

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**LÍVIA MARIA SILVESTRE ELISEI**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE NANOCÁPSULAS DE POLY $\epsilon$ -CAPROLACTONA  
CONTENDO ARTEMISININA E DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TOLL LIKE 4  
E DE CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS EM UM MODELO DE DOR CRÔNICA PÓS-  
OPERATÓRIA EM CAMUNDONGOS**

**Alfenas/MG**

**2019**

**LÍVIA MARIA SILVESTRE ELISEI**

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE NANOCÁPSULAS DE POLY $\epsilon$ -CAPROLACTONA  
CONTENDO ARTEMISININA E DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TOLL LIKE 4  
E DE CÉLULAS DA GLIA ESPINAIS EM UM MODELO DE DOR CRÔNICA PÓS-  
OPERATÓRIA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas-UNIFAL/MG.

Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia da dor  
Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

**Alfenas/MG**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Elisei, Livia Maria Silvestre.  
E43i      Investigação do efeito de nanocápsulas de Polyε-caprolactona contendo artemisinina e da participação do receptor Toll like 4 de células da glia espinais em um modelo de dor crônica pós-operatória em camundongos / Livia Maria Silvestre Elisei. -- Alfenas/MG, 2019.  
81 f.: il. --  
  
Orientador: Giovane Galdino de Souza.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.  
  
1. Dor pós-operatória. 2. Artemisininas. 3. Nanopartículas. 4. Microglia.  
5. Receptor 4 Toll-Like. I. Souza, Giovane Galdino de. II. Título.  
CDD- 612.83

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva  
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735

TÍVIA MARIA SILVESTRE

"Investigação do efeito de nanocápsulas de Poly  $\epsilon$  – caprolactona contendo artemisinina e da participação do receptor Toll like 4 e de células da glia espinais em um modelo de dor crônica pós- operatória em camudongos".

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal de Alfenas, Orientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Aprovado em: 03/05/19

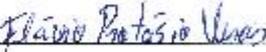
Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Prof. Dr. Flávio Protásio Veras  
Instituição: Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto  
- USP-RP

Assinatura: 

*A Deus, Aurélio e Sílvia, Levi, Charlene, Otávio, meu grande  
companheiro Raphael e a todos os covardes que tiveram a coragem de  
cair na estrada.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer à Deus pela dádiva da vida e do saber. Por todas as portas que se fecharam e se abriram ao longo da jornada. A Nossa Senhora Aparecida pela intercessão e pela força para chegar até aqui: *“Se eu curvar meu corpo na dor, me alivia o peso da cruz, mãe interceda por mim, junto à Jesus”*.

Aos meus pais, Aurélio e Sílvia por toda compreensão, amor incondicional, carinho, atenção e apoio nas mais diversas horas e decisões. Obrigada por sempre confiarem em mim, pela educação e criação, por serem meu exemplo em todos os sentidos. Eu amo vocês!

Ao meu irmão Levi, a quem sempre admirei pelo grande coração, força e humildade. Aquele com que sempre pude contar. Por sempre me incentivar a lutar pelos meus objetivos e metas, por não me deixar desanimar e abater por nada, por me ensinar a ser sempre forte. Meus sinceros agradecimentos por tudo que fez e faz por mim, por nós. Te amo!

A minha irmã Charlene e a meu sobrinho Otávio por todos os dias de diversão e risadas, pelo companheirismo, carinho e acolhimento quando não tinha a quem recorrer, também, e principalmente, pelo amor sincero e mais puro do meu sobrinho por mim. Amo vocês!

Ao meu eterno amor, Raphael, pelo apoio e pelo estímulo em sempre buscar mais e o melhor. Ao amor que me dedica desde sempre e ao carinho e cuidado. Te amo!

Aos meus tios Simara e Ronan por abrirem as portas de sua casa, sendo sempre muito amáveis e receptivos. Aos meus padrinhos Silvana e Ernane, por sempre me receberem e por serem meus pais. Muito obrigada pelo carinho, amo vocês.

Aos meus amigos de laboratório Rafaela, Iago, Thamyris e Renata, por terem me ajudado e me ensinado muitas coisas. Em especial, aos meus irmãos Iago e Thamyris por sempre estarem comigo, sem vocês não chegaria até aqui, e por isso meu eterno agradecimento. Gratidão à Aninha, minha parceira desde o início do mestrado até hoje.

Aos técnicos Luciana e Luiz pela disponibilidade em sempre ajudar, a Michele e a Célia, por colaborar na limpeza e cuidado com os animais e com nosso laboratório

e a cada vida animal, necessária para que esse estudo fosse realizado. Meu sincero respeito e gratidão.

As parcerias com o Ives Charlie-Silva, Leonardo Fernandes Fraceto, Nathalie Ferreira Silva de Melo e colaborações da Universidade Brasil, Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, Universidade Estadual Paulista, Sorocaba e Faculdade de Medicina de Araras, no fornecimento de instrumentos fundamentais para que o trabalho fosse realizado. A todos os envolvidos minha gratidão.

Gostaria de agradecer as pesquisadoras Mary Ann Foglio e Ilza Maria de Oliveira Sousa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, pelo fornecimento da planta *Artemisia annua L* e artemisinina, assim como ao meu orientador, professor Doutor Giovane Galdino de Souza pela oportunidade e confiança.

A UNIFAL-MG, minha casa durante muitos anos, ao Programa Multicêntrico pela chance e pelo suporte e a fundação de apoio CAPES, pelo apoio financeiro (001).

E a todos que de uma maneira ou outra me ajudaram, GRATIDÃO!

*“O antigo inimigo cedeu o espaço para um desafio ainda maior.  
Se manter de pé, contra o que vier, vencer os medos, mostrar ao  
que veio, ter o foco ali e sempre seguir rumo a VITÓRIA”.*

*Dead Fish- Vitória*

## RESUMO

A dor crônica pós-operatória (DCPO) é definida como uma dor crônica que se desenvolve ou aumenta de intensidade após um procedimento cirúrgico ou uma lesão tecidual, persiste além do processo de cicatrização e dura pelo menos 3 meses. As células gliais expressam o receptor Toll like 4 (TLR4) e a ativação do mesmo possui um papel importante na modulação da DCPO. A Artemisinina (ART) mostra ser um fármaco eficaz na inibição da via relacionada ao TLR4. Porém, a ART apresenta meia vida curta e baixa solubilidade em água e para auxiliar no processo de melhoramento da entrega do fármaco e facilitar a sua ação, a nanotecnologia se mostra como uma estratégia vantajosa. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da nanocápsula de ART sobre a DCPO em camundongos, avaliando o envolvimento da de células da glia espinais e da participação do TLR4 espinal. Para isso, foram utilizados camundongos *Swiss* machos pesando entre 30 e 35 g. O modelo de incisão e retração da pele e músculo (IRPM) foi utilizado e adaptado para camundongos. Uma incisão de 1 cm foi feita na região medial da coxa do animal e uma outra incisão de 7 mm na camada muscular da coxa medial. A região superficial do músculo foi afastada através da inserção do micro retrator no local da incisão onde então eles foram retraídos em 10 mm, revelando a fáscia dos músculos adutores subjacentes. As drogas ART livre e ART nanocápsula foram administradas por via intratecal (i.t.) no 3º e 28º dia de pós-operatório (P.O) e a minociclina (inibidor de micróglia), o fluorocitrato (inibidor de astrócitos) e o lipopolissacarídeo de *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS, antagonista do TLR4) foram administrados apenas no 3º P.O. A avaliação da nocicepção foi feita por meio do teste nociceptivo de von Frey filamentos. Os resultados demonstraram que a cirurgia de IRPM induziu hiperalgesia, que foi verificada do 1º ao 28º dia de P.O. A ART livre promoveu antinocicepção somente no 3º dia de P.O, que perdurou por 1 hora, o que não pôde ser observado na avaliação da mesma no 28º P.O. Já a nanocápsula de ART promoveu uma antinocicepção após 3 e 28 dias da cirurgia de IRPM, tendo um efeito mais prolongado (até 7 horas no 3º dia) em relação ao tempo de eficácia que a ART em sua forma livre. O fluorocitrato não alterou a nocicepção induzida pela cirurgia de IRPM. Já o pré-tratamento com a minociclina ou com o LPS-RS reverteu a antinocicepção encontrada após o 3º dia de P.O. Assim, o presente estudo concluiu que a ART em nanocápsula foi mais eficaz em relação ao tempo de eficácia do que a ART livre no controle da dor induzida pela cirurgia de IRPM tanto em uma fase aguda quanto crônica. Além disso, foi verificado que a micróglia espinal, bem como o TLR4 pode estar envolvido na fase aguda da dor pós-operatória induzida pelo modelo de IRPM.

Palavras-chave: Dor pós-operatória crônica. Artemisinina. Nanocápsulas. Micróglia.

Toll like 4.

## ABSTRACT

Chronic postoperative pain is defined as a chronic pain that develops or increases in intensity after a surgical procedure or a tissue injury, persists beyond the healing process and lasts for at least 3 months. The glial cells express the Toll Like Receptor 4 (TLR4) and activation thereof plays an important role in the modulation of DCPO. Artemisinin (ART) shows to be an effective drug in inhibiting the TLR4-related pathway. However, ART has a short half-life and low solubility in water and to aid in the process of improving drug delivery and facilitating its action, nanotechnology is an advantageous strategy. Thus, the objective of the present study was to investigate the effect of ART nanocapsule on DCPO in mice, evaluating the involvement of spinal glial cells and the participation of spinal TLR4. For this, male Swiss mice weighing between 30 and 35 g were used. The skin and muscle incision and retraction model (IRPM) was used and adapted for mice. A 1 cm incision was made in the medial region of the thigh of the animal and another incision of 7 mm in the muscular layer of the medial thigh. The superficial region of the muscle was removed by insertion of the microtractor at the incision site where they were then retracted by 10 mm, revealing the fascia of the underlying adductor muscles. The free ART and nanocapsule ART drugs were administered intrathecally (it) on the 3rd and 28th postoperative day (PO) and minocycline (microglial inhibitor), fluorocitrate (astrocyte inhibitor) and lipopolysaccharide of *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS, TLR4 antagonist) were only administered in the 3rd PO. The nociception evaluation was done by nociceptive test of von Frey filaments. The results showed that the IRPM surgery induced hyperalgesia, which was verified from the 1st to the 28th postoperative day. The free ART promoted antinociception only on the 3rd postoperative day, which lasted for 1 hour, which could not be observed in the evaluation of the same 28th PO. The nanocapsule of ART promoted an antinociception after 3 and 28 days of IRPM surgery, having a longer effect (up to 7 hours on the 3rd day) in relation to the time of effectiveness than ART in its free form. The fluorocitrate did not alter the nociception induced by IRPM surgery. On the other hand, pre-treatment with minocycline or with LPS-RS reversed the antinociception found after the 3rd PO day. Thus, the present study concluded that nanocapsule ART was more effective in relation to the time of effectiveness than free ART in the control of pain induced by IRPM surgery in both an acute and chronic phase. In addition, it was found that spinal microglia as well as TLR4 may be involved in the acute phase of postoperative pain induced by the IRPM model.

Keywords: Chronic postoperative pain. Artemisinin. Nanocapsules. Microglia. Toll like 4.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fibras aferentes nociceptivas.....	19
Figura 2-	Visão esquemática de fibras aferentes nociceptivas e a condução do impulso até o córtex somatossensorial através das vias ascendente ....	20
Figura 3-	Mecanismo de sensibilização central e envolvimento de células glia ....	24
Figura 4-	Estrutura molecular do receptor Toll like 4 .....	28
Figura 5-	Via de sinalização de TLR4 dependente de MyD88.....	29
Figura 6-	Estrutura química da Artemisinina e seus derivados.....	32
Figura 7-	Artemisia annua L. no campo.....	34
Figura 8-	Micro retrator utilizado para retração da pele e músculo.....	43
Figura 9-	Cirurgia de incisão e retração da pele e músculo.....	43
Figura 10-	Aparato de Von Frey .....	46
Figura 11-	Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata (g), em animais naive e operados .....	47
Figura 12-	Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata (g), após a injeção intratecal de ART livre, ART nanocápsula ou veículos .....	48
Figura 13-	Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata (g), após a injeção intratecal de minociclina, fluorocitrato, LPS-RS ou veículo .....	49

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após a cirurgia de IRPM.....	50
Gráfico 2-	Investigação da eficácia da ART livre frente a dor pós-operatória no 3º dia de P.O. ....	52
Gráfico 3-	Investigação da eficácia da ART livre frente a dor pós-operatória no 28º dia de P.O. ....	53
Gráfico 4-	Investigação da eficácia da ART nano frente a dor pós-operatória no 3º dia de P.O. ....	54
Gráfico 5-	Investigação da eficácia da ART nano frente a dor pós-operatória no 28º dia de P.O. ....	55
Gráfico 6-	Envolvimento da micróglia na nocicepção induzida pela cirurgia de IRPM no 3º P.O. ....	56
Gráfico 7-	Envolvimento do astrócito na nocicepção induzida pela cirurgia de IRPM no 3º P.O. ....	57
Gráfico 8-	Envolvimento do receptor Toll like 4 na nocicepção induzida pela cirurgia de IRPM.....	58
Gráfico 9-	Envolvimento da ART livre, nanopartícula, veículo e veículo nanopartícula na nocicepção em animais saudáveis .....	59
Gráfico 10-	Envolvimento do fluorocitrato 1200 pmol, minociclina 1000 ng, LPS-RS 2 µg, veículo e veículo nanopartícula na nocicepção em animais saudáveis .....	60

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

<b>AFM</b>	Microscopia de força atômica
<b>AINE</b>	Anti-inflamatórios não esteroidais
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
<b>ART</b>	Artemisinina
<b>ASIC</b>	Canais iônicos sensíveis a ácido
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>CCF</b>	Cromatografia em camada fina
<b>CCL2</b>	Ligante 2 de quimiocina com motivo-c
<b>CCL5</b>	Ligante 5 de quimiocina com motivo-c
<b>CDME</b>	Corno dorsal da medula espinal
<b>CFA</b>	Complexo adjuvante de Freund
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>cJNK</b>	c-Jun quinase terminal
<b>DAMP</b>	Padrões moleculares associados ao dano
<b>DCPO</b>	Dor crônica pós-operatória
<b>EE</b>	Eficiência de encapsulação
<b>ERK</b>	Quinase regulada por sinal extracelular
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GFAP</b>	Proteína fibrilar glial ácida
<b>GRD</b>	Gânglio da raiz dorsal
<b>I.m.</b>	Intramuscular
<b>I.p.</b>	Intraperitoneal
<b>I.pl.</b>	Intraplantar
<b>I.t.</b>	Intratecal
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor

<b>IKK<math>\alpha</math></b>	Inibidor do fator nuclear $\kappa$ -B subunidade $\alpha$
<b>IKK<math>\beta</math></b>	Inibidor do fator nuclear $\kappa$ -B subunidade $\beta$
<b>IL-18</b>	Interleucina 18
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IRAK</b>	Quinase relacionada ao receptor de interleucinas
<b>IRF5</b>	Fator regulador de interferon 5
<b>IRPM</b>	Incisão e retração da pele e músculo
<b>KCNK</b>	Subtipos de canais de potássio
<b>KA</b>	Receptor kainato
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LPS-RS</b>	Lipopolissacarídeo <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
<b>L-<math>\alpha</math>-AA</b>	L- $\alpha$ -aminoácido
<b>MAPK</b>	Proteínas quinases ativada a mitógeno
<b>MB</b>	Medida basal
<b>MD2</b>	Diferenciação mieloide 2
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Íon magnésio
<b>MGlur</b>	Receptor metabotrópico de glutamato
<b>MyD88</b>	Fator de diferenciação mieloide 88
<b>NA<sub>v</sub></b>	Canais de sódio dependente de voltagem
<b>NC</b>	Nanocápsula
<b>NDD</b>	Fármacos nanoestruturais
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NK1</b>	Neurocinina 1
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartado
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NTA</b>	Rastreamento de nanopartículas
<b>P2X4</b>	Receptor purinérgico do tipo 4
<b>PAMP</b>	Padrão molecular associado ao patógeno

<b>PCL</b>	Poli- $\epsilon$ -caprolactona
<b>PDI</b>	Índice de polidispersão
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PKA</b>	Proteína quinase A
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>P<sub>2</sub>X<sub>4</sub></b>	Purinoreceptor de P <sub>2</sub> X <sub>4</sub>
<b>P<sub>2</sub>X<sub>7</sub></b>	Purinoreceptor de P <sub>2</sub> X <sub>7</sub>
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RRP</b>	Receptor de reconhecimento padrão
<b>SMIR</b>	Incisão e retração da pele e do músculo
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SP</b>	Substância P
<b>TLR4</b>	Receptor do tipo <i>toll like 4</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TRAF6</b>	Fator 6 associado ao receptor de TNF
<b>TrkB</b>	Tropomiosina quinase B
<b>TRPA</b>	Receptor transiente de potencial anquirina
<b>TRPM</b>	Receptor transiente de potencial melastatina
<b>TRPV</b>	Receptor transiente de potencial vaniloide

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Dor: Considerações gerais</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Dor pós-operatória crônica</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Envolvimento espinal e dor crônica pós-operatória</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4</b>	<b>Células da glia e a modulação da DCPO</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>O receptor Toll Like 4 e as células gliais na DCPO</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Tratamento da dor crônica pós-operatória</b> .....	<b>30</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Artemisinina</b> .....	<b>32</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Artemisinina e nanotecnologia</b> .....	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta de material vegetal</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Extração de Artemisinina</b> .....	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Purificação e quantificação de ART por HPLC-RI</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Preparação de nanocápsulas de PCL contendo ART</b> .....	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Caracterização e estabilidade da nanocápsula</b> .....	<b>41</b>
<b>4.6</b>	<b>Animais de experimentação</b> .....	<b>41</b>
<b>4.7</b>	<b>Modelo de dor pós-operatória – IRPM</b> .....	<b>42</b>
<b>4.8</b>	<b>Drogas utilizadas</b> .....	<b>44</b>
<b>4.9</b>	<b>Via de administração</b> .....	<b>44</b>
<b>4.10</b>	<b>Avaliação do limiar nociceptivo</b> .....	<b>45</b>
<b>4.11</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	<b>46</b>
<b>4.12</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após a cirurgia de IRPM</b> .....	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Avaliação do efeito da ART livre e em nanocápsula sobre a hiperalgesia induzida pela cirurgia de IRPM</b> .....	<b>51</b>

5.3	Avaliação da participação das células da glia espinais na hiperalgesia induzida pela cirurgia de IRPM.....	55
5.4	Avaliação da participação do receptor Toll like 4 na hiperalgesia induzida pela cirurgia de IRPM .....	58
5.5	Avaliação da participação das diferentes drogas no limiar nociceptivo de animais naive .....	59
6	DISCUSSÃO .....	61
7	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS .....	69
	ANEXO A- Certificado do Comitê de ética em pesquisa e uso animal .....	79

## 1 INTRODUÇÃO

A Associação Internacional para o estudo da Dor (IASP), define a dor crônica pós-operatória (DCPO) como uma dor que se desenvolve após uma grande intervenção cirúrgica e dura pelo menos 3 meses, excluindo outras causas para a dor (GIAMBERARDINO et al., 2018). Esse tipo de dor pode ser aguda (protetora), a qual acontece normalmente após um evento cirúrgico por exemplo, porém, ela pode se tornar crônica (DINAKAR; STILLMAN, 2016). Nesse contexto, tratamentos não resolutivos da dor contribuem para que ela se torne uma dor crônica (REDDI, 2016). Um estudo demonstrou que a DCPO é vivenciada por 10 a 50% dos indivíduos após as operações clássicas, podendo ser grave em cerca de 5 a 10% destes pacientes (KEHLET; JENSEN; WOOLF, 2006a; MARTINEZ; BAUDIC; FLETCHER, 2013). Uma pesquisa envolvendo cirurgia de hérnia inguinal primária ou recorrente, unilateral ou bilateral, constatou que em um ano a incidência de DCPO foi de 43% para pacientes com idade entre 18 e 40 anos, 29% para pacientes com 40 a 60 anos e 19% para pacientes com mais de 60 anos (THEUNISSEN et al., 2016).

As células gliais possuem papel neuroprotetor no sistema nervoso central (SNC), e podem ser ativadas por várias substâncias, tais como, citocinas, quimiocinas, metaloproteinases, padrões moleculares associados ao dano (DAMP's), neurorregulinas e adenosina trifosfato (ATP), através de diversos receptores que elas expressam, e dentre esses receptores expressos, os receptores de membrana *Toll like 4* (TLR4) demonstram modular a dor através da liberação de citocinas pró-inflamatórias que contribuem diretamente para a sensibilização de neurônios e células gliais à nível central (GRACE et al., 2014; MILLIGAN; WATKINS, 2009). Devido a esses achados, o TLR4 expresso pelas células gliais parece ter papel importante em uma das vias de modulação da DCPO, visto que, através da liberação de mediadores pró-inflamatórios eles podem sensibilizar ainda mais neurônios, células imunes e gliais para o estado de neuroinflamação no SNC. Sun e colaboradores (2015) demonstraram em seu estudo que as células gliais têm papel importante na neuromodulação da DCPO (SUN et al., 2015a). Levando em consideração esses fatos, é necessário o devido tratamento da DCPO, pois, podemos ressaltá-la como um importante problema de saúde, representando uma carga socioeconômica considerável no mundo todo. Consequentemente, a DCPO também afeta

negativamente a qualidade de vida dos indivíduos, por se tratar de um sintoma incapacitante e sendo o maior desafio da terapia analgésica (GOSSELIN et al., 2011; SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990).

A Artemisinina (ART) tem sido demonstrada como um tratamento de diversas patologias (HO et al., 2014) bem como no controle da inflamação (SHAKIR et al., 2011) e dor (YING et al., 2017). A ART é um dos princípios ativos oriundos da planta medicinal chinesa *Artemisia annua* L. (YUAN et al., 2017). Ademais, essa substância pode inibir algumas vias de sinalização pró-inflamatórias, tais como, a via relacionada ao receptor TLR4 e ao fator nuclear de transcrição *kappa B* (NF $\kappa$ B) (LUO et al., 2008; WANG et al., 2015, 2006a) responsáveis, dentre outras funções, por modular a dor. Porém, a ART apresenta meia vida curta e baixa solubilidade em água, e para auxiliar no processo de melhoramento da entrega do fármaco e facilitar a sua ação a nanotecnologia se mostra como uma estratégia vantajosa, visto que, a mesma possui potencial para aumentar a biodisponibilidade do princípio ativo, assim como auxiliar no controle de liberação e alcance do fármaco até o tecido alvo.

Desse modo, a nanotecnologia tem sido uma aplicação tecnológica importante para melhorar a terapia medicamentosa em relação às limitações potenciais dos fármacos convencionais. Sabendo que a ART é um potencial tratamento para a DCPO, sendo que estudos já identificaram papéis antinociceptivos e anti-inflamatórios (DE FAVERI FAVERO et al., 2014; SHI et al., 2018; YING et al., 2017), o presente estudo teve o objetivo de investigar o papel da nanocápsula de ART sobre a DCPO induzida pelo modelo IRPM em camundongos, bem como, verificar se ocorre ativação glial através da ativação do TLR4 neste modelo de dor.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Nos tópicos abaixo serão abordados os aspectos da dor.

### 2.1 Dor: Considerações gerais

A dor se define de acordo com a IASP como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada ao dano tecidual real, potencial ou descrita em termos de tal dano (LOESER et al., 2011). Ela inclui componentes discriminativos da sensibilidade dolorosa e a percepção consciente de um evento sensorial e inclui a análise cognitiva além da resposta emocional associada à experiência durante o processo doloroso (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). Enquanto que a nocicepção é caracterizada como um mecanismo fisiológico de proteção frente à estímulos potencialmente nocivos. A dor possui função importante na proteção contra danos ao organismo e serve como sinal de alerta para preservação do corpo frente a potenciais danos (BASBAUM et al., 2009).

Do ponto de vista temporal, a dor pode ter caráter agudo, definida como de início recente e de duração limitada, ou, ela pode ter caráter crônico, definida como àquela dor que persiste além do período esperado para a cura de uma doença ou injúria (ALVES et al., 2017). Os neurônios aferentes primários do sistema somatossensorial, também reconhecidos como nociceptores ou fibras sensoriais, têm seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal (GRD) ou nos gânglios trigêmeos (WOOLF; MA, 2007). As fibras A $\delta$  são mais calibrosas e apresentam bainha de mielina que permite a rápida transmissão do impulso nociceptivo. Estas, conduzem as informações nociceptivas de estímulos mecânicos perigosamente intensos, bem como, conduzem estímulos mecânicos e térmicos não nociceptivos. Enquanto que as fibras C, amielínicas, transmitem o impulso nociceptivo de maneira lenta e reconhecem estímulos mecânicos, químicos e térmicos. Em contrapartida, as fibras A $\alpha$  e A $\beta$  mielínicas detectam estímulos inócuos, tato leve e não contribuem para a transmissão do impulso elétrico, como pode ser observado na figura 1 (BASBAUM et al., 2009; CHRISTIANSEN; COHEN, 2018; MILLAN, 1999).

Os neurônios aferentes primários, por sua vez, reconhecem e transpõem os estímulos da periferia sejam eles de origem química, tátil, de pressão ou temperatura,

por meio de canais iônicos incluindo subtipos de canais potenciais do receptor transiente (TRPA, TRPM e TRPV), isoformas do canal de sódio ( $Na_v$ ), subtipos de canais de potássio (KCNK), canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC's), além de outros. A transdução de estímulos externos é iniciada pela geração do potencial de ação do nervo periférico devido a ativação desses canais iônicos, e estes conduzem o sinal elétrico ao longo dos axônios até o GRD e lá farão a primeira sinapse com neurônios aferentes secundários, excitando os mesmos através da liberação de mediadores neuronais, tais como, glutamato, substância P (SP), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e óxido nítrico (NO) (CHRISTIANSEN; COHEN, 2018; GRACE et al., 2014b).

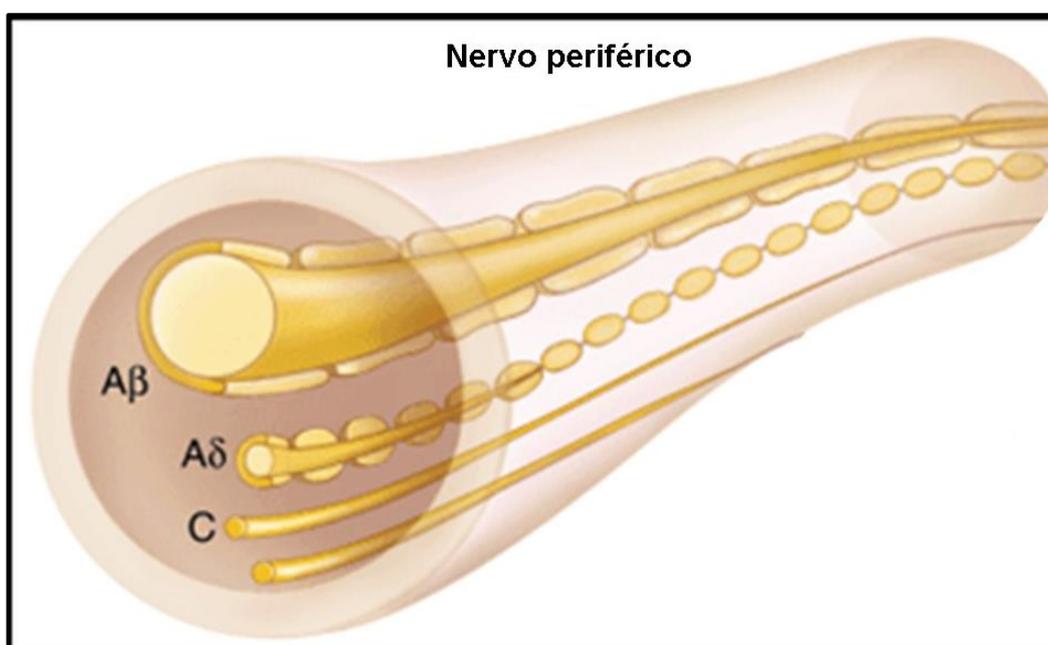


Figura 1-Fibras aferentes nociceptivas.

Fonte: Adaptado de The McGraw-Hill Companies, Inc.

Nota: Tipos de fibras aferentes primárias. As fibras do tipo A $\beta$  são fibras de grande diâmetro, altamente mielinizadas e conduzem estímulos proprioceptivos. As fibras do tipo A $\delta$  são de médio diâmetro, levemente mielinizadas e contribuem para a dor, detectando estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Já as fibras do tipo C não são mielinizadas, possuem pequeno diâmetro e são capazes de detectar estímulos inócuos e nociceptivos.

Após a condução do impulso elétrico através da sinapse dos neurônios aferentes primários com os secundários, no GRD, o potencial de ação é transmitido via axonal até chegar nas lâminas I, II e V do corno dorsal da medula espinal (CDME) e a modulação do impulso, bem como, o cruzamento de vias ocorrerá, culminando na união de fibras ascendentes do sistema anterolateral. Assim, os tratos

espinotalâmicos se prolongam para os centros supra espinais de processamento da dor (núcleos talâmicos: ventropóstero-lateral e intralaminar) e o tronco cerebral. Os axônios do tálamo se estendem e fazem sinapse com neurônios aferentes terciários para várias áreas corticais como o córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção e interpretação do estímulo como dor como pode ser observado na (figura 1) (BASBAUM et al., 2009; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

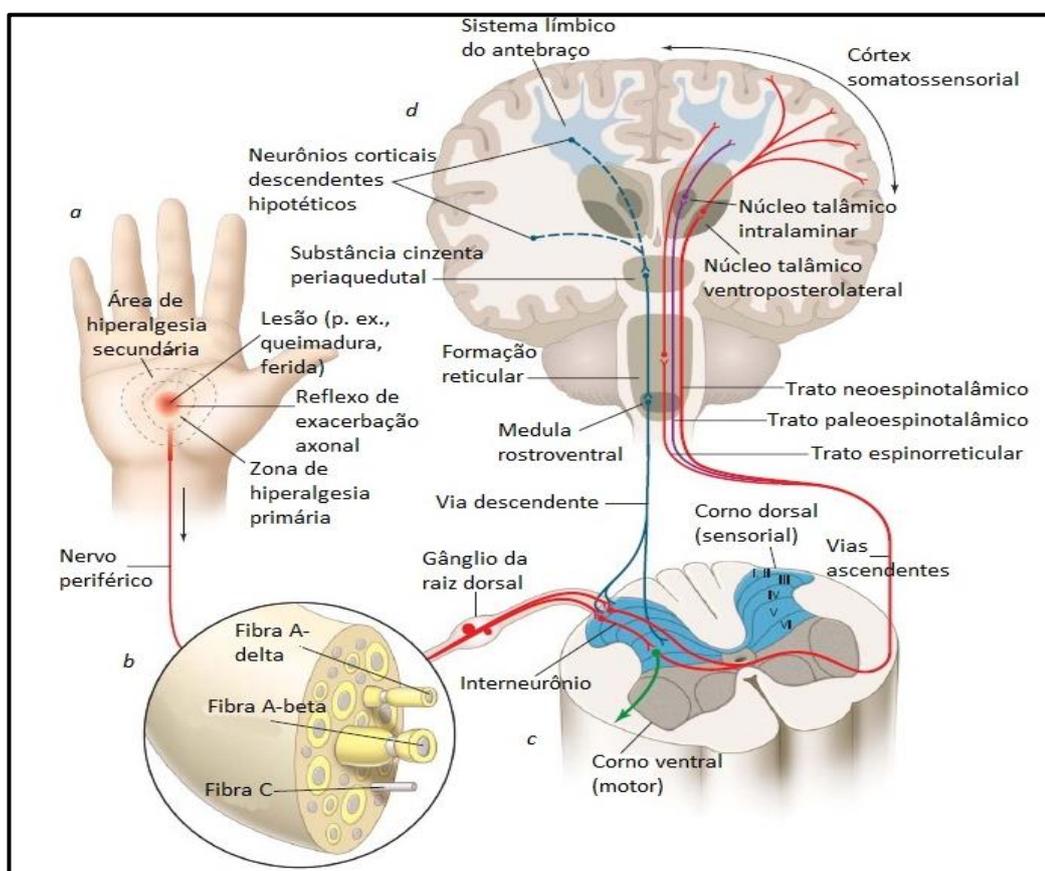


Figura 2-Visão esquemática de fibras aferentes nociceptivas e a condução do impulso até o córtex somatossensorial através das vias ascendentes.

Fonte: Adaptado de Oaklander, 2011.

Nota: Em vermelho as vias ascendentes, após estímulo prévio por alguma injúria tecidual na pele, de origem química, elétrica ou mecânica. O impulso transformado em potencial elétrico passa pelo gânglio da raiz dorsal, realizando a primeira sinapse, após isso, a via decussa à nível medular pelo corno dorsal da medula espinal e lá realiza a segunda sinapse e ascende até o tálamo, onde realiza a sinapse terciária e ascende finalmente até o córtex somatossensorial, onde será interpretada como dor.

## 2.2 Dor crônica pós-operatória

De acordo com a IASP, a DCPO é definida como uma dor crônica que se desenvolve ou aumenta de intensidade após um procedimento cirúrgico ou uma lesão tecidual, persiste além do processo de cicatrização e dura pelo menos 3 meses. Ela se distingue entre traumas teciduais decorrentes de um procedimento controlado na prestação de cuidados de saúde (cirurgia) ou formas de danos acidentais como amputações, acidentes automobilísticos, entre outros (BENOLIEL et al., 2018). Considera-se que a dor aguda após a cirurgia seja uma resposta fisiológica e previsível com conseqüente resolução do problema, entretanto, na maioria das vezes não é o que ocorre. Estudos demonstram que até um terço dos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos comuns relatam dor persistente ou intermitente de gravidade variável no primeiro ano de pós-operatório (BRUCE et al., 2019). Uma revisão demonstra que a DCPO é vivenciada por 10-50% dos indivíduos após as operações clássicas, podendo ser grave em cerca de 5 a 10% destes pacientes (KEHLET; JENSEN; WOOLF, 2006b; MARTINEZ; BAUDIC; FLETCHER, 2013).

O prejuízo causado pela DCPO é certamente enorme se pensarmos o volume de procedimentos cirúrgicos realizados anualmente (BRUCE et al., 2019; KEHLET; JENSEN; WOOLF, 2006a). A DCPO pode ter um impacto duradouro na qualidade de vida dos indivíduos, e, apesar de ocorrer com frequência os mecanismos deste tipo de dor não estão bem elucidados, por isso, ela é subtratada (BENOLIEL et al., 2018). Atualmente, não há uma maneira definitiva de prevenir a ocorrência de DCPO. Várias técnicas foram utilizadas na tentativa de reduzir os riscos, mas, com sucesso variável. Portanto, identificar os fatores de risco em cada paciente e aplicar uma estratégia preventiva oportuna é extremamente importante e pode ajudar os indivíduos a evitar o sofrimento da dor crônica (THAPA; EUASOBHON, 2018).

Alguns métodos epidemiológicos têm sido estudados para identificar fatores de risco que possam contribuir para o desenvolvimento de DCPO, tais como, presença de dor pré-operatória, idade, manuseio intraoperatório, fatores psicológicos, tipo de abordagem cirúrgica, predisposição genética, dor aguda pós-operatória além do tipo de anestesia (BRUCE et al., 2019). Estudos transversais citam um aumento de duas a três vezes no risco de DCPO entre pacientes com dor pré-operatória, muito embora essas estimativas sejam baseadas frequentemente na memória e relato do paciente (POOBALAN et al., 2001). A idade também pode influenciar na intensidade da DCPO, pois, estudos revelam que pacientes jovens têm maior probabilidade em desenvolver DCPO quando comparados com pacientes idosos (ANDERSEN; KEHLET, 2011;

BRUCE et al., 2019; POOBALAN et al., 2001; WILDGAARD et al., 2011), entretanto, existem convergências entre os estudos (PAGE et al., 2002).

Outro fator de risco importante a se levar em conta no entendimento da DCPO é o estado psicológico do indivíduo. Indivíduos com ansiedade são considerados hipersensíveis e psicologicamente mais reativos a estímulos ameaçadores. A ansiedade e a depressão são preditivas de dor pós-operatória aguda, assim como a ansiedade pré-operatória se correlaciona com a alta da mesma no pós-operatório, além de aumentar a intensidade da dor pós-operatória, culminando na necessidade de analgésicos e maior tempo de internação hospitalar (CAUMO et al., 2002; POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017). A genética também é uma grande influência quando se trata de DCPO. Pacientes submetidos a cirurgias eletivas estão extensamente expostos a níveis semelhantes de lesão tecidual, contudo, apenas uma proporção destes apresentam dor crônica. Com isso, seria coerente suspeitar que, como acontece com muitas outras doenças, existam componentes genéticos e ambientais em todos os mecanismos causais, além de já se saber sobre a propensão à dor, onde a mesma é influenciada por vários genes (KATZ; SELTZER, 2009).

### **2.3 Envolvimento espinal e dor crônica pós-operatória**

Durante o processo de injúria promovida pelo processo cirúrgico, células imunes residentes presentes no GRD liberam mediadores pró-inflamatórios. Esses mediadores pró-inflamatórios liberados vão sensibilizar neurônios periféricos através da diminuição do limiar de ativação dos mesmos, além de contribuir para a inflamação e sensibilização periférica (CALVO; BENNETT; DAWES, 2012; OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016).

Em adição ao componente periférico da nocicepção na DCPO, um componente central também está correlacionado e contribui para o estabelecimento e manutenção da dor crônica (GRACE et al., 2014a; HUCHO; LEVINE, 2007; COSTIGAN; WOOLF, 1999). A sensibilização central se dá, dentre outros fatores, através da hipersensibilidade causada previamente por estímulos potencialmente lesivos reconhecidos por nociceptores periféricos que transmitem o estímulo pelo axônio em forma de potencial de ação até o GRD. Em consequência, esses neurônios

liberam neurotransmissores excitatórios, como o glutamato. O glutamato, por sua vez, se liga a diversos receptores em neurônios pós-sinápticos de neurônios secundários, no CDME, como o propionato de amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazol (AMPA), N-metil-D-Aspartato (NMDA), receptores kainato (KA) e vários subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato metabotrópicos (mGluR) (figura 3). A ativação do receptor NMDA é um passo essencial para inicialização e manutenção da sensibilização central, pois, ele está presente em praticamente todas as sinapses nas lâminas superficiais do CDME. Naturalmente, o receptor NMDA é bloqueado de maneira dependente de voltagem por um íon de magnésio ( $Mg^{2+}$ ) localizado no poro do receptor (CHRISTIANSEN; COHEN, 2018; KUNER, 2015; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; NARANJO; VARDEH, 2017).

A liberação de glutamato sustentada pela hipersensibilidade neuronal das fibras nociceptivas, bem como a liberação de SP pelas fibras C, conduzem a despolarização da membrana do neurônio aferente secundário o suficiente para forçar o  $Mg^{2+}$  a deixar o sítio de ligação do receptor NMDA. O CGRP, também sintetizado pelos neurônios sensitivos de pequeno diâmetro potencializa os efeitos da SP e participa na sensibilização central por meio de receptores CGRP pós-sinápticos, ativando com isso a proteína quinase A e C (PKA e PKC). Após todo esse processo, a ligação do glutamato ao receptor gera uma corrente interna. A remoção desse bloqueio de  $Mg^{2+}$  dependente de voltagem é um mecanismo importante para aumentar rapidamente a eficácia sináptica e com isso, permite a entrada de  $Ca^{2+}$  no neurônio de segunda ordem, e este então ativa vias intracelulares que contribuem para a manutenção da sensibilização central (CHRISTIANSEN; COHEN, 2018; KUNER, 2015; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009; NARANJO; VARDEH, 2017).

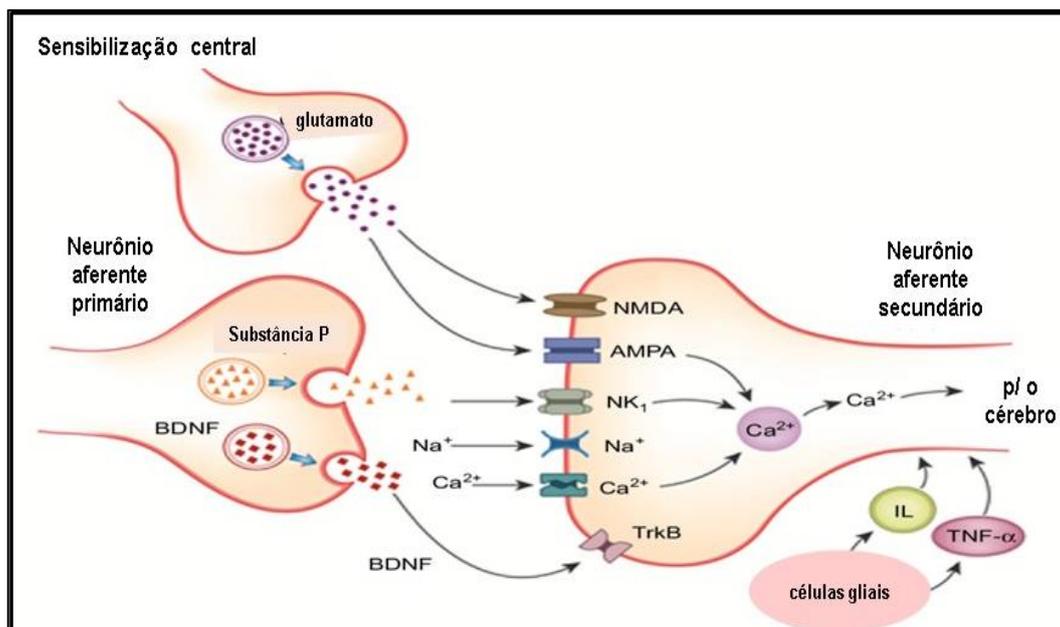


Figura 2- Mecanismo de sensibilização central e envolvimento de células gliais.

Fonte: Adaptado de Dureja, 2017.

Nota: BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro;  $\text{Na}^+$ : sódio;  $\text{Ca}^{2+}$ : cálcio; NMDA: N-metil-D-aspartato; AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico;  $\text{NK}_1$ : neurocinina 1; TrkB: tropomiosinacina B; IL: interleucina;  $\text{TNF}\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa. O glutamato sendo liberado via exocitose, ativando receptores AMPA E NMDA na fenda sináptica do neurônio aferente secundário, para estimulá-lo ainda mais. Além disso, mediadores liberados pelo neurônio aferente primário, como o BDNF e a substância P, que ativam outros receptores como TrkB e  $\text{NK}_1$ , alteram o potencial de membrana do neurônio aferente secundário, o qual ocorre influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , e, eles em conjunto contribuem para a propagação do potencial de ação com consequente perpetuação da sensibilização central. Em paralelo, as células gliais também estimulam o neurônio aferente secundário ao liberar citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas e  $\text{TNF}\alpha$ .

Estudos mostram que componentes que previamente não participavam da nocicepção passam a contribuir para a sensibilização central, como por exemplo as fibras  $\text{A}\beta$ , de baixo limiar, as quais transferem principalmente estímulos mecânicos inócuos. Elas normalmente se alinham de modo a ativar vias sensoriais de tato não doloroso, e seu potencial excitatório pré-sináptico não é capaz de ativar neurônios de projeção da via nociceptiva. Todavia, quando os neurônios de segunda ordem se encontram sensibilizados, sua eficácia na recepção sináptica aumenta e essas células despolarizam-se com facilidade, sendo que estímulos advindos das fibras  $\text{A}\beta$  também contribuem para a despolarização dos neurônios de projeção da via nociceptiva. Com isso, um estímulo inócuo como o toque leve sobre a pele, é capaz de provocar sensação dolorosa no indivíduo (WOOLF, 2012).

## 2.4 Células da glia e a modulação da dor crônica pós-operatória

A sensibilização do processo nociceptivo possui muitos outros fatores importantes, tais como, o envolvimento de células especializadas que se encontram no SNC, referidas em conjunto como glia e compostas por astrócitos, oligodendrócitos e micróglia. 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. Dentre as células gliais, os astrócitos são os mais abundantes e atuam na manutenção da homeostase de líquido e íons do microambiente neuronal e têm participação na função, formação e plasticidade sináptica. Sua ativação leva a alterações morfológicas como hipertrofia e aumento da produção de um marcador de astrócitos chamado proteína ácida fibrilar glial (GFAP), além do aumento funcional da produção de substâncias pró-inflamatórias, como as citocinas (WOOLF, 2012; GOSSELIN et al., 2011; GRACE et al., 2014a; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Já a micróglia se apresenta em estado quiescente, ou seja, em “repouso”, com morfologia ramificada, pouca ou nenhuma expressão de receptores e marcadores de superfície celular. Elas são células consideradas originárias de uma linhagem celular monocítica de origem mesodérmica (mieloide) e entram no SNC durante o desenvolvimento fetal. As células microgлияis são semelhantes a macrófagos no SNC e estão envolvidas no desenvolvimento cerebral a partir de interações com as sinapses no desenvolvimento normal do cérebro, por meio da ativação da cascata do sistema complemento e possuem um papel fundamental na resposta às lesões diretas no SNC, como trauma ou isquemia, doenças autoimunes como esclerose múltipla e doenças neurodegenerativas (HANSEN; HANSON; SHENG, 2017; SALTER; STEVENS, 2017; BAI; HE; XU, 2016). 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 (WOOLF, 2012; GOSSELIN et al., 2011; GRACE et al., 2014a; MILLIGAN; WATKINS, 2009; OLSON; SCHOMBERG, 2012).

As células da glia, além de expressar receptores para os principais neurotransmissores excitatórios da via nociceptiva expressam também receptores para outras moléculas sinalizadoras que são liberadas pelos nociceptores periféricos.

A glia espinal contribui para estados de dor hiperresponsivos devido ao seu recrutamento e ativação (WOOLF, 2012; GRACE et al., 2014a; GUILLOT et al., 2012a; MILLIGAN; WATKINS, 2009; OLSON; SCHOMBERG, 2012). A micróglia expressa diversos receptores responsáveis por ativar vias de sinalização intracelular que culminam na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Diversas vias de sinalização medeiam o recrutamento da micróglia espinal e elas são ativadas a partir da ligação de seus respectivos ligantes. O TLR4 pode ser ativado através de DAMP's ou por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP's) e é um dos receptores expressos pela micróglia. Ao ser ativado, ele induz a produção de fatores de transcrição como NFκB que terminam na produção de mediadores inflamatórios como a interleucina 1 beta (IL-1β), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e BDNF. Esses mediadores podem atuar de forma autócrina, ativando e recrutando mais células para o CDME, além estimular a liberação de mais mediadores pró-inflamatórios (WOOLF, 2012; GRACE et al., 2014a; GUILLOT et al., 2012a; MILLIGAN; WATKINS, 2009; OLSON; SCHOMBERG, 2012).

Em consonância, a ativação de astrócitos também aumenta a expressão gênica e síntese de fatores inflamatórios como os acima citados. Eles, por sua vez, também são capazes de atuar sobre receptores presentes em neurônios e outras células quiescentes pela retroalimentação positiva, realizando essa função através da regulação da atividade sináptica e da liberação de neuromoduladores como o glutamato, a D-serina e o ATP, através da expressão e ativação de receptores NMDA, canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem, receptores não NMDA, receptores metabotrópicos, purinas e SP. Na ativação astrocitária, são ativadas vias de sinalização de sinal extracelular (ERK) cJNK, dentre outras (WOOLF, 2012; GRACE et al., 2014b; GUILLOT et al., 2012; MILLIGAN; WATKINS, 2009; MOALEM; TRACEY, 2006; CHIU; JR; PINHO-RIBEIRO, 2017; RU-RONG JI, TEMUGIN, 2014).

Após um estímulo nociceptivo muito intenso ou aplicado de forma crônica, a tendência à sensibilização ocorre de forma que o limiar de ativação de nociceptores ou de neurônios da via nociceptiva no SNC seja reduzido, possibilitando que estímulos subsequentes sejam potencializados (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Os estímulos lesivos causados, dentre outras formas, por processos cirúrgicos muitas vezes são necessários. Entretanto, a nocicepção causada pelo estímulo lesivo pode tornar-se uma patologia se não tratada de maneira adequada (LAVAND'HOMME, 2015; REDDI, 2016; CURRAN; REDDI, 2014). Na maioria das vezes, os indivíduos

submetidos a procedimentos cirúrgicos desenvolvem DCPO e a fim de elucidar os mecanismos que levam a esse tipo de afecção, estudos vêm sendo realizados. Além disso, eles revelam que a micróglia e os astrócitos parecem estar envolvidos nesses mecanismos causadores da DCPO, assim como eles parecem ser ativados por meio de TLR's (CHEN et al., 2015; SUN et al., 2015a).

#### **2.4 O receptor Toll Like 4 e as células gliais na dor pós-operatória crônica**

O sistema imune inato envolve inúmeras classes de receptores conhecidos em conjunto como receptores de reconhecimento de padrão (RRP's). Eles reconhecem sequências moleculares e são classificados através dos respectivos ligantes. A categoria dos TLR foram identificados como RRP's, e desde então foram extensivamente reconhecidos devido as suas colaborações essenciais frente ao sistema imune inato (MEDZHITOV; JANEWAY, 2002). A descoberta dos TLR originou-se da identificação da proteína *Toll*, que desempenha um papel essencial na ditadura da polaridade dorsoventral durante a embriogênese larval da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (GRACE; LACAGNINA; WATKINS, 2017). Um homólogo humano de *Drosophila Toll* (que posteriormente conferiu a nomenclatura *Toll like*) foi clonado e caracterizado como uma proteína transmembrana capaz de induzir a transcrição de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, e IL-8 em monócitos humanos mediada por meio do NFκB (JANEWAY; MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT, 1997).

Existe descrito na literatura até o momento um total de 13 TLR's, sendo que humanos expressam funcionalmente TLR1 a TLR10, enquanto roedores expressam TLR1 a TLR9 e TLR11 a TLR13 (AKIRA; TAKEDA, 2004; MILLIGAN; WATKINS, 2009). O TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos principalmente na superfície celular, enquanto o TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são tipicamente encontrados no interior da célula. Sendo assim, os TLR são essenciais para orquestrar respostas inflamatórias de proteção, defesa do organismo hospedeiro contra patógenos e dano tecidual, além disso, eles demonstram papel fundamental na dor (GRACE; LACAGNINA; WATKINS, 2017; DELEO; NUTILE-MCMENEMY; TANGA, 2005). Eles

também são expressos em tipos de células não neuronais e neuronais e contribuem para distúrbios infecciosos e não infecciosos no SNC (GAO; JI; LIU, 2012).

O TLR4 é o mais descrito dos TLR's (figura 4), baseado em seu papel fundamental no reconhecimento bacteriano, no arranjo da resposta inflamatória e em resposta a ligantes endógenos liberados durante a lesão tecidual, como os produtos de degradação de macromoléculas, proteínas de choque térmico e componentes intracelulares de células apoptóticas, conhecidos, em geral, como DAMP's. Além disto, eles podem ser ativados por meio de ligantes exógenos, como o lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas (LPS) (GRACE et al., 2014a; GRACE; LACAGNINA; WATKINS, 2017; NICOTRA et al., 2012).

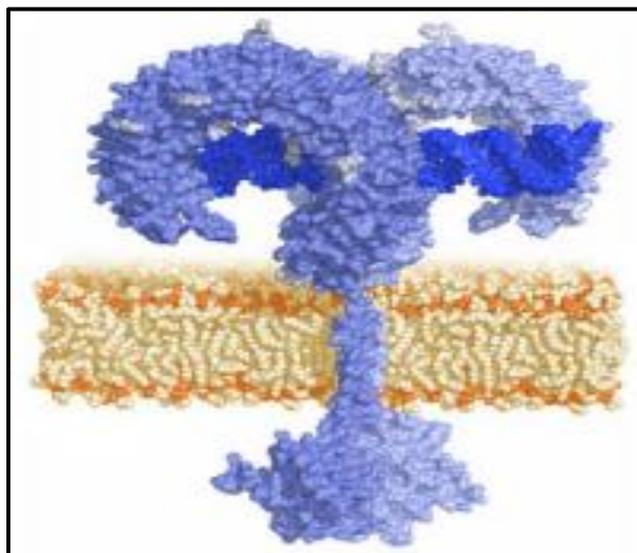


Figura 3- Estrutura molecular do receptor Toll like 4  
Fonte: <https://www.invivogen.com/review-trlr>.

A ativação desse receptor faz com que ocorra a associação com a proteína adaptadora MyD88, esta, recruta as proteínas quinases associadas ao receptor interleucina 1 (IRAK's), permitindo a fosforilação das mesmas. O fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TRAF6) em associação as IRAK's, ambas fosforiladas, formam um complexo na membrana plasmática (AKIRA; TAKEDA, 2004; RU-RONG JI, TEMUGIN, B, 2014). Esse processo induz a degradação das IRAK's na membrana plasmática e o complexo remanescente desloca-se para o citosol. Isso leva à fosforilação do complexo inibidor do fator nuclear *kappa* B, associado a I $\kappa$ B-quinase

(IKK) que então fosforila I $\kappa$ B, levando à sua ubiquitinação e degradação subsequente. Isso permite que o NF $\kappa$ B se desloque para o núcleo e estimule a expressão dos seus genes alvo (figura 5), que culminam na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e o TNF- $\alpha$ , NO e PGE<sub>2</sub> (AKIRA; TAKEDA, 2004; MILLIGAN; WATKINS, 2009; RU-RONG JI, TEMUGIN, B, 2014).

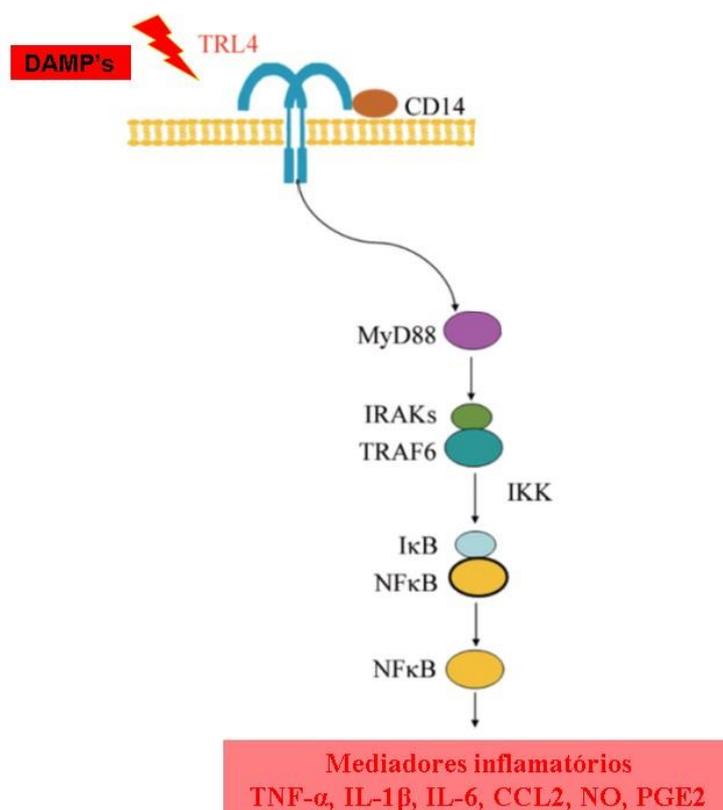


Figura 4- Via de sinalização de TLR4 dependente de MyD88.  
Fonte: Adaptado de Liu, 2012.

Nota: DAMP's: padrões moleculares associados ao dano; TLR4: receptor toll like 4; CD14: grupamento de diferenciação 14; MyD88: fator de diferenciação mieloide 88; IRAK's: proteínas quinases associadas ao receptor IL-1; TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF; IKK's: inibidor do fator nuclear kappa B; IKKB: inibidor do fator nuclear kappa B subunidade  $\beta$ ; NF $\kappa$ B: fator nuclear kappa B; TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; IL1- $\beta$ : interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; IL1- $\beta$ : interleucina 1 beta; CCL2: ligante 2 de quimiona (motivo CC); NO: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2.

A glia, como já foi descrito aqui, são células especializadas residentes no SNC e conferem diversas funções protetoras. Elas expressam TLR's que também já mostraram ter papel essencial na imunidade inata. Dentre eles, o TLR2, 3 e 4 parecem

estar presentes na neuromodulação da dor crônica (GAO; JI; LIU, 2012). Várias cirurgias comuns, como toracotomia e correção de hérnia inguinal, envolvem retração tecidual prolongada e necessária, causando, muitas vezes DCPO. A DCPO por sua vez, se encaixa na classificação internacional de doenças (CID) como uma patologia (GIAMBERARDINO et al., 2018). Devido a relevância clínica desse tipo de doença, estudiosos desenvolveram um novo modelo de DCPO em animais, permitindo realizar mais pesquisas e desvendar os complexos mecanismos moleculares que levam à essa dor, bem como, elucidar novos tratamentos para tal (FLATTERS, 2008). Em um estudo em modelo animal, os autores mostraram que a cirurgia de IRPM causou hiperalgesia da pata ipsilateral a 50%, com duração de pelo menos 20 dias e a análise Western blotting e imunohistoquímica revelaram que a cirurgia de IRPM aumentou significativamente a expressão do TLR4 em células gliais no lado ipsilateral da medula espinal (CHEN et al., 2015).

## **2.5 Tratamento da dor crônica pós-operatória**

Estudos atuais revelam que ainda não há uma maneira definitiva de prevenir a ocorrência de DCPO, sendo que várias técnicas e medicamentos pré-operatórios, perioperatórios ou pós-operatórios com sucesso variável foram testados para reduzir os riscos (WYLDE et al., 2017). Terkawie colaboradores (2015) quiseram determinar se o uso da infusão peri-operatória de lidocaína estava associada à diminuição da DCPO após a mastectomia. Sendo assim, foi feita uma análise secundária de dados de 61 pacientes submetidos a mastectomia por câncer de mama e os pacientes foram randomizados para placebo (n=27) ou lidocaína por via venosa. A DCPO foi avaliada 6 meses após a cirurgia pela análise de regressão logística *Stepwise* e como resultado eles encontraram que, no total, 20% dos pacientes desenvolveram DCPO, sendo 30% no grupo placebo e 12% no grupo lidocaína. Em adição, os corticosteroides como a dexametasona, quando utilizados em associação com opioides, parecem ser eficazes na diminuição da DCPO (POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017). Já em relação a tratamentos não farmacológicos, a acupuntura não teve evidências significativas na diminuição da dor pós-operatória em uma cirurgia de ombro quando

comparada a fisioterapia convencional, e um outro estudo envolvendo prática de exercícios cinesioterapêuticos convencionais não demonstraram eficácia no alívio da DCPO em pacientes submetidos a cirurgia lombar (BRANDT; LOVICH-SAPOLA; SMITH, 2015; POGATZKI-ZAHN; SEGELCKE; SCHUG, 2017; WYLDE et al., 2017)

Um estudo revela que os opioides como a morfina fornecem analgesia rápida e eficaz para pacientes com dor moderada a grave (BRANDT; LOVICH-SAPOLA; SMITH, 2015), porém, diversos efeitos colaterais são observados como a reprovação regulatória e desenvolvimento de tolerância, abstinência e vício (LOUISE, 2019). Os autores do estudo acima citado, também revelaram que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) são elementos eficazes na analgesia da dor, porém, são comumente inadequados como o único agente analgésico, podendo ser um medicamento eficaz quando utilizado em conjunto com outros medicamentos (BRANDT; LOVICH-SAPOLA; SMITH, 2015). Contudo, os AINE's podem ter efeitos maléficos em pacientes com risco cardiovascular, o que limita seu uso para o tratamento da DCPO (HUNT et al., 2009). Wylde e colaboradores (2015), apontaram não haver uma redução na severidade da dor 12 meses após uma infiltração intraoperatória com anestésico local de 0,25% de bupivacaína juntamente com a técnica de bloqueio do nervo femoral e a anestesia espinal ou geral em uma cirurgia de artroplastia de joelho.

Mesmo com avanços na compreensão dos processos que levam à DCPO, o manejo e a prevenção da mesma permanecem inadequados, visto que, alguns medicamentos possuem efeitos colaterais como vício, tolerância e eficácia limitada. Levando em consideração esses achados, estudos crescentes na área da medicina chinesa vêm demonstrando bons resultados no tratamento da dor de uma maneira geral (WANG et al., 2018). A dose de 40 mg/kg de curcumina produziu efeito antinociceptivo que durou pelo menos 3 horas e o tratamento repetido com curcumina também facilitou a recuperação da dor pós-operatória desses animais (ZHU et al., 2014). Em adição, a artemisinina (ART) também exprime efeitos antinociceptivos em modelos experimentais animais através da sua administração via intraperitoneal (i.p) de ART após a indução de dor persistente por meio da injeção intraplantar (i.pl) de complexo adjuvante de Freund (CFA) (DE FAVERI FAVERO et al., 2014).

A medicina tradicional chinesa e seus componentes ativos têm vantagens exclusivas no tratamento da dor por um longo tempo mostrando uma boa eficácia, bem como, menos reações adversas (WANG et al., 2018). Com isso, a medicina

chinesa pode ser uma estratégia importante para a ampliação de recursos analgésicos eficazes e com pouco ou nenhum efeito adverso contra a DCPO, tendo como objetivo final a melhora da saúde e do bem-estar dos pacientes (CHEN et al., 2015; JENSEN ; KEHLET; WOOLF, 2006b; KRAYCHETE et al., 2016; WANG et al., 2018).

### 2.5.1 Artemisinina

A ART e seus derivados (arteméter, dihidroartemisinina e artesunato) são uma lactona sesquiterpênica e sua estrutura química (figura 6) é derivada da planta chinesa *Artemisia annua* L. sendo ela própria da família *Asteraceae* ou *Compositae* e produzida em muitos países (HUANG et al., 2016). A primeira alusão ao uso da ART foi datada em 168 a.C. onde na tumba da dinastia *Mawangdui Han*, em “Receitas para 52 tipos de doenças” foi encontrada. Posteriormente, a planta foi mencionada no “Livro de Bolso de Prescrições para Tratamento de Emergências” de Ge Hong para reduzir a febre (DE FAVERI FAVERO et al., 2014).

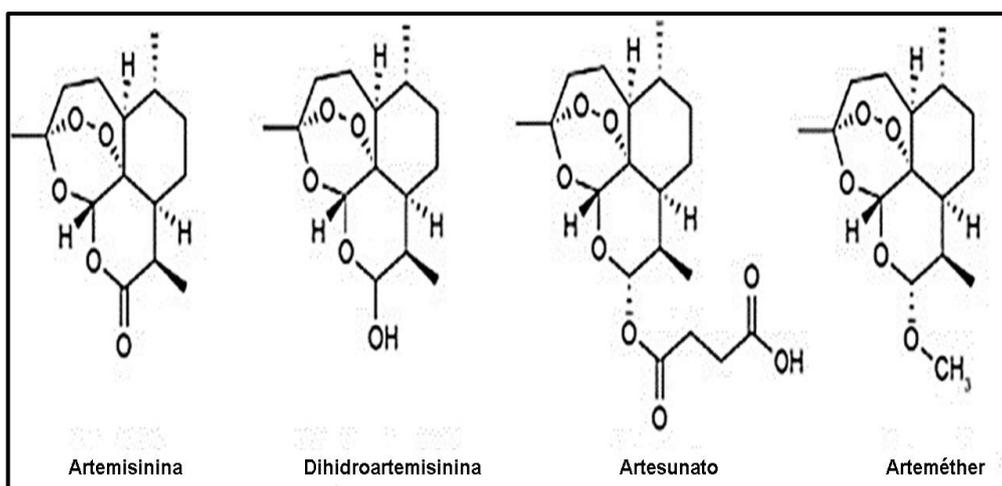


Figura 5- Estrutura química da Artemisinina e seus derivados.

Fonte: Adaptado de Tu e colaboradores, 2019.

Devido a crescente expansão da malária no mundo na década de 1960, principalmente no sudeste asiático, onde a malária criou resistência a drogas como cloriquina e quinolinas, iniciou-se uma busca incessante por tratamentos que fossem

capazes de combater de fato o *Plasmodium Falciparum*, um dos parasitas da classe *Plasmodium* responsáveis por causar a malária. Com isso, o governo chinês não mediu esforços para pesquisar a malária nessa época e então um projeto chamado projeto 523 foi desenvolvido para consolidação da pesquisa contra a malária a nível nacional (TU, 2011). Registros antigos já demonstravam que a ART era capaz de combater os sintomas causados pela malária, sendo assim, Tu e colaboradores (2011) realizaram uma revisão da literatura em registros antigos para identificar entre 2000 possíveis remédios oriundos de plantas medicinais algum tratamento para a malária. E dentre esses medicamentos a ART foi encontrada e testada (figura 7), sendo a princípio não muito promissora, porém, após algumas outras pesquisas, foi possível identificá-la como potencial recurso terapêutico antimalárico (FU, 2004; TU, 2011). Em 1972 o ingrediente ativo foi purificado e denominado *qinghaosu* (essência do *qinghao*) (FU, 2004; MESHNICK, 2002). Desde a sua descoberta, a ART tornou-se o fármaco antimalárico mais importante e eficaz, o que conferiu a Youyou Tu o prêmio Nobel de fisiologia e Medicina em 2015.

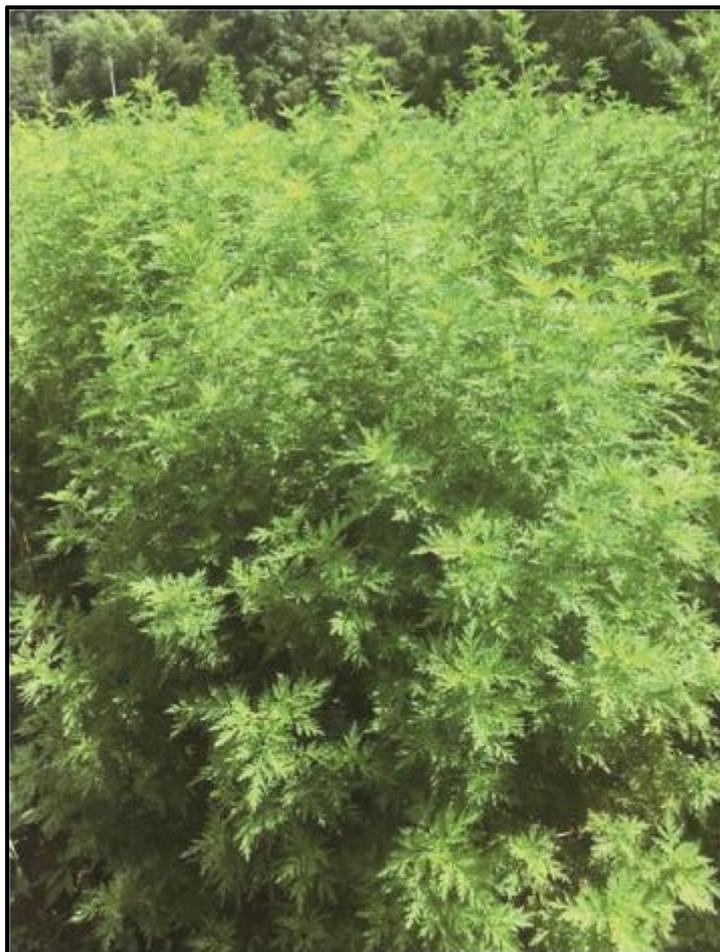


Figura 6- *Artemisia annua* L. no campo.  
Fonte: Tu e colaboradores, 2019.

Atualmente, estudos vem mostrando a ART como uma opção relevante para a terapêutica em diversas doenças além da malária. Outros estudos relataram vários efeitos biológicos da ART. Constatou-se que esta substância possui uma gama de propriedades, incluindo anti-úlceras (DA SILVA et al., 2002), antinociceptiva, com envolvimento do sistema opioide (DE FAVERI FAVERO et al., 2014), antifúngico (PINI et al., 2016), antibacteriana (TAJEHMIRI et al., 2014), anti-HIV (LUBBE et al., 2012) e ação anticancerosa (HUMPHREYS et al., 2016).

Em seu mecanismo clássico de ação ocorre a formação de radicais livres através da clivagem da ligação endoperoxídica pelo ferro heme na sua estrutura para executar a ação antimalárica, bem como, para executar efeitos citotóxicos contra células cancerosas (JENSEN; KEHLET; WOOLF, 2006b; KRAYCHETE et al., 2016; GAO; TSAN, 2004). Pesquisadores sugeriram que esse composto pode ser útil como uma alternativa para o tratamento de muitas doenças inflamatórias (FERREIRA;

KEISER; PEADEN, 2011; SPRENGER et al., 2015). Wang e colaboradores (2006b) relataram que a ART inibe a ativação dos produtos genéticos NFκB, regulados por NFκB e via MAPK que estão associados a efeitos imunossupressores. Outras teorias sobre os efeitos incluem a ativação da p53 e o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) como efeitos citotóxicos (CHATURVEDI et al., 2010). Uma outra análise envolvendo a aplicação de artesunato, um derivado da planta *Artemisia annua* L. em ratos com pancreatite aguda grave, demonstrou que o LPS aumentou significativamente as expressões de RNA mensageiro de TLR4 e NFκB p65, enquanto que o artesunato pôde diminuí-las significativamente (CEN et al., 2016). Além disso, Lina Lai e colaboradores (2015) demonstraram que a administração de ART diminuiu a inflamação em ratos, e revela ainda, que o efeito antiinflamatório da droga pode ser devido à inibição da via de sinalização de TLR4/MyD88/NFκB em células imunes do plasma sanguíneo, no entanto, a mesma ressalta a necessidade de mais pesquisas para uma maior exploração do papel detalhado de TLR4/MyD88/NFκB frente o tratamento através da ART.

Apesar de ser conhecida a atividade da ART e seus derivados contra afecções como o câncer, bactérias, inflamação, fungos, alergia e parasitas, ela também demonstrou, atualmente, ter papel na diminuição da dor neuropática através da inibição de astrócitos e da expressão do receptor purinérgico 4 de P2X (P2X4) associada a ART (HO et al., 2014; LAI; SASAKI; SINGH, 2013; YING et al., 2017; ZHAO et al., 2017). Apesar de sua eficácia, seu uso ainda é limitado devido à baixa biodisponibilidade. A este respeito, a ART tem baixa solubilidade em água, resultando em absorção fraca e errática após a administração oral. Além disso, a ART tem meia vida curta e metabolismo de primeira passagem elevado, sendo necessária altas doses diárias (BILIA et al., 2017a; LAI; SASAKI; SINGH, 2013; WHITE, 1994). Muito embora sua meia vida curta e rápida degradação pelo fígado seja uma limitação, já é conhecida a eficácia da ART em diversas patologias e afecções, com isso, há uma necessidade urgente de desenvolver novas formulações. Portanto, o uso de sistemas de liberação controlada de drogas em nanocápsulas é uma alternativa atraente para superar esses problemas, aumentar sua biodisponibilidade, seletividade e aplicabilidade terapêutica, de modo a intervir na redução da DCPO. Visto que cada vez mais indivíduos são expostos a cirurgias no mundo todo, é necessária a exploração de pesquisas que intervenham de maneira eficiente contra esse sintoma que interfere diretamente na qualidade de vida dos indivíduos.

### 2.5.2 Artemisinina e nanotecnologia

O tratamento convencional, muitas vezes causa acúmulo de produtos do fármaco no sangue e esse acúmulo pode ser tóxico para o indivíduo, resultando na ocorrência de eventos adversos, assim como a ineficiência terapêutica do mesmo. Sendo assim, a nanotecnologia tem se tornado cada vez mais relevante na pesquisa médica, pois, pode oferecer vantagens significativas tanto em eficácia quanto em segurança, quando comparadas com as modalidades terapêuticas e diagnósticas atuais (FANG et al., 2018; TAVARES et al., 2016). Ela abrange, portanto, o estudo de material particulado, natural ou sintético, com distribuição de tamanhos numéricos e uma das suas dimensões entre 1 e 100 nm, apresentando propriedades únicas que permitem novas aplicações, sendo intitulada como desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos nanoestruturados (NDD's). Entretanto, o conceito pode se ampliar para partículas menores que 1000 nm, as quais atingem um sistema biológico e exibem propriedades diferentes quando comparado ao mesmo material em escala não-nanométrica. Consoante à composição, os NDD's são tidos como carregadores poliméricos, lipídicos e inorgânicos e podem assumir estruturas como matriz, vesicular, auto-agregada ou emulsões (CHARLIE-SILVA; FRACETO; DE MELO, 2018).

As nanocápsulas poliméricas definidas como partículas coloidais submicrônicas, geralmente são compostas por fármaco e polímero. Elas podem promover a proteção de medicamentos e também evitar a eliminação pelo corpo, resultando em uma meia-vida mais longa (FANG et al., 2018; TAVARES et al., 2016). Ademais, podem também reduzir a distribuição de medicamentos através de tecidos saudáveis, promover liberação controlada, reduzir efeitos adversos, aumentar a eficiência terapêutica e a segurança, superar barreiras fisiológicas e igualmente evitar bombas de efluxo (FANG et al., 2018; TAVARES et al., 2016). A poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), um tipo de nanopartícula, define-se como um polímero biodegradável, biocompatível, não tóxico. Se revela promissor no desenvolvimento de nanocápsulas, além de ser multifuncional ao ser possível a combinação com outros polímeros, a fim de se obter copolímeros com diferentes propriedades químicas (CHARLIE-SILVA; FRACETO; DE MELO, 2018).

Essa versatilidade é vantajosa no controle de parâmetros com a finalidade de obter uma melhor via de administração de drogas com muitas propriedades diferentes. Com isso, a formulação da nanocápsula pode ser dividida em dois segmentos, onde a primeira introduz uma carga útil que exerce uma função de aplicação específica, e a segunda propicia nanocápsulas carregadas em um meio ótimo, o qual interage com o ambiente diminuindo interações não específicas e aumentando as específicas (CHARLIE-SILVA; FRACETO; DE MELO, 2018; FANG et al., 2018; TAVARES et al., 2016). Um trabalho envolvendo a mucoadesão das nanopartículas de curcumina e as células do câncer colorretal, verificou que as nanopartículas demonstraram um efeito anticancerígeno em comparação com a curcumina livre (CHUAH et al., 2014). Na literatura, vários estudos investigaram o uso de diferentes tipos de NDD's carregados com ART ou seus derivados e observaram que, frequentemente houve uma melhora na atividade farmacológica (ESTANQUEIRO et al., 2015; KAPADIA et al., 2015; P. CHATTOPADHYAY et al., 2017; RAMAZANI et al., 2018; WANG et al., 2016). Sendo assim, o presente estudo teve o objetivo de investigar o efeito da ART em sua formulação livre e nanocápsula sobre a DCPO induzida pelo modelo de IRPM em camundongos, avaliando o envolvimento da micróglia espinal.

### 3 OBJETIVOS

Segue abaixo os objetivos do presente estudo.

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito de nanocápsulas de polyε-caprolactona contendo Artemisinina e sua forma livre, além da participação do receptor *Toll like 4* e de células da glia espinais em um modelo de dor crônica pós-operatória em camundongos.

#### 3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Avaliar o efeito da ART livre e ART nanocápsula sobre o limiar nociceptivo de camundongos submetidos a cirurgia de IRPM;
- b) Verificar a participação de astrócitos e micróglia espinal durante o desenvolvimento da dor pós-operatória induzida pela cirurgia de IRPM;
- c) Verificar a participação do TLR4 espinal durante o desenvolvimento da dor pós-operatória induzida pela cirurgia de IRPM;
- d) Verificar o curso do tempo da dor pós-operatória causada pela cirurgia de IRPM em camundongos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado e conduzido de acordo com a Comissão de ética no uso de animais (CEUA), da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL- MG) Brasil, sob o protocolo n°: 33/2018.

### 4.1 Coleta de material vegetal

A variedade de *Artemisia annua* CPQBA-UNICAMP foi cultivada em Paulínia, Estado de São Paulo, Brasil. A planta foi cultivada em casa de vegetação com circulação de ar. Após a colheita, as folhas foram separadas manualmente dos caules e galhos grossos. A matéria prima final consistia apenas de folhas, que eram moídas em pó (MAGALHÃES, 1996).

### 4.2 Extração de artemisinina

A ART foi isolada de *Artemisia annua* (1 kg) por extração com etanol por agitação mecânica (3x de 1½ h) à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato foi filtrado, eliminando o solvente sob vácuo. O extrato bruto foi limpo filtrando-se o extrato etanólico bruto (100g dissolvido em etanol 500 ml) sobre 10% de carbono ativo (Carbomafra®). Esta mistura foi agitada à temperatura ambiente durante meia hora, filtrada adicionalmente e evaporada sob vácuo a 40°C (RODRIGUES et al., 2006). O extrato enriquecido com artemisinina foi purificado por cromatografia em coluna sobre sílica gel 60 (70-230 mesh Merck®) usando gradientes de acetato de etilo-hexano. A separação foi monitorizada por cromatografia em camada fina (CCF) com artemisinina padrão para comparação (DA SILVA et al., 2002).

### 4.3 Purificação e quantificação de ART por HPLC-RI

A ART foi quantificada de acordo com o protocolo descrito por Celeghinin (2009) usando um padrão de 98% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*) em uma faixa de concentração de (50-1250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por análise de HPLC-IR com um sistema modular Waters composto por uma bomba Waters 515, um forno de coluna, um detector de índice de refração Waters 2414 e uma coluna LC-CN (4,6  $\times$  250 mm, tamanho de partícula de Luna *Phenomenex, Macclesfield, UK*). As separações foram realizadas no modo isocrático, usando metanol: água (60:40v/v) mL/min a uma vazão de 1 mL/min com volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ . O detector e a temperatura da coluna foram de 35 °C. A ART foi quantificada por uma curva analítica validada, com três repetições, com tempo de retenção de 7,0 min. Um gráfico correlacionando a área sob a curva com a respectiva concentração foi plotado e analisado por regressão linear usando o *software Empower*.

### 4.4 Preparação de nanocápsulas de PCL contendo ART

As nanocápsulas de PCL (NC's) foram obtidas de acordo com o método de deposição de polímeros interfaciais inicialmente descrito por Fessi et al. e ligeiramente modificado por de Melo e colaboradores (2018). Utiliza-se 100 mg de polímero, triglicérides cáprico/caprílico, 40 mg de monoestearato de sorbitano e 20 mg de ART foram dissolvidos em acetona. A fase orgânica foi vertida para a fase aquosa composta por 60 mg de polissorbato 80 e água purificada, sob agitação magnética. A emulsão foi agitada durante 15 min para estabilização e o solvente orgânico foi removido usando evaporador rotativo. A concentração de ART foi de 2 mg/mL<sup>-1</sup> na suspensão final (FESSI et al., 1989).

A quantidade de ART encapsulada em PCL foi avaliada utilizando o método de ultrafiltração/centrifugação (de (MELO et al., 2017). Dispositivos de ultrafiltração (*Amicon 10 kDa, Millipore*) permitiram a quantificação da fração não-encapsulada do fármaco. A eficiência de encapsulação (EE) foi então determinada pela diferença entre a quantidade total do fármaco e a fração apresentada no ultrafiltrado quantificado por

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a equação da curva analítica previamente validada acima mencionada.

#### **4.5 Caracterização e estabilidade da nanocápsula**

Os parâmetros coloidais de tamanho de nanocápsulas e índice de polidispersão (PDI) foram verificados usando espectroscopia de correlação de fótons e potencial zeta por microeletroforese. As suspensões foram diluídas 100 vezes e medidas usando um analisador de partículas *Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern, UK)* com um ângulo fixo de 90 graus, a 25°C. Os resultados foram expressos como a média aritmética das determinações finalizadas (CHARLIE-SILVA; FRACETO; DE MELO, 2018; DE MELO et al., 2010). A concentração de nanocápsulas também foi avaliada usando a análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). Para realizar essas medidas, as suspensões foram diluídas 5000 vezes e analisadas em triplicata em um instrumento *NanoSight LM10 (Malvern, Reino Unido)* (de Melo et al., 2016; Oliveira et al., 2018). A morfologia da superfície das nanocápsulas foi analisada utilizando microscopia de força atômica (AFM), onde as suspensões diluídas (5000 vezes) foram depositadas em placas de silício e analisadas em modo sem contato com o microscópio *Easy Scan 2 BT02217 (Nanosurf, Suíça)* equipado com *cantilevers TapAl-G* taxa de trabalho de 100 Hz (DE OLIVEIRA et al., 2018). As estabilidades das nanocápsulas foram avaliadas por meio de medidas de tamanho médio, PDI, potencial zeta e concentração de partículas no dia da preparação e intervalos de 15, 30 e 60 dias de armazenamento (MELO et al., 2014).

#### **4.6 Animais de experimentação**

Para a realização dos experimentos utilizamos camundongos machos *Swiss*, pesando entre 30 e 35 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). Os animais foram sob condições padrões de temperatura (22,1 °C), ciclo claro/escuro (12h/12 h) e umidade de 65%, com livre acesso a ração e água até

o início de cada experimento. 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 IASP (ZIMMERMANN, 1983) e as normas que regulamentaram aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela CEUA da UNIFAL-MG.

#### **4.7 Modelo de dor pós-operatória – IRPM**

Inicialmente os animais foram anestesiados com injeção intramuscular (i.m) de uma solução composta por quetamina e xilazina, nas doses de 60 mg/kg e 8 mg/kg, respectivamente. O volume utilizado foi de 10 µL a cada 10 gramas de peso do animal. Após confirmada a sedação, o animal foi colocado em decúbito dorsal e a região interna da perna traseira direita foi tricotomizada e esterilizada com iodo. Os materiais cirúrgicos foram esterilizados, bem como, os micro retratores e o forro colocado na mesa cirúrgica (tecido TNT na cor branca). Para induzir a DCPO foi utilizado o modelo de incisão e retração da pele e músculo (do inglês *SMIR-skin muscular incision and retraction*) com adaptações para camundongos (FLATTERS, 2008). Sendo assim, uma incisão vertical de 1 cm de comprimento foi feita na região medial da coxa direita do animal. Além disso, uma outra incisão vertical de 7 mm de comprimento foi feita na camada muscular superficial (músculo grácil) da coxa medial. A região superficial do músculo foi afastada através da inserção do micro retrator (figuras 8a e 8b) no local da incisão, onde então os músculos superficiais foram retraídos em 10 mm, revelando a fáscia dos músculos adutores subjacentes com retração pelo período de 1 hora (figura 9).

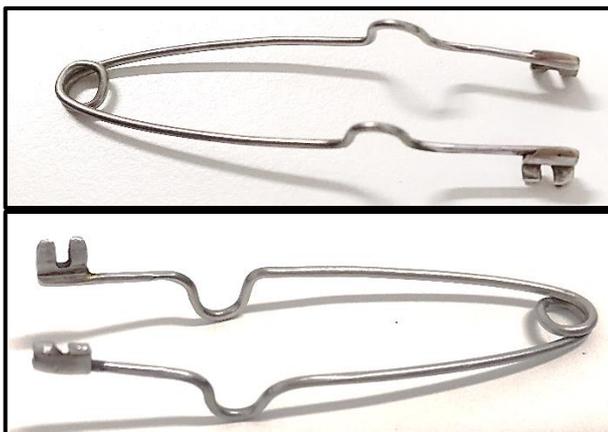


Figura 7- Micro retrator utilizado para retração da pele e músculo.  
Fonte: Da autora.



Figura 8- Cirurgia de incisão e retração da pele e músculo.  
Fonte: Da autora.  
Nota: Fâscia muscular adutora em evidência.

Durante o período de retração os animais foram monitorados pelo experimentador e quando necessário foi fornecida anestesia adicional utilizando uma subdose da mistura anestésica de quetamina e xilazina (1/3 da dose). Além disso,

durante esse período os animais foram mantidos aquecidos em cima de uma placa *Heatpad* (*Insight* equipamentos, pesquisa e ensino), com o intuito de minimizar o risco de hipotermia e consequente morte dos animais durante a anestesia e período operatório. Para evitar a desidratação do local cirúrgico, foi aplicada solução de salina estéril (0,9%), a qual também foi gotejada nos olhos dos animais para evitar desidratação da córnea. Após o período de retração, os tecidos foram suturados com fios de sutura de seda 4,0 (*TECHNEW*). Também foi aplicada via i.p uma reposição hipovolêmica de solução salina estéril (0,9%; 0,5 a 1 mL por animal, de acordo com as recomendações do CEUA local). Após a recuperação da anestesia, todos os animais foram colocados em suas respectivas caixas e mantidos aquecidos sob a luz de uma lâmpada incandescente mantida a 40 cm de distância de cada caixa.

#### 4.8 Drogas utilizadas

Para o estudo foram utilizadas as seguintes drogas e substâncias:

- a) **Minociclina (SIGMA®, EUA):** inibidor seletivo de micróglia, diluída em solução salina estéril (0,9%) nas doses de 240 ng, 480 ng e 1000 ng;
- b) **Fluorocitrato (INVIVOGEN®, EUA):** inibidor de astrócitos, diluído em solução salina estéril (0,9%) nas doses de 300 pmol, 600 pmol e 1200 pmol;
- c) **LPS-RS (INVIVOGEN®, EUA):** antagonista do receptor TLR4, diluído em solução salina estéril (0,9%) nas doses de 1 µg e 2 µg;
- d) **Artemisinina livre:** diluída em solução salina estéril (0,9%) nas doses de 250 ng, 500 ng e 1000 ng;
- e) **Artemisinina nanocápsula:** diluída em solução salina estéril (0,9%), nas doses de 250 ng, 500 ng e 1000 ng;

Para os grupos controle foram administrados os seguintes veículos: salina estéril (0,9%) e veículo nanocápsula.

#### 4.9 Via de administração

Todas as drogas foram administradas por via intratecal (i.t). Previamente à administração das drogas, o experimentador realizou um treinamento dessa via de administração por meio da injeção de lidocaína (2%) (DENSPLY PHARMACEUTICAL®, Japão), a qual confirma a administração correta quando os membros posteriores dos animais permanecem temporariamente paralisados. Para a injeção, primeiramente os animais foram tricotomizados e anestesiados com isoflurano 2% (CRISTÁLIA®, Brasil) e O<sub>2</sub> (2 L/min), por meio de um vaporizador calibrado. Logo em seguida, os animais foram posicionados adequadamente afim de facilitar o reconhecimento dos espaços intervertebrais, por meio de palpação utilizando o dedo indicador do experimentador. Um volume de 5 µL de cada droga ou veículo foi injetado no espaço subaracnóide entre a quinta e a sexta vértebra lombar, após uma verificação de um reflexo de retirada de cauda do animal (*Flinch*) no momento em que a agulha (13 x 0,3 mm) de uma seringa hipodérmica (BD®, Brasil) é inserida nesse local (HYLDEN; WILCOX, 1980).

#### **4.10 Avaliação do limiar nociceptivo**

De acordo com o método de Chaplan e colaboradores (1994), para testar o limiar nociceptivo dos animais, inicialmente, eles foram colocados em caixas individuais de vidro sobre uma grade de metal que dá acesso a pata e mantidos por no mínimo 30 minutos para a aclimação ao ambiente para que então fosse dado início ao experimento. A avaliação do limiar de retirada da pata foi feita por meio do aparato von Frey filamentos (ANESTHESIO®) (figura 10a,10b e 10c). Os filamentos utilizados foram os seguintes: 0,16 g, 0,4 g; 0,6 g, 1,4 g e 2 g, onde os mesmos foram aplicados de forma perpendicular à superfície plantar da pata traseira do animal por alguns segundos. Foi considerada uma resposta positiva a retirada da pata, seguida de lambida da mesma e/ou retirada da pata”. Durante o teste, foram realizadas 3 medidas do limiar nociceptivo para cada animal, separadas por intervalos de 3 minutos entre cada uma das medidas e cada uma das estimulações com duração de 3 segundos cada. A média das medidas foi descrita como o limiar mecânico de retirada de pata em gramas (g).



Figura 9- aparato de Von Frey.

Fonte: Da autora.

Nota: a) caixas de vidro e suporte de metal; b) grade de metal vazada para possibilitar a avaliação; c) filamentos em diferentes gramaturas do aparelho de von Frey.

#### 4.11 Delineamento experimental

Inicialmente, foi realizada a mensuração do limiar nociceptivo antes da cirurgia (MB), logo em seguida, os animais foram submetidos a cirurgia de IRPM e no 1º, 3º, 5º, 7º, 10º, 14º, 17º, 21º, 24º e 28º dia após a cirurgia foram realizadas novas medidas do limiar nociceptivo, como demonstrado pela figura 11. Para esse experimento, os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: a)

grupo IRPM, composto por animais submetidos a cirurgia IRPM; grupo naive, composto por animais sem nenhum tipo de intervenção ou aplicação de fármacos.



Figura 10- Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata (g), em animais naive e operados.

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo.

Posteriormente, com o intuito de avaliar o efeito antinociceptivo da ART, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos, contendo 6 animais em cada grupo, sendo eles: a) grupo IRPM composto por animais submetidos a IRPM; b) grupo IRPM + vec composto por animais submetidos a IRPM que receberam veículo; c) grupo IRPM + ART livre 1000 ng composto por animais submetidos a IRPM e aplicação de ART livre na dose de 1000 ng; d) grupo IRPM + ART livre 500 ng composto por animais submetidos a IRPM e ART livre na dose de 500 ng; e) grupo IRPM + ART livre 250 ng composto por animais submetidos a IRPM e ART livre na dose de 250 ng; f) grupo naive composto por animais sem nenhum tipo de intervenção cirúrgica ou aplicação de fármacos; g) grupo naive + ART livre 1000 ng composto por animais que foram tratados com injeção i.t de ART livre na dose de 1000 ng ;h) grupo naive + vec composto por animais que foram tratados com veículo. Para avaliar o efeito da formulação da ART em nanocápsula, grupos similares aos grupos previamente citados foram utilizados, inclusive com a mesma dose. Além disso, também foram utilizados grupos controle para avaliar o efeito do veículo (nanocápsula sem a ART).

Nos grupos compostos por animais naive e operados em que o efeito da ART livre e nanocápsula foi avaliada, inicialmente foi realizada uma MB do limiar nociceptivo e logo em seguida à administração das drogas, tanto no 3º ou 28º dia de pós-operatório (P.O), uma nova medida do limiar nociceptivo foi realizada nos intervalos de 1, 3, 5, 7, 24 e 48 horas, de acordo com a figura 12.



- **Artemisinina livre: 1000 ng; 500 ng e 250 ng;**
- **Artemisinina nanocápsula: 1000 ng; 500 ng e 250 ng;**
- **Veículos: salina estéril; nanocápsula**

Figura 11- Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata (g), após a injeção intratecal de ART livre, ART nanocápsula ou veículos. Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; injeção i.t: injeção intratecal; ART: artemisinina; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; P.O: pós-operatório; h: horas.

Além da avaliação do efeito da ART, o presente estudo também investigou o envolvimento espinal de astrócitos e micróglia na DCPO. Para tal, foram utilizados os seguintes grupos (n=6): a) grupo IRPM, composto por animais submetidos a IRPM; b) grupo IRPM + vec composto por animais submetidos a IRPM e aplicação de veículo; c) grupo IRPM + minociclina 240 ng composto por animais submetidos a IRPM e aplicação de minociclina na dose de 240ng; d) grupo IRPM + minociclina 480 ng composto por animais submetidos a IRPM e aplicação de minociclina na dose de 480ng; e) grupo IRPM + minociclina 1000 ng composto por animais submetidos a IRPM e aplicação de minociclina na dose de 1000ng; f) grupo naive composto por animais sem nenhum tipo de intervenção ou aplicação de fármacos; e g) grupo naive + vec composto por animais tratados com aplicação de veículo; h) grupo naive +

minociclina 1000 ng composto por animais tratados com aplicação de minociclina na dose de 1000 ng. Grupos similares (n=6) foram divididos aleatoriamente e realizado o pré-tratamento com o fluorocitrato nas doses 300, 600 e 1200 pmol ou o seu veículo.

Para investigar a participação do TLR4 na DCPO também utilizamos grupos similares aos descritos anteriormente (n=6) que receberam uma pré injeção de LPS-RS, um antagonista do TLR4, nas doses de 1 e 2 µg ou somente o seu veículo. O protocolo de avaliação do limiar nociceptivo foi similar ao protocolo utilizado para a avaliação das células da glia, como mostrado na figura 13.

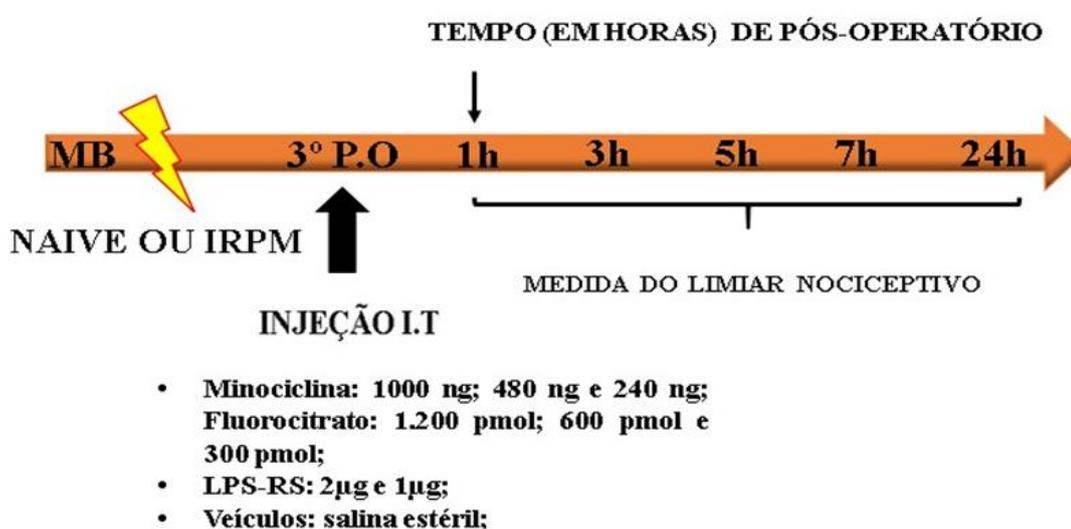


Figura 12- Esquema com a periodicidade da mensuração do limiar nociceptivo de retirada da pata (g), após a injeção intratecal de minociclina, fluorocitrato, LPS-RS ou veículo.

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; injeção i.t: injeção intratecal; LPS-RS: Lipopolissacarídeo de *Rhodobacter Sphaeroides*; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; P.O: pós-operatório.

#### 4.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados de acordo com a média  $\pm$  E.P.M. Para o tratamento estatístico dos dados comportamentais, foi utilizada a análise de variância de *Two-Way* ANOVA. As análises foram seguidas pelo do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas e foram considerados estatisticamente significativos os valores de  $p < 0,05$ . As análises estatísticas e elaboração de figuras foram realizadas utilizando o *software Graph Pad Prism 5.0*.

## 5 RESULTADOS

Segue abaixo os resultados obtidos.

### 5.1 Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após a cirurgia de IRPM

Inicialmente, foi realizado um estudo para a investigar o efeito da cirurgia de IRPM sobre o limiar nociceptivo dos animais. Assim, podemos verificar pelo gráfico 1 que ocorreu uma redução significativa ( $p < 0,001$  para todos os dias avaliados e  $p < 0,01$  para o 7º dia) do limiar nociceptivo dos animais submetidos a cirurgia de IRPM do 1º ao 28º dia de P.O quando comparado ao grupo naive.

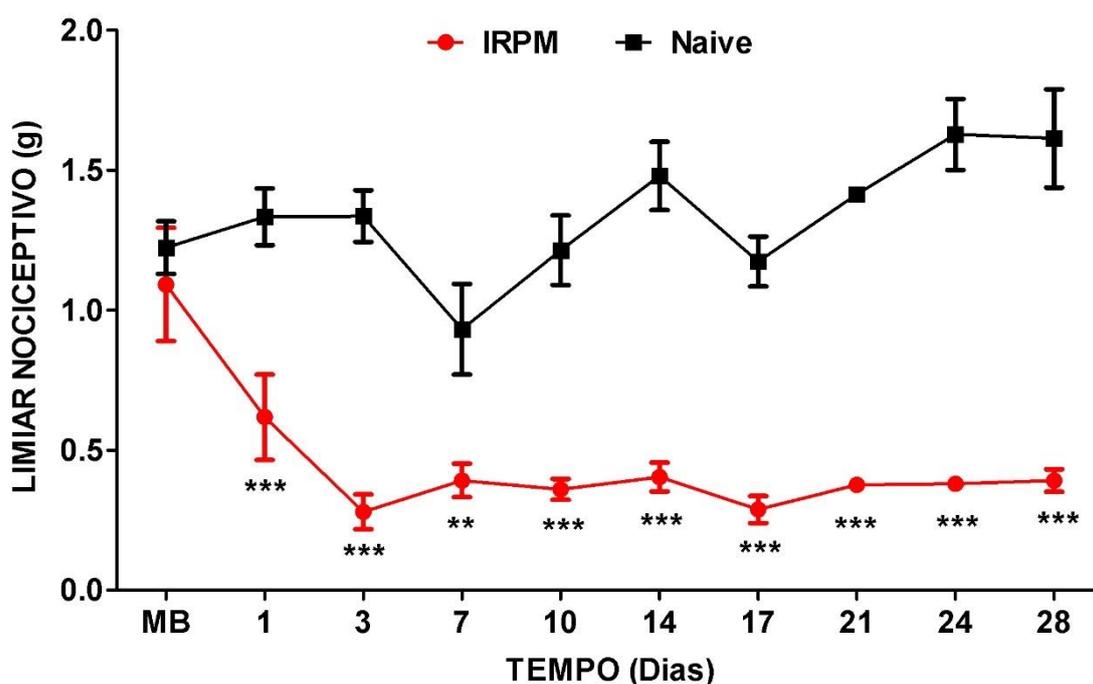


Gráfico 1- Avaliação do limiar nociceptivo mecânico após a cirurgia de IRPM. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni; \*\* indica significância estatística ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive.

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; P.O: pós-operatório.

## 5.2 Avaliação do efeito da ART livre e em nanocápsula sobre a hiperalgisia induzida pela cirurgia de IRPM

Após verificado que o modelo de IRPM promoveu nocicepção, nós investigamos o possível efeito antinociceptivo da ART sobre essa resposta. Para essa avaliação foram considerados o 3<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia de P.O, baseado em uma fase inicial e em uma fase tardia da DCPO. Assim, a ART livre ou veículo foram administradas i.t. em diferentes doses. Como pode ser observado no gráfico 2, houve uma antinocicepção (diminuição da hiperalgisia) no 3<sup>o</sup> dia de P.O após a administração de ART livre na dose de 1000 ng na 1<sup>a</sup> hora ( $p < 0,001$ ), e na dose de 500 ng também na 1<sup>a</sup> hora ( $p < 0,01$ ), o que não pôde ser observado na dose de 250 ng, quando comparados com o grupo IRPM. Em adição, houve diferença estatística em todos os grupos tratados em relação ao grupo naive ( $p < 0,001$ ) em todas as horas avaliadas.

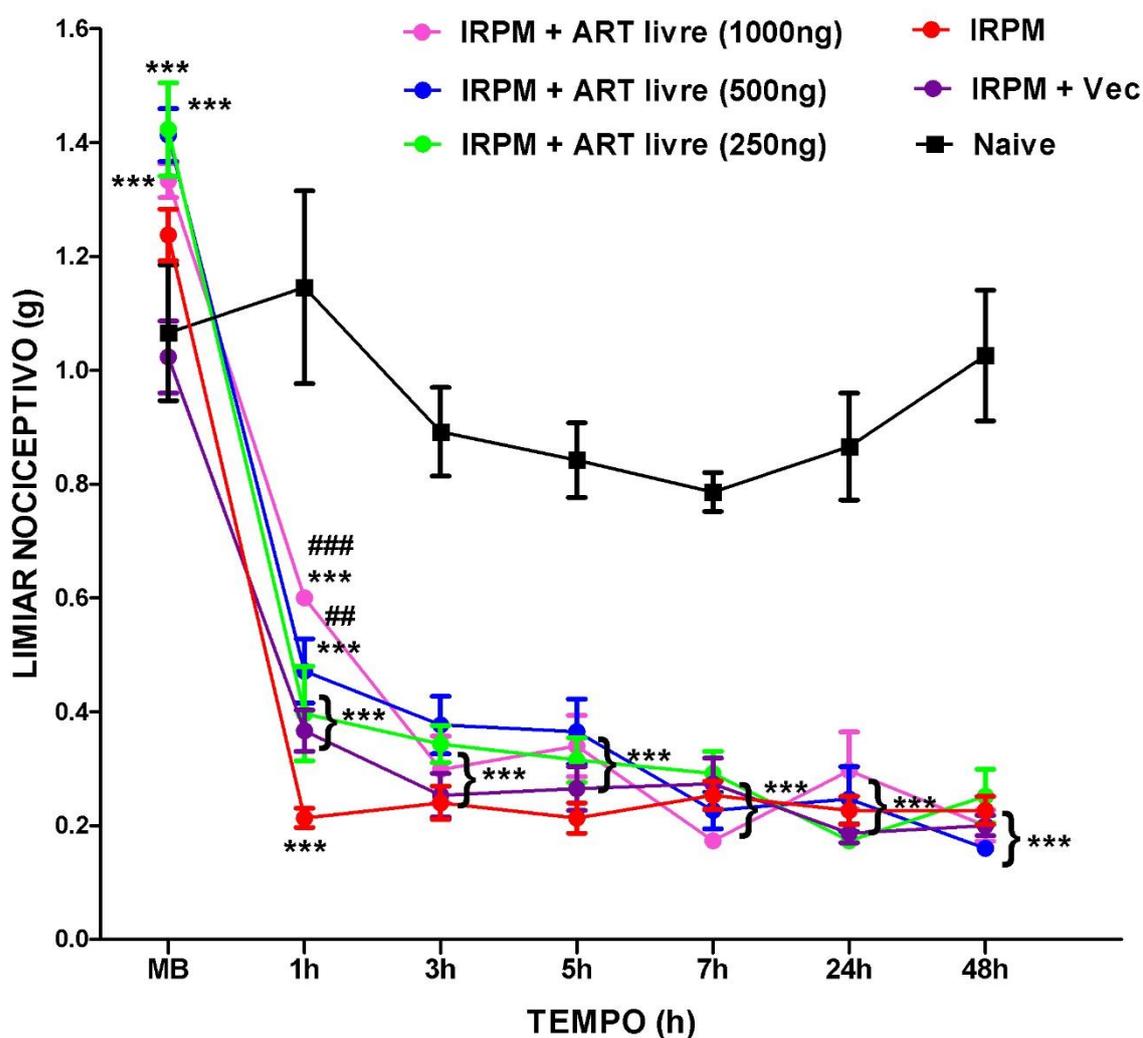


Gráfico 2- Investigação da eficácia da ART livre frente a dor pós-operatória no 3º dia de P.O. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo Naive. ## indica significância estatística ( $p < 0,01$ ) e ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo IRPM; Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; ART: artemisinina; Vec: veículo; P.O: pós-operatório.

Quando avaliada no 28º dia de P.O, podemos verificar através do gráfico 3 que nenhuma dose da ART livre alterou a nocicepção induzida pela cirurgia de IRPM ( $p > 0,05$ ) em nenhuma das doses propostas. Em contrapartida, houve diferença estatística em todos os grupos tratados em relação ao grupo Naive ( $p < 0,001$ ) em todas as horas avaliadas.

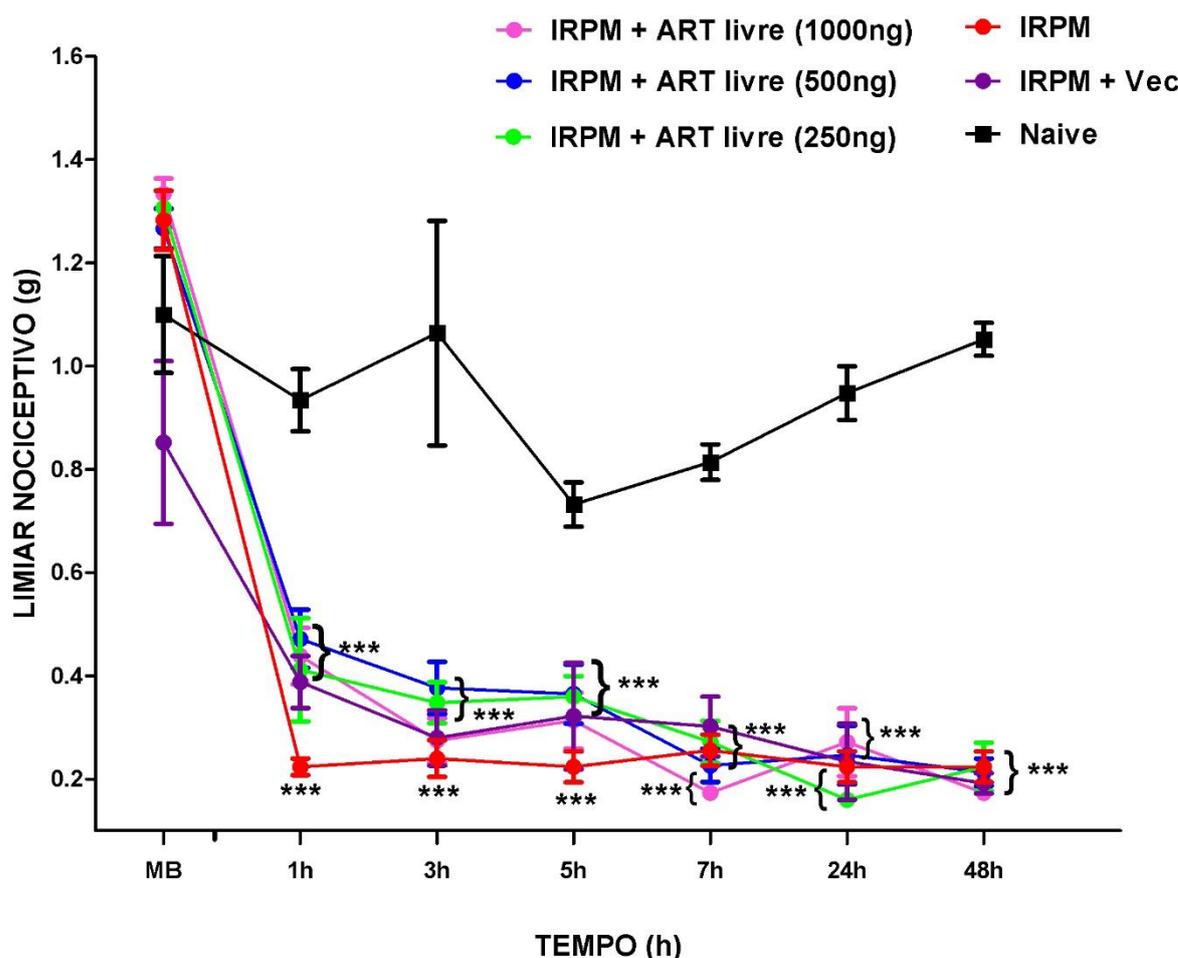


Gráfico 3- Investigação da eficácia da ART livre frente a dor pós-operatória no 28º dia de P.O. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive.

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; ART: artemisinina; Vec: veículo; P.O: pós-operatório.

Já a nanocápsula de ART promoveu uma antinocicepção após 3 dias da cirurgia de IRPM da 1ª hora até a 7ª hora ( $p < 0,001$ ) posterior a administração na dose de 1000 ng (Gráfico 4). Além disso, a nanocápsula de ART nas doses de 500 e 250 ng também promoveu redução da hiperalgesia da 1ª hora até a 5ª hora ( $p < 0,001$ ) quando comparado com o grupo IRPM. Em relação aos grupos tratados, houve diferença estatística em todos em relação ao grupo naive ( $p < 0,001$ ) 7ª e 24ª hora e os grupos IRPM e IRPM + vec a diferença estatística foi verificada em todas as horas avaliadas.

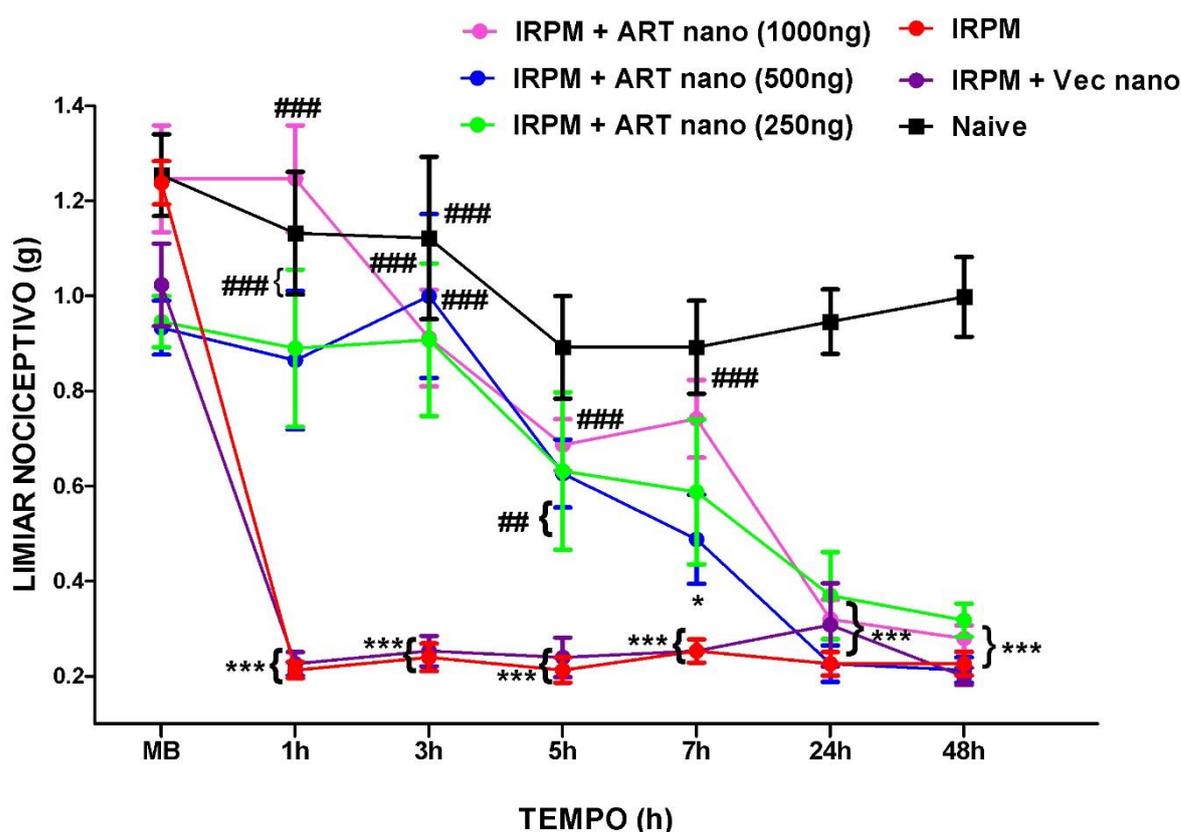


Gráfico 4- Investigação da eficácia da ART nano frente a dor pós-operatória no 3º dia de P.O. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naíve. # indica significância estatística ( $p < 0,05$ ) e ## indica significância estatística ( $p < 0,01$ ) e ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo IRPM;

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; ART: artemisinina; ART nano: artemisinina nanopartícula; Vec: veículo; P.O: pós-operatório.

Quando avaliado o efeito da ART nanocápsula no 28º dia de P.O, verifica-se que a dose de 1000 ng promoveu efeito antinociceptivo (redução da hiperalgisia mecânica) após cirurgia de IRPM na 1ª hora ( $p < 0,001$ ) até a 5ª hora ( $p < 0,05$ ). Esse efeito também foi encontrado após a 1ª hora de administração da nanocápsula de ART na dose de 500 ng ( $p < 0,001$ ) e na dose de 250 ng ( $p < 0,001$ ) houve antinocicepção na 1ª hora, oscilando negativamente na 3ª hora e voltando a produzir efeitos de redução da hiperalgisia na 5ª hora ( $p < 0,001$ ). Os grupos tratados com ART nanocápsula diferiram estatisticamente do grupo naíve na 5ª hora para a dose de 250 ng ( $p < 0,05$ ), na 7ª ( $p < 0,001$ ) para as doses de 1000 ng e 500 ng e  $p < 0,05$  para a dose

de 250 ng, 24<sup>a</sup> ( $p < 0,001$ ) e 48<sup>a</sup> horas ( $p < 0,001$ ). Já o grupo tratado com veículo e o grupo IRPM mostrou diferença da 1<sup>a</sup> até a 24<sup>a</sup> hora ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ) (Gráfico 5).

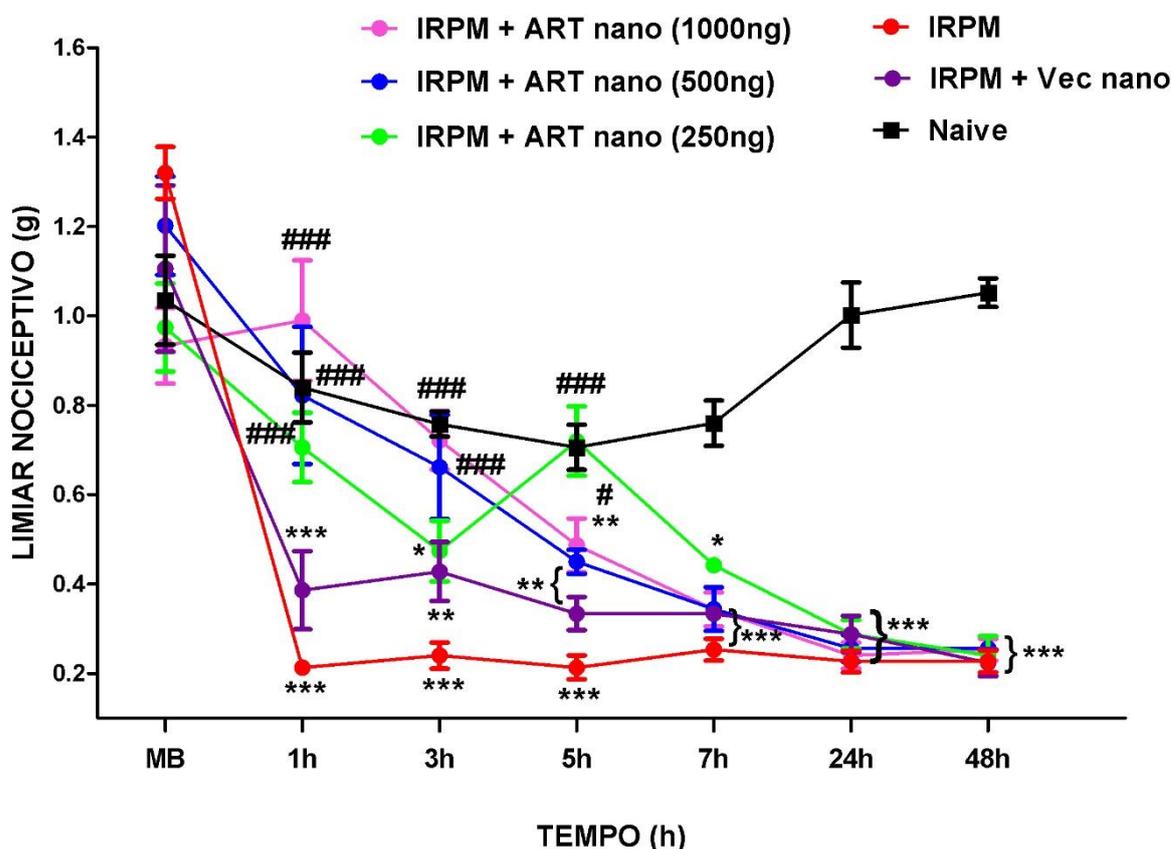


Gráfico 5- Investigação da eficácia da ART nano frente a dor pós-operatória no 28<sup>o</sup> dia de P.O. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \* indica significância estatística ( $p < 0,05$ ), \*\* indica significância estatística ( $p < 0,01$ ); e \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive. ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo IRPM;

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; ART: artemisinina; ART nano: artemisinina nanopartícula; Vec nano: veículo nanopartícula; P.O: pós-operatório.

### 5.3 Avaliação da participação das células da glia espinais na hiperalgesia induzida pela cirurgia de IRPM

O próximo passo do estudo foi investigar o possível envolvimento de micróglia e astrócitos na dor pós-operatória induzida pela cirurgia de IRPM. Assim, no gráfico 6, podemos observar uma antinocicepção após a administração i.t. de minociclina, um inibidor microglial, na dose de 240 ng na 5<sup>a</sup> hora ( $p < 0,05$ ), na dose de 480 ng esse

efeito pode ser observado da 3<sup>a</sup> até a 5<sup>a</sup> hora ( $p < 0,05$ ) e na dose de 1000 ng observamos uma antinocicepção da 3<sup>a</sup> ( $p < 0,01$ ) a 7<sup>a</sup> hora ( $p < 0,001$ ) quando comparadas ao grupo IRPM. O grupo IRPM que recebeu veículo mostrou diferença estatística da 1<sup>a</sup> até a 24<sup>a</sup> hora ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive, bem como os grupos tratados com minociclina nas doses de 1000, 480 e 240 ng ( $p < 0,001$ ).

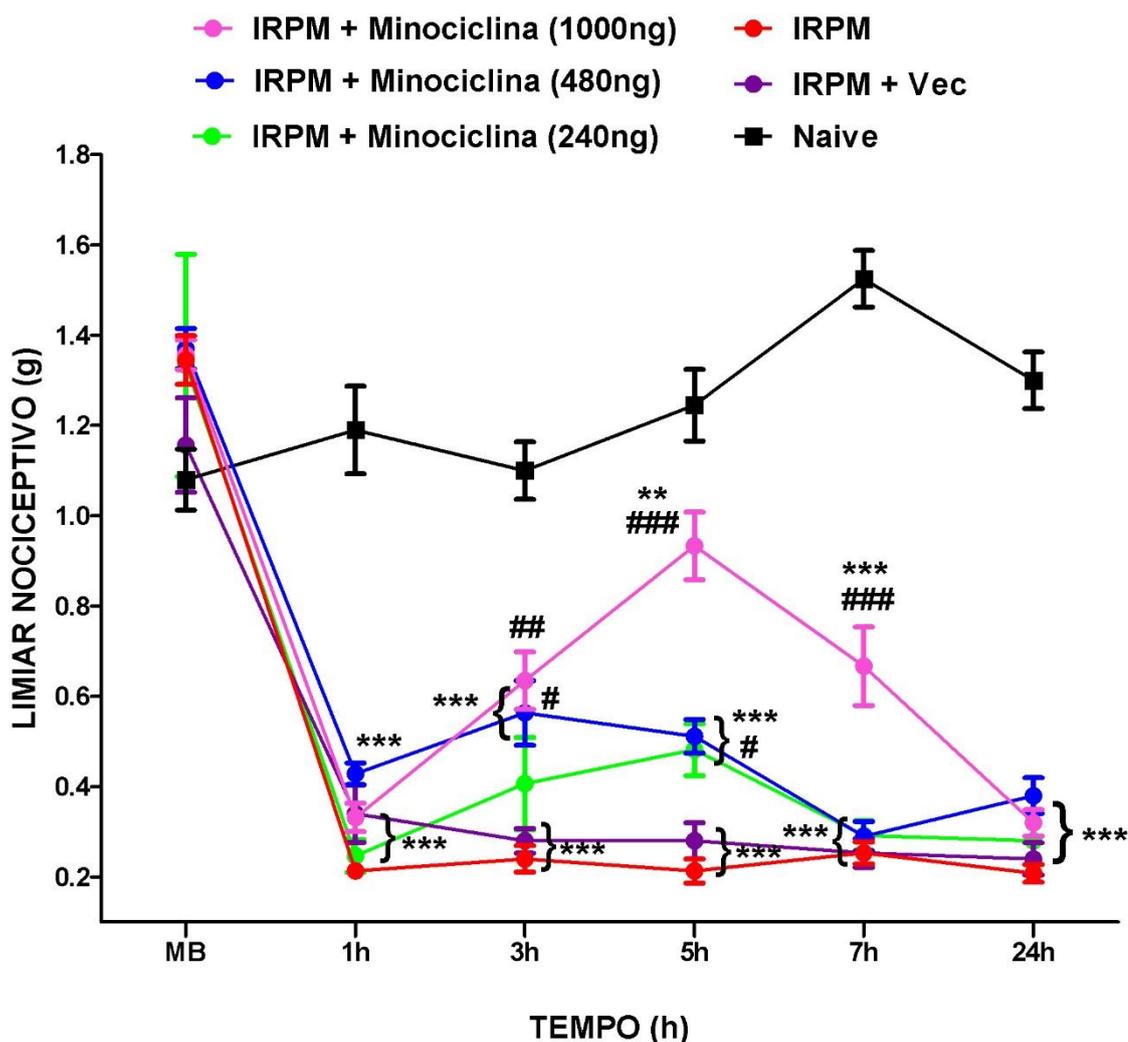


Gráfico 6- Envolvimento da micróglia na nocicepção induzida pela cirurgia de IRPM no 3º P.O. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\* indica significância estatística ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive; # indica significância estatística ( $p < 0,05$ ), ## indica significância estatística ( $p < 0,01$ ) e ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo IRPM;

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; Vec: veículo; P.O: pós-operatório.

Além de avaliar o envolvimento da micróglia espinal, o presente estudo também investigou a participação de astrócitos na dor induzida pela cirurgia de IRPM. Para tal, o fluorocitrato (inibidor de astrócitos) foi pré-administrado (i.t.) nas doses de 300 pmol, 600 pmol e 1.200 pmol e foi verificado que essa droga não alterou a nocicepção induzida pela cirurgia de IRPM, no 3º dia de P.O. Já os mesmos grupos tratados quando comparados ao grupo naive demonstraram ter diferença estatística da 1ª até a 24ª hora ( $p < 0,001$ ) como pode ser visualizado no gráfico 7.

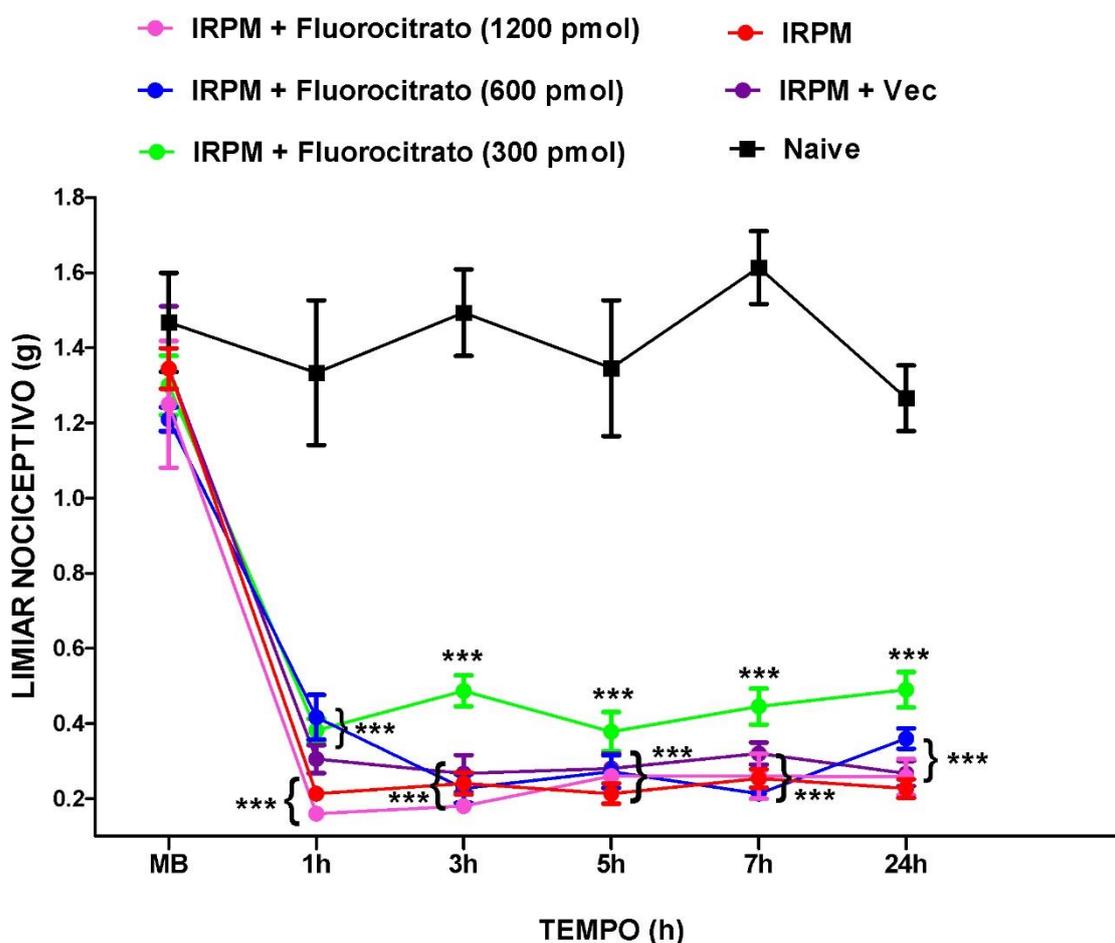


Gráfico 7- Envolvimento do astrócito na nocicepção induzida pela cirurgia IRPM no 3º P.O. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive.

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; Vec: veículo; P.O: pós-operatório.

#### 5.4 Avaliação da participação do receptor Toll like 4 na hiperalgesia induzida pela cirurgia de IRPM

Sabendo que os receptores TLR4 participam do processo nociceptivo a nível espinal e tais receptores são expressos em micróglia, nós também avaliamos a participação deles na dor pós-operatória induzida pela cirurgia de IRPM. O gráfico 8 demonstra que a injeção i.t do antagonista para TLR4, o LPS-RS, no 3º dia de P.O promoveu antinocicepção nos grupos tratados. Esse efeito foi verificado nas doses de 1 e 2 µg, sendo que na dose de 1 µg ocorreu antinocicepção da 3ª até a 7ª hora ( $p < 0,001$ ) e na dose de 2 µg da 3ª até a 5ª hora ( $p < 0,01$ ). Todos os grupos tratados demonstraram diferença estatística em relação ao grupo naive da 1ª até a 24ª hora ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ).

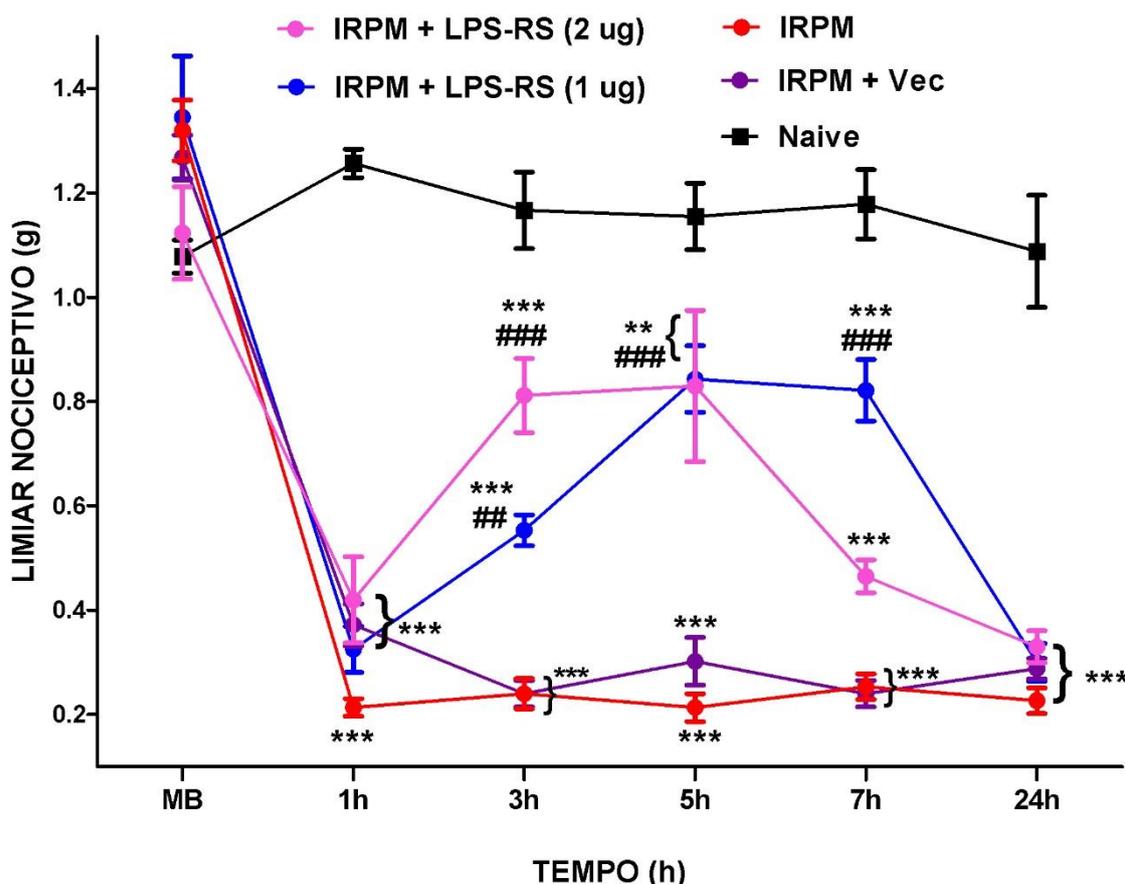


Gráfico 8- Envolvimento do receptor Toll like 4 na nocicepção induzida pela cirurgia IRPM. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*\*\* indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive. ## indica significância estatística ( $p < 0,01$ ) e ### indica significância estatística ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo naive;  
Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; LPS-RS: lipopolissacarídeo da bactéria *Rodhobacter sphaeroides*; Vec: veículo; P.O: pós-operatório.

### 5.5 Avaliação da participação das diferentes drogas no limiar nociceptivo de animais naive

Durante o estudo nós investigamos se a ART livre ou em forma de nanopartícula, bem como, o veículo nanopartícula e veículo seriam capazes de alterar o limiar nociceptivo de animais naive, no 3º dia de P.O. Desse modo, no gráfico 9 podemos observar que nenhuma das drogas ou seus respectivos veículos alterou o limiar nociceptivo desses animais em nenhuma das doses ( $p>0,05$ ).

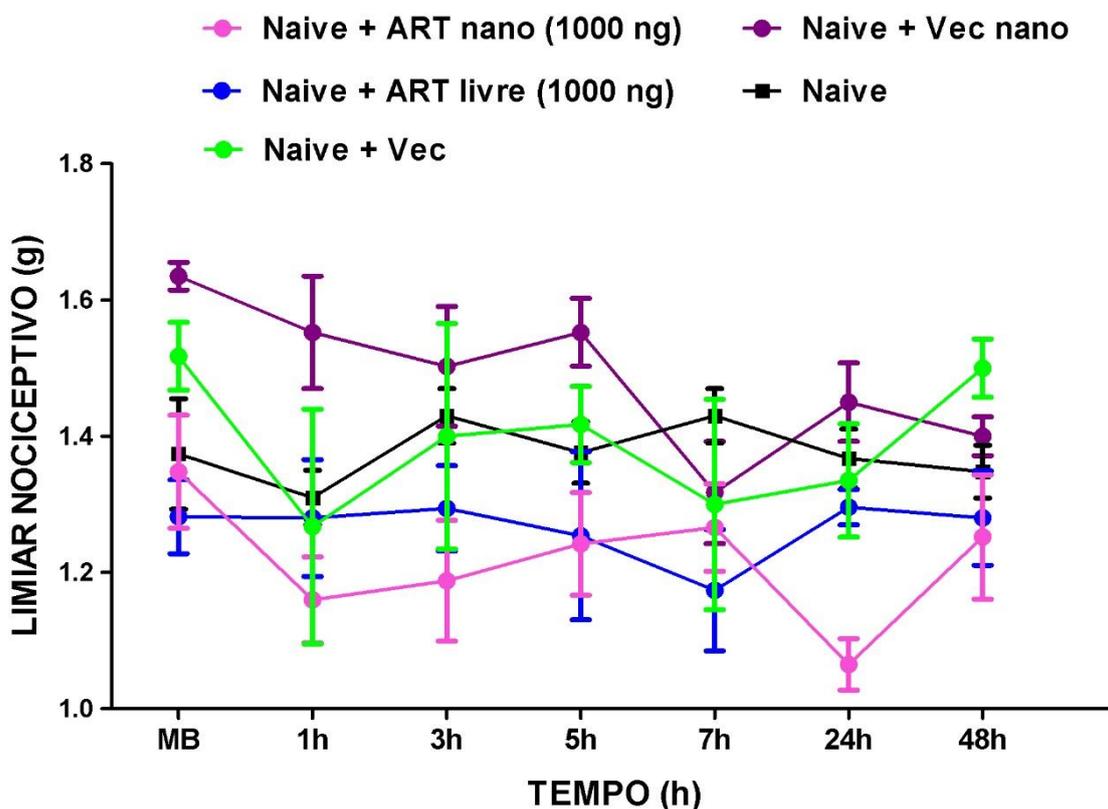


Gráfico 9- Envolvimento da artemisinina (ART) livre, nanopartícula, veículo e veículo nanocápsula na nocicepção em animais saudáveis. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni.

Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; ART: artemisinina; ART nano: artemisinina nanocápsula; Vec: veículo; Vec nano: veículo nano.

Após avaliar o efeito da ART livre ou nanocápsula sobre o limiar nociceptivo de animais naive, de maneira similar, nós avaliamos o envolvimento da minociclina (1000 ng), do fluorocitrato (1200 pmol) e do LPS-RS (2  $\mu$ g), assim como seus veículos (salina para todos eles) na alteração desse parâmetro também no 3º dia de P.O, e no gráfico 10, podemos ver que também não houve alteração do limiar nociceptivo ( $p > 0,05$ ).

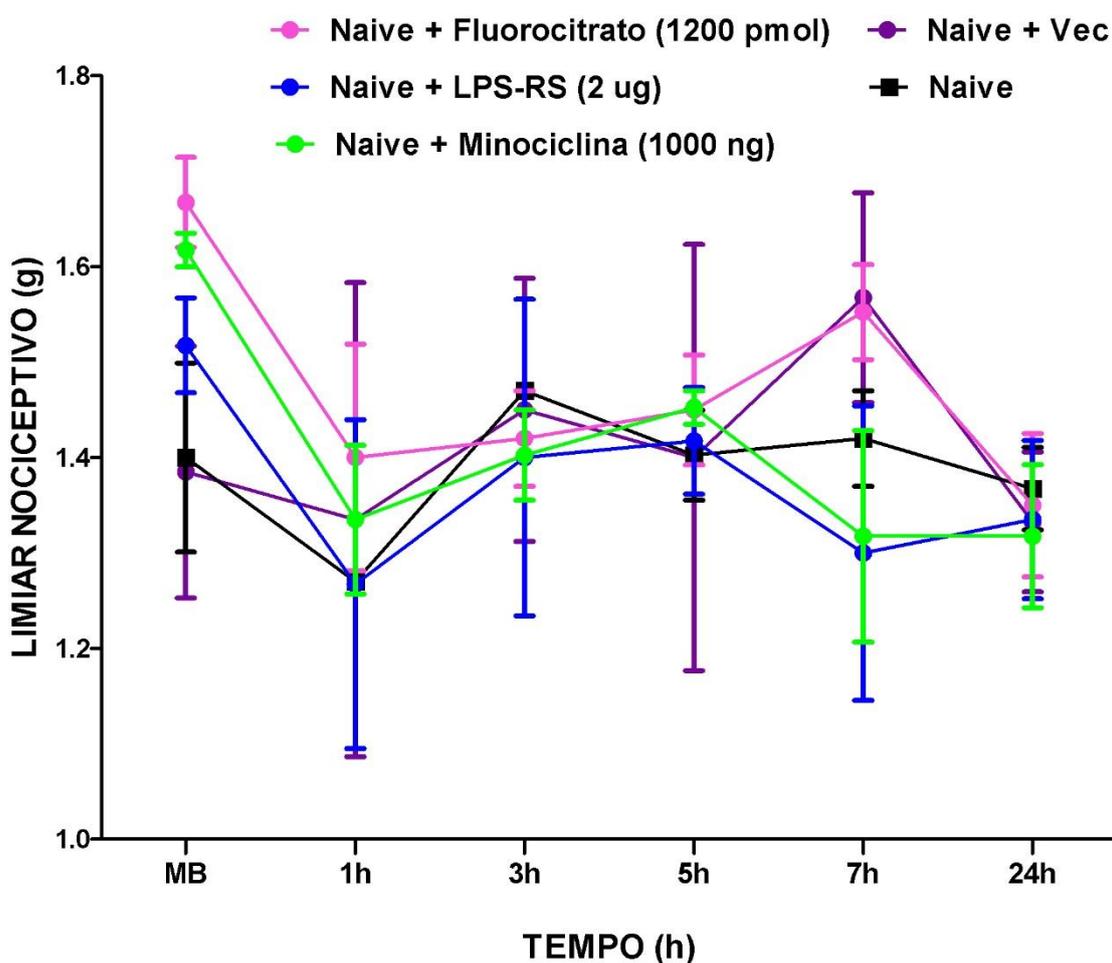


Gráfico 10- Envolvimento do astrócito, da micróglia e TLR4 na nocicepção em animais saudáveis. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. do limiar nociceptivo em gramas (g). Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. Fonte: Da autora.

Nota: MB: medida basal; IRPM: incisão e retração da pele e músculo; LPS-RS: lipopolissacarídeo da bactéria *Rodhobacter sphaeroides*; Vec: veículo.

## 6 DISCUSSÃO

Segundo dados apresentados no presente estudo, o modelo cirúrgico de IRPM foi capaz de induzir DCPO em camundongos. Em adição, foi verificado que a nanocápsula de ART foi mais eficaz em relação a duração da eficácia do efeito antinociceptivo quando comparado à ART livre, tanto na fase aguda quanto em uma fase mais tardia dada dor pós-operatória, demonstrando que a nanoformulação pode ser vantajosa para o tratamento desse sintoma. Além disso, foi encontrado, por meio de experimentos farmacológicos, um envolvimento da micróglia espinal e de TLR4 na fase aguda da dor pós-operatória. Nosso estudo mostrou de maneira inédita que o modelo de IRPM pode ser exequível em camundongos, além de poder mimetizar a dor induzida por cirurgias de grande porte em humanos. A partir dessa evidência, uma melhor elucidação de mecanismos moleculares envolvidos neste tipo de dor poderá ser viável para futuros estudos. Da mesma forma, será possível a realização de pesquisas com camundongos isogênicos e transgênicos, pois a maioria das modificações genéticas são feitas apenas em camundongos.

O fato de a cirurgia de IRPM ter produzido dor pós-operatória evidente nos camundongos por um período extenso de dias se deve a característica da incisão muscular associada a retração prolongada, o que faz com que haja uma hiperalgesia notória e possível sensibilização central, ocasionando a DCPO. Castel e colaboradores (2014), compararam um modelo de dor incisional com um modelo de IRPM em suínos e observaram que a cirurgia de IRPM promoveu uma maior sensibilidade mecânica. Um resultado similar foi encontrado em um outro estudo realizado em ratos após incisão muscular em comparação com um grupo submetido apenas à incisão de pele e fáscia (WIDEMAN; ZAUTRA; EDWARDS, 2014). Além da eficácia do modelo em reproduzir a DCPO, foi observado que o período de manifestação da nocicepção foi similar ao de outros estudos que investigaram esse modelo em ratos, nos quais a hiperalgesia foi verificada até o 28º dia e até o 32º dia de P.O (FLATTERS, 2008; SHEN et al., 2016).

Em nosso estudo foi demonstrado que a ART, tanto na forma livre quanto em nanopartícula, reduziu a hiperalgesia induzida pelo modelo de IRPM, no 3º P.O. Além disso, é importante ressaltar que a dose e a via de administração podem ser uma alternativa para o tratamento da DCPO. O estudo realizado por Favero e

colaboradores (2014), encontrou que a ART testada em diferentes doses em ratos e camundongos não produziu mortalidade ou distúrbios comportamentais no período de 14 dias de observação, porém na dose de 500 mg/kg, foi observada letargia e ptose após o tratamento. Em relação à atividade locomotora, eles revelaram que na dose de 300 mg/kg houve uma redução de cruzamentos quando comparados com o grupo veículo no teste de campo aberto, demonstrando então que essa dose causou prejuízos na locomoção desses animais. Em nossa pesquisa, as doses de nanocápsulas de artemisinina utilizadas foram muito menores quando comparadas às doses de ART livre utilizadas pelos autores acima, além de nossa via de administração ser diferente (i.t.), a qual permite a injeção de pequenos volumes, reduzindo efeitos sistêmicos e adversos de rápida metabolização pelo fígado.

A ART livre e a nanocápsula foram testadas em uma fase inicial do desenvolvimento da dor pós-operatória (3º dia de P.O) e em uma fase tardia (28º dia de P.O). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, foi demonstrado que na fase aguda, a ART livre produziu um curto efeito antinociceptivo que perdurou por 1 hora. Já a ART em nanopartícula também produziu antinocicepção nesta fase, no entanto, o seu efeito permaneceu por um período mais prolongado (7 horas). A hiperalgesia primária causada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios advindos de células imunes residentes ativas como macrófagos, neutrófilos e mastócitos, são responsáveis por hipersensibilizar neurônios aferentes primários em uma fase aguda da lesão (MEYER et al., 2005; MOALEM; TRACEY, 2006; SCHOLZ; WOOLF, 2007). Além disso, a própria incisão cirúrgica rompe vasos sanguíneos e leva a hipóxia dos mesmos, com aumento de lactato e diminuição de pH, o que faz com que também haja isquemia muscular e aumento de estímulos hiperresponsivos aos neurônios e outras células imunes (MEYER et al., 2005; KANG. et al., 2013). Dessa forma, a nanocápsula demonstrou seu efeito controlado de liberação e sua entrega no tecido alvo de maneira eficaz, considerando a resposta inflamatória presente nesta fase aguda, contribuindo para sua maior ação. Este efeito não pôde ser observado na sua forma livre, visto que, o metabolismo da ART livre é rápido o suficiente para produzir efeitos antinociceptivo prolongados, um efeito que reforça a importância do uso da nanocápsula neste estudo.

Os estímulos oriundos da hiperalgesia primária causada pela incisão e retração cirúrgica não ocorrem mais na fase crônica da dor pós-operatória, pois a cicatriz cirúrgica já foi reparada e células imunes locais já não participam mais deste

evento. Todavia, esse processo hiperalgésico de neurônios periféricos contribui para que ocorra uma liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios no CDME com ativação e proliferação de células imunes no SNC, como astrócito e micróglia que por sua vez, contribuem para a hiperalgesia secundária e para a sensibilização central (SCHOLZ; WOOLF, 2007). Nesse caso, nós verificamos que somente a nanoformulação de ART foi capaz de promover antinocicepção no 28º dia de P.O. Esse efeito pode ser também pelo reduzido metabolismo de primeira passagem, facilitando um melhor alcance do tecido alvo, no caso, a medula espinal. Enquanto que, a rápida metabolização da droga livre pode ser maior, reduzindo o período de sua ação antinociceptiva.

A ART já é descrita em estudos envolvendo imunomodulação, inflamação e nocicepção (DE FAVERI FAVERO et al., 2014; GUILLOT et al., 2012; HO et al., 2014; YAO; WANG; WANG, 2016; ZOU et al., 2017). Um resultado semelhante, utilizando a ART livre, foi encontrado por Ying e colaboradores (2017), que demonstraram uma diminuição da alodinia mecânica, em modelo de dor neuropática ao tratar os animais com doses diárias de artemisinina do 7º até o 13º dia. Há poucos estudos investigando o seu efeito no controle da nocicepção, sendo assim, o presente estudo é importante, pois foi o primeiro a avaliar o efeito antinociceptivo dessa substância em seu estado livre e em nanopartícula na DCPO induzida pela cirurgia de IRPM em camundongos. Atualmente, é possível verificar um considerável número de plantas que contêm substâncias com potencial terapêutico, o qual pode ser melhorado com a aplicação de diferentes técnicas de formulação, dentre elas o nanoencapsulamento, a fim de aumentar a sua eficácia. Assim, mesmo com potencial terapêutico, a ART e seus derivados apresentam um empecilho na sua disponibilidade, devido à sua baixa solubilidade em água e meia vida curta, o que compromete sua ação efetiva (BILIA et al., 2017; LAI; SINGH; SASAKI, 2013). Diante disso, vários trabalhos têm demonstrado benefícios na utilização de nanotecnologia para facilitar o tratamento, principalmente o tratamento farmacológico de diversas patologias (CHARLIE-SILVA; FRACETO; DE MELO, 2018; FANG et al., 2018; LAI; SINGH; SASAKI, 2013; TAVARES et al., 2016). Diante disso, avaliamos o efeito da ART em nanocápsula sobre a DCPO induzida pelo modelo de IRPM.

Uma pesquisa verificou que nanopartículas de ART possuem um maior tempo de dissolução quando comparado com a droga livre (KAKRAN et al., 2010), favorecendo a prolongação do efeito esperado. Além disso, Manjili e colaboradores

(2018) realizaram experimentos *in vivo* com a administração via intravenosa de micelas (estruturas globulares que possuem características polares e apolares simultaneamente, dispersas em líquido) de ART, compostas por uma estrutura núcleo-casca contendo um núcleo poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) hidrofóbico e uma casca polietilenoglicol (PEG) hidrofílica (ART/PCL-PEG-PCL) e outra camada de PCL. Do mesmo modo, os pesquisadores realizaram estudos *in vitro* através de uma cultura celular de linhagens de adenocarcinoma mamário de camundongos (4T1) e de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), mostrando que houve maior eficácia antitumoral de micelas contendo ART/PCL-PEG-PCL em comparação com a mesma dose de ART livre. Nesse contexto, Nosrati e colaboradores (2019), encontraram resultados semelhantes na diminuição do tumor mamário tanto *in vivo* quanto em culturas *in vitro*, através do tratamento com a nanoformulação de micelas copoliméricas de ART com polietilenoglicol e poli- $\epsilon$ -caprolactona (PEG-PCL) acrescidas com vitamina B7. Em adição, Abriata e colaboradores (2019), observaram uma otimização da terapia farmacológica com PCL do quimioterápico paclitaxel em uma cultura de células cancerígenas (câncer de ovário), quando comparadas a terapia convencional com paclitaxel em sua forma livre.

A ART é uma droga lipofílica e insolúvel em água, o que limita sua aplicação clínica. Em consequência disso, o encapsulamento por nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona parece ser um avanço por superar a hidrofobicidade da ART, conferindo o papel na melhoria de sua distribuição sistêmica. Vale salientar que, embora os estudos supracitados tenham utilizado nanocarreadores e vias de administração diferentes do presente estudo, é possível verificar que os resultados foram semelhantes quando se avalia a potencialização do efeito. Além disso, esse estudo foi o primeiro a investigar o efeito de nanocápsulas de ART para o controle da DCPO em camundongos e o fato do efeito da ART em nanocápsula ter sido mais eficaz em relação ao efeito da ART livre, em ambos os dias de tratamento (3<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias de P.O), pode ser devido à característica da nanoformulação utilizada, pois a nanocápsula de poli- $\epsilon$ -caprolactona é um polímero biodegradável, biocompatível, não tóxico, o que faz com que a droga atinja o tecido alvo de maneira lenta, aumentando a sua eficiência terapêutica, bem como sua segurança.

As células da glia possuem características de defesa importantes para evitar que haja invasão de organismos potencialmente lesivos ao SNC, além de promover manutenção de neurônios e condução de estímulos, e, muitos estudos também

demonstram o seu papel essencial na neuromodulação da dor crônica através da liberação de citocinas pró-inflamatórias e contribuição para a sensibilização central (GRACE et al., 2014; MILLIGAN; WATKINS, 2009). Encontramos em nosso estudo que a micróglia pode estar envolvida na fase aguda da dor pós-operatória induzida pela cirurgia de IRPM. Wang e colaboradores (2019), encontraram que durante a DCPO induzida pelo modelo de IRPM em ratos ocorreu uma ativação microglial no bulbo ventromedial rostral, com o envolvimento do receptor P2X7, IL-1 $\beta$  e espécies reativas de oxigênio. Outro trabalho conduzido por Ying e colaboradores (2014), descreveram que a ativação do receptor P2X7 no corno dorsal da medula espinal também contribuiu para o desenvolvimento de dor crônica induzida pelo mesmo modelo cirúrgico, através da ativação da micróglia e do astrócito, com consequente liberação de TNF- $\alpha$ .

Tsuda e colaboradores (2003), verificaram que a micróglia é ativada via P2X4, após a indução de dor neuropática em animais, sendo portanto, um processo chave na dor neuropática. Usando um modelo de neuropatia diabética dolorosa causada por estreptozotocina, Cheng e colaboradores (2014), descobriram que a micróglia, no CDME, mostrou morfologia hipertrófica, além do aumento no número de células e na expressão de marcadores microgliais. Assim, apesar de os modelos de dor crônica serem diferentes do utilizado em nosso estudo, esses achados acima citados reforçam o nosso, visto que todos eles encontraram papel importante da micróglia frente à neuroinflamação a nível central, demonstrando que essa célula possui papel chave na neuromodulação da dor crônica. Ao mesmo tempo, nosso estudo demonstrou que a inibição da micróglia pode ser uma alternativa na terapia analgésica neste modelo de dor.

Nossa pesquisa não encontrou participação de astrócitos na fase aguda da dor pós-operatória (3<sup>o</sup> P.O). Na medula espinal, estudos demonstram que o astrócito é ativado posteriormente à ativação microglial, normalmente participando da manutenção da dor patológica e crônica, o que pode explicar o fato da não participação dessa célula nesta fase da dor pós-operatória (RAGHAVENDRA, 2003; TANGA; RAGHAVENDRA; DELEO, 2004). Além disso, similar aos nossos resultados, outros estudos também não encontraram o envolvimento de astrócitos espinais na dor pós-operatória (CHEN et al., 2015; JIN et al., 2003). No estudo de Sandoval e colaboradores (2009), eles observaram que a micróglia é ativada do 1<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de P.O, em modelos de dor cirúrgica por incisão plantar e por dor neuropática e também

revelaram que os astrócitos demonstram sua ativação apenas após o 4º dia de P.O, reforçando o fato de células microgliais serem ativadas em uma fase inicial da dor crônica e os astrócitos ativados em uma fase tardia da dor, contribuindo para a manutenção da mesma.

Uma das hipóteses do presente trabalho foi de ocorrer ativação microglial via TLR4, após indução de DCPO por meio do modelo de IRPM em camundongos. A compreensão do reconhecimento de TLR's através de ativação desses receptores por DAMP's, é particularmente relevante para muitas hipóteses relacionadas a mecanismos neuroimunes de nocicepção em que algum insulto mecânico, químico ou imunológico resulta em lesão tecidual culminando, na maioria das vezes, no aparecimento de dor crônica (LACAGNINA; WATKINS; GRACE, 2017). Os TLR4 são expressos em células da glia, principalmente em micróglia e astrócitos (MILLIGAN; WATKINS, 2009). Além disso, o envolvimento desse receptor em modelos de dor crônica pós-operatória tem sido descrito em alguns estudos (CHEN et al., 2015; SUN et al., 2015).

Sun e colaboradores (2015), relataram a participação da micróglia ativada, via TLR4, na liberação aumentada de TNF- $\alpha$  na medula espinal de ratos após a cirurgia de IRPM. Em adição, os autores encontraram que o antagonismo do TLR4 impediu a liberação de TNF- $\alpha$  e conseqüentemente atenuou a alodinia mecânica induzida pela cirurgia de IRPM. Esse estudo sugere que a expressão de TNF- $\alpha$  regulada positivamente via TLR4 no CDME contribui para a DCPO. O estudo de Zhao e colaboradores (2015), examinou as expressões de TLR4 e micróglia na medula espinal em diferentes momentos da dor inflamatória induzida por CFA e os resultados mostraram que o CFA induz hipersensibilidade e edema de pata, assim como ativação da micróglia no CDME, com o aumento das expressões de OX-42 (anticorpo marcador de micróglia) e TLR4 durante a dor inflamatória. Além disso, a injeção intratecal de cloridrato de minociclina reverteu a hipersensibilidade à dor e suprimiu a ativação de micróglia e TLR4 induzida por CFA.

Em nosso estudo por meio de ensaios farmacológicos, demonstramos que o envolvimento da micróglia através da inibição dessas células com o inibidor seletivo minociclina, bem como, demonstramos a participação de TLR4 por meio da inibição desse receptor com seu inibidor, o LPS-RS, ambos no 3º P.O. Nossos resultados portanto, corroboram com os resultados acima descritos e sugerem que a micróglia atua na indução da DCPO por meio da ativação do TLR4 e, com isso, contribui com o

processo de sensibilização central. Além disso, estudos futuros são necessários para correlacionar se o efeito da ART ocorre por meio da inibição da via micróglia/TLR4, uma vez que os resultados farmacológicos apresentados encontraram o efeito antinociceptivo da mesma na DCPO. Ademais, os estudos de Sun e colaboradores (2015) e Chen e colaboradores (2015) são os únicos a relacionar a expressão de TLR4 nas células microgliais e ativação dessas células no modelo de IRPM (em ratos). Esses achados destacam a necessidade de desenvolver novos estudos com a finalidade de desvendar os mecanismos envolvidos na DCPO.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que a ART em nanocápsula foi mais eficaz em relação a ART livre, no que diz respeito ao efeito farmacológico e a duração, na redução da hiperalgesia induzida pelo modelo cirúrgico de IRPM, tanto em uma fase inicial quanto em uma fase mais tardia da dor pós-operatória. Esses dados demonstram que a nanoformulação dessa substância pode ser uma estratégia terapêutica para o tratamento da DCPO. Além disso, nós sugerimos também que a micróglia espinal parece estar envolvida nesse processo, sendo ativada através de TLR4, assim como é possível a utilização do modelo de IRPM para mimetizar a DCPO em camundongos, sendo uma grande vantagem para realização de estudos futuros com animais isogênicos e transgênicos.

## REFERÊNCIAS

- ABRIATA, J. P. et al. Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 96, p. 347–355, 2019.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499–511, 2004.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, n. 1–2, p. 40–56, 2004.
- ALVES, J. E. D. O. et al. Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 8, n. 1, p. 56, 2017.
- ANDERSEN, K. G.; KEHLET, H. Persistent pain after breast cancer treatment: a critical review of risk factors and strategies for prevention. **Journal of Pain**, v. 12, n. 7, p. 725–746, 2011.
- BASBAUM, A. I. et al. Review cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, p. 267–284, 2009.
- BENOLIEL, R. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 60–68, 2018.
- BILIA, A. R. et al. Improving on nature: the role of nanomedicine in the development of clinical natural drugs. **Planta Medica**, v. 83, n. 5, p. 366–381, 2017a.
- BRUCE, J. et al. Dor pós-operatória crônica prevalência. **Reviews in pain**, v. 5, n. 3, p. 23–29, 2019.
- CALVO, M.; DAWES, J. M.; BENNETT, D. L. H. The role of the immune system in the generation of neuropathic pain. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 7, p. 629–642, 2012.
- CASTEL, D. et al. Characterization of a porcine model of post-operative pain. **European Journal of Pain**, v. 18, n. 4, p. 496–505, 2014.
- CAUMO, W. et al. Preoperative predictors of moderate to intense acute postoperative pain in patients undergoing abdominal surgery. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 46, n. 10, p. 1265–1271, 2002.
- CEN, Y. et al. Artesunate ameliorates severe acute pancreatitis (SAP) in rats by inhibiting expression of pro-inflammatory cytokines and Toll-like receptor 4. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 252–260, 2016.
- CHARLIE-SILVA, I.; FRACETO, L. F.; DE MELO, N. F. S. Progress in nano-drug

delivery of artemisinin and its derivatives: towards to use in immunomodulatory approaches. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. S3, p. 1–10, 2018.

CHATURVEDI, D. et al. Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 2, p. 435–454, 2010.

CHEN, H. et al. P38 and interleukin-1 beta pathway via toll-like receptor 4 contributed to the skin and muscle incision and retraction-induced allodynia. **Journal of Surgical Research**, v. 197, n. 2, p. 339–347, 2015.

CHENG, K. I. et al. Persistent mechanical allodynia positively correlates with an increase in activated microglia and increased p38 mitogen-activated protein kinase activation in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 18, n. 2, p. 162–173, 2014.

CHRISTIANSEN, S.; COHEN, S. P. Chronic pain: pathophysiology and mechanisms. **Essentials of Interventional Techniques in Managing Chronic Pain**, p. 15–25, 2018.

CHUAH, L. H. et al. Cellular uptake and anticancer effects of mucoadhesive curcumin-containing chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 228–236, 2014.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain cliffords. **Pain**, v. 152, p. 1–31, 2012.

DA SILVA, É. F. et al. Antiulcerogenic activity of some sesquiterpene lactones isolated from *artemisia annua*. **Planta Medica**, v. 68, n. 6, p. 515–518, 2002.

DE FAVERI FAVERO, F. et al. *Artemisia annua* L.: evidence of sesquiterpene lactones' fraction antinociceptive activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1–11, 2014.

DE MELO, N. F. S. et al. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 65–69, 2010.

DE OLIVEIRA, E. G. et al. Reconstituted spray-dried phenytoin-loaded nanocapsules improve the in vivo phenytoin anticonvulsant effect and the survival time in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 551, n. 1–2, p. 121–132, 2018.

DIAB, D. L. et al. A comparison of spinal Iba1 and GFAP expression in rodent models of acute and chronic pain. **Brain Research**, v. 6, n. 11, p. 1249–1254, 2009.

DINAKAR, P.; STILLMAN, A. M. Pathogenesis of pain. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 23, n. 3, p. 201–208, 2016.

ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, n. 2015, p. 631–648, 2015.

FANG, R. H. et al. Cell membrane coating nanotechnology. **Advanced Materials**, v. 30, n. 23, p. 1–34, 2018.

FERREIRA, J. F. S.; PEADEN, P.; KEISER, J. In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis* : trematocidal plant alcoholic extracts. **Parasitology Research**, v. 109, n. 6, p. 1585–1592, 2011.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. 1–4, 1989.

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

FU, J. Artemisinin and chinese medicine as Tu science. **Endeavour**, v. 41, n. 3, p. 127–135, 2004.

GIAMBERARDINO, M. A. et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. 160, n. 1, p. 28–37, 2018.

GOSSELIN, R. et al. Glial cells and chronic pain. **Neuroscientist**, v. 16, n. 5, p. 519–531, 2011.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, 2014a.

GUILLOT, X. et al. Pain and immunity. **Joint Bone Spine**, v. 79, n. 3, p. 228–236, 2012.

HANSEN, D. V; HANSON, J. E.; SHENG, M. Microglia in Alzheimer ' s disease. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 2, p. 459–472, 2017.

HO, W. E. et al. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 142, n. 1, p. 126–139, 2014.

HUANG, Y. et al. The production and exportation of artemisinin - derived drugs in China : current status and existing challenges. **Malaria Journal**, p. 1–8, 2016.

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

HUMPHREYS, C. et al. Artemisinins as potential anticancer agents: uptake detection in erythrocytes using Fourier transform infrared spectroscopy and cytotoxicity against bladder cancer cells. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 11, p. 962–967, 2016.

HUNT, R. H. et al. Myths and facts in the use of anti-inflammatory drugs. **Annals of Medicine**, v. 41, n. 6, p. 423–437, 2009.

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

JIN, S. et al. P38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 10, p. 4017–4022, 2003.

KAKRAN, M. et al. Fabrication of drug nanoparticles by evaporative precipitation of nanosuspension. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, n. 1–2, p. 285–292, 2010.

KAPADIA, C. H. et al. Nanoparticulate immunotherapy for cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 167–180, 2015.

KATZ, J.; SELTZER, Z. Transition from acute to chronic postsurgical pain: risk factors and protective fa. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 9, n. 5, p. 723–744, 2009.

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

KRAYCHETE, D. C. et al. Postoperative persistent chronic pain: what do we know about prevention, risk factors, and treatment. **Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)**, v. 66, n. 5, p. 505–512, 2016.

KUNER, R. Spinal excitatory mechanisms of pathological pain. **Pain**, v. 156, n. 4, p. S11–S17, 2015.

LACAGNINA, M. J.; WATKINS, L. R.; GRACE, P. M. Toll-like receptors and their role in persistent pain. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 184, n. October 2017, p. 145–158, 2017.

LAI, H. C.; SINGH, N. P.; SASAKI, T. Development of artemisinin compounds for cancer treatment. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 1, p. 230–246, 2013.

LAI, L. et al. Artesunate alleviates hepatic fibrosis induced by multiple pathogenic factors and inflammation through the inhibition of LPS/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 765, p. 234–241, 2015.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **Journal of Pain**, v. 10, n. 9, p. 895–926, 2009.

LAVAND'HOMME, P. Douleurs chroniques après chirurgie: état des lieux. **Presse Medicale**, v. 44, n. 5, p. 486–491, 2015.

LIU, T.; GAO, Y. J.; JI, R. R. Emerging role of toll-like receptors in the control of pain and itch. **Neuroscience Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 131–144, 2012.

LOESER, J. et al. Pain Terms, A Current list with definitions and notes on usage.

**Classification of Chronic Pain**, p. 209–214, 2011.

LOUISE, A. Dor crônica. **ACP Medicine**. p. 1–22, 2019.

LOVICH-SAPOLA, J.; SMITH, C. E.; BRANDT, C. P. Postoperative pain control. **Surgical Clinics of North America**, v. 95, n. 2, p. 301–318, 2015a.

LOVICH-SAPOLA, J.; SMITH, C. E.; BRANDT, C. P. Postoperative pain control. **Surgical Clinics of North America**, v. 95, n. 2, p. 301–318, 2015b.

LUBBE, A. et al. Ethnopharmacology in overdrive: The remarkable anti-HIV activity of *Artemisia annua*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 854–859, 2012.

LUO, P. et al. Antimalarial artesunate protects sepsis model mice against heat-killed *Escherichia coli* challenge by decreasing TLR4, TLR9 mRNA expressions and transcription factor NF- $\kappa$ B activation. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 379–389, 2008.

MANJILI, H. K. et al. In vitro and in vivo delivery of artemisinin loaded PCL–PEG–PCL micelles and its pharmacokinetic study. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 46, n. 5, p. 926–936, 2018.

MARTINEZ, V.; BAUDIC, S.; FLETCHER, D. Douleurs chroniques postchirurgicales. **Annales Francaises d'Anesthesie et de Reanimation**, v. 32, n. 6, p. 422–435, 2013.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 298–300, 2002.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394–397, 1997.

MELO, N. F. S. DE et al. Development of hydrophilic nanocarriers for the charged form of the local anesthetic articaine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 66–73, 2014.

MELO, N. F. S. DE et al. Characterization of articaine-loaded Poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules and solid lipid nanoparticles in hydrogels for topical formulations. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 6, p. 4428–4438, 2017.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 13, p. 1655–1660, 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 23–36, 2009.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Research Reviews**, v. 51, n. 2, p. 240–264, 2006.

NICOTRA, L. et al. Toll-like receptors in chronic pain. **Experimental Neurology**, v. 234, n. 2, p. 316–329, 2012.

NOSRATI, H. et al. Biotin-functionalized copolymeric PEG-PCL micelles for in vivo tumour-targeted delivery of artemisinin. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 104–114, 2019.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O. DE; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, n. Suppl 1, p. 35–42, 2016.

CHATTOPADHYAY, A. et al. Nanoliposomal artemisinin for the treatment of murine visceral leishmaniasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 2189–2204, 2017.

THAPA, P; EUASOBHON, P. Chronic postsurgical pain: current evidence for prevention and management. **Korean Journal of Pain**, v. 31, n. 3, p. 155–173, 2018.

PAGE, B. et al. Pain from primary inguinal hernia and the effect of repair on pain. **British Journal of Surgery**, v. 89, n. 10, p. 1315–1318, 2002.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; JR, W. A. V.; CHIU, I. M. Nociceptor sensory neuron – immune interactions in pain and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.

PINI, G. et al. Vapour and liquid-phase *Artemisia annua* essential oil activities against several clinical strains of candida. **Planta Medica**, v. 82, n. 11/12, p. 1016–1020, 2016.

POGATZKI-ZAHN, E. M.; SEGELCKE, D.; SCHUG, S. A. Postoperative pain — from mechanisms to treatment. **PAIN Reports**, v. 2, n. 2, p. e588, 2017.

POOBALAN, A. S. et al. Chronic pain and quality of life following open inguinal hernia repair. **British Journal of Surgery**, v. 88, n. 8, p. 1122–1126, 2001.

RAGHAVENDRA, V. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 306, n. 2, p. 624–630, 2003.

RAMAZANI, A. et al. Preparation and in vivo evaluation of anti-plasmodial properties of artemisinin-loaded PCL–PEG–PCL nanoparticles. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 23, n. 9, p. 911–920, 2018.

REDDI, D. Preventing chronic postoperative pain. **Anaesthesia**, v. 71, p. 64–71, 2016.

- REDDI, D.; CURRAN, N. Chronic pain after surgery: Pathophysiology, risk factors and prevention. **Postgraduate Medical Journal**, v. 90, n. 1062, p. 222–227, 2014.
- RODRIGUES, R. A. F. et al. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 368–372, 2006.
- RU-RONG JI, TEMUGIN, B, N. M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy?. **Pain**, v. 154, n. 0 1, p. S10–S28, 2014.
- SALTER, M. W.; STEVENS, B. Microglia emerge as central players in brain disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 9, p. 1018–1027, 2017.
- SCHOMBERG, D.; OLSON, J. K. Immune responses of microglia in the spinal cord: Contribution to pain states. **Experimental Neurology**, v. 234, n. 2, p. 262–270, 2012.
- SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205–218, 1990.
- SHAKIR, L. et al. Artemisinins and immune system. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, n. 1–2, p. 6–14, 2011.
- SHEN, Y. et al. The effects of an intraperitoneal single low dose of ketamine in attenuating the postoperative skin/muscle incision and retraction-induced pain related to the inhibition of N-methyl-d-aspartate receptors in the spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 616, p. 211–217, 2016.
- SHI, Z. et al. Resolving neuroinflammation, the therapeutic potential of the anti-malaria drug family of artemisinin. **Pharmacological Research**, v. 136, n. July, p. 172–180, 2018.
- SPRENGER, L. K. et al. Atividade ovicida e larvicida do extrato hidroalcoólico de *Artemisia annua* sobre parasitas gastrintestinais de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. p. 25–31, 2015.
- SUN, Y. et al. The over-production of TNF- $\alpha$  via Toll-like receptor 4 in spinal dorsal horn contributes to the chronic postsurgical pain in rat. **Journal of Anesthesia**, v. 29, n. 5, p. 734–740, 2015a.
- TAJEHMIRI, A. et al. In vitro antimicrobial activity of artemisia annua leaf extracts against pathogenic bacteria. **Advanced Studies in Biology**, v. 6, n. 3, p. 93–97, 2014.
- TANGA, F. Y.; NUTILE-MCMENEMY, N.; DELEO, J. A. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 16, p. 5856–61, 2005.

TANGA, F. Y.; RAGHAVENDRA, V.; DELEO, J. A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 2–3, p. 397–407, 2004.

TAVARES, M. R. et al. Polymeric nanoparticles assembled with microfluidics for drug delivery across the blood-brain barrier. **European Physical Journal: Special Topics**, v. 225, n. 4, p. 779–795, 2016.

TERKAWI, A. S. et al. Perioperative lidocaine infusion reduces the incidence of post-mastectomy chronic pain: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. **Pain Physician**, v. 18, n. 2, p. E139-46, 2015.

THEUNISSEN, M. et al. Recovery 3 and 12 months after hysterectomy. **Medicine**, v. 95, n. 26, p. e3980, 2016.

TSAN, M.-F.; GAO, B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 514–519, 2004.

TSUDA, M. et al. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. **Nature**, v. 424, n. August, p. 1–6, 2003.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1217–1220, 2011.

VARDEH, D.; NARANJO, J. F. Peripheral and central sensitization. **Pain Medicine: An Essential Review**, v. 17, n. Suppl 1, p. 15–17, 2017.

WANG, D. et al. Artesunate attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses by suppressing TLR4, MyD88 expression, and NF- $\kappa$ B activation in microglial cells. **Inflammation**, v. 38, n. 5, p. 1925–1932, 2015.

WANG, J. et al. The antimalarial artemisinin synergizes with antibiotics to protect against lethal live *Escherichia coli* challenge by decreasing proinflammatory cytokine release. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2420–2427, 2006a.

WANG, J. et al. The antimalarial artemisinin synergizes with antibiotics to protect against lethal live *Escherichia coli* challenge by decreasing proinflammatory cytokine release. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2420–2427, 2006b.

WANG, L. et al. Encapsulation of low lipophilic and slightly water-soluble dihydroartemisinin in PLGA nanoparticles with phospholipid to enhance encapsulation efficiency and in vitro bioactivity. **Journal of Microencapsulation**, v. 33, n. 1, p. 43–52, 2016.

WANG, R. et al. Progress on active analgesic components and mechanisms of commonly used traditional chinese medicines: a comprehensive review. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences**

**pharmaceutiques**, v. 21, n. 1, p. 437–480, 2018.

WANG, W. et al. Rostral ventromedial medulla-mediated descending facilitation following P2X7 receptor activation is involved in the development of chronic post-operative pain. **Journal of Neurochemistry**, 2019.

WHITE, N. J. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of artemisinin and derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 41–43, 1994.

WIDEMAN, T. H.; ZAUTRA, A. J.; EDWARDS, R. R. Expression profile of nerve growth factor after muscle incision in the rat. **Anesthesiology**, v. 154, n. 11, p. 2262–2265, 2014.

WILDGAARD, K. et al. Consequences of persistent pain after lung cancer surgery: A nationwide questionnaire study. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 55, n. 1, p. 60–68, 2011.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7723–7730, 1999.

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

WYLDE, V. et al. Effect of local anaesthetic infiltration on chronic postsurgical pain after total hip and knee replacement: The APEX randomised controlled trials. **Pain**, v. 156, n. 6, p. 1161–1170, 2015.

WYLDE, V. et al. Systematic review of management of chronic pain after surgery. **British Journal of Surgery**, v. 104, n. 10, p. 1293–1306, 2017.

XU, L.; HE, D.; BAI, Y. Microglia-mediated inflammation and neurodegenerative disease. **Molecular Neurobiology**, p. 6709–6715, 2016.

YAO, W.; WANG, F.; WANG, H. Immunomodulation of artemisinin and its derivatives. **Science Bulletin**, v. 61, n. 18, p. 1399–1406, 2016.

YING, M. et al. Effect of artemisinin on neuropathic pain mediated by P2X4receptor in dorsal root ganglia. **Neurochemistry International**, v. 108, p. 27–33, 2017.

YING, Y. L. 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**, v. 261, p. 836–843, 2014.

YUAN, D.-S. et al. Artemisinin: a panacea eligible for unrestrictive use?. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. October, p. 1–5, 2017.

ZHAO, D. et al. Artesunate protects LPS-induced acute lung injury by inhibiting TLR4 expression and inducing Nrf2 activation. **Inflammation**, v. 40, n. 3, p. 798–805,

2017.

ZHAO, X.; ZHANG, T.; LI, Y. The up-regulation of spinal Toll-like receptor 4 in rats with inflammatory pain induced by complete Freund ' s adjuvant. **Brain Research Bulletin**, v. 111, p. 97–103, 2015.

ZHU, Q. et al. Antinociceptive effects of curcumin in a rat model of postoperative pain. **Scientific Reports**, v. 4, p. 8–11, 2014.

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

## ANEXO A- Certificado do Comitê de ética em pesquisa e uso animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do efeito da nanocápsula de Artemisinina sobre a ativação do receptor *Toll Like 4* em micróglia em um modelo cirúrgico de incisão e retração de pele e músculo em camundongos", registrada com o nº 33/2018, 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 (ou ensino) - 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.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 11/09/2018 a 14/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	156
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 11 de Setembro de 2018.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG