

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAFAELLA ROCHA FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DO LIMAR NOCICEPTIVO E MARCADORES INFLAMATÓRIOS
EM RATOS APÓS INDUÇÃO DE ENFISEMA PULMONAR POR ELASTASE NOS
MODELOS DE DOR FÁSICA, INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA**

Alfenas, MG

2017

RAFAELLA ROCHA FIGUEIREDO

**AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO E MARCADORES INFLAMATÓRIOS
EM RATOS APÓS INDUÇÃO DE ENFISEMA PULMONAR POR ELASTASE NOS
MODELOS DE DOR FÁSICA, INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde
pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração:
Neurociências e comportamento.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva.
Coorientadora: Dra. Josie Resende Torres da Silva

Alfenas/MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Figueiredo, Rafaella Rocha

Avaliação do limiar nociceptivo e marcadores inflamatórios em ratos após indução de enfisema pulmonar por elastase nos modelos de dor fásica, inflamatória e neuropática / Rafaella Rocha Figueiredo. -- Alfenas/MG, 2017.

72 f.

Orientador: Marcelo Lourenço da Silva

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -
Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Doença pulmonar obstrutiva Crônica. 2. Enfisema Pulmonar.
3. Dor animal - Modelos animais. I. Silva, Marcelo Lourenço da. II. Título.

CDD-616.24

RAFAELLA ROCHA FIGUEIREDO

“AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO E MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM RATOS APÓS INDUÇÃO DE ENFISEMA PULMONAR POR ELASTASE NOS MODELOS DE DOR FÁSICA, INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovado em: 15/05/2017

Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: _____

Profa. Dra. Juliana Bassalobre Carvalho Borges
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: _____

Prof. Dr. Guilherme Rabelo de Souza
Instituição: Universidade de São Paulo
– USP

Assinatura: _____

Dedico a DEUS por guiar meus passos e por me dar forças para vencer mais uma etapa;
Aos meus pais pela imensa dedicação e amor incondicional;
Aos meus irmãos, Júnior e Izabella por sempre acreditarem em mim;
Ao meu futuro marido Samuel, pela força e companheirismo em toda minha trajetória;
Aos meus amigos e aos demais familiares pelas orações e pela confiança depositadas em mim.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi fácil, se hoje conquisto essa vitória esta se dá por mérito de algumas pessoas as quais foram de extrema importância, em especial:

- Professor Dr. Marcelo Lourenço da Silva, meu orientador pela confiança em mim depositada;
- Professora Dra. Josie Resende Torres da Silva minha co-orientadora, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa;
- A minha querida amiga e companheira de todas as horas, Izabela Cristina Albano Breda;
- Isabella de Paula, Luiz Fernando, colaboradores de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos colegas de laboratório, Isabella, Thamyres, Rafaela, Angélica, Nayara, Ravena pelo apoio e amizade;
- Aos demais professores e alunos do Laboratório de fisioterapia experimental – Labfex.

Todo o começo que nos aguarda e todo futuro que desde já construiremos, será através da influência que recebi de todos vocês durante esta jornada, muito obrigada!

RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) tem como característica a obstrução crônica ao fluxo aéreo não reversível totalmente. Embora comprometa os pulmões, ela também produz consequências sistêmicas significativas. Indivíduos com DPOC têm níveis elevados de alguns marcadores inflamatórios no sangue, como TNF- α , IL -6 e IL1- β , tais marcadores inflamatórios poderiam ser os responsáveis pela redução do limiar doloroso em pacientes com DPOC. O presente estudo tem como objetivo analisar e determinar a relação das citocinas pró-inflamatórias com a redução do limiar nociceptivo de ratos com DPOC, onde a doença foi induzida por elastase pancreática suína em um ensaio clínico. Participaram do estudo 144 ratos *Wistars* machos, estes foram submetidos aos modelos de dor física, dor inflamatória, dor neuropática. Os resultados mostram que os animais com DPOC, ao serem avaliados pelo teste *Tail Flick* apresentaram retirada antecipada da cauda quando comparado aos animais do grupo controle. Para análises das citocinas no grupo dor física foram encontradas diferenças significativas para a IL-1 β , IL-6 e TNF- α , no momento em que a retirada da cauda dos animais com DPOC foi menor, coincidindo com níveis mais elevados de citocinas. Em tempo 0, após a indução da hiperalgesia aguda pelo CFA os animais com DPOC apresentaram um limiar de pressão inferior aos dos animais sem a doença e com CFA. Os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α apresentaram-se em maior quantidade no plasma em animais com DPOC no tempo 24 horas, com diferenças significativas, sugerindo que em vinte e quatro horas após a indução da hiperalgesia, as citocinas oriundas do processo inflamatório sistêmico da DPOC associados com os mediadores inflamatórios do processo causado pelo CFA levaram a tal aumento, fato que corrobora com os resultados encontrados anteriormente. Para o grupo dor neuropática é possível observar resultados similares aos do grupo dor inflamatória. Os marcadores inflamatórios do grupo dor neuropática apresentaram diferenças significativas ao compararmos os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α de animais sem DPOC que sofreram a cirurgia de CCI (salina), e animais com DPOC que também sofreram tal cirurgia. Portanto, animais com DPOC apresentam níveis elevados de marcadores inflamatórios, sugerindo que a patologia interfere na percepção do estímulo nocivo. Contudo para os modelos de dor inflamatória e dor neuropática, tais modificações aconteceram somente na presença do estímulo de CFA e CCI.

Palavras-chave: DPOC, Doença pulmonar obstrutiva Crônica, Modelo experimental de indução de DPOC, Modelos de dor em animais.

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by chronic non-reversible airflow obstruction. Although it compromises the lungs, it also has significant systemic consequences. Individuals with COPD have elevated levels of some inflammatory markers in the blood, such as TNF- α , IL-6 and IL-1- β , such inflammatory markers could be responsible for reducing painful liming in patients with COPD. The present study aims to analyze and determine the relationship of proinflammatory cytokines with the reduction of the nociceptive threshold of rats with COPD, where the disease was induced by porcine pancreatic elastase in a clinical trial. A total of 144 male Wistars rats were submitted to models of phasic pain, inflammatory pain, and neuropathic pain. The results show that animals with COPD, when evaluated by the Tail Flick test, showed early tail withdrawal when compared to the animals in the control group. A significant difference was found for IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the phasic pain group at the time when the tail removal of animals with COPD was lower, coinciding with higher levels of cytokines. At time 0, after induction of acute CFA hyperalgesia, animals with COPD had a lower pressure threshold than those of naive CFA animals. The levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were higher in plasma in animals with COPD at 24 hours, with significant difference, suggesting that at twenty-four hours after the induction of hyperalgesia by CFA, The cytokines originating from the systemic inflammatory process of COPD associated with the inflammatory mediators of the CFA process led to such an increase, a fact that corroborates with the results found previously. For the neuropathic pain group it is possible to observe results similar to those of the inflammatory pain group. The inflammatory markers in the neuropathic pain group showed a significant difference when we compared the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in animals without COPD that underwent CCI (saline) surgery, and animals with COPD that also underwent such surgery. Therefore, dpocytic animals present high levels of inflammatory markers, they present altered responses to the noxious stimulus, suggesting that the pathology interferes in the perception of the noxious stimulus. However for the models of inflammatory pain and neuropathic pain, such modifications occur only in the presence of the CFA and CCI stimulus.

Key words: COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Experimental model of COPD induction, Animal pain models.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Avaliação da dor no grupo dor fásica, utilizando o teste de *Tail Flick* nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0, T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24.*significância ($p<0,05$) em relação ao grupo salina. No gráfico 1, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58}= 4.21, p<0.01$) tempo ($F_{4,126}=0.12, p<0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{8,126}= 8.83, p<0.05$).....35
- Gráfico 2- Avaliação dos marcadores inflamatórios dos animais pertencentes ao grupo dor fásica, realizando a retirada do sangue dos mesmos nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0, T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24.*significância ($p<0,05$) em relação ao grupo Salina. No gráfico 2, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58}= 3.18, p<0.01$) tempo ($F_{2,18}=3.32, p<0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{5,18}= 4.23, p<0.05$)36
- Gráfico 3- Avaliação da dor no grupo dor inflamatória, utilizando o testes de nocicepção mecânica- pressão crescente pata *von Frey* nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0 ,T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24.*significância ($p<0,05$)em relação ao grupo Salina. # Diferente de todos os grupos ($P<0,05$). No gráfico 3, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{3,20}= 65.43, p<0.01$) tempo ($F_{4,56}=19.67, p<0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{12,56}= 44.53, p<0.05$).....37
- Gráfico 4- Avaliação da dos marcadores inflamatórios nos animais pertencentes ao grupo dor inflamatória, ocorrendo a retirada do sangue para análise nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0 ,T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24.*significância ($p<0,05$). No gráfico 4, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58}= 5.87, p<0.01$) tempo ($F_{2,18}=13.19, p<0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{5,18}= 8.61, p<0.05$).38
- Gráfico 5- Avaliação da dor no grupo dor neuropática, utilizando o testes de nocicepção mecânica- pressão crescente na pata *von Frey* nos momentos: basal (antes

da indução da DPOC), nos tempos T0 ,T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24. *significância (p<0,05)em relação ao grupo salina salina. # Diferente de todos os grupos (P<0,05). No gráfico 5, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{3,20}= 43.88$, $p<0.01$) tempo ($F_{4,56}=56.71$, $p<0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{12,56}= 69.11$, $p<0.05$).....39

Gráfico 6- Avaliação dos marcadores inflamatório do animais pertencentes ao grupo dor neuropática, utilizando a retirada de sangue para análise posterior nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0 ,T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24. *significância (p<0,05). No gráfico 6, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58}= 12.11$, $p<0.01$) tempo ($F_{2,18}=4.62$, $p<0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{5,18}= 18.33$, $p<0.05$).....40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Animal sedado, incisão anterior da cervical para expor a traqueia. Fonte do autor.....26
- Figura 2- Instilação da Elastase pancreática suína ou solução salina na traquéia do animal. Fonte do autor.26
- Figura 3- Aparelho do *Tail Flick*. Fonte- Do autor.27
- Figura 4- Cirurgia de CCI “*Chronic Constriction Injury*”, com exposição do nervo ciático, o mesmo com quatro amarrações com fios de seda separados por aproximadamente 2 mm e sutura da pele e musculatura do animal anestesiado. Fonte do autor.....28
- Figura 5- Aparelho para o teste de nocicepção mecânica *von Frey* digital. Fonte do autor29
- Figura 6- Animais posicionados na caixa de acrílico, por um período de ambientação de aproximadamente 1 hora. Fonte do autor.29
- Figura 7- Posição do animal dentro da caixa de acrílico, propiciando acesso a pata traseira dos animais para realização do teste de *von Frey*. Fonte- Autor30
- Figura 8- Delineamento do experimento realizado no grupo Dor Física. Onde ● indica coleta de sangue para dosagem de citocinas. T0: tempo zero, T1: tempo 1 hora, T3: tempo 3 horas, T24:tempo 24 horas.....32
- Figura 9- Delineamento do experimento realizado no grupo Dor Inflamatória. Onde ● indica coleta de sangue para dosagem de citocinas. T0: tempo 1 horas, T3: tempo 3 horas, T24: tempo 24 horas32
- Figura 10- Delineamento do experimento realizado no grupo Dor Neuropática. Onde ● indica coleta de sangue para dosagem de citocinas. T0: tempo zero, T1: tempo 1 hora, T3: tempo 3 horas, T24:tempo 24 horas.....32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFA:	Complete Freund's Adjuvant
CRP:	C – reativa
CCI:	Injúria por Constrição Crônica do nervo Isquiático (<i>Chronic constriction injury</i>)
DPOC:	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
HNE:	Elastase de neutrófilo humano
IL6:	Interleucina 6
IL1- β :	Interleucina 1 beta
IL:	Interleucina
LTB4:	Leucotrieno B4
PPE:	Elastase pancreática de porco
SNP:	Sistema nervoso periférico
SNC:	Sistema nervoso central
TF:	<i>Tail Flick Test</i>
TNF- α :	Fator de necrose tumoral- alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3 JUSTIFICATIVA	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo Geral	24
4.2 Objetivos Específicos.....	24
5 MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 Animais.....	25
5.2 Indução do Enfisema por elastase pancreática suína.....	25
5.3 Modelos Experimentais.....	26
5.3.1 Modelo de Dor fásica. Teste de retirada da cauda – Tail Flick	26
5.3.2 Modelo de Dor Inflamatória. Indução da hiperalgesia aguda por CFA	27
5.3.3 Modelo de Dor neuropática. Modelo de hiperalgesia neuropática periférica.....	27
5.3.4 Teste de nocicepção mecânica.....	28
5.4 Método para detecção das citocinas pró-inflamatórias	30
5.4.1 Coleta de sangue.....	30
5.4.2 Dosagens dos níveis plasmáticos dos marcadores inflamatórios	31
5.5 Grupos Experimentais	31
5.6 Protocolos Experimentais	32
5.6.1 Modelo de Dor Fásica	32
5.6.2 Modelo de Dor Inflamatória	32
5.6.3 Modelo de Dor Neuropática	32
5.6.4 Análise Estatística	33
6 RESULTADOS	34
7 DISCUSSÃO	41
8 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS	52
9 ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é umas das principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo, onde o tabagismo é precursor principal da doença, o mesmo é o responsável por até 50% da obstrução aérea de indivíduos com mais de 70 anos (LUNDBACK, et al., 2005). Estima-se que no Brasil de cerca de 30 mil óbitos/ano acontece devido a DPOC, sendo a quinta causa de morte. Dados sugerem que existam aproximadamente três milhões de dpoéticos no país, sendo que a cada ano são hospitalizados 280 mil brasileiros (MONTEIRO et al., 2004).

A doença respiratória pulmonar conhecida como DPOC, tem como principal característica a obstrução crônica ao fluxo aéreo o qual não é reversível totalmente. Tal obstrução é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões, que tem como principal causa a inalação de gases tóxicos como a fumaça de cigarro (JEZLER, et al., 2007).

O processo inflamatório crônico pode produzir alterações nos bronquíolos, brônquios, e /ou parênquima pulmonar, o que pode resultar em bronquite crônica, bronquiolite obstrutiva e enfisema pulmonar. Tais alterações variam em cada indivíduo, tendo relação com os sintomas apresentados (JEZLER, et al., 2007).

As consequências da DPOC experimentadas pelo paciente incluem sintomas, perda de peso, intolerância ao exercício, dispnéia, aumento do gasto energético, redução da qualidade de vida, gastos financeiros e pode levar a morte (BUSS; SILVA, 2009).

Embora a DPOC comprometa os pulmões, ela também produz consequências sistêmicas significativas (JEZLER, et al., 2007). Assim, a DPOC pode ser considerada uma doença do sistema respiratório o qual provoca manifestações sistêmicas (EAGAN, et al., 2010). Trata-se de uma doença com efeitos extrapulmonares que contribuem para a gravidade da mesma (JEZLER, et al., 2007).

Estudos demonstram que pacientes com DPOC têm níveis mais elevados de alguns marcadores inflamatórios no sangue, nomeadamente, a proteína C-reativa (CRP), fibrinogênio, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e as citocinas inflamatórias como as interleucinas (IL-6 e IL1- β) (EAGAN, et al., 2010). Tais marcadores inflamatórios seriam os responsáveis pela redução do limiar de dor em dpoéticos, porém, tais evidências não estão descritas em nenhum estudo.

A dor é definida como uma sensação e/ou experiência emocional desagradável, que está primariamente associada à lesão tecidual. A dor tem geralmente origem no sistema nervoso periférico, e é processada e interpretada pelo sistema nervoso central (IASP, 1994).

A dor e o sistema imunológico se influenciam de forma mútua, assim as células envolvidas na resposta inflamatória podem desencadear efeitos de hiperexcitabilidade crônica e alterações na expressão fenotípica dos nociceptores, levando a um processamento anormal dos sinais nocivos e exacerbação da sensação dolorosa (OLIVEIRA, et. al., 2011). Assim, os níveis elevados de marcadores inflamatório envolvidos na patogênese da DPOC influenciam nas manifestações sistêmicas da doença, no entanto não se sabe ao certo até que ponto esses marcadores influenciam no processo de ativação de nociceptores, gerando aumento da sensação dolorosa, tais fatos ainda não foram elucidados.

As células implicadas no processo da inflamação crônica da DPOC são linfócitos T (predominando o linfócito CD8+), macrófagos e neutrófilos. A ativação destas células desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente leucotrieno LTB₄, IL-6, IL-8 e TNF- α . Pacientes com DPOC estável apresentam concentrações pulmonares elevadas de IL1- β e TNF- α (CHIESA; KNORST, 2005).

Devido estes conhecimentos e aos achados da literatura, surgiu a necessidade de investigações relacionadas às alterações sistêmicas causadas pela liberação de mediadores inflamatórios, segundo Dourado et al., (2006) e Mineto et al., (2005) e suas implicações no limiar nociceptivo em dpocticos, fatos os quais ainda não foram elucidados até o momento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ao contrário das várias doenças crônicas que estão em declínio, a DPOC vem atingindo proporções alarmantes, estima-se que 210 milhões de indivíduos são afetados, sendo que mais de 16 milhões só nos Estados Unidos. Assim, tal patologia é considerada uma das principais causas de morte e incapacitação no mundo (BARNES, 2003).

No Brasil a DPOC é a quinta causa de morte, cerca de 30 mil óbitos/ano, e mais de 280 mil brasileiros são hospitalizados devido a morbidade. Estima-se que até o ano de 2020 a DPOC seja a terceira causa de morte no mundo sendo ultrapassada pelas doenças cardíacas e vasculares cerebrais (WRIGTH; CHURG, 2008).

A principal causa da DPOC é o tabagismo, embora estudos epidemiológicos demonstrem evidências consistentes de que não fumantes também podem desenvolver obstrução crônica ao fluxo aéreo (BARNABÉ, 2010).

Pacientes com DPOC apresentam sintomas tais como: tosse, dispnéia, expectoração e fadiga. Os sintomas contribuem para o desfecho clínico, auxiliam também na determinação do grau de obstrução aérea, tolerância ao exercício e qualidade de vida (BARNABÉ, 2010).

Pacientes com DPOC, devido redução da luz brônquica apresentam aumento da demanda ventilatória o que os obriga a evitar atividade física levando ao sedentarismo. O indivíduo com DPOC, por sua vez, apresenta redução da força e massa muscular, da capacidade aeróbia, o que resulta em demanda ventilatória ainda mais intensa para as atividades de baixa intensidade, fechando o ciclo denominado dispnéia-sedentarismo-dispnéia (WOUTER, et al., 2007).

Algumas literaturas incluem a diferenciação entre bronquite crônica e enfisema. Onde a bronquite crônica se caracteriza pela presença de tosse com expectoração em vários períodos do dia devido inflamação dos brônquios. O enfisema pode ser definido como aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, com destruição das paredes alveolares (GOLD, 2015). Tais termos não estão incluídos no presente estudo visto que tal diferença não é encontrada em modelos experimentais.

A redução difusa da luz brônquica faz com que a resistência pulmonar permaneça aumentada na DPOC, levando a uma obstrução relativa do fluxo aéreo. Assim a insuficiência respiratória obstrutiva se instala, e leva bloqueio torácico em inspiração (hiperinsuflação) na medida em que as crises vão acontecendo, levando a alterações na mecânica ventilatória as quais se tornam mais pronunciadas (BARNABÉ, 2010).

Laennec no ano de 1834 descreveu o enfisema pela primeira vez através de observações em cortes superficiais necroscópicos de pulmões humanos, onde apresentavam características de lesão atrófica do tecido pulmonar e hiperinsuflação pulmonar. Anos depois Ciba Guest (1959) o enfisema foi então redefinido, como uma “dilatação anormal e permanente dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal”. Tal definição foi posteriormente modificada ao acrescentarem o trecho “destruição da parede alveolar sem fibrose evidente” (SNIDER et al., 1985).

Assim a DPOC pode ser considerada como um processo obstrutivo crônico, resultante das alterações na estrutura distal do bronquíolo terminal, denominado ácino. Tais alterações incluem dilatação dos espaços aéreos e/ou destruição da parede alveolar, o que leva a uma perda da superfície respiratória e irrigação sanguínea, reduzindo o recolhimento elástico o que gera a hiperinsuflação pulmonar. Essas mudanças anatômicas podem atingir toda a estrutura acinar ou apenas uma parte do ácino, indicando a etiologia e o comportamento fisiopatológico da doença (PETTA 2010).

A destruição da matriz extracelular alveolar resulta no alargamento do espaço aéreo e consequentemente leva a redução de troca gasosa alvéolo-capilar, fazendo com que a obstrução ao fluxo aéreo se instale, o qual não é reversível totalmente, associada a uma resposta inflamatória do pulmão decorrente de gases ou partículas tóxicas (BRABER et al., 2010).

A resposta inflamatória decorre do aumento das células inflamatórias específicas localizadas em diferentes regiões do pulmão o que leva a alterações estruturais resultantes do processo repetitivo de lesão e reparo. De acordo com a gravidade da doença as mudanças estruturais das vias aéreas se tornam mais acentuadas (INOUE et al., 2010).

A reação inflamatória do sistema respiratória no paciente com DPOC parece estar exacerbada quando comparada com a de um paciente sem a patologia. Estão envolvidos no mecanismo de lesão inflamatória o estresse oxidativo e o excesso de proteinases presentes no pulmão. Diferentes tipos celulares estão envolvidos no processo inflamatório, principalmente neutrófilos, linfócitos e macrófagos (DEMEDTS et al., 2005).

Muitos processos parecem estar envolvidos com a patogênese da DPOC. Porém, a hipótese do desequilíbrio enzimático proteinase-antiproteinase tem prevalecido como tema central nos últimos anos. De acordo com essa hipótese, a destruição da parede alveolar resulta da ação de enzimas proteolíticas ativas que degradam a matriz extracelular afetando as fibras colágenas e elásticas. Em condições normais, existe um equilíbrio entre a produção de substâncias agressoras e protetoras no pulmão (PETTA, 2010).

Tal hipótese defende que a exposição crônica à fumaça do cigarro ou a qualquer agente tóxico leva ao incurso de células inflamatórias para as vias aéreas, liberando uma grande quantidade de proteases, levando ao desequilíbrio protease-antiprotease e conseqüentemente a destruição do tecido pulmonar (AOSHIBA; YOKOHORI; NAGAI, 2003; DEMEDTS, et al., 2005).

As proteases derivadas de neutrófilos que merecem destaque na DPOC são: neutrofílicas proteases, catepsina G neutrofílica, elastase neutrofílica, metaloproteínas neutrofílicas (gelatinase B e colagenaseneutrofílica); e as derivadas de macrófagos são: as metaloproteinases dos macrófagos (colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas) e metaloelastasescisteína (tiol) proteinase do macrófago (lisossomol-tiol-proteinase e catepsinas B, H, L e S). As mesmas atuam como enzimas degradando substâncias específicas da matriz celular como a elastase neutrofílica que possui atividade contra as proteínas presentes na matriz, e as metaloproteinases neutrofílicas que atuam na degradação do colágeno intersticial da membrana basal e da elastina (RUFINO; SILVA, 2006).

Os neutrófilos apresentam-se em grande quantidade no sangue, mas praticamente ausentes nos tecidos pulmonares de indivíduos saudáveis, o mesmo não acontece em pacientes com DPOC (BARNES, 2003; DALLEGRI; OTTONELLO, 1997; PETTA, 2010; RUFINO; SILVA, 2006; WAGNER; ROTH, 2000). Onde há um aumento de 25 vezes no número de macrófagos no tecido e no espaço alveolar de indivíduos com enfisema (BARNES, 2003; DALLEGRI; OTTONELLO, 1997; RUFINO; SILVA, 2006; WAGNER; ROTH, 2000).

Diferentes células estão envolvidas no mecanismo inflamatório da DPOC, como as IL e os produtos oxidantes, que formam o processo inflamatório e que se relacionam com a matriz extracelular, modificando o arranjo da estrutura pulmonar e os seus componentes como as fibras elásticas e o músculo bronquiolar. Dentre os marcados presentes na reação inflamatória tem destaque a proteína C-reativa (CRP), fibrinogênio, TNF- α , e as citocinas inflamatórias como a IL1- β e IL -6 (EAGAN, et al., 2010; RUFINO; COSTA., 2013).

Podem participar direta ou indiretamente da destruição do parênquima pulmonar os grânulos de neutrófilos liberados no processo inflamatório, tais como fosfatase ácida, elastase neutrofílica, mieloperoxidases, betagluconidases, metaloproteinases (MMP-8, MMP-9), lipocaína associada à gelatinase, proteinase 3 (PR3) e catepsina G. Além disso, estas células contribuem para a destruição do parênquima pela liberação de oxidantes como ânion superóxido (MACNEE et al., 1989. PAUWELS 2003).

Em uma reação inflamatória, vários fatores quimiotáticos são produzidos para que as células migrem para o sítio da inflamação, onde exercem função fagocitária liberando substâncias lesivas aos tecidos, desempenhando papel central na fisiopatologia do enfisema pulmonar (BARNES 2003; HOGG; SÊNIOR, 2002).

Em situações como infecção e fumo, os macrófagos e leucócitos são ativados e migram em grande quantidade para o pulmão, fazendo com que a reação inflamatória aconteça, a lesão ocorre no decorrer de anos como consequência desse constante “reparo”. O processo inflamatório pode acometer desde pequenas vias aéreas (menos de 2 mm) até mesmo os brônquios e bronquíolos. Acredita-se que a responsável pela ruptura das estruturas epiteliais de sustentação alveolar seja a inflamação persistente das vias respiratórias distais em pacientes com DPOC. Assim os ductos alveolares e os alvéolos perdem suas características estruturas (RUFINO; COSTA, 2013).

O processo inflamatório eleva os radicais livres fazendo com o que o estresse oxidativo aumente, liberando citocinas (1L-6, 1L-8, 1L-1 β e TNF- α) (DOURADO, et al., 2006).

O sistema imunológico influencia a dor, assim como a dor interfere no sistema imunológico, tornando difícil determinar se o bloqueio da nocicepção contribui para a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, ou se a redução da formação das mesmas resulta em dor menos intensa. Dessa forma, acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias participam do processo nocivo, as quais podem ter origem nas células imunológicas, neuronais e gliais, tanto no sistema nervoso central, quanto no periférico. Assim os marcadores inflamatórios poderiam ser os responsáveis pela redução do limar de dor em pacientes com DPOC, onde tais marcadores desencadeariam efeitos de hiperexcitabilidade crônica e alterações na expressão fenotípica dos nociceptores, levando a um processamento anormal dos sinais nocivos e exacerbação da sensação dolorosa (OLIVEIRA, et al., 2011).

A dor é uma sensação desagradável e subjetiva acompanhada de uma lesão real ou potencial, que pode ser classificada de diferentes formas dependendo da intensidade, duração e comportamento da doença (IASP, 1994).

Vivenciada por quase todos os seres vivos, a dor é um instrumento de proteção, ela permite a percepção de estímulos externos, os quais podem ser físicos, mecânicos e/ou químicos como nocivos (DWORKIN et al., 2010). Possibilitando o equilíbrio corporal, fazendo com que sinais sejam liberados para que diversas patologias possam ser identificadas (BASBAUM et al., 2009).

Dentre as manifestações dolorosas, as que ocorrem devido a injúria tecidual é a dor inflamatória e a neuropática, onde a estimulação do neurônio sensorial primário acontece já, a dor momentânea ou fásica a estimulação ocorre nos nociceptores, e a transmissão da informação dolorosa é feita por meio das fibras aferentes primárias C e A- δ (JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 2002).

Durante o processamento doloroso a nociceção tem um importante papel, fazendo parte da via nociceptiva, onde os mecanismos periféricos e centrais de transdução, transmissão, modulação e percepção acontecem, possibilitando que sinais neurais gerados por meio de uma resposta a um estímulo nocivo externo pode ser identificado (MILLAN et al., 2002).

O processo de transdução detecta a informação dolorosa, essa por sua vez passa pelo processo de transmissão, as quais ocorrem nas fibras aferentes primárias, onde formam conexões diretas ou indiretas com três populações de neurônios do corno dorsal da medula: interneurônios, subdivididos em excitatórios e inibitórios; neurônios próprios espinhais os quais permitem a ligação com vários segmentos da medula espinhal; neurônios de projeção que participam da transmissão através da medula espinhal até os centros supraespinhais (KLAUMANN et al., 2008).

No corno dorsal da medula espinhal ocorre a modulação da dor, nesse momento o estímulo no qual foi transmitido é reconhecido como nocivo ou não, em seguida sinapses entre neurônios de segunda ordem ocorrem liberando neurotransmissores, como substância P e glutamato, permitindo assim que tais estímulos possam ser caracterizados como excitatórios e/ou inibitórios (LIU et al., 1997).

A informação nociceptiva então ascende até os centros superiores, por meio dos tratos espinoreticulotalâmico ou espinotalâmico em direção ao tálamo, o qual redireciona a informação ao córtex somatossensorial, o mesmo processa o estímulo determinando a intensidade e a localização (MILLAN, 2002). Tal percepção pode caracterizar a dor como fásica (nociceptiva), inflamatória e neuropática (FOROUD; VERSAL, 2015).

Animais não possuem a capacidade de verbalizar quanto à ocorrência de dor, no entanto os mesmos podem apresentar sinais e comportamentos, respostas motoras e fisiológicas frente a estímulos nocivos, por esse motivo para animais não se utiliza o termo dor e sim nociceção (PERAZA, et al., 2007). Tais respostas são estudadas para que posteriormente possam ser comparadas na presença ou não de drogas para verificar a existência ou não de uma resposta álgica (PERAZA, et al., 2007).

Mediadas por neurônios sensoriais não mielinizados (fibras C) ou finamente mielinizados (fibras A δ), a dor fásica ou nociceptiva desempenha geralmente uma função biológica importante, uma vez que alerta o organismo para o perigo iminente e informa-o da ocorrência da lesão ou dano tecidual (WOLKERSTORFER, et al., 2016). O modelo para dor fásica utilizado no presente estudo, assim como no estudo descrito por Hernández (2003) foi o *Tail Flick test*, o qual avalia o comportamento doloroso momentâneo, através de um estímulo térmico, medido entre a exposição ao calor na cauda, até sua retirada (FOROUD; VESAL, 2015). O limiar nociceptivo é verificado por meio do tempo de latência do reflexo de retirada da cauda (PERAZA, et al., 2007).

As manifestações sistêmicas da DPOC são consequências da ativação das citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da DPOC (EAGAN, et. al., 2010), no entanto até o momento não foi descrito tal relação, não se sabe até que ponto o processo inflamatório influencia na ativação de nociceptores, gerando aumento da sensação dolorosa em indivíduos com DPOC (DOURADO, et al., 2006).

Achados clínicos sugerem que a liberação de mediadores inflamatórios pode contribuir para o desenvolvimento do hipermetabolismo, levando a uma resposta inadequada à ingestão alimentar, levando a alterações nutricionais observadas nos pacientes com DPOC. O TNF- α e a IL-1 β através da ativação e da aceleração da enzima ubiquitina proteassoma presente nos músculos esqueléticos periféricos pode estimular a proteólise, causar anorexia e alterações no metabolismo da leptina (DOURADO, et al., 2006).

Marcadores inflamatórios como o TNF- α , o fibrinogênio, a PCR, IL-6 e IL1- β já são associados à inflamação decorrente da DPOC, porém outros marcadores inflamatórios sistêmicos também podem ser analisados devido à sua capacidade para refletir vias inflamatórias envolvidas na patogênese da DPOC (EAGAN, et. al., 2010).

Na inflamação crônica da DPOC as células implicadas na atividade inflamatória são: os linfócitos T (predominando o linfócito CD8+), macrófagos e neutrófilos. A ativação destas células desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente leucotrieno B4 (LTB4), IL-6, IL-8 e TNF- α (CHIESA, KNORST, 2005).

As citocinas são polipeptídios ou glicoproteínas extracelulares produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteína quinases, ativadas por mitógenos, substância na qual estimula a proliferação celular. São polipeptídios hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa (OLIVEIRA, et al., 2011). Essas glicoproteínas são capazes de influenciar a atividade celular, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, regulando assim a produção e a atividade de outras

células, que podem elevar ou atenuar a resposta inflamatória. Em decorrência de diferentes estímulos, as citocinas são liberadas e interagem com os seus receptores regulando a função celular (OLIVEIRA, et al., 2011).

O TNF- α , foi descoberto em 1975 por Carswell et al., sendo considerada uma das principais citocinas relacionadas aos processos inflamatórios e imunes, agindo em partes diferentes do corpo (VITALE; ANDRADE; RIBEIRO, 2007). O TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos que após ser produzido e liberado o TNF- α irá ligar-se a receptores específicos denominados de receptores de TNF (TNF-R) I e II, para que possa produzir o seu efeito biológico. Desta forma, o principal efeito fisiológico do TNF- α é promover a resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los. Por esse motivo, essa citocina provoca uma série de efeitos e respostas no organismo (VITALE; ANDRADE; RIBEIRO, 2007).

A IL-1 inclui duas proteínas distintas a IL-1 α e a IL-1 β . A IL-1 β é produzida de maneira primária, por monócitos e macrófagos, mas também por células da glia e neurônios, células adrenais, células endoteliais, plaquetas, linfócitos T, neutrófilos, osteoblastos e fibroblastos. A sua função está relacionada com o início do processo inflamatório, sua produção induz a secreção de quimiotáticos, facilitando o recrutamento de mononucleares estimulando a secreção de interferon gama e ativação de macrófagos (CHIESA; KNORST, 2005).

A IL-6 é considerada uma citocina endócrina, com secreção durante o sono e regulação pelo ciclo circadiano. É uma proteína multifuncional, com 184 aminoácidos e 21 kDa, produzida por célula T, monócitos e macrófagos, fibroblasto, hepatócitos, células endoteliais, e por algumas células tumorais, sendo um dos principais estímulos para o eixo hipotalâmico durante o processo inflamatório e resposta imune. A IL-6 age estimulando a secreção de anticorpos pelas células B e a produção de IL-2 pelas células T (CHIESA; KNORST, 2005).

Novos estudos com o intuito de elucidar as manifestações sistêmicas tornam-se necessárias, para que estratégias de tratamento sejam descritas, principalmente em relação ao estado nutricional, disfunção dos músculos esqueléticos e no esclarecimento da relação de patologias como DPOC e sua influência no comportamento da resposta ao estímulo doloroso e/ou nocivo (DOURADO, et al., 2006; RUFINO; COSTA, 2013).

Embora existam estudos demonstrando a relação dos marcadores inflamatórios com a DPOC ainda não fica claro se as alterações sistêmicas causadas pela liberação de mediadores inflamatórios poderiam ser os responsáveis pela redução do limiar de dor em dpoéticos, e se

isso acontece verdadeiramente, esse fato ainda não foi descrito, não existindo nenhum trabalho descrevendo tal relação (DOURADO, et. al., 2006; EAGAN, et al., 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos foi possível observar um aumento na prevalência da morbidade e mortalidade por DPOC, sendo uma das principais causas de óbito no mundo. Estima-se que 12 % dos adultos maiores de 40 anos sejam acometidos pela doença. Segundo a Organização Mundial de Saúde, devido o aumento da expectativa de vida a doença passou a ser considerada uma epidemia. Tais dados sugerem que em um futuro próximo a DPOC se tornará um problema de saúde, fazendo com que o estudo de tal patologia se torne importante.

O acréscimo de marcadores inflamatórios e as alterações sistêmicas em pacientes com DPOC já vem sendo estudado, entretanto os mecanismos envolvidos na liberação desses marcadores relacionados à redução do limiar doloroso e/ou nociceptivo ainda é obscuro. A interação entre a inflamação sistêmica e o estresse oxidativo podem ser os responsáveis pela redução do limiar doloroso em dpcóticos, outro questionamento existente é se tal alteração do liminar de dor acontece verdadeiramente.

Nesse contexto, o presente estudo objetiva desenvolver modelos de enfisema induzidos por elastase pancreática suína no intuito de obter não só alterações estruturais, como também inflamatórias que se assemelhem aos da patologia no humano, propiciando melhor entendimento fisiopatológico da doença e a relação dos marcadores inflamatórios com o limiar nociceptivo.

Esse trabalho se justifica, pois os resultados encontrados poderão estimular estudos posteriores em humanos, a fim de beneficiar tratamentos futuros, onde a dor poderia ser um fator limitante para dpcóticos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Avaliar e determinar a interação entre a liberação de citocinas pró-inflamatórias nos modelos de dor inflamatória e neuropática pelo teste de *von Frey* e na dor física através do *Tail Flick*, em animais com a DPOC induzida por elastase pancreática suína e como tal morbidade pode interferir na liberação dos mesmos.

4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a relação das citocinas com a redução ou não do limiar nociceptivo em animais com DPOC;
- b) Determinar os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 liberados no processo inflamatório e seu efeito sobre o limiar nociceptivo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 144 ratos machos *Wistar*, com peso entre 250 a 300g, que foram mantidos no biotério do curso de Fisioterapia provenientes do Biotério Central do Campus da UNIFAL. Os ratos foram mantidos em gaiolas de acrílico, com a temperatura entre 18-21° C, 55-60% de umidade relativa, e ciclos de 12 horas claro/ escuro). Com ração padrão e água disponível até o dia do experimento.

As normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) foram seguidas em todos os experimentos (ZIMMERMANN, 1983).

As normas que regulamentam os aspectos éticos da utilização de animais em laboratório elaborados pela Comissão de Ética Experimentação em Animal da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL foram adotadas e seguidas rigorosamente, o presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL com o registro n^o19/2016.

5.2 Indução do Enfisema por Elastase Pancreática Suína

Experimentos utilizando animais como instrumento de pesquisa vêm sendo cada vez mais utilizados (CHUNG, 2004), permitindo a observação da evolução de várias doenças, dentre elas as pulmonares.

Alguns modelos experimentais para simular a DPOC são utilizados, dentre eles os três principais são: exposição à fumaça de cigarro, instilação intratraqueal de enzimas proteolíticas, e linhagens de animais geneticamente modificados (CERVILHA, 2014).

No presente estudo a protease utilizada foi a elastase pancreática suína, que em cerca de 21 dias após a aplicação da enzima já é possível observar lesão pulmonar seguida de mudanças morfológicas, remodelamento do parênquima pulmonar e comprometimento da função pulmonar, o que o tornou apto para estudar as alterações provocadas nas fibras do parênquima pulmonar do indivíduo com DPOC, fato comprovado no estudo de Hamakawa em 2011 e no de Santos et al., (2014).

Os animais foram anestesiados com cetamina (34 mg / kg, intraperitoneal, *ip*) e xilazina (12 mg / kg, *ip*), uma incisão cervical anterior para expor a traquéia foi realizada,

seguintes soluções foram instiladas utilizando um dispositivo estéril denominado **Scalpe** calibre 27, solução salina estéril (0,9% de NaCl, 5 μ L; grupo Sal) ou elastase pancreática suína (PPE; 0,6 U, Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluída em 5 μ L de solução de soro fisiológico (grupo DPOC induzido por elastase) (SANTOS, et al., 2014). A incisão cervical foi fechada com sutura de seda 4-0.



Figura 1- Animal sedado, incisão anterior da cervical para expor a traqueia. Fonte do autor.



Figura 2- Instilação da Elastase pancreática suína ou solução salina na traquéia do animal. Fonte do autor.

5.3 Modelos Experimentais

5.3.1 Modelo de Dor Fásica – Teste de Retirada da Cauda –*Tail Flick*

Modificado no ano de 1982 por Azami e colaboradores, o grau de antinocicepção foi medido por meio do teste de retirada da cauda (D`AMOUR; SMITH, 1941).

Sobre o equipamento de analgesímetro, com 2 cm da porção final da cauda o animal foi gentilmente imobilizado, o filamento de níquel-cromo aqueceu progressivamente a cauda do animal (aproximadamente 9°C/segundo) a partir da temperatura ambiente (23 ° C \pm 1° C) até que atingisse uma temperatura nociva (53°C) em aproximadamente 3 segundos.

O aquecimento foi interrompido em 6 segundos para evitar dano tecidual. Todos os animais tiveram o seu limiar basal avaliado para o reflexo de retirada de cauda, sendo utilizadas três medidas consecutivas com intervalos de 5 minutos. Após a medida basal, os animais passaram pela cirurgia traqueal com elastase / salina.

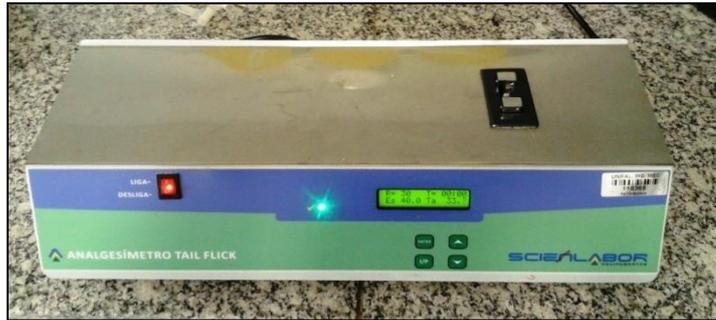


Figura 3- Aparelho do *Tail Flick*. Fonte do autor.

5.3.2 Modelo de Dor Inflamatória - Indução da hiperalgesia aguda por CFA

Para induzir a resposta inflamatória persistente, os animais receberam injeção de intraplantar (i.pl) de 100 μ L de adjuvante completo de Freud (CFA), na superfície planta da pata direita traseira. A hipernocicepção mecânica foi avaliada por meio da técnica do *von Frey* digital (CUNHA et al., 2007).

O grupo controle recebeu injeção i.pl. de salina (100 μ L). Quatro horas após a injeção de CFA ou salina, o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado (basal sem CFA e após o CFA).

5.3.3 Modelo de Dor Neuropática - Modelo de hiperalgesia neuropática periférica

No presente estudo para avaliação da dor neuropática o modelo utilizado foi o de constrição do nervo ciático (CCI) onde o mesmo sofreu quatro amarrações (BENNET; XIE, 1988). Os animais desenvolvem comportamentos que lembram neuropatia em humanos, como a proteção do membro lesado (animal tenta esconder a pata) sugerindo dor espontânea. Antes da cirurgia os animais foram anestesiados com cetamina (34 mg / kg, intraperitoneal, *ip*) e xilazina (12 mg / kg, *ip*). Para expor o nervo ciático, foi realizada uma incisão na região abaixo do glúteo onde a musculatura e a pele foram suturadas posteriormente. Com quatro amarrações com fio de seda separados por 2 mm o nervo sofreu a constrição, ao final da cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos para prevenir a hipotermia e, em seguida, recolocados no biotério de manutenção. Para os animais do grupo CCI-Sham, os mesmos tiveram somente o nervo ciático exposto, não sofrendo as quatro amarrações.

Três dias após o procedimento, os animais foram testados e considerados hiperalgésicos quando o limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos no teste de *von Frey* correspondeu a pelo menos, 50% do limiar de resposta basal.



Figura 4- Cirurgia de CCI “*Chronic Constriction Injury*”, com exposição do nervo ciático, o mesmo com quatro amarrações com fios de seda separados por aproximadamente 2 mm e sutura da pele e da musculatura do animal anestesiado. Fonte do autor.

5.3.4 Testes de nocicepção mecânica- Pressão contínua na pata (*von Frey* digital)

O limiar nociceptivo mecânico dos animais foi avaliado utilizando *von Frey* digital (Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil).

Os animais foram colocados em caixas de acrílico com a face dianteira posicionada sobre uma tela de arame propiciando acesso a pata traseira dos mesmos, após aproximadamente uma hora para que os animais se ambientassem com o local.

O teste foi realizado pelo aparelho *von Frey* eletrônico, através de uma ponta de polipropileno, aplicado perpendicularmente, à superfície plantar da pata traseira segundo Farghaly et al., (2016), por um período de aproximadamente 4 segundos ou até que o animal demonstre comportamento nociceptivo, caracterizado por retirada da pata, seguida de lambida da mesma e/ou “flinch”. A força utilizada é suficiente para gerar uma resposta positiva de retirada da pata (CHAPLAN et al., 1994).

O ramo sural do nervo ciático inerva a região avaliada da pata do animal, o qual não sofre qualquer tipo de manipulação neste modelo experimental. Assim, é uma região crítica no desenvolvimento da neuropatia, e, por isso, é a região analisada por *von Frey* eletrônico (RICHNER et al., 2011).



Figura 5- Aparelho para o teste de nociceção mecânica *von Frey* digital. Fonte do autor.



Figura 6- Animais posicionados na caixa de acrílico, por um período de ambientação de aproximadamente 1 hora. Fonte do autor.



Figura 7- Posição do animal dentro da caixa de acrílico, propiciando acesso a pata traseira dos animais para realização do teste de *von Frey*. Fonte do autor.

5.4 Métodos de detecção das citocinas pró-inflamatórias

5.4.1 Coleta de sangue

O sangue foi coletado por punção cardíaca, através da técnica a vácuo em ambiente estéril, pelo pesquisador, onde o mesmo foi estocado em armazenado para análises posterior. Após ser anestesiado com cetamina (34 mg / kg, intraoperitoneal) e xilazina (12 mg / kg intraperitoneal), o animal foi colocado em uma superfície plana, em decúbito dorsal, onde uma incisão na região anterior do tórax foi realizada e uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo para coleta do sangue. A punção cardíaca é a coleta final, pois o animal normalmente é sacrificado após este tipo de procedimento.

Os tubos foram centrifugados 1500 rpm, por 15 minutos, após a coleta. Posteriormente, o plasma foi retirado em capela de fluxo laminar, utilizando pipetas de Pasteur previamente esterilizadas. Posteriormente as coletas foram colocadas em Eppendorfs estéreis e estocadas no freezer a -80°C para a realização das análises. As amostras foram coletadas sempre pelo pesquisador e no mesmo horário, nos períodos de início do experimento, após 21 dias da aplicação da elastase pancreática e nos momentos de T_0 , T_1 , T_3 , T_{24} , os quais estão descritos no tópico procedimentos experimentais (BASYIGIT, et al., 2010).

5.4.2 Dosagens dos níveis plasmáticos dos mediadores inflamatórios

ELISA (*Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay*) é um teste imuno enzimático que permite a detecção de anticorpos específicos. Este teste é usado no diagnóstico de várias doenças que induzem a produção de imunoglobulinas.

No método ELISA o antígeno é preso a uma superfície (geralmente de poliestireno) através de um anticorpo. Uma vez o antígeno ligado ao anticorpo imobilizado, este complexo pode ser reconhecido por outro anticorpo, desta vez ligada a uma enzima que possa produzir um composto facilmente detectável. Para a análise dos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram coletados 4 mililitros de sangue. (BASYIGIT, et al.2010)

As análises das concentrações plasmáticas dos mediadores inflamatórios foram realizadas pelo método de ELISA do tipo sanduíche, por meio do kit Quantikine (HS, R&D Systems Minneapolis) para analisar níveis de TNF- α IL-1 β e IL-6, segundo as instruções do fabricante (BASYIGIT, et al., 2010; CHIESA; KNORST, 2005; GOMES, et al., 2015).

5.5 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos. Sendo: grupo dor fásica, grupo dor inflamatória, grupo dor neuropática. No grupo dor fásica 16 ratos tiveram DPOC induzido, e os outros 16 animais (grupo controle) os quais tiveram instilação de salina em sua traqueia não possuíam a doença, seguindo o mesmo procedimento da indução da DPOC, no entanto no lugar da elastase foi administrada salina. Nos momentos de T₀, T₁, T₃, T₂₄ foi aplicado o teste de *Tail Flick*, e 16 animais tiveram sangue retirado para análise dos marcadores inflamatórios do tal grupo.

No grupo dor inflamatória, 16 ratos com DPOC induzido foram submetidos à CFA, e 16 com DPOC foram submetidos à aplicação de salina na pata, e 16 animais tiveram sangue retirado para análise dos marcadores inflamatórios. No grupo dor neuropática, 16 ratos com DPOC sofreram a cirurgia de CCI, e 16 ratos dpoéticos sofreram a cirurgia mais não tiveram o nervo ciático suturado (CCI-SHAM). Em ambos os grupos em seus respectivos T₀, T₁, T₃, T₂₄ o teste de *von Frey* foi realizado e 16 animais tiveram sangue retirado para análise dos marcadores inflamatórios.

5.6 Protocolos Experimentais

5.6.1 Modelo de dor Fásica – *Tail Flick*

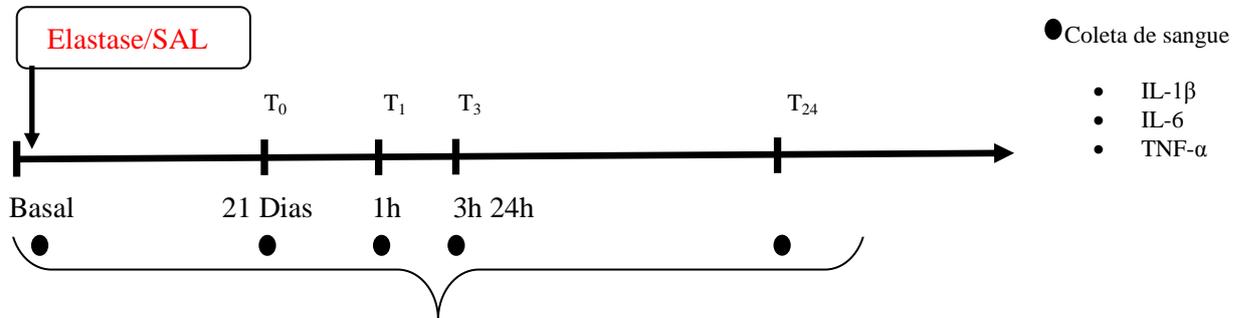


Figura 8- Delineamento do experimento realizado no grupo Dor Fásica. Onde ● indica coleta de sangue para dosagem de citocinas. T0: tempo zero, T1: tempo 1 hora, T3: tempo 3 horas, T24:tempo 24 horas.

5.6.2 Modelo de dor Inflamatória

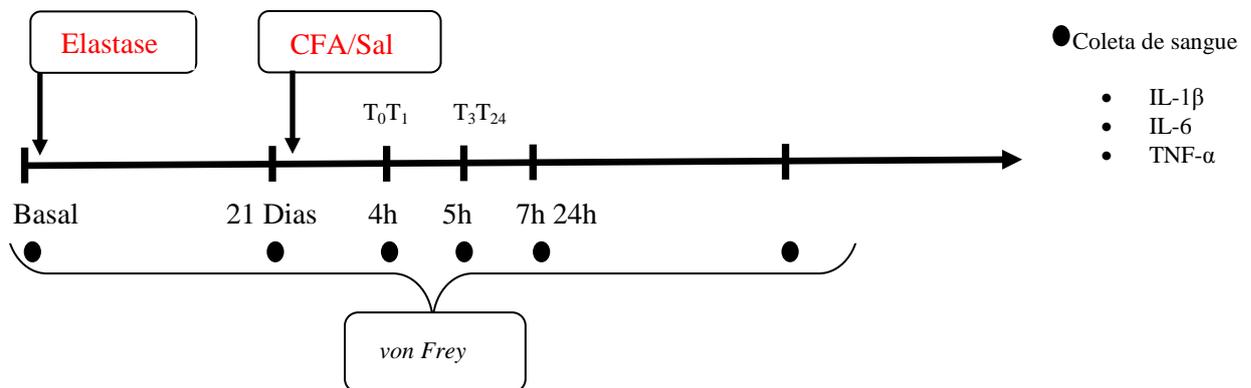


Figura 9- Delineamento do experimento realizado no grupo Dor Inflamatória. Onde ● indica coleta de sangue para dosagem de citocinas. T0: tempo zero, T1: tempo 1 hora, T3: tempo 3 horas, T24:tempo 24 horas

5.6.3 Modelo de dor Neuropática

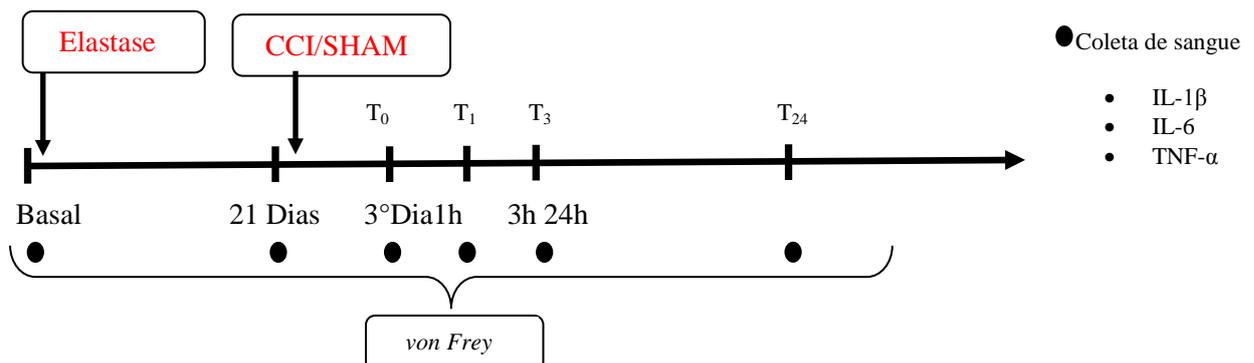


Figura 10- Delineamento do experimento realizado no grupo Dor Neuropática. Onde ● indica coleta de sangue para dosagem de citocinas. T0: tempo zero, T1: tempo 1 hora, T3: tempo 3 horas, T24:tempo 24 horas.

5.6.4. Análise estatística

Para avaliação dos dados foi utilizando a análise de variância – ANOVA (two-way) e as comparações pelo teste de post-hoc de Bonferroni, utilizando o *Software Statistical Package for the Social Sciences* (SSP) (IBM, Chicago, USA) versão 15.0. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Foram analisados 144 ratos machos Wistars com idade média de 8 semanas, com peso entre 250 a 300g, houve perda de 40 animais decorrente do procedimento anestésico. Os animais avaliados eram pertencentes aos grupos de dor fásica (32 animais), grupo dor inflamatória (32 animais) e grupo dor neuropática (32 animais) e 48 animais para dosagem e análise das citocinas. Os dados avaliados foram dispostos em forma de gráficos.

Para os animais avaliados pelo método de retirada de cauda foi possível observar diferença estatisticamente significativa no tempo 0, que corresponde ao horário da cirurgia de indução do DPOC através da instilação de elastase pancreática suína, porém com intervalo de 21 dias pós cirurgia para que a manifestação da patologia ocorresse. Tal diferença também foi observada no T1, T3, T24.

Pelo gráfico 1 foi possível observar que os animais com DPOC induzido, ao serem avaliados pelo teste *Tail Flick* apresentaram retirada antecipada da cauda quando comparado aos animais do grupo controle. No tempo 0, os animais dpocíticos tiveram um período de latência em torno de 2,8 segundos enquanto que no grupo controle a retirada era em 3,5 segundos aproximadamente. O período de latência reduziu discretamente nos momentos de T1, T3, T24 para os animais do grupo DPOC, apresentando valores próximos à 2,7 segundos.

A presença da patologia nos animais levou os mesmo a terem alteração no limiar nociceptivo, através do teste de retirada da cauda – *Tail Flick* é possível observar que ratos dpocíticos têm respostas diferentes a dor fásica quando comparado ao grupo controle, demonstrando que tais ratos têm redução do limiar nociceptivo.

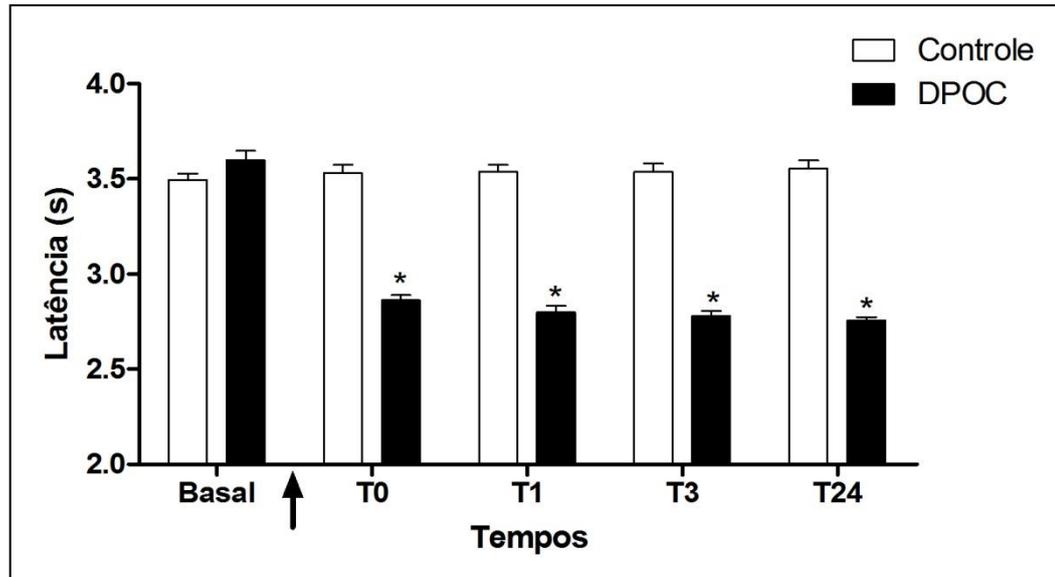


Gráfico 1- Avaliação da dor no grupo dor fásica, utilizando o teste de *Tail Flick* nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0, T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24. *significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina. No gráfico 1, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58} = 4,21, p < 0,01$) tempo ($F_{4,126} = 0,12, p < 0,05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{8,126} = 8,83, p < 0,05$).

Para análises das citocinas no grupo Dor fásica, é possível observar no gráfico 2, níveis de marcadores inflamatórios próximos para o basal, visto que a indução do enfisema ainda não tinha sido realizada.

Após a indução do enfisema foram encontradas diferenças significativas para a IL-1 β , onde em T0 os valores desses marcadores tiveram o aumento evidente, os níveis plasmáticos dos mesmos mais que dobraram em relação ao grupo de animais sem a DPOC, houve um discreto declínio no decorrer do tempo, porém a diferença estatística se manteve.

Porém para a IL-6 e para o TNF- α , essa discreta redução dos níveis plasmáticos não ocorreu, ao contrário, houve um aumento da concentração desses marcadores no decorrer dos tempos até o T24, com diferenças estatisticamente significativas.

Ao analisarmos os gráficos 1 (Tail-Flick) e gráfico 2 (Citocinas –Grupo dor Fásica), é possível observar que em ambos os gráficos em seus momentos de T0), houve diferença significativa, indicando que no momento da retirada da cauda, tempo de latência dos animais com DPOC foi menor e coincide com níveis mais elevados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , o mesmo ocorre em todos os tempos.

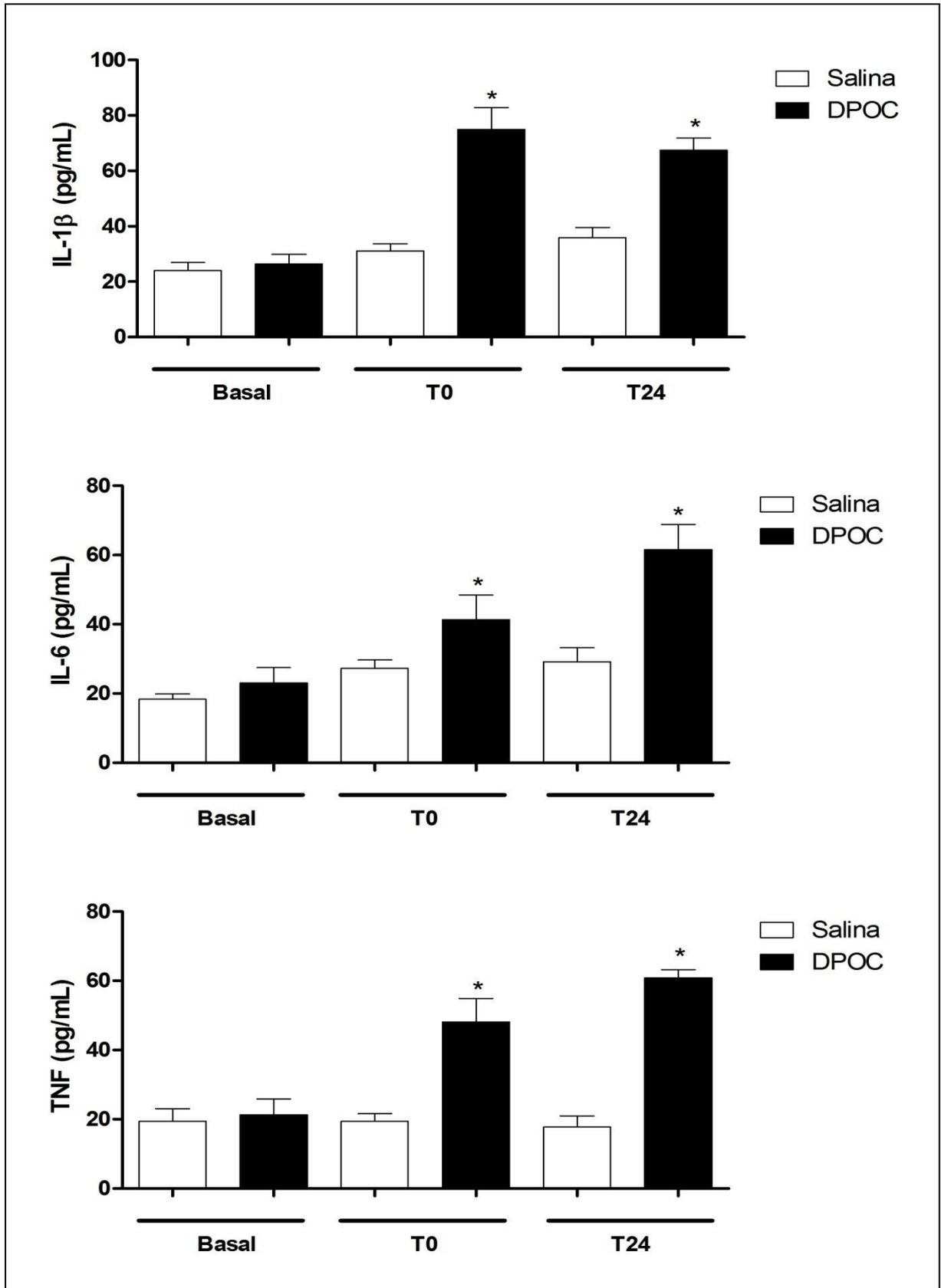


Gráfico 2- Avaliação dos marcadores inflamatórios dos animais pertencentes ao grupo dor física, realizando a retirada do sangue dos mesmos nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0, T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24. *significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo Salina. No gráfico 2, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58} = 3.18$, $p < 0.01$) tempo ($F_{2,18} = 3.32$, $p < 0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{5,18} = 4.23$, $p < 0.05$).

Para o modelo de dor Inflamatória foi aplicado CFA na pata direita dos animais para indução da hiperalgesia aguda, onde o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado utilizando o teste de *von Frey* digital durante um período aproximado de 4 segundos ou até que o animal demonstre comportamento nociceptivo, caracterizado por retirada da pata, seguida de lambida da mesma e/ou “*flinch*”.

Analisando o gráfico 3 é possível observar que para os valores do basal no teste de *von Frey*, todos os animais dos subgrupos apresentaram respostas semelhantes.

Em tempo 0 tanto os animais com DPOC induzida e salina na pata apresentaram valores de limiar de pressão próximos, indicando que para o limiar mecânica feito pelo *von Frey* a presença da DPOC não influenciou na retirada antecipada da pata, no entanto ao analisarmos o grupo de animais hígdos com injeção de CFA e animais com DPOC e CFA podemos observar uma diferença quando comparado com os grupos salina na pata. Após a indução da hiperalgesia aguda pelo CFA os animais com DPOC apresentaram um limiar de pressão inferior aos dos animais hígdos injetados com CFA, sugerindo que o processo inflamatório sistêmico da DPOC potencializou a resposta inflamatória local causada pela hiperalgesia aguda do CFA.

Tal fato se repetiu nos tempos 1 hora, 3 horas e tempo 24 horas.

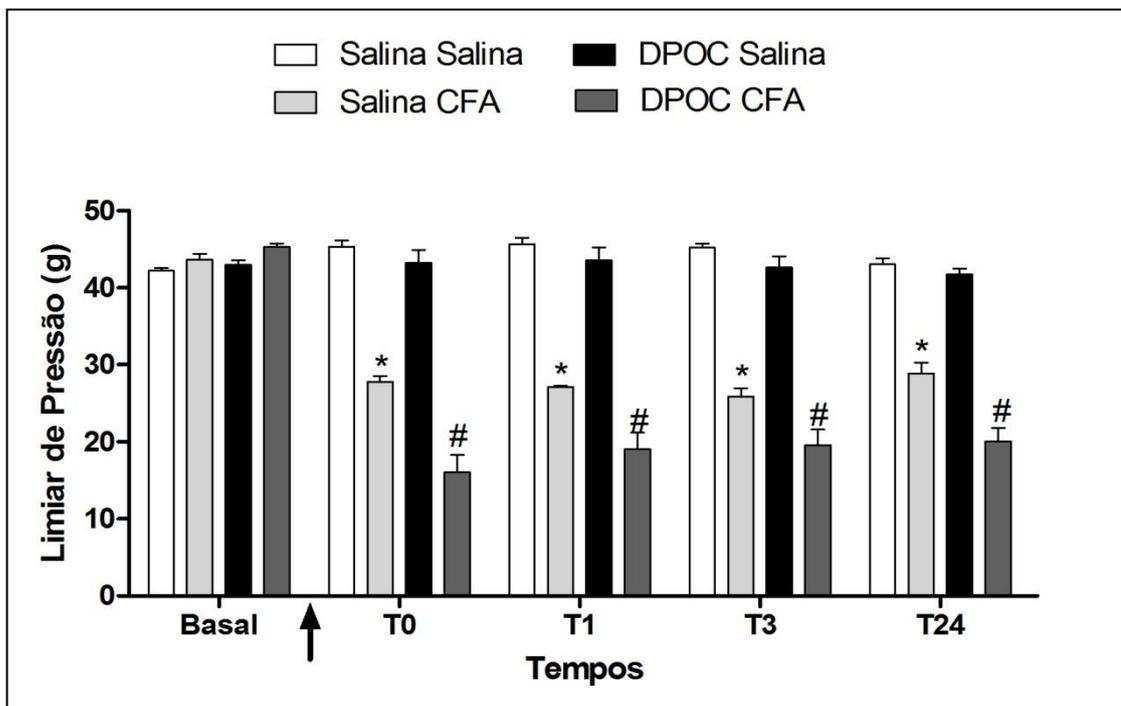


Gráfico 3- Avaliação da dor no grupo dor inflamatória, utilizando o testes de nocicepção mecânica- pressão crescente pata *von Frey* nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0, T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24. *significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo Salina. # Diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). No gráfico 3, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{3,20} = 65.43, p < 0.01$) tempo ($F_{4,56} = 19.67, p < 0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{12,56} = 44.53, p < 0.05$).

Os níveis de citocinas pró-inflamatória do grupo dor inflamatória mantiveram valores próximos entre os grupos no basal e no T0. Vale ressaltar que os animais pertencentes a tal grupo, para análise das citocinas, todos os animais tiveram a indução da hiperalgesia por CFA, sendo o subgrupo salina (animais sem DPOC) e o DPOC (animais com a patologia), visto que a intenção dessa avaliação era de verificar o comportamento dos marcadores inflamatórios de animais com e sem DPOC frente a um processo de hiperalgesia aguda.

Os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α apresentaram-se em maior quantidade no plasma em animais com DPOC no tempo 24 horas, com diferença significativas, sugerindo que em vinte e quatro horas após a indução da hiperalgesia por CFA, as citocinas pro-inflamatórias oriundas do processo inflamatório sistêmico da DPOC associados com os mediadores inflamatórios do processo causado pelo CFA levou a tal aumento, fato que corrobora com os resultados encontrados e apresentados no gráfico 3.

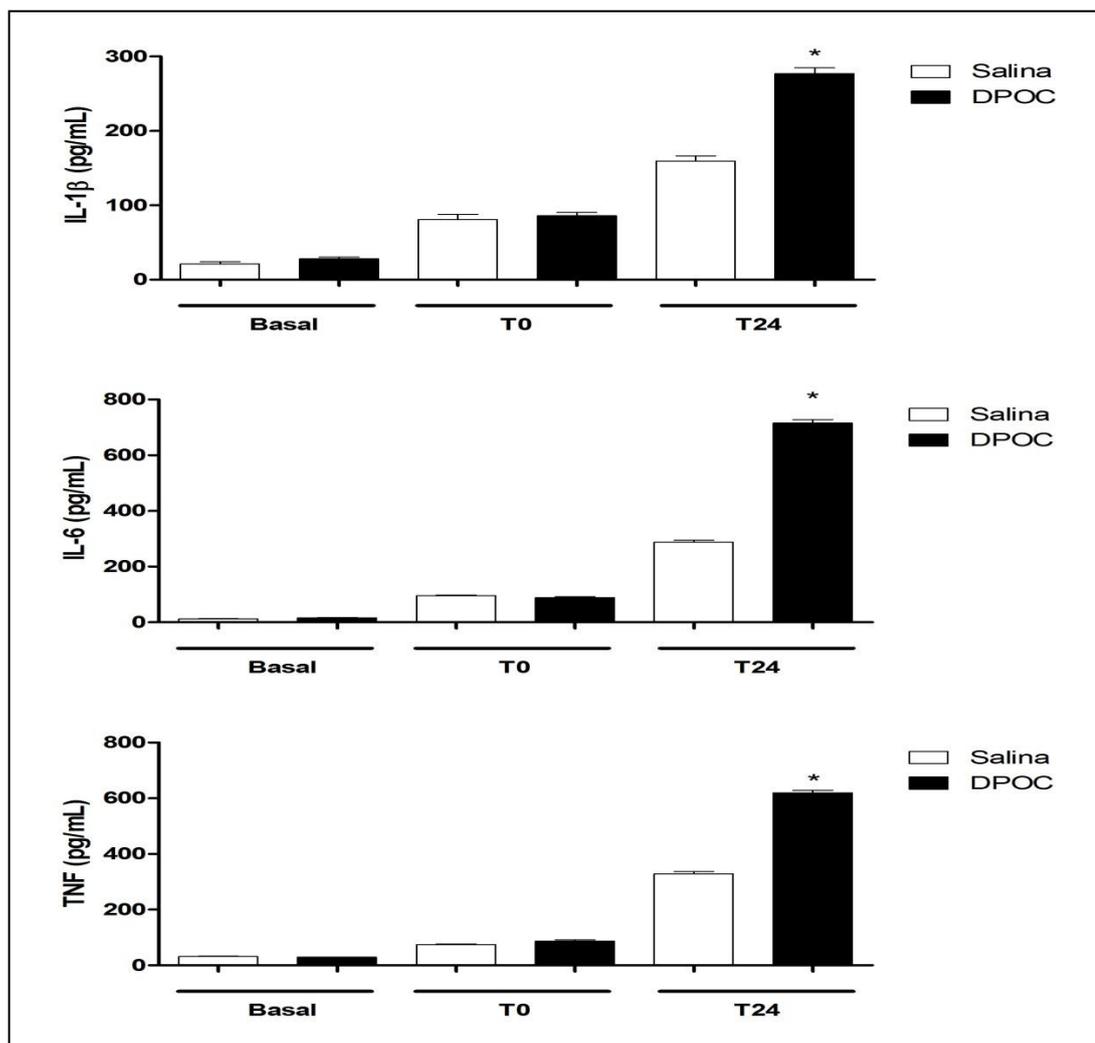


Gráfico 4- Avaliação da dos marcadores inflamatórios no animais pertencentes ao grupo dor inflamatória, ocorrendo a retirada do sangue para análise nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0 ,T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24. *significância ($p < 0,05$). No gráfico 4, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58} = 5.87$, $p < 0.01$) tempo ($F_{2,18} = 13.19$, $p < 0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{5,18} = 8.61$, $p < 0.05$).

Para o grupo dor neuropática, os dados foram dispostos no gráfico 5, onde é possível observar resultados similares aos do grupos dor inflamatória. O limiar de pressão apresentou valores próximos em todos os grupos para o basal, com valores em torno de 42g aproximadamente.

Para os animais que sofreram a cirurgia de CCI – Sham tanto os animais com DPOC quanto os animais sem a patologia, ambos apresentaram valores de limiar de pressão próximos dos valores basal do *von Frey*, evidenciando que a cirurgia de CCI-sham não alterou o limiar de pressão de tais animais.

No entanto para os animais que sofreram a cirurgia de CCI é possível observar uma diferença significativa no limiar de pressão quando comparados com os animais CCI – Sham. Porém os animais pertencentes ao grupo DPOC- CCI quando comparado aos animais sem a doença com a cirurgia de constrição no nervo ciático o resultado foi estatisticamente significativo no limiar de pressão para o teste de *von Frey*, sugerindo que a presença de citocinas inflamatórias oriundas da DPOC potencializa as alterações do limiar de pressão do *von Frey* para a cirurgia de constrição do nervo ciático.

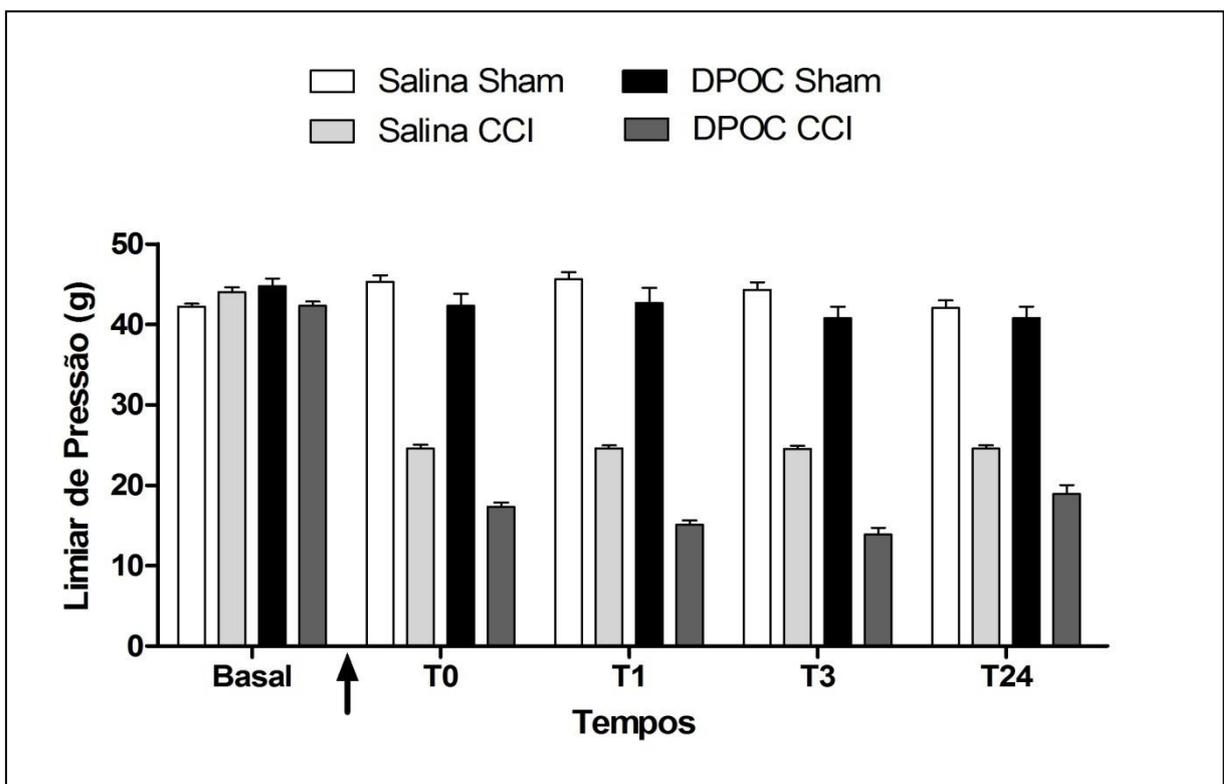


Gráfico 5- Avaliação da dor no grupo dor neuropática, utilizando o testes de nocicepção mecânica- pressão crescente na pata *von Frey* nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0 ,T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24.*significância ($p<0,05$)em relação ao grupo salina salina. # Diferente de todos os grupos ($P<0,05$). No gráfico 5, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{3,20}= 43.88$, $p<0.01$) tempo ($F_{4,56}=56.71$, $p<0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{12,56}= 69.11$, $p<0.05$).

Ao analisarmos os marcadores inflamatórios no grupo dor neuropática (Gráfico 6), podemos observar uma diferença estatisticamente significativa ao compararmos os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α de animais sem DPOC que sofreram a cirurgia de CCI (salina), e animais com DPOC que também sofreram a cirurgia do CCI, nos tempos T0 e T24. No tempo 0, tal diferença foi menos pronunciada do que no tempo 24 horas, porém com resultado significativo em ambos os tempos.

Como já foi descrito anteriormente, os animais com DPOC tiveram uma resposta ainda mais evidente para o teste de *von Frey* quando os mesmos tiveram a cirurgia do CCI, quando com parado com os animais sem patologia que passaram pela cirurgia, o que corrobora com os resultados expostos no gráfico a seguir, onde os níveis plasmáticos de tal marcadores de encontravam em maior número em animais dpoéticos.

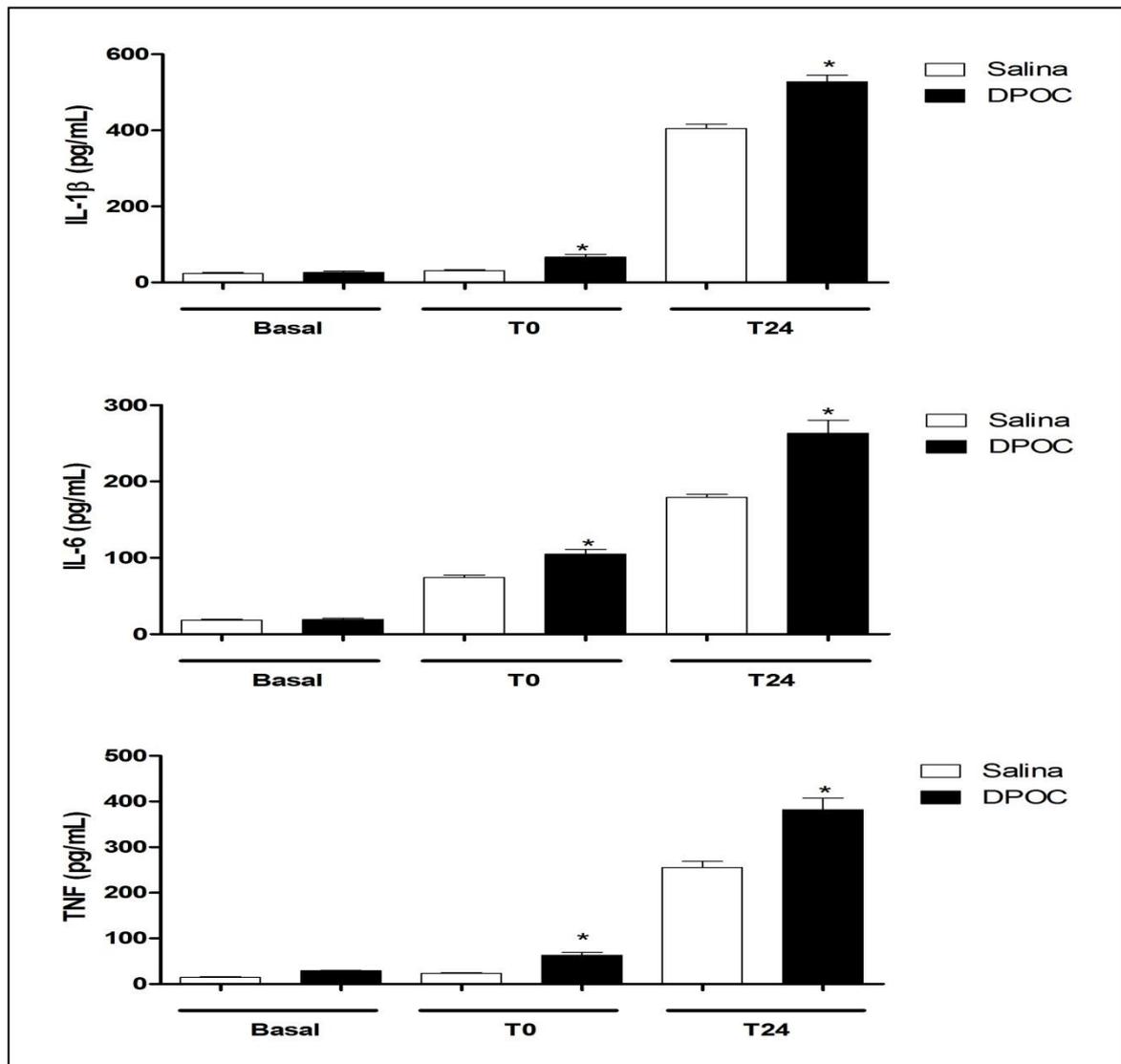


Gráfico 6- Avaliação dos marcadores inflamatório do animais pertencentes ao grupo dor neuropática, utilizando a retirada de sangue para análise posterior nos momentos: basal (antes da indução da DPOC), nos tempos T0, T1, T3, ambos realizados após 21 dias da cirurgia da indução, e posteriormente T24. *significância ($p < 0,05$). No gráfico 6, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58} = 12.11$, $p < 0.01$) tempo ($F_{2,18} = 4.62$, $p < 0.05$) e tiveram interação tempo x tratamento ($F_{5,18} = 18.33$, $p < 0.05$).

7 DISCUSSÃO

A DPOC tem como patogênese uma série de processos lesivos, que incluem a resposta inflamatória anormal dos pulmões frente a partículas inaladas e/ou gases tóxicos, falha na reparação de células anormais, resolução deficiente do processo inflamatório, apoptose precoce, destruição da matriz extracelular pelo desequilíbrio protease/antiprotease e oxidante/antioxidante (RUFINO; COSTA, 2013).

Vários métodos são utilizados como modelo de indução do enfisema, o modelo empregado no presente estudo foi de instilação de enzima proteolítica, elastase pancreática suína, no entanto existem outros métodos como inalação de fumaça de cigarro, instilação de enzimas proteolíticas: protease de planta (papaína), elastase de neutrófilos humanos (HNE) e instilação de lipopolissacarídeos intratraqueal (CERVILHA, 2014).

Wright e Churg (1995) apresentaram o primeiro modelo utilizando fumaça de cigarro em cobaias, onde os mesmos foram expostos ao fumo de forma passiva durante aproximadamente 20 semanas. Acredita-se que tal modelo retrata a forma moderada de DPOC centrolobular e desenvolvimento de metaplasia de células caliciformes das vias aéreas, assim o mesmo parece ser o modelo que retrata as alterações pertencentes aos seres humanos de maneira mais fidedigna (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008; TOLNAI, et al., 2012).

Em contraste a utilização de enzimas elastolíticas está muito bem descrita, com a vantagem de ter um custo menor, tempo de instalação do DPOC mais rápido, enquanto que a exposição à fumaça de cigarro leva seis meses para a instalação da patologia (BARNABÉ, 2010) o que poderia tornar o experimento inviável. Existe também uma falta de padronização, podendo ocorrer variações principalmente quanto ao sistema e ao protocolo de exposição à fumaça de cigarro e aos tipos de cigarros utilizados (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008). Tais fatos foram decisivos para a escolha do modelo de indução da DPOC no presente trabalho.

O modelo de DPOC com instilação traqueal de enzimas proteolíticas busca mimetizar o enfisema ocorrido em humanos fumantes com base na hipótese protease-antiprotease (WRIGHT; COSIO; CHURG, 2008). O desequilíbrio protease/anti-protease da DPOC foi constatada após observações em fumantes que apresentavam alto índice de α 1-antitripsina e risco aumentado de desenvolver a doença (BARNES, 2007). Desde então, várias enzimas com a capacidade de degradar elastinas intactas foram instiladas nos pulmões de animais para a produção do enfisema pulmonar (ANTUNES; ROCCO, 2011; BARNES, 2007).

Quando instiladas na traqueia, as elastases destroem as elastinas, produzindo assim aumento da resistência das vias aéreas e redução da elasticidade pulmonar e

consequentemente da complacência segundo Barnes (2007), induzindo o enfisema pulmonar com características panacinar após uma única instilação intratraqueal (SNIDER, 1986; 1992).

Inicialmente ocorre uma perda de fibras de colágeno e elastina. Posteriormente os níveis de elastina tendem a diminuir, a matriz extracelular tem sua estrutura reduzida e as vias aéreas apresentam-se de forma anormal (BARNABÉ, 2010).

São modelos que provocam anormalidades da função pulmonar, hipoxemia e metaplasia de células secretoras (GRONEBERG; CHUNG, 2004). Associados a tais eventos ocorrem o processo inflamatório, que leva a lesão das paredes alveolares, tais lesões são próximas das encontradas nos pacientes com DPOC. Dessa maneira a evolução da doença deve-se, em grande parte, aos efeitos destrutivos exercidos pelas células inflamatórias (GRONEBERG; CHUNG, 2004).

Estudos científicos comprovam que a exposição do pulmão de roedores frente à instilação de enzimas promove inflamação pulmonar aguda (DEMEDTS et al., 2006), seguida de mudanças estruturais e morfológicas (SNIDER; LUCEY; STONE, 1986) comprometendo a função pulmonar (CHUNG, 2004), fazendo com que o pulmão do animal adquira características próximas ao do pulmão de um humano com DPOC (INOUE, e tal., 2010), onde as características são próximas do enfisema pulmonar. Além disso, para melhor ajuste da doença em modelos experimentais existe a possibilidade de utilizar inibidores enzimáticos (WRIGHT; CHURG, 2008), tais inibidores não foram utilizados no presente estudo.

Hantos e colaboradores (2008) em seu trabalho relataram que a indução do enfisema pulmonar com elastase pancreática suína em camundongos produziu danos pulmonares similares aos danos encontrados no enfisema dos seres humanos que fumaram durante 5 anos, no entanto nosso estudo fez uso da elastase pancreática suína só que em ratos, o que poderia ter efeitos diferentes.

Em seu estudo Shapiro (2000) descreveu a permanência do processo inflamatório meses após a DPOC instalada, sugerindo que inflamações em múltiplas células estruturais ocorrem contribuindo para piora da destruição alveolar na DPOC.

Assim como no presente estudo Barnes (2007) em seu trabalho induziu o enfisema em ratos utilizando o modelo com elastase pancreática suína, ressaltando que o modelo é o mais comum, os resultados encontrados por ele sugerem que após a instilação da enzima ocorre uma destruição severa alveolar acompanhada por um remodelamento sutil da parede das vias aéreas, reforçando que o modelo de enfisema empregado em nosso estudo promoveu as alterações necessárias para avaliar a patologia em animais.

A DPOC tem como consequência uma série de efeitos sistêmicos importantes, tais como a inflamação sistêmica, devido presença do estresse oxidativo sistêmico, concentrações anormais de citocinas circulantes e ativação das células inflamatórias (KUNIKOSHITA, et al., 2006; DOURADO, et. al., 2006). Trata-se de uma doença pulmonar com manifestações extrapulmonares onde as células inflamatórias liberam substâncias como elastase, colagenase, as quais modificam os componentes da matriz extracelular (DOURADO, et. al., 2006; RUFINO; COSTA, 2013).

Diversos mediadores envolvidos no processo inflamatório são responsáveis pelos eventos vasculares da inflamação, podendo estimular os neurônios sensoriais locais, o que colabora para o surgimento da dor e/ou nocicepção (GILMAN, et al., 2006; SPINOSA et al., 2006; RANG et al., 2007; ROTH et al., 2009). No presente estudo foi possível observar que animais com DPOC apresentaram níveis elevados de marcadores inflamatórios sendo eles IL-1 β , IL-6 e TNF- α , em todos os grupos.

Em doenças que cursam com processo inflamatório crônico como a DPOC, estudos demonstram que as citocinas podem induzir o organismo a criar uma série de respostas na tentativa de acelerar as reações enzimáticas defensivas, aumentando a proliferação de células imune, reduzindo a replicação de patógenos, dentre outros. As citocinas podem então ser reconhecidas por neurônios e desencadear assim diversas reações intracelulares que irão determinar alterações na atividade elétrica do nervo por tempo indeterminado (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE; 2006).

Na patogênese do enfisema os macrófagos alveolares desempenham uma função primordial, onde os mesmos são ativados por vários sinais extracelulares, os quais podem estar associados à resposta antimicrobiana e inflamação ou associados à cicatrização e resolução da inflamação (CRUZ et al., 2012).

Já se sabe que as citocinas pró-inflamatórias exercem papel fundamental na nocicepção periférica (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE; 2006), porém a relação das mesmas com o limiar nociceptivo de indivíduos com DPOC ainda não foi descrito em nenhum trabalho. No entanto no presente estudo para o teste de *Tail Flick*, método que também avalia o reflexo de retirada sob interferência de projeções centrais, os resultados mostraram que os ratos pertencentes ao grupo DPOC apresentaram limiar de latência inferior ao do grupo controle, onde os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α estavam aumentados, indicando que tais marcadores contribuíram para a percepção alterada do limiar nociceptivo de animais dpocíticos.

O processo inflamatório atua na geração da dor não somente pelos efeitos da migração de leucócitos, acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias participam do processo nocivo, podendo ter origem nas células imunológicas neuronais e gliais, tanto no SNP e no SNC, onde tais moléculas podem desencadear efeitos de hiperexcitabilidade crônica levando a alterações na expressão fenotípica dos nociceptores, que tem como consequência o processamento anormal e exacerbação dos sinais nocivos (OLIVEIRA, C. M. B. et al., 2011).

Durante um processo inflamatório agudo e/ou crônico as citocinas, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , são consideradas fundamentais na geração da hiperalgesia e alodinia (ZARINGHALAM, J. et al., 2010). Tais marcadores inflamatórios foram os analisados no presente estudo, para que a sua relação com o limiar nociceptivo de animais dpo-cítico pudesse ser elucidada.

A dor inflamatória ocorre por danos no tecido, devido aos estímulos nocivos (químicos, físicos, mecânicos), constituindo um desequilíbrio na homeostase, o qual perturba a integridade do tecido e dispara uma resposta mediada por células efectoras, que liberam mediadores químicos, e sensibilizam a via periférica. (HARGREAVES; RUPAREL, 2016; KANDEL et. al., 2000).

Liberados por macrófagos, mastócitos, linfócitos dentre outros, diversos neuromediadores inflamatórios ativam os nociceptores (fibras nervosas tipos A δ e C), facilitando a transmissão dolorosa e alterações inflamatórias periféricas, levando consequentemente ao quadro de hiperalgesia (BASBAUM; BUSHNELL, 2003).

Estudos demonstram que a ocorrência de traumas, de processos inflamatórios, de infecções virais, de distúrbios endócrinos dentre outros, contribui de forma evidente para estimulação persistente do sistema nervoso (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE; 2006).

Na persistência do estímulo agressivo local, as células da glia as quais possuem propriedades autoreguladoras perdem a capacidade de manter a homeostase bioquímica, fazendo com que o neurônio perca a função celular e morte programada (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE; 2006). Tal fato pode justificar os achados encontrados no presente estudo, onde a persistência de citocinas pró-inflamatórias oriundas do processo inflamatório sistêmico da DPOC poderiam ser os responsáveis pela percepção do estímulo nocivo alterado.

Citocinas pró-inflamatórias ativam a via nociceptiva, os neuromediadores periféricos facilitam a despolarização da membrana neuronal por tempo prolongado, exacerbando a hiperalgesia ou a alodínia. Isso se deve pelo aumento da condutividade de canais de sódio ou cálcio, ou também pela redução do influxo de cloro ou potássio para o meio intracelular (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE; 2006). Concordando como presente estudo, onde

foi possível encontrar níveis elevados de marcadores inflamatórios, onde os animais dpocíticos reconheceram o estímulo térmico como nocivo de forma antecipada, quando comparado com os animais sem a doença.

Lesões as quais acometem o SNP são capazes de modificar tanto a fisiologia quanto a anatomia do SNC com hiperatividade celular, predominantemente no corno dorsal da medula espinhal, no tálamo e no córtex cerebral (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE; 2006).

Corroborando com as justificativas do estudo em questão, Woolf e Salter (2000) já descreviam que as alterações na expressão de canais iônicos, de sinapses e nos receptores das células nervosas são capazes de promover mudanças em neurotransmissores e neuromediadores, permitindo que neurônios centrais e/ou periféricos atinjam o limiar para despolarização mais precocemente, gerando descargas ectópicas que se amplificam e ativam células vizinhas onde estímulos periféricos nociceptivos podem levar a uma sensibilização sináptica clássica, aumentando assim a resposta de fibras aferentes A e C (MILLAN et al., 2002).

Para avaliação da dor inflamatória o presente estudo utilizou o teste de pressão crescente na pata feito pelo *von Frey*, os resultados encontrados comprovam que houve diferença frente à resposta nociva nos ratos dpocíticos que tiveram CFA aplicado na pata, uma vez que quando comparados a animais sem a doença pulmonar e injetados com CFA, os animais com DPOC tiveram uma resposta exacerbada, sugerindo que os marcadores inflamatórios que se encontram elevados nos indivíduos com doença podem ter contribuído para que resposta frente o limiar de pressão. A hiperalgesia aguda induzida pelo CFA é frequentemente recomendada para modelos animais. Corroborando com os achados do trabalho aqui apresentado, autores relatam que animais com injeção de CFA apresentam níveis elevados de IL-6 no soro, associado à hiperalgesia e edema da pata durante a primeira semana após a injeção, indicando que a elevação desse marcador contribuiu para surgimento da dor e do edema (ZARINGHALAM, et al., 2008).

Níveis elevados de IL-6 no soro podem ser os responsáveis pela secreção de alguns neurotransmissores tais como, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, contribuindo para ativação dos mesmos (RUZEK, et al., 1997).

De acordo com Fonseca et al., (2009) na inflamação induzida pelo CFA a IL-6 parece ser de grande importância visto que a mesma tem um participação na indução do processo inflamatório e da geração da dor (ZARINGHALAM, et al., 2010).

A estimulação feita pela IL-6 sobre as fibras aferentes de nociceptores pode causar hiperalgesia durante a inflamação (ZARINGHALAM, et al., 2010). Assim como no presente

estudo, onde os animais dpoicíticos do grupo dor inflamatória apresentaram limiar de pressão inferior quando comparado com animais sem a patologia quando ambos tiveram CFA aplicado, sugerindo que ocorreu uma somatização de células pró-inflamatórias contribuindo para exacerbação do reconhecimento do estímulo mecânico, contudo outros marcadores apresentaram-se aumentados, não somente a IL-6, como descrito acima, mas também as IL-1 β e TNF- α .

A inflamação induzida pelo CFA ocorre em 2 fases, sendo fase precoce (aguda) e tardia (crônica) (PHILIPPE, et al., 1997). Na fase aguda, diferentes mediadores são liberados como histamina, serotonina e quinina, os quais migram para o local da lesão (MALEKI, et al. 2001). Após a indução com o CFA a inflamação vem acompanhada pelo aumento de radicais livres e de citocinas (ZARINGHALAM, et al.,2008). A fase tardia é caracterizada pelos eventos imunológicos mediados por células (PATIL, et al., 2009).

Durante um processo inflamatório agudo e ou crônico as citocinas: IL-1 β , IL-6 e TNF- α , são as principais responsáveis pelo surgimento da hiperalgesia, e assim pela sensibilização neuronal (ZARINGHALAM, J. et al., 2010).

A sensibilização ocorre quando nociceptores são expostos aos produtos oriundos do dano tecidual e da inflamação (cascata inflamatória), como histamina, bradicinina, citocinas e TNF- α (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os mediadores liberados na resposta inflamatória, referentes à dor e/estímulo nocivo, são divididos em mediadores hiperalgésicos intermediários que são liberados no início e durante a inflamação, e mediadores hiperalgésicos finais, que fazem interação direta com seus receptores específicos ou nociceptores de neurônios aferentes primários, provocando sua sensibilização/estimulação segundo Cunha et al., (2007), gerando assim, uma redução do limiar de excitabilidade neuronal, aumento da atividade espontânea da célula nervosa e aumento da frequência de disparo por uma resposta a estímulos supralimiarres (WALL; MELZACK, 1999). Tais evidências podem justificar os resultados encontrados no presente estudo, onde o grupo DPOC apresentou alteração da resposta ao estímulo nocivo (teste *Tail Flick*), evidenciando a presença de uma inflamação sistêmica capaz de alterar no limiar nociceptivo em ratos.

A dor que tem como origem o processo inflamatório é resultado da participação dos mediadores inflamatórios oriundos do tecido danificado, com os neurônios sensoriais periféricos (ALEY et al., 2000). Fato este que pode justificar os resultados encontrados no teste de *von Frey*. Tais mediadores não somente sensibilizam os nociceptores como podem também desencadear a própria resposta nociva (FERREIRA et al., 2010). Assim devido a

sensibilização dos nociceptores, a chance de estímulos anteriormente inócuos se tornarem nocivos são maiores (ALEY et al., 2000; FERREIRA et al., 2010), ocorrendo modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos permitindo o surgimento da hiperalgisia inflamatória (FERREIRA, 2008). Corroborando com o presente estudo, onde uma possível sensibilização dos nociceptores ocorreu devido a inflamação sistêmica oriunda da DPOC.

Os mediadores responsáveis por tal sensibilização são divididos em dois grupos: mediadores hiperalgésicos intermediários e os mediadores hiperalgésicos finais.

Os mediadores hiperalgésicos intermediários são liberados no início e durante o processo inflamatório, onde libera outros mediadores intermediários. Os hiperalgésicos finais se ligam a receptores específicos dos neurônios aferentes primários, levando a modificações no limiar de ativação destas células nervosas (FERREIRA, 2008; LEVINE, 1999; ALEY et al., 2000).

Destacam-se como mediadores hiperalgésicos finais os eicosanóides (prostaglandinas e prostaciclina), a serotonina, as aminas simpáticas, os leucotrienos, o fator de agregação plaquetária e a histamina (FERREIRA, et al., 2010).

A ativação e estimulação persistente de nociceptores, decorrente da lesão tecidual observada durante o processo inflamatório acarreta em alterações plásticas no tecido nervoso periférico e central (SCHOLZ; WOOLF, 2002; HOLDEN; PIZZI, 2003), concordando com os resultados encontrados nesse trabalho.

Estudos descrevem a relação existente entre a função neuroimune e a nocicepção isso se deve ao fato de que as citocinas, quimiocinas e neurotrofinas estão envolvidas no início e na manutenção das síndromes dolorosas crônicas, principalmente a dor neuropática (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE; 2006).

O modelo de dor neuropática que promove alterações no SNP através de uma lesão ou ligadura de nervos periféricos resulta em quimiotaxia de amebócitos para o local e consequentemente liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e o TNF (FOROUD; VESAL, 2015). Corroborando com os achados do presente estudo, onde os animais pertencentes ao grupo dor neuropáticas que não sofreram a contração do nervo ciático não apresentaram diferenças quanto ao limiar de pressão, porém os animais os quais sofreram a cirurgia do CCI apresentaram um limiar de pressão inferior. No entanto, quando comparados os animais sem a patologia que sofreram a CCI e dpcócos, foi possível observar que ambos tiveram alteração do limiar de pressão, porém para aqueles com os níveis de marcadores já em maior quantidade (animais com DPOC) tal limiar sofreu alteração de forma mais expressiva,

atingindo valores menores, sugerindo que as citocinas presentes no DPOC foram capazes de ampliar a resposta do estímulo de nocicepção mecânica.

CUI e colaboradores (2000) em seu estudo analisaram vários modelos de compressão nervosa, evidenciando assim um aumento na expressão dos níveis de IL-6 e TNF- α em ratos com alodínia em relação aos animais hígidos, correlacionando o aumento de tais citocinas com a intensidade do quadro patológico do modelo de dor neuropática, corroborando com o trabalho atual, onde foi possível observar também o aumento de tais marcadores em animais que sofreram a cirurgia CCI, contudo os níveis foram ainda maiores nos animais dpoéticos os quais sofreram a cirurgia.

Com a sensibilização da via, o neurônio tende a disparar descargas elétricas subsequentes mesmo ao breve estímulo intracelular, fazendo com que ocorra a despolarização neuronal (FARGHALY; MAHMOUD; ABDEL-SATER, 2016). São mecanismos que aumentam a sensibilidade de nociceptores mecânicos, desencadeando reflexos imediatos a estímulos agressivos posteriores, fazendo com que ocorra uma redução do limiar para resposta nociceptiva anteriormente inócuas (FOROUD; VESAL, 2015).

O TNF é umas das citocinas analisadas no presente estudo, a mesma tem a capacidade de iniciar a cascata inflamatória, ativando outras citocinas contribuindo para eficácia da mesma (ABDEL-SATER, 2016; FARGHALY; MAHMOUD), várias células podem liberar tal citocina, inclusive as de Schwann, seus efeitos acontecem através da interação com o receptor do TNF tipo I (sTNRF1), os quais tem sua expressão aumentada após a lesão neuronal (HOMMA; BRULL; ZHANG,2003). Tal marcador inflamatório no presente apresentou-se com níveis mais elevados após a indução da DPOC em todos os modelos de dor, tanto o fásico, quanto inflamatório e neuropático.

Este fato pode ser justificado, visto que o TNF- α estimula fibras nervosas periféricas do tipo C, reduzindo seu limiar de ativação frente a estímulos mecânicos, gerando alodinia mecânica. O mesmo aumenta as correntes iônicas dos canais de sódio, atuando também na condutância dos canais de potássio afetando a capacidade das células gliais, resultando em maior vulnerabilidade neuronal (OLIVEIRA, et al., 2011).

No presente estudo foi possível observar que após a instalação do enfisema os níveis de alguns marcadores inflamatórios dentre eles a IL-1 β apresentaram-se aumentados. Segundo Oliveira e colaboradores (2016) são necessárias doses repetidas de elastase para que as manifestações sistêmicas da DPOC se manifeste e assim, marcadores inflamatórios pudessem ser encontrados a nível sistêmico, discordando do presente estudo onde fizemos a instilação única de 6 U PPE, e após 21 dias foi possível observar alterações tanto no limiar

nociceptivo quando nos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos ratos com DPOC. Tal diferença pode ser justificada, pois o presente estudo foi feito em ratos *Wistar* machos, enquanto que o estudo feito em 2016 utilizou camundongos fêmeas (CRUZ et al., 2012; OLIVEIRA, et al., 2016).

Segundo Oliveira e colaboradores (2016), a primeira instilação (0,2 U) de elastase levou ao um número aumentado de células mononucleares no parênquima pulmonar, a segunda dose (mais 0,2 U, total de 0,4) resultou em alvéolos hiperinflados, com aumento da interceptação linear média e redução da fibra elástica no parênquima pulmonar; a terceira instilação (mais 0,2 U, total de 0,6) levou ao aumento de neutrófilos e de fibras de colágeno nos septos e vias aéreas, enquanto que a elasticidade pulmonar estática foi reduzida, e então somente após a quarta instilação (mais 0,2 U, total de 0,8) foi possível observar o aumento na porcentagem de macrófagos no pulmão onde os níveis de IL-1 β tiveram níveis elevados, discordando dos achados encontrados no trabalho atual, onde os níveis de IL-1 β se apresentaram elevados após uma única instilação de elastase, e associados a tal evento houve também alteração do limiar nociceptivo, evidenciando o papel dos marcadores inflamatórios no disparo do estímulo nocivo. Uma limitação do presente estudo, a falta de histologia dos pulmões, é justificada pelo modelo robusto de DPOC pela elastase. Entretanto, amostras de pulmões de alguns grupos foram coletadas para análise posterior.

Contudo a administrações de doses repetidas de elastase para o desenvolvimento do enfisema experimental e suas consequências fisiopatológicas permanecem desconhecidas, sendo necessários mais estudos (OLIVEIRA, et al., 2016). Os resultados apresentados no presente estudo mostraram que após a instilação da elastase pancreática suína os animais apresentaram níveis elevados de marcadores inflamatórios, o aumento da produção e da liberação desses mediadores, levam ao um estado de excitação na medula espinhal decorrente da estimulação excessiva das fibras aferentes na qual induz uma redução do mecanismo inibitório devido a perda de interneurônios inibitórios gabaérgico, ampliando mais o processo doloroso (MILLAN, 2002). Gerando um estado de hiperexcitabilidade da via nociceptiva (HUCHO; LEVINE, 2007; SALTER, 2000; WOOLF; COSTIGAM, 1999; WOOLF).

O conjunto de modificações tanto funcionais como estruturas do nociceptores decorrente de uma lesão tissular é conhecido como neuroplasticidade. A eficácia da condução sináptica é descrito na literatura como sensibilização, a mesma pode acometer tanto o sistema nervoso central como o sistema nervoso periférico de pacientes com exposição crônica de agentes agressores no sistema nervoso (WOOLF; SALTER, 2000). Como em dpoCíticos, onde a exposição crônica de marcadores inflamatórios sistêmicos como IL-1 β , IL-6 e TNF- α ,

são capazes de alterar a percepção nociceptiva, tal fato foi encontrado no presente estudo, onde animais os quais tiveram o enfisema induzido por elastase, além de apresentarem níveis aumentados de tais marcadores, os mesmos também tiveram respostas diferentes frente ao estímulo mecânico, animais dpocíticos além de apresentarem limiar de latência inferior (*Tail Flick*), os mesmos também apresentam um limiar de pressão reduzido quando comparado com animais sem a patologia que passaram pelos mesmos procedimentos tanto de indução de hiperalgesia por CFA quanto que pelo CCI.

8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados é possível verificar que os animais dpocíticos apresentam níveis elevados de marcadores inflamatórios, sendo eles IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Animais com DPOC apresentam respostas alteradas frente ao estímulo nocivo, ao mesmo tempo em que os níveis de citocinas se encontravam elevadas, sugerindo que a patologia em questão além promover manifestações pulmonares, o processo inflamatório sistêmico oriundo da DPOC interfere na percepção do estímulo nocivo.

Contudo foi possível observar uma modificação somente na presença do estímulo tanto do CFA quanto da CCI, indicando que na presença do processo inflamatório local ou em uma neuropatia as citocinas sistêmicas provenientes da DPOC se somariam causando uma exacerbação do estímulo mecânico.

REFERÊNCIAS

- AGUSTÍ A. G; et al. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. **Eur. Respir. J.** 21, 347–360. 2003
- ANTUNES, M. A;et al. Effects of different mesenchymal stromal cell sources and delivery routes in experimental emphysema. **Respir. Res.** 15:118. 10.1186. 2014
- ANTUNES, M. A., Rocco, P.R.M., Elastase-induced pulmonary emphysema:insights from experimental models. **An. Acad. Bras. Cienc.**83, 1385–1395.2011.
- ARRUDA JL, COLBURN RW, RICKMAN AJ, RUTKOWSKI MD, DELEO JA: Increase of interleukin-6 mrna in the spinal cord following peripheral nerve injury in the rat: Potential role of il-6 in neuropathic pain. **Brain Res: Mol Brain Res** 62: 228-35, 1998.
- AZAMI, J.; LLEWELYN, M.B.; ROBERTS, M.H.The contribution of nucleus reticularisparagiganto cellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. **Pain**, v. 12, p. :229–246, 1982
- AOSHIBA, K.; YOKOHORI, N.; NAGAI, A. Alveolar wall apoptosis causes lung destruction and emphysematous changes. **Am J Respir Cell MolBiol**, v. 28, p. 555-562, 2003.
- ANTUNES M. A; ROCCO P. R. M.Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models .**An Acad Bras Cienc** 2011.
- ALLER, M.A. et al. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225-234, 2006.
- ALWANI, M.E. et al. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response.**Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 171-183, 2006.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain.**Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009
- BASBAUM A, BUSHNELL MA: Pain: Basic mechanisms. In: Giamberardino MA (ed.), Pain 2002-an updated review: **Refresher course syllabuss**. 1ªed., IASP Press: Seattle, 3-7p., 2002.

BANKS WA, KASTIN AJ: Saturable transport of peptides across the blood-brain barrier. **Life Science** 41: 1319-38, 1987.

BARNABÉ, V. **Efeitos da atividade física intensa e moderada sobre o enfisema pulmonar**. 2010. 70f. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BARNES, P. J. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. **Ann Rev Med**, v. 54, p. 113-29, 2003.

BARNES, P. J.; SHAPIRO, S. D.; PAUWELS. R. A. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. **Eur Respir J**, v. 22, p. 672-688, 2003.

BATES, J. H.; BACONNIER, P.; MILIC-EMILI, J.A theoretical analysis of interrupter technique for measuring respiratory mechanics. **J ApplPhysiol**, v. 64, p. 2204-2214, 1988.

BATES, J. H. et al. Interrupter resistance elucidated by alveolar pressure measurement in open-chest normal dogs. **J ApplPhysiol**, v. 65, p. 408-414, 1988.

BATES, J. H. et al. Measurement of alveolar pressure in closed-chest dogs during flow interruption. **JApplPhysiol**, v. 67, p. 488-492, 1989.

BATES, J. H. T. et al. Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. **JApplPhysiol**, v. 59, p. 732-737, 1985.

BATES, J. H. T.; ROSSI, A.; MILIC-EMILI, J. Analysis of the behavior of the respiratory system with constant inspiration flow. **JApplPhysiol**, v. 58, p. 1840-1848, 1985.

BARNES, P. J. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. **Ann Rev Med**, v. 54, p. 113-29, 2003

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheralmononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.

BIRREL, M. A. et al. Steroid-resistant Inflammation in a Rat model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease is Associated with a Lack of Nuclear Factor- κ B Pathway Activation. **Am J RespirCritCareMed**, v. 172, p. 74-84, 2005.

BISELLI, P. J. C. Efeito da exposição à fumaça de cigarro e ao resíduo de óleo diesel (ROFA) em pulmões de camundongos C57/B16.2008. **Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, USP.**São Paulo, 2008.

BRABER, S. et al. Inflammatory changes in the airway of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation. **Respiratory Research**, v. 11, p. 99, 2010.

BOYD RL, Fisher MJ, Jaeger MJ. Non-invasive lung function tests in rats with progressive papain-induced emphysema. **RespirPhysiol**1980; 40: 181- 90.

BREWER, K. K. et al. Lung and alveolar wall elastic and hysteretic behavior in rats: effects of in vivo elastase treatment. **J ApplPhysiol**, v. 95, p. 1926–1936, 2003.

BRITTON, J. R. et al. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. **Am J RespirCrit Care Med**, v. 151, p. 1383–1387, 1995.

BEAVERS, K.M.; BRINKLEY, T.E.; NICKLAS, B.J. Effect of exercise training on chronic inflammation. **ClinicaChimica Acta**, v. 411, p. 785-793, 2010.

BUSS, A.S.; SILVA, L.M.C. Comparative study of two quality of life questionnaires in 3 patients with COPD. **Jornal Brasileiro Pneumologia**.2009;35(4):318-324

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.

BENNETT GJ: Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: Focus on the nmda-receptor. **J Pain Sympt Man** 19: S2-6, 2000.

BREWER, K. K. et al. Lung and alveolar wall elastic and hysteretic behavior in rats: effects of in vivo elastase treatment. **J ApplPhysiol**, v. 95, p. 1926–1936, 2003.

BARNES P.J. Falha inesperada da terapia de fator de necrose anti-tumor na doença pulmonar obstrutiva crônica. **Am J RespirCritCareMed** 175 : 866-867, 2007.

BARTELES B, CAVARRA E, FINESCHI S, LUCATTELLI M, LUNGHI B, MARTORANA PA, LUNGARELLA G. Diferentes respostas pulmonares à fumaça de cigarro em duas linhagens de camundongos sensíveis a oxidantes. **EurRespir**. 25 : 15-22, 2005.

BATES DV. Chronic bronchitis and emphysema. In: macklempt and permutt s, eds. The Lung in the Transition Between Health and Disease. Vol. 12. New York, **Marcel Dekker Inc**. 1979. pp.1-13.

BERGE S, WEDZICHA J. A. Exacerbações da DPOC: Definições e classificações. **EurRespir J** 21 , S41: 46S-53S, 2003.

BRADLEY PR. British herbal compendium: a handbook of scientific information on widely used plant drugs[M]. **Bournemouth: British Herbal Medicine Association**, 1992.

BRICKS, L.F.; SILVA, C.A.A. Toxicidade dos anti-inflamatórios não-hormonais. **Pediatria**, v.27, n.3, p.181-193, 2005

BOTTING, R.M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v.31, p.208-219, 2006.

COSTA R. L; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Rev Bras Med Esporte**.2002; 8:167-72.

CUI, J. G, HOLMIN S, MATHIESEN T, MEYERSON BA, LINDEROTH B: Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. **Pain**88: 239-48, 2000

CHIESA, D.; KNORST, M. M. Efeito do exercício físico sobre a liberação de interleucina -1 β , interleucina -6, fator de necrose tumoral- α em homens portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. **Programa de Pós graduação em Medicina– Pneumologia**. Porto Alegre, RS, 2005.

CERVILHA D. A. B. Avaliação experimental da responsividade das vias aéreas em camundongos após indução do enfisema pulmonar por elastase. **Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, no Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas**, 2014.

CUNHA,T. M;VERRIJR;POOLE,S;PARADA,C.A; CUNHA,F.Q;FERREIRA,S.H; Painfacilitationbyproinflammatorycytokineactionsatperipheralnerveterminals. **Immune and Glial Regulation of Pain**, p. 67–83,2007.

CUNHA FQ, LORENZETTI BB, POOLE S, FERREIRA SH: Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br J Pharmacol** 104: 765-7, 1991.

CARDOSO, W. V. et al. Collagen and elastin in human pulmonary emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, p. 975–981, 1993.

CHANG, H. K.; MORTOLA, J. P. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement.**J ApplPhysiol**, v. 51, p. 218-225, 1981.

CHEN, C.; FANG, X.; CHANG, C. Surfactante and corticosteroid effects on lung function in a rat model of acute lung injury.**Crit Care Med**, v. 29, p. 2169-75, 2001.

CHENG, S. L. et al. Prevention of elastase-induced emphysema in placenta growth factor knock-out mice. **Respiratory Research**, v. 10, p. 115, 2009.

CHURG, A. et al. An MMP-9/-12 inhibitor prevents smoke-induced emphysema and small airway remodeling in guinea pigs. **Thorax**, v. 62, p. 706-713, 2007.

CHURG A., Wright J. L. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive lung disease. **Contrib. Microbiol.** 14, 113–125. 10.1159/0000107058. 2007

CHURG A., ZHOU S., WRIGHT J. L. (Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease: matrix metalloproteinases in COPD. **Eur. Respir. J.** 39, 197–209.. 2012.

CIBA GUEST SYMPOSIUM REPORT.Terminology, definitions and classifications of chronic pulmonary emphysema and related conditions.**Thorax**, v. 14, p. 286-99, 1959.

CROXTON, T. L. et al. Future research directions in chronic obstructive pulmonary disease.**Am J respire Crit Care Med**, v. 165, p. 838-844, 2002.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway Annu. **Rev. Neurosci**, v. 24, p. 487–517, 2001.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

COSTIGAN M.; SCHOLZ J.; WOOLF J.C. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Rev Neurosci**, n.32, p. 1–32, 2009.

CUNHA, T.M. et al.; Pain facilitation by proinflammatory cytokine action at peripheral nerve terminals. **Immune and Glial Regulation of Pain**, p. 67–83, 2007.

CRUZ, F. F. et al. . (2012). Protective effects of bone marrow mononuclear cell therapy on lung and heart in an elastase-induced emphysema model. **Respir. Physiol. Neurobiol.** 182, 26–36. 10.1016/j.resp.2012.01.002

DAWKINS, P. A.; STOCKLEY, R. A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 56, p. 972-977, 2001.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J Immunol Methods**, v. 232, p. 3–14, 1999.

DALLEGRI, F.; OTTONELLO. Tissue injury in neutrophilic inflammation. **Inflamm Res**, v. 46, n. 10, p. 382-91, 1997.

DAWKINS, P. A.; STOCKLEY, R. A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 56, p. 972-977, 2001.

DE JONG, J. W. et al. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. **Respir Med**, v. 91, n. 2, p. 67-76, 1997.

DEGENS, H. et al. Apoptosis and Id2 expression in diaphragm and soleus muscle from the emphysematous hamsters. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 1, p. R135-44, 2007.

DEMEDTS, I. K. et al. Matrix metalloproteinases in asthma and COPD. **Curr Opin Pharmacol**, v. 5, p. 257-263, 2005.

DEMEDTS, I. et al. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. **Respiratory Research**, v. 30, n. 7, p. 53, 2006.

DESSEIN PH, SHIPTON EA, STANWIX AE, JOFFE BI: Neuroendocrine deficiency-mediated development and persistence of pain in fibromyalgia: A promising paradigm? **Pain** 86: 213-5, 2000.

DOURADO; V. Z; et. al. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. 2006;32(2):161-71.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L.A method for determining loss of pain sensation. **JPharmacolExpTher**, v. 72, p. 74-79, 1941.

DHAMI, R. et al. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1 antitrypsin. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 22, n. 2, p. 244-52, 2000.

DEVOR, M.; Sodium channel and mechanism of neuropathic pain. **J Pain**, v. 7, p. 3-12, 2006.

DUNNILL, M. S. Emphysema. In: **Pulmonary pathology**. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1982. p.81-112.

DAWKINS P.A; STOCKLEY R. A. The animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**.56.12.972. 2001

DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clinic proceedings**. **Mayo Clinic**, v. 85, p. S3-S14, 2010.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.101, p.8-16, 2008.

DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clinic proceedings**. **Mayo Clinic**, v. 85, p. S3-S14, 2010.

ERICSSON A, KOVACS KJ, SAWCHENKO PE: A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. **J Neurosci**14: 897-913, 1994.

EAGAN, T.M.L.; et. al. Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study. **Eur Respir J** 2010; 35: 540-548

FAFFE, D. S. et al. Comparison of rat and mouse pulmonary tissue mechanical properties and histology. **J Appl Physiol**, v. 92, p. 230-234, 2002.

FABBRI L. M., LUPPI F., BEGHÉ B., RABE K. F. Complex chronic comorbidities of COPD. **Eur. Respir. J.** 31, 204–212.2008.

FARGHALY, H.S.M., MAHMOUD, A.M., ABDEL-SATER, K.A. Effect of dexmedetomidine and cold stress in a rat model of neuropathic pain: Role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . **European Journal of Pharmacology**, 2016.

FLESHNER M, e al. Interleukin-1 beta induced corticosterone elevation and hypothalamic ne depletion is vagally mediated. *Brain Res Bull* 37: 605-10, 1995.

FERREIRA SH, LORENZETTI BB, CUNHA FQ, POOLE S: Bradykinin release of tnf-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **AgentsActions** 38: C7-9, 1993.

FINLAY G. A., et al.: elastina e colágeno remodelação no enfisema. Um estudo de microscopia eletrônica de varredura. **Am J Pathol** 1996 **149**: . 1405-1415

FIGUEIRÔA, S. F. S. Dimorfismo sexual no modelo experimental de enfisema pulmonar induzido por papaína em camundongos. 2009. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.**

FRICKER M., DEANE A., HANSBRO P. M. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. **Exp. Opin. Drug Discov.** 9, 629–645. 10.1517. 2014.

FINKELSTEIN, R. et al. Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 152, p. 1666–1672, 1995.

FINLAY, G. A. et al. Elastin and collagen remodeling in emphysema: a scanning electron microscopy study. **Am J Pathol**, v. 149, p. 1405–1415, 1996.

FLOREANI, A. A. et al. Smoke and C5a induce airway epithelial ICAM-1 and cell adhesion. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 29, n. 4, p. 471-82, 2003.

FORONJI, R. F. et al. Structural emphysema does not correlate whit lung compliance: lessons from the mouse smoking model. **Exp Lung Res**, v. 31, p. 547-562, 2005.

FONSECA JE, SANTOS MJ, CANHO H, CHOY E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. **Auto immun Rev**, 2009, 8(7) : 538-542

FREGONESE, L.; STOLK, J. Hereditary alpha-I-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 3, p. 16, 2008.

FULLMER, H. M.; SHEETZ, J. H.; NARKATES, A. J. Oxytalan connective tissue fibers: a review. **J Oral Pathol**, v. 3, p. 291-316, 1974.

FEIN, A. **Nociceptores**: As células que sentem dor. Dor OnLine, 2011. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>>. Acesso em: 16 dez 2015.

FERREIRA, S.H. et al. Dor Inflamatória. In Dor - Princípio e prática. **São Paulo: Artmed**, 2009.

FOROUD, M.; VESAL, N. Evaluation of the anti-nociceptive effects of morphine, tramadol, meloxicam and their combinations using the tail-flick test in rats **Veterinary Research Forum**. v. 6 (4), p. 313 – 318, 2015.

FUSCO, L. B. et al. Papain-induced experimental pulmonary emphysema model in rats. **J Pneumol**, v. 28, n. 1, p. 107, 2002.

FLÓ C, et al. Effects of exercise training on papaininduced pulmonary emphysema in Wistar rats. **J Appl Physiol** 2006; 100(1):281-385.

FROST R. A; LANG CH, Gelato MC. Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor-alpha inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. **Endocrinology** 1997;138(10):4153-9.

FERREIRA, S.H.; FERRARI, L.F.; CUNHA, T.M.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; VERRI, W.A.; CUNHA, F.Q. **Dor Inflamatória**. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/Html/DorInflamatoria.html>>, Acessado em: outubro/2010.

FOROUD, M.; VESAL, N. Evaluation of the anti-nociceptive effects of morphine, tramadol, meloxicam and their combinations using the tail-flick test in rats. **Veterinary Research Forum**. v. 6 (4), p. 313 – 318, 2015.

GARRY, E.M.; JONES, E.; FLEETWOOD-WALKER, S.M. Nociception in vertebrates: key receptor participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 2, p. 216-224, 2004.

GOODMAN, L., et al. Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.56-62, 2009.

GONÇALVES, J.C.; et al. Antinociceptive activity of (-) Carvone: Evidence of association decrease peripheral nerve excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p.1017-1020, 2008.

GANESAN, S. et al. Quercetin prevents progression of disease in elastase/LPS-exposed mice by negatively regulating MMP expression. **Respiratory Research**, v. 11, p. 131, 2010.

GARDI, C. et al. Collagen breakdown products and lung collagen metabolism: an in vitro study on fibroblast cultures. **Thorax**, v. 49, p. 312–318, 1994.

GORDON, L.; SNIDER. Clinical Relevance Summary: Collagen VS Elastin in Pathogenesis of Emphysema; Cellular Origin of Elastases; Bronchiolitis VS Emphysema as Cause of Airflow. **Chest**, v. 117, p. 244S-246S, 2000.

GOLD – Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary diseases. COPD, 2015. Disponível em: <<http://www.goldpoc.com.br/arquivos/GOLD-Report-Portugues.pdf>>

GRONEBERG, D. A.; CHUNG, F. K. Models of chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Research**, v. 5, n. 18, 2004.

GROSS, P. et al. Experimental emphysema: its production with papain in normal and silicotic rats. **Arch Environ Health**, v. 11, p. 50-8, 1965.

GUERASSIMOV, A. et al. The development of emphysema in cigarette smoke-exposed mice is strain dependent. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 170, n. 9, p. 974-80, 2004.

GAN W Q., et al. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. **Thorax**. 2004;59(7):574-80. Comment in: **Thorax**.2005;60(7):612-3; author reply 612-3.

GOMES, S. C; et al. Influence of supragingival biofilm control and smoking habit on Interleukin-1 β concentration. **Braz Oral Res** [online]. 2015; 29(1):1-8

GOEHLER L. E., et al. Blockade of cytokine induced conditioned taste aversion by subdiaphragmatic vagotomy: Further evidence for vagal mediation of immune-brain communication. **Neurosci Lett** 185: 163-6, 1995.

HANAN, S., et al. Effect of dexmedetomidine and cold stress in a rat model of neuropathic pain: Role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . **European Journal of Pharmacology**, 0014-2999/ 2016.

HAMAKAWA, H, et al. Structure–function relations in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 45, 517–524.

HALBERT, R. J. et al. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. **Eur Respir J**, v. 28, p. 523-532, 2006.

HANTOS, Z. et al. Lung volumes and respiratory mechanics in elastase-induced emphysema in mice. **J Appl Physiol**, v. 105, n. 6, p. 1864-72, 2008.

HAYES, J. A.; KORTHY, A.; SNIDER, G. L. The pathology of elastase-induced panacinar emphysema in hamster. **J Pathol**, v. 117, p. 1-14, 1975.

HELLERMANN, G. R. et al. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced acute inflammatory response in human bronchial epithelial cells. **Respir Res**, v. 3, p. 22, 2002.

HENRICKS, P. A; NIJKAMP, F. P. Reactive oxygen species as mediators in asthma. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 14, p. 409–420, 2001.

HOMMA Y, BRULL SJ, ZHANG JM. A comparison of chronic pain behavior following local application of tumor necrosis factor alpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat. **Pain** 95: 239-46, 2002.

HARRIS TB, FERRUCCI L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH Jr, et al. Associations of elevated interleukin- 6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. **Am J Med.** 1999;106(5):506-12.

HERNÁNDEZ, D., et al. Morphine and dipyron co-administration delays tolerance development and potentiates antinociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 469, p. 71–79, 2003.

HARGREAVES, K. M.; RUPAREL, S. Role of Oxidized Lipids and TRP Channels in Orofacial Pain and Inflammation. **Journal of Dental Research**, 2016

HUNT SP, PINI A, EVAN G: Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. **Nature** 328: 632-4, 1987.

IASP, 1994. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. **Classification of Chronic Pain, 2 ed.**, editora:Seattle, 1994.

INOUE, K. et al. Comprehensive analysis of elastase-induced pulmonary emphysema in mice: Effects of ambient existing particulate matters. **IntImmunopharmacol**, 2010.

ITO, S. et al. Mechanics, nonlinearity, and failure strength of lung tissue in a mouse model of emphysema: possible role of collagen remodeling. **J App Physiol**, v. 98, p. 503-511, 2005.

JEZLER S; et al. III Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). **J BrasPneumol**.2007;33(Supl 2):S 111-S 118

JANOFF, A. Elastases and emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 132, p. 417-433, 1985.

JEFFERY, P. K. Inflammation in chronic obstructive lung disease. **Am J RespirCrit Care Med**, v. 160, p. S3-S4, 1999.

JI, R.R.; XU, Z.Z.; GAO, Y.J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain **Nat Rev Drug Discov**, v. 13(7), p 533–548, 2014.

JI R R, et al. MAPkactivation by ngf in primary sensory neurons after inflammation increases trpv1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron** 36: 57-68, 2002.

JI RR, KOHNO T, MOORE KA, WOOLF CJ: Central sensitization and ltp: Do pain and memory share similar mechanisms? Trends **Neurosci** 26: 696-705, 2003.

JUE DM, JEON KI, JEONG JY: Nuclear factor kappa b (NF-kappa b) pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. **J Kor Med Sci** 14: 231-8, 1999.

JUNGER H, SORKIN LS: Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF. **Pain** 85: 145-51, 2000.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception, **Nature**, v. 413, 2001.

KALSO, E. et al. Opioids in chronic non-cancer pain: systematic review of efficacy and safety. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 372–380, 2004.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. Principles of Neural Science. **McGraw-Hill Medical**, 4th edition, 2000.

KASAHARA, Y. et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. **J Clin Invest**, v. 106, p. 1311-1319, 2000.

KASAHARA, et al. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, p. 737-744, 2001.

KUNIKOSHITA L. N et al. Efeitos de três programas de fisioterapia respiratória (pfr) em portadores de dpoc. **Rev. bras. Fisioter** 2006.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

LAENNEC RTH. Laennec RTH. In: A treatise on diseases of the chest and on mediate auscultation. 4th ed. **London Translate by Forbes: Logmans**; 1834.

LAURENT, G. J. Regulation of lung collagen production during wound healing. **Chest**, v. 99, p. 67S–69S, 1991.

LIU, X. et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for ATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, p. 147-157, 1996.

LI J, SIMONE DA, LARSON AA: Windup leads to characteristics of central sensitization. **Pain** 79: 75-82, 1999.

LEE, J.S.;HAN, J.S.;LEE, K.;BANG, J.;LEE, H.The peripheral and central mechanisms underlying itch. **BMB Rep.**, 2016.

LEVINE, J. D.; HABER, N. A. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 989–1003, 2007.

LIU,C.N.;RABER,P.;ZIVSEFER,S.;DEVOR,M.:Hyperexcitabilityinsensoryneuronssofratsselectedfor highversuslowneuropathicpainphenotype.**Neuroscience**, v. 105, p. 265-75,2001.

LIU, H.; MANTYH, P.W.; BASBAUM, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors.**Nature**, v.386, p, 721-724, 1997.

MACNEE, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. **Eur J Pharmacol**, v. 429, p. 195–207, 2001.

MINETTO, M.; RAINOLD, A.; GAZZONI, M. et al. Differential responses of serum and salivary interleukine -6 to acute strenuous exercise.**Eur J Appl Physiol** 2005; 93:679-686

MANNINO, D. M.; BUIST, A. S. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. **Lancet**, v. 370, p. 765-773, 2007.

MAO, J. T. et al. A pilot study of all-trans-retinoic acid for the treatment of human emphysema.**Am J RespirCrit Care Med**, v. 165, p. 718-723, 2002.

MARCHAND, E. et al. Lung Volume Reduction Surgery Does Not Improve Diaphragmatic Contractile Properties or Atrophy in Hamsters with Elastase-induced Emphysema. **Am J RespirCrit Care Med**, v. 168, p. 1052-1057, 2000.

MATTSON, J. P.; POOLE, D. C. Pulmonary emphysema decrease hamster skeletal muscle oxidative enzyme capacity.**J ApplPhysiol**, v. 85, n. 1, p. 210-214, 1998.

MENEZES, A. M. B. et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. **Lancet**, v. 366, p. 1875-1881, 2005.

MIJAILOVICH, S. M. et al. Dynamic moduli of rabbit lung tissue and pigeon ligamentum propatagiale undergoing uniaxial cyclic loading.**J ApplPhysiol**, v. 76, p. 773-782, 1994.

MIO, T. et al. Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 155, p. 1770–1776, 1997.

MONTEIRO, R. et al. Avaliação das alterações morfológicas cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar: estudo experimental em ratos. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 19, n. 4, p. 341-347, 2004.

MONTES, G. S. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v. 20, p. 15-27, 1996.

MORISSETE, M. C.; PARENT, J.; MILOT, J. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: What we know and what we need to know. **International Journal of COPD**, v. 4, p. 19-31, 2009.

MAC N W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc**. 2005;2(1):50-60.

MILLAN, M .J; Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p.355-474,2002.

ONOFRE, A.N, COSTA, C.M, SIQUEIRA, J.T, TEIXEIRA, M.J. Dor princípios e práticas. **Artmed**, p. 764-778, 2009.

OLIVEIRA, M. V., et al., 2016.Characterization of a mouse model of emphysema induced by multiple instillations of low-dose elastase. **Front Physiol**. 2016; 7: 457.

OLIVEIRA, C.M.B.; ISSY, A.M.; SAKATA, R.K. Fisiopatologia da dor pós operatória. **Revista Brasileira de Medicina**, v.11, n.67, p.415-418, 2010.

OLIVEIRA,C. M. B; et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Vol. 61, nº 2, Marco-Abril, 2011.

OLIVEIRA, G. P. Efeitos da glutathione em modelo experimental de lesão pulmonar aguda induzida por sepse. 2008. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ**.Rio de Janeiro, 2008.

PETTA A. D. Patogenia do enfisema pulmonar – eventos celulares e moleculares.**Einstein** (São Paulo) vol.8 no.2 São Paulo Abr./June 2010

PAUWELS, R. A. et al. Scientific Committee. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI / WHO Global Initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) Workshop summary. **Am J RespirCrit Care**, v. 163, n. 5, p. 1256-76, 2001.

PERAZA G. G; RODRIGUES S. T; S; MEDEIROS, H. L; BAISCH A. L. M. Uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vittale, rio grande**, 19(1): 35-44, 2007

PHILIPPE L., et al. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats[J]. **Am J Physiol**, 1997, 273(4 Pt 2) : R1550-R1556.

PRIETO, A. et al. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoprophosphopeptical (immunoferon). **Am J RespirCrit Care Med**, v. 163, p. 1578–1583, 2001.

PRYOR, W. A. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. **Environ Health Perspect**, v. 105, p. 875–882, 1997.

RAHMAN, I. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J RespirCrit Care Med**, v. 166, p. 490–495, 2002.

RIEDEL W, LAYKA H, NEECK G: Secretory pattern of gh, tsh, thyroid hormones, acth, cortisol, fsh, and lh in patients with fibromyalgia syndrome following systemic injection of the relevant hypothalamic-releasing hormones. **Rheumatology** 57: 81-7, 1998.

RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 3, p. 241-8, 2006.

RUZEK MC, MILLER AH, OPAL SM, PEARCE BD, BIRON CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection[J]. **J Exp Med**, 1997, 185(7) : 1185-1192.

SAETTA, M. et al. CD8+ T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J RespirCrit Care Med**, v. 157, n. 3, p. 822-6, 1998.

SAETTA, M.; TURATO, G.; LUPPI, F. Inflammation in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Chronic Obstructive lung disease**. BC Decker, p. 114-126, 2002.

SHAPIRO SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klotho and Marlboro mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**2000; 22:4-7

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: Peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci Lett**, v.6, p.184-7, 2004.

SHAPIRO SD. Animal models for chronic obstructive pulmonary disease: age of klotho and Marlboro mice. **Am J Respir Cell Mol Biol**2000; 22:4-7.

SHAPIRO, S. D. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potential roles in destructive lung disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 150, n. 6, p. S160-4, 1994.

SNIDER GL: **estudos experimentais sobre enfisema e lesão brônquica crônica**. *Eur J Respir Dis Suppl* 1986, **146**: 17-35 [PubMed](#) [Google Scholar](#)

SNIDER, G. L. et al. Definition of emphysema. Report of a national Heart, Lung and Blood institute, Division of Lung Diseases. **Am Rev Respir Dis**, v. 133, p. 132-82, 1985.

SNIDER, G. L.; LUCEY, E. C.; STONE, P. J. Animal models of emphysema. **Am Rev Respir Dis**, v. 133, p. 149-169, 1986.

SNIDER, G. L. Clinical relevance summary: collagen vs elastin in pathogenesis of emphysema: cellular origin of elastases; bronchiolitis vs emphysema as a cause of airflow obstruction. **Chest**, v. 117, p. 244-6, 2000.

SUKI, B.; LUTCHEN, K. R.; INGENITO, E. P. On the progressive nature of emphysema. Roles of proteases, inflammation, and mechanical forces. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 168, p. 516-521, 2003.

SUKI, B. et al. Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. **J Appl Physiol**, v. 98, p. 1892-1899, 2005.

SNIDER GL. Clinical relevance summary: Collagen vs elastin in pathogenesis of emphysema; cellular origin of elastases; bronchiolitis vs emphysema as a cause of airflow obstruction. **Chest**. 2000;117(5 Suppl 1):244S-6S.

SNIDER GL. Experimental studies on emphysema and chronic bronchial injury. **Eur J Respir Dis Suppl**. 1986;146:17-35.

SHAPIRO S. D; Proteólise no pulmão. **Eur Respir J Suppl** 2003, 44: 30s-32.

SNIDER GL: estudos experimentais sobre enfisema e lesão brônquica crônica. **Eur J Respir Dis Suppl** 1986, **146**: 17-35 [PubMed](#) [Google Scholar](#)

SANTOS L. M. O; et al. Bronchial responsiveness in an elastase-induced mouse model of emphysema. **Respiratory Physiology & Neurobiology** 194 (2014) 9–14

TEODORO, L. C; Estudo morfo-funcional do pulmão em modelo de enfisema induzido por elastase em camundongos. **Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -Universidade Federal de Alfenas**, Minas Gerais, 2011.

TOLNAI; J. et al; Functional and morphological assessment of early impairment of airway function in a rat model of emphysema. **J Appl Physiol (1985)** . 2012 Junho 1E; 112 (11): 1932-1939. 2012

THOMPSON ME, BARKHUIZEN A: Fibromyalgia, hepatitis c infection, and the cytokine connection. **Curr Pain Headache Rep** 7: 342-7, 2003.

TUDER, R. M.; GRATH, S.; NEPTUNE, E. The pathobiological mechanisms of emphysema models: what do they have in common? **Pulm Pharmacol Ther**, v. 16, p. 67-78, 2003.

VITALE, R.F.; ANDRADE, F.; RIBEIRO. Papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**. 2007;73:123-7.

VALENÇA, S. S.; PORTO, L. C. Immunohistochemical study of lung remodeling in mice exposed to cigarette smoke. **J Bras Pneumol**, v. 34, n. 10, p. 787-795, 2008.

VLAHOVIC, G. et al. Cellular and connective tissue changes in alveolar septal wall in emphysema. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 160, p. 2086-292, 1999.

WALL, P. D.; MELZACK, R. Textbook of pain. **Churchill Livingstone**, v. 41, n. 1, p. 122-123, 1990.

WOLKERSTORFER, A.; HANDLER, N.; BUSCHMANN, H. New approaches to treating pain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 1103-1119, 2016.

WALL, P. D.; MELZACK, R. Textbook of pain. **Churchill Livingstone**, v. 41, n. 1, p. 122-123, 1990.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3, p. 349-74, 2000.

WEIBEL, E. R. "Morphometry: stereological theory and practical methods", In: Gil J. (Ed.), Models of lung disease-microscopy and structural methods, **New York**, p. 199-247, 1990.

WILLEMSE, B. W. et al. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation. **Eur Respir J**, v. 23, p. 464-476, 2004.

WRIGHT, J. L.; CHURG, A. Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 268, p. L17-L20, 1995.

WATKINS LR, WIERTELAK EP, GOEHLER LE, SMITH KP, MARTIN D, MAIER SF: Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. **Brain Research** 654: 15-26, 1994.

WOOLF CJ, ALLCHORNE A, SAFIEH-GARABEDIAN B, POOLE S: Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: The contribution of tumour necrosis factor alpha. **Br J Pharmacol** 121: 417-24, 1997

WAGNER R, MYERS RR: Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. **Neuroreport** 7: 2897-901, 1996.

WATKINS LR, MAIER SF, GOEHLER LE: IMMUNE ACTIVATION: The role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain** 63: 289-302, 1995.

WRIGHT, J. L.; COSIO, M.; CHURG, A. Animal models of obstructive pulmonary disease. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 295, p. L1:L15, 2008.

WOUTERS E. F. Local and systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Proc Am Thorac Soc.** 2005;2(1):26-33.

WOOLF CJ, SALTER MW: Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. **Science** **288**: 1765-9, 2000.

WOUTERS, GROENEWEGEN, DENTENER, et al. Systemic Inflammation in Exacerbation of COPD. **Proceedings of the american thoracic society**, vol. 4. 2007

WRIGHT A: Recent concepts in the neurophysiology of pain. **Manual Therapy** **4**: 196-202, 1999.

YOSHIMURA T, et al. Involvement of Th17 cells and the effect of anti-IL-6 therapy in autoimmune uveitis[J]. **Rheumatology (Oxford)**, 2009, 48(4) : 347-354.

YUAN, H.; INGENITO, E. P.; SUKI, B. Dynamic properties of lung parenchyma: mechanical contributions of fiber network and interstitial cells. **J Appl Physiol**, v. 83, p. 1420-1431, 1997.

YENDE, S.; et. al. Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. **Thorax.** 2006 Jan; 61(1): 10–16.

ZARINGHALAM, J. et al. Achillea santolina reduces serum interleukin-6 level and hyperalgesia during complete Freund's adjuvant-induced inflammation in male Wistar rats. **Journal of Chinese Integrative Medicine**: Volume 8, Issue 12, Pages: 1180-1189, 2010.

ZARINGHALAM, J. et al. Spinal mu-opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthritis in rats[J]. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 2008, 35(11): 1309-1315.

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

ANEXO

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

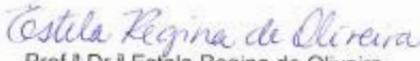
	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000; Fax: (35) 3299-1063	
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL		

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Marcadores inflamatórios sistêmicos em ratos portadores de DPOC induzida por elastase", registrada com o nº 19/2016, sob a responsabilidade de Marcelo Lourenço da Silva – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em reunião de 23/06/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 01/10/2016 a 28/09/2017	
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico	
Nº de animais	96	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 27 de junho de 2016.


 Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira