

Avaliação do limiar nociceptivo e marcadores inflamatórios em ratos após indução de enfisema pulmonar por elastase nos modelos de dor fásica, inflamatória e neuropática

Evaluation of the nociceptive threshold and inflammatory markers in rats after induction of pulmonary emphysema by elastase in the phasic, inflammatory and neuropathic pain models

Rafaella Rocha Figueiredo¹, Isabela de Paula Ribeiro Argôlo¹, Luiz Fernando Xavier¹, Josie Resende Torres da Silva¹, Marcelo Lourenço da Silva¹

DOI 10.5935/2595-0118.20230015-pt

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) caracteriza-se pela obstrução do fluxo aéreo e, embora comprometa os pulmões, produz importantes consequências sistêmicas. O objetivo deste estudo foi analisar a relação entre citocinas pró-inflamatórias e limiar nociceptivo em ratos com DPOC induzida por elastase pancreática suína.

MÉTODOS: Cento e quarenta e quatro animais foram distribuídos aleatoriamente em três modelos diferentes: dor fásica nociceptiva no teste de retirada de cauda (TF), dor inflamatória no modelo de adjuvante completo de Freund (CFA) e dor neuropática no modelo de constrição do nervo ciático (CCI). Vinte e um dias após a instilação traqueal de elastase a DPOC foi estabelecida e o limiar nociceptivo foi avaliado em diferentes períodos.

RESULTADOS: Os animais com DPOC apresentaram menor tempo de latência de retirada e maiores níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF-alfa no TF. No modelo CFA e CCI, os animais com DPOC apresentaram aumento da hiperalgesia mecânica e

os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF-alfa foram maiores no plasma até 24 horas.

CONCLUSÃO: Animais com DPOC apresentam níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias e limiares nociceptivos reduzidos, sugerindo uma relação entre DPOC e aumento da nocicepção.

Descritores: Doença pulmonar, Doença pulmonar obstrutiva crônica, Dor.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by airflow obstruction, although it compromises the lungs, it also produces significant systemic consequences. The objective of this study was to analyze the relationship between pro-inflammatory cytokines and nociceptive threshold in rats with porcine pancreatic elastase-induced COPD.

METHODS: 144 animals were randomly distributed into 3 different models: nociceptive phasic pain at tail-flick test (TF), inflammatory pain in the Freund's complete adjuvant model (CFA) and neuropathic pain in the sciatic nerve constriction model (CCI). 21 days after tracheal instillation of elastase the COPD was established, and the nociceptive threshold was evaluated at different times.

RESULTS: The animals with COPD in TF had a shorter latency time and higher levels of IL-1 β , IL-6 and TNF-alpha cytokines. In the CFA and CCI model, the animals with COPD showed an increase in the mechanical hyperalgesia and the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF-alpha were greater in plasma up to 24 hours.

CONCLUSION: Animals with COPD have higher levels of pro-inflammatory cytokines and reduced nociceptive thresholds, suggesting a relationship between COPD and increased nociception.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease, Pain, Pulmonary disease.

INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo e o tabagismo é o principal precursor da doença, responsável por até 50% da

Rafaella Rocha Figueiredo – <https://orcid.org/0000-0003-4190-6207>;
Marcelo Lourenço Da-Silva – <https://orcid.org/0000-0002-5523-5910>;
Josie Resende Silva – <https://orcid.org/0000-0002-6679-2675>;
Isabela de Paula Ribeiro Argôlo – <https://orcid.org/0000-0002-7292-0733>;
Luiz Fernando Xavier – <https://orcid.org/0000-0002-6045-2485>.

1. Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências da Motricidade, Laboratório de Neurociência, Neuromodulação e Estudo da Dor, Alfenas, MG, Brasil.

Apresentado em 20 de dezembro de 2022.

Aceito para publicação em 24 de fevereiro de 2023.

Conflito de interesses: não há – Fontes de fomento: Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código Financeiro 001.

DESTAQUES

- Estudo sobre uma doença que está em crescimento no Brasil e no mundo. Estima-se que no Brasil cerca de 30 mil óbitos/ano acontecem devido à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), sendo esta a quinta maior causa de morte no país.
- Animais com DPOC induzida por instilação de elastase traqueal apresentam níveis elevados de marcadores inflamatórios.
- Animais com DPOC apresentam respostas alteradas frente ao estímulo nocivo, sugerindo uma influência dos marcadores inflamatórios na percepção nociceptiva.

Correspondência para:

Rafaella Rocha Figueiredo

E-mail: rafaellafigueiredo_1990@hotmail.com

obstrução do ar em indivíduos com mais de 70 anos de idade^{1,3}. Estima-se que no Brasil cerca de 30.000 mortes/ano ocorrem devido à DPOC, sendo esta a quinta causa de morte no país. Além disso, os dados sugerem que há aproximadamente três milhões de pessoas com DPOC no Brasil, gerando cerca de 280.000 hospitalizações por ano⁴.

A doença respiratória pulmonar conhecida como DPOC, tem como principal característica a redução crônica do fluxo de ar, que não é totalmente reversível. Consequentemente, é progressiva e associada a uma resposta inflamatória anormal nos pulmões, que é causada principalmente pela inalação de gases tóxicos, principalmente pela fumaça de cigarro^{5,6}.

O processo inflamatório crônico pode produzir alterações nos bronquíolos, brônquios e/ou parênquima pulmonar, o que pode resultar em bronquite crônica, bronquiolite obstrutiva e enfisema pulmonar. Entretanto, tais mudanças são diferentes para cada indivíduo, estando relacionadas com os sintomas apresentados^{5,7}. Além disso, as consequências da DPOC experimentadas pelo paciente incluem perda de peso, intolerância ao exercício, dispnéia, aumento do gasto energético, redução da qualidade de vida e despesas financeiras, podendo levar à morte^{7,8}.

Embora a DPOC comprometa os pulmões, ela também produz complicações sistêmicas⁵. Assim, a DPOC pode ser considerada uma doença do sistema respiratório com manifestações sistêmicas⁹. Além disso, é uma doença com efeitos extrapulmonares que contribuem para sua gravidade⁵.

Estudos demonstram que pacientes com DPOC têm níveis mais altos de marcadores inflamatórios no sangue, como proteína C-reativa (PCR), fibrinogênio, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e citocinas inflamatórias, como a interleucina (IL-6 e IL-1 β)⁹⁻¹¹. Os marcadores inflamatórios seriam responsáveis pela redução do limiar de dor em pacientes com DPOC; entretanto, tais evidências ainda não estão descritas.

A dor é definida como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão

tecidual real ou potencial”. Essa geralmente tem origem no sistema nervoso periférico e é processada e interpretada pelo sistema nervoso central¹².

O sistema imunológico e a dor se influenciam mutuamente, além disso as células envolvidas na resposta inflamatória podem desencadear efeitos de hiperexcitabilidade crônica e mudanças na expressão fenotípica dos nociceptores, levando a um processamento anormal de sinais nocivos e exacerbação da sensação dolorosa^{13,14}. Assim, altos níveis de marcadores inflamatórios envolvidos na patogênese da DPOC podem influenciar as manifestações sistêmicas da doença, porém não é conhecido o impacto desses marcadores na sensibilização dos nociceptores, o que pode aumentar a sensação dolorosa. As células envolvidas na DPOC são linfócitos T (predominantemente linfócitos CD8+), macrófagos e neutrófilos. A ativação dessas células desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente leucotrieno LTB₄, IL-6, IL-8 e TNF- α . Os pacientes com DPOC estável têm concentrações pulmonares elevadas de IL-1 β e TNF- α ¹⁵⁻¹⁷.

O objetivo deste estudo foi avaliar a interação entre a liberação de citocinas pró-inflamatórias em diferentes modelos de dor em animais com DPOC induzida por elastase pancreática suína.

MÉTODOS

O presente estudo seguiu as diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) para experimentação com animais¹⁸.

Desenho do estudo

O desenho do estudo realizado com ratos com DPOC está apresentado na figura 1.

Tamanho da amostra

A lista de animais distribuídos em seus respectivos grupos está apresentada na tabela 1.

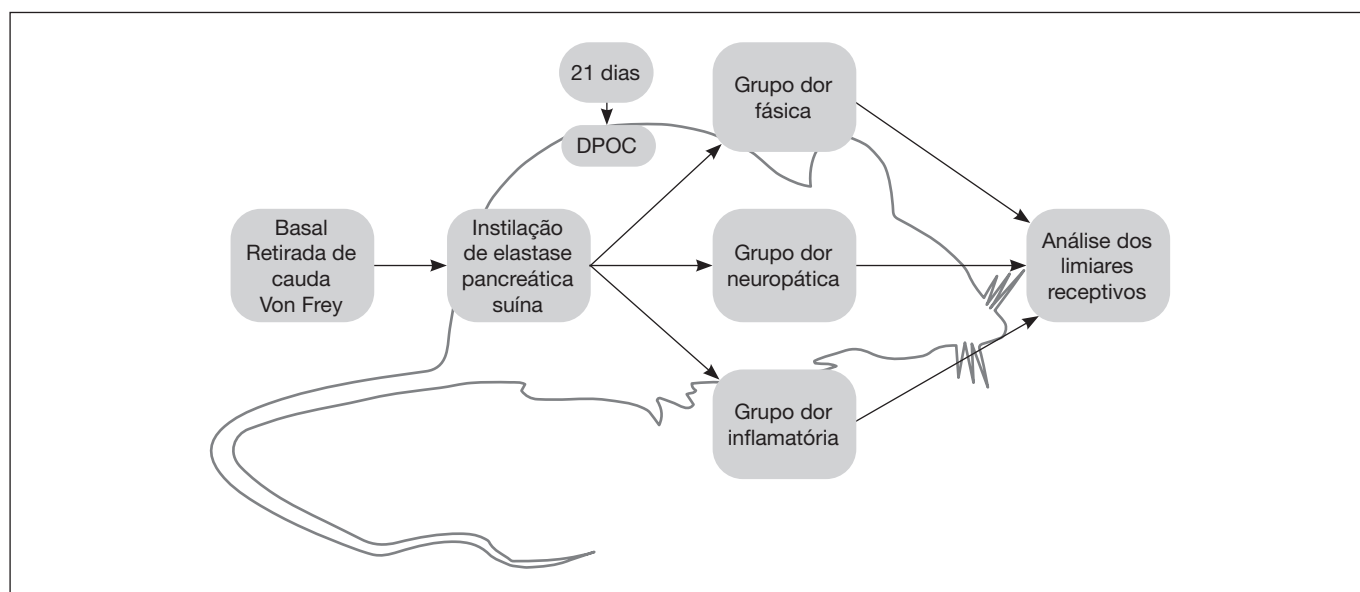


Figura 1. Delineamento do estudo realizado em ratos Wistar e distribuição dos grupos.

Tabela 1. Distribuição dos animais

Grupos		Animais
Retirada de cauda	Retirada de cauda salina	16
	Retirada de cauda salina citocina	8
	Retirada de cauda elastase	16
	Retirada de cauda elastase citocina	8
Dor Neuropática	CCI-Sham	16
	CCI-Sham citocina	8
	CCI	16
	CCI citocina	8
Dor inflamatória	CFA-Sham	16
	CFA-Sham citocina	8
	CFA	16
	CFA citocina	8

Critérios de inclusão e exclusão

Este estudo incluiu ratos wistar machos, com idade de sete a oito semanas, pesando entre 250 e 300 g, em condições fisiológicas normais e sem anormalidades físicas. Além disso, os animais eram excluídos se não apresentassem peso corporal e idade dentro da descrição, bem como se apresentassem qualquer alteração fisiológica.

Randomização

Neste estudo, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos três seguintes grupos: dor física, dor inflamatória e dor neuropática.

Cegamento/mascaramento

Os pesquisadores foram cegados no momento das análises de laboratório. Conseqüentemente, as análises de citocinas inflamatórias foram realizadas por um examinador externo ao estudo, e ele realizou a análise não sabia a que grupo o animal pertencia.

Medição de resultados

Os seguintes parâmetros foram avaliados: a latência da retirada de cauda por TF (três medições consecutivas com um intervalo de 5 minutos entre elas, e as medições foram calculadas como média), o limiar nociceptivo mecânico pelo teste digital Von Frey (através de uma pipeta de polipropileno, aplicada perpendicularmente à superfície plantar da pata traseira, por um período de aproximadamente 4 segundos ou até que o animal demonstrasse comportamento nociceptivo, caracterizado pela retirada da pata, seguida de lambida e/ou "flinching"; foram coletadas 3 medidas e a média entre elas foi calculada).

Análise estatística

Esta pesquisa utilizou Análise de Variância (ANOVA two-way), com comparações estabelecidas através do teste post-hoc de Bonferroni e usadas para a avaliação de dados, que foi realizada através do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (IBM, Chicago, EUA) versão 15.0. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Animais experimentais

Um total de 144 ratos wistar machos foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG). Os ratos foram mantidos em condições normais em gaiolas de acrílico, com temperatura entre 18 e 21°C, 55-60% de umidade relativa e um ciclo claro/escuro de 12 horas. Com alimentação padrão e água disponível até o dia da experiência. Os padrões éticos estabelecidos

para a experimentação com cordados, recomendados pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor), foram seguidos em todos os experimentos¹⁹. Os aspectos éticos do uso de animais em laboratório foram preparados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL-MG (nº19/2016).

Procedimentos experimentais

Indução de enfisema por elastase pancreática suína

Alguns modelos experimentais costumam ser utilizados para simular a DPOC: exposição a fumaça de cigarro, instilação intratraqueal de enzimas proteolíticas e cepas de animais geneticamente modificados²⁰. No presente estudo, foi utilizado o modelo de elastase pancreática suína, através do qual em cerca de 21 dias após a aplicação da enzima, já é possível observar danos pulmonares seguidos de alterações morfológicas, remodelação do parênquima pulmonar e comprometimento da função pulmonar, o que tornou o modelo adequado para estudar as alterações provocadas nas fibras do parênquima pulmonar em indivíduos com DPOC²¹.

Os animais foram anestesiados com cetamina (34 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) e xilazina (12 mg/kg, i.p.), e foi feita uma incisão cervical anterior para expor a traqueia; soro fisiológico estéril (0,9% NaCl, 5 µL; grupo salino) ou elastase pancreática suína (PPE; 0,6 U, Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluída em solução salina de 5 µL (grupo DPOC induzido por elastase)²¹ foram instilados usando uma agulha estéril Scalp 27. A incisão cervical foi fechada com uma sutura (4-0 Monocryl; Shalon Medical, Inc).

Modelo de dor física nociceptiva

Modificado no ano de 1982 por um estudo usado como referência²², o grau de antinocicepção foi medido através do TF²¹. Em um analgesímetro, com 2 cm da porção final da cauda aplicados, o animal foi gentilmente imobilizado. Em seguida o filamento de níquel-cromo foi aquecendo progressivamente a cauda do animal (aproximadamente 9°C/segundo) a partir da temperatura ambiente (23°C ± 1°C C) até atingir uma temperatura prejudicial (-53°C) em aproximadamente 3 segundos, sendo o aquecimento interrompido em 6 segundos para evitar danos ao tecido. Todos os animais tiveram seu limiar de base avaliado pelo TF através de três medições consecutivas em intervalos de 5 minutos. Após a medição da linha de base, os animais foram submetidos a uma cirurgia traqueal com elastase/solução salina e após 21 dias foram submetidos ao TF em T0, T1, T3, e T24 horas.

Modelo de dor inflamatória

Para induzir a resposta inflamatória persistente, os animais receberam uma injeção intraplantar (i.pl) de 100 µL do adjuvante completo de Freud (CFA) na superfície plantar da pata traseira direita. A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando a técnica digital de Von Frey²³. Por outro lado, o grupo controle recebeu uma injeção i.pl de soro fisiológico (100 µL). Quatro horas após CFA ou solução salina, o limiar nociceptivo mecânico foi avaliado em T0, T1, T3, e T24 horas.

Modelo de dor neuropática

O modelo de constrição do nervo ciático (CCI) foi utilizado para a avaliação da dor neuropática no presente estudo²⁴. Os animais

desenvolvem comportamentos que se assemelham à neuropatia em humanos, como a proteção do membro ferido (o animal tenta esconder a pata), sugerindo dor espontânea. Antes da cirurgia, os animais foram anestesiados com cetamina (34 mg/kg, p.i.) e xilazina (12 mg/kg, p.i.). Para expor o nervo ciático, foi feita uma incisão na região abaixo do glúteo onde a musculatura e a pele foram retraídas. Com quatro ligaduras de fio de seda, separadas por 2 mm, o nervo foi apertado e a pele foi suturada.

Ao final da cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos para evitar hipotermia e depois voltaram ao biotério. Para os animais do grupo CCI-Sham, apenas o nervo ciático foi exposto e a pele suturada, não sofrendo ligadura. Três dias após o procedimento, os animais foram testados e considerados hiperalérgicos quando o limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos correspondeu a pelo menos 50% do limiar de resposta da linha de base.

Teste mecânico nociceptivo

O limiar nociceptivo mecânico dos animais foi avaliado utilizando o teste de Von Frey digital (Insight Equipments, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Nesse processo, os animais foram colocados em caixas de acrílico com a face frontal posicionada sobre uma tela de arame que dá acesso à pata traseira, após aproximadamente uma hora para que os animais se adaptassem ao local. A seguir, o teste foi realizado pelo aparelho eletrônico de Von Frey, usando uma pipeta de polipropileno aplicada perpendicularmente na superfície plantar da pata traseira esquerda, nos períodos T0, T1, T3, e T24 horas²⁵. A força utilizada foi suficiente para gerar uma resposta positiva de retirada da pata^{26,27}.

Avaliação das citocinas pró-inflamatórias

Coleta de sangue

O sangue foi coletado pelo pesquisador através de punção cardíaca, usando a técnica de vácuo, em um ambiente estéril, sendo então embalado e armazenado para análise posterior. Após ser anestesiado com cetamina (34 mg/kg, i.p.) e xilazina (12 mg/kg, i.p.), o animal foi colocado em uma superfície plana e uma incisão foi feita na região anterior do tórax, sendo inserida uma agulha no ventrículo esquerdo para coleta de sangue. Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 15 minutos após a coleta. Posteriormente, o plasma foi removido em um gabinete de fluxo laminar, usando pipetas Pasteur previamente esterilizadas. Posteriormente, as amostras foram colocadas em Eppendorfs estéreis e armazenadas em um freezer com temperatura de -80°C, para análise. As amostras foram coletadas ao mesmo tempo pelo pesquisador, no início do experimento e 21 dias após a aplicação de elastase pancreática, nas horas T0, T1, T3, T24, conforme descrito no tópico de procedimentos experimentais²⁸.

Níveis de plasma dos mediadores inflamatórios

O ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um imunoenensaio enzimático que permite a detecção de anticorpos específicos. Além disso, esse teste é utilizado para o diagnóstico de várias doenças que induzem a produção de imunoglobulinas. No método ELISA, o antígeno é ligado a uma superfície (geralmente feita de poliestireno) por meio de um anticorpo. Uma vez que o antígeno é ligado ao anticorpo imobilizado, o complexo resultante pode ser reconhecido

por outro anticorpo, desta vez ligado a uma enzima que pode produzir um composto facilmente detectável. Para a análise dos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-6, foram coletados 4 mililitros de sangue²⁸.

A análise das concentrações plasmáticas de mediadores inflamatórios foi realizada utilizando o método ELISA sanduíche, através do kit Quantikine (HS, R&D Systems, Minneapolis, EUA), para analisar os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, de acordo com as instruções do fabricante^{15,28}.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos: grupo de dor física nociceptiva, grupo de dor inflamatória, e grupo de dor neuropática. No grupo de dor física nociceptiva, 16 ratos tiveram DPOC induzida, e outros 16 animais (grupo controle) receberam instilação salina em sua traqueia. 21 dias depois foi feita a aplicação do teste de retirada de cauda, nas horas T0, T1, T3 e T24, e 16 animais tiveram sangue retirado para análise dos marcadores inflamatórios do grupo. No grupo da dor inflamatória, 16 ratos com DPOC induzida foram submetidos ao CFA, e 16 animais tiveram sangue retirado para análise dos marcadores inflamatórios. No grupo da dor neuropática, 16 ratos com DPOC foram submetidos a cirurgia CCI, e 16 ratos com DPOC foram submetidos a cirurgia placebo (CCI-SHAM). Em ambos os grupos, o teste de von Frey foi realizado nas respectivas T0, T1, T3 e T24 horas e 16 animais tiveram sangue retirado para análise de marcadores inflamatórios.

RESULTADOS

Os animais avaliados pertenciam ao grupo TF (32 animais), ao grupo CFA (32 animais) e ao grupo CCI (32 animais), além de 48 animais para dosagem e análise de citocinas. Nos animais avaliados pelo método TF, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa no tempo 0 ($p < 0,05$), que corresponde ao tempo da cirurgia de indução de DPOC através da instilação de elastase pancreática suína, mas com um intervalo de 21 dias após a cirurgia para que a manifestação da doença ocorresse. Tal diferença também foi observada nas horas T1, T3, e T24.

Na figura 2, é possível observar que os animais com DPOC induzida, quando avaliados pelo TF, mostraram uma retirada precoce da cauda quando comparados aos animais do grupo controle. Além disso, no tempo 0, os animais com DPOC tinham um período de latência de cerca de 2,8 segundos, enquanto no grupo controle a retirada era de aproximadamente 3,5 segundos. O período de latência diminuiu ligeiramente em T1, T3, T24 horas para os animais do grupo DPOC, mostrando valores próximos a 2,7 segundos. Além disso, é possível observar que os ratos DPOC têm respostas diferentes de dor física quando comparados com o grupo controle, demonstrando que tais ratos reduziram o seu limiar nociceptivo.

Para análise das citocinas no grupo TF, é possível observar na figura 3 níveis de marcadores inflamatórios próximos à linha de base, já que a indução de enfiema ainda não havia sido realizada. Entretanto, após a indução da DPOC, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) para IL-1 β , sendo que em T0 os valores

desses marcadores tiveram um aumento evidente, seus níveis plasmáticos mais que dobraram em relação ao grupo de animais sem DPOC; houve um leve declínio ao longo do tempo, mas a diferença estatística permaneceu. Para IL-6 e TNF- α , uma similar redução leve nos níveis plasmáticos não ocorreu, mas houve um aumento na concentração desses marcadores ao longo do tempo até T24 horas, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Ao analisar as figuras 2 (TF) e 3 (Citocinas), é possível observar que, em ambas as figuras, em T0 houve diferenças significativas ($p < 0,05$), indicando que no momento da retirada de cauda, o tempo de latência dos animais com DPOC era menor e se sobrepuja

a níveis mais altos de IL-1 β , IL-6 e TNF- α ; o mesmo ocorreu em todos os momentos.

Na figura 4, foi possível observar que, para os valores de linha de base nos grupos CFA, no tempo 0, tanto os animais com DPOC quanto com solução salina induzida na pata apresentavam valores limiares de pressão similares, indicando que para o limiar mecânico, a presença de DPOC não influenciou a retirada da pata. Por outro lado, após a indução da hiperalgesia aguda por CFA, os animais com

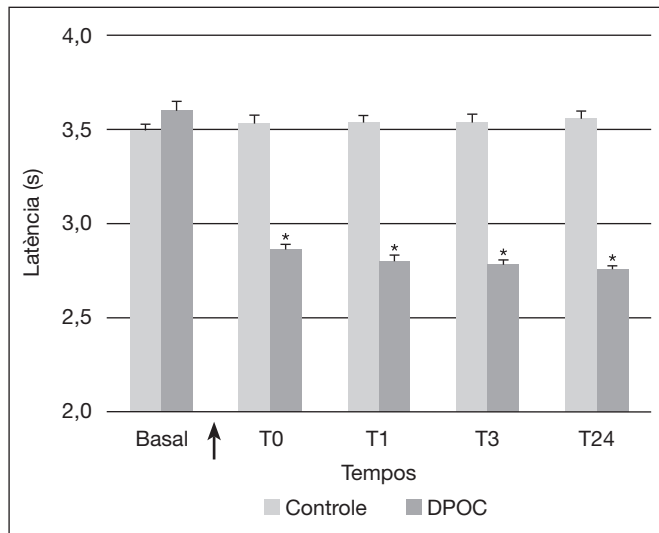


Figura 2. Avaliação da dor no grupo de dor física, usando o TF na linha de base (antes da indução da DPOC), em T0, T1, T3 e posteriormente em T24 horas, realizada 21 dias após a cirurgia de indução. *Significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo solução salina. As barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58} = 4,21$, $p < 0,01$) e ao tempo ($F_{4,126} = 0,12$, $p < 0,05$), com cálculo de interação tempo x tratamento ($F_{8,126} = 8,83$, $p < 0,05$).

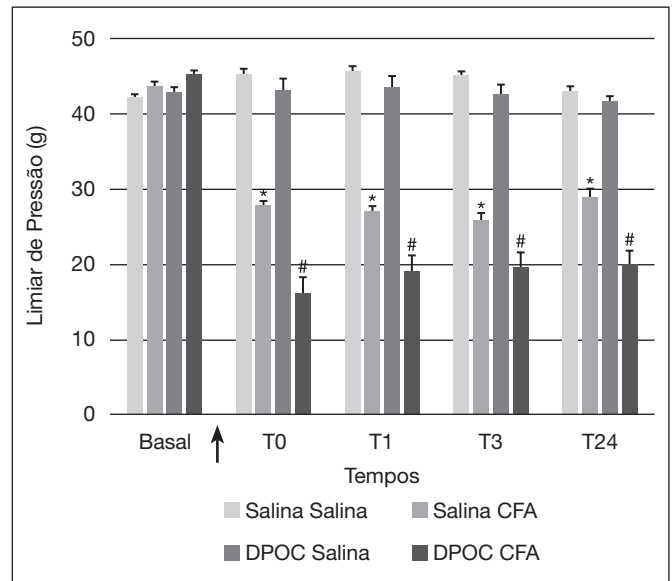


Figura 4. Avaliação da dor no grupo dor inflamatória através do teste de von Frey nos seguintes momentos: linha de base (antes da indução da DPOC), T0, T1, T3 e posteriormente T24 horas, realizada 21 dias após a cirurgia de indução.

*Significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo solução salina. # Diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). Na figura 4, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{3,20} = 65,43$, $p < 0,01$) e ao tempo ($F_{4,56} = 19,67$, $p < 0,05$), com cálculo de interação tempo x tratamento ($F_{12,56} = 44,53$, $p < 0,05$).

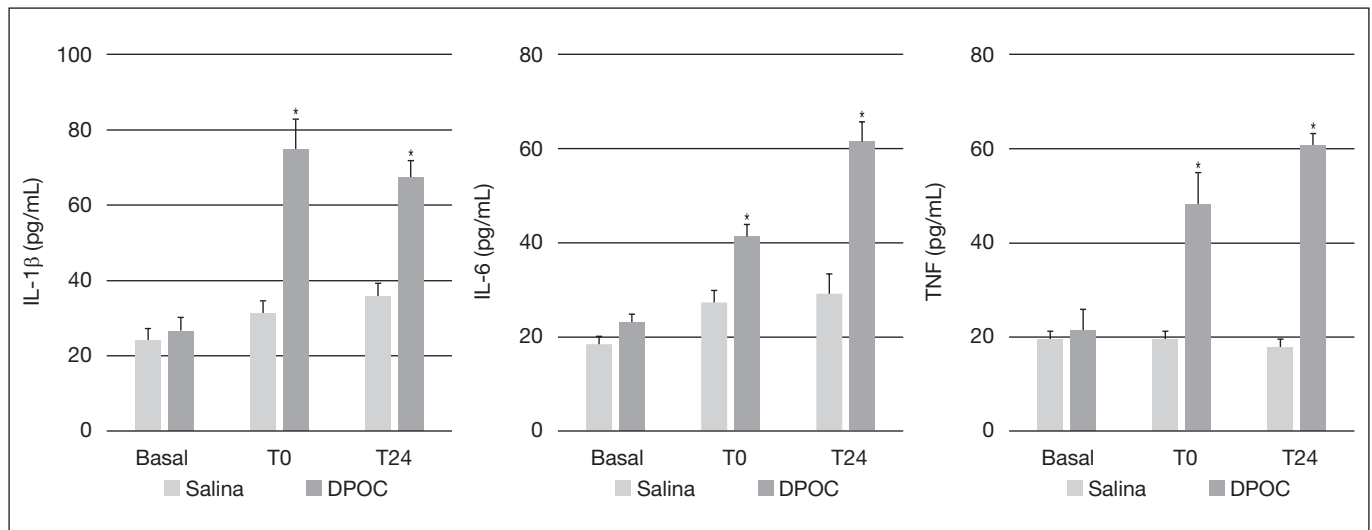


Figura 3. Avaliação dos marcadores inflamatórios dos animais pertencentes ao grupo TF, com a realização de retirada de sangue nos seguintes momentos: linha de base (antes da indução da DPOC), T0, T1, T3 e posteriormente T24 horas, realizados após 21 dias da cirurgia de indução. *Significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo solução salina. As barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58} = 3,18$, $p < 0,01$) e ao tempo ($F_{2,18} = 3,32$, $p < 0,05$), com cálculo de interação tempo x tratamento ($F_{5,18} = 4,23$, $p < 0,05$).

DPOC apresentaram um limiar de pressão inferior ao dos animais com solução salina, sugerindo que o processo inflamatório sistêmico da DPOC potencializou a resposta inflamatória local causada pela hiperalgesia aguda por CFA. Esse fato se repetiu durante as horas T1, T3 e T24.

Os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram maiores no plasma de animais com DPOC em 24 horas, com diferenças significativas ($p < 0,05$), sugerindo que vinte e quatro horas após a indução de hiperalgesia por CFA, as citocinas pró-inflamatórias originárias do processo inflamatório sistêmico da DPOC, associadas aos mediadores inflamatórios do processo causado pelo CFA, levaram a tal aumento, de acordo com os resultados encontrados e apresentados na figura 5.

Em relação ao CCI, os dados são mostrados na figura 6, na qual é possível observar resultados similares aos dos grupos CFA. O limiar de pressão mostrou valores similares para todos os grupos na linha de base, com valores em torno de 42 g. Os animais que foram submetidos à cirurgia CCI-Sham, tanto os com DPOC quanto os sem a doença, apresentaram valores de limiares de pressão próximos aos valores basais de von Frey, mostrando que a cirurgia CCI-Sham não alterou o limiar de pressão nestes animais.

Entretanto, nos animais que foram submetidos à cirurgia CCI, é possível observar uma diferença significativa ($p < 0,05$) no limiar de pressão em comparação com os animais CCI-Sham. Em contrapartida, para os animais pertencentes ao grupo DPOC-CCI, quando comparados aos animais sem a doença e com cirurgia CCI, o resultado do teste von Frey foi estatisticamente significativo no limiar de pressão, sugerindo que a presença de citocinas inflamatórias decorrentes da DPOC potencializa mudanças no limiar de pressão em caso de cirurgia CCI.

Ao analisar os marcadores inflamatórios no grupo CCI (Figura 7), é possível observar uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α de animais sem DPOC que foram submetidos à cirurgia CCI (solução salina), e animais com DPOC que também foram submetidos à cirurgia CCI, nos momentos T0 e T24. No momento 0, essa diferença foi

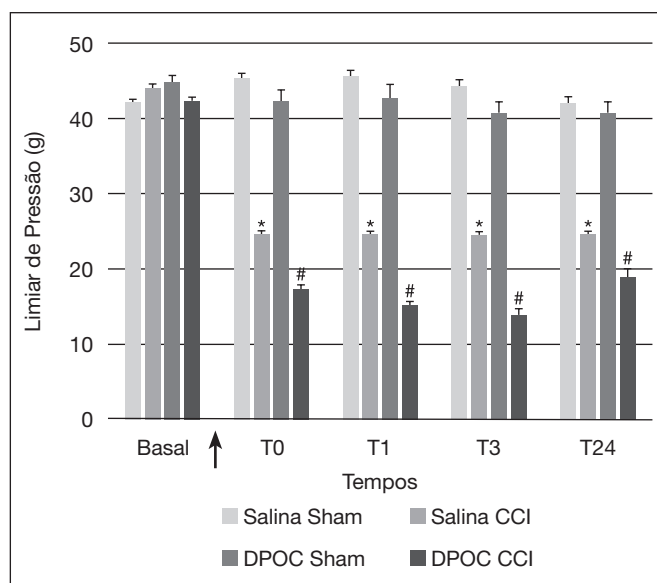


Figura 6. Avaliação da dor no grupo CCI, utilizando o teste de von Frey nos seguintes momentos: linha de base (antes da indução da DPOC), T0, T1, T3 e posteriormente T24 horas, realizada 21 dias após a cirurgia de indução.

*Significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo solução salina. # Diferente de todos os grupos ($P < 0,05$). Na figura 6, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{3,20} = 43,88$, $p < 0,01$) e ao tempo ($F_{4,56} = 56,71$, $p < 0,05$), com cálculo de interação tempo x tratamento ($F_{12,56} = 69,11$, $p < 0,05$).

menos pronunciada do que no momento 24 horas, mas com um resultado significativo em ambos os períodos.

Isso é consistente com o que foi descrito anteriormente, quando os animais com DPOC tiveram uma resposta ainda mais evidente ao teste de von Frey quando foram submetidos à cirurgia CCI, em comparação com os animais sem doença que foram submetidos à mesma cirurgia, o que corrobora os resultados mostrados na figura 7, a qual mostra que os níveis plasmáticos dos marcadores foram encontrados em maior número nos animais com DPOC.

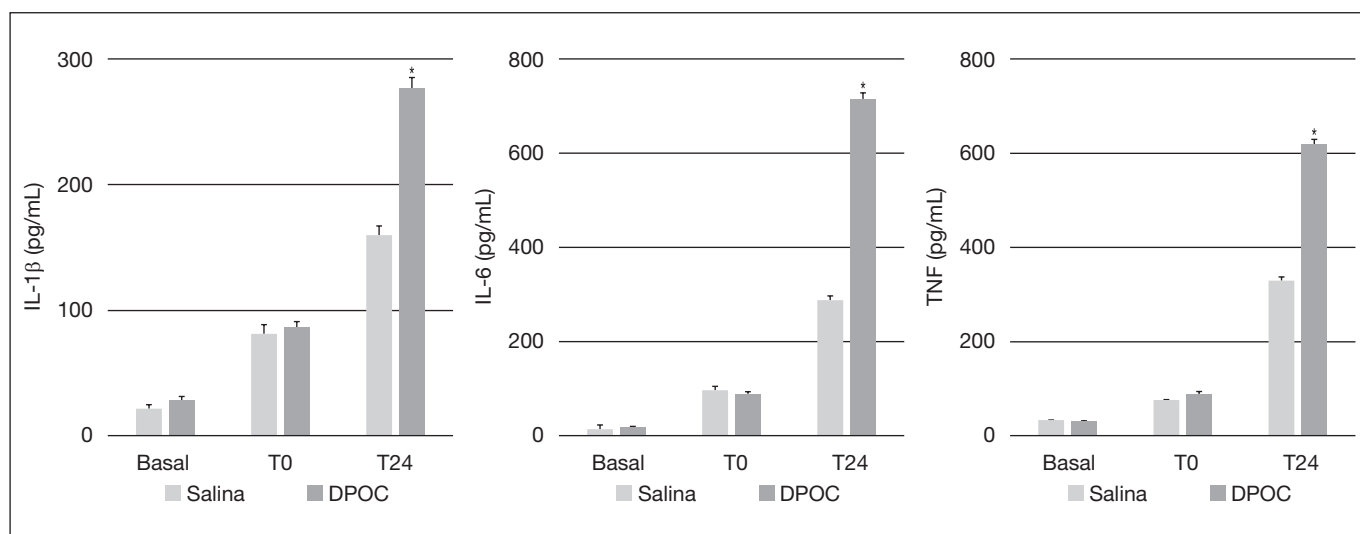


Figura 5. Avaliação dos marcadores inflamatórios em animais pertencentes ao grupo dor inflamatória, com coleta de sangue para análise nos seguintes momentos: linha de base (antes da indução da DPOC), T0, T1, T3 e posteriormente T24 horas, realizada 21 dias após a cirurgia de indução. *Significância ($p < 0,05$). Na figura 5, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58} = 5,87$, $p < 0,01$) e ao tempo ($F_{2,18} = 13,19$, $p < 0,05$), com cálculo de interação tempo x tratamento ($F_{5,18} = 8,61$, $p < 0,05$).

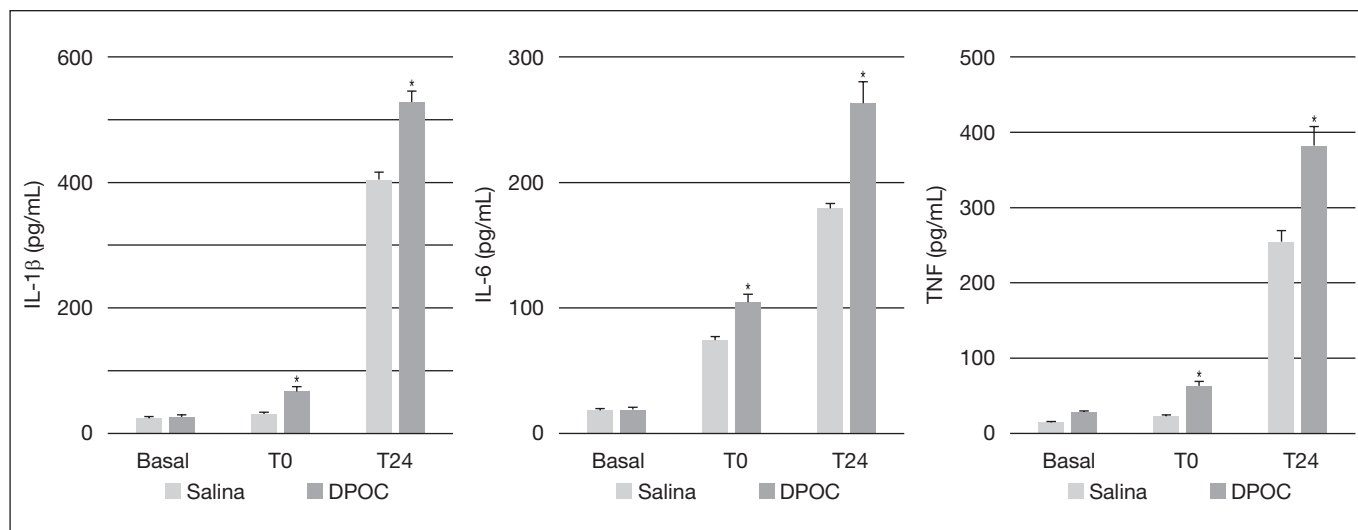


Figura 7. Avaliação dos marcadores inflamatórios em animais pertencentes ao grupo dor neuropática, utilizando retirada de sangue para análise posterior nos seguintes momentos: linha de base (antes da indução da DPOC), T0, T1, T3 e posteriormente T24 horas, realizada 21 dias após a cirurgia de indução.

*Significância ($p < 0,05$). Na figura 7, as barras foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{1,58} = 12.11$, $p < 0.01$) e ao tempo ($F_{2,18} = 4.62$, $p < 0.05$), com cálculo de interação tempo x tratamento ($F_{5,18} = 18.33$ $p < 0.05$).

DISCUSSÃO

Vários métodos são usados como modelo de indução de enfisema, o modelo usado no presente estudo foi a instilação de uma enzima proteolítica, elastase pancreática suína, mas existem outros métodos como a inalação de fumaça de cigarro, instilação de enzimas proteolíticas: protease vegetal (papaína), elastase neutrofílica humana (HNE) e instilação de lipopolissacarídeo intratraqueal²⁰.

Um estudo²⁹ apresentou o primeiro modelo utilizando a fumaça de cigarro em cobaias, que foram expostas à fumaça passiva por aproximadamente 20 semanas. Acredita-se que esse modelo retrata a forma moderada da DPOC centrilobular e o desenvolvimento de metaplasia nas células caliciformes das vias aéreas; assim, esse parece ser o modelo que retrata de forma mais confiável as alterações típicas dos seres humanos³⁰.

Em contrapartida, o uso de enzimas elastolíticas é muito bem descrito, com a vantagem de ter um custo mais baixo e um início mais rápido da DPOC, enquanto a exposição à fumaça do cigarro leva seis meses para desencadear o início da doença³¹, o que poderia inviabilizar o experimento. Há também uma falta de padronização e podem ocorrer variações, principalmente em relação a sistema e protocolo de exposição à fumaça do cigarro, e aos tipos de cigarros utilizados²⁹. Tais fatos foram decisivos para a escolha do modelo de indução da DPOC utilizado no presente estudo.

O modelo de indução da DPOC com instilação traqueal de enzimas proteolíticas imita o enfisema que ocorre em fumantes humanos com base na hipótese protease/anti-protease³¹. Isso porque o desequilíbrio protease/anti-protease da DPOC foi constatado após observações em fumantes que tinham um alto nível de α 1-antitripsina e um risco maior de desenvolver a doença³². Assim, várias enzimas capazes de degradar elastina intacta foram injetadas nos pulmões dos animais para produzir o enfisema pulmonar^{32,33}.

A DPOC resulta em uma série de efeitos sistêmicos importantes, como a inflamação sistêmica, devido à presença de estresse oxidativo

sistêmico, concentrações anormais de citocinas circulantes e ativação de células inflamatórias^{16,34}. Além disso, é uma doença pulmonar com manifestações extrapulmonares, nas quais as células inflamatórias liberam substâncias tais como elastase e colagenase, que modificam os componentes da matriz extracelular^{16,34}.

Vários mediadores envolvidos no processo inflamatório são responsáveis pelos eventos vasculares da inflamação, e podem estimular neurônios sensoriais locais, que contribuem para a ativação da dor e/ou da nocicepção³⁶⁻³⁸. No presente estudo, foi possível observar que animais com DPOC apresentavam altos níveis de marcadores inflamatórios, especificamente IL-1 β , IL-6 e TNF- α , em todos os grupos.

Já se sabe que as citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel fundamental na nocicepção periférica³⁹, no entanto sua relação com o limiar nociceptivo de indivíduos com DPOC ainda não foi descrita em nenhum estudo. No presente estudo, para o teste TF, um método que também avalia o reflexo de retirada da cauda sob interferência de projeções centrais, os resultados mostraram que os ratos pertencentes ao grupo DPOC tinham um limiar de latência inferior ao do grupo controle. Além disso, os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α estavam aumentados, indicando que esses marcadores contribuíram para a percepção alterada do limiar nociceptivo nos animais com DPOC.

O processo inflamatório pode gerar dor não apenas devido aos efeitos da migração leucocitária, acredita-se que as citocinas pró-inflamatórias também participam do processo e podem originar-se de células imunes neuronais e gliais, tanto no sistema nervoso periférico (SNP) como no sistema nervoso central (SNC), onde tais moléculas podem desencadear efeitos de hiperexcitabilidade crônica, levando a mudanças na expressão fenotípica dos nociceptores, o que resulta em processamento anormal e exacerbação de sinais nocivos¹³.

Na persistência do estímulo local agressivo, as células gliais que têm propriedades autorreguladoras perdem a capacidade de manter a homeostase bioquímica, fazendo com que o neurônio perca a função

celular e também cause sua morte programada³⁹. Além disso, esse fato pode justificar as descobertas encontradas no presente estudo, as quais mostram que a persistência de citocinas pró-inflamatórias do processo inflamatório sistêmico da DPOC poderia ser responsável pela percepção de estímulos nocivos alterados.

Corroborando com as justificativas deste estudo, de acordo com outra pesquisa³⁹ as mudanças na expressão dos canais iônicos, nas sinapses e nos receptores das células nervosas são capazes de promover mudanças nos neurotransmissores e nos neuromoduladores, permitindo que os neurônios centrais e/ou periféricos alcancem o limiar de despolarização mais cedo, gerando descargas ectópicas que amplificam e ativam células vizinhas nas quais os estímulos nociceptivos periféricos podem levar à sensibilização sináptica clássica, aumentando assim a resposta das fibras aferentes A e C^{40,41}.

Para avaliar a dor inflamatória, o presente estudo utilizou um teste de pressão crescente sobre a pata (teste de von Frey). Os resultados encontrados mostraram que houve uma diferença na resposta nociva em ratos com DPOC que tiveram CFA aplicado à pata, quando comparados aos animais de controle. Os animais com DPOC tiveram uma resposta exacerbada, sugerindo que os marcadores inflamatórios que estão elevados em animais com a doença podem ter contribuído para tal resposta.

De acordo com um estudo⁴² sobre a inflamação induzida pelo CFA, a IL-6 parece ser de grande importância, pois tem uma participação na indução do processo inflamatório e na geração da dor⁴³. A estimulação da IL-6 nas fibras aferentes dos nociceptores pode causar hiperalgesia durante a inflamação⁴⁴. Assim também foi constatado no presente estudo, no qual os animais com DPOC no grupo dor inflamatória tinham um limiar de pressão mais baixo quando comparados aos animais sem a doença, quando ambos os grupos tiveram aplicação de CFA, sugerindo que houve uma somatização das células pró-inflamatórias, contribuindo para a exacerbção do reconhecimento do estímulo mecânico. Por outro lado, outros marcadores foram aumentados, não apenas a IL-6, como descrito acima, mas também a IL-1 β e a TNF- α .

De acordo com um estudo²³ os mediadores liberados na resposta inflamatória, referentes à dor e a estímulos nocivos, são divididos em mediadores hiperalgésicos intermediários, que são liberados no início e durante a inflamação, e mediadores hiperalgésicos finais, que interagem diretamente com seus receptores específicos ou nociceptores de neurônios aferentes primários, causando sua sensibilização/estimulação, gerando assim uma redução no limiar de excitabilidade neuronal, um aumento na atividade espontânea da célula nervosa e um aumento na frequência de disparos em resposta a estímulos supra-limiares⁴⁵. Tais evidências podem justificar os resultados encontrados no presente estudo, no qual o grupo DPOC apresentou alteração na resposta a estímulos nocivos, evidenciando a presença de uma inflamação sistêmica capaz de alterar o limiar nociceptivo em ratos.

O modelo CCI, que promove alterações no SNP através de lesão ou ligação de nervos periféricos, resulta em quimiotaxia de amebócitos no local e, conseqüentemente, na liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β e a TNF- α ⁴⁶. Isso corrobora com as descobertas do presente estudo, no qual os animais pertencentes ao grupo CCI-Sham que não sofreram constrição do nervo ciático não apresentaram diferenças em relação ao limiar

de pressão. Por outro lado, os animais que foram submetidos à cirurgia CCI apresentaram um limiar de pressão mais baixo. Entretanto, ao comparar os animais sem a doença que sofreram CCI aos que sofreram DPOC, foi possível observar que ambos os grupos tiveram uma mudança no limiar de pressão, mas para aqueles com os níveis de marcadores já em maior quantidade (animais com DPOC) esse limiar foi alterado mais expressivamente, atingindo valores menores, sugerindo que as citocinas presentes na DPOC foram capazes de amplificar a resposta ao estímulo mecânico de nocicepção.

A TNF- α é uma das citocinas analisadas no presente estudo, ela tem a capacidade de iniciar o fluxo inflamatório, ativando outras citocinas, contribuindo para sua eficácia⁴⁶. Várias células podem liberar essa citocina, incluindo as células de Schwann; seus efeitos ocorrem através da interação com o receptor TNF tipo I (sTNRF1), que tem sua expressão aumentada após uma lesão neuronal⁴⁷. Esse marcador inflamatório apresentou níveis mais elevados após a indução da DPOC em todos os modelos de dor, tanto física quanto inflamatória e neuropática.

O conjunto de modificações funcionais e estruturais dos nociceptores resultantes de lesões teciduais é conhecido como neuroplasticidade. A eficácia da condução sináptica é descrita na literatura como sensibilização; ela pode afetar tanto o sistema nervoso central quanto o sistema nervoso periférico de pacientes com exposição crônica a agentes agressivos no sistema nervoso³⁹. Como no caso da DPOC, na qual a exposição crônica de marcadores inflamatórios sistêmicos, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , é capaz de alterar a percepção nociceptiva. Esse fato foi encontrado no presente estudo, no qual animais que tinham enfisema induzido por elastase, além de apresentarem níveis aumentados de tais marcadores, também tiveram respostas diferentes ao estímulo mecânico. Os animais com DPOC, além de apresentarem um limiar de latência menor no TF, também apresentaram um limiar de pressão reduzido quando comparados aos animais sem a doença que foram submetidos aos mesmos procedimentos tanto pela indução de hiperalgesia por CFA quanto por CCI.

A limitação encontrada no presente estudo foi a ausência de uma análise histológica dos pulmões dos animais, a fim de estabelecer relações entre o comprometimento do tecido pulmonar e o limiar nociceptivo.

CONCLUSÃO

Dados os resultados apresentados, foi possível verificar que os animais com DPOC possuíam altos níveis de marcadores inflamatórios, a saber IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Os animais com DPOC apresentaram respostas alteradas aos estímulos nocivos, ao mesmo tempo em que os níveis de citocinas foram elevados, sugerindo que, na doença em questão, além de ocorrer uma série de manifestações pulmonares, o processo inflamatório sistêmico decorrente da DPOC interfere na percepção dos estímulos nociceptivos.

Entretanto, foi possível observar uma mudança apenas na presença de estímulo por CFA e por CCI, indicando que na presença de um processo inflamatório local ou em uma neuropatia, as citocinas sistêmicas da DPOC se somariam, causando uma exacerbção do estímulo nociceptivo.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Rafaella Rocha Figueiredo

Análise Estatística, Coleta de Dados, Conceitualização, Gerenciamento de Projeto, Investigação, Metodologia, Redação - Preparação do Original, Redação - Revisão e Edição, Validação, Visualização.

Marcelo Lourenço da Silva

Análise Estatística, Software, Supervisão, Validação.

Josie Resende Torres da Silva

Gerenciamento de Projeto, Supervisão.

Isabela de Paula Ribeiro Argôlo

Coleta de Dados, Metodologia.

Luiz Fernando Xavier

Coleta de Dados.

REFERÊNCIAS

1. Ståhl E, Lindberg A, Jansson SA, Rönmark E, Svensson K, Andersson F, Löfdahl CG, Lundbäck B. Health-related quality of life is related to COPD disease severity. *Health Qual Life Outcomes*. 2005;3:56.
2. Coelho AEC, Avelar CIS, de Lucena Araujo H, Silva IMP, Mendes LNJ, de Oliveira Bernardino J, Freitas Melo SK, Carneiro YV, Vasconcelos ST. Abordagem geral da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC): uma revisão narrativa. *Rev Eletr Acervo Médico*. 2021;1(1):e8657-e.
3. Couto LC, Melo TA. Efeitos do treinamento resistido na capacidade funcional de pacientes com DPOC hospitalizados: revisão sistemática. *Rev Pesqui Fisioter*. 2019;9(4):563-71.
4. Monteiro R, Jatene FB, Pazetti R, Correia AT, Manoel LA, Bernardo WM, Riveiro DH, Oliveira AS. Avaliação das alterações morfológicas cardíacas secundárias ao enfisema pulmonar: estudo experimental em ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2004;19(4):341-7.
5. Roberto J, Brito J, Rogério RJJ. Consenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). 2000;26(Supl 1):1.
6. Marques GA, Oliveira PDD, Montzel M, Menezes AMB, Malta DC, Sardinha LMV. Tratamentos utilizados por portadores de DPOC no Brasil: Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. 2023;56.
7. Bagatini MA, de Oliveira VdSL, da Silva Naue W, editors. *Fisiopatologia do DPOC e suas implicações na funcionalidade*. IX Mostra Integrada de Iniciação Científica; 2019.
8. Buss AS, Silva LM. Comparative study of two quality of life questionnaires in patients with COPD. *J Bras Pneumol*. 2009;35(4):318-24.
9. Eagan TM, Ueland T, Wagner PD, Hardie JA, Mollnes TE, Damås JK, Aukrust P, Bakke PS. Systemic inflammatory markers in COPD: results from the Bergen COPD Cohort Study. *Eur Respir J*. 2010;35(3):540-8.
10. Oliveira PC. Apresentações clínicas da DPOC. *Pulmão*. 2013;22(2):15-8.
11. Junkes-Cunha M, Pelandré G, Maurici RJ. Relationship between levels of inflammatory markers and Sit and Stand activities in individuals with COPD. *Braz J Develop, Curitiba*. 2021;7(8):80904-16.
12. Part III I. Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. Classification of Chronic Pain. ed. Seattle: IASP Press; 1994.
13. de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anestesiol*. 2011;61(2):255-65.
14. de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão RJ. Citocinas e dor. *Rev Bras Anestesiol*. 2019;61(2):260-5.
15. Chiesa D. Efeito do exercício físico sobre a liberação de interleucina-1 [beta], interleucina-6 e fator de necrose tumoral-[alfa] em homens portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. 2005.
16. Dourado VZ, Tanni SE, Vale SA, Faganello MM, Sanchez FF, Godoy IJ. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol*. 2006;32(2):161-71.
17. Minetto M, Rainoldi A, Gazzoni M, Terzolo M, Borriero P, Termine A, Saba L, Dovio A, Angeli A, Paccotti P. Differential responses of serum and salivary interleukin-6 to acute strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2005;93(5-6):679-86.
18. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*. 2010;160(7):1577-9.
19. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16(2):109-10.
20. Cervilha DA. Avaliação experimental da responsividade das vias aéreas em camundongos após indução do enfisema pulmonar por elastase. 2014.
21. Santos LM, de Brito Cervilha DA, Cabral LD, Garcia ÉK, Teixeira VP, Brito JM, Moriya HT, Soncini R. Bronchial responsiveness in an elastase-induced mouse model of emphysema. *Respir Physiol Neurobiol*. 2014;194:9-14.
22. Azami J, Llewelyn MB, Roberts MHT. The contribution of nucleus reticularis paravagantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. *Pain*. 1982;12(3):229-46.
23. Cunha T, Verri Jr W, Poole S, Parada C, Cunha F, Ferreira SJI. Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. 2007;67:83.
24. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
25. Farghaly HS, Mahmoud AM, Abdel-Sater KA. Effect of dexmedetomidine and cold stress in a rat model of neuropathic pain: role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *Eur J Pharmacol*. 2016;776:139-45.
26. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1):55-63.
27. Richner M, Bjerrum OJ, Nykjaer A, Vaegter CB. The spared nerve injury (SNI) model of induced mechanical allodynia in mice. *J Vis Exp*. 2011;18(54):3092.
28. Akkurt I, Akyıldırım H, Mavi B, Kilincarslan S, Basyigit C. Photon attenuation coefficients of concrete includes barite in different rate. *Ann Nucl Energ*. 2010;37(7):910-4.
29. Wright JL, Churg A. Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. *Am J Physiol*. 1995;268(1 Pt 1):L17-20.
30. Tolnai J, Szabari MV, Albu G, Maár BA, Parameswaran H, Bartolák-Suki E, Suki B, Hantos Z. Functional and morphological assessment of early impairment of airway function in a rat model of emphysema. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(11):1932-9.
31. Barnabé V. Efeitos da atividade física intensa e moderada sobre a enfisema pulmonar: Universidade de São Paulo; 2010.
32. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med*. 2003;54:113-29.
33. Antunes MA, Rocco PR. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc*. 2011;83(4):1385-96.
34. Gloeckl R, Schneeberger T, Jarosch I, Kenn K. Pulmonary rehabilitation and exercise training in chronic obstructive pulmonary disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(8):117-23.
35. Rufino R, Silva JLS. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol*. 2006;32(3):241-8.
36. David B, Bafadhel M, Koenderman L, De Soyza A. Eosinophilic inflammation in COPD: from an inflammatory marker to a treatable trait. *Thorax*. 2021;76(2):188-95.
37. Larsson K. Inflammatory markers in COPD. *Clin Respir J*. 2008;2(Suppl 1):84-7.
38. Mycroft K, Krenke R, Górska K. Eosinophils in COPD-current concepts and clinical implications. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2020;8(8):2565-74.
39. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000;288(5472):1765-9.
40. Millan MJ. Descending control of pain. *Progr Neurobiol*. 2002;66(6):355-474.
41. De Ridder D, Adhia D, Vanneste S. The anatomy of pain and suffering in the brain and its clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021;130:125-46.
42. Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimm Rev*. 2009;8(7):538-42.
43. Zaringhalam J, Manaheji H, Mghsoodi N, Farokhi B, Mirzaie V. Spinal mu-opioid receptor expression and hyperalgesia with dexamethasone in chronic adjuvant-induced arthritis in rats. *Clin Exper Pharmacol Physiol*. 2008;35(11):1309-15.
44. Julius D. TRP channels and pain. *Ann Rev Cell Dev Biol*. 2013;29:355-84.
45. Foroud M, Vesal N. Evaluation of the anti-nociceptive effects of morphine, tramadol, meloxicam and their combinations using the tail-flick test in rats. *Vet Res Forum*. 2015 Fall;6(4):313-8.
46. Farghaly HS, Mahmoud AM, Abdel-Sater KA. Effect of dexmedetomidine and cold stress in a rat model of neuropathic pain: Role of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . *Eur J Pharmacol*. 2016;776:139-45.
47. Homma Y, Brull SJ, Zhang JM. A comparison of chronic pain behavior following local application of tumor necrosis factor alpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat. *Pain*. 2002;95(3):239-46.

