

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GABRIELA XAVIER SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO ESPINHAL DOS RECEPTORES TRPV1 NA
ATIVAÇÃO DA VIA PI3K/AKT/mTOR DURANTE A DOR PÓS-OPERATÓRIA EM
CAMUNDONGOS**

ALFENAS/MG

2024

GABRIELA XAVIER SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO ESPINHAL DOS RECEPTORES TRPV1 NA
ATIVAÇÃO DA VIA PI3K/AKT/mTOR DURANTE A DOR PÓS-OPERATÓRIA EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Santos, Gabriela Xavier.

Investigação da participação espinal dos receptores TRPV1 na ativação da via PI3K/AKT/mTOR durante a dor pós-operatória em camundongos / Gabriela Xavier Santos. - Alfenas, MG, 2024.

75 f. : il. -

Orientador(a): Giovane Galdino de Souza.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. TRPV1. 2. PI3K/AKT/mTOR pathway. 3. Glial cells. 4. Postoperative pain. 5. Surgery. I. Souza, Giovane Galdino de, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

GABRIELA XAVIER SANTOS

INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO ESPINHAL DOS RECEPTORES TRPV1 NA ATIVAÇÃO DA VIA PI3K/AKT/mTOR DURANTE A DOR PÓS-OPERATÓRIA EM CAMUNDONGOS

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Aprovada em: 05 de fevereiro de 2024.

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho

Instituição: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

UFRRJ

Profa. Dra. Morgana Duarte da Silva

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

UFSC



Documento assinado eletronicamente por **Morgana Duarte da Silva, Usuário Externo**, em 05/02/2024, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 07/02/2024, às 11:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1168215** e o código CRC **81C48E1A**.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de trilhar este caminho, da vida acadêmica, por me conceder saúde, sabedoria, força e resiliência para a conclusão deste ciclo;

A todos os professores da Universidade de Federal de Alfenas, que foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico. Em especial, agradeço ao professor Giovane, por me aceitar como parte da sua equipe de trabalho no LABNID, e por colocar sempre a dispor a auxiliar no desenvolvimento deste projeto;

Aos meus queridos amigos, companheiros desta jornada acadêmica Thamyris, Lívia, Iago, Fernanda, Javier, Bruno e todos os alunos que frequentaram o laboratório durante este período, quero expressar minha gratidão, pela amizade, por sempre estenderem a mão, a ajudar uns aos outros.

Aos meus pais Wander e Iraceli, irmãos, avós, tios e tias, primos, madrinha Ana este trabalho dedico a vocês que sempre torceram e torcem por mim, e se fizeram presente nesta caminhada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – pelo bolsa concedida durante a realização deste estudo sob o Código de Financiamento 001.

“Aquele que recebe de mim uma ideia, tem aumentada a sua instrução, sem que eu tenha diminuído a minha. Como aquele que acende sua vela na minha recebe luz sem apagar a minha” (Thomas Jefferson).

RESUMO

Aproximadamente 86% dos indivíduos submetidos a um tipo de cirurgia reportam sentir dor pós-operatória (DPO), a qual a intensidade da dor é frequentemente moderada a severa, iniciando de maneira aguda e podendo se tornar crônica. Além disso, poucos mecanismos têm sido descritos na literatura que elucidam a gênese da DPO. Diante desse contexto, o presente estudo investigou a participação do receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1) a ativação da via PI3K/AKT/mTOR na medula espinhal de camundongos submetidos a um modelo DPO. Para tal, foram utilizados camundongos machos (20-25g) da linhagem C57BL6. O modelo de DPO utilizado foi o de incisão e retração de pele e músculo (IRPM) e o limiar nociceptivo foi avaliado pelo teste de von *Frey* filamentos. Para a avaliação farmacológica da via PI3K/AKT/mTOR e do receptor TRPV1 na DPO, os animais receberam por via intratecal bloqueador e inibidores específicos para TRPV1, PI3K, AKT, mTOR os quais foram administrados no 14º dia de DPO, seguido da avaliação do limiar nociceptivo. No 14º dia os animais que receberam administração intratecal dos inibidores da via PI3K/AKT/mTOR e o bloqueador do TRPV1 apresentaram aumento do limiar nociceptivo. Na análise biomolecular, a expressão de PI3K p110 γ e AKT (Thr 308) não foram modificadas após DPO. No entanto, foi observado aumento da expressão dos receptores TRPV1 ($p < 0,05$) e p-mTOR (Ser 2481) ($p < 0,05$) comparado ao grupo naive. De acordo com os resultados obtidos, nós sugerimos o envolvimento da via PI3K/AKT/mTOR e do receptor TRPV1 na fisiopatologia da DPO, porém o aumento dos níveis de expressão da via PI3K/AKT/mTOR, pelo receptor TRPV1 não foi observada.

Palavras-chave: TRPV1; via PI3K/AKT/mTOR; células da glia; dor pós-operatória; cirurgia.

ABSTRACT

Approximately 86% of individuals undergoing a type of surgery report experiencing post-operative pain (POP), which is often moderate to severe, starting acutely and may become chronic. Furthermore, few mechanisms have been described in the literature that elucidate the genesis of POP. Given this context, the present study investigated the participation of the transient potential receptor vanilloid type 1 (TRPV1) in the activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in spinal glial cells during POP. Male mice (20-25g) of the C57BL6 lineage were used. The POP model used was the muscle incision and retraction surgery (SMIR) and the nociceptive threshold was assessed using the von Frey filament test. For the pharmacological evaluation of the TRPV1/PI3K/AKT/mTOR pathways and glial cells in POP, the animals received intrathecal blockers and specific inhibitors for TRPV1, PI3K, AKT, mTOR which were administered on the 14th day of POP, followed by assessment of the nociceptive threshold. On the 14th day, animals that received intrathecal administration of the PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and the TRPV1 blocker showed an increase in the nociceptive threshold. In the biomolecular analysis, an increase in the expression of TRPV1 receptors ($p < 0.05$) and p-mTOR ($p < 0.05$) was observed compared to the naïve group. However, TRPV1 blockade did not alter mTOR expression. According to the results obtained, we suggest the involvement of the PI3K/AKT/mTOR and TRPV1 pathway in the pathophysiology of POP, however the relationship of TRPV1 in the activation of the pathway was not observed.

Keywords: TRPV1; PI3K/AKT/mTOR pathway; glial cells; postoperative pain; surgery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via ascendente da dor	21
Figura 2 - Representação de um modelo de dor pós-operatória.....	26
Figura 3 - Estrutura do TRPV1	31
Figura 4 - Via PI3K/AKT/mTOR.....	34
Figura 5 - Imagem ilustrativa demonstrando a via de administração intratecal	37
Figura 6 - Imagem ilustrativa do retrator utilizado para IRPM	39
Figura 7 - Etapa da cirurgia de IRPM para indução da DPO.....	39
Figura 8 - Imagem ilustrativa do aparato utilizado para avaliação do limiar nociceptivo	41
Figura 9 - Delineamento experimental avaliação do limiar nociceptivo	44
Figura 10 - Delineamento experimental da sequência de execução dos experimentos.	46
Figura 11 - Delineamento experimental da sequência de execução dos experimentos.	47
Figura 12 - Delineamento experimental da coleta da medula espinhal	48
Gráfico 1 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após a cirurgia de DPO.....	50
Gráfico 2 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após administração do SB-366791 bloqueador do receptor TRPV1 de animais submetidos a DPO.....	52
Gráfico 3 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após administração do AS605240 inibidor da PI3K animais submetidos a DPO	53
Gráfico 4 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após administração do AS6730 inibidor da AKT em animais submetidos a DPO.....	54
Gráfico 5 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após administração da rapamicina inibidor de mTOR em animais submetidos a DPO	55
Gráfico 6 - Análise da expressão dos receptores TRPV1 no segmento lombar da medula espinhal no 14º dia de DPO	56
Gráfico 7 - A, B e C Análise dos níveis da expressão da PI3K/AKT/mTOR na medula espinhal após a DPO.....	57
Gráfico 8 - Análise dos níveis de expressão proteica de mTOR após bloqueio dos receptores TRPV1	58
Tabela 1 - Anticorpos utilizados para a quantificação de proteínas pela técnica de Western Blot	43

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP	4E Proteínas de ligação
5-HT	Serotonina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróidais
AKT	Proteína quinase B
AMPA	Receptor de propionato de amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazol
ASICs	Canais iônicos sensíveis a ácidos
ATP	Trifosfato de adenosina interleucina
BK	Receptor de bradicicnina
CCA	Córtex cingulado anterior
CDME	Corno dorsal da medula espinhal
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
DCPO	Dor crônica pós-operatória
DN	Dor neuropática
DPO	Dor pós-operatória
eIF4-E	Proteína de iniciação eucariótica
i.t	intratecal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina IL-6
IRPM	Incisão e retração de pele e musculo
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NA	Noradrenalina
NGF	Fator de crescimento do nervo
OMS	Organização mundial da saúde
P2X3R	Receptor ionotrópico P2X3
PA	Potencial de ação
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PDK1	Proteína-quinase 1 dependente de fosfoinosítideo-3

PGE2	Prostaglandina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato
PIP3	fosfatidilinositol-4, 5-trifosfato
RVM	Medula rostralventromedial
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema nervoso periférico
SP	Substância P
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TrkA	Receptor de tropomiosina relacionado à quinase A
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1
VPL	Núcleo ventral pósterolateral do tálamo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A DOR	17
2.2	DOR PÓS-OPERATÓRIA.....	21
2.2.1	Modelos experimentais utilizados no estudo da DPO	23
2.2.2	Sensibilização periférica.....	24
2.2.3	Mecanismos centrais envolvidos da DPO.....	26
2.3	TRPV1	28
2.4	PI3K-AKT-mTOR	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	36
4.2	SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	36
4.3	MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA (DPO)	38
4.4	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO.....	39
4.5	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT ..	41
4.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
4.6.1	Avaliação do limiar nociceptivo de camundongos com DPO	44
4.6.2	Avaliação da participação dos receptores TRPV1 e da via PI3K/AKT/mTOR na medula espinal de camundongos com DPO	44
4.6.3	Avaliação da expressão da via PI3K/AKT/mTOR e dos receptores TRPV1 na medula espinal de camundongos com DPO	46
4.6.4	Avaliação da participação dos receptores TRPV1 na ativação da via PI3K/AKT/mTOR na DPO	48
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5	RESULTADOS	50

5.1	AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO APÓS A CIRURGIA DE DOR PÓS-OPERATÓRIA.....	50
5.2	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA.....	51
5.3	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PI3K NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA	52
5.4	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA AKT NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA	53
5.5	INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE mTOR NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA	54
5.6	INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NA DOR PÓS-OPERATÓRIA	55
5.7	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA PI3K/AKT/mTOR NO 14º DIA DE DOR PÓS-OPERATÓRIA	56
5.8	INVESTIGAÇÃO DO BLOQUEIO DO TRPV1 SOB OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTEICA DE mTOR APÓS DOR PÓS-OPERATÓRIA	58
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A - Aprovação Comitê de Ética.....	75

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo são submetidas a cirurgias todos os anos (Fuller; Bharde; Sikandar, 2023). Devido à alta incidência de cirurgias, pode ser que em algum momento da vida, o indivíduo necessite passar por algum procedimento cirúrgico, seja ele minimamente invasivo ou de grande porte. No entanto após o evento cirúrgico, a dor surge como consequência, da incisão promovida aos tecidos, durante a prestação de cuidado (Fuller; Bharde; Sikandar, 2023). A dor aguda pós-operatória possui um papel fisiológico protetivo, onde o indivíduo relata um aumento da sensibilidade na região e ao redor da área operada. Este aumento da sensibilidade dolorosa ocorre em resposta à sensibilização periférica e/ou central, que inicialmente contribui para que o indivíduo proteja a região, favorecendo o restabelecimento tecidual até o retorno da sua integridade (Woolf, 2018).

Embora a dor cumpra um papel protetivo, ao mesmo tempo sua intensidade exacerbada e persistente é um fator de risco para cronificação. Após o dano tecidual, os nociceptores ficam sensibilizados, os principais sintomas relatados pelos indivíduos no pós-operatório são a presença de alodinia (estímulo inócuo é percebido como doloroso) e de hiperalgesia (exacerbação da dor, mediante um estímulo nocivo) na área operada e ao redor (Woller *et al.*, 2017). Estima se que cerca de 10% a 50% dos pacientes submetidos a uma intervenção cirúrgica desenvolva dor pós-operatória crônica (DPOC) persistente com duração superior a três meses. Destes, cerca de 2 a 25% dos indivíduos apresentam DPOC persistente severa, sendo que esta incidência pode variar de acordo com a região operada (Fuller; Bharde; Sikandar, 2023; Schug; Bruce, 2017). Muitos profissionais da área da saúde negligenciam a dor pós-operatória (DPO), pois a consideram como um evento esperado (Garcia *et al.*, 2017). No entanto, este quadro doloroso, quando mau gerenciado, pode levar consequências tanto físicas como psicológicas.

Nesta perspectiva existem várias escalas que podem ser utilizadas para mensurar a intensidade da dor. Estas escalas são de fácil aplicabilidade, e ajudam a identificar indivíduos que apresentam dor, auxiliando o profissional de saúde a elaborar estratégias terapêuticas que sejam mais efetivas para o manejo do sintoma doloroso (Breivik *et al.*,

2008; Haefeli; Elfering, 2005). Os principais fármacos utilizados no manejo da dor pós-operatória são os opioides, anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), anestésicos locais. Entretanto outros medicamentos podem ser usados isoladamente ou como adjuvantes, para outras complicações ou diferentes tipos de dores que surgem após o procedimento cirúrgico. Como exemplos de medicamentos utilizados nesses casos encontram-se opioides, como o tramadol; AINES, como o paracetamol; gabapentina (anticonvulsivante análogo estrutural do ácido gamaminobutírico [GABA]); anticoagulantes e outros relacionados aos sintomas (Brigham; Ji; Becker, 2021). No entanto, apenas uma pequena parcela de indivíduos apresenta redução satisfatória dos sintomas e geralmente o tratamento farmacológico ofertado, vem acompanhado de efeitos adversos importantes (Garcia *et al.*, 2017). Diante deste cenário, vários pesquisadores se debruçam no estudo da dor, com o intuito de descobrir quais são os mecanismos envolvidos na fisiopatologia DPO, para que assim possam pensar em novas formas de terapia para tratamento da dor.

Após a lesão tecidual, é observado modificações na via nociceptiva. Evidências científicas têm demonstrado que a via PI3K/AKT/mTOR envolvida da tradução de proteínas como a interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina IL-6 (IL-6) em modelos experimentais de dor, estão supra regulada tanto no nervo periférico como no sistema nervoso central (SNC) de animais submetidos a modelos experimentais de dor neuropática e nociceptiva induzidas, incluindo a própria DPO (Duan *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2017; Kondo; Saegusa; Tanabe, 2018; Xu *et al.*, 2011). mTOR quando ativada, fosforila proteínas *dowstream* como S6K e 4E proteínas de ligação (4E-BP). Em circunstâncias normais a 4E-BP está ligada à proteína de iniciação eucariótica (eIF4-E), porém quando a 4E-BP é fosforilada pela mTOR, a eIF4-E se dissocia de 4E-BP e se une outras proteínas de iniciação, formando um complexo de proteínas eIF4 que é fundamental para a iniciação da tradução de proteínas.

A proteína mTOR integra sinais tanto intracelulares como extracelulares para controle de processos celulares, dentre eles, a tradução do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA). Na superfície da membrana plasmática encontra-se vários receptores, que podem ser ativados por moléculas endógenas, liberadas durante o processo inflamatório, resultando na ativação de vias de sinalização intracelulares.

Dentre estes receptores localizados na membrana plasmática, o receptor de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1) é um receptor transmembranar, que pode ser ativado por ligantes endógenos, exógenos e estímulo térmico. A ativação do TRPV1 promove um influxo de cátions, modificando a atividade de proteínas intracelulares. Visto que o TRPV1 possui um importante papel da transdução de estímulo nocivo, e que o mesmo tem o seu limiar de ativação reduzido após o dano tecidual, nós hipotetizamos que a ativação do TRPV1, localizado na região da medula espinal, possa contribuir no aumento da expressão da via PI3K/AKT/mTOR, aumentando a tradução de mRNA, em animais submetidos a DPO.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A DOR

Embora desagradável a dor é um mecanismo imprescindível para nossa sobrevivência, pois tem como função nos alertar de alguma ocorrência de um dano real ou potencial que possa comprometer a homeostase do organismo (De Ridder; Adhia; Vanneste, 2021). Dado a importância deste mecanismo de alerta e proteção, mediante um estímulo nocivo, estudos tem sugerido que o feto no seu primeiro trimestre de gestação, já possui este sistema protetivo, devido à presença da subplaca cortical, uma estrutura única que está presente apenas durante o desenvolvimento fetal e neonatal precoce, responsável pela formação da primeira rede cortical (Thill, 2022, 2023).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (do Inglês, *International Association for the Study of Pain* - IASP) é composta por vários integrantes que tem o mesmo objetivo: pesquisar e difundir o conhecimento sobre a dor. Com a finalidade de padronizar uma linguagem mundial a respeito da terminologia da dor, vários especialistas se reuniram, para propor uma definição que abranja todos os tipos de dores. De acordo com a última atualização proposta pela IASP, a dor é definida como uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial (Raja *et al.*, 2020). De acordo com esta definição, percebe-se que a dor não é composta puramente pelo aspecto biológico, mas é influenciada por fatores psicológicos e sociais. Estes aspectos quando integrados no SNC juntamente com a experiência de vida de cada indivíduo, faz com que a percepção da dor seja subjetiva (Kuner; Kuner, 2021).

A dor aguda, também conhecida como dor fisiológica, tem um papel puramente adaptativo. Seu tempo de resolução não deve exceder o período de três meses, caso o sintoma de dor persista além deste período, a dor se torna crônica sendo considerada uma doença (Bell, 2018; Treede *et al.*, 2019). Além do tempo de duração dos sintomas, a dor também pode ser categorizada de acordo com seus mecanismos subjacentes em nociceptiva, neuropática e nociplástica (Nicholas *et al.*, 2019; Scholz *et al.*, 2019; Treede *et al.*, 2019). De acordo com a IASP a dor nociceptiva é decorrente da ativação de

nociceptores, que estão localizados na pele, músculo, articulações e nas vísceras. Os nociceptores são ativados por estímulos de alta intensidade. Diferente da dor nociceptiva, na dor neuropática (DN) a lesão e/ou a doença acomete a via somatossensorial que conduz o estímulo até o SNC. Por fim, a dor nociplástica é caracterizada pela alteração da nocicepção, pois não é possível detectar uma causa aparente para a dor, visto que o sistema somatossensorial está preservado e não há ativação dos nociceptores (Fitzcharles *et al.*, 2021; Nicholas *et al.*, 2019). Estes mecanismos neurofisiológicos nociceptivo, neuropático e nociplástico podem se sobrepor, o que denominamos de dor mista.

O sistema somatossensorial é quem conduz as sensações de tato, propriocepção, calor, frio, vibração e dor da periferia para o SNC (Pasluosta; Kiele; Stieglitz, 2018). O sistema somatossensorial possui subpopulações de fibras nervosas que são diferentes entre si do ponto de vista estrutural e funcional (Lee; Neumeister, 2020). Os neurônios sensoriais que conduzem impulsos do sistema nervoso periférico (SNP) para o SNC são chamados de neurônios de primeira ordem. Anatomicamente os corpos celulares dos neurônios sensoriais estão localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD) ou gânglio trigeminal. Os mesmos emitem dois prolongamentos, sendo um periférico em direção à pele (derme e/ou epiderme) e outro central em direção à medula espinhal ou tronco encefálico, onde fazem sinapse com neurônio de segunda ordem (Bourne; Machado; Nagel, 2014; Doody; Bailey, 2019).

Os neurônios de primeira ordem são constituídos por três tipos de fibras diferentes, sendo elas a A β , A δ e C. As fibras A β são altamente mielinizadas, possuem rápida velocidade de condução, sendo responsável pela transmissão de estímulo tátil, vibração, pressão e propriocepção. Já as fibras A δ são menos mielinizadas e possuem velocidade de condução intermediária, são ativadas por estímulo térmico e mecânico de alta intensidade. E por fim as fibras do tipo C, também denominadas de polimodais por responder a estímulos mecânico, térmico e químico são amielínicas com velocidade de condução lenta, e possuem o campo receptivo menor. Ambas as fibras A δ e C são responsáveis pela transmissão dos estímulos potencialmente nocivos, e por isso, elas são denominadas como fibras nociceptivas (D'Mello; Dickenson, 2008).

A extremidade das fibras nociceptivas são constituídas por terminações nervosas livres denominadas nociceptores, que são receptores de alto limiar, ativados por temperatura extrema, pressão intensa e produtos químicos (Dubin; Patapoutian, 2010). O fato do nociceptor detectar o estímulo nocivo e traduzir o estímulo em sinal elétrico, não significa que isto irá resultar em dor, pois o estímulo nocivo pode ser modulado ao longo da via nociceptiva. A transdução é apenas uma das etapas da dor nociceptiva que ocorre antes do estímulo nocivo chegar ao SNC. Vale ressaltar que a dor pode ocorrer na ausência da ativação dos nociceptores, um exemplo é a dor nociplástica (Fitzcharles *et al.*, 2021).

Existe uma variedade de receptores, que podem ser canais iônicos ou receptores especializados na detecção de estímulos específicos, expressos nas terminações nervosas livres, como por exemplo, os receptores de potencial transitório (TRP), TRPV1, TRPV2, TRPV3, melastatina 8 (TRPM8), canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs), receptor ionotrópico P2X3 (P2X3R), receptor de bradicnina (BK1, BK2) que detectam estímulo nocivo e traduz em sinal elétrico (Dubin; Patapoutian, 2010; Scholz; Woolf, 2002). Por exemplo, a abertura do TRPV1 mediante estímulo nocivo, resulta num influxo de íons de cálcio na célula. Este influxo de carga positiva altera o potencial de membrana, facilitando a ativação de canais iônicos controlados por voltagem, resultando na geração do potencial de ação (PA) (Yam *et al.*, 2018). O PA irá se propagar pelo neurônio de primeira ordem até a região do corno dorsal da medula espinhal (CDME). A partir daí, libera uma variedade de substâncias de seus terminais centrais, que têm o potencial de excitar os neurônios de segunda ordem, que estão localizados principalmente nas lâminas I, II e V de Rexed (Lee; Neumeister, 2020; Viana, 2018). Os neurônios de segunda ordem cruzam contralateral a medula e ascendem principalmente pela via espinotalâmica, conduzindo o estímulo até o tálamo lateral, medial e posterior. É no núcleo pósterolateral ventral (VPL) do tálamo que os neurônios de projeção tálamo-cortical se projetam para o córtex somatossensorial, onde de fato o estímulo nocivo será inicialmente interpretado, possibilitando a posterior identificação dos aspectos sensorio-discriminativo da dor como localização, intensidade e qualidade (Chen; Abdi, 2022; Kuner; Kuner, 2021). Os neurônios nociceptivos de segunda ordem também se projetam para várias regiões do tronco encefálico, como a formação reticular, grupo

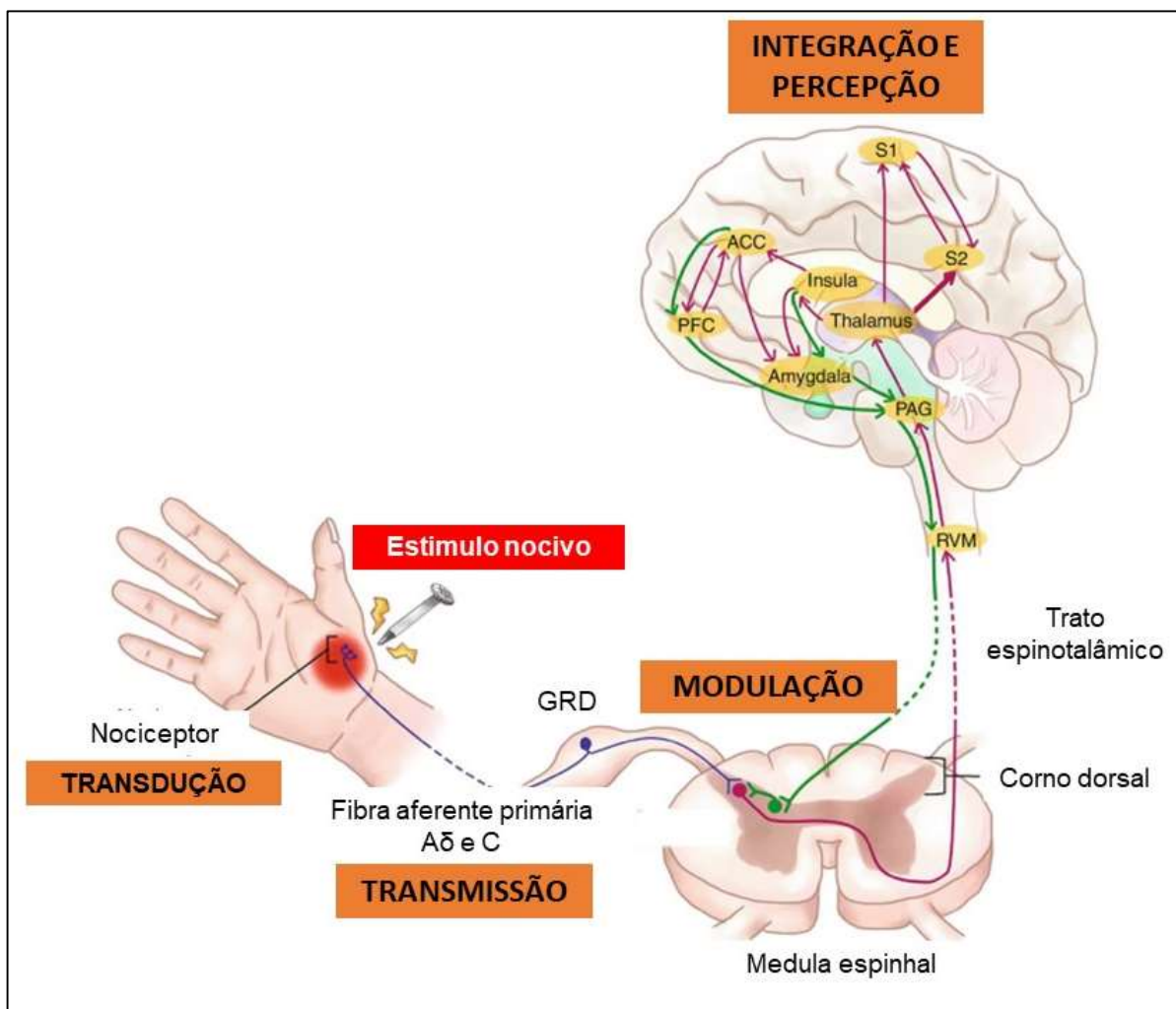
noradrenérgico A1, núcleos parabraquiais, área intercolicular e substância cinzenta periaquedutal (PAG), entre outras regiões envolvidas no componente afetivo motivacional e cognitivo avaliativo da dor (Kuner; Kuner, 2021).

O estímulo nociceptivo, ao ser transmitido da periferia ao SNC, pode ser modulado a nível medular pela ativação das fibras A β que irão excitar os interneurônios inibitório, ou pela ativação das fibras descendentes inibitórias localizadas no bulbo ventromedial rostral (do inglês RVM). A partir daí se projetam para a medula espinhal liberando neurotransmissores como serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), opióides que modulam a atividade dos neurônios de primeira e segunda ordem, reduzindo ou cessando a transmissão do estímulo nocivo (Peng *et al.*, 2023).

A via nociceptiva é dividida didaticamente em quatro etapas, denominadas de transdução, transmissão, modulação e percepção (Figura 1). O estímulo nociceptivo será percebido como doloroso, apenas quando atingir a região do córtex cerebral, que combinado com a integração de vários fatores como psicológico, social, cognitivos, experiências passadas irão modular a experiência dolorosa, fazendo com que o indivíduo se afaste do risco ou dano real (Bourne; Machado; Nagel, 2014).

É importante que haja um equilíbrio no sistema de transmissão e modulação da dor. Pois a falha do sistema de transmissão, como no caso de insensibilidade a dor ou quando o sistema de facilitação descendente está hiperativado, como no caso das dores crônicas, acarreta prejuízo reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos (Schon; Parker; Woods, 2020).

Figura 1 - Via ascendente da dor



Fonte: Adaptado de Chen e Abdi (2022).

Legenda: Via aferente responsável pela transmissão do estímulo nocivo da periferia até regiões superiores envolvidas no processamento da dor. GRD: gânglio da raiz dorsal, PAG: substância cinzenta periaquedutal, RVM: medula rostroventromedial; PFC: córtex pré-frontal, ACC: córtex cingulado anterior, S1: córtex somatossensorial 1, S2: córtex somatossensorial 2.

2.2 DOR PÓS-OPERATÓRIA

Recentemente a IASP, juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaboraram um sistema de classificação para dores crônicas, com o intuito auxiliar os profissionais da saúde na identificação e diagnóstico mais assertivo do tipo de dor crônica. Esta nova classificação encontra-se disponível na classificação internacional de doenças, décima primeira revisão (CID-11). Com base nesta classificação a dor crônica é dividida em primária e secundária (Treede *et al.*, 2019). As dores crônicas primárias

foram ainda divididas em subcategorias, de modo geral, inclui todos os tipos de dores nociplástica, onde não é possível detectar a causa, a própria dor é a doença. Já as dores crônicas secundárias surgem como consequência de um evento prévio. Este sistema de classificação mais abrangente, além de auxiliar no diagnóstico, pode permitir que estudos futuros relatem a incidência dos tipos de dor com mais precisão (Treede *et al.*, 2019).

Dentro das subclassificações das dores crônicas secundárias, encontra-se a DCPO, que surge como consequência de uma dor pós-operatória aguda (Schug *et al.*, 2019). Estima-se que o número de pessoas com DCPO tende a aumentar nos próximos anos, devido ao aumento da expectativa de vida, sedentarismo e maior procura para realização de cirurgias estéticas (Weiser *et al.*, 2008). Dentre as causas mais frequentes de DCPO, estão as cirurgias de coluna vertebral, histerectomia, amputações, artroplastia, herniotomia, cirurgia de mama, toracotomia (Schug *et al.*, 2019).

Embora não exista uma correlação direta entre a extensão da lesão e intensidade da dor, estudos têm demonstrado que cirurgias de grande porte, como por exemplo, cirurgia de toracotomia apresentam maior incidência de DPOC variando de 6% a 85% com relação a cirurgias de pequena magnitude, como por exemplo, cirurgia de dente variando de 6% a 13% (Rosenberger; Pogatzki-Zahn, 2022; Schug *et al.*, 2019). A DPO é uma consequência da incisão da pele e tecidos, que resulta de um processo inflamatório local. Embora a incisão seja um procedimento controlado pelos médicos durante a prestação de cuidados, os indivíduos relatam sentir dor de moderada a alta intensidade. A DPO tem sido relatada como uma das complicações cirúrgicas mais temidas pelos pacientes (Simanski *et al.*, 2014). Muitas vezes esta dor é subestimada pelos profissionais de saúde, que a consideram normal após a intervenção cirúrgica. No entanto, o sintoma doloroso quando mal gerenciado, pode atrasar o processo de recuperação do indivíduo.

A perpetuação do sintoma doloroso após a cirurgia, que supera o tempo normal de cicatrização dos tecidos, é considerada crônica (Treede *et al.*, 2019). Ainda não está claro porque alguns indivíduos desenvolvem DCPO e outros não, entretanto alguns fatores de risco foram apontados o qual predispõe o surgimento da DCPO. Os fatores de risco podem estar relacionados ao procedimento cirúrgico ou a particularidades de cada indivíduo, visto que a dor é multidimensional (Al-Mahrezi; Al-Shidhani, 2018). Indivíduos

que apresentam alterações psicológicas como ansiedade, distúrbio do humor, catastrofização da dor são candidatos a desenvolverem DCPO. Ser jovem, do sexo feminino, fumante, índice de massa corporal (IMC) elevado, alterações genéticas, presença de dor prévia de moderada a alta intensidade, seja pela condição atual ou outro tipo de dor pré-existente, também predispõem o surgimento da DCPO (Kraychete *et al.*, 2016; Rosenberger; Pogatzki-Zahn, 2022).

Dentre os fatores de risco relacionados à cirurgia, que predispõem a cronificação, incluem técnica cirúrgica aberta, cirurgias com tempo de duração prolongado, lesão nervosa e dor intensa no pós-operatório (Kraychete *et al.*, 2016; Rosenberger; Pogatzki-Zahn, 2022). Além disso, complicações pós-operatórias, como reoperação, infecção ou terapias adjuvantes, como rádio ou quimioterapia, são fatores de risco adicionais para o surgimento da DCPO (Rosenberger; Pogatzki-zahn, 2022). Antes de iniciar qualquer procedimento cirúrgico, é importante que o profissional faça uma avaliação minuciosa do indivíduo, para detectar os fatores de risco presentes e implementar estratégias, com o objetivo de prevenir a DCPO (Gulur; Nelli, 2019).

2.2.1 Modelos experimentais utilizados no estudo da DPO

Embora a compreensão dos fatores de risco seja importante para identificar indivíduos mais suscetíveis a desenvolver DCPO, é importante compreender e reconhecer os mecanismos celulares e moleculares que estão envolvidos na transição da dor aguda para dor crônica. Os modelos animais nos permitem explorar os possíveis mecanismos envolvidos na cronificação, visto que em humanos este tipo de abordagem é inviável. Vários modelos experimentais foram desenvolvidos para mimetizar a DPO clínica (Fuller; Bharde; Sikandar, 2023).

O primeiro modelo de DPO desenvolvido foi o de incisão plantar (Brennan; Vandermeulen; Gebhart, 1996). Desde então, devido ao aumento no número de casos de indivíduos com dor persistente após a cirurgia, vários outros modelos experimentais foram criados, modificando o local da incisão (por exemplo tórax, coxa, pescoço, abdômen, cauda entre outras regiões), a profundidade da incisão (superficial ou profunda envolvendo o tecido muscular) (Fuller; Bharde; Sikandar, 2023; Pogatzki-Zahn; Segelcke;

Zahn, 2018). Alguns modelos experimentais foram criados para mimetizar a DN iatrogênica, que pode ocorrer principalmente em cirurgias de maior complexidade. Estas variações nos modelos experimentais tendem a imitar os mais variados tipos de cirurgias realizadas em ambulatórios e centros hospitalares especializados.

Com base no conhecimento adquirido dos estudos pré-clínicos, sabe-se que o trauma tecidual ocasionado pela incisão na pele e/ou músculo promove alterações tanto a nível periférico, medular e supra medular. Essas alterações podem perdurar mesmo após a cicatrização dos tecidos (Lavand'Homme, 2017).

2.2.2 Sensibilização periférica

A DPO apresenta mecanismos neurofisiológicos predominantemente do tipo nociceptiva inflamatória, podendo ter um componente neuropático associado, caso haja lesão nervosa durante a intervenção cirúrgica. Indivíduos que relatam sintomas de dor em queimação, choque elétrico, formigamento no trajeto do nervo lesionado, são sinais de que o nervo foi lesionado durante a intervenção cirúrgica. O trauma cirúrgico decorrente do corte da pele e/ou músculo realizado pelo médico para ter acesso a região de interesse, gera um processo inflamatório local. O conteúdo intracelular das células danificadas pela incisão é liberado para o meio extracelular, dentre eles a bradicinina, íons potássio, íons de hidrogênio, fator de crescimento do nervo (NGF) e trifosfato de adenosina (ATP). Estas substâncias contribuem para o processo de sensibilização (Chapman; Vierck, 2017; Segelcke; Pradier; Pogatzki-Zahn, 2019).

As células imunológicas residentes no local da lesão ou circulantes são atraídas por quimiotaxia para ajudar no reparo tecidual e restabelecimento da função. As células imunológicas liberam vários mediadores como prostaglandina, bradicinina, histamina, interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina IL-6 (IL-6) e NGF (Basbaum *et al.*, 2009) (Figura 2). Estas substâncias liberadas na área lesionada irão atuar diretamente em seus receptores expressos nos neurônios sensoriais periféricos, modulando a excitação neuronal e transdução do sinal (Baral; Udit; Chiu, 2019; Grace *et al.*, 2021; Ji; Xu; Gao, 2014; Pinho-Ribeiro; Verri; Chiu, 2017). As quimiocinas CCL17 e CCL22 são super reguladas na DPO pelas células dendríticas.

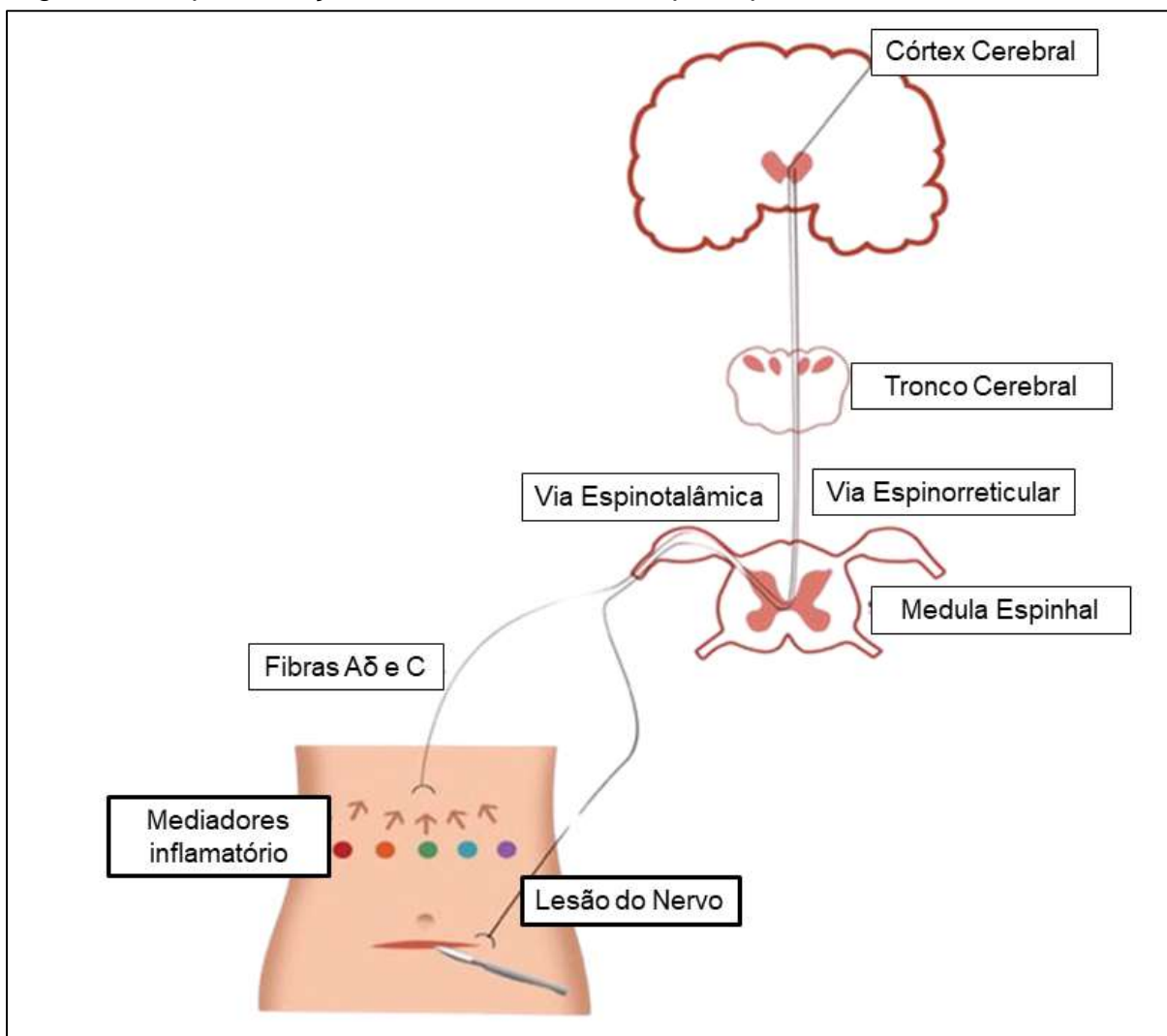
Essas quimiocinas se ligam no receptor CCR4 expressos nos neurônios periféricos, aumentando a excitabilidade neuronal, contribuindo no processo de hiperalgesia térmica e mecânica (Silva *et al.*, 2022).

Os neurônios de primeira ordem expressam diversos receptores, dentre eles o receptor de tropomiosina relacionado à quinase A (TrkA). A ligação do NGF ao receptor TrkA promove mudança conformacional, resultando na ativação de proteínas intracelulares como a p38, envolvida no aumento da expressão do TRPV1. A PI3K também ativada mediante a ativação do receptor TrkA pelo NGF. A PI3K uma vez fosforilada, fosforila resíduo específico do TRPV1 reduzindo seu limiar de ativação (Bonnington; McNaughton, 2003).

Assim como o TRPV1, outros canais iônicos e canais dependente de voltagem são supra regulados nos neurônios nociceptivos como ASIC3, Nav 1.7, facilitando a despolarização dos neurônios na DPO (Pogatzki-Zahn; Segelcke; Schug, 2017; Rosenberger; Pogatzki-Zahn, 2022). Do mesmo modo, as fibras A β responsáveis pela transmissão de estímulos não nocivos apresentam alterações no seu fenótipo, após lesão tecidual. Estas fibras A β passam a expressar receptores nociceptivos que normalmente são expressos apenas nas fibras C e A δ , como consequência as fibras A β passam a fazer sinapse com neurônios nociceptivos espinhais.

A inflamação no local da incisão cirúrgica, pode ser intensificada pelos neurônios nociceptivos que possuem propriedades eferente secretando neuropeptídeos pró-inflamatórios como a substância P (SP), CGRP e neuroquinina A. Estas substâncias contribuem na intensificação do processo inflamatório, promovendo vasodilatação e ativação dos mastócitos que se degranulam, liberando histamina, bradicinina e prostaglandina (Basbaum *et al.*, 2009). Embora o tempo de cicatrização dos tecidos seja diferente, a depender do local e extensão da lesão, o processo inflamatório tende a se resolver dentro de uma a duas semanas. Entretanto esse processo inflamatório pode persistir indefinidamente, mesmo na ausência dos sinais cardinais (dor, inchaço, rubor, calor e perda de função). A persistência destas substâncias inflamatórias de baixo grau pode contribuir na perpetuação do sintoma doloroso pós-operatório.

Figura 2 - Representação de um modelo de dor pós-operatória



Fonte: Adaptado de Al-Mahrezi e Al-Shidhani (2018).

Legenda: O dano tecidual promovido pelo bisturi, resulta na liberação de mediadores pró inflamatórios para promover o reparo tecidual. No entanto, estes mediadores podem induzir a sensibilização periférica, reduzindo o limiar de ativação dos nociceptores o que resulta no aumento da excitabilidade das fibras nociceptivas, potencializando a geração de potenciais de ação.

2.2.3 Mecanismos centrais envolvidos da DPO

Assim como na sensibilização periférica, a sensibilização central faz parte de um processo adaptativo e autolimitado, sendo considerada um componente chave da hipersensibilidade à dor pós lesão. A sensibilização central tem como finalidade gerar uma amplificação das vias centrais da dor, de modo que o indivíduo evite se mover ou tocar na região lesada até que a integridade dos tecidos se restabeleça (Woolf, 2018).

Porém em algumas circunstâncias, a sensibilização central pode se prolongar se tornando mal adaptativa, como no caso da DCPO e outros tipos de dores crônicas.

Um aumento nos níveis de glutamato é observado no CDME durante a lesão, promovendo despolarização sustentada dos neurônios de segunda ordem. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, e se liga nos receptores inotrópico como N-methyl-D-aspartate (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), cainato e receptores metabotrópicos acoplado a proteína G. Dentre estes receptores o NMDA parece ser crítico para o desenvolvimento da sensibilização central em modelo de dor neuropática (Mao *et al.*, 1992), inflamação (Ren; Dubner, 1993) e irritação química (Chaplan; Malmberg; Yaksh, 1997). No entanto, na DPO induzida por incisão plantar, os receptores NMDA localizados no CDME não contribuíram no processo de hipersensibilidade mecânica como observado em outros estudos. A administração intratecal do antagonista NMDA antes da incisão plantar (Pogatzki; Zahn; Brennan, 2000), bem como após a incisão plantar (Zahn; Brennan, 1998), não modificou o limiar nociceptivo mecânico, demonstrando que estes receptores, não possuem uma contribuição significativa no processo de iniciação e manutenção da DPO. Considerando a particularidade da ativação dos receptores NMDA que é bloqueado pelo íon magnésio, possivelmente o modelo de incisão plantar não gerou aumento da excitabilidade neuronal suficiente para expelir o íon magnésio do receptor NMDA e promover o influxo de cálcio.

Em contrapartida, os receptores AMPA desempenham um papel importante na hiperalgesia pós-operatória. Os mecanismos pelo qual o tráfego dos receptores AMPA é aumentado na membrana plasmática pós-sináptica, ocorre por meio da fosforilação da subunidade GluR1 do receptor AMPA em Serina-831 pela fosfoquinase C gama (PKC γ), que aumenta o influxo de íons cálcio, após a ligação do glutamato nos receptores AMPA favorecendo a excitabilidade do neurônio de segunda ordem (Wang *et al.*, 2013).

Em alguns casos a resolução da DPO ocorre por conta de um estado chamado de sensibilização latente, isso significa que mesmo que a dor desapareça, a cirurgia predispõe o surgimento de dor persistente diante de um novo insulto nocivo subsequente (Gulur; Nelli, 2019). A perda da homeostase após lesão tecidual leva à ativação do sistema de modulação da dor inibitório na tentativa limitar a intensidade e a duração da hipersensibilidade. Esta resposta adaptativa é denominada de alostase onde um novo

estado biológico se instala para gerar um equilíbrio de alto nível entre o sistema inibitório e o sistema pro-nociceptivo (Richebé; Capdevila; Rivat, 2018). Este sistema compensatório em algum momento pode entrar em exaustão devido a sua super ativação ou diante de um novo estímulo nocivo subsequente, retornando ao quadro de hiperalgesia (Richebé; Capdevila; Rivat, 2018).

As células da glia presentes na medula espinhal são importantes protagonistas da sensibilização central, inclusive essas células estão envolvidas na gênese e manutenção da DPO (Elisei *et al.*, 2020; Ying *et al.*, 2014). A glia, em conjunto, são células abundantes no SNC, superando em grande parte os neurônios. Além disso, elas não possuem capacidade de transmitir impulsos nervosos. Quando ativada, a micróglia sofre alterações morfológicas como hipertrofia proliferação, aumento dos marcadores e receptores de superfície celular, além de alterações nas atividades funcionais, por exemplo, a liberação de substâncias pró-inflamatórias (Bradesi, 2010). Assim, substâncias liberadas tanto pela micróglia quanto pelos astrócitos durante a dor, podem ativar o neurônio de 2ª ordem no CDME, potencializando o impulso nociceptivo (Grace *et al.*, 2014), contribuindo para sensibilização central.

2.3 TRPV1

O receptor de potencial transitório (TRP) representa uma grande família diversificada de canais iônicos que respondem a uma ampla gama de estímulos químicos e físicos. Com base na sua homologia de sequência, os canais TRP são divididos em sete subfamílias denominadas TRPC (canônico), TRPA (anquirina), TRPM (melastatina), TRPP (policístico), TRPML (mucolipina), TRPN (sem canais C de potencial mecanorreceptor) e TRPV (vanilóide) (Zhang *et al.*, 2023). Destes canais iônicos o TRPV é subcategorizado em seis membros, sendo o TRPV1 o mais bem caracterizado, diante de seu papel na fisiologia da dor e outras funções fisiológicas. O TRPV1 é um canal homotetrâmeros simétrico, onde cada subunidade é composta por quatro módulos, o sensor de voltagem (S1-S4), região do poro (S5-S6) e a porção N-terminal e C-terminal localizados na região citoplasmática (Latorre *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2015) (Figura 3).

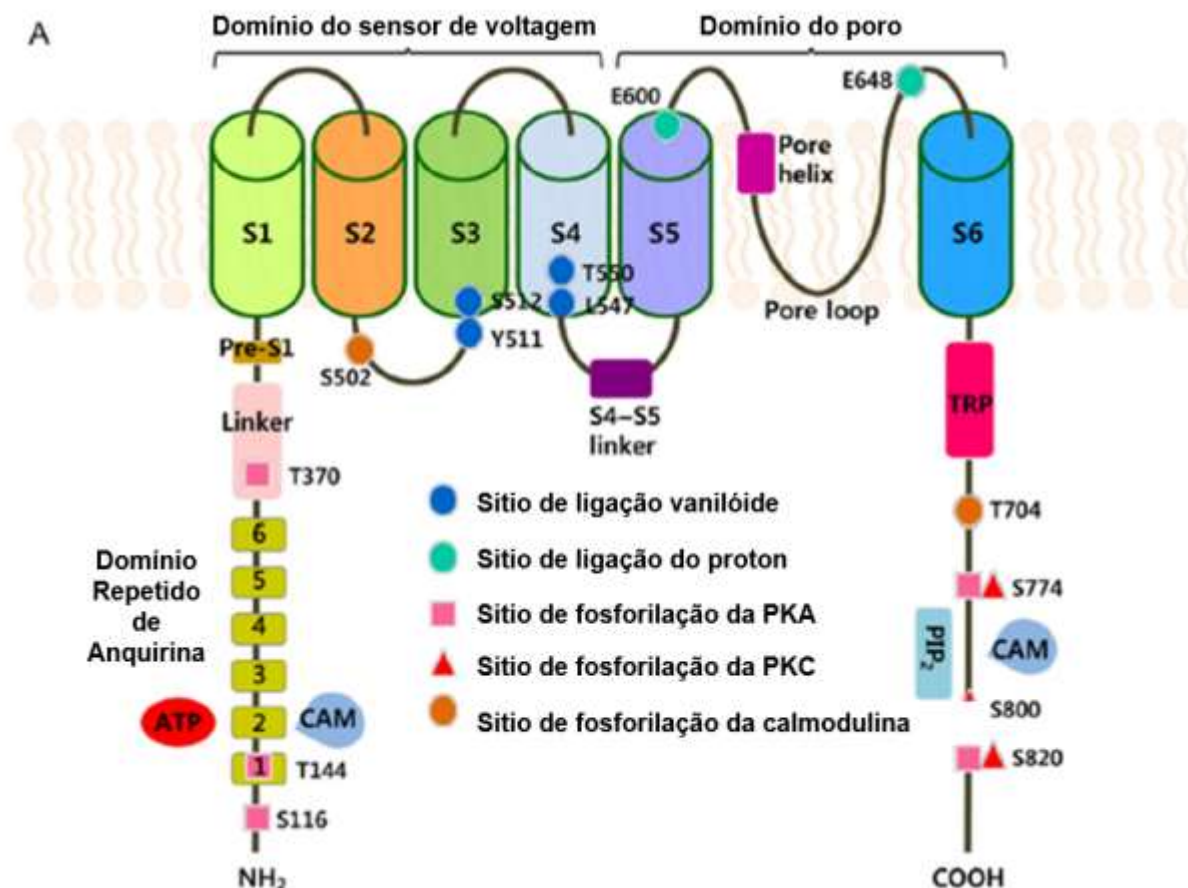
David Julius foi o pesquisador laureado com o prêmio Nobel no ano de 2021, ao descobrir que a capsaicina, um componente pungente da pimenta malagueta, ao ser ingerida, se liga aos receptores TRPV1 causando a sensação de dor ardente (Logan, 2021). O TRPV1 pode ser expresso em células neuronais e não neuronais. Na periferia o TRPV1 é expresso em fibras sensoriais nociceptivas (Caterina *et al.*, 1997). Este receptor também pode ser encontrado em várias regiões do SNC que estão diretamente ou indiretamente envolvidos com a via nociceptiva, como córtex somatossensorial, córtex cingulado anterior (CCA), ínsula, RVM, PAG, amígdala, CDME, hipotálamo, núcleos talâmicos e células da glia (Choi *et al.*, 2016).

Além da capsaicina outros ligantes exógenos podem ativar os receptores TRPV1, como eugenol, resiniferatoxin (RTX), canabinoides (canabidiol, tetrahydrocannabinol, canabinol, cânfora) derivados animais (gambierol, brevetonina), derivados do gengibre (gingerol 6 e gingerol 8). Várias substâncias químicas endógenas, denominadas endovaniloide podem ativar diretamente os receptores TRPV1, por exemplo, endocanabinóides, pH baixo, substâncias geradas do metabolismo lipídico sob condições inflamatórias (Van Der Stelt; Di Marzo, 2004). A maioria deles são derivados de ácidos graxos, incluindo aminas (anandamida, N-araquidonoildopamina, N-oleoiletanolamina, N-araquidonolilserina), ácidos eicosatetraenóicos oxigenados (produtos de lipoxigenase e seus análogos hidroxílicos, prostaglandinas e leucotrienos) e ácido lisofosfatídico (Benítez-Angeles *et al.*, 2020; Mickle; Shepherd; Mohapatra, 2015; Schumacher, 2010). Enquanto outras moléculas como NGF, IL-1 β , TNF, prostaglandin E2 (PGE2), leukotriene B4, bradicicnina podem modular alostericamente a atividade do TRPV1 reduzindo seu limiar de ativação (Baral; Udit; Chiu, 2019; Elokely *et al.*, 2016). Como resultado da ativação do TRPV1, um influxo dos íons de sódio e cálcio alteram o potencial de membrana, o que pode levar à ativação de canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem resultando no disparo do PA (Caterina; Julius, 2001). Além da função de transdução do estímulo nocivo, o TRPV1 possui um papel eferente, o influxo de íon cálcio na célula decorrente da ativação do TRPV1 promove fusão das vesículas contendo neuropeptídeos como SP e CGRP para a periferia, evento denominado como inflamação neurogênica. A liberação destes neuropeptídeos no local da lesão promove vasodilatação e ativam mais células imunes, levando à liberação de mediadores pró-inflamatórios que

resultam em um ciclo de feedback de sinalização positiva, causando potencialização da ativação do canal TRPV1 (Julius, 2013).

Visto que na DPO vários mediadores que compõem a “sopa inflamatória” são liberados, estas substâncias ao se ligarem nos seus respectivos receptores promovem mudanças pós-traducionais com ativação de quinases intracelulares, como a PKA, PKC, MAPK, p38, PI3k que influenciam na sensibilidade do TRPV1, por meio da fosforilação de sítios específicos do TRPV1 (Lee *et al.*, 2015; Palazzo *et al.*, 2010). Esta mudança na sensibilidade do TRPV1 permite que ele seja ativado por um estímulo de menor intensidade, levando a uma hipersensibilidade a estímulos nocivos após lesão tecidual. Entretanto, um efeito de dessensibilização pode ocorrer mediante à exposição prolongada ou sob altas concentrações de capsaina, estimulando o TRPV1, levando a um período refratário de longa duração (Caterina; Julius, 2001; Frias; Merighi, 2016). O papel do TRPV1 como um receptor nociceptivo nos neurônios nociceptivos já é bem descrito na literatura, no entanto o papel destes receptores no SNC, principalmente a nível medular, precisa de melhor compreensão, visto que sua expressão se encontra alterada em condições patológicas de dor nociceptiva e neuropática (Choi *et al.*, 2016; Echeverry; Rodriguez; Torres, 2016).

Figura 3 - Estrutura do TRPV1



Fonte: Adaptado de Cui *et al.* (2016).

Legenda: Arquitetura geral do canal TRPV1. (A) Organização de domínio dos módulos TRPV1 representado em uma visão bidimensional. O domínio transmembrana é composto por seis segmentos. Os domínios S1 a S4 formam o sensor de voltagem, S5 a S6 formam o canal iônico seletivo. O TRPV1 é composto por uma porção C-terminal e N-terminal. Possui resíduo específico para ligação de endovalinóides, prótons e sítios de fosforilação para as proteínas quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA) e calmodulina (CAM).

2.4 PI3K-AKT-mTOR

Embora os estudos tenham avançado na compreensão da fisiopatologia da DPO, o tratamento ainda é limitado, os mecanismos envolvidos nesse processo necessitam de maiores investigações. Sendo assim, a via “alvo da rapamicina em mamíferos” (do inglês mTOR: *mammalian target of rapamycin*) pode ser um importante mecanismo envolvido na DPO a nível espinhal.

A via mTOR está inserida dentro do complexo da via de sinalização intracelular fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/proteína quinase B (AKT), a qual tem sido considerada

uma via regulatória fundamental nos processos de tradução que envolvem progressão do ciclo celular, sobrevivência celular, migração e síntese proteica (Corradetti; Guan, 2006; Wong; Engelman; Cantley, 2010) (Figura 4). Uma vez fosforilada, a PI3K converte o PIP2 (fosfatidilinositol-4, 5-bifosfato) em PIP3 (fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato) (Mantyh *et al.*, 2011; Martelli *et al.*, 2007) recrutando assim, proteínas que contenham homologia com a pleckstrina (PH), como a AKT e a PDK1 (proteína-quinase 1 dependente de fosfoinosítideo-3) (Kang *et al.*, 2005). A interação do domínio PH da AKT com o PIP3 provocará alterações conformacionais na molécula de AKT, resultando na exposição de dois sítios de fosforilação (Thr 308 no domínio quinase e Ser 473 no domínio regulatório) (Jacinto *et al.*, 2006). A completa ativação de AKT somente ocorre por meio de dois eventos: no primeiro, AKT é parcialmente ativada pela fosforilação por PDK1 na Thr 308; no segundo, a ativação completa de AKT requer a fosforilação do Ser 473 por mTOR-Rictor (Foster; Fingar, 2010).

A regulação de mTOR pela proteína AKT pode ocorrer direta ou indiretamente (Laplante; Sabatini, 2009). Diretamente, a proteína AKT pode ativar mTOR pela fosforilação nos domínios Thr 2446 e Ser 2448 dessa proteína e, indiretamente, ela pode inibir a atividade do complexo TSC1/TSC2 (hamartina/tuberina) (Zhang *et al.*, 2003). O complexo TSC1/TSC2 atua como uma proteína de ativação da GTPase (GAP), inibindo a proteína G Rheb (homólogo de Ras enriquecido no cérebro). Por fosforilar TSC2, a AKT perturba o complexo TSC, permitindo assim que a Rheb se ligue ao ATP e converta-se do estado GDP-Rheb (inativo) para o estado GTP-Rheb (ativo). GTP-Rheb, por sua vez, se liga ao domínio quinase de *Regulatory associated protein of mTOR* (RAPTOR) (Inoki *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003) e essa ligação provoca alterações conformacionais no complexo mTOR-Raptor promovendo sua ativação (Long *et al.*, 2005).

A proteína mTOR é uma serina/treonina quinase, considerada membro da família proteína-quinase, envolvida em múltiplas funções celulares (Zoncu; Efeyan; Sabatini, 2011). Essa proteína pode formar dois novos complexos com funções diferentes: mTORC1 e mTORC2. As proteínas mTOR RAPTOR) e “40 kDa proline-rich AKT substrate” (PRAS40) são específicas de mTORC1. Já as proteínas “rapamycinin sensitive companion of mTOR” (RICTOR), “mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1” (mSIN1) e “protein observed with RICTOR” (PROTOR) são específicas de

mTORC2. Enquanto a mTORC2 é responsável pela fosforilação de alguns membros do grupo de quinases AGC, como AKT (S473), e tem sido relacionada ao controle do citoesqueleto, a mTORC1 é um complexo bem caracterizado como um regulador da síntese de proteínas, principalmente de moléculas envolvidas na transmissão do impulso nociceptivo (Liu; Lv; Ren, 2018; Zoncu; Efeyan; Sabatini, 2011).

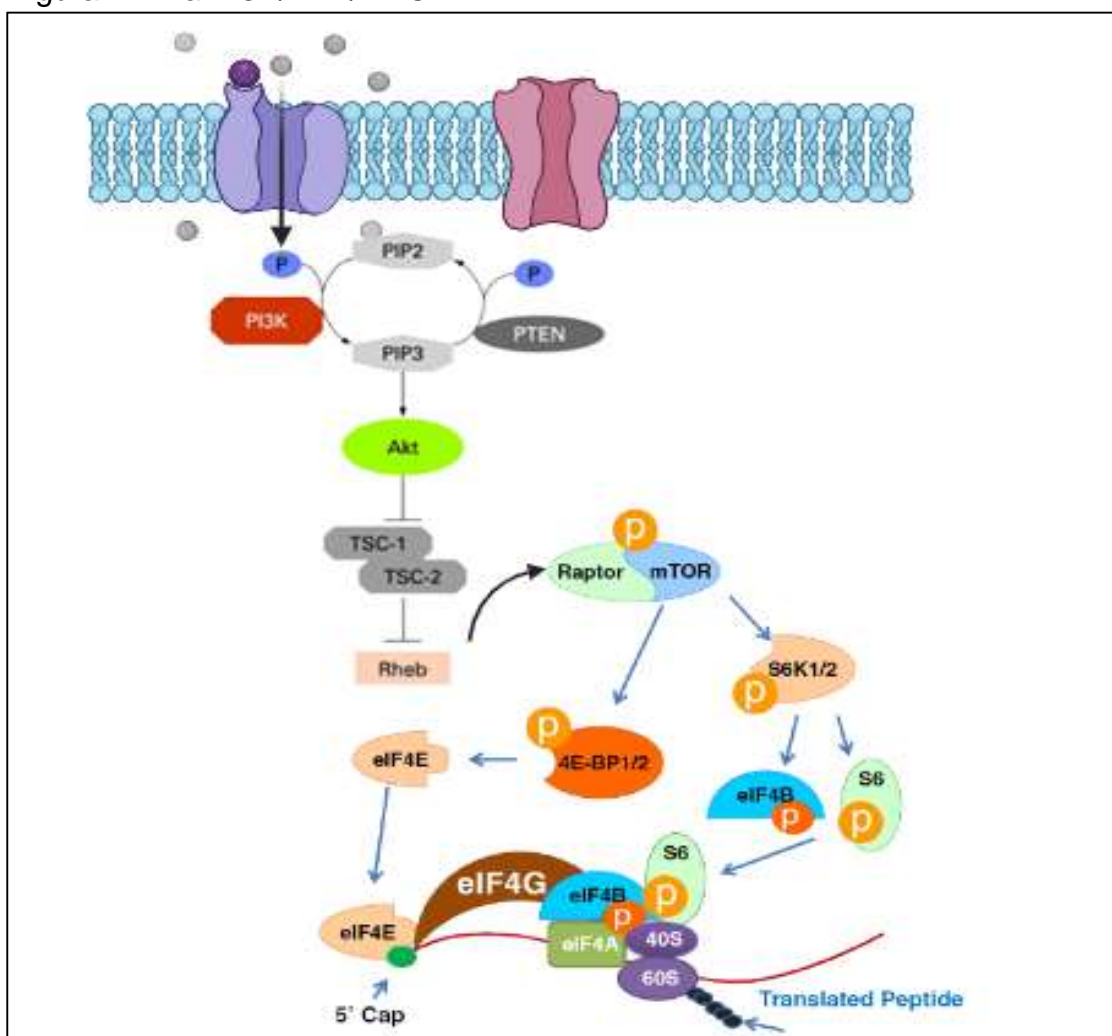
O processo de tradução de proteínas é dividido em três etapas, sendo elas iniciação, alongação e terminação (Proud, 2007). Já é bem estabelecido que ativação de mTORC1 pode regular a tradução de proteínas, através da fosforilação da proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótica 4E (4E-BP1) e p70 ribossomal S6 proteína quinase 1/2 (S6K1/2) (Figura 4). A proteína 4E-BP1 permanece ligada ao fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E) impedindo a tradução (Alberts *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2024). No entanto a fosforilação de 4E-BP1 pela mTORC1 altera sua atividade, permitindo que eIF4E se dissocia de 4E-BP1, ficando livre para se ligar na região cap de 7-metil-guanina na extremidade 5' do RNAm juntamente com outras proteínas envolvidas na iniciação da tradução (Roux; Topisirovic, 2018). A ativação de mTOR também induz a fosforilação de outras proteínas *downstream* com as proteínas ribossômicas S6 (S6) e a S6K1/2 que por sua vez ativa o fator de iniciação eucariótico 4B (eIF4B) que se unem as outras proteínas de iniciação da tradução formando um complexo de proteínas, envolvidas na primeira etapa da transdução (Proud, 2007).

Prévios estudos já haviam demonstrado que tanto a inibição da PI3K quanto da via PI3K/AKT reverteu a DN e inflamatória em ratos e camundongos e que essas proteínas estão envolvidas na sensibilização central da dor (Ji *et al.*, 1999; Pezet *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2007). Além disso, o mTOR também foi identificado em neurônios sensoriais e no CDME durante o processo nociceptivo, evidenciando a sua contribuição para a amplificação da resposta nociceptiva (Géranton *et al.*, 2009). Nesse contexto, os estudos encontraram que a administração intratecal de rapamicina, um inibidor específico de mTOR, induz antinocicepção em modelos de dor inflamatória em roedores (Géranton *et al.*, 2009; Price *et al.*, 2007).

Guo *et al.* (2017) demonstraram que após indução da DN em ratos houve aumento da expressão de OX-42 (um marcador de micróglia) e de PI3K, AKT e mTOR no CDME. Além disso, a inibição da PI3K por um inibidor específico reduziu a alodínia mecânica

induzida pela neuropatia e a expressão do OX-42. Entretanto, outro estudo demonstrou que tanto a expressão da AKT quanto do OX-42 estava aumentada em CDME, em modelo experimental de câncer ósseo em ratos e essa expressão foi reduzida em animais pré-tratados com um inibidor de AKT (Jin *et al.*, 2015). Em relação a DPO, ainda é escasso as evidências que demonstram como a via PI3K/AKT/mTOR é ativada.

Figura 4 - Via PI3K/AKT/mTOR



Fonte: Adaptado de Lutz *et al.* (2015).

Legenda: Via PI3K/AKT/mTOR envolvida na tradução das proteínas. A ativação de mTOR mediante a ativação da PI3K/AKT, resulta na ativação de proteínas *downstream* como de 4E-BP1/2, S6K1/2, S6. A fosforilação de 4E-BP1/2 provoca a liberação de eIF4E que fica então livre para se combinar com o complexo de iniciação da tradução. O eIF4B também faz parte do complexo de proteínas envolvidas na iniciação, após sua fosforilação por S6K1. 4E-BP1/2: proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótica 4E; 40S: uma pequena subunidade ribossômica eucariótica; 60S: uma grande subunidade ribossômica eucariótica. eIF4E/B/G/A: fator de iniciação da tradução eucariótica 4E/4B/4G/4A. mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos; p: fosforilado; S6K1/2: p70 ribossomal S6 Quinase 1/2.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo investigar o envolvimento dos receptores TRPV1 sobre os níveis de expressão da via PI3K/AKT/mTOR na medula espinhal na DPO em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o envolvimento dos receptores TRPV1 na medula espinhal, de camundongo com DPO induzida por IRPM;
- Verificar o envolvimento espinhal da via PI3K/AKT/mTOR em modelo de DPO induzida por IRPM;
- Avaliar expressão espinhal dos receptores TRPV1 e da via PI3K/AKT/mTOR em modelo de DPO induzida por IRPM;
- Avaliar a participação dos receptores TRPV1 sobre os níveis de expressão da via PI3K/AKT/mTOR em modelo de DPO induzida por IRPM.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL6, pesando entre 20 e 25 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Os animais permaneceram em condições padrões de temperatura (22 °C), ciclo claro/escuro (12 h/12 h) e umidade de 65%, com livre acesso a ração e água até o início de cada experimento. Além disso, os animais foram alojados em caixas de polipropileno, sendo 6 animais por caixa. Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação, recomendadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG. O presente projeto foi aprovado pelo CEUA/UNIFAL-MG, sob o protocolo n: 0007/2021 (Anexo A).

4.2 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Substância para inibição da via PI3K/AKT/mTOR e bloqueio dos receptores TRPV1

- ✓ **SB-366791** (Sigma, EUA peso molecular=287,74). Bloqueador do TRPV1 dissolvido em DMSO, concentração de 28.774 µg e 2.8774 µg/volume de 5 µl (Fernandes *et al.*, 2011);
- ✓ **AS605240** (Sigma, EUA): inibidor da PI3K, diluído em solução salina estéril (0,9%) e 3% de DMSO, concentração 5 µg/volume de 5 µl, adaptado de Manjavachi *et al.* (2019);
- ✓ **A6730** (Sigma, EUA): inibidor da AKT, diluído em DMSO (1%); concentração 1 e 0,1 µg/ volume de 5 µl (Xu *et al.*, 2020);
- ✓ **Rapamicina** (Sigma, EUA): inibidor do mTOR foi diluído em solução salina estéril (0,9%), concentração 1 e 0,1 µg/ volume de 5 µl (Zhang *et al.*, 2013).

Todas as substâncias e veículos foram administradas por via intratecal (i.t). Para tal administração, os animais foram previamente sedados, para que assim possibilitasse a palpação dos espaços intervertebrais lombares L4-L5. A sedação foi realizada por meio de um sistema de vaporização de isoflurano, previamente calibrado, com um fluxo de oxigênio de 2 L/min, dispensando via cone nasal 3% de isoflurano para indução da sedação e 2% para manutenção (Figura 5). Após a sedação, realizou-se a tricotomia da região dorsal dos animais, seguido da assepsia com álcool 70%, seguido da administração das substâncias de acordo com o respectivo grupo. A administração foi feita por meio de uma seringa ultrafina 6 mm X 0,25 mm (cepalab®) de acordo com o procedimento descrito (Hylden; Wilcox, 1980). O movimento de *flinch* da cauda do camundongo é observado após a introdução da agulha no espaço sub-araquinoide, certificando que a agulha está no local correto, para administração intratecal.

Figura 5 - Imagem ilustrativa demonstrando a via de administração intratecal



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Posicionado do camundongo em decúbito ventral, sobre a cama de anestésico inalatório. O fusinho foi colocado sob orifício do sistema de inalação. Após a sedação a agulha foi introduzida no espaço intratecal, para administração das substâncias.

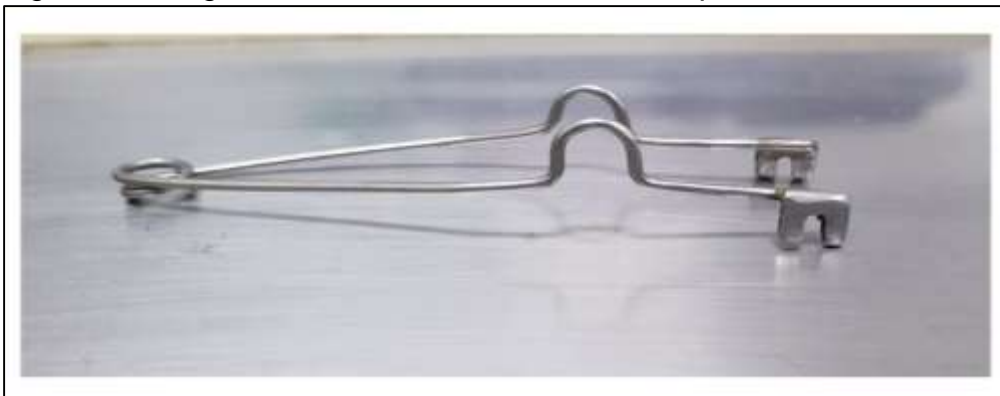
4.3 MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA (DPO)

Para a realização da DPO foi utilizado o modelo de incisão e retração de pele e músculo (IRPM), adaptado de Flatters (2008). Primeiramente os animais foram anestesiados com injeção intramuscular, administrada no músculo gastrocnêmio direito, com uma solução composta por quetamina (60 mg/Kg) e xilazina (8 mg/Kg). O volume utilizado foi de 0,01 ml a cada 10 gramas de peso do animal. Após a sedação dos animais, detectado pela ausência do reflexo de pinçamento da cauda e do reflexo interdigital, foi realizado a tricotomia do membro inferior direito seguido da assepsia da região com povidona iodo.

Os animais foram então posicionados em decúbito dorsal em uma placa de aquecimento (INSIGHT, BRASIL) com intuito de prevenir a hipotermia. Com auxílio de um bisturi uma incisão de 8 mm de comprimento na região da coxa do animal, a 3 mm medial à veia safena. Além disso, uma outra incisão com 5 mm de comprimento foi realizada na camada muscular superficial (músculo grácil), aproximadamente 3 mm medial ao nervo safeno. A região superficial do músculo foi afastada, permitindo a inserção de um micro retrator esterilizado, com extremidades espaçadas em uma distância de 2 a 3 mm, com 4 mm de profundidade de cada dente (Figura 6). A pele e o músculo superficial da coxa permaneceram retraídos de 8 a 10 mm por um período de uma hora (Elisei *et al.*, 2020) (Figura 7). Nos olhos e na região de retração dos músculos foi gotejada solução salina estéril (0,9%) para evitar ressecamento da córnea e a desidratação tecidual.

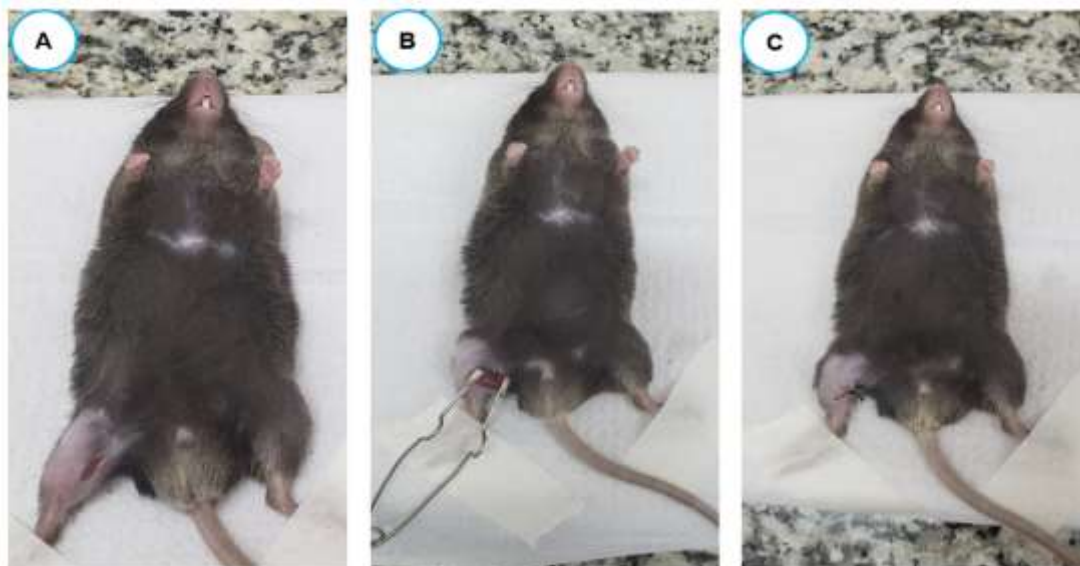
Os animais foram monitorados durante o procedimento e, quando necessário, foi fornecido anestesia adicional utilizando uma subdose anestésica de quetamina e xilazina (1/3 da dose total). Após o período de retração de uma hora, os tecidos foram suturados com fios de sutura de seda 4.0 e após a recuperação da anestesia, todos os animais foram colocados em suas respectivas caixas e mantidos aquecidos sob a luz de uma lâmpada incandescente.

Figura 6 - Imagem ilustrativa do retrator utilizado para IRPM



Fonte: Autora (2024).

Figura 7 - Etapa da cirurgia de IRPM para indução da DPO



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) Após a tricotomia e assepsia do local da IRPM, foi feita uma incisão da pele;
B) incisão dos músculos superficiais e colocação do retrator;
C) sutura da incisão.

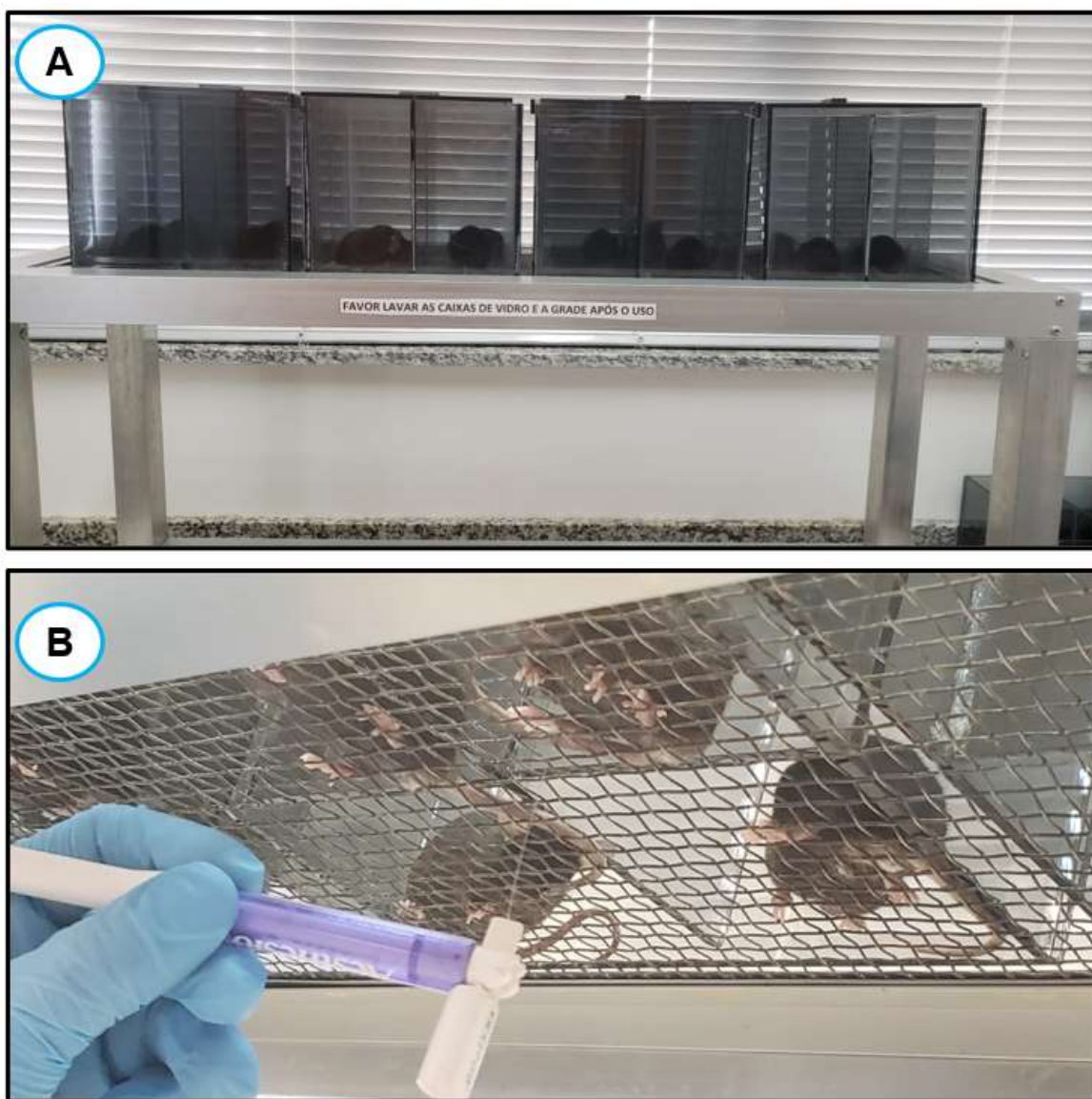
4.4 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO

Com o intuito de investigar a DPO, os animais foram submetidos à avaliação do limiar nociceptivo mecânico utilizando os filamentos de von *Frey* de diversa espessura (0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 0,6; 1,0; 1,4 e 2,0 g) (AESTHESIA®, EUA) de acordo com o método padronizado em nosso laboratório anteriormente (De Oliveira *et al.*, 2020).

Primeiramente, os camundongos foram colocados em caixas de vidro com compartimentos individuais, sobre uma grade de metal que permite a exposição da pata dos animais, por um período de 60 minutos, com a finalidade de permitir a ambientação dos animais ao aparato (Figura 8A). Após o período de ambientação, a avaliação iniciou se aplicando o filamento de menor espessura de forma perpendicular sobre superfície plantar da pata traseira direita do animal por três vezes. Se nenhuma resposta comportamental como retirada brusca, lambida ou agitação for identificada após as três tentativas é aplicado o filamento subsequente mais espesso, por três vezes e assim sucessivamente até observamos uma resposta comportamental, frente ao estímulo mecânico.

Após identificar o filamento capaz de evocar resposta comportamental de nocicepção, este processo é repetido por três vezes, com intervalo de três minutos. A média das 3 medições em gramas foi considerada como o limiar nociceptivo mecânico dos animais (Figura 8 A e B).

Figura 8 - Imagem ilustrativa do aparato utilizado para avaliação do limiar nociceptivo



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A) caixas de vidro com compartimento individual para os camundongos;

B) assoalho de tela vazado, permitindo a aplicação do filamento perpendicular a pata traseira direita do animal.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

Além dos ensaios comportamentais, o presente estudo analisou os níveis de proteínas do TRPV1, PI3K, AKT, mTOR por meio da técnica de western blot. Esse experimento foi importante para verificar a participação do TRPV1 na ativação da via proposta.

No 14º dia os animais com DPO e naive foram eutanasiados com uma overdose de quetamina e xilazina seguido da decapitação. Os segmentos da região lombar da medula espinhal de L4 a L6 foram extraídos cirurgicamente, e armazenados em microtubos e congelados instantaneamente a -196 °C em nitrogênio e mantidos em -80°C até o dia do processamento. Para homogeneização dos tecidos, foi adicionado em cada amostras 150 µL de uma solução tampão de ensaio radioimunoprecipitador (RIPA – R0278, SIGMA®, EUA), contendo 10% de um coquetel inibidor de proteases (P2714, SIGMA®, EUA) e 1% de um coquetel inibidor de fosfatases (P0044, SIGMA®, EUA). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi aliqotado em microtubos e armazenados a -80 °C para dar sequência no experimento.

Posteriormente, foram utilizadas 60 µg de proteínas acrescidas de tampão de amostra Laemmli 4x (BIO-RAD, EUA) com 10% de β-mercaptoetanol que foram aquecidas em banho maria a seco por 5 minutos a 95 °C. Em seguida, as amostras com um volume total em 20 µL foram pipetados no gel de poliacrilamida na concentração de 12% ou 6% dependendo do tamanho da proteína, seguido da eletroforese no gel de poliacrilamida utilizando um aparato Mini- PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BIO-RAD®, EUA) com corrente inicial de 80 V no gel entrada e de 120 V no gel de corrida. Após esta etapa de eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Amershan (SIGMA®, USA) com poro de 0,45 µm de diâmetro, por meio do sistema Trans-Blot Turbo (BIO-RAD®, EUA). Para confirmar se as proteínas foram de fato transferidas para a membrana de nitrocelulose, foi adicionado à solução de Ponceau 0,3%. Após a confirmação da transferência a membrana foi lavada com o tampão de lavagem TBS-Tween (TBST) 1x até a remoção completa do Ponceau e em seguida colocada em solução de bloqueio contendo 5% de albumina de soro bovino (BIO-RAD®, EUA) por 2 horas.

Após o período de bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T 1x por cinco vezes de cinco minutos e incubada *overnight* com o anticorpo primário específico descrito na Tabela 1. No dia seguinte, a membrana foi novamente lavada por cinco vezes de cinco minutos com TBS-T e incubada por um duas horas com o anticorpo secundário correspondente (Tabela 1). Posteriormente a membrana foi novamente lavada cinco

vezes por cinco minutos cada lavagem com TBS-T 1x. As bandas proteicas foram então detectadas por uma reação de quimioluminescência de acordo com a intensidade da densidade óptica de imunorreatividade pelo sistema Chemidoc (Bio-Rad, EUA) e analisadas pelo software ImageLab (Bio-Rad, EUA).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para a quantificação de proteínas pela técnica de Western Blot

Anticorpo Primário	Fabricante código referência	Diluição	Anticorpo secundário	Fabricante código de referência	Diluição
TRPV1	Sigma-Aldrich (A2228)	1:5000	anti-mouse IgG-HRP	Sigma-Aldrich (A9044)	1:2000
PI3K p110 γ	Santa Cruz (Sc 7177)	1:1000	anti-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich (Sc-2004)	1:2000
PIK3CG	Invitrogen (PA5-102022)	1:1000	anti-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich (Sc-2004)	1:2000
AKT (pan C67E7)	Cell Signalling (4691S)	1:1000	anti-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich (Sc-2004)	1:2000
p-AKT1 (Thr 308)	Cell Signalling (13038S)	1:1000	anti-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich (Sc-204)	1:2000
p-mTOR (Ser 2481)	Cell Signalling (2974L)	1:1000	anti-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich (Sc-2004)	1:2000
mTOR	Sigma-Aldrich (SAB5700779)	1:1000	anti-rabbit IgG-HRP	Sigma-Aldrich (Sc-2004)	1:2000

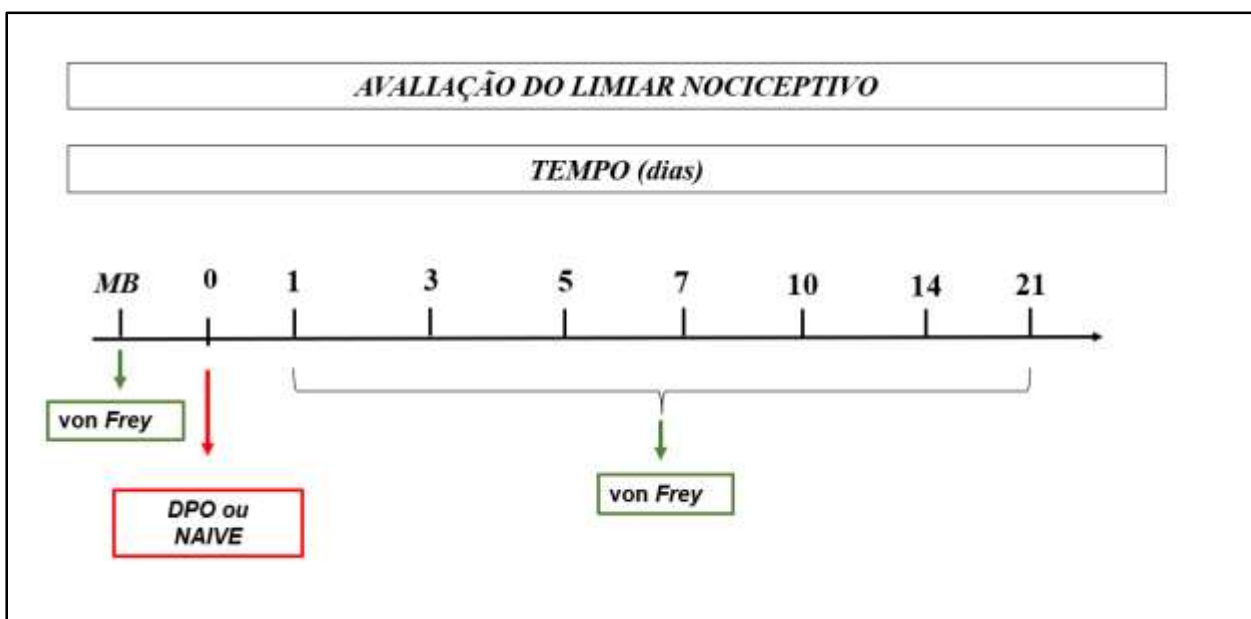
Fonte: Autora (2024).

4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.6.1 Avaliação do limiar nociceptivo de camundongos com DPO

Inicialmente, todos os animais tiveram o limiar nociceptivo avaliado pelos filamentos de von Frey. Posteriormente os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos DPO (animais submetidos ao procedimento cirúrgico de IRPM para indução da DPO) e naive (animais que não passaram por nenhuma intervenção). Após a indução da DPO nos dias 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21 foi avaliado o limiar nociceptivo para verificar as modificações da resposta nociceptiva ao longo do tempo e estabelecer o dia que os demais procedimentos foram realizados (Figura 9).

Figura 9 - Delineamento experimental avaliação do limiar nociceptivo



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Protocolo experimental para a avaliação do limiar nociceptivo. Primeiramente foi realizada a MB pelo teste de von Frey, seguido do modelo de cirurgia de DPO, logo após novas medidas no limiar nociceptivo foram realizadas nos dias 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14 e 21 dias.

Nota: i.t: intratecal; MB: medida basal; DPO: dor pós-operatória.

4.6.2 Avaliação da participação dos receptores TRPV1 e da via PI3K/AKT/mTOR na medula espinhal de camundongos com DPO

O envolvimento da via PI3K/AKT/mTOR e dos receptores TRPV1 foram investigados na fisiopatologia da DPO a nível medular. Para tal investigação, os experimentos foram realizados na seguinte sequência, primeiramente os camundongos foram avaliados pelo teste de von *Frey*, para obter medida basal do seu limiar nociceptivo. Após a avaliação basal os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais naive e DPO (submetidos a cirurgia de IRPM). Passados 14^o dias da indução da DPO os animais foram reavaliados novamente pelo teste de von *Frey* para confirmar a presença da alodinia mecânica induzida pela DPO. Após a confirmação da presença da alodinia mecânica, os animais receberam administração i.t dos inibidores da PI3k/AKT/mTOR e bloqueador do TRPV1 de acordo com seus respectivos grupos, seguido da avaliação do limiar nociceptivo nos seguintes tempos 1, 3, 5, 7 e 24 horas (Figura 10).

Grupos para investigação do envolvimento dos receptores TRPV1 na DPO, a concentração do bloqueador SB-366791 (peso molecular= 287,74), foi selecionada de acordo com o estudo de Fernandes *et al.* (2011).

- NAIVE
- DPO
- NAIVE + SB-366791 (28.774 µg/volume de 5 µl)
- DPO + SB-366791 (28.774 µg/ volume de 5 µl)
- DPO + SB-366791 (2.8774 µg/volume de 5 µl)

Grupos para investigação do envolvimento da PI3k na DPO, a concentração do inibidor AS605240 foi selecionada de acordo com o estudo de Manjavachi *et al.* (2019).

- NAIVE
- DPO
- NAIVE + AS605240 (5 µg)
- DPO + AS605240 (5 µg)
- DPO + AS605240 (0,5 µg)

Grupos para investigação do envolvimento de AKT na DPO, a concentração do AS6730, foi selecionada de acordo com o estudo de Xu *et al.* (2020):

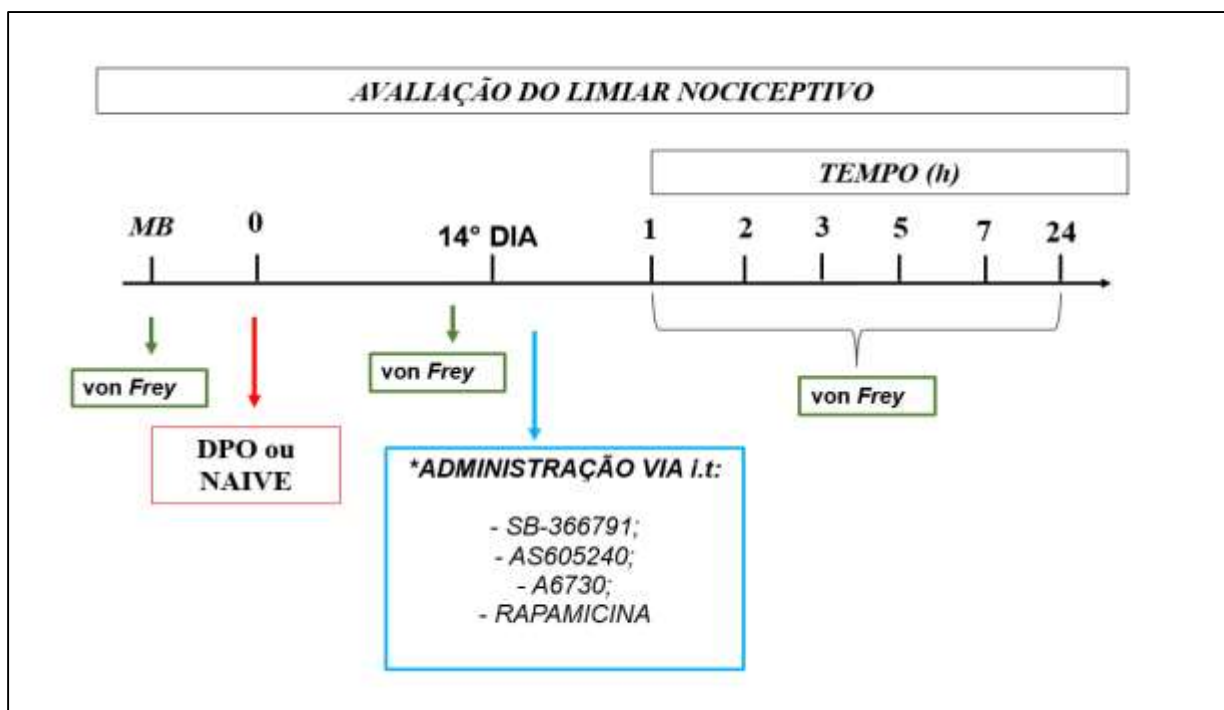
- NAIVE
- DPO
- NAIVE + AS6730 (1 µg)

- DPO + AS6730 (1 μg)
- DPO + AS6730 (0,1 μg)

Grupos para investigação do envolvimento de mTOR na DPO, a concentração de rapamicina utilizada, foi selecionada de acordo com o estudo de Zhang *et al.* (2013).

- NAIVE
- DPO
- NAIVE + rapamicina (1 μg)
- DPO + rapamicina (1 μg)
- DPO + rapamicina (0,1 μg)

Figura 10 - Delineamento experimental da sequência de execução dos experimentos



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Protocolo experimental da ordem de execução dos experimentos. Primeiramente foi realizado a MB do limiar nociceptivo pelo teste de von Frey seguida da DPO. No 14º dia novas medidas no limiar nociceptivo foram realizadas seguida da administração das substâncias i.t e avaliação do limiar nociceptivo. Nota: i.t: intratecal; MB: medida basal; DPO: dor pós-operatória.

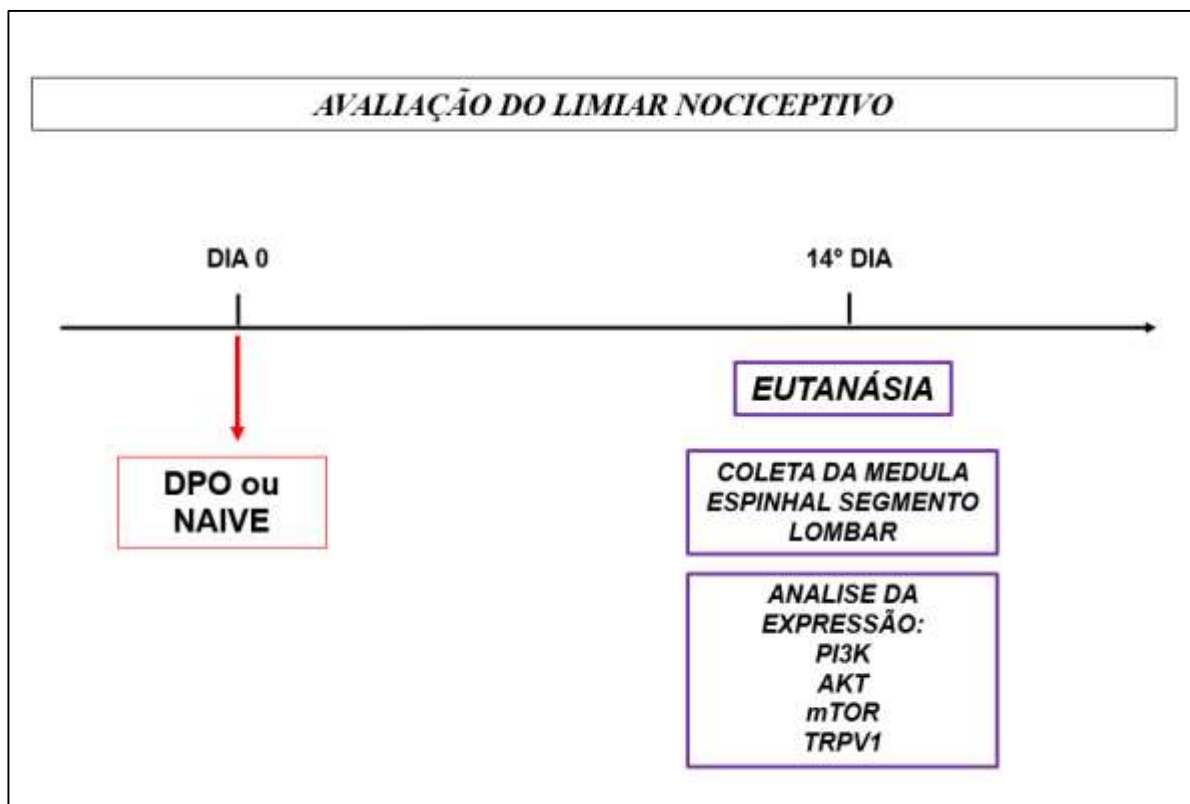
4.6.3 Avaliação da expressão da via PI3K/AKT/mTOR e dos receptores TRPV1 na medula espinal de camundongos com DPO

Esta etapa foi realizada com o intuito de verificar se a DPO promove alterações nos níveis de expressão de proteína dos receptores TRPV1 e da PI3K/AKT/mTOR na medula espinhal. Inicialmente os camundongos foram divididos em dois grupos DPO e naive, no 14º dia após a indução da DPO os animais foram eutanasiados e o segmento da coluna lombar foi coletado para posterior análise dos níveis de expressão de proteínas utilizando a técnica de Western Blot (Figura 11).

Grupos para análise da expressão de proteínas:

- DPO
- Naive

Figura 11 - Delineamento experimental da sequência de execução dos experimentos



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Protocolo experimental da ordem de execução dos experimentos. No 14º dia após a DPO os animais foram eutanasiados e o segmento da medula espinhal foi coletado para posterior análise dos níveis de expressão das proteínas.

Nota: DPO: dor pós-operatória.

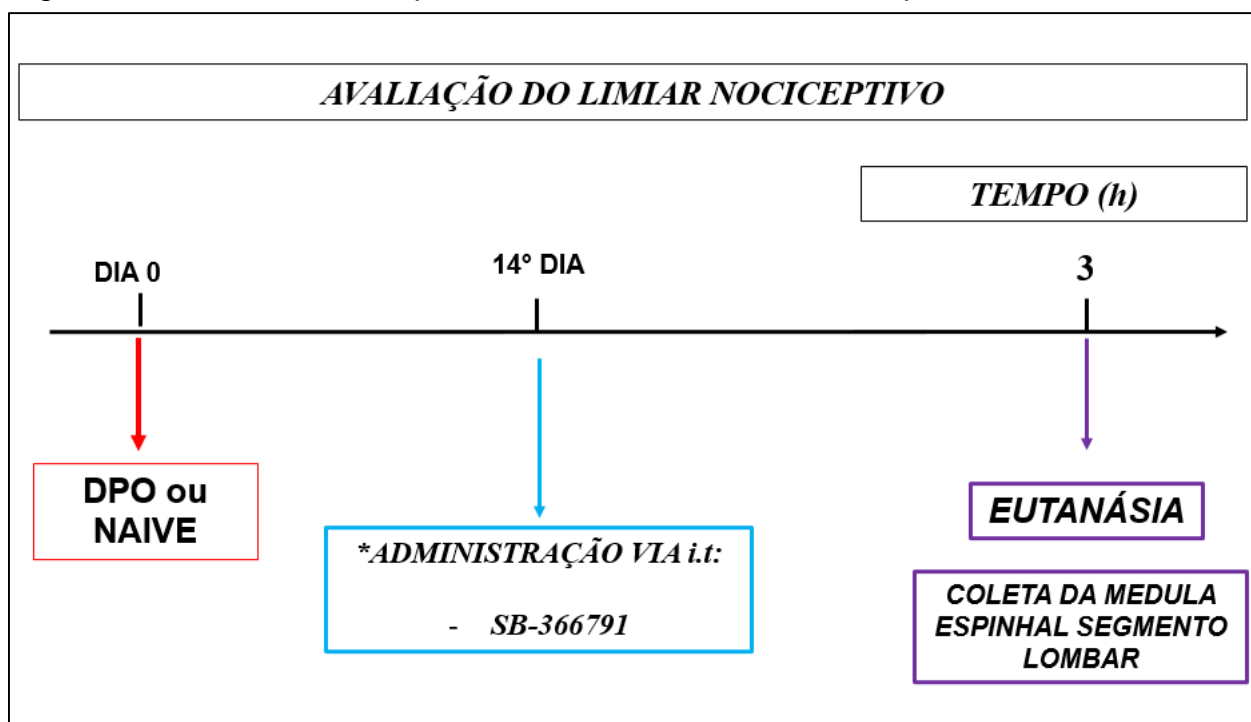
4.6.4 Avaliação da participação dos receptores TRPV1 na ativação da via PI3K/AKT/mTOR na DPO

Após análise dos níveis de expressão proteica da PI3K/AKT/mTOR e dos receptores TRPV1, esta etapa do experimento tem a finalidade de verificar se os receptores TRPV1 contribuem na ativação da via de sinalização intracelular PI3K/AKT/mTOR. Os animais foram divididos em dois grupos DPO e NAIVE, no 14º dia de DPO o segmento da coluna lombar foi coletado após três horas da administração i.t do bloqueador (SB-36679) do TRPV1, para posterior análise da expressão das proteínas (Figura 12).

Grupos para análise da expressão de proteínas:

- NAIVE
- DPO+ SB-366791

Figura 12 - Delineamento experimental da coleta da medula espinal



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Protocolo experimental ilustra a ordem de execução dos experimentos. No 14º dia após a DPO os animais receberam administração i.t do bloqueador dos receptores TRPV1 (SB-366791). Três horas após a administração do bloqueador, os animais foram eutanasiados e o segmento da medula espinal foi coletado. Nota: i.t: intratecal; DPO: dor pós-operatória.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média \pm E.P.M. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizado a análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*). Já o tratamento estatístico dos dados obtidos nos ensaios moleculares foi realizado por meio do teste t student não pareado. As análises do ANOVA foi seguida pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram consideradas estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. A análise estatística e a preparação dos gráficos foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 5 (GraphPad Software, EUA).

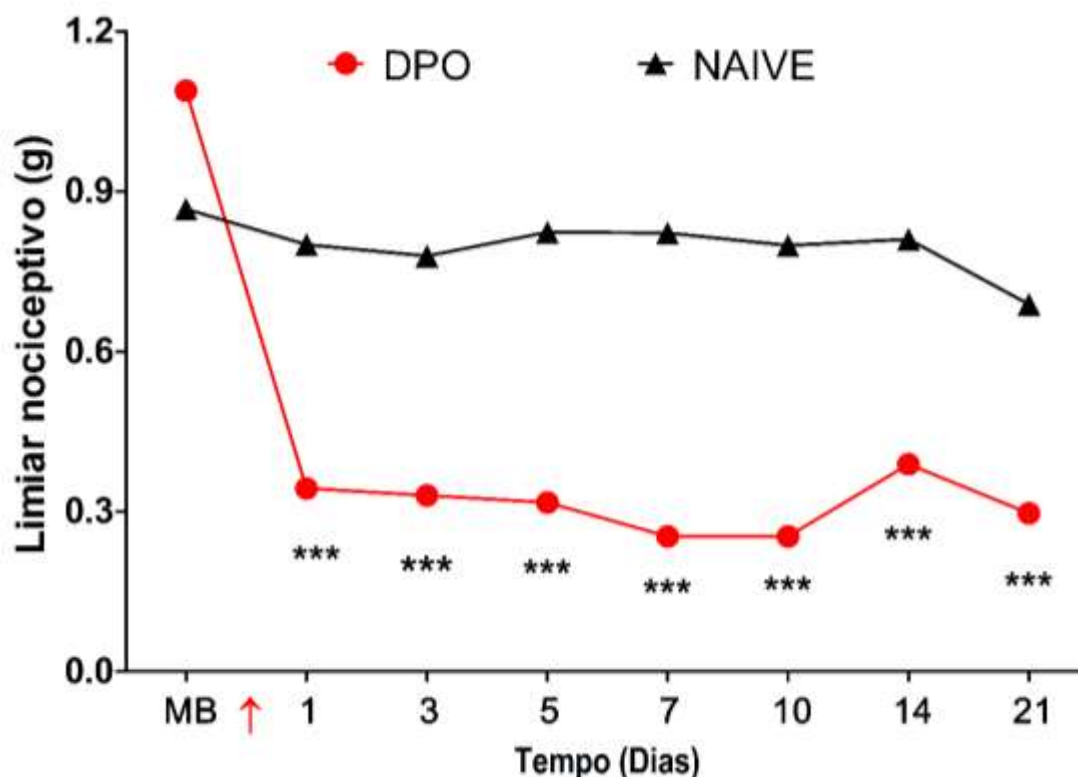
5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO APÓS A CIRURGIA DE DOR PÓS-OPERATÓRIA

Inicialmente os animais foram submetidos à cirurgia de DPO e o limiar nociceptivo foi avaliado ao longo do tempo até o 21º dia pelo teste de von Frey (Gráfico 1).

Observa-se que o grupo DPO apresentou uma redução do limiar nociceptivo mecânico, no primeiro dia após a cirurgia com valor de ($F_{1,10}= 9,8$, $p<0,001$,) comparado ao grupo naive. O limiar nociceptivo permaneceu reduzido do 1º ao 21º dia de avaliação, após a DPO ($p<0,001$) comparado ao grupo naive.

Gráfico 1 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após a cirurgia de DPO



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A seta vermelha indica que a DPO foi realizada após a MB. Os dados foram analisados utilizando ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; *** indica significância estatística ($p < 0,001$) com relação ao grupo naive. Número de animais por grupo $n=6$.

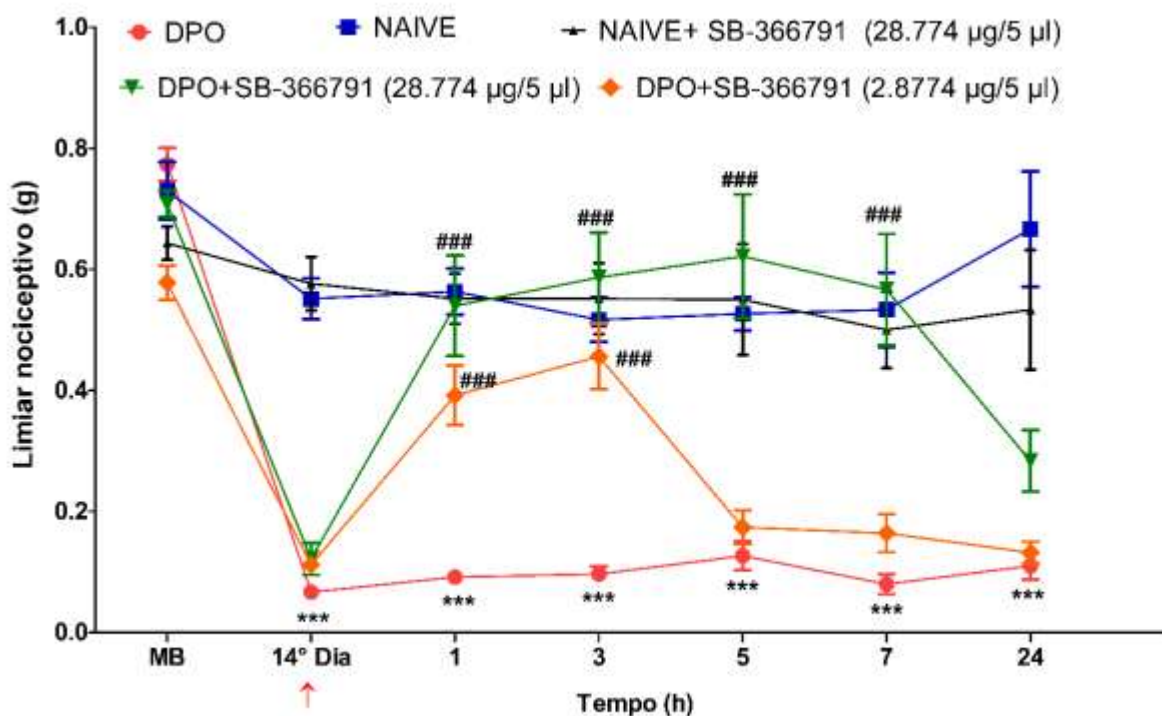
Nota: MB: medida basal; DPO: dor pós-operatória; (g) gramas.

5.2 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA

Visto que os animais com DPO apresentaram alodinia mecânica até o 21º dia de avaliação, nós avaliamos a participação dos receptores TRPV1 no 14º dia de DPO (Gráfico 2). Os animais submetidos ao modelo de DPO, que não receberam administração do SB-366791 apresentaram uma redução do limiar nociceptivo avaliado pelo teste de von *Frey* no 14º dia, quando comparado ao grupo naive em todos os tempos avaliados 1, 3, 5, 7e 24h ($F_{4,24} = 8.175$, $p < 0,001$).

No 14º dia os camundongos que receberam administração i.t do SB-366791 na concentração de 28.774µg ou 2.8774µg, apresentaram aumento do limiar nociceptivo comparado ao grupo DPO. A concentração de SB-366791 28.774µg aumentou o limiar nociceptivo nos seguintes tempos após sua administração 1ª, 3ª, 5ª e 7ª hora ($p < 0,001$) comparado ao grupo DPO. Já a concentração de SB-366791 de 2.8774µg aumentou o limiar nociceptivo na 1ª e 3ª hora após a sua administração comparado ao grupo DPO ($p < 0,001$).

Gráfico 2 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após administração do SB-366791 bloqueador do receptor TRPV1 de animais submetidos a DPO



Fonte: Autora (2024).

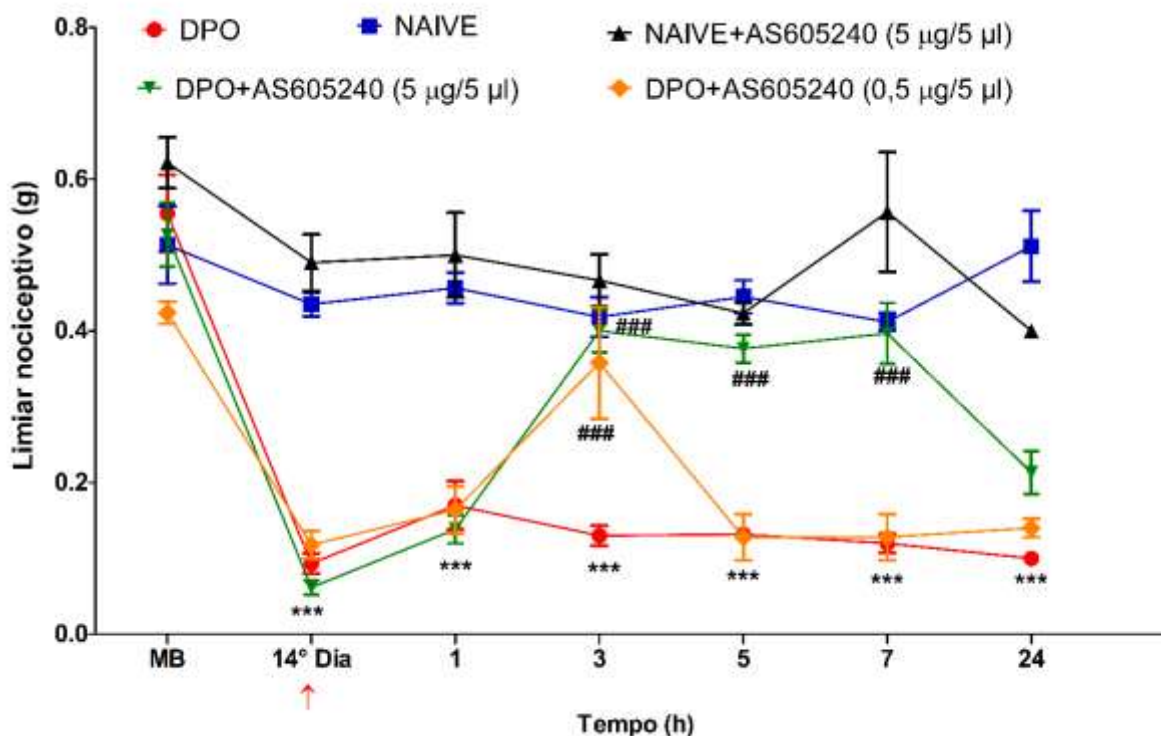
Legenda: A seta vermelha indica o 14º dia após a indução da DPO, onde foi realizado a administração do SB-366791. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas. Os dados foram analisados utilizando ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; *** indica significância estatística ($p < 0,001$) com relação ao grupo naive e #### com relação ao grupo DPO. N=6 a 5 animais por grupo.

Nota: MB: medida basal; DPO: dor pós-operatória; (g) gramas.

5.3 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PI3K NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA

O Gráfico 3 demonstra os resultados do grupo DPO que recebeu a administração intratecal do inibidor da PI3K AS605240 5 µg ou 0,5 µg. Após a administração desta substância, na concentração de 5 µg observa-se um aumento do limiar nociceptivo nos seguintes tempos avaliados 3ª, 5ª e 7ª hora após a administração, comparado ao grupo DPO ($F_{4,24}=8.231$, $p < 0,001$). Na 3ª hora também foi observado um aumento do limiar nociceptivo, no grupo DPO que recebeu a menor concentração do AS605240 0,5 µg comparado ao grupo DPO ($p < 0,001$).

Gráfico 3 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após administração do AS605240 inibidor da PI3K animais submetidos a DPO



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A seta vermelha indica o 14º dia após a indução da DPO, onde foi realizada a administração do AS605240. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas. Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; *** indica significância estatística ($p < 0,001$) com relação ao grupo naive e ### comparado ao grupo DPO. N=6 a 5 animais por grupo.

Nota: MB: medida basal; DPO: dor pós-operatória; (g) gramas.

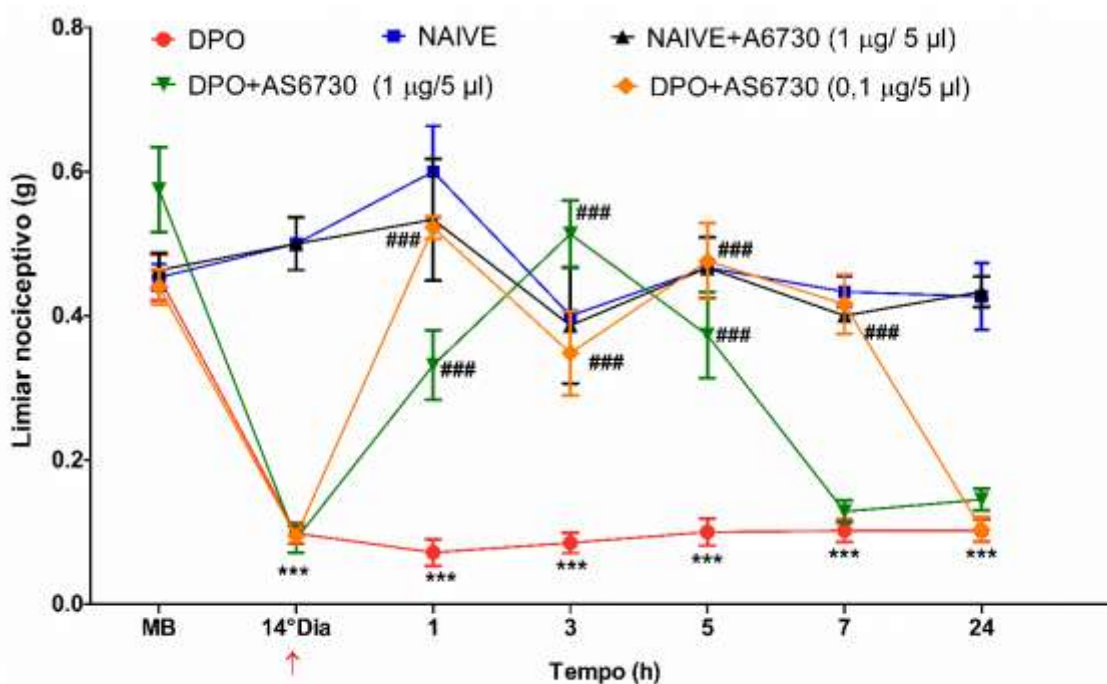
5.4 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA AKT NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA

Após verificarmos o envolvimento da PI3K na DPO, os animais receberam administração intratecal do inibidor da AKT A6730 com o objetivo de investigar seu envolvimento.

Após a administração i.t A6730 na concentração de 1 µg os animais apresentaram aumento do limiar nociceptivo. Este aumento do limiar nociceptivo foi observado nos seguintes tempos avaliados 1ª, 3ª e 5ª hora, comparado ao grupo DPO ($F_{4,24}=8.665$, $p < 0,001$). Já na administração de A6730 com a menor dose 0,1 µg foi observado um

aumento do limiar nociceptivo iniciando na 1ª hora após sua administração perdurando até a 7ª hora de avaliação comparado ao grupo DPO ($p < 0,001$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após administração do AS6730 inibidor da AKT em animais submetidos a DPO



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A seta vermelha indica o 14º dia após a indução da DPO, onde foi realizado a administração do A6730 intratecal. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas. Os dados foram analisados utilizando ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; *** indica significância estatística ($p < 0,001$) com relação ao grupo naive ou #### comparado ao grupo DPO. N=6 a 5 animais por grupo.

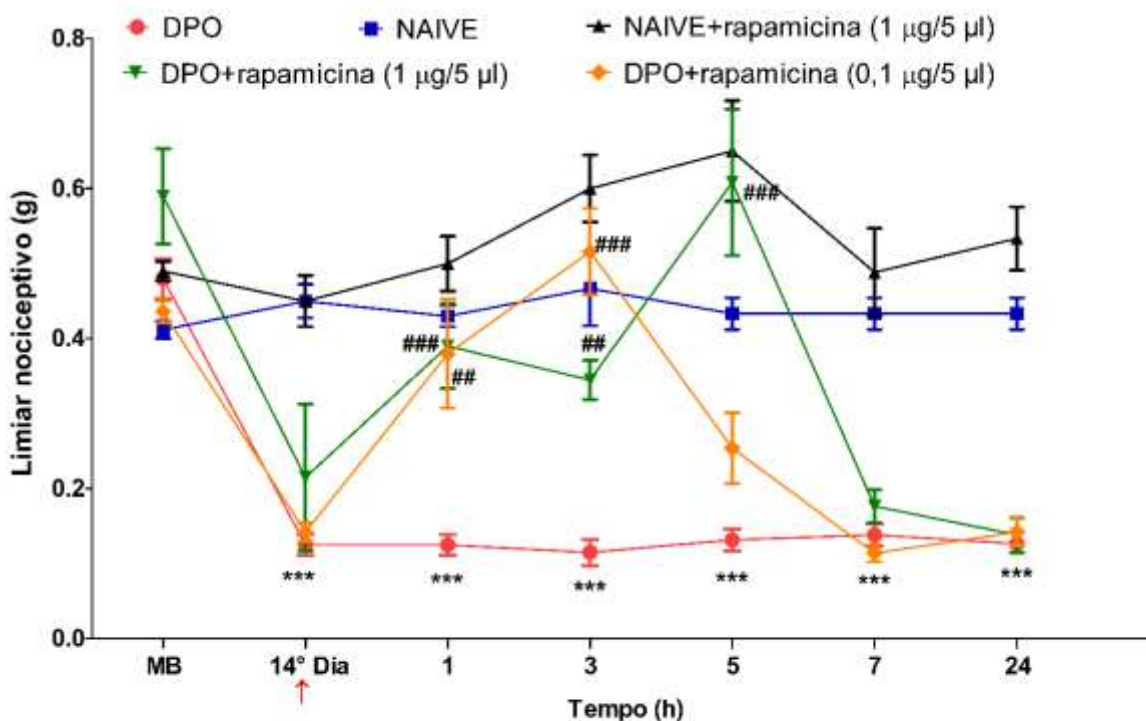
Nota: MB: medida basal; DPO: dor pós-operatória; (g) gramas.

5.5 INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE mTOR NO LIMIAR NOCICEPTIVO DE CAMUNDONGOS COM DOR PÓS-OPERATÓRIA

A participação de mTOR foi investigada no 14º dia após a DPO (Gráfico 5). O grupo DPO que recebeu administração i.t do inibidor mTOR rapamicina na dose de 1 µg apresentou aumento do limiar nociceptivo nos seguintes tempos avaliados 1ª hora ($F_{4,24}=6.147$, $p < 0,001$), 3ª hora ($p < 0,01$) e 5ª hora ($p < 0,001$) comparado ao grupo DPO.

Já a administração da rapamicina na dose de 0,1 µg promoveu aumento do limiar nociceptivo nos seguintes momentos avaliados 1ª hora ($p<0,01$) e 3ª hora ($p<0,01$).

Gráfico 5 - Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após administração da rapamicina inibidor de mTOR em animais submetidos a DPO



Fonte: Autora (2024).

Legenda: A seta vermelha indica o 14º dia de DPO, onde foi realizada a administração da rapamicina. Os dados representam a média \pm E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas. Os dados foram analisados utilizando ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; ***, ### indica significância estatística ($p < 0,001$) com relação ao grupo naive ou DPO. N=6 a 5 animais por grupo.

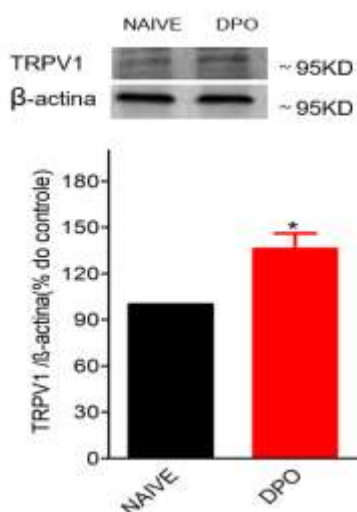
Nota: MB: medida basal; DPO: dor pós-operatória; (g) gramas.

5.6 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES TRPV1 NA DOR PÓS-OPERATÓRIA

Visto que os receptores TRPV1 possuem um importante papel na nocicepção, nós investigamos sua participação a nível medular, em camundongos submetidos à DPO. Ademais foi verificado se os níveis da expressão do TRPV1, estariam aumentados na região medular lombar após a DPO.

De acordo com o Gráfico 6 observa-se que a expressão dos receptores TRPV1 após a DPO analisados pela técnica de Western blot aumentou no 14º dia de DPO comparado ao grupo naive ($p < 0,05$).

Gráfico 6 - Análise da expressão dos receptores TRPV1 no segmento lombar da medula espinhal no 14º dia de DPO



Fonte: Autora (2024).

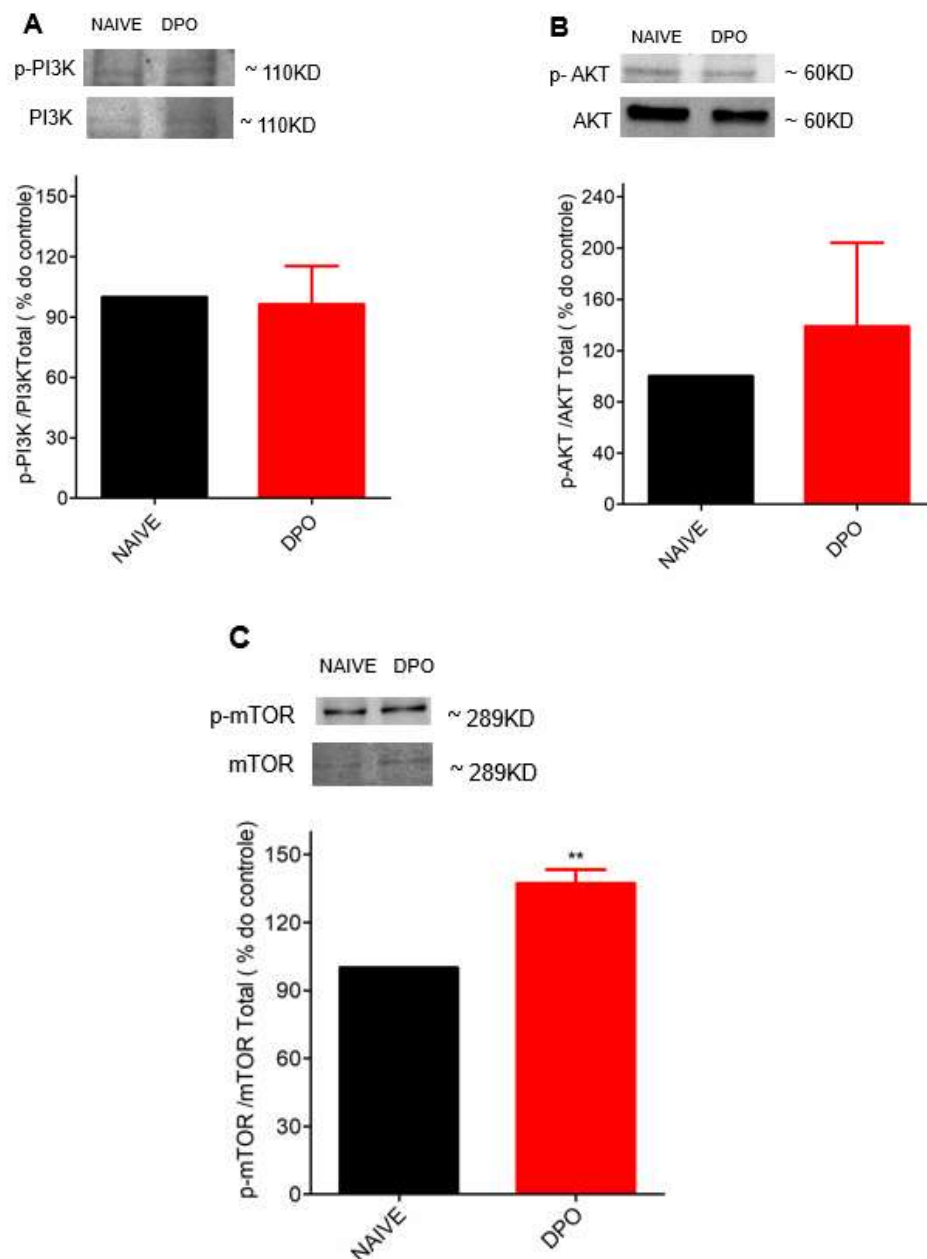
Legenda: Os dados são expressos como a média \pm E.P.M. da expressão relativa de TRPV1 pela β -actina como porcentagem da expressão do grupo naive. Os dados foram analisados utilizando o teste T não pareado. N=4 animais por grupo. DPO: dor pós-operatória; TRPV1: receptor de potencial transiente vanilóide 1; KD:kilodaltons.

5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA VIA PI3K/AKT/mTOR NO 14º DIA DE DOR PÓS-OPERATÓRIA

Foi investigado os níveis da expressão proteica da via PI3K/AKT/mTOR no segmento medular lombar de animais com DPO pela técnica de Western Blot.

Observa-se no Gráfico 7 que não houve aumento da expressão de PI3k e Akt dos sítios de fosforilação investigado PI3Kp110 γ e AKT (Thr 308) após a DPO comparado ao grupo naive ($p > 0,005$). No entanto, observa-se que a mTOR aumentou seus níveis de expressão proteica no 14º dia após a DPO no segmento lombar ($p < 0,005$). O sítio de fosforilação investigado na mTOR foi Ser 2481.

Gráfico 7 - A, B e C Análise dos níveis da expressão da PI3K/AKT/mTOR na medula espinal após a DPO



Fonte: Autora (2024).

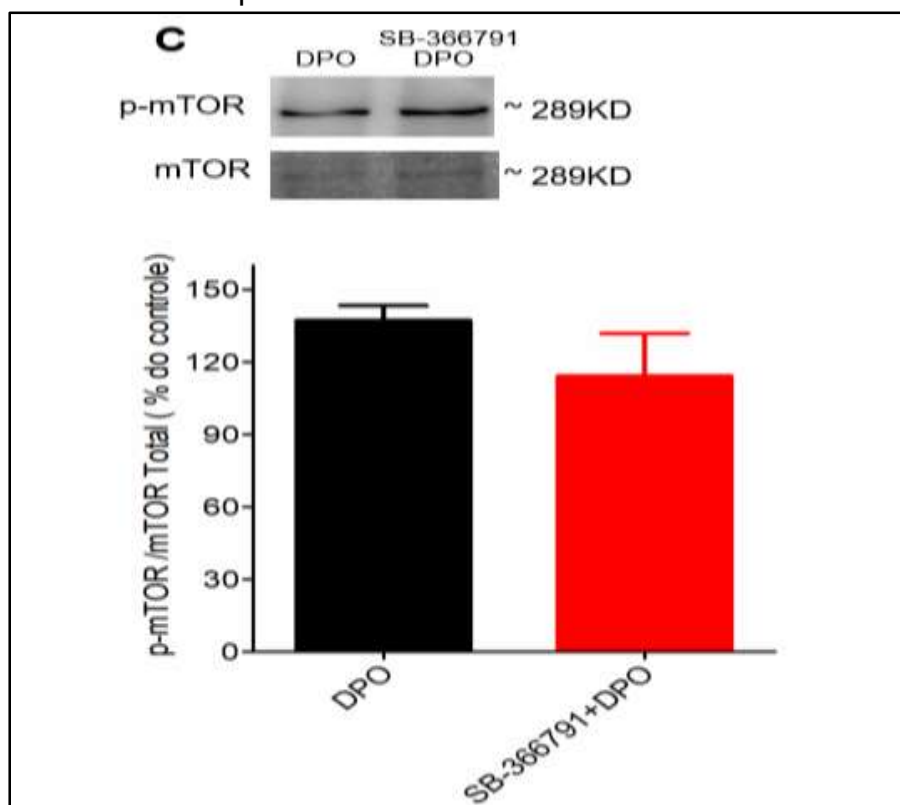
Legenda: Análise da expressão das proteínas: A) PI3K; B) AKT e C) mTOR na medula espinal no segmento lombar no 14º dia. Foi utilizado Teste t student não pareado; ** P<0,05 indica significância estatística em relação ao grupo naive; (grupo PI3k n=3; mTOR n=3), (grupo AKT n=4). DPO: dor pós-operatória.

5.8 INVESTIGAÇÃO DO BLOQUEIO DO TRPV1 SOB OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTEICA DE mTOR APÓS DOR PÓS-OPERATÓRIA

Identificamos o envolvimento da mTOR molecularmente e no teste comportamental após a administração da rapamicina seu inibidor. Nesta etapa subsequente investigamos se a administração do bloqueador do TRPV1 administrado i.t influencia nos níveis de expressão proteica de p-mTOR (Ser 2481).

De acordo com os dados apresentados abaixo no gráfico 8 não foi observado mudança na expressão de mTOR após o bloqueio do TRPV1 pelo SB-366791 na concentração de 28.774 $\mu\text{g} / 5\mu\text{l}$.

Gráfico 8 - Análise dos níveis de expressão proteica de mTOR após bloqueio dos receptores TRPV1



Fonte: Autora (2024).

Legenda: Análise da expressão de mTOR nos segmentos lombares da medula espinal no 14º dia após a DPO. A coleta da medula foi realizada 3 horas após a administração do bloqueador do TRPV1. Os dados são expressos como a média \pm E.P.M. da expressão relativa de p-mTOR /mTOR total como porcentagem da expressão do grupo naive. Os dados foram analisados utilizando o teste t student não pareado. N=4 animais por grupo. DPO: dor pós-operatória; SB-366791 (bloqueador do TRPV1); KD:kilodaltons

6 DISCUSSÃO

A via PI3K/AKT/mTOR, bem como os receptores TRPV1, parecem estar envolvidos na fisiopatologia da DPO induzida por IRPM, uma vez que o bloqueio dos receptores TRPV1 assim como a inibição da via PI3K/AKT/mTOR no 14º dia aumentou o limiar nociceptivo dos animais, promovendo um efeito antialodínico. O presente estudo utilizou o modelo de IRPM (Flatters, 2008) para o estudo da DPO em ratos, porém com algumas modificações para camundongo descrita por Elisei *et al.* (2020).

A cirurgia de IRPM foi realizada com o objetivo de padronizar e verificar o pico da nocicepção. O sinal de alodinia iniciou vinte e quatro horas após a IRPM e perdurou até o vigésimo primeiro dia de avaliação nociceptiva. Estes dados corroboram com os dados encontrados na literatura onde o modelo de IRPM foi capaz de reduzir o limiar nociceptivo dos camundongos (Elisei *et al.*, 2020; Ying *et al.*, 2014). No entanto, no estudo de YANG *et al.*, 2019 a alodinia mecânica persistiu até o décimo quarto dia, essa diferença pode ser justificada devido às diferenças de tração do retrator utilizado para IRPM.

Assim como o presente estudo, evidências científicas têm demonstrado que a inibição da via PI3K/AKT/mTOR por seus respectivos inibidores administrados sistemicamente (Izumi *et al.*, 2015) a nível medular (Guo *et al.*, 2017; Liu; Lv; Ren, 2018; Xu *et al.*, 2020) tanto quanto a nível supra espinhal (Kondo; Saegusa; Tanabe, 2018; Zhang *et al.*, 2019) aumenta o limiar nociceptivo de modelos animais com dor ciática induzida pelo tecido uterino (Liu *et al.*, 2019), dor do câncer ósseo (Zhang *et al.*, 2019), dor neuropática (Guo *et al.*, 2017; Kondo; Saegusa; Tanabe, 2018) e inflamatória (Xu *et al.*, 2020). O presente estudo também sugere o envolvimento desta via na fisiopatologia da DPO no 14º dia visto que, a administração intratecal dos inibidores PI3K/AKT/mTOR promoveu uma resposta comportamental antialodínica.

Embora a via PI3K/AKT/mTOR esteja envolvida no processo de nocicepção em vários modelos de dor, existe uma lacuna na literatura demonstrando como esta via é ativada na DPO. Nossa hipótese é que os receptores TRPV1 aumenta a expressão desta via, e conseqüentemente sua atividade, uma vez que estes receptores exercem um importante papel na nocicepção. Primeiramente investigamos farmacologicamente a contribuição dos receptores TRPV1 localizados na região da medula espinhal, após a

administração i.t do bloqueador dos receptores TRPV1. Uma hora após a administração do bloqueador os animais apresentaram aumento do limiar nociceptivo que perdurou até a 3ª hora na concentração 2.8774 µg, e até a 7ª hora na concentração de 28.774 µg. Semelhante aos nossos resultados, outros estudos também demonstraram a participação do TRPV1 em modelo experimental de incisão plantar através da administração i.p do bloqueador do TRPV1 e uso de animais *knockout* para TRPV1 aliviando a hipersensibilidade térmica (Izumi *et al.*, 2015).

Com o objetivo de fortalecer estes achados, nós avaliamos se no 14º dia de DPO ocorre mudança nos níveis de expressão de proteínas dos receptores TRPV1. Utilizando a técnica de *Western blot* nós identificamos aumento nos níveis da expressão de proteínas no grupo DPO comparado ao grupo naive. Esse aumento nos níveis da expressão TRPV1 não ocorre a nível periférico, pelo menos nos dias iniciais que sucede a DPO (IZUMI *et al.*, 2015; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2005). Porém mesmo não havendo aumento nos níveis de expressão periféricamente, eles contribuem ao desenvolvimento da alodinia mecânica e hipersensibilidade térmica. Os autores demonstraram que os animais *knockout* para TRPV1 não desenvolvia comportamento de hipersensibilidade térmica. A sensibilidade desses receptores pode ser aprimorada durante da DPO, onde vários mediadores são liberados como NGF, PGE2, ATP, que aos se ligarem nos seus sítios específicos, promovem ativação de proteínas intracelulares que podem fosforilar sítios específicos do TRPV1, reduzindo seu limiar de ativação nos neurônios (Cui *et al.*, 2016; Palazzo *et al.*, 2010).

A ativação do TRPV1, seja por calor nocivo ou por seus ligantes endógenos resulta no influxo de cálcio nas células. O cálcio desempenha um importante papel na regulação de inúmeros funções, dentre elas a ativação de enzimas dependentes de cálcio. A contribuição dos receptores TRPV1 localizados nos neurônios de primeira ordem na nocicepção é bem conhecido, no entanto nós investigamos se a ativação do TRPV1 localizados na medula espinhal pode resultar na ativação da via de sinalização envolvida na transdução de proteínas PI3K/AKT/mTOR.

Alguns estudos já demonstraram que a via PI3K/AKT/MTOR é regulada positivamente em modelos de dor nociceptiva e neuropática (Guo *et al.*, 2017; Kondo; Saegusa; Tanabe, 2018) e inflamatória (Xu *et al.*, 2020). Inclusive a relação do receptor

TRPV1 com a PI3K/AKT foi demonstrado em um estudo de lesão cerebral induzida pelo frio no SNC (Liu *et al.*, 2017). Entretanto na DPO a relação do TRPV1 com a via de tradução das proteínas ainda não foi demonstrada. A princípio utilizamos a técnica de Western blot para analisar se os níveis de fosforilação destas proteínas foram supra regulados no 14° dia de DPO. A medula espinhal dos animais foi coletada para investigação dos seguintes sítios de fosforilação PI3K p110 γ , p-AKT1 (Thr 308) e p-mTOR (Ser 2481). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, houve aumento da expressão p-mTOR (Ser 2481) mas não da PI3K p110 γ e p-AKT1 (Thr 308). Embora os níveis da expressão PI3K p110 γ e p-AKT1 (Thr 308) não foram supra regulados na DPO, nós não podemos descartar a possibilidade do seu envolvimento, uma vez que farmacologicamente a administração de seus inibidores resultou em aumento do limiar nociceptivo. Talvez outros sítios de fosforilação estejam envolvidos, mas não os PI3K p110 γ e p-AKT1 (Thr 308). Estudos prévios da literatura demonstram que a ativação de mTOR é dependente da PI3K no GRD (Duan *et al.*, 2018) e CDME de animais com dor neuropática induzido oxaliplatin e constrição crônica do nervo ciático (CCI) (Guo *et al.*, 2017) e dor inflamatória provocada pela administração de carragenina (Xu *et al.*, 2011). Assim como a PI3K, a AKT localizada no CDME de camundongos com DPO induzido por incisão plantar também medeia a ativação de mTOR. A administração do inibidor de AKT MK2206 intratecal reduz a expressão de mTOR e conseqüentemente alivia a alodia mecânica (Xu *et al.*, 2020).

A mTOR é uma proteína que está envolvida no processo de tradução de proteínas uma vez ativada mTOR fosforila proteínas *downstream* envolvidas na tradução dos RNAm. Izumi *et al.* (2015) demonstrou em seu estudo com ratos com incisão plantar, que houve um aumento da p-mTOR em neurônios nociceptivos sensíveis ao calor que expressam TRPV1. O aumento do transportador vesicular de glutamato (VGLUT20) que facilita a liberação do glutamato no CDME foi associado ao aumento da atividade mTOR. O aumento da p-mTOR também foi encontrada na região do CDME e foi colocalizada com astrócitos em ratos com dor inflamatória (Xu *et al.*, 2011) e microglia em camundongos com incisão plantar (Xu *et al.*, 2020).

No presente estudo observamos um aumento da expressão da p-mTOR no CDME em animais com DPO com relação ao grupo naive, que corroboram com estudos prévios

da literatura. Como etapa subsequente deste projeto nós hipotetizamos que o bloqueio dos receptores TRPV1 poderia reduzir a atividade da proteína mTOR a tradução de proteínas pró inflamatória. Entretanto o bloqueio dos receptores TRPV1 pela administração i.t de SB-366791 não influenciou a nos níveis de expressão de mTOR.

Embora nossa hipótese não tenha sido confirmada, não podemos descartar o envolvimento dos receptores TRPV1 contribuindo para ativação da via. Por se tratar de um estudo *in vivo* outros receptores podem estar sendo ativados, e promovendo o influxo de cálcio, e conseqüentemente isso mascara a contribuição do TRPV1 na ativação de mTOR. Prova disso, identificamos que a ativação dos receptores NMDA pelo glutamato em animais com dor do câncer ósseo, promove influxo de cálcio que pode ativar a via PI3K/AKT/mTOR (Lutz *et al.*, 2015). Uma vez ativada a mTOR irá fosforilar S6k1/2 e 4E-BP1 promovendo a tradução de proteínas pró-inflamatória que contribuem para sensibilização central. Vale ressaltar que a mTOR é ativada não só pelas enzimas PI3K/AKT, mas por diversas outras proteínas a *upstream* como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), proteína ribossomal s6 quinase beta-1 (s6k1), Ikk α , quinase 1 de ligação a tank (TBK1) entre outras, que pode fosforilar diretamente a mTOR. O complexo de proteínas ao redor da mTOR como a Raptor e a mLST8 quando ativadas por ERK1/2, JNK, PKA também pode promover ativação da mTOR (Melick; Jewell, 2020).

Diante da complexidade dos mecanismos envolvidos *in vivo*, nós sugerimos que estudos futuros com cultura de célula estabeleçam melhor a relação do TRPV1 com a mTOR na medula espinhal.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, nós sugerimos o envolvimento da via PI3K/AKT/mTOR e TRPV1 na fisiopatologia da DPO, porém a ativação da via PI3K/AKT/mTOR pelo receptor TRPV1 não foi observada

REFERÊNCIAS

AL-MAHREZI, Abdulaziz; AL-SHIDHANI, Asma. Is chronic post-surgical pain preventable? *In: Pain management in special circumstances*. SHALLIK, Nabil A. (ed.). United Kingdom: IntechOpen Limited, 2018.

ALBERTS, Bruce *et al.* From RNA to protein. *In: Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.

BARAL, Pankaj; UDIT, Swalpa; CHIU, Isaac M. Pain and immunity: implications for host defence. **Nature Reviews Immunology**, [England], v. 19, n. 7, p. 433–447, July 2019.

BASBAUM, Allan I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, [United States], v. 139, n. 2, p. 267-284, Oct. 2009.

BELL, A. The neurobiology of acute pain. **The Veterinary Journal**, [London], v. 237, p. 55–62, July 2018.

BENÍTEZ-ANGELES, Miguel *et al.* TRPV1: Structure, endogenous agonists, and mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, [United States], v. 21, n. 10, May 2020.

BONNINGTON, Jennifer K.; MCNAUGHTON, Peter A. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. **The Journal of Physiology**, [London], v. 551, n. 2, p. 433-446, Sept. 2003.

BOURNE, Sarah; MACHADO, Andre G.; NAGEL, Sean J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, [United States], v. 25, n. 4, p. 629–638, Oct. 2014.

BRADESI, Sylvie. Role of spinal cord glia in the central processing of peripheral pain perception. **Neurogastroenterology and Motility**, [England], v. 22, n. 5, p. 499-511, May 2010.

BREIVIK, H. *et al.* Assessment of pain. **British Journal of Anaesthesia**, [England], v. 101, n. 1, p. 17–24, July 2008.

BRENNAN, Timothy J.; VANDERMEULEN, Erik P.; GEBHART, G. F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, [Netherlands], v. 64, n. 3, p. 493–502, Mar. 1996.

BRIGHAM, Natasha C.; JI, Ru-Rong; BECKER, Matthew L. Degradable polymeric vehicles for postoperative pain management. **Nature communications**, [England], v. 12, n. 1, Mar. 2021.

CATERINA, Michael J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, [England], v. 389, n. 6653, p. 816–824, Oct. 1997.

CATERINA, Michael J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience**, [United States], v. 24, p. 487–517, Jan. 2001.

CHAPLAN, S. R.; MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [United States], v. 280, n. 2, p. 829–838, Feb. 1997.

CHAPMAN, C. Richard; VIERCK, Charles J. The transition of acute postoperative pain to chronic pain: An integrative overview of research on mechanisms. **The Journal of Pain**, [United States], v. 18, n. 4, p. 359.e1-359.e38, Apr. 2017.

CHEN, Yinan; ABDI, Salahadin. Basic science: Pain mechanisms and pathways. *In: Anesthesiology in-training exam review: Regional anesthesia and chronic pain.* BANIK, R. K. (ed.). United States: Springer, 2022. p. 185–189.

CHOI, Seung-In *et al.* Emerging role of spinal cord TRPV1 in pain exacerbation. **Neural Plasticity**, [United States], v. 2016, Jan. 2016.

CORRADETTI, M. N.; GUAN, K. L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? **Oncogene**, [England], v. 25, n. 48, p. 6347–6360, Oct. 2006.

CUI, Minghua *et al.* Polymodal transient receptor potential vanilloid type 1 nociceptor: structure, modulators, and therapeutic applications. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, [United States], v. 104, p. 81–125, Jan. 2016.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, [England], v. 101, n. 1, p. 8–16, July 2008.

DE OLIVEIRA, Herick Ulisses *et al.* Investigation of the involvement of the endocannabinoid system in tens-induced antinociception. **The Journal of Pain**, [United States], v. 21, n. 7–8, p. 820–835, July/Aug. 2020.

DE RIDDER, Drik; ADHIA, Divya; VANNESTE, Sven. The anatomy of pain and suffering in the brain and its clinical implications. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [England], v. 130, p. 125–146, Nov. 2021.

DOODY, Owen; BAILEY, Maria E. Understanding pain physiology and its application to person with intellectual disability. **Journal of Intellectual Disabilities**, [England], v. 23, n. 1, p. 5–18, Mar. 2019.

DUAN, Zongsheng *et al.* Involvement of pro-inflammation signal pathway in inhibitory effects of rapamycin on oxaliplatin-induced neuropathic pain. **Molecular Pain**, [England], v. 14, Apr. 2018.

DUBIN, Adrienne E.; PATAPOUTIAN, Ardem. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, [United States], v. 120, n. 11, p. 3760–3772, Nov. 2010.

ECHEVERRY, Santiago; RODRIGUEZ, María Juliana; TORRES, Yolima P. Transient receptor potential channels in microglia: Roles in physiology and disease. **Neurotoxicity Research**, [United States], v. 30, n. 3, p. 467–478, Oct. 2016.

ELISEI, L. M. S. *et al.* Antinociception induced by artemisinin nanocapsule in a model of postoperative pain via spinal TLR4 inhibition. **Inflammopharmacology**, [Netherlands], v. 28, n. 6, p. 1537–1551, Dec. 2020.

ELOKELY, Khaled *et al.* Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [United States], v. 113, n. 2, p. E137–E145, Jan. 2016.

FERNANDES, Elizabeth S. *et al.* A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor α -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, [United States], v. 63, n. 3, p. 819–829, Mar. 2011.

FITZCHARLES, Mary-Ann *et al.* Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. **Lancet**, [London], v. 397, n. 10289, p. 2098–2110, May 2021.

FLATTERS, Sarah J. L. Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR). **Pain**, [Netherlands], v. 135, n. 1–2, p. 119–130, Mar. 2008.

FOSTER, Kathryn G.; FINGAR, Diane C. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. **The Journal of Biological Chemistry**, [United States], v. 285, n. 19, p. 14071–14077, May 2010.

FRIAS, Bárbara; MERIGHI, Adalberto. Capsaicin, nociception and pain. **Molecules**, [Basel], v. 21, n. 6, June 2016.

FULLER, Alice M.; BHARDE, Sabah; SIKANDAR, Shafaq. The mechanisms and management of persistent postsurgical pain. **Frontiers in Pain Research**, [Lausanne], v. 4, July 2023.

GARCIA, João Batista Santos *et al.* Aprimorar o controle da dor no pós-operatório na América Latina. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 395–403, jul./ago. 2017.

GÉRANTON, Sandrine M. *et al.* A rapamycin-sensitive signaling pathway is essential for the full expression of persistent pain states. **The Journal of Neuroscience**, [United States], v. 29, n. 47, p. 15017-15027, Nov. 2009.

GRACE, Peter M. *et al.* Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, [England], v. 14, n. 4, p. 217–231, Apr. 2014.

GRACE, Peter M. *et al.* The neuroimmunology of chronic pain: from rodents to humans. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [London], v. 41, n. 5, p. 855–865, Feb. 2021.

GULUR, Padma; NELLI, Amanda. Persistent postoperative pain: mechanisms and modulators. **Current Opinion in Anaesthesiology**, [London], v. 32, n. 5, p. 668–673, Oct. 2019.

GUO, Jian-Rong *et al.* Effect and mechanism of inhibition of PI3K/Akt/mTOR signal pathway on chronic neuropathic pain and spinal microglia in a rat model of chronic constriction injury. **Oncotarget**, [United States], v. 8, n. 32, p. 52923-52934, Aug. 2017.

HAEFELI, Mathias; ELFERING, Achim. Pain assessment. **European Spine Journal**, [United States], v. 15, n. 1, p. S17-24, Dec. 2005.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**, [Netherlands], v. 67, n. 2–3, p. 313–316, Oct. 1980.

INOKI, Ken *et al.* TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nature Cell Biology**, [England], v. 4, n. 9, p. 648–657, Sept. 2002.

IZUMI, Y. *et al.* mTOR signaling controls VGLUT2 expression to maintain pain hypersensitivity after tissue injury. **Neuroscience**, v. 308, p. 169–179, Nov. 2015.

JACINTO, Estela *et al.* SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. **Cell**, [United States], v. 127, n. 1, p. 125–137, Oct. 2006.

JI, Ru-Rong *et al.* Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. **Nature Neuroscience**, [United States], v. 2, n. 12, p. 1114–1119, Dec. 1999.

Ji, Ru-Rong; XU, Zhen-Zhong; GAO, Yong-Jing. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, [England], v. 13, n. 7, p. 533–548, June 2014.

JIA, Xuechao *et al.* Protein translation: biological processes and therapeutic strategies for human diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [United Kingdom], v. 9, n. 1, p. 1–17, Feb. 2024.

JIN, Di *et al.* MCP-1 stimulates spinal microglia via PI3K/Akt pathway in bone cancer pain. **Brain Research**, [Netherlands], v. 1599, p. 158–167, Mar. 2015.

JULIUS, David. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [United States], v. 29, p. 355–384, Oct. 2013.

KANG, Sohye *et al.* Mutated PI 3-kinases: cancer targets on a silver platter. **Cell Cycle**, [Georgetown], v. 4, n. 4, p. 578–581, Apr. 2005.

KONDO, Daisuke; SAEGUSA, Hironao; TANABE, Tsutomu. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/mammalian target of rapamycin/peroxisome proliferator-activated receptor γ pathway for induction and maintenance of neuropathic pain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [United States], v. 499, n. 2, p. 253–259, May 2018.

KRAYCHETE, Durval Campos *et al.* Dor crônica persistente pós-operatória: o que sabemos sobre prevenção, fatores de risco e tratamento? **Brazilian Journal of Anesthesiology**, Campinas, v. 66, n. 5, p. 505–512, set./out. 2016.

KUNER, Rohini; KUNER, Thomas. Cellular circuits in the brain and their modulation in acute and chronic pain. **Physiological Reviews**, [United States], v. 101, n. 1, p. 213–258, Jan. 2021.

LAPLANTE, Mathieu; SABATINI, David M. mTOR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, [England], v. 122, n. 20, p. 3589–3594, Oct. 2009.

LATORRE, Ramon *et al.* ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. **Cell Calcium**, [Scotland], v. 42, n. 4–5, p. 427–438, Oct./Nov. 2007.

LAVAND'HOMME, Patricia. Transition from acute to chronic pain after surgery. **Pain**, [Netherlands], v. 158, n. 4, p. S50–S54, Apr. 2017.

LEE, Greg I.; NEUMEISTER, Michael W. Pain: Pathways and physiology. **Clinics in Plastic Surgery**, [United States], v. 47, n. 2, p. 173–180, Apr. 2020.

LEE, Yoonji *et al.* Transient receptor potential vanilloid type 1 antagonists: a patent review (2011 - 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [England], v. 25, n. 3, p. 291–318, Mar. 2015.

LIU, Wei; LV, Yanling; REN, Facheng. PI3K/Akt pathway is required for spinal central sensitization in neuropathic pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [United States], v. 38, n. 3, p. 747–755, Apr. 2018.

LIU, Ying *et al.* Cold stress-induced brain injury regulates TRPV1 channels and the PI3K/AKT signaling pathway. **Brain Research**, [Netherlands], v. 1670, p. 201–207, Sept. 2017.

LIU, Ying *et al.* Effects of inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on the pain of sciatic endometriosis in a rat model. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [Canada], v. 97, n. 10, p. 963–970, Oct. 2019.

LOGAN, Darren W. Hot to touch: the story of the 2021 Nobel Prize in Physiology or Medicine. **Disease Models & Mechanisms**, [England], v. 14, n. 10, Oct. 2021.

LONG, Xiaomeng *et al.* Rheb binds and regulates the mTOR kinase. **Current Biology**, [United States], v. 15, n. 8, p. 702–713, Apr. 2005.

LUTZ, Brianna Marie *et al.* mTOR, a new potential target for chronic pain and opioid-induced tolerance and hyperalgesia. **Molecular Pain**, [England], v. 11, n. 1, May 2015.

MANJAVACHI, Marianne N. *et al.* Spinal blockage of CXCL1 and its receptor CXCR2 inhibits paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. **Neuropharmacology**, [England], v. 151, p. 136–143, June 2019.

MANTYH, Patrick W. *et al.* Antagonism of nerve growth factor-trkA signaling and the relief of pain. **Anesthesiology**, [United States], v. 115, n. 1, p. 189–204, July 2011.

MAO, J. *et al.* Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Research**, [Netherlands], v. 598, n. 1–2, p. 271–278, Dec. 1992.

MARTELLI, A. M. *et al.* Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside. **Current Medicinal Chemistry**, [Netherlands], v. 14, n. 19, p. 2009–2023, Jan. 2007.

MELICK, Chase H.; JEWELL, Jenna L. Regulation of mTORC1 by upstream stimuli. **Genes**, [Basel], v. 11, n. 9, p. 1–28, Sept. 2020.

MICKLE, Aaron D.; SHEPHERD, Andrew J.; MOHAPATRA, Durga P. Sensory TRP channels: The Key transducers of nociception and pain. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, [United States], v. 131, p. 73-118, Apr. 2015.

NICHOLAS, Michael *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic primary pain. **Pain**, [Netherlands], v. 160, n. 1, p. 28–37, Jan. 2019.

PALAZZO, Enza *et al.* Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. **Molecular Pain**, [England], v. 6, Jan. 2010.

PASLUOSTA, Cristian; KIELE, Patrick; STIEGLITZ, Thomas. Paradigms for restoration of somatosensory feedback via stimulation of the peripheral nervous system. **Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, [Ireland], v. 129, n. 4, p. 851–862, Apr. 2018.

PENG, Bingxue *et al.* Bulbosplinal nociceptive ON and OFF cells related neural circuits and transmitters. **Frontiers in Pharmacology**, [Switzerland], v. 14, Apr. 2023.

PEZET, Sophie *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflammatory conditions. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [London], v. 28, n. 16, p. 4261–4270, Apr. 2008.

PINHO-RIBEIRO, Felipe A.; VERRI, Waldiceu A.; CHIU, Isaac M. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. **Trends in Immunology**, [Switzerland], v. 38, n. 1, p. 5–19, Jan. 2017.

POGATZKI-ZAHN, Esther M. *et al.* Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain. **Pain**, [Netherlands], v. 115, n. 3, p. 296–307, June 2005.

POGATZKI-ZAHN, Esther M.; SEGELCKE, Daniel; SCHUG, Stephan A. Postoperative pain-from mechanisms to treatment. **Pain Reports**, [United States], v. 2, n. 2, Mar. 2017.

POGATZKI-ZAHN, Esther; SEGELCKE, Daniel; ZAHN, Peter. Mechanisms of acute and chronic pain after surgery: update from findings in experimental animal models. **Current Opinion in Anaesthesiology**, [London], v. 31, n. 5, p. 575–585, Oct. 2018.

POGATZKI, E. M.; ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. Effect of pretreatment with intrathecal excitatory amino acid receptor antagonists on the development of pain behavior caused by plantar incision. **Anesthesiology**, [United States], v. 93, n. 2, p. 489–496, Aug. 2000.

PRICE, Theodore J. *et al.* Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile x mental retardation protein: Role of mGluR1/5 and mTOR. **The Journal of Neuroscience**, [United States], v. 27, n. 51, p. 13958-13967, Dec. 2007.

PROUD, Christopher G. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. **The Biochemical Journal**, [England], v. 403, n. 2, p. 217–234, Apr. 2007.

RAJA, Srinivasa N. *et al.* The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, [Netherlands], v. 161, n. 9, p. 1976-1982, Sept. 2020.

REN, K.; DUBNER, R. NMDA receptor antagonists attenuate mechanical hyperalgesia in rats with unilateral inflammation of the hindpaw. **Neuroscience Letters**, [Netherlands], v. 163, n. 1, p. 22–26, Nov. 1993.

RICHEBÉ, Philippe; CAPDEVILA, Xavier; RIVAT, Cyril. Persistent postsurgical pain: Pathophysiology and preventative pharmacologic considerations. **Anesthesiology**, [United States], v. 129, n. 3, p. 590–607, Sept. 2018.

ROSENBERGER, D. C.; POGATZKI-ZAHN, E. M. Chronic post-surgical pain - update on incidence, risk factors and preventive treatment options. **BJA Education**, [London], v. 22, n. 5, p. 190–196, May 2022.

ROUX, Philippe P.; TOPISIROVIC, Ivan. Signaling pathways involved in the regulation of mRNA translation. **Molecular and Cellular Biology**, [United States], v. 38, n. 12, June 2018.

SCHOLZ, Joachim *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. **Pain**, [Netherlands], v. 160, n. 1, p. 53–59, Jan. 2019.

SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, [United States], v. 5, n. 11, p. 1062–1067, Oct. 2002.

SCHON, Katherine Rose; PARKER, Alasdair Patrick John; WOODS, Christopher Geoffrey. Congenital insensitivity to pain overview. *In: GeneReviews®*. ADAM, Margaret P. *et al.* (eds.). Seattle: University of Washington, 2020.

SCHUG, Stephan A. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic postsurgical or posttraumatic pain. **Pain**, [Netherlands], v. 160, n. 1, p. 45–52, Jan. 2019.

SCHUG, Stephan A.; BRUCE, Julie. Risk stratification for the development of chronic postsurgical pain. **Pain Reports**, [United States], v. 2, n. 6, Nov. 2017.

SCHUMACHER, Mark A. TRP Channels in Pain and Inflammation: Therapeutic Opportunities. **Pain Practice**: The Official Journal of World Institute of Pain, [United States], v. 10, n. 3, p. 185-200, May/June 2010.

SEGELCKE, Daniel; PRADIER, Bruno; POGATZKI-ZAHN, Esther. Advances in assessment of pain behaviors and mechanisms of post-operative pain models. **Current Opinion in Physiology**, [London], v. 11, p. 85–92, Oct. 2019.

SILVA, Jaqueline Raymondi *et al.* Skin-resident dendritic cells mediate postoperative pain via CCR4 on sensory neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [United States], v. 119, n. 4, Jan. 2022.

SIMANSKI, Christian J. P. *et al.* Incidence of chronic postsurgical pain (CPSP) after general surgery. **Pain Medicine**, [Malden], v. 15, n. 7, p. 1222–1229, July 2014.

THILL, Bridget. Fetal pain in the first trimester. **Linacre Quarterly**, [London], v. 89, n. 1, p. 73–100, Feb. 2022.

THILL, Bridget. The fetal pain paradox. **Frontiers in Pain Research**, [Lausanne], v. 4, Mar. 2023.

TREEDE, Rolf-Detlef *et al.* Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). **Pain**, [Netherlands], v. 160, n. 1, p. 19–27, Jan. 2019.

VAN DER STELT, Mario; DI MARZO, Vincenzo. Endovanilloids. **European Journal of Biochemistry**, [London], v. 271, n. 10, p. 1827–1834, May 2004.

VIANA, Félix. Nociceptors: thermal allodynia and thermal pain. **Handbook of Clinical Neurology**, [Netherlands], v. 156, p. 103–119, Jan. 2018.

WALKER, Suellen M. *et al.* Primary and secondary hyperalgesia can be differentiated by postnatal age and ERK activation in the spinal dorsal horn of the rat pup. **Pain**, [Netherlands], v. 128, n. 1–2, p. 157–168, Mar. 2007.

WANG, Y. *et al.* Surgical incision induces phosphorylation of AMPA receptor GluR1 subunits at Serine-831 sites and GluR1 trafficking in spinal cord dorsal horn via a protein kinase C γ -dependent mechanism. **Neuroscience**, [United States], v. 240, p. 361–370, June 2013.

WEISER, Thomas G. *et al.* An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. **Lancet**, [London], v. 372, n. 9633, p. 139–144, July 2008.

WOLLER, Sarah A. *et al.* An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, [Italy], v. 35, n. 107, p. 40, 2017.

WONG, Kwok-Kin; ENGELMAN, Jeffrey A.; CANTLEY, Lewis C. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**, [United States], v. 20, n. 1, p. 87, Feb. 2010.

WOOLF, Clifford J. Pain amplification—A perspective on the how, why, when, and where of central sensitization. **Journal of Applied Biobehavioral Research**, [United States], v. 23, n. 2, June 2018.

XU, Bing *et al.* Role of spinal cord Akt-mTOR signaling pathways in postoperative hyperalgesia induced by plantar incision in mice. **Frontiers in Neuroscience**, [Switzerland], v. 14, July 2020.

XU, Qinghao *et al.* Spinal phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling cascades in inflammation-induced hyperalgesia. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, [London], v. 31, n. 6, p. 2113–2124, Feb. 2011.

YAM, Mun Fei *et al.* General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, [Basel], v. 19, n. 8, Aug. 2018.

YING, Yan-Lu *et al.* Over-expression of P2X7 receptors in spinal glial cells contributes to the development of chronic postsurgical pain induced by skin/muscle incision and retraction (SMIR) in rats. **Experimental Neurology**, [United States], v. 261, p. 836–843, Nov. 2014.

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

ZHANG, Jian *et al.* Neuroinflammation and central PI3K/Akt/mTOR signal pathway contribute to bone cancer pain. **Molecular Pain**, [England], v. 15, Feb. 2019.

ZHANG, Miao *et al.* TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [United Kingdom], v. 8, n. 1, Dec. 2023.

ZHANG, Wei *et al.* Activation of mTOR in the spinal cord is required for pain hypersensitivity induced by chronic constriction injury in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, [London], v. 111, p. 64–70, Oct. 2013.

ZHANG, Yong *et al.* Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. **Nature Cell Biology**, [England], v. 5, n. 6, p. 578–581, June 2003.

ZONCU, Roberto; EFEYAN, Alejo; SABATINI, David M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [England], v. 12, n. 1, p. 21–35, Jan. 2011.

ANEXO A - Aprovação Comitê de Ética

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Investigação da participação dos receptores TLR4 e TRPV1 na ativação da via PI3K/AKT/mTOR durante a dor pós operatória em camundongos**, registrada com o nº **0007/2021**, sob a responsabilidade de **Giovane Galdino de Souza**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/04/2021 a 03/01/2025**, 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.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / B16c57	144	144	0	Biotério central da unifal-mg

Alfenas, 15 de Fevereiro de 2022

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: c287775e02464e71811ba85b640eabd