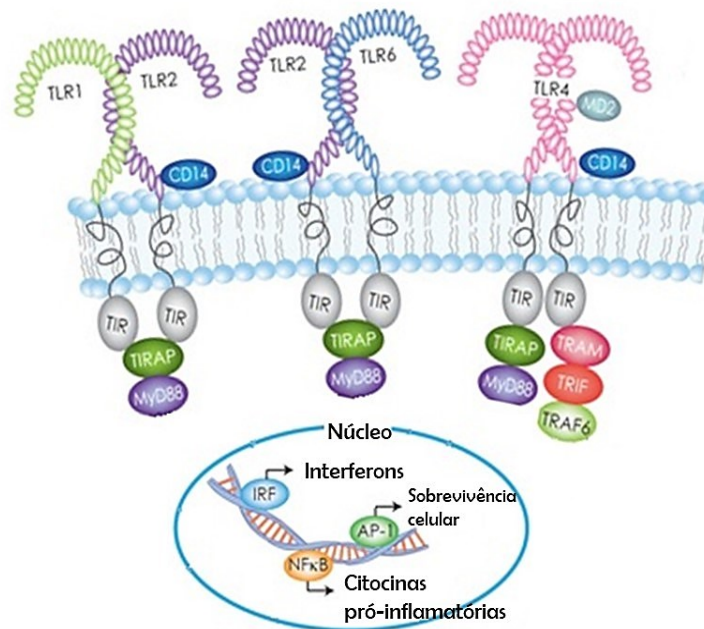
Comparados a outros TLRs, o TLR2 é o receptor que detecta a maior quantidade de DAMPs e padrões moleculares associados patógenos (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*) (HOSSAIN; TANASESCU; GRAN, 2017), incluindo proteoglicanos, glicosaminoglicanos e materiais liberados por células necróticas (VAN BERGENHENEGOUWEN et al., 2013).

Para realizar sua função de reconhecimento e atuar como um modificador de sinal intracelular, o TLR2 utiliza co-receptores que auxiliam na ativação de moléculas adaptadoras da sinalização de vias de transdução de sinal específicas, como pode ser observado na figura 1. A heterodimerização TLR2 com TLR1 e TLR6 é necessária para iniciar a ativação celular mesmo que não induza a diferenças na via subsequente, apenas aumente o repertório de ligação e reconhecimento de padrões moleculares. Além desses, conta com moléculas intermediárias facilitadoras da dimerização. O TLR2/1 depende de CD14 ou entrega de lipopeptídeos diacetilados por CD14 solúvel (sCD14) enquanto TLR2/6 depende de ligação inicial com CD36 lipopeptídeos diacetilados ou ácido lipoteicoico (BERGENHENEGOUWEN et al., 2013).

O TLR2, o único formador de heterodímeros, está envolvido no reconhecimento de vários PAMPs derivados de bactérias, fungos e parasitas, atuando principalmente no reconhecimento de lipopeptídeos tri ou di-acetilados através da dimerização com TLR1 e TLR6. Apesar da localização na superfície celular, após ativação do receptor, os ligantes são capazes de induzir uma sinalização endossomal dependente de NF-KB. Com TLR1 ou TLR6 para reconhecer lipopeptídeos di ou tri-acetilados de bactérias gram negativas e demais

patógenos. TLR2 com seus heterodimeros TLR 1 e 6 requer internalização para ativar NF-KB em resposta ao ácido lipoteicoico (LTA, do inglês, *lipoteichoic acid*) e lipopeptídeos e coordenar a resposta imune, que apesar da localização do receptor na superfície celular, os ligantes são capazes de induzir uma sinalização endossomal dependente de NF-KB (MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU, 2016).

Figura 1 – Localização e sinalização celular do TLR2 e TLR4. Ativação da via TLR2 pelos seus ligantes (DAMPs) após estímulo cirúrgico resultando em citocinas pró-inflamatórias e consequente hiperalgesia.



Fonte: adaptado de Cayman Chemicals (MAY, 2012).

O TLR2 é amplamente expresso em células inatas e adaptativas do sistema imune, células endoteliais, epiteliais e células do sistema nervoso como micróglia e astrócitos (JURGA et al., 2016). Indicando sua participação na detecção de estímulos nocivos que desencadeiam a dor, o TLR2 é expresso em neurônios sensoriais de pequeno e médio diâmetro do DRG e gânglio trigêmeo, co-expresso com especialmente com a isolecitina B4 e com os receptores TRPV1/TRPA1 (receptor de potencial transitório vanilóide 1, do inglês, *the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* e receptor de potencial transitório relacionado à proteína anquirina 1, do inglês, *the transient receptor potential ankyrin 1*, respectivamente) (WANG et al., 2020).

1.6 TLR2 COMO UM ALVO TERAPÊUTICO NA DOR

Algumas evidências demonstram a participação do TLR2 na dor crônica em humanos, como em casos de degeneração de discos intervertebrais, onde os DAMPS desencadeiam uma importante resposta inflamatória causadora de dor crônica. A sinalização TLR2 em estágios iniciais desse processo em humanos contribui substancialmente para esse processo (KROCK et al., 2016).

Por outro lado, existem muitos estudos indicando o papel do TLR2 em diferentes modelos de dor em roedores. Como existe uma disponibilidade limitada de antagonistas seletivos TLR2, animais nocautes para o TLR2 são ferramentas importantes nestes estudos. Estes animais não apresentam alterações na secção de estímulos nociceptivos térmicos e mecânicos (testes da placa quente e von Frey), apresentam redução da nocicepção espontânea causada pela formalina e na hiperalgesia mecânica induzida por alguns PAMPs, como adjuvante completo de Freund (WANG et al., 2020). Também usando animais nocautes, estudos ainda indicam que na artrite experimental induzida por zimosan, o dímero TLR2/MyD88 está envolvido na cascata de eventos de hiperalgesia articular por meio de um mecanismo dependente da produção de citocinas e quimiocinas (GUERRERO et al., 2011).

Vários estudos pré-clínicos também suportam a hipótese da participação do TLR2 em modelos de dor neuropática. Após lesão em nervos periféricos, já foi demonstrado que os neurônios sensoriais danificados ativam a células gliais da medula espinal por estimulação do TLR2 (KIM et al., 2007; SHI; ZEKKI; ZHANG, 2011). Animais nocautes TLR2 possuem redução não somente na ativação glial e expressão pró-inflamatória na medula espinal, mas também na hiperalgesia persistente (KIM et al., 2007; STOKES; CORR; YAKSH, 2013). Deve-se salientar que o glicosfingolípido sialilado GT1b foi identificado como o ligante TLR2 responsável pela ativação da glia da medula espinal e pela hiperalgesia induzidas por lesão nervosa (LIM et al., 2020).

A administração intratecal de um antagonista dual TLR2/TLR4 (sparstolonina B) também foi capaz de reduzir a hiperalgesia e a expressão de genes pró-inflamatórios em modelo de dor neuropática em ratos (JIN; JIN; ZHOU, 2018). Adicionalmente, tanto o TLR4 quanto o TLR2 são expressos em maior quantidade no DRG após injúria neuronal induzida pela neuropatia (embora a resposta TLR4 seja mais rápida que a TLR2) e o bloqueio dual destes

receptores melhorou a eficácia analgésica do tratamento com buprenorfina (JURGA et al., 2016). Finalmente é importante ressaltar que os estudos realizados acima foram feitos com animais machos e que já foi demonstrado que a participação do TLR4 na dor neuropática ou inflamatória ocorrem em machos, mas não em fêmeas (SORGE et al., 2011). Infelizmente, o efeito do dimorfismo sexual para respostas nociceptivas não foi ainda estudado para o receptor TLR2.

2 HIPÓTESE

A inibição do receptor *toll-like* do tipo 2 (TLR2) reduz a dor pós-operatória aguda e persistente com dimorfismo sexual no modelo de incisão plantar em camundongos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento do receptor TLR2 na nocicepção pós-operatória aguda e persistente no modelo da incisão plantar em camundongos machos e fêmeas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o modelo da incisão plantar com lesão na pele e músculo em camundongos C57BL/6 no Laboratório de Farmacologia Experimental – LAFEX.
- Investigar através animais nocautes e antagonista seletivo a participação do TLR2 na nocicepção aguda e persistente no modelo de incisão da pata em camundongos.
- Verificar a participação do TLR2 no edema pós-operatório.
- Investigar o dimorfismo sexual tanto no desenvolvimento da nocicepção pós-cirúrgica como no possível efeito antinociceptivo da inibição TLR2.

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas com idade entre 8 e 16 semanas pesando 18-30 g, mantidos de 2 a 6 animais em estantes micro isoladoras e caixas de polipropileno transparente (39,6 x 21,5 x 17,2 cm), os quais receberam água filtrada e ração *ad libitum*. Em ciclos controlados claro/escuro (12/12 h) iniciando o período claro às 7:00 a.m. e temperatura ($22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$). As trocas foram realizadas semanalmente pelo próprio experimentador em capela de fluxo laminar e os animais receberam tubos PVC (5 cm diâmetro x 10 cm comprimento) e de papel como enriquecimento ambiental.

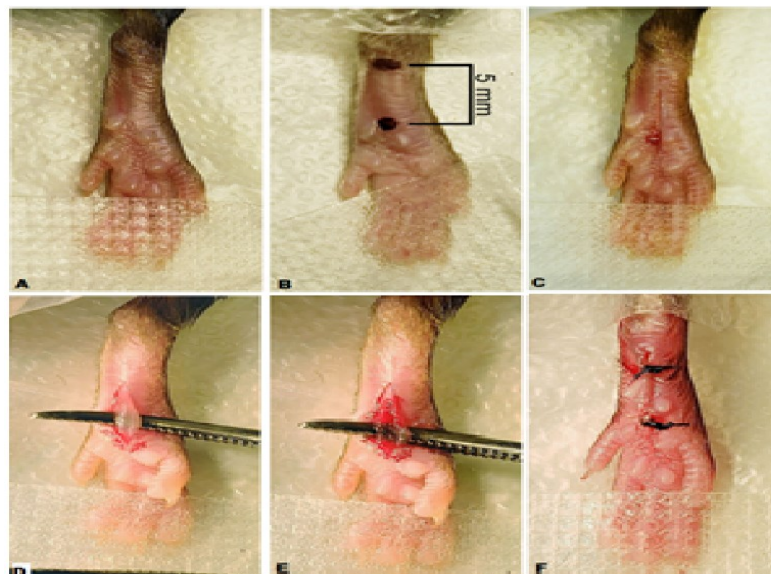
Camundongos (*Mus musculus*) foram única espécie a ser utilizada. Quanto à linhagem, camundongos C57BL/6 foram provenientes do Biotério setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e animais com deleção gênica para o receptor TLR2 (TLR2^{-/-}) e TLR4 (TLR4^{-/-}), oriundos do Biotério setorial do Laboratório de Imunobiologia das Doenças Infecciosas (LIDI) da UFSC. Todos os animais foram mantidos sobre as mesmas condições supracitadas, no Biotério Setorial do LAFEX.

Nesse estudo, os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em experimentação animal conforme as diretrizes da ARRIVE – do inglês, *Animal Research and Reporting of In Vivo Experiments* (KILKENNY et al., 2010). E foram aprovados pelo Comitê de Ética do uso de animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo número 3505290719. Com intuito de reduzir o uso de animais, o “N” amostral foi o mínimo necessário, o cálculo foi baseado no teste definido como desfecho primário, limiares de retirada no teste de von Frey e com auxílio do software GPower 3.1, teste *t* de student, revelou um *N* de 8 animais. Após numeração dos animais, foi realizada a alocação randomizada dos grupos utilizando o *website* random.org e os tratamentos foram feitos utilizando cegamento para reduzir o viés da influência do avaliador no resultado do teste. Todos os experimentos foram divididos em 2 – 3 blocos experimentais independentes contendo todas as variáveis (tratados e não tratados ou nocautes e selvagens) até que o *N* estivesse completo.

4.2 MODELO DA INCISÃO PLANTAR

Para induzir a dor pós-cirúrgica como exemplificado na figura 2, foi utilizado o métodos de incisão da pele e músculo, conforme Cowie & Stucky (2019) com modificações (XU; BRENNAN, 2011). Após indução e manutenção da anestesia com isoflurano, foi realizada a antisepsia com solução de iodopovidona 10% (PVPI), após, a pata direita do animal foi posicionada em um campo cirúrgico, e em seguida, realizada uma incisão de 5 mm com uma lâmina número 11 através da pele e subcutâneo do animal, se estendendo por 2 mm da borda proximal da pata direita, até próximo às falanges. O músculo flexor digital brevis foi elevado com auxílio de uma pinça curva e traumatizado em sua extensão através de uma incisão longitudinal de 2 mm, deixando ambas origem e inserção musculares intactas. A pele foi aposicionada com uma sutura única em ponto isolado simples, a fim de conferir melhor coaptação das bordas com fio nylon 6.0, não absorvível e monofilamentar. Os animais falso-operados (*Sham*) foram submetidos apenas ao procedimento anestésico, assepsia e posicionamento cirúrgico.

Figura 2 - Modelo de dor pós-operatória por incisão plantar em camundongo, onde o painel A demonstra posicionamento no campo cirúrgico, B, a delimitação e marcação do local operado, C a incisão longitudinal através da pele e subcutâneo, D, elevação do músculo flexor digital, painel E, diérese do músculo e em F, sutura de aposição da pele incisada, que por nós foi realizada através de um único ponto.



Fonte: imagem adaptada de COWIE e STUCKY, 2019.

4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO E EDEMA

A introdução de medidas comportamentais que utilizam não somente a resposta reflexa (retirada da pata) como parâmetro de dor na investigação de novos fármacos analgésicos é uma alternativa para o refinamento das técnicas, a fim de minimizar resultados falso positivos (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017). Para os testes de nocicepção espontânea, hiperalgesia mecânica e respostas afetivas motivacionais (RAM, derivado do inglês *affective motivational behaviour*), os animais foram acomodados individualmente em caixas transparentes (7 x 9 x 11 cm) elevados que permitem acesso a superfície ventral e das patas do animal. Antes dos procedimentos serem realizados os animais são ambientados na sala teste, permaneceram por aproximadamente uma hora para para fins de acomodação comportamental.

4.3.1 Avaliação da nocicepção espontânea

O teste de nocicepção espontânea foi realizado através do comportamento de guarda (do inglês, *guarding behaviour*), que avalia o comportamento do animal em relação à pata operada em um determinado período de tempo e foi realizado durante todo decurso temporal dos experimentos. Este teste antecedeu o teste de von Frey que é descrito a seguir. Para a avaliação da nocicepção espontânea, os animais foram avaliados durante 30 minutos, esta, se inicia logo após colocar o animal na plataforma, e consiste na observação da reação do animal com a pata operada, as observações são divididas em pontuações a cada 5 minutos (em um total de 6 medidas), sendo: 0 – pata normal, 1 – pata de lado, 2 – pata erguida, 3 – lambe, chacoalhar ou morder a pata, sendo 3 o escore máximo, conforme demonstrado anteriormente (XU; BRENNAN, 2009). Esse teste foi realizado com o intuito de aumentar a validade de face do modelo através da avaliação da dor espontânea (não provocada) em relação à incisão cirúrgica (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017).

4.3.2 Teste de *von Frey* para detecção dos limiares de retirada e das respostas afetivas-motivacionais (RAM)

Para o teste de von Frey, foi detectado o limiar de resposta de retirada e avaliadas as RAM. Após a aplicação de estímulo mecânico na superfície plantar operada, o limiar 50% de retirada da pata frente a este estímulo foi avaliado utilizando os filamentos de von Frey (0,008 - 4 g), usando o método *up-and-down* de Dixon (1965), de acordo com Chaplan et al., (1994). Este teste consistiu em 6 aplicações, iniciando com o filamento de 0,4 gramas, o qual é capaz de evocar a resposta de retirada em 50% dos animais testados. A ausência da resposta (estímulo de retirada) para um filamento determina a utilização de um filamento com maior gramatura, e em caso de resposta positiva, o próximo filamento é de gramatura menor. Finalizadas as 6 aplicações, o conjunto de respostas foi utilizado para o cálculo do limiar 50% de resposta. A hiperalgesia mecânica foi caracterizada como uma redução significativa dos limiares após a cirurgia, comparado aos limiares basais (antes da cirurgia).

Os limiares de retirada no teste de von Frey foram considerados como desfecho primário em nosso estudo. As medidas foram realizadas antes da indução do modelo de dor pós-operatória e este valor foi considerado como medida basal, e após a indução do modelo para verificar a presença da hiperalgesia mecânica, uma hora (1 hora - fase aguda de indução), um e dois dias (1 e 2 dias - fase aguda de manutenção), três, quatro, sete, quatorze, 21 e 28 dias (3-28 dias – fase persistente) após cirurgia. Além disso, estas medidas foram realizadas antes e após os tratamentos farmacológicos para verificar o possível efeito anti-hiperalgésico. Todos os animais passaram por esta avaliação tanto em animais selvagens quanto em nocautes.

A avaliação do RAM, o componente afetivo motivacional relacionado à nocicepção, foi realizado imediatamente após a aplicação de cada filamento de von Frey que obteve resposta de retirada positiva, de acordo com a posição da pata do animal por um período de 1 minuto. Durante o período de observação, foram atribuídos escores, 0: pata do animal toca completamente a superfície da plataforma; escore 1: superfície plantar do animal toca a superfície da plataforma parcialmente ou com a porção lateral da pata; escore 2: elevação da pata, o animal não toca a superfície da plataforma com a pata; escore 3: o animal chacoalha, lambe ou morde a pata (XU; BRENNAN, 2011; CORDER et al., 2019).

4.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA

A mensuração da espessura da pata operada foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital (Western Pro®, resolução: 0.1mm/0.01; exatidão: 0.3mm/0.01) nos diferentes tempos observados. Esta medida foi utilizada como indicativo do desenvolvimento de edema local após a cirurgia nos animais nocautes e também após a administração dos tratamentos. Para a expressão gráfica dos valores obtidos, estes, foram subtraídos dos valores basais, obtidos 24 h antes da indução do modelo, e foram expressos como Δ da espessura da pata (mm) (FEHRENBACHER; VASKO; DUARTE, 2012; NAIDU et al., 2010).

4.5 DETECÇÃO DOS EFEITOS ADVERSOS

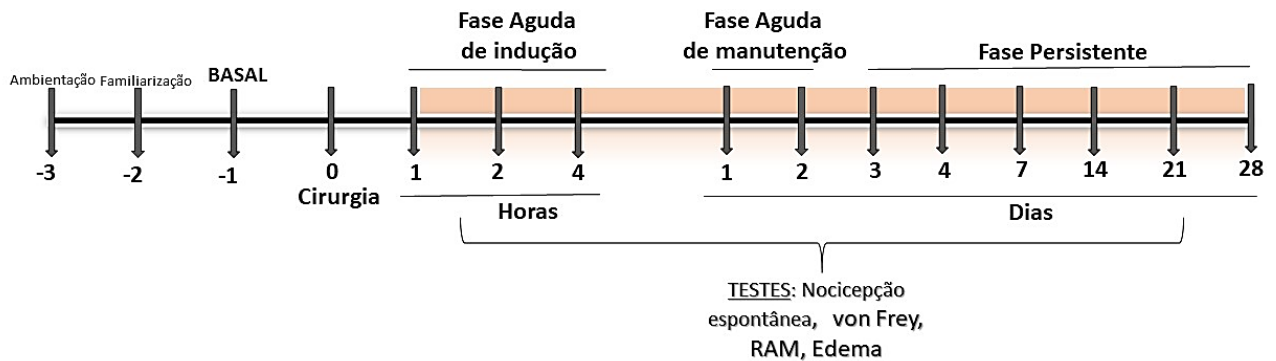
Os efeitos adversos relacionados ao tratamento com as drogas testadas foram avaliados pela observação de sangramento e comportamentos sensoriais e motores anormais. A função motora-sensorial foi avaliada por reflexo de pisar (do inglês, *stepping* - elevação da pata causada pelo contato do dorso da pata operada na borda da mesa) (TERASHIMA et al., 2013), pelo reflexo de retirada ao pinçamento da pata ipsilateral, o pelo teste de agarrar (do inglês, *grasping test*) no qual o animal é colocado em uma grade que é imediatamente rotacionada para verificação da capacidade de permanecer agarrado à mesma (ATTAL et al., 1990). A fim de verificar a possível interferência dos tratamentos em parâmetros cicatriciais e na intensidade de sangramento do local operado no momento da cirurgia e em 1, 2 e 24 horas após, essa avaliação ocorreu de maneira qualitativa através dos seguintes escores - 0: ausência de sangramento, 1: sangramento leve, 2: sangramento moderado e 3: sangramento intenso. A hiperemia foi avaliada na mesma maneira, nos tempos de 2 e 24 horas após o tratamento (DE TOLEDO-PIZA; MARIA, 2014; GUPTA; KUMAR, 2015).

4.6 FERRAMENTAS FARMACOLÓGICAS E DESENHOS EXPERIMENTAIS

4.6.1 Avaliação da nocicepção e edema pós-operatórios em animais machos e fêmeas selvagens ou nocautes para os receptores TLR2 e TLR4.

Para a determinação do decurso temporal e caracterização da nocicepção pós-operatória, o modelo foi induzido em animais C57BL/6 e TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} em machos e fêmeas para verificação do dimorfismo sexual. Após a indução do modelo, os animais foram avaliados ao longo do tempo até o retorno ao limiar normal em 28 dias foram caracterizadas em diferentes fases da nocicepção conforme desenho experimental explicitado na figura 3.

Figura 3 – Desenho Experimental I: Avaliação do decurso temporal para caracterização do edema e da nocicepção pós-operatória em animais selvagens e investigação dos efeitos anti-nociceptivos e antidematogênicos da deleção gênica do TLR2 ou do TLR4 em comparação com C57BL/6 em machos e fêmeas no laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX).



Fonte: elaborada pelo autor.

4.6.3 Efeito do antagonista TLR2 e combinação com anestésico local

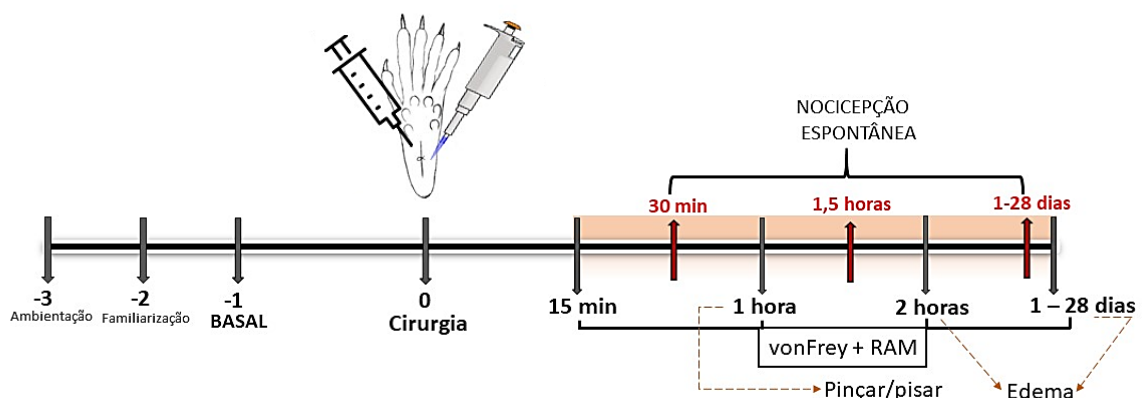
Para avaliação do envolvimento do TLR2 na dor pós cirúrgica, como ferramenta farmacológica, foi utilizado um antagonista seletivo para TLR2, além do seu veículo (PBS - solução tampão fosfato), conforme desenho experimental apresentado na figura 4.

O antagonista seletivo de TLR2, ortho-o-vanillina foi obtido da Sigma Aldrich®, o qual foi capaz de suprimir a atividade TLR2 seletivamente (MISTRY et al., 2015). Esse antagonista foi utilizado a fim de demonstrar os efeitos do bloqueio farmacológico desse receptor na diminuição de parâmetros nociceptivos, proprioceptivos e edematogênicos descritos previamente. Como controle positivo foi utilizado o anestésico local bupivacaína (Tradinol®, cloridrato de bupivacaína 0,5%, sem vasoconstritor). Um grupo separado de

animais também recebeu a associação da ortho-o-vanillina com bupivacaína, a fim de observar uma melhora nos efeitos anti-nociceptivos desejáveis e uma redução os efeitos adversos indesejáveis. As soluções utilizadas nos testes foram preparadas imediatamente antes da realização dos experimentos.

Quanto a via de administração, o efeito farmacológico dessas drogas foi caracterizado através de administração local, subcutânea na pata do animal no momento pré (10 uL) e transoperatório (5 uL), como descrito em KUMAR et al. (2019). A fim de observar a ocorrência de dimorfismo sexual nos efeitos anti-nociceptivos, antiinflamatórios e adversos, os tratamentos foram administrados em machos e fêmeas. O teste de nocicepção espontânea foi realizado nos tempos de 1,5 horas e 24 horas após a cirurgia. A detecção dos limiares de retirada e RAMs foram realizados em 0,25 (15 minutos), 1, 2, 4 e 24 horas após a incisão. O edema e os efeitos adversos foram realizados em 2 e 24 horas e após os demais testes (Figura 4).

Figura 4 – Desenho experimental II – investigação do efeito do bloqueio farmacológico de TLR2 com o antagonista ortho-o-vanillina, bupivacaína e associação de ambas em machos e fêmeas, no modelo de incisão na pata, através de administração local (pré e trans-operatório) de 15 uL. O tempo de avaliação inicia 15 minutos após a cirurgia, e persiste até 24 horas (imagem elaborada pelo autor).



Fonte: elaborado pelo autor

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi calculado baseando-se no desfecho primário, a sensibilidade mecânica verificada com filamentos de von Frey. O tamanho da amostra foi então definido conforme descrito anteriormente (ARMITAGE e BERRY, 1987), onde a amostra para um experimento com nível de significância de 5%, poder de teste 90%, sendo o teste de hipótese bicaudal, foi estimada considerando-se o desvio padrão (que foi baseado em dados prévios obtidos em estudo-piloto), e a diferença é detectada entre as médias dos grupos (pelo menos 30 %). Deste modo, partindo de resultados obtidos em estudo-pilotos conduzidos em nosso laboratório revelaram, para o desfecho primário em questão, um desvio padrão médio de 0,5, e uma diferença a ser detectada entre os grupos de 0,6 gramas (pelo menos 30%). Diante desses dados e considerando o nível de significância e poder de teste acima descritos, estima-se o tamanho da amostra como 8 animais, afim de garantir a validade dos experimentos, dentro de um risco aceitável de não estar observando diferenças onde elas poderão existir, nem tão pouco estar observando diferenças onde elas não poderão existir.

ANOVA de duas vias foi utilizada para comparação de múltiplas variáveis (tratamento ou genótipo) em vários tempos (medida repetida), seguida do teste de Dunnet quando os dados apresentavam distribuição normal e homogeneidade de variâncias entre os grupos. Os valores de limiar de retirada foram transformados em logaritmo (log) para atingir as premissas da ANOVA. O teste de Chi-quadrado foi utilizado para dados não paramétricos (efeitos adversos). O Software GraphPad Prism 7 (graphPad, USA) foi utilizado para a realização dessas análises. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de “p” foram menores que 0,05 ($p < 0,05$). O teste de Grubbs foi utilizado para detecção de outliers para o desfecho primário. Uma vez detectados outliers para o teste de von Frey, os dados foram retirados das análises incluindo os demais parâmetros. O teste de correlação de Pearson foi utilizado para avaliar a existência de correlação entre as variáveis observadas, neste, todos os dados foram tratados como possuindo distribuição normal e homogeneidade de variâncias.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA EM ANIMAIS C57BL/6 MACHOS E FÊMEAS

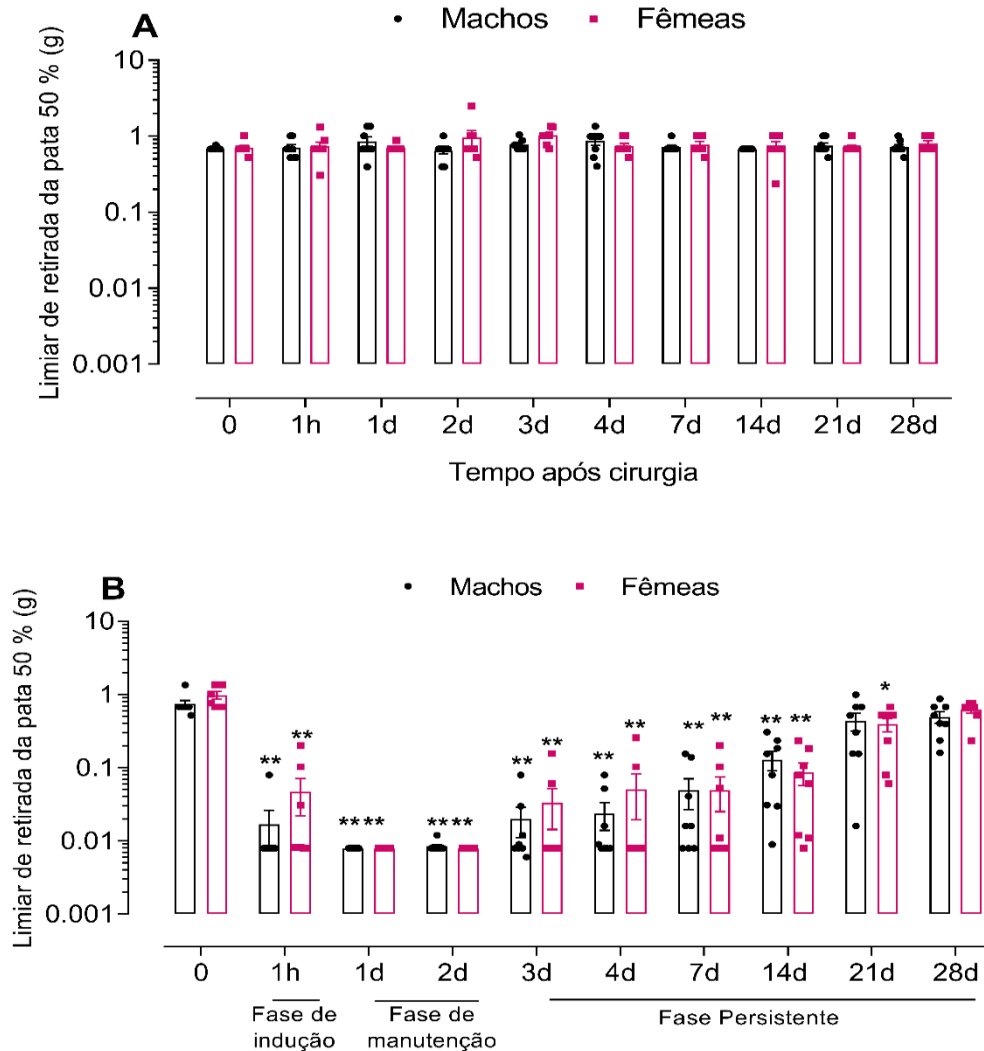
5.1.1 Modelo de dor pós-operatória produz hiperalgesia mecânica persistente, que pode ser determinada por 3 fases distintas

Inicialmente, detectamos os limiares de retirada em animais falso-operados. Observamos que não ocorreu alterações nos limiares de retirada de pata após a falsa cirurgia quando comparados aos valores basais, assim como não foi verificada diferença de limiares entre machos e fêmeas antes ou após a falsa cirurgia (figura 5, painel A).

Comparado aos valores basais, foi possível observar que a cirurgia realizada nos animais produziu hiperalgesia mecânica persistente até 14-21 dias, apresentada pela diminuição do limiar de retirada da pata 50% (g) tanto em machos quanto em fêmeas (figura 5 painel B), o que não ocorreu nos animais falso-operados (figura 5 painel A). Esta hiperalgesia ocorreu já na primeira hora após a cirurgia (fase aguda de indução), teve pico nos dias 1 e 2 (fase aguda de manutenção) e se manteve significativa por 2-3 semanas (fase persistente) até retornar ao valor basal. A hiperalgesia foi mais duradoura em fêmeas em comparação aos machos (21 vs. 14 dias). No entanto, a intensidade de hiperalgesia nas fases aguda ou persistente foi semelhante entre os sexos ($F(9, 63) = 0,5141$; $p=0,85$). Porém, salientamos que nos dias 1 e 2 os limiares caíram aos menores valores detectáveis pelo nosso método (efeito chão), o que poderia ter mascarado diferenças.

Figura 5 – Decurso temporal da hiperalgesia pós-operatória em animais machos e fêmeas demonstrada pela queda no limiar de retirada da pata 50% (g) pelo teste de von Frey em animais falso-operados (painel A) e em animais operados (painel B) ao longo do decurso temporal até o retorno ao limiar basal. Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N = 8$ /grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (*) – Representa

diferença significativa ($p < 0,05$); (**) – Representa diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado aos valores de medidas basais de cada respectivo sexo.



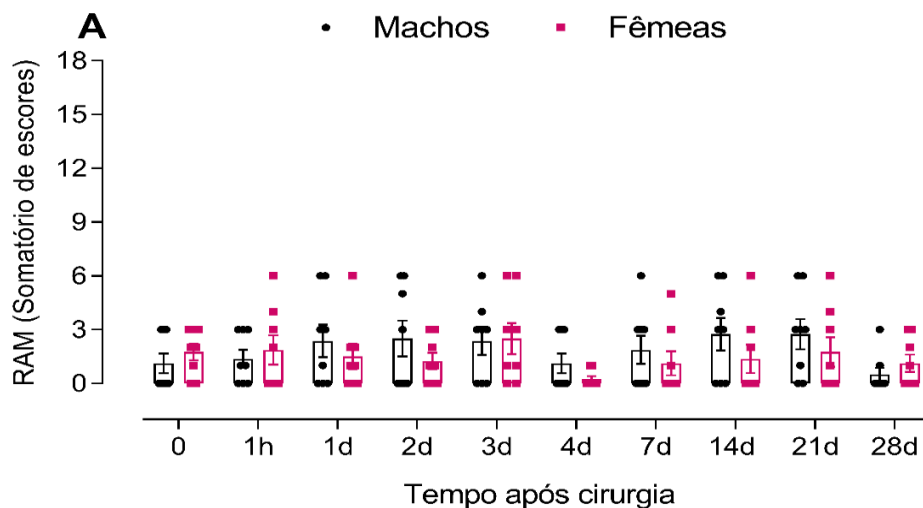
Fonte: elaborado pelo autor

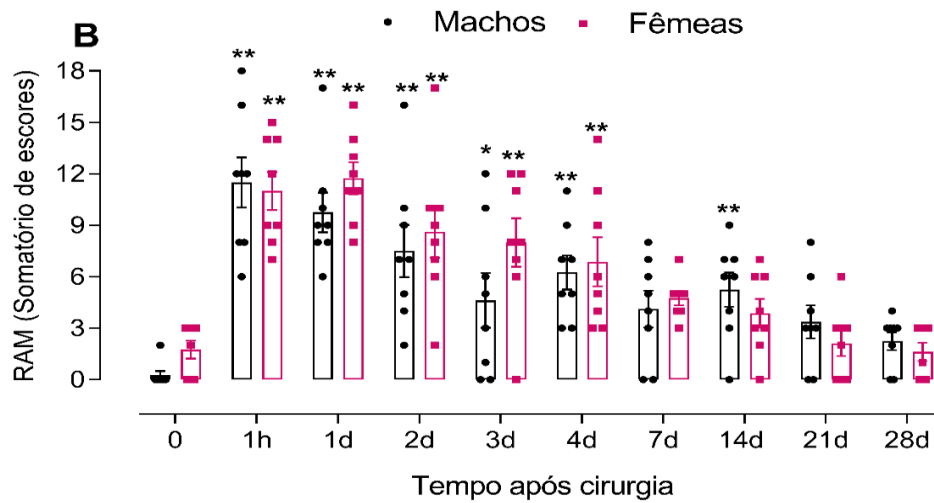
5.1.2 modelo de dor pós-operatória também induz respostas afetivos-motivacionais (RAM) persistentes

Com relação as respostas afetivas-motivacionais evocada após cada resposta positiva aos filamentos do teste de von Frey (figura 6, painéis A e B), podemos observar que nos animais falso-operados não foram observadas alterações de 1 hora a 28 dias após procedimento, em relação aos valores basais ou em relação ao sexo. Os animais que passaram por procedimento

cirúrgico, apresentaram um aumento das RAM em comparação com os valores basais, com maior intensidade em 1 hora e 1 dia pós-cirurgia, se mantendo significativa até 4 dias após a cirurgia. Estas respostas, de modo geral, não foram diferentes entre machos e fêmeas entre 1 hora e 4 dias após a cirurgia. Como exceção, verificamos que machos apresentaram aumento de RAMs 14 dias após a cirurgia, provavelmente devida aos valores baixos de RAMs basais nestes blocos de experimentos.

Figura 6 – Decurso temporal das respostas afetivo-motivacionais (RAM) evocadas após cirurgia em animais machos e fêmeas demonstrada pelo somatório dos escores de respostas positivas após teste de von Frey em animais falso-operados (painel A) e em animais operados (painel B) ao longo do decurso temporal até o retorno ao limiar basal. Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N = 8/\text{grupo}$) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparado aos valores de medidas basais. O teste de Grubbs detectou como *outlier* 1 macho operado do último bloco experimental operado, que foi retirado da análise.





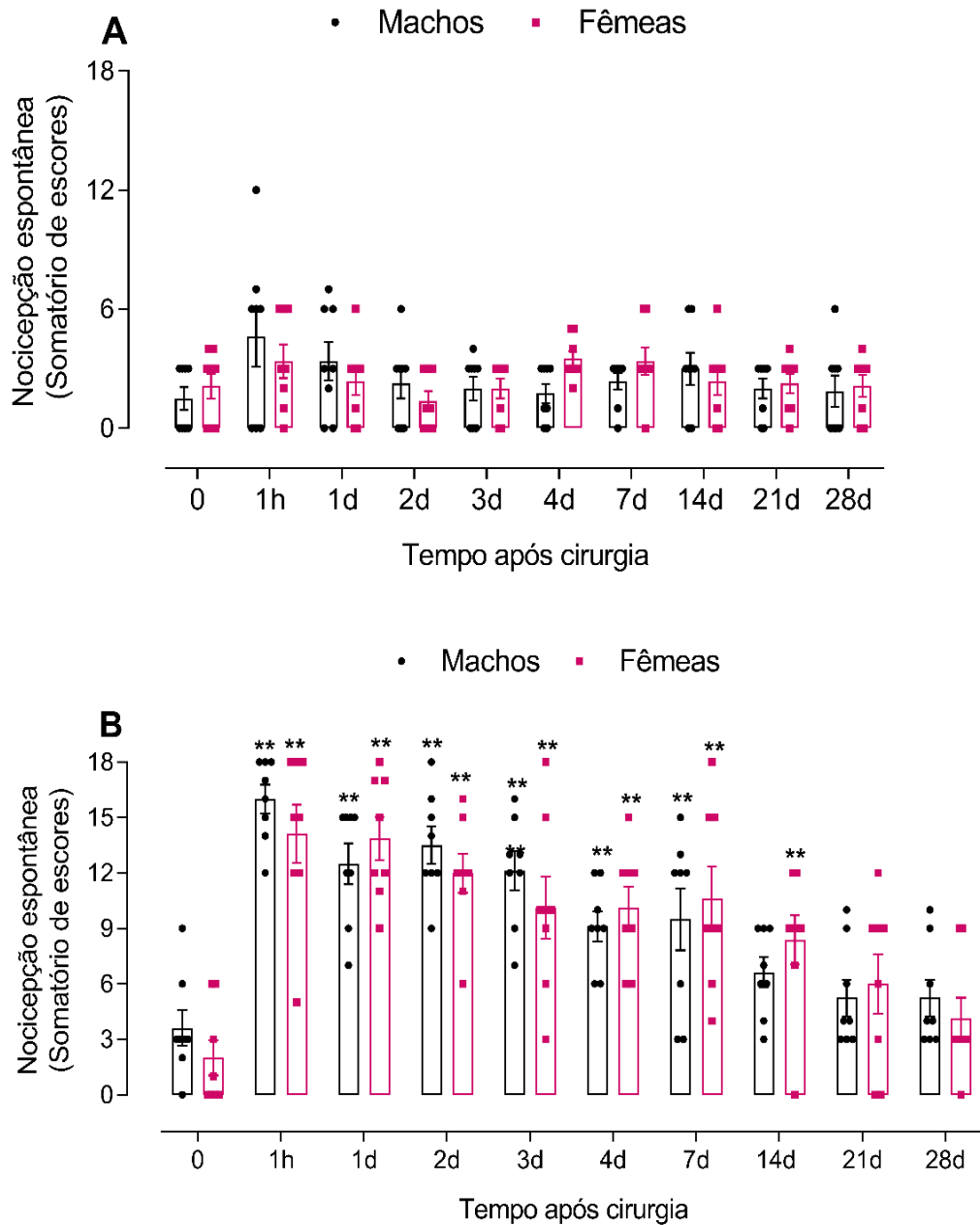
Fonte: elaborado pelo autor

5.1.3 – Modelo de dor pós-operatória também induz nocicepção espontânea persistente

A nocicepção espontânea após a cirurgia foi determinada pela observação dos animais durante 6 medidas ao longo de 30 minutos de observação, na qual os escores foram obtidos e caracterizados conforme disposto na figura 7, painéis A e B. A falsa-cirurgia não causou aumento dos escores em relação aos valores basais, tanto em machos quanto em fêmeas (figura 7, painel A).

Nos animais submetidos a cirurgia, ocorreu aumento nos escores de nocicepção espontânea, com pico na primeira hora e se mantendo significativo pelo menos até 7 dias após a cirurgia em machos e fêmeas (figura 7, painel B). A intensidade da nocicepção espontânea não foi diferente entre sexos até o 7º dia. Por outro lado, verificamos que a nocicepção espontânea foi mais duradoura em fêmeas, sendo observada até 14 dias após a cirurgia.

Figura 7 – Decurso temporal do comportamento de nocicepção espontânea ao longo do tempo após cirurgia em animais machos e fêmeas demonstrada em animais sham (painel A) e em animais operados (painel B) ao longo do decurso temporal até o retorno ao limiar basal. Escores em somatório de resposta. Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N = 8$ /grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais.



Fonte: elaborado pelo autor

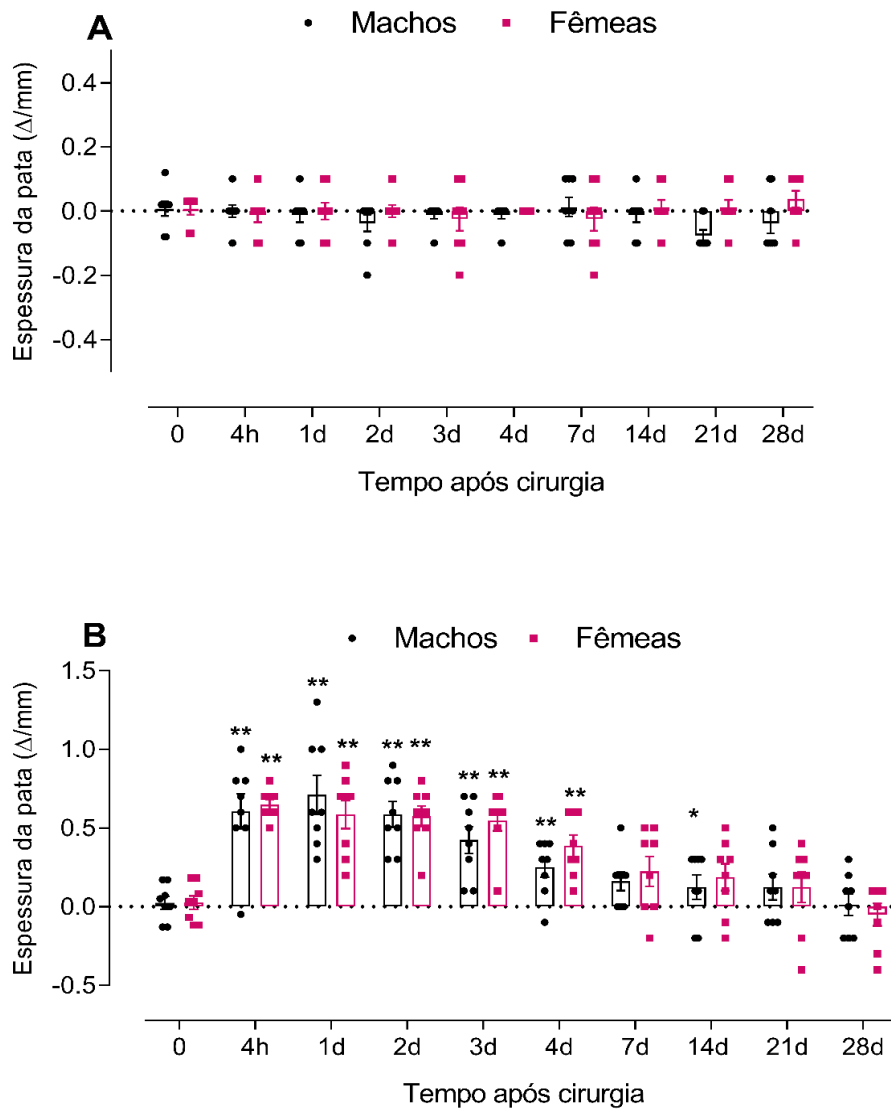
5.1.4 – Caracterização do edema em animais C57BL/6 machos e fêmeas no modelo de dor pós-operatória.

Não foram observadas alterações na espessura da pata (Δ /mm) até 28 dias após o procedimento de falsa cirurgia comparado aos valores basais (figura 8, painel A). Também não foram detectados diferenças entre os sexos pelos testes realizados, no entanto, uma análise de

correlação de pearson demonstrou que o edema em machos, está correlacionado com a nocicepção espontânea ($p=0,0002$) e com as respostas afetivo-motivacionais ($p=0,0007$), essa correlação se perde quando em períodos agudos (até 2 dias), mas apresenta correlação positiva com a nocicepção espontânea na fase persistente ($p<0,01$). Para as fêmeas, o edema está correlacionado com a nocicepção espontânea e respostas afetivo-motivacionais, em períodos agudos ($p=0,0068$ e $p=0,0356$, respectivamente) e também persistentes ($p=0,0435$ e $p=0,0014$, respectivamente).

Na figura 8, painel B, podemos observar o potencial edematogênico ocasionado pela cirurgia em camundongos, que teve pico nos primeiros dias após a lesão e durou pelo menos até 4 dias em machos e fêmeas. Como ocorreu na nocicepção espontânea, o edema em fêmeas foi mais duradouro que em machos, sendo observado até 7 dias após a cirurgia.

Figura 8 – Caracterização do efeito edematogênico ocasionado pela cirurgia ao longo do tempo em animais machos e fêmeas C57BL/6, demonstrada em animais falso-operados (painel A) e em animais operados (painel B). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N=8$ /grupo) e em (Δ /mm) da pata direita, esse experimento consistiu em 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (*) – Representa diferença significativa ($p<0,05$); (**) – Representa diferença significativa ($p<0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais.



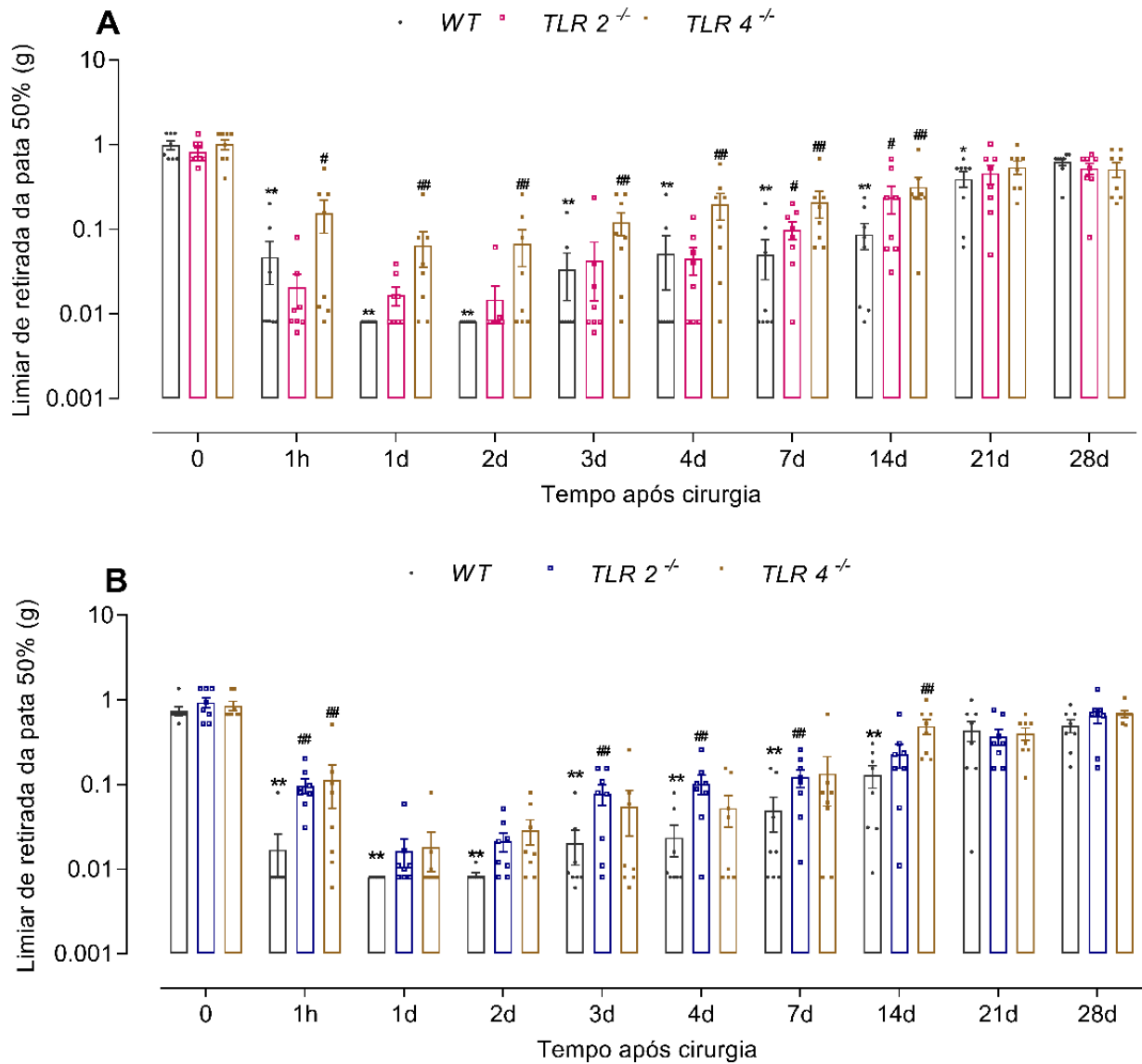
5.2 EFEITO DA DELEÇÃO GÊNICA DO TLR2 NAS DIFERENTES FASES DA NOCICEPÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

5.2.1 Deleção gênica do TLR2 reduz hiperalgesia pós-operatória com dimorfismo sexual em diferentes fases da hiperalgesia

Nas fêmeas nocautes para o TLR2 podemos observar que a hiperalgesia nas fase de indução e manutenção foram semelhantes aos animais selvagens (figura 9, painel A). Por outro lado, verificamos uma redução parcial da hiperalgesia na fase persistente em fêmeas nocautes TLR2, com retorno ao limiar basal acelerado em comparação aos selvagens, sendo significativamente menor em relação aos selvagens em 7 e 14 dias. Para fêmeas do TLR4, pode ser observado uma prevenção parcial da hiperalgesia já na primeira hora, que se estendeu durante todas as fases da hiperalgesia (figura 9, painel A).

Para os machos, quando comparados com os animais selvagens e com os valores basais, podemos observar que a deleção gênica do TLR2 promoveu redução parcial na resposta hiperalgésica nas fases de indução e de recuperação (3 a 7 dias), mas não na fase de manutenção da hiperalgesia pós-operatória (figura 9, painel B). De maneira semelhante, não houve alteração da fase de manutenção da hiperalgesia em machos com deleção do TLR4, mas ocorreu prevenção parcial na fase de indução e aceleração da recuperação em 14 dias (figura 9, painel B).

Figura 9 - Participação do TLR2 na hiperalgesia pós-operatória no modelo de nocicepção envolvendo diérese de pele e músculo em animais selvagens (WT) em comparação com animais com deleção gênica para TLR2 e TLR4 em fêmeas (A) e machos (B) obtidos pelo teste de hiperalgesia mecânica de von Frey comparando os efeitos das deleções gênicas com os animais WT ao longo do decurso temporal até o retorno ao limiar basal. Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 8$ /grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p<0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($p<0,05$) e (##) representa diferença significativa ($p<0,001$) quando comparado o grupo selvagem. O teste de Grubbs foi utilizado para a detecção de *outliers*, ao todo foram retirados um animal macho WT do bloco 2 e duas fêmeas TLR2^{-/-}, uma do bloco 1 e uma do bloco 2 os quais não foram incluídos em nenhuma análise.



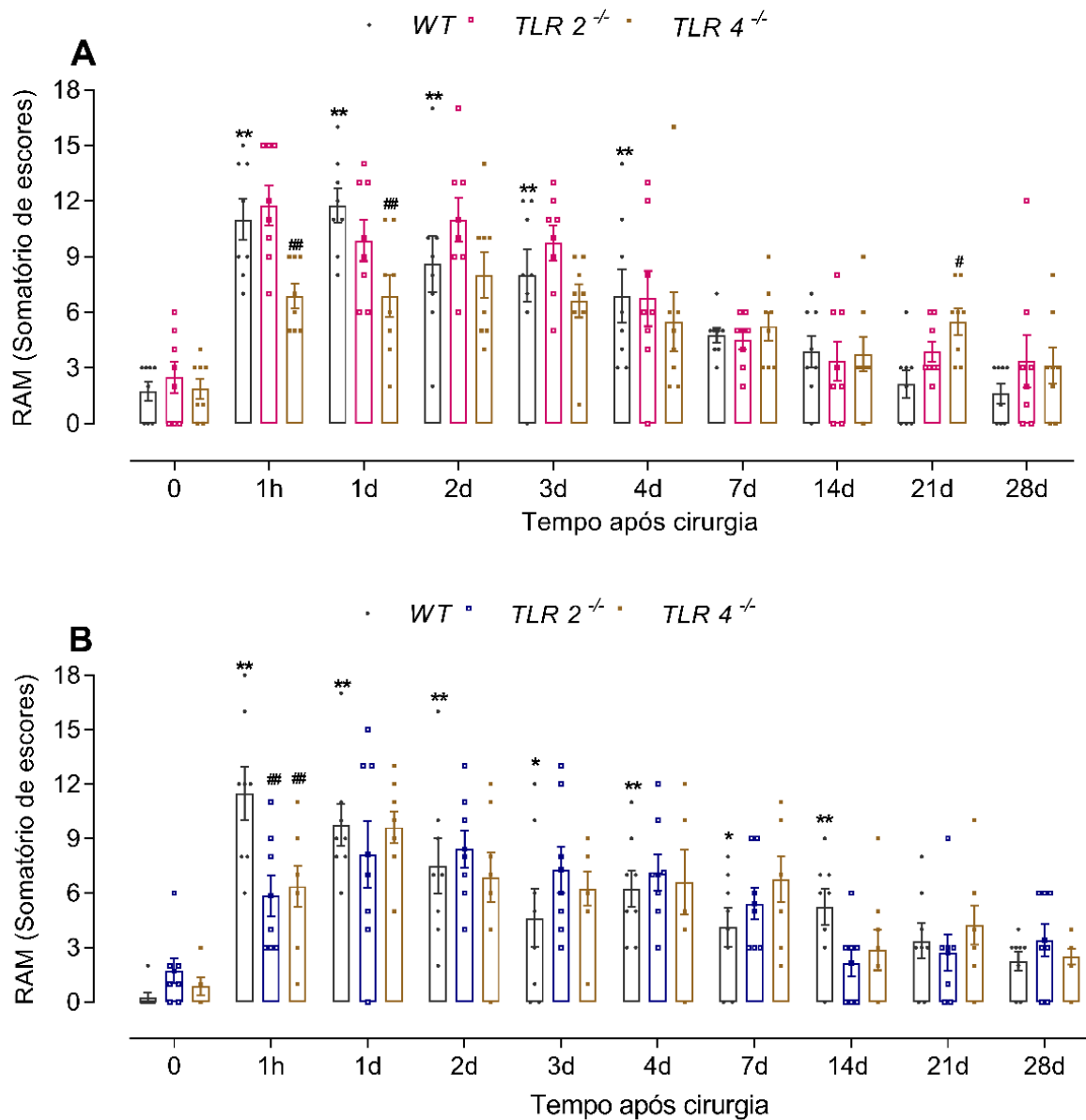
Fonte: elaborado pelo autor

5.2.2 Redução das respostas afetivo-motivacionais (RAMs) pela deleção gênica TLR2 ocorre transitoriamente somente em machos

Animais TLR2^{-/-} fêmeas não apresentaram redução nas RAMs em nenhuma das fases de nocicepção, em relação às fêmeas selvagens (figura 10, painel A). Já fêmeas nocautes para TLR4 tiveram redução das RAMs na fase aguda de indução e manutenção da nocicepção (1 h e 1 d após cirurgia) e aumento na fase persistente (dia 21).

Para os machos, tanto os camundongos TLR2^{-/-} quanto o TLR4^{-/-} tiveram uma redução das RAMs na fase aguda de indução (1 h), mas não nas fases de manutenção ou persistente da dor pós-operatória (figura 10, painel B).

Figura 10 - Efeito da deleção gênica do TLR2 ou TLR4 da resposta afetiva motivacional (RAM) após a aplicação dos filamentos de von Frey na pata operada em animais (WT) em comparação com animais com deleção gênica para TLR2 e TLR4 em fêmeas (A) e machos (B). Dados estão representados como média ± E.P.M. (N= 8/grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p<0.001$) quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($p<0.05$). (#) – Representa diferença significativa ($p<0,05$) quando comparado ao grupo selvagem (C57BL/6); (##) – Representa diferença significativa ($p<0,01$) quando comparado ao grupo selvagem (C57BL/6).



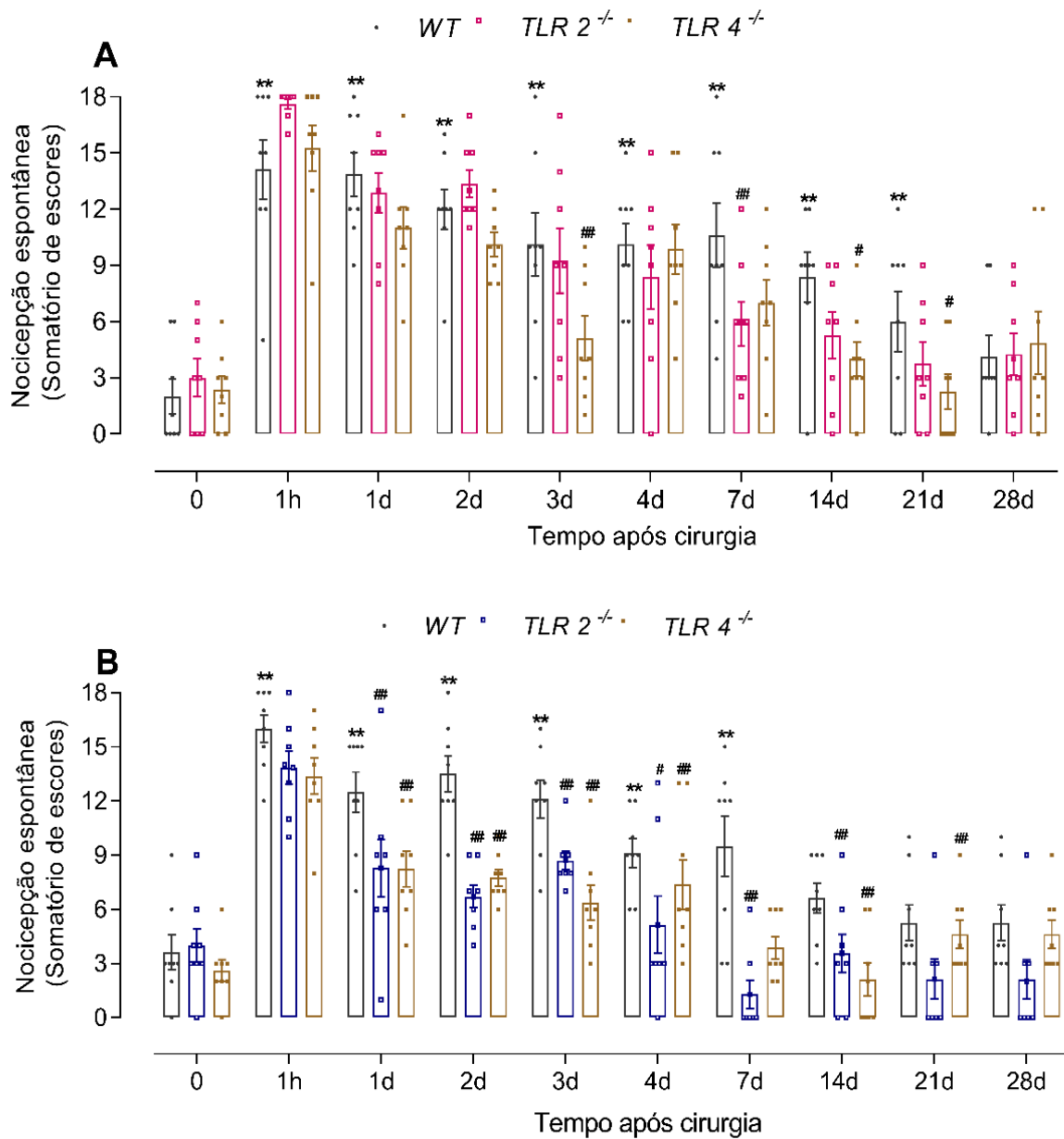
Fonte: elaborado pelo autor

5.2.3 A redução na nocicepção espontânea pós-operatória animais nocautes para TLR2 é sexualmente dimórfico e fase-dependente

As fêmeas TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} não apresentam redução na nocicepção espontânea nas fases de indução e manutenção, mas apresentaram uma redução na fase persistente (14 dias para TLR2 e 3, 14 e 21 dias para TLR4) conforme demonstrado na figura 11, painel A.

Os machos TLR2^{-/-} ou TLR4^{-/-} também não tiveram alterações na fase de indução da dor pós-operatória comparada aos animais selvagens. Estes animais nocautes tiveram uma redução eficaz e prolongada nas fases de manutenção e persistente da nocicepção pós-operatória.

Figura 11 - Efeito do TLR2 na redução da dor espontânea mensurado através da caracterização do decurso temporal da nocicepção espontânea (comportamento de guarda da pata operada) após cirurgia em animais selvagens (WT) em comparação com animais com deleção gênica para TLR2 e TLR4 em fêmeas (A) e machos (B). O teste foi realizado durante 30 minutos e os dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 8$ /grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p<0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($p<0,05$). (##) – Representa diferença significativa ($p<0,001$) quando comparado ao grupo selvagem (C57BL/6).

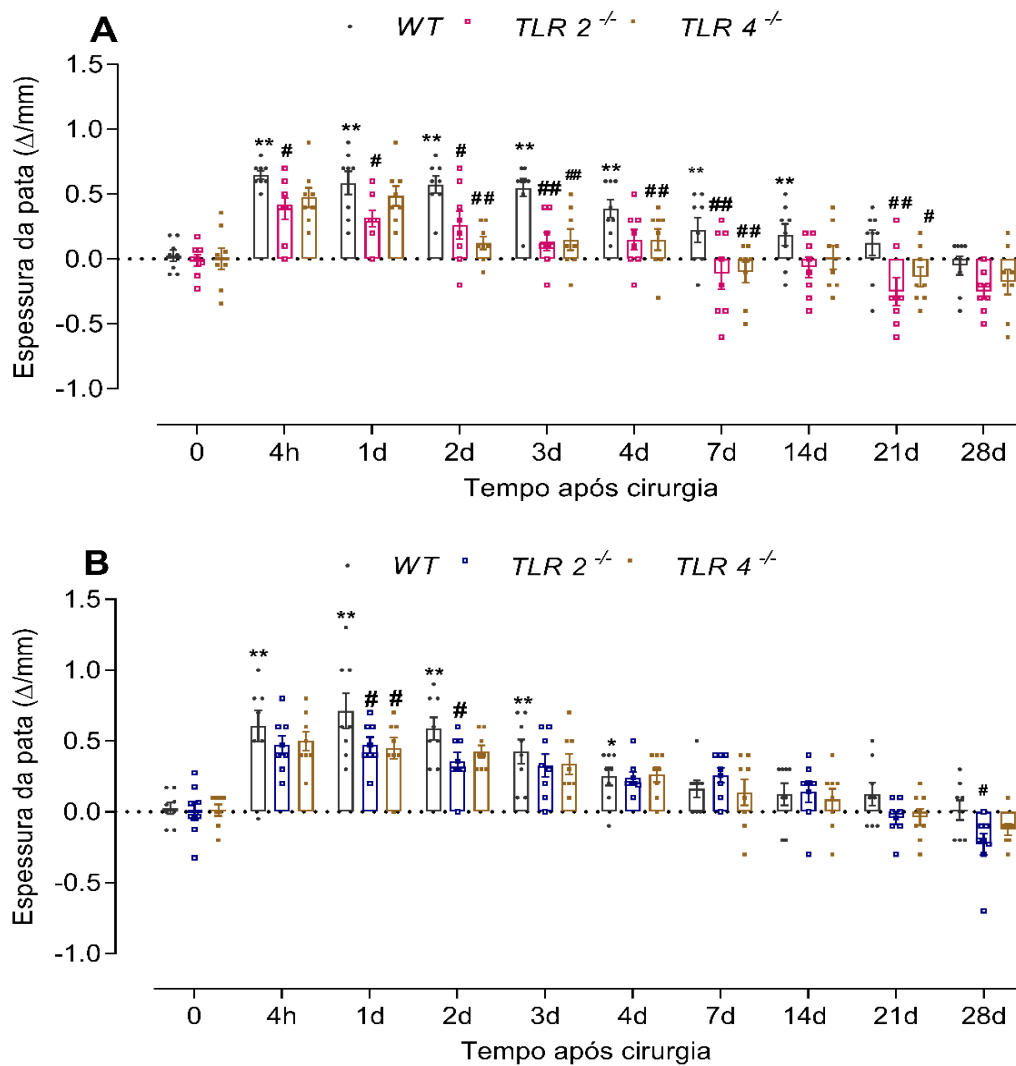


Fonte: elaborado pelo autor

5.2.4 Efeitos anti-edematogênico relacionado à deleção gênica do TLR2 também possui dimorfismo sexual

O edema da pata operada foi significativamente menor nas fêmeas TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} em todas as fases pós-cirúrgicas comparado a animais selvagens (figura 12, painel A). Nos machos, observa-se um efeito de redução do edema em animais TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} em relação aos selvagens, mas com maior relevância na fase de manutenção (1 e 2 dias após cirurgia).

Figura 12 - Papel do TLR2 no desenvolvimento do edema pós-operatório. Mensuração do edema da pata operada ao longo do decurso temporal da nocicepção após cirurgia em animais selvagens (WT) em comparação com animais com deleção gênica para TLR2 e TLR4 em fêmeas (A) e machos (B). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N= 8$ /grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p<0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($p<0,05$). (##) – Representa diferença significativa ($p<0,001$) quando comparado ao grupo WT.



Fonte: elaborado pelo autor

5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTAGONISTA TLR2 SOBRE A DOR PÓS-OPERATÓRIA

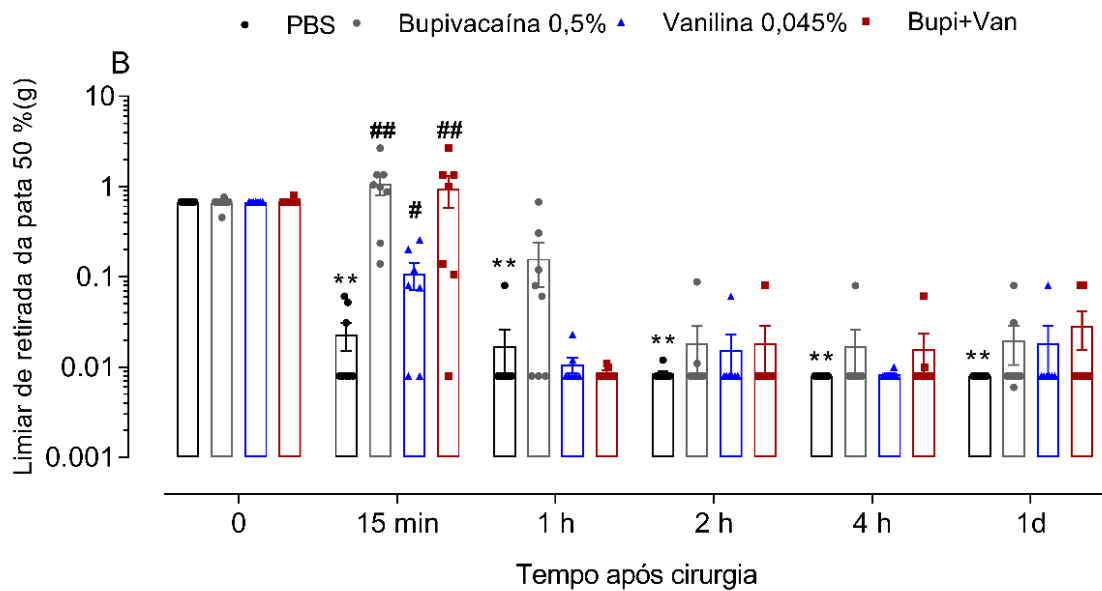
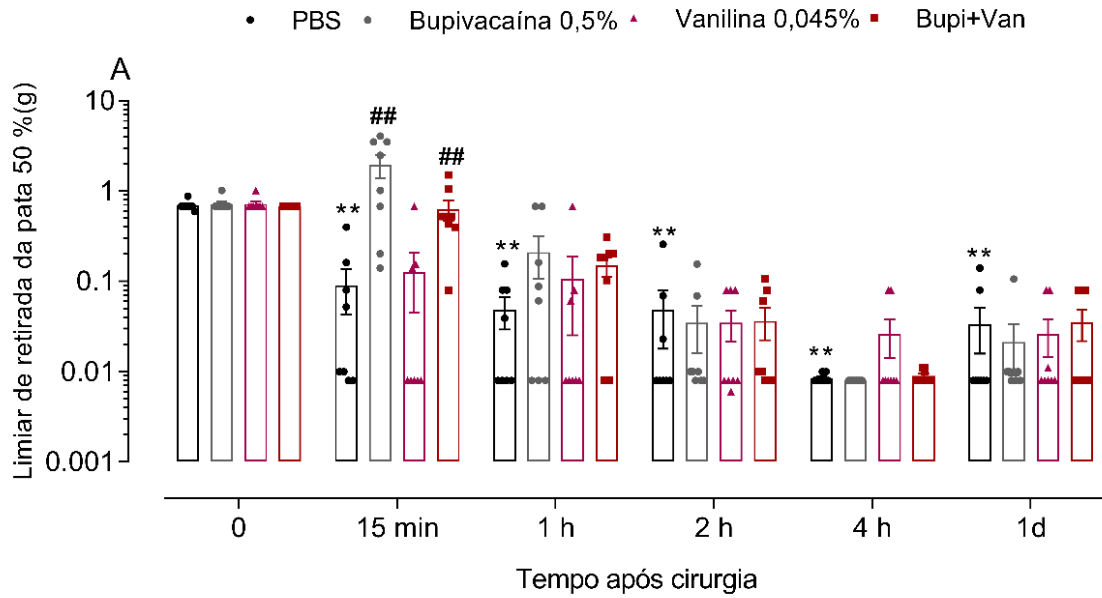
5.3.1 Efeito da administração intraplantar de o-vanillina, bupivacaína ou sua combinação na hiperalgesia pós-operatória em fêmeas e machos C57BL/6

Como os efeitos anti-nociceptivos e anti-edematogênico da deleção gênica do TLR2 foram mais pronunciados em machos, principalmente na fase de indução, verificamos o efeito da administração local (10 uL pré operatório + 5 uL transoperatório) de um anestésico local (controle positivo) e de um antagonista seletivo do TLR2 no modelo de dor pós-operatória. Foram testadas a concentração de 3 mM (ou 0,045%) para a vanilina de 17,3 mM (ou 0,5%) para bupivacaína sozinhas e em combinação.

O tratamento com a bupivacaína isoladamente preveniu a hiperalgesia pós-operatória, com um efeito de curta duração (aparecendo em 15 min, mas não 1 hora após a cirurgia) e que ocorreu tanto em machos quanto em fêmeas (figura 13). Similar ao que ocorreu em animais nocautes, o tratamento com vanilina isoladamente foi capaz de prevenir parcialmente (e por um curto tempo) a hiperalgesia somente em machos, mas não em fêmeas. A associação com o-vanilina, não alterou significativamente a eficácia ou a duração do efeito anti-hiperalgésico da bupivacaína em ambos os sexos.

Figura 13 – Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local na nocicepção pós-operatória em fêmeas demonstrada pelo limiar de retirada da pata 50% (g) pelo teste de von Frey (painel A) e em machos (painel B) ao longo de 24 horas após administração das drogas. Grupo bupi+van (0,5% + 0,0045%). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N = 8$ /grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais. (## ou #) – Representa diferença significativa ($p < 0,001$; $p < 0,01$) quando comparados aos valores dos tratados com o veículo PBS. O teste de Grubbs foi utilizado para a

detecção 1 *outlier* do grupo vanilina, que foi retirado da análise para as fêmeas, 1 do grupo vanilina e 1 do grupo bupi+van (0,5% + 0,0045%) dos machos.

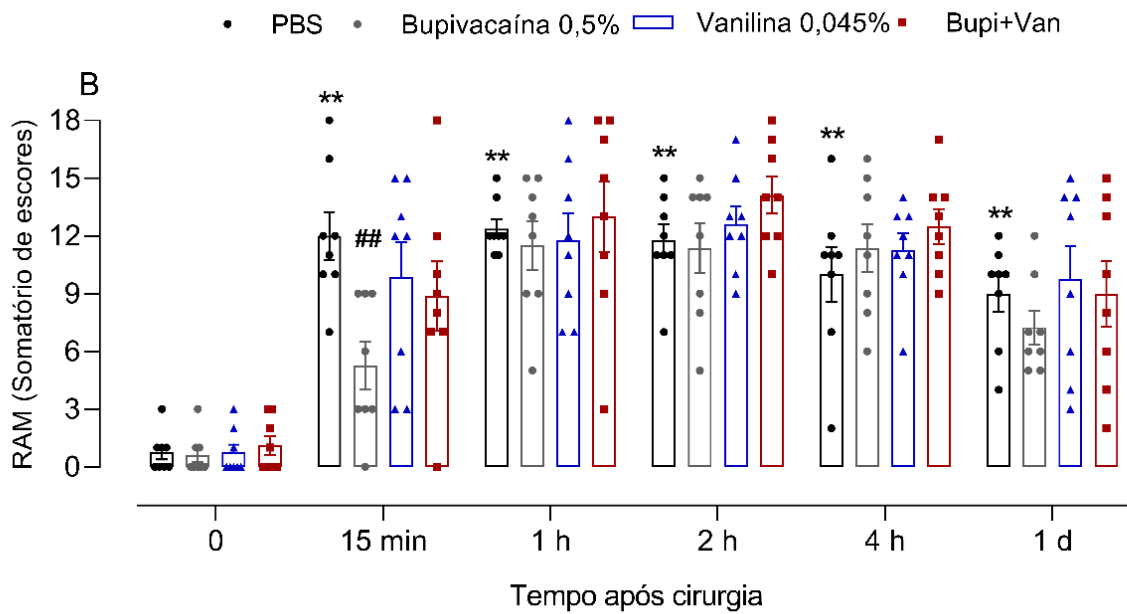
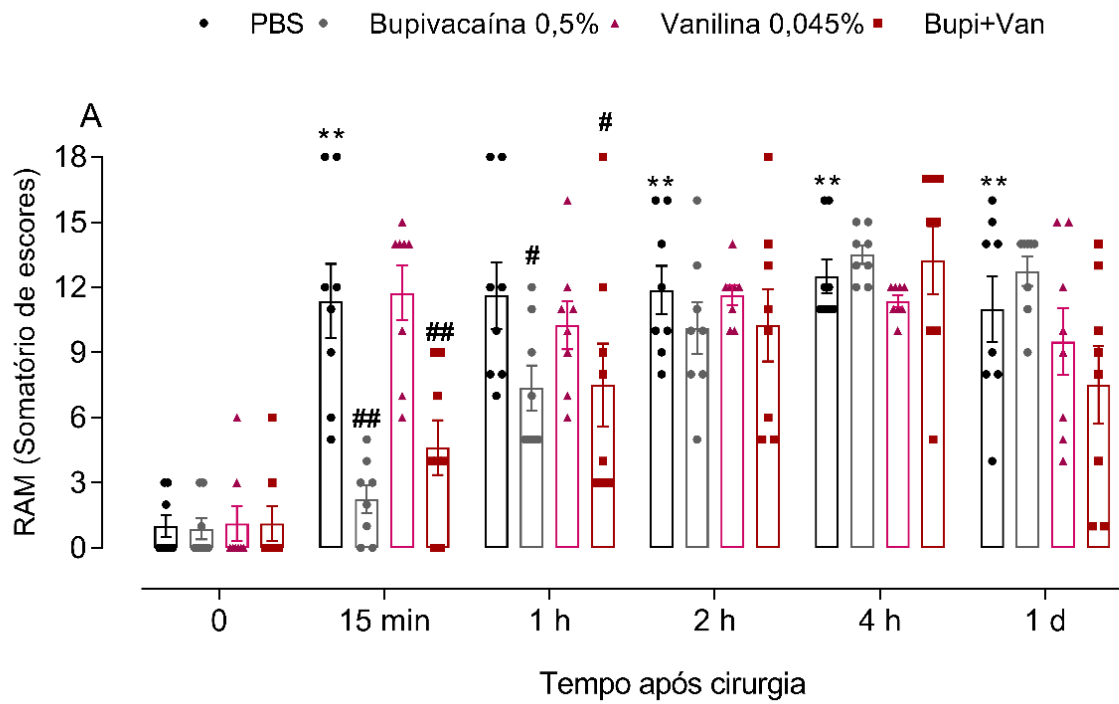


Fonte: elaborado pelo autor

5.3.2 Efeito da administração intraplantar de o-vanillina, bupivacaína ou sua combinação nas respostas afetivo-motivacionais induzidas pela cirurgia em fêmeas e machos C57BL/6

Comparada ao veículo, o tratamento com a o-vanilina isoladamente não alterou as respostas nociceptivas afetivo-motivacionais induzidas pela aplicação de filamentos de von Frey na pele próxima a incisão. Por sua vez, o tratamento com bupivacaína isoladamente preveniu estes comportamentos, com maior eficácia e duração de efeito em fêmeas quando comparadas aos machos (figura 14). A co-administração de vanilina não alterou a eficácia ou a duração do efeito antinociceptivo da bupivacaína em fêmeas, mas curiosamente preveniu o efeito em machos.

Figura 14 – Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local na nocicepção evocada pós-operatória em fêmeas demonstrada pelo somatório de RAM (painel A) e em machos (painel B) ao longo de 24 horas após administração das drogas. Grupo bupi+van (0,5% + 0,0045%). Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N = 8$ /grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes *post-hoc* de Dunnet. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais. (## e #) – Representa diferença significativa ($p < 0,001$; $p < 0,01$) quando comparados aos valores dos tratados com o veículo PBS.

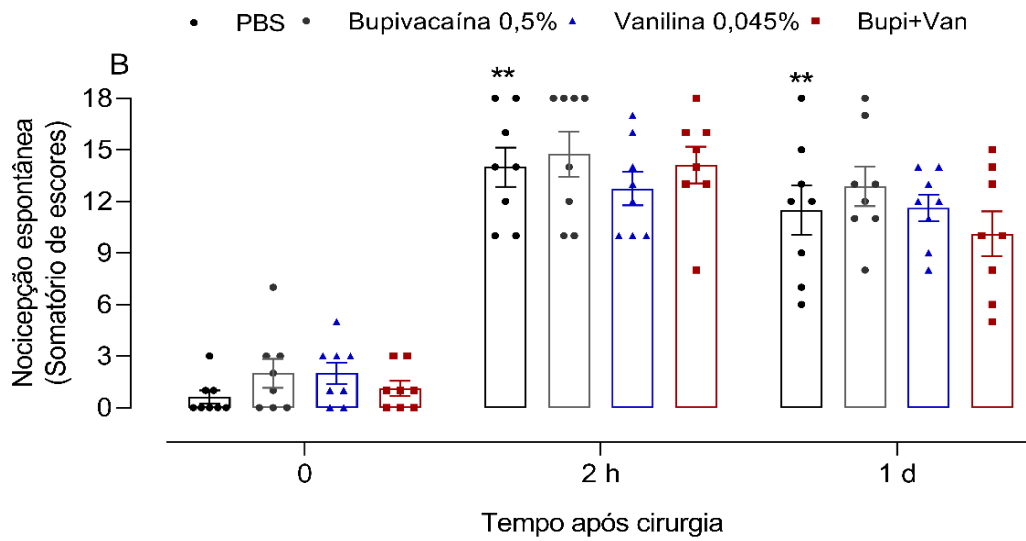
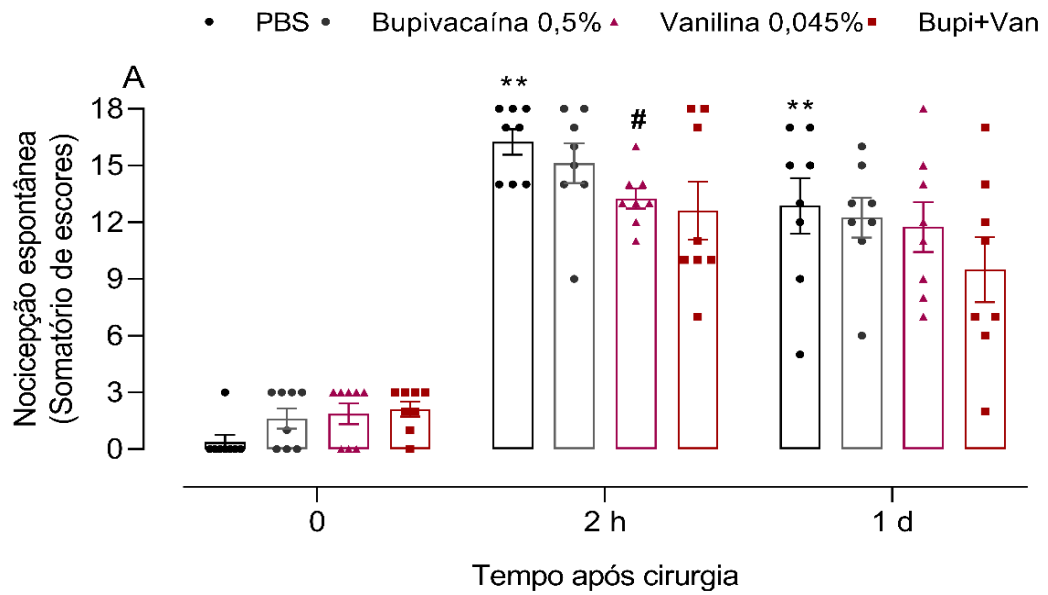


Fonte: elaborado pelo autor

5.3.3 Efeito da administração intraplantar de o-vanillina e a combinação o-vanillina+bupivacaína na nocicepção espontânea induzidas pela incisão na pata em fêmeas e machos C57BL/6

Buscando avaliar o efeito das drogas na redução da nocicepção em repouso, na figura 15 abaixo, podemos observar que o tratamento com vanilina isoladamente foi capaz de prevenir parcialmente, mas de forma significativa, a nocicepção espontânea apresentada 2 horas após a cirurgia em fêmeas, mas não em machos. Os tratamentos com bupivacaína ou bupicavacaína+vanilina não foram capazes de alterar significativamente a nocicepção em repouso em fêmeas ou machos.

Figura 15 – Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local na nocicepção espontânea em machos e fêmeas demonstrada pelo somatório de respostas ao longo de 24 horas após administração das drogas. Dados estão representados como média \pm E.P.M. ($N = 8/\text{grupo}$) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa quando comparado aos valores de medidas basais ($p < 0,001$) e (#) – Representa diferença significativa em relação ao veículo PBS ($p < 0,01$).

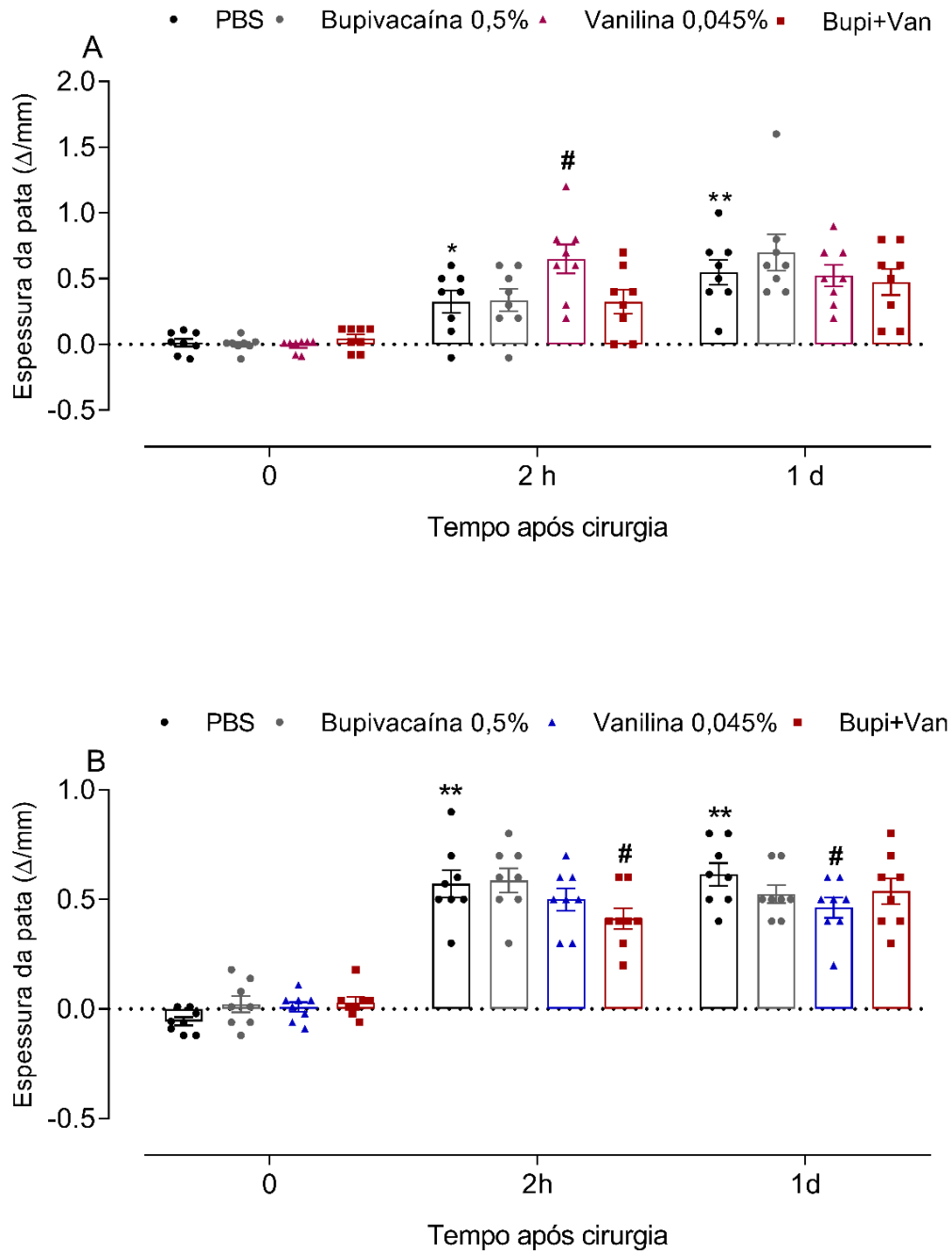


Fonte: elaborado pelo autor

5.3.4 Efeito da administração intraplantar de o-vanillina, bupivacaína ou sua combinação no edema da pata operada após a cirurgia em fêmeas e machos C57BL/6

Em fêmeas, os tratamentos não foram capazes de alterar o edema pós-operatório, com exceção de um leve aumento do edema 2 horas após cirurgia em animais tratados com vanilina isoladamente (figura 16, painel A). Em machos, os tratamentos com bupivacaína+vanilina na concentração de 0,5% + 0,045% (em 2 horas) ou somente vanilina (em 24 horas) reduziram discretamente o edema pós-operatório (figura 16, painel B).

Figura 16 - Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local no edema pós-operatório ocasionado pela incisão na pata em fêmeas (painel A) e machos (painel B) demonstrada pela mensuração em Δ /milímetros de espessura da pata ao longo de 24 horas após administração das drogas. Dados estão representados como média \pm E.P.M. (N = 8/grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais. (#) – Representa diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparados aos valores dos tratados com o veículo PBS.



5.3.5 Avaliação de efeitos adversos da administração intraplantar de o-vanilina, bupivacaína ou sua combinação

Como pode ser observado na tabela 1, nenhum tratamento utilizado em machos ou fêmeas alteraram parâmetros neurológicos/motores avaliados pelos comportamentos de pinçar,

pisar e agarrar, com exceção de uma redução no reflexo de retirada após pinçamento de pata 24 horas após o tratamento com PBS, comparados aos outros tratamentos. Como pode ser observado na figura 17, o sangramento e a hiperemia em machos e fêmeas não foram alterados pelo tratamento com vanilina e com bupivacaína em nenhum tempo analisado.

Tabela 1 – Efeitos adversos da administração intraplantar pré-operatória de ortho-o-vanilina, bupivacaína e combinação em camundongas (A) e camundongos (B). Dados expressos em ausência do reflexo/total de animais avaliados, em 2 e 24 horas após a cirurgia.

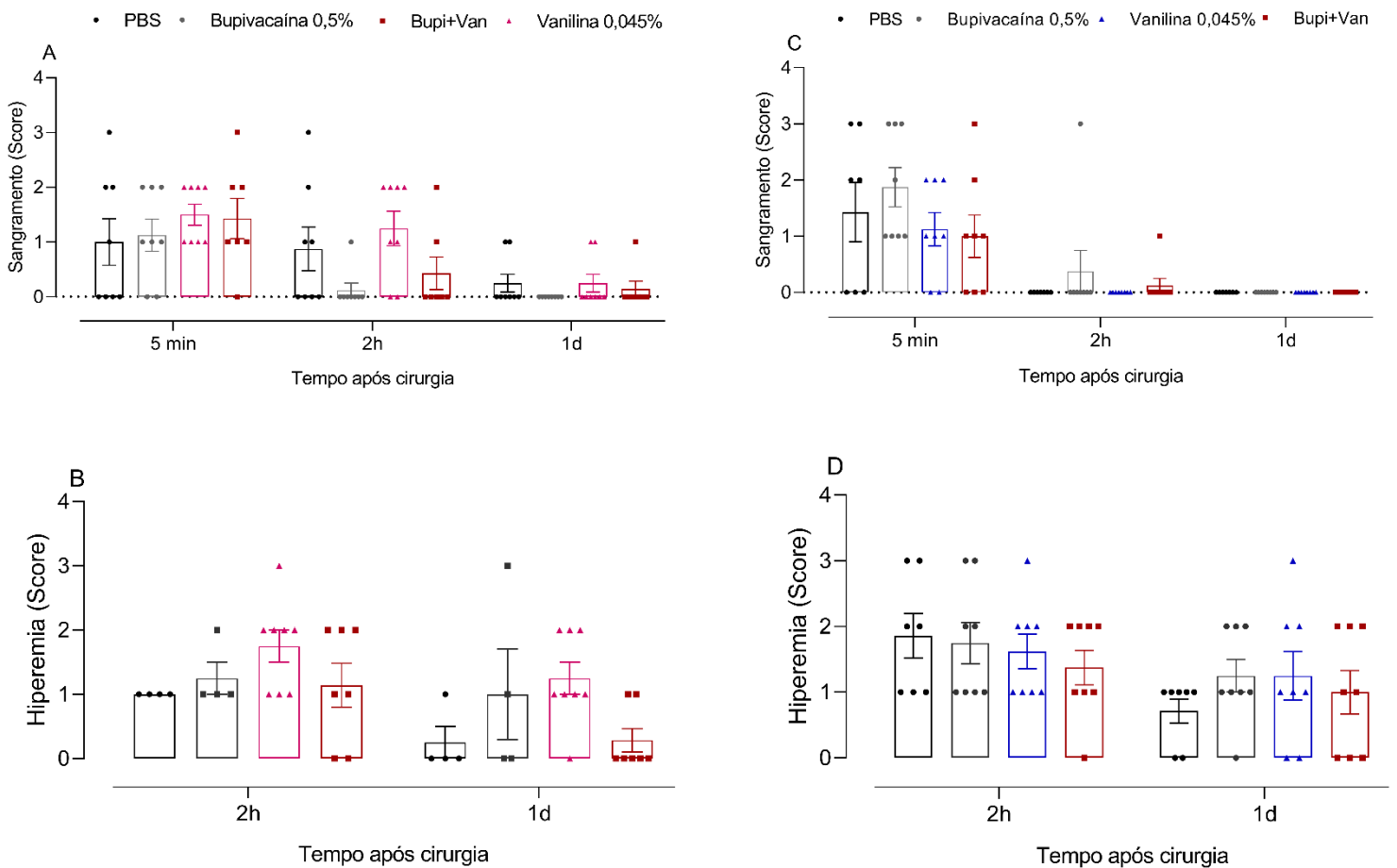
A. FÊMEAS C57BL/6			2 horas após cirurgia			24 horas após cirurgia		
Substância	DOSE (Sítio 10+5 uL)	n	Pinçar	Pisar	Agarrar	Pinçar	Pisar	Agarrar
PBS	0	8	3/8	3/8	1/8	1/8	0/8	2/8
Bupivacaína	0,5%	8	4/8	2/8	2/8	0/8	2/8	2/8
Vanilina	0,045%	8	2/8	4/8	2/8	0/8	1/8	0/8
Bupi + Vanilina	0,5% + 0,045%	8	0/8	1/8	2/8	2/8	0/8	1/8

B. MACHOS C57BL/6			2 horas após cirurgia			24 horas após cirurgia		
Substância	DOSE (Sítio 10+5 uL)	n	Pinçar	Pisar	Agarrar	Pinçar	Pisar	Agarrar
PBS	0	8	2/7	3/7	2/7	6/7*	1/7	5/7
Bupivacaína	0,5%	8	2/8	2/8	2/8	1/8*	3/8	2/8
Vanilina	0,045%	8	1/8	2/8	3/8	3/8*	1/8	1/8
Bupi + Vanilina	0,5% + 0,045%	8	1/8	5/8	4/8	2/8*	3/8	3/8

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 17 - Efeito do tratamento local com antagonista TLR2 e sua combinação anestésico local na intensidade do sangramento decorrente da cirurgia e no pós-operatório em fêmeas no painel A e machos em C e hiperemia da pata operada no pós operatório em fêmeas, B e machos

painel D. Dados estão representados como média \pm E.P.M. (N = 8/grupo) de 3-4 blocos de experimentos independentes e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett. (0) – Basal. (**) – Representa diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado aos valores de medidas basais. (##) – Representa diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparados aos valores dos tratados com o veículo PBS.



6 DISCUSSÃO

Tendo em vista a urgência do problema, a dor pós-operatória vem sendo estudada através de diversos modelos pré-clínicos e clínicos buscando mimetizar vários aspectos do procedimento cirúrgico e avaliação da nocicepção subsequente à este (COWIE; STUCKY, 2019; FLATTERS, 2008; LAVAND'HOMME, 2017; POGATZKI; RAJA, 2003; XU; BRENNAN, 2009).

Em modelo clínico de incisão de pele no antebraço de voluntários humanos, Kawamata et al. (2002) demonstrou a ocorrência não só de dor espontânea na primeira hora, mas também de hiperalgesia mecânica (avaliada por teste de von Frey) durante 2 dias após incisão. A dor espontânea e a hiperalgesia parecem estar relacionadas à dor em repouso ou induzida por estímulos mecânicos (como movimentos respiratórios após cirurgias torácicas ou movimentos viscerais em cirurgias abdominais). O modelo pré-clínico de dor pós-cirúrgica mais amplamente é o da incisão da pele da pata, proposto inicialmente em ratos (BRENNAN; VANDERMEULEN; GEBHART, 1996) e posteriormente adaptado para camundongos (POGATZKI; RAJA, 2003). Apesar deste modelo de incisão da pele de roedores ser importante na identificação de mecanismos moleculares, celulares e patológicos envolvendo a dor pós operatória, este apresenta algumas limitações. Uma limitação é a curta duração da hiperalgesia mecânica (3 e 7 dias em ratos e camundongos) (BRENNAN ET AL., 1996; POGATZKI; RAJA, 2003), o que impossibilita o estudo da dor pós-operatória persistente neste modelo. Outra limitação é a curtíssima duração da dor espontânea (1 - 2 horas para ratos ou camundongos) (OLIVEIRA; SILVA; FERREIRA, 2013; XU; BRENNAN, 2010), o que limita o estudo do efeito de fármacos sobre a dor em repouso em pacientes. Além disso, embora o sexo seja um dos principais fatores de risco para desenvolvimento de dor pós-operatória (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019; LAVAND'HOMME, 2017) não foi observada diferença entre sexos na duração ou intensidade da hiperalgesia mecânica de camundongos submetidos a incisão somente da pele (BANIK et al., 2006).

O acesso cirúrgico em pacientes envolve tecidos profundos, nos quais a pele e musculatura adjacente são incisadas e manipuladas para remoção de tumores ou órgãos inflamados, o dano somático de modelo animal deve ser similar. Na tentativa de reduzir as limitações do modelo de incisão da pele, foi proposto o modelo de incisão da pele + músculo

da pata de ratos (XU; BRENNAN, 2010) e camundongos (COWIE; STUCKY, 2019). De fato, a lesão mais profunda do tecido da pata é capaz de causar tanto hiperalgesia quanto nocicepção espontânea (guarding) mais prolongadas comparadas a incisão somente da pele de roedores (XU; BRENNAN, 2010). Indicando validade de construto deste modelo, dados de estudos em humanos são consistentes com o conceito de que a manipulação do tecido profundo, em vez somente da pele, tem um grande impacto na dor pós-operatória. De fato, quando comparadas duas abordagens cirúrgicas para artroplastia total unilateral do quadril com o mesmo comprimento de incisão na pele (20 cm) e uma quantidade diferente de lesão profunda no tecido muscular, a abordagem que incizou mais tecido profundo induziu maior dor em repouso e uso de morfina (DORR et al., 2007). Em outro ponto interessante do modelo, a incisão de pele + músculo demonstrou uma tendência de hiperalgesia mais duradoura em camundongos fêmeas do que em machos, apesar dos autores só investigarem a hiperalgesia até o 7º dia pós-operatório e o efeito do sexo ser variável conforme o bloco de experimentos (COWIE; STUCKY, 2019). Desta forma, caracterizamos em nosso laboratório o modelo de lesão de pele + músculo para investigar mecanismos da dor pós-operatória aguda e persistente, incluindo o dimorfismo sexual.

Nossos resultados demonstram que o modelo de dor pós operatória com lesão de pele e músculo induz hiperalgesia persistente em machos e fêmeas, caracterizado por nós em 3 fases distintas. As primeiras horas foi denominada como fase aguda de indução, o primeiro e segundo dia como fase aguda de manutenção, e após o terceiro dia a fase persistente, onde observamos uma hiperalgesia duradoura que se manteve significativa por 2 - 3 semanas. Nas primeiras horas e dias após a cirurgia ocorre predominantemente inflamação tecidual decorrente da divulsão e diérese tecidual cirúrgica da pele incisada, da inflamação local, do dano muscular (FLATTERS, 2008). Verificamos que nesta fase aguda ocorre o pico da hiperalgesia, da nocicepção espontânea e do edema, não sendo possível detectar diferenças de intensidade destes parâmetros em animais machos ou fêmeas. Por outro lado, demonstramos que o modelo utilizado por nós foi capaz de causar hiperalgesia persistente, de até 14 dias para os machos, e de até 21 dias para as fêmeas. Este tipo de hiperalgesia persistente é semelhante a demonstrada no modelo de dor pós-operatória persistente causada pela incisão de pele+músculatura e retração tecidual da coxa de ratos, onde a hiperalgesia pode ser detectada por até 22 dias após cirurgia (FLATTERS, 2008). Sabendo que a persistência da dor pós-operatória poder estar relacionada a componente neuropático (DARRABIE et al., 2018; GONG et al., 2020;

SCHAEFER, 2014), devemos investigar marcadores de lesão neuronal na fase persistente de nosso modelo para testar esta hipótese.

Salienta-se que a hiperalgesia detectada com filamentos de von Frey em roedores pode ser considerado uma medida do reflexo espinhal, sendo assim limitada como uma avaliação mais global da dor (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). Recentemente a definição de dor foi atualizada pela primeira vez desde 1979 como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante à associada a dano tecidual real ou potencial, foi ampliada com a adição de seis notas principais e elevou a etimologia da palavra dor para um contexto valioso adicional o qual nos diz que a dor é sempre uma experiência individual influenciada em vários graus por fatores biológicos e também sociais, portanto, dor e nociceção são fenômenos diferentes. A dor não pode ser inferida apenas a partir da atividade nos neurônios sensoriais, mas através de experiências individuais (IASP, 2020). Esse conceito reforça nossa ideia de que ao utilizar uma espécie como modelo animal para estudar a dor pós operatória, devemos nos atentar para a avaliação de comportamentos típicos de dor expressados pelos roedores. Desta forma, verificamos não somente o reflexo sensorial de retirada de pata em nosso modelo, mas também incluímos a avaliação de parâmetros mais elaborados para caracterização do processo nociceptivo ao longo do tempo no pós operatório, incluindo as respostas afetivos-motivacionais (RAM) dos animais após aplicação dos filamentos e o comportamento espontâneo de guarda da pata antes da aplicação dos filamentos.

Respostas afetivo-motivacionais são comportamentos complexos que requerem processamento por circuitos límbicos e corticais no cérebro, cuja aparência indica a motivação e a excitação do sujeito para fazer cessar as sensações aversivas, lambendo o tecido afetado, protegendo-o ou buscando uma rota de fuga (CORDER et al., 2017). Durante estados de hiperalgesia, a amígdala basolateral codifica as mudanças no limiar nociceptivo e traduz esse estímulo somatossensorial em uma resposta comportamental aversiva e protetiva do local estimulado (CORDER et al., 2019). Em nosso estudo, as RAMs foram intensas na fase aguda em ambos os sexos, depois decresce e se resolve em 7 dias. Observamos um maior escore de RAMs após 1 hora na fase aguda de indução, correspondente com o encontrado por Kawamada e colaboradores (2002) em humanos.

Assim como exposto por Xu e Brennan (2011), a investigação de tratamentos para dor pós operatória deve mimetizar todos os componentes observados em humanos, incluindo a dor

em repouso. O comportamento de guarda da pata operada avaliado por nós como nociceção espontânea (na ausência de estímulos), parece ser correspondente à dor em repouso em humanos (XU; BRENNAN, 2009, 2011). Foi demonstrado no modelo de incisão de pele + músculo que o tecido profundo incisado, e não a pele, é fundamental para o desenvolvimento da dor espontânea (guarding) e aumento da atividade espontânea dos neurônios do corno da raiz dorsal (XU & BRENNAN, 2009; 2011). Em nossas mãos, o pico da nociceção espontânea foi nas primeiras horas da hiperalgesia. Semelhante à hiperalgesia, podemos observar a influência do dimorfismo sexual na fase persistente, onde para as fêmeas a nociceção espontânea foi mais duradoura que para os machos (14 dias e 7 dias respectivamente).

As mulheres são demonstradas por como um dos subgrupos com piores índices de dor crônica operatória com um alto nível de consistência de evidência; sabe-se que pacientes que apresentam dor crônica de qualquer tipo anteriormente a cirurgia apresentam uma alta predisposição à apresentar persistência da dor pós operatória, ainda, devemos considerar que os fatores pré-disponentes não são independentes, mas sim interligados. Nesse sentido, a população feminina apresenta maior sensibilidade à estímulos dolorosos além de maiores índices de diagnóstico de transtornos depressivos e de ansiedade, que também são fatores pré disponentes para a persistência da dor após procedimentos cirúrgicos (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019; REDDI; CURRAN, 2014).

Segundo nossos resultados, podemos observar que o dimorfismo sexual é importante principalmente na fase persistente e que no nosso modelo as fêmeas tiveram respostas nociceptivas mais duradouras que os machos. Na literatura, mesmo havendo uma preocupação em estudar mulheres como fator de cronificação pra dor pós-operatória, nos modelos pré-clínicos caracterizados até então estas foram pouco levadas em consideração. Nossos resultados demonstram que o dimorfismo sexual é importante na persistência da nociceção pós-operatória. Salienta-se ainda que observações clínicas demonstram que a eficácia de tratamentos para a dor pós operatória é diferente em homens e mulheres, a eficácia de cada fármaco em regimes multimodais pode ter efeitos diferentes, sob diferentes condições, conforme mencionado por KIM et al. (2019). Além disso, diferenças sexuais no sistema imune já foram demonstradas por Cowie, Dittel e Stucky (2019) em receptores NLRP3 de inflamossomas, levando a hiperalgesia pós-operatória em camundongos com dimorfismo sexual.

Experimentalmente, a especificidade sexual dos mecanismos neurais que modulam a nociceção já foi demonstrada em roedores, essas diferenças intersexuais parecem ser

relevantes, por exemplo, para a analgesia dos agonistas dos receptores kappa-opioides, uma classe de medicamentos relatada como clinicamente eficaz apenas em mulheres (MOGIL et al., 2003). Para os receptores TLR, já foi demonstrado por Strokes et al. (2013) utilizando animais nocautes, que o TLR4 é importante no desenvolvimento de dor neuropática em camundongos machos, mas em fêmeas, o nocaute desse receptor não apresenta efeitos na alodinia tátil explorado pelo modelo de mononeuropatia induzido por ligação de L5, explorado pelos pesquisadores pela administração do agonista TLR4, LPS, o qual demonstrou efeito pró hiperalgésico nas fêmeas, mas não em machos, indicando que mesmo os ligantes endógenos que iniciam o estado hiperpático encontram-se ausente em machos.

Além da nocicepção, também medimos o edema da pata operada nas diferentes fases da hiperalgesia. O edema do local operado foi avaliado por nós como parâmetro de inflamação tecidual, ocorrendo pico nos primeiros dias, na fase aguda de manutenção, semelhante aos parâmetros nociceptivos. De fato, a ocorrência de inflamação periférica na fase aguda após cirurgia está intimamente ligada ao desenvolvimento da dor pós-operatória (XING et al., 2018). Também semelhante a nocicepção, o edema foi mais duradouro em fêmeas do que em machos. Para o nosso modelo, a aposição e cicatrização adequada para a retirada das suturas foi atingida no dia 2, assim como em Xu & Brennan (2009).

Após caracterização, utilizamos o modelo de lesão de pele + músculo para investigar o papel do TLR2 na dor pós-operatória aguda e persistente, incluindo o dimorfismo sexual. O envolvimento do TLR2 já foi implicado por polimorfismos genéticos relacionados ao consumo de opioides por pacientes com dor pós-cirúrgica (SOMOGYI et al., 2016). Além disto, estudos pré-clínicos demonstraram a participação do TLR2 em modelos de dor induzida por PAMPs e DAMPs (GUERRERO et al., 2012; KROCK et al., 2015). De acordo com estes dados da literatura, nossos dados demonstraram que a deleção do TLR2 previne a nocicepção e inflamação pós-operatória em camundongos.

Somogyi et al. (2016) avaliando a sinalização imune e opioide através da marcação de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) em 1066 mulheres que passaram por cesariana com anestesia espinal, encontraram uma variante para o TLR2 (rs3804100) associada com redução do consumo de morfina pelas pacientes. Sabendo que a variante TLR2 rs3804100 é relacionada a uma diminuição da atividade pro-inflamatória do TLR2 (PARK; CHO; PARK, 2011), os autores sugeriram que a redução do consumo pelas pacientes com esta variante deve estar

relacionada uma redução na atividade TLR2 sobre vias pró-inflamatórias que contribuem para indução da dor pós-operatória (por resposta aos DAMPs) ou por respostas paradoxais aos opioides. De fato, opioides, como a morfina, podem causar não somente analgesia via receptores opioides, mas também causar hiperalgesia por ativar dores da sinalização imune, como o complexo TLR4/MD2 (SOMOGYI et al., 2016). Sabendo que opioides são o padrão ouro para o tratamento da dor pós-operatória, devemos investigar no futuro as interações entre o TLR2 e os efeitos analgésicos e adversos a opioides na dor pós-operatória. Por outro lado, como o tipo de cirurgia investigado neste estudo é realizado apenas em mulheres, não foi possível identificar dimorfismo sexual na resposta aos opioides em portadores desta variante do TLR2. Em nossos resultados podemos observar uma redução parcial da hiperalgesia e da nocicepção espontânea pós-operatória nos animais TLR2^{-/-}, nas fases aguda e persistente para os machos, mas somente na persistente para fêmeas (mesmo com significativa redução do edema).

Dados da literatura, apontam que a fase aguda (de indução e manutenção) da nocicepção pós-operatória parece ser decorrente da liberação de DAMPs e indução de inflamação enquanto a fase persistente parece ser dependente de componente neuropático (DARRABIE et al., 2018; GONG et al., 2020; SCHAEFER, 2014). Os efeitos antinociceptivos parciais e dependentes do tempo para a deleção do TLR2 observados em nosso estudo podem ser explicados, especialmente na fase aguda, pela produção e liberação de múltiplos DAMPs que possuem promiscuidade em sua interação com PRRs, incluindo TLRs (KAWAI; AKIRA, 2011; MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU, 2016). Assim, a falta do TLR2 não poderia impedir a interação de DAMPs com outros TLRs que também participam do processo nociceptivo. De fato, a deleção TLR4 previne a hiperalgesia em todas as fases em fêmeas, mas principalmente na fase aguda de indução em machos. Este resultado está de acordo com a ocorrência de resposta nociceptivas dependentes do TLR4 que são sexualmente dimórficas (SORGE et al., 2011) e no efeito anti-hiperalgésico parcial produzido pela pré-administração local de antagonista seletivo para o TLR4 em ratos machos (XING et al., 2018). Sabendo que os receptores TLR2 e TLR4 podem funcionar de maneira cooperativa na detecção de DAMPs (BABELOVA et al., 2009), estratégias de inibição conjunta destes dois receptores poderiam ter melhor eficácia da nocicepção pós-operatória. Desta forma, pretendemos no futuro testar o efeito da deleção gênica dupla e/ou de antagonista dual sobre a nocicepção pós-cirúrgica. Outro ponto importante a ser estudado é a identificação dos DAMPs que poderiam estar implicados na dor pós-operatória.

Demonstramos que a importância do TLR2 para a dor pós-operatória, tanto em machos quanto em fêmeas, ocorre na especialmente na fase persistente, devida a uma melhor recuperação pós-cirúrgica e/ou prevenção do desenvolvimento de neuropatia. De fato, vários estudos demonstram que a deleção do TLR2 previne a hiperalgesia causada pela lesão de nervos (STOKES et al., 2015; KIM et al., 2007; SHI; ZEKKI; ZHANG, 2011). Os resultados de Shi e colaboradores (2011) confirmam que o TLR2 pode ser ativado por ligantes endógenos derivados do nervo lesionado e que a expressão de TLR2 aumenta progressivamente até 14 dias, enquanto a maioria das células que expressam TLR2 são macrófagos (e células de Schwann que recrutam macrófagos durante a degeneração valeriana), e que a infiltração de macrófagos está praticamente abolida em nocautes TLR2. Desta forma, parece ser também relevante a investigação dos tipos celulares que expressam o TLR2 e que medeiam a dor pós-operatória.

Posteriormente, confirmamos os dados de deleção gênica usando um antagonista seletivo do TLR2 (ortho-vanilina, conforme, MISTRY et al., 2015), administrado no local da incisão no momento trans-operatório. Como controle positivo, utilizamos o anestésico local bupivacaína na concentração comercial 0,5%, o qual já foi demonstrado por Xu e Brennan (2009;2011) em reduzir a atividade espontânea neuronal de ratos submetidos a incisão. Em nossos resultados, a bupivacaína quando aplicada nas fêmeas C57BL/6, ocasionou hipoalgesia em 15 minutos após tratamento, perdendo o efeito gradualmente em 4 horas e 1 dia, enquanto nos machos o efeito anti-hiperalgésico ocorreu em 15 minutos e 1 hora. A combinação de bupivacaína e vanilina não pareceu melhorar ou prologar o efeito do anestésico local em nenhum dos sexos na dose testada. A nocicepção espontânea não foi reduzida após o tratamento com a bupivacaína, entretanto, nossas avaliações foram após 2 horas onde talvez o efeito da droga já tenha sido perdido. Em nossos resultados, a o-vanilina funcionou de maneira sexo-dependente prevenindo parcialmente a hiperalgesia (15 minutos) e o edema (24 horas) em animais machos, de maneira coerente ao encontrado por nós nos animais nocautes. Por outro lado, o tratamento com vanilina piorou o edema de fêmeas em 2 horas. Estes resultados devem ser analisados com cuidado pois não possuímos dados confirmando a eficácia e a segurança do antagonista testado. Curvas de dose frente a agonista seletivo deverão ser realizadas para esclarecer estes resultados.

7 CONCLUSÃO

Vimos que tanto a deleção quanto o bloqueio farmacológico do TLR2 apresentam efeitos anti-nociceptivos em modelo de dor pós-operatória de maneira sexualmente distinta, indicando a viabilidade desse alvo na busca de uma ferramenta farmacológica útil no manejo da dor pós-operatória.

8 PERSPECTIVAS

Esse estudo nos levou à proposição da hipótese de que o receptor TLR2 pode ser explorado clinicamente através do antagonismo, e investigado através de outros modelos. Determinar a expressão de TLR2 no local, nos nervos lesionados e/ou no SNC, em nível de medula espinhal e DRG, através de ferramentas farmacológicas e genéticas; esclarecer as relações espaciais e temporais entre indução de TLR2 e ativação da micróglia, astrócitos, e citocinas; e investigar como a sinalização TLR2 é necessária para a manutenção da hiperalgesia pós-operatória persistente através de parâmetros moleculares. Também desejamos avaliar a eficácia dos antagonistas através da caracterização de um modelo de dor e inflamação causados pela administração subcutânea do agonista TLR2 e, como prova de conceito, evidenciar o potencial analgésico de antagonistas TLR2 na dor pós-operatória em contextos clinicamente relevantes, utilizando cirurgias como ovariectomia em fêmeas e orquiectomia em machos, as cirurgias mais comuns em animais de laboratório e pets.

REFERÊNCIAS

- ARMITAGE P, BERRY G. The planning a statistical investigations. In: Armitage P, Berry G, editors. **Statistical methods in medical research**. 2 ed. Oxford: Blackwell; p. 179- 85. 1987.
- ATTAL, N.; JAZAT, F.; KAYSER, V.; *et al.* Further evidence for “pain-related” behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. **Pain**, v. 41, n. 2, p. 235–251, 1990.
- BABELOVA, Andrea; MORETH, Kristin; TSALASTRA-GREUL, Wasiliki; *et al.* Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 36, p. 24035–24048, 2009.
- BANIK, Ratan K.; WOO, Young Cheol; PARK, Soo Seog; *et al.* Strain and sex influence on pain sensitivity after plantar incision in the mouse. **Anesthesiology**, v. 105, n. 6, p. 1246–1253, 2006.
- BRENNAN, Timothy J.; VANDERMEULEN, Erik P.; GEBHART, G. F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v. 64, n. 3, p. 493–502, 1996.
- BRENNAN, Timothy J.; ZAHN, Peter K.; POGATZKI-ZAHN, Esther M. Mechanisms of incisional pain. **Anesthesiology Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 1–20, 2005.
- BYERS, Shannon L.; WILES, Michael V.; DUNN, Sadie L.; *et al.* Mouse estrous cycle identification tool and images. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2012.
- CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, 1994.
- CHOU, Roger; GORDON, Debra B.; DE LEON-CASASOLA, Oscar A.; *et al.* Management of postoperative pain: A clinical practice guideline from the American pain society, the American society of regional anesthesia and pain medicine, and the American society of anesthesiologists’ committee on regional anesthesia, executive commi. **Journal of Pain**, v. 17, n. 2, p. 131–157, 2016.
- CORDER, Gregory; AHANONU, Biafra; GREWE, Benjamin F.; *et al.* An amygdalar neural ensemble that encodes the unpleasantness of pain. **Science**, v. 363, n. 6424, p. 276–281, 2019.
- CORDER, Gregory; TAWFIK, Vivianne L; WANG, Dong; *et al.* Loss of μ -opioid receptor signaling in nociceptors, and not spinal microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesic efficacy. **Nat Med**, v. 23, n. 2, p. 164–173, 2017.
- COWIE, Ashley; STUCKY, Cheryl. A Mouse Model of Postoperative Pain. **Bio-Protocol**, v. 9, n. 2, 2019.

- COWIE, Ashley M.; DITTEL, Bonnie N.; STUCKY, Cheryl L., A novel sex-dependent target for the treatment of postoperative pain: The NLRP3 inflammasome, **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 1–9, 2019.
- CHEN Hui; JIANG, You-Shui; SUN, Yang; XIONG, Yuan-Chang. p38 and interleukin-1 beta pathway via toll-like receptor 4 contributed to the skin and muscle incision and retraction-induced allodynia. *J Surg Res*. v.197, n.2, p.339-347; 2015.
- DARRABIE, Marcus D.; CHEESEMAN, Jennifer; LIMKAKENG, Alexander T.; *et al.* Toll-like receptor activation as a biomarker in traumatically injured patients. **Journal of Surgical Research**, v. 231, p. 270–277, 2018.
- DE TOLEDO-PIZA, Ana Rita; MARIA, Durvanei Augusto. Healing process in mice model of surgical wounds enhanced by *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 27, n. 12, p. 538–547, 2014.
- DEUIS, Jennifer R.; DVORAKOVA, Lucie S.; VETTER, Irina. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. September, p. 1–17, 2017.
- DIXON, W. J. The Up-and-Down Method for Small Samples, *Journal of the American Statistical Association*. v.60. n.312, p.967-978, 1965.
- DORR, Lawrence D.; MAHESHWARI, Aditya V.; LONG, William T.; *et al.* Early pain relief and function after posterior minimally invasive and conventional total hip arthroplasty: A prospective, randomized, blinded study. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, v. 89, n. 6, p. 1153–1160, 2007.
- DYBDAHL B, WAHBA A, LIEN E, *et al.* Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*. v.105. n.6. p.685-690. 2002
- FEHRENBACHER, Jill C.; VASKO, Michael R.; DUARTE, Djane B. Models of inflammation: Carrageenan- or unit 5.4 complete Freund's adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat. **Current Protocols in Pharmacology**, n. SUPPL.56, p. 1–7, 2012.
- FLATTERS, Sarah J.L. Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR). **Pain**, v. 135, n. 1–2, p. 119–130, 2008.
- GLARE, Paul; AUBREY, Karin R.; MYLES, Paul S. Transition from acute to chronic pain after surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1537–1546, 2019.

- GONG, Tao; LIU, Lei; JIANG, Wei; *et al.* DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 95–112, 2020.
- GUERRERO, Ana T.G.; CUNHA, Thiago M.; VERRI, Waldiceu A.; *et al.* Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF- α , IL-1 β and CXCL1/KC. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 1, p. 51–57, 2011.
- GUPTA, Akriti; KUMAR, Pramod. Assessment of the histological state of the healing wound. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 2, n. 5, p. 239, 2015.
- GUPTA, Anita; BAH, Maimouna. NSAIDs in the Treatment of Postoperative Pain. **Current Pain and Headache Reports**, v. 20, n. 11, 2016.
- HOETZENECKER, Konrad; HOCHDANINGER, Moritz; TRAXLER, Denise; *et al.* Antimicrobial peptides are highly abundant and active in postoperative pleural drainage fluids. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 98, n. 3, p. 1042–1050, 2014.
- HOSSAIN, Md Jakir; TANASESCU, Radu; GRAN, Bruno. Innate immune regulation of autoimmunity in multiple sclerosis: Focus on the role of Toll-like receptor 2. **Journal of Neuroimmunology**, v. 304, p. 11–20, 2017.
- JAMES, Sabu Kumar. Chronic postsurgical pain: is there a possible genetic link? **British Journal of Pain**, v. 11, n. 4, p. 178–185, 2017.
- JIN, Guanghui; JIN, Xing; ZHOU, Shuang. Sparstolonin B selectively suppresses toll-like receptor-2 and -4 to alleviate neuropathic pain. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 1, p. 1247–1252, 2018.
- JURGA, Agnieszka M.; ROJEWSKA, Ewelina; PIOTROWSKA, Anna; *et al.* Blockade of toll-like receptors (TLR2, TLR4) attenuates pain and potentiates buprenorphine analgesia in a rat neuropathic pain model. **Neural Plasticity**, v. 2016, 2016.
- KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.
- KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637–650, 2011.
- KAWAMATA, Mikito; WATANABE, Hiroaki; NISHIKAWA, Kohki; *et al.* Different mechanisms of development and maintenance of experimental incision-induced hyperalgesia in human skin. **Anesthesiology**, v. 97, n. 3, p. 550–559, 2002.
- KEHLET, Henrik; JENSEN, Troels S.; WOOLF, Clifford J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1618–1625, 2006.

- KILKENNY, Carol; BROWNE, William J.; CUTHILL, Innes C.; *et al.* Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, p. 6–11, 2010.
- KIM, Donghoon; MYUNG, Ah Kim; CHO, Ik Hyun; *et al.* A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 20, p. 14975–14983, 2007.
- KIM, Young Chan; LEE, Sang Eun; KIM, Somi K.; *et al.* Toll-like receptor mediated inflammation requires FASN-dependent MYD88 palmitoylation. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 9, p. 907–916, 2019.
- KRAYCHETE, Durval Campos *et al.* Postoperative persistent chronic pain: what do we know about prevention, risk factors, and treatment, **Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)**, v. 66, n. 5, p. 505–512, 2016.
- KROCK, Emerson; CURRIE, J. Brooke; WEBER, Michael H.; *et al.* Nerve growth factor is regulated by toll-like receptor 2 in human intervertebral discs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 7, p. 3541–3551, 2016.
- KUMAR, Rahul; GUPTA, Shivani; GAUTAM, Mayank; *et al.* Diverse characters of brennan’s paw incision model regarding certain parameters in the rat. **Korean Journal of Pain**, v. 32, n. 3, p. 168–177, 2019.
- LACAGNINA, Michael J.; WATKINS, Linda R.; GRACE, Peter M. **Toll-like receptors and their role in persistent pain**. [s.l.: s.n.], 2018.
- LAVAND’HOMME, Patricia. ‘Why me?’ The problem of chronic pain after surgery. **British Journal of Pain**, v. 11, n. 4, p. 162–165, 2017.
- LIANG, Qiaoli; WU, Qinan; JIANG, Jihong; *et al.* Characterization of sparstolonin B, a chinese herb-derived compound, as a selective toll-like receptor antagonist with potent anti-inflammatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 30, p. 26470–26479, 2011.
- LIM, Hyoungsub; LEE, Jaesung; YOU, Byunghyun; *et al.* GT1b functions as a novel endogenous agonist of toll-like receptor 2 inducing neuropathic pain. **The EMBO Journal**, v. 39, n. 6, p. 1–14, 2020.
- MEDZHITOV, Ruslan; JANEWAY, Charles A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 298–300, 2002.

- MISTRY, Pragnesh; LAIRD, Michelle H.W.; SCHWARZ, Ryan S.; *et al.* Inhibition of TLR2 signaling by small molecule inhibitors targeting a pocket within the TLR2 TIR domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 17, p. 5455–5460, 2015.
- MOGIL, Jeffrey S.; WILSON, Sonya G.; CHESLER, Elissa J.; *et al.* The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4867–4872, 2003.
- MUKHERJEE, Suprabhat; KARMAKAR, Subhajit; BABU, Santi Prasad Sinha. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: A review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 193–204, 2016.
- NAIDU, Pattipati S.; KINSEY, Steven G.; GUO, Tai L.; *et al.* Regulation of inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 334, n. 1, p. 182–190, 2010.
- NEUMAN, Mark D.; BATEMAN, Brian T.; WUNSCH, Hannah. Inappropriate opioid prescription after surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1547–1557, 2019.
- OLIVEIRA, Sara M.; SILVA, Cássia R.; FERREIRA, Juliano. Critical role of protease-activated receptor 2 activation by mast cell tryptase in the development of postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 118, n. 3, p. 679–690, 2013.
- PARK, Chan Soon; CHO, Jin Hee; PARK, Yong Jin. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms in a Korean population: Association with chronic rhinosinusitis. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 144, n. 1, p. 96–100, 2011.
- PHILIPPE RICHEBÉ, M.D., PH.D., XAVIER CAPDEVILA, M.D., PH.D., CYRIL RIVAT, Ph.D. Persistent postsurgical pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, v. 7, n. 2, p. 144–152, 2013.
- POGATZKI-ZAHN, Esther; CHANDRASENA, Chandani; SCHUG, Stephan A. Nonopioid analgesics for postoperative pain management. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 27, n. 5, p. 513–519, 2014.
- POGATZKI-ZAHN, Esther M.; SEGELCKE, Daniel; SCHUG, Stephan A. Postoperative pain—from mechanisms to treatment. **Pain Reports**, v. 2, n. 2, 2017.
- POGATZKI-ZAHN, Esther M.; ZAHN, Peter K.; BRENNAN, Timothy J. Postoperative pain—clinical implications of basic research. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 21, n. 1, p. 3–13, 2007.

- POGATZKI-ZAHN, Esther; SEGELCKE, Daniel; ZAHN, Peter. Mechanisms of acute and chronic pain after surgery: update from findings in experimental animal models. **Current opinion in anaesthesiology**, v. 31, n. 5, p. 575–585, 2018.
- POGATZKI, Esther M.; RAJA, Srinivasa N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v. 99, n. 4, p. 1023–1027, 2003.
- PRICE, Theodore J.; BASBAUM, Allan I.; BRESNAHAN, Jacqueline; *et al.* Transition to chronic pain: Opportunities for novel therapeutics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 383–384, 2018.
- REDDI, Danielle; CURRAN, Natasha. Chronic pain after surgery: Pathophysiology, risk factors and prevention. **Postgraduate Medical Journal**, v. 90, n. 1062, p. 222–227, 2014.
- SCHAEFER, Liliana. Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 51, p. 35237–35245, 2014.
- SHI, Xiang Qun; ZEKKI, Hakima; ZHANG, Ji. The role of TLR2 in nerve injury-induced neuropathic pain is essentially mediated through macrophages in peripheral inflammatory response. **Glia**, v. 59, n. 2, p. 231–241, 2011.
- SOMOGYI, Andrew A.; SIA, Alex T.; TAN, Ene Choo; *et al.* Ethnicity-dependent influence of innate immune genetic markers on morphine PCA requirements and adverse effects in postoperative pain. **Pain**, v. 157, n. 11, p. 2458–2466, 2016.
- SORGE, Robert E.; LACROIX-FRALISH, Michael L.; TUTTLE, Alexander H.; *et al.* Spinal cord toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 43, p. 15450–15454, 2011.
- STASIOWSKA, Maria K.; NG, Su Cheen; GUBBAY, Anthony N.; *et al.* Postoperative pain management. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 76, n. 10, p. 570–575, 2015.
- STOKES, Jennifer A.; CORR, Maripat; YAKSH, Tony L. Spinal Toll-like receptor signaling and nociceptive processing: Regulatory balance between TIRAP and TRIF cascades mediated by TNF and IFN β . **Pain**, v. 154, n. 5, p. 733–742, 2013.
- SUN, Yang; YANG, Mingmin; TANG, Hao; *et al.* The over-production of TNF- α via Toll-like receptor 4 in spinal dorsal horn contributes to the chronic postsurgical pain in rat. **Journal of Anesthesia**, v. 29, n. 5, p. 734–740, 2015.
- TERASHIMA, T. *et al.* Intrathecal P/Q and R-type calcium channel blockades on spinal substance P release and c-Fos expression. **Neuropharmacology** v. 75, p. 1-8, 2013.

VAN BERGENHENEGOUWEN, Jeroen; PLANTINGA, Theo S.; JOOSTEN, Leo A. B.; *et al.* TLR2 & Co: a critical analysis of the complex interactions between TLR2 and coreceptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 5, p. 885–902, 2013.

VANDENKERKHOF, Elizabeth G.; HOPMAN, Wilma M.; GOLDSTEIN, David H.; *et al.* Impact of perioperative pain intensity, pain qualities, and opioid use on chronic pain after surgery: A prospective cohort study. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

WANG, Ting Ting; XU, Xian Yun; LIN, Wei; *et al.* Activation of Different Heterodimers of TLR2 Distinctly Mediates Pain and Itch. **Neuroscience**, v. 429, p. 245–255, 2020.

WEISER, Thomas G.; HAYNES, Alex B.; MOLINA, George; *et al.* Ampleur et répartition du volume mondial d'interventions chirurgicales en 2012. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 3, p. 201-209F, 2016.

XIE, Nan; MATIGIAN, Nicholas; VITHANAGE, Tharindu; *et al.* Effect of perioperative opioids on cancer-relevant circulating parameters: Mu opioid receptor and toll-like receptor 4 activation potential, and proteolytic profile. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 10, p. 2319–2327, 2018.

XING, Fei; ZHANG, Wei; WEN, Jing; *et al.* TLR4/NF- κ B signaling activation in plantar tissue and dorsal root ganglion involves in the development of postoperative pain. **Molecular Pain**, v. 14, 2018. D

XU, Jun; BRENNAN, Timothy J. Comparison of skin incision vs. skin plus deep tissue incision on ongoing pain and spontaneous activity in dorsal horn neurons. **Pain**, v. 144, n. 3, p. 329–339, 2009.

XU, Jun; BRENNAN, Timothy J. Guarding pain and spontaneous activity of nociceptors after skin versus skin plus deep tissue incision. **Anesthesiology**, v. 112, n. 1, p. 153–164, 2010.

XU, Jun; BRENNAN, Timothy J. The pathophysiology of acute pain: Animal models. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 24, n. 5, p. 508–514, 2011.