

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Fernanda Martins

**Investigação não-clínica da eficácia analgésica e da segurança da infiltração de gabapentina em modelo de dor pós-cirúrgica em camundongos**

Florianópolis

2022

Fernanda Martins

**Investigação não-clínica da eficácia analgésica e da segurança da infiltração de gabapentina em modelo de dor pós-cirúrgica em camundongos**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira.

Florianópolis

2022

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

Martins, Fernanda

Investigação não-clínica da eficácia analgésica e da segurança da infiltração de gabapentina em modelo de dor pós cirúrgica em camundongos / Fernanda Martins ; orientador, Juliano Ferreira, 2022.

55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. qPCR. 3. Desenvolvimento de fármacos. 4. Cirurgia. I. Ferreira, Juliano. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. III. Título.

Fernanda Martins

**Investigação não-clínica da eficácia analgésica e da segurança da infiltração de gabapentina em modelo de dor pós-cirúrgica em camundongos**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 15 de março de 2022

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Liliete Canes Souza Cordeiro  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Juliano Ferreira  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Filipe Carvalho Matheus  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2022.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Juliano Ferreira pela orientação ao longo desses anos de iniciação científica. Muito obrigada pela atenção, por todas as oportunidades, por todas as tardes de reunião compartilhando comigo seu conhecimento, seus ensinamentos, me proporcionando uma boa formação científica, sem dúvidas você é inspiração para todos os seus orientandos.

As minhas colegas de laboratório, por sempre me ajudar em todos os meus experimentos e acima de tudo a amizade. Agradeço pelos momentos de desabafo, choro, risadas, conversas e companhia, pelo auxílio e pelos melhores conselhos, não só sobre o laboratório, mas também sobre a vida. Obrigada por me ensinarem todas as práticas de laboratório, trabalho com animais, por compartilhar seus conhecimentos científicos, sua paixão por laboratório e por toda a paciência.

As minhas amigas Luísa, Iara, Heloísa, Gabriela e Tainee que estiveram comigo durante a graduação. Com certeza levarei vocês comigo para a vida toda, obrigada pela ajuda, companheirismo e por todos os momentos que tivemos durante esses anos. Desejo sucesso a todas vocês!

A minha família, pelo apoio incondicional, em especial ao meu pai que há um ano virou minha estrelinha e inspiração para seguir em frente. Pai, muito obrigada por sempre acreditar, me incentivar a sempre lutar pelos meus sonhos e estar ao meu lado, sem você eu não teria conseguido seguir em frente, essa conquista é sua.

Ao meu namorado, por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis que passei. Essa conquista será a primeira de muitas que conquistaremos juntos.

Aos professores Filipe e Alfeu por aceitarem o convite para compor a banca e avaliar esse trabalho.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Santa Catarina e aos órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo suporte financeiro durante minha caminhada nos anos de iniciação científica.

Muito obrigada!



## RESUMO

A dor pós-operatória é uma forma comum de dor na prática clínica (cerca de 70% dos pacientes apresentam dor de moderada a intensa logo após cirurgias), mas o padrão ouro do seu tratamento (fármacos opioides) possui grande limitação por indução de efeitos adversos sistêmicos e graves. O fármaco gabapentina também é utilizado por via oral para o tratamento da dor pós-operatória e para redução do consumo de opioides, mas similarmente causa efeitos adversos sistêmicos relevantes. Entre as estratégias para evitar efeitos adversos sistêmicos e melhorar a segurança dos fármacos utilizados para a dor pós-operatória, destaca-se o uso de analgesia por infiltração de fármacos (p.ex. anestésicos locais) no local da incisão. Assim, o objetivo do presente estudo foi à investigação pré-clínica da eficácia analgésica e da segurança da infiltração de gabapentina em modelo de dor cirúrgica em camundongos. A gabapentina (1-5%) foi infiltrada no período transoperatório de cirurgia de incisão na pele de camundongos C57/BL6 anestesiados. Foram avaliados parâmetros de comportamentos relacionados à dor e edema, além de efeitos adversos, nos períodos pré e pós-operatório. A infiltração com gabapentina preveniu amplamente o desenvolvimento e a manutenção da hiperalgesia, com duração de 0,25 a 48 horas após a cirurgia. Efeito esse dependente da dose, com efeito parcial obtido com a dose de 1% e com inibições máximas nas doses de 3 e 5%. Em relação aos comportamentos afetivos motivacionais, a gabapentina (3%) preveniu amplamente desde 0,25 a 48 horas após a cirurgia. A gabapentina 3% foi capaz de prevenir de maneira muito eficaz o edema pós-operatório, com efeito, 2 horas após a cirurgia, mantendo-se por até 48 horas. Verificamos também que o efeito anti-hiperalgésico da gabapentina em fêmeas foi de curta duração, não sendo mais detectado de 4 à 24 horas após a cirurgia e sendo estatisticamente diferente do efeito observado em machos nesses tempos. As fêmeas apresentaram redução significativa do comportamento afetivo motivacional somente 2 horas após a cirurgia, mas com eficácia menor do que nos machos. Quanto ao edema, curiosamente, a infiltração com gabapentina em fêmeas aumentou o edema observado 2 horas após a cirurgia. Por fim, buscando avaliar o possível efeito adjuvante da gabapentina na infiltração com anestésicos locais antes da cirurgia, associamos uma dose baixa de gabapentina (1%) com o anestésico local bupivacaína (0,5%). A combinação de bupivacaína 0,5% + gabapentina 1% reduziu a hiperalgesia e comportamentos afetivo-motivacionais significativamente com efeito precoce e de longa duração. A combinação de bupivacaína + gabapentina também reduziu o edema 2, 24 e 48 horas após a cirurgia. Em relação aos efeitos adversos, nenhum dos nossos tratamentos alterou os parâmetros de motores/sensoriais e sangramento. Sendo assim, concluímos que a gabapentina infiltrada apresentou efeito antinociceptivo e antiedematogênico em modelo de dor pós-operatória de maneira sexualmente distinta, indicando sua viabilidade como ferramenta farmacológica útil no manejo da dor pós-operatória.

**Palavras-chave:** qPCR. Desenvolvimento de fármacos. Cirurgia.



## ABSTRACT

Postoperative pain is a common form of pain in clinical practice (about 70% of patients have moderate to severe pain right after surgery), but the gold standard used as treatment (opioid drugs) in surgeries has a major limitation due to inducing systemic and severe adverse effects. The drug gabapentin is used orally for the treatment of postoperative pain and to reduce the consumption of opioids, but it similarly causes relevant systemic adverse effects. Among the strategies to avoid systemic adverse effects and improve the safety of drugs used for postoperative pain treatment, the use of analgesia by infiltration drugs (eg, local anesthetics) at the incision site stands out. Thus, the aim of the present study was the pre-clinical investigation of the analgesic efficacy and safety of gabapentin infiltration in a mouse model of surgical pain. Gabapentin (1-5%) was infiltrated during the intraoperative period of skin incision surgery in anesthetized C57/BL6 mice. Behavior parameters related to pain and edema were measured, in addition adverse effects were assessed, in the pre and postoperative periods. Infiltration with gabapentin largely prevented the development and maintenance of hyperalgesia, lasting from 0.25 to 48 hours after surgery. This effect is dose-dependent, with partial effect obtained with a dose of 1% and with maximum inhibitions at doses of 3 and 5%. Regarding motivational affective behaviors, gabapentin (3%) largely prevented from 0.25 to 48 hours after surgery. Gabapentin 3% was able to prevent effectively the postoperative edema in 2 hours after surgery, lasting for up to 48 hours. We also verified that the anti-hyperalgesic effect of gabapentin in females was short-lived, not being detected from 4 to 24 hours after surgery and being statistically different from the effect observed in males at these times. Female mice showed a significant reduction in affective motivational behavior only 2 hours after surgery, but with lower effectiveness than males. Interestingly, gabapentin infiltration in females increased the edema observed 2 hours after surgery. Finally, in order to assess the possible adjuvant effect of gabapentin on infiltration with local anesthetics before surgery, we associated a low dose of gabapentin (1%) with the local anesthetic bupivacaine (0.5%). The combination of 0.5% bupivacaine + 1% gabapentin significantly reduced hyperalgesia and affective-motivational behaviors with an early and long-lasting effect. The combination of bupivacaine + gabapentin also reduced edema in 2, 24 and 48 hours after surgery. Regarding adverse effects, none of our treatments changed the motor/sensory and bleeding parameters. Therefore, we conclude that the infiltrated gabapentin had a sexually distinct antinociceptive and antiedematogenic effect in the postoperative pain model, indicating its viability as a useful pharmacological tool in the management of postoperative pain.

**Keywords:** qPCR. Drug development. Surgery.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da infiltração de gabapentina na hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de dor pós-operatória em camundongos machos.....	21
Figura 2. Efeito da infiltração de gabapentina nas respostas afetivas motivacionais (RAM) induzida pelo modelo de dor pós-operatória em camundongos machos.....	22
Figura 3 – Efeito do tratamento com Veículo (PBS) ou Gabapentina (1%, 3 % e 5%) no edema observado no modelo de dor pós-operatória em machos.....	24
Figura 4 – Efeito do tratamento com Veículo (PBS) ou Gabapentina (1%, 3 % e 5%) na hiperemia induzida pelo modelo de dor pós-operatória em machos.....	25
Figura 5 – Efeito da gabapentina na nocicepção e edema pós-operatório em animais machos e fêmeas.....	27
Figura 6 – Decurso temporal do tratamento com gabapentina (1%), bupivacaína 0,5% e sua associação na nocicepção pós-operatória em machos.....	29
Figura 7 – Decurso temporal do tratamento com gabapentina (1%), bupivacaína 0,5% e sua associação na nocicepção pós-operatória em machos.....	30
Figura 8 – Efeito do tratamento com gabapentina no sangramento pós-cirurgia.....	33
Figura 9 – Expressão do Cacna2d1 após falsa cirurgia e cirurgia.....	35
Figura 10 – Expressão do TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ após falsa cirurgia, cirurgia e tratamento com gabapentina 3%.....	36

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Efeitos adversos em animais machos tratados com veículo (PBS), gabapentina nas doses de 1%, 3% e 5%, bupivacaína 0,5% e bupivacaína 0,5% + gabapentina 1%.....32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de variância (do inglês, *Analyses of variance*)

ARRIVE - Pesquisa Animal e Relato de Experimentos in vivo (do inglês, *Animal in Research: Reporting in vivo Experiments*)

B – Basal

CaV – Canal ativado por voltagem

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CCDV – Canais de cálcio dependente de voltagem

GABA – Ácido gama-aminobutírico

IASP – *International Association for Study of Pain*

LAFEX – Laboratório de Farmacologia Experimental

PBS – Salina tamponada com fosfato (do inglês, *Phosphate-buffered saline*)

qPCR – Reação em Cadeia Polimerase quantitativa em tempo real (do inglês, *Polymerase Chain Reaction Real Time*)

RAM – Respostas Afetivas Motivacionais

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic acid*)

RNAm – RNA mensageiro

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

TRPs – Receptores de Potencial Transitório (do inglês, *Transient Receptor Potential*)

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VGCC – Canal de cálcio controlado por voltagem (do inglês, *Voltage gated calcium channel*)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>16</b>
3.1	ANIMAIS .....	16
3.2	Fármacos e reagentes.....	16
3.3	Modelo de dor pós-operatória.....	16
3.4	ANÁLISES COMPORTAMENTAIS RELACIONADOS À DOR.....	17
<b>3.4.1</b>	<b>Hiperalgesia mecânica.....</b>	<b>17</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Comportamento Afetivo Motivacional (AMB) relacionado a dor .....</b>	<b>17</b>
3.5	ANÁLISES DE TOXICIDADE .....	18
<b>3.5.1</b>	<b>Avaliação de efeitos adversos induzidos por anestésicos locais .....</b>	<b>18</b>
3.6	ANÁLISE MOLECULAR .....	18
<b>3.6.1</b>	<b>Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....</b>	<b>18</b>
3.7	Análise Estatística.....	19
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>20</b>
4.1	ANÁLISES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À NOCICEPÇÃO ....	20
4.2	ANÁLISES DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS .....	23
4.3	COMPARAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI- EDEMAOGÊNICO DA GABAPENTINA EM MACHOS E FÊMEAS .....	26
4.4	EFEITOS DA INFILTRAÇÃO COMBINADA DE BUPIVACAÍNA E GABAPENTINA.....	28
4.5	AVALIAÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS .....	31
4.6	ANÁLISE MOLECULAR .....	31

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Os processos dolorosos afetam milhões de pessoas e são a principal causa de procura aos serviços de saúde por todo o mundo. A Associação Internacional para Estudos da Dor (do inglês *International Association for Study of Pain* - IASP) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante àquela associada a, dano real ou potencial ao tecido” (IASP, 2020). Em relação a sua causa, a IASP classifica a dor em nociceptiva (que ocorre com um sistema nervoso somatossensorial funcionando normalmente e que possui caráter fisiológico de proteção, alertando o organismo sobre um perigo iminente), inflamatória (relacionada ao dano tecidual), dor nociplástica (que surge da nocicepção alterada sem haver evidência de dano tecidual e doença ou lesão do sistema somatossensorial) e dor neuropática (dor originada de uma lesão ou doença afetando o sistema somatossensorial) (LOESER; TREEDE, 2008). Nas dores patológicas (inflamatória, nociplástica e neuropática), pode ser observado nos pacientes o aparecimento de dor a estímulos antes inócuos (alodínia), como um leve toque, ou ainda, ocorre a percepção exacerbada da dor a estímulos dolorosos (hiperalgesia) e também aparecimento da dor espontânea, descrita como dor em queimação (CRUCCU et al., 2010).

A dor pós-operatória é uma forma comum de dor aguda na prática clínica, que possui componentes de dor não somente nociceptiva e inflamatória, mas também neuropática (JAMES, 2017). O tratamento da dor aguda em pacientes cirúrgicos tem sido amplamente reconhecido como uma questão importante nos cuidados de saúde. Entretanto, aproximadamente 50-70% dos pacientes ainda experimentam dor moderada a grave após a cirurgia. Além disso, o tratamento inadequado da dor aguda também pode contribuir para o desenvolvimento de dor pós-cirúrgica persistente e pode estar associado a um impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes (CHOU et al., 2016). Finalmente, tanto a dor quanto a analgesia pós-operatória possui diferenças intersexuais. De fato, o sexo feminino é fator de risco para persistência da dor pós-operatória e a eficácia de analgésicos na dor pós-operatória é diferente em homens e mulheres (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019; LAVAND’HOMME, 2017; KIM et al., 2019)

Os opioides são considerados o tratamento “padrão ouro” para a dor pós-operatória, podendo ser utilizados por vias de administração sistêmica (p.ex. oral ou endovenosa) ou central (p.ex. intratecal). No entanto, alguns pacientes fazem uso inadequado ou persistente desses opioides, o que prejudica a qualidade de vida pós-

cirúrgica (NEUMAN; BATEMAN; WUNSCH, 2019). Além da tolerância, uma preocupação comum em relação ao uso de opioides é o desenvolvimento de efeitos adversos sistêmicos ou centrais, como abuso, dependência e constipação (KRAUSE; SREDNI, 2016).

Entre as estratégias para reduzir o consumo de opioides no pós-cirúrgico, destaca-se o uso de analgesia por infiltração de fármacos (geralmente anestésicos locais) no sítio da incisão. Em uma revisão sistemática que avaliou as evidências das intervenções analgésicas após artroplastia total do quadril, foi relatado que a analgesia por infiltração local reduziu significativamente o consumo de morfina nos pacientes (KARLSEN et al., 2015). Entretanto, a analgesia infiltrativa possui algumas desvantagens como curta duração e possibilidade de efeitos adversos locais (p.ex. sangramentos e disfunção motora-sensorial) e sistêmicos como tontura, sonolência e convulsões (CHOU et al., 2016). Assim, a investigação de fármacos analgésicos mais seguros e eficazes para o tratamento da dor pós-operatória é urgentemente necessária.

Células excitáveis, como neurônios e células musculares, contêm canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) que são necessários para mediar funções de liberação de transmissores, secreção de hormônios, contração, transcrição gênica, entre outras funções (TERASHIMA et al., 2013). Os CCDV são classificados de acordo com suas propriedades biofísicas e farmacológicas em canais tipo L, N, P/Q, R (ativados por alta voltagem:  $\sim -30\text{mV}$ ) e T (ativados por baixa voltagem:  $\sim -60\text{ mV}$ ) (DOLPHIN, 2016; NEUMAIER et al., 2015; ZAMPONI et al., 2015). Os CCDV são formados pela associação de uma subunidade formadora principal ( $\alpha_1$  dos subtipos Cav1 a 3) e acessórias ( $\alpha_2\delta$ , beta e gama) e estão distribuídos de maneira diferente por todo o organismo. Subunidade de canais de cálcio da família Cav2 (formadoras das correntes, N, P/Q e R) são expressos especialmente em neurônios das vias periféricas e centrais de dor e são regulados por subunidade acessórias  $\alpha_2\delta$  (ZAMPONI et al., 2015). As subunidades regulatórias  $\alpha_2\delta$  são os principais alvos para a ação dos fármacos gabapentinoídes, como a gabapentina e a pregabalina (CHINCHOLKAR, 2018). Os gabapentinoídes foram desenvolvidos para atuar no tratamento da epilepsia como análogos do ácido gama-amino butírico (GABA), porém foi descoberto que eles não atuam pela via Gabaérgica e sim pelo bloqueio das subunidades  $\alpha_2\delta_1$  (codificada pelo gene *Cacna2d1*) e  $\alpha_2\delta_2$  (*Cacna2d2*) dos CCDV, diminuindo a amplitude das correntes

de cálcio. Atualmente, eles têm sido uma importante ferramenta no manejo farmacológico da dor (especialmente a neuropática), com o mecanismo molecular exato ainda incerto. A maioria dos estudos mostra que os gabapentinoides inibem a liberação de neurotransmissores, pela interação direta com CCDVs (DOLPHIN, 2016). Gabapentinoides também inibem a reciclagem dependente de rab11 de VGCCs endossomais, reduzindo a expressão de VGCC e a liberação de transmissores. Independentemente de sua associação com CCDVs, as subunidades  $\alpha 2\delta$  podem interagir com proteínas da matriz extracelular, como trombospondinas, e mediar a sinaptogênese excitatória, um processo que também é inibido pela gabapentina (PATEL; DICKENSON, 2016).

O uso oral de gabapentinoides aumentou substancialmente nos últimos anos, após dados iniciais promissores com relação ao controle da dor pós-operatória aguda. Porém, metanálises recentes revelaram que dados anteriores provavelmente subestimaram os efeitos adversos associados (KUMAR; HABIB, 2019). De fato, a utilização oral dos gabapentinoides pode ocasionar o aparecimento de efeitos adversos sistêmicos como tontura, vertigem, confusão mental, ganho de peso e edema de membros inferiores (KRAUSE; SREDNI, 2016). Além disso, tem havido uma preocupação crescente com relação ao potencial de uso indevido ou abusivo de gabapentinoides (KUMAR; HABIB, 2019).

Apesar dos efeitos terapêuticos e adversos dos gabapentinoides serem geralmente relacionadas às suas ações no sistema nervoso central, várias evidências apontam a existência de efeitos periféricos. Estudo pioneiro demonstrou que a infiltração local de gabapentina, diminuiu significativamente os comportamentos relacionados à dor induzidos pela injeção subcutânea do agente irritante formalina em ratos (CARLTON; ZHOU, 1998). Este resultado foi confirmado em estudos desenvolvidos por outro grupo de pesquisadores (ORTIZ et al., 2006). Além disso, o tratamento tópico da região afetada com géis contendo gabapentina causa analgesia não somente em modelos não-clínicos de dor em roedores (SHAHID et al., 2017; 2019), mas também em pacientes com diferentes tipos de dor neuropática, sem produzir efeitos adversos locais ou sistêmicos (HIOM et al., 2015). Assim, os resultados da literatura indicaram que a administração periférica da gabapentina exerce alívio da dor patológica, com prevenção de efeitos adversos sistêmicos. Porém, ainda não foram realizados estudos não-clínicos para investigar não somente o efeito tipo analgésico, mas também a segurança de gabapentinoides infiltrados nos sítios da incisão.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1.1 Objetivo Geral**

O objetivo do presente trabalho foi investigar o potencial analgésico e de segurança da infiltração local de gabapentina em modelo não-clínico de dor pós-operatória em camundongos.

### **2.1.2 Objetivos Específicos**

1. Selecionar a dose de gabapentina infiltrada com melhor janela terapêutica (maior eficácia/menor toxicidade);
2. Comparar a eficácia e segurança da gabapentina infiltrada com o anestésico local bupivacaína infiltrado (controle positivo de eficácia local e segurança sistêmica);
3. Comparar a eficácia e segurança da gabapentina infiltrada em machos e fêmeas;
4. Verificar a expressão periférica e central de alvos farmacológicos relacionados a gabapentina após a cirurgia e após a administração do fármaco.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem C57BL/6-UFSC (18-25 g) fêmeas e machos, com seis a oito semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental da Universidade Federal de Santa Catarina (LAFEX). Os animais foram acondicionados em caixas de acrílico com no máximo seis animais por caixa, sendo mantidos em microisoladores, com temperatura controlada ( $22 \pm 2$  °C), em ciclo claro/escuro de 12 horas e com acesso livre a água e ração. Os experimentos foram conduzidos de acordo Zimmerman (1983) e seguiram a diretriz para pesquisa animal ARRIVE (*Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments*, 2010). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC N° 3495231121.

#### 3.2 FÁRMACOS E REAGENTES

Gabapentina, pregabalina e PBS foram compradas da Sigma-Aldrich. A bupivacaína usada foi da marca comercial Tradinol® (Hypolabor, cloridrato de bupivacaína 0,5%, sem vasoconstritor). O isoflurano usado foi da marca comercial Isoforine® (Cristália). Os reagentes e primers para qPCR foram obtidas da Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA) (DE AMORIM et al., 2021).

#### 3.3 MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA

Para indução da dor pós-operatória (TONELLO et al., 2020), os animais machos e fêmeas foram anestesiados em uma caixa saturada com isoflurano e mantidos em máscaras ventiladas com saturação de oxigênio de 500 mL por minuto em circuito semi-aberto e mantidos com isoflurano 2%. A antisepsia foi realizada com clorexidina 2% seguida de solução de iodo-povidona 10%, após, a pata direita do animal foi posicionada em um campo cirúrgico, e em seguida, foi realizada uma incisão de 5 mm com uma lâmina número 11, através da pele e subcutâneo do animal, a incisão inicia-se 2 mm da borda proximal e se estende até próximo aos dedos. A pele foi posicionada com uma sutura

único em ponto isolado simples, a fim de conferir melhor captação das bordas e fio nylon 6.0, não absorvível e monofilamentar. Os animais falso-operados (*Sham*) foram submetidos apenas ao procedimento anestésico, assepsia e posicionamento cirúrgico.

A fim de aumentar a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, bem como obter validade dos tratamentos em ambos os sexos, o modelo foi induzido em machos e em fêmeas. Associado às medidas dos parâmetros nociceptivos comportamentais (descritos abaixo), o edema da pata operada foi avaliado com auxílio de um paquímetro manual. As características cicatriciais foram observadas pelo experimentador, para posteriores tomadas de decisão quanto aos critérios de inclusão e exclusão do grupo experimental, como por exemplo, deiscência das suturas ou infecção local.

### 3.4 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS RELACIONADOS À DOR

#### 3.4.1 Hiperalgisia mecânica

A hiperalgisia mecânica foi avaliada com filamentos de von Frey (0,008-4 g). O limiar de 50% de resposta será determinado pelo método de *Up-and-Down* de Dixon (1980), de acordo com (CHAPLAN; POGREL; YAKSH, 1994). A pata traseira dos animais foi estimulada com os filamentos de von Frey (0,008–4) g com incrementos logaritmos crescentes. O limiar de retirada de pata foi expresso em gramas (g). Uma redução significativa do limiar 50% de resposta dos animais comparados aos valores basais foi considerada hiperalgisia mecânica.

#### 3.4.2 Comportamento Afetivo Motivacional (AMB) relacionado a dor

A pata do animal foi observada por um minuto após a aplicação de cada filamento de von Frey. De acordo com a posição da pata durante o período de observação, foram atribuídos diferentes escores. No final do teste teremos um total de 6 medidas e o resultado será expresso como o somatório dos escores obtidos nas 6 medidas (XU e BRENNAN, 2010) (CORDER et al., 2017), dividido pelo número de respostas positivas a exposição ao filamento de Von Frey.

### 3.5 ANÁLISES DE TOXICIDADE

Para avaliar se o surgimento de efeitos adversos desencadeados pelos nossos tratamentos foi realizado alguns testes comportamentais descritos abaixo.

#### 3.5.1 Avaliação de efeitos adversos induzidos por anestésicos locais

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

### 3.6 ANÁLISE MOLECULAR

#### 3.6.1 Reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real (qPCR)

Foi verificada a expressão de RNAm (decorso temporal de 3 horas) na pele e em tecido nervoso (medula espinhal) de animais falso-operados ou submetidos ao modelo de incisão da pata, em animais cujos comportamentos relacionados a dor foram avaliados previamente. Após eutanásia com superdosagem de isoflurano, o RNAm foi extraído do tecido lesado e da medula espinhal. Posteriormente, foi realizado o teste de reação em cadeia polimerase em tempo real para quantificação do RNAm. Além de *cacna2d1* (gene que codifica subunidade  $\alpha 2\delta$  de CCDV), também foi avaliada a expressão de marcadores

de inflamação (interleucina 1beta, fator de necrose tumoral-alfa), utilizando primers específicos (TONELLO et al., 2020; DE AMORIM et al., 2021).

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais são expressos como média  $\pm$  EPM de n observações, onde n representa o número de animais como indicado na legenda das figuras. O teste de Grubbs disponível na plataforma online do GraphPad Prism foi utilizado para a verificação da existência de valores outliers entre os dados, e os valores identificados como tal foram excluídos das análises estatísticas. Os conjuntos de dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, com ou sem medidas repetidas, seguidas pelos testes post-hoc de Dunnett, Sidak ou Tukey conforme necessário, indicado nas legendas das figuras. O teste “t” de Student foi utilizado para avaliação quando dois grupos. O Software GraphPad versão 8.0, San Diego, Califórnia, EUA (GraphPad Software, USA) foi utilizado para fazer as análises. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas com valores de “p” menores que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Alguns procedimentos foram aplicados para maximizar a reprodutibilidade e minimizar vieses experimentais (segundo a diretriz ARRIVE), tais como: cálculo prévio do número de animais, cegamento, randomização, definição de critérios de exclusão e os experimentos foram realizados na forma de blocos.

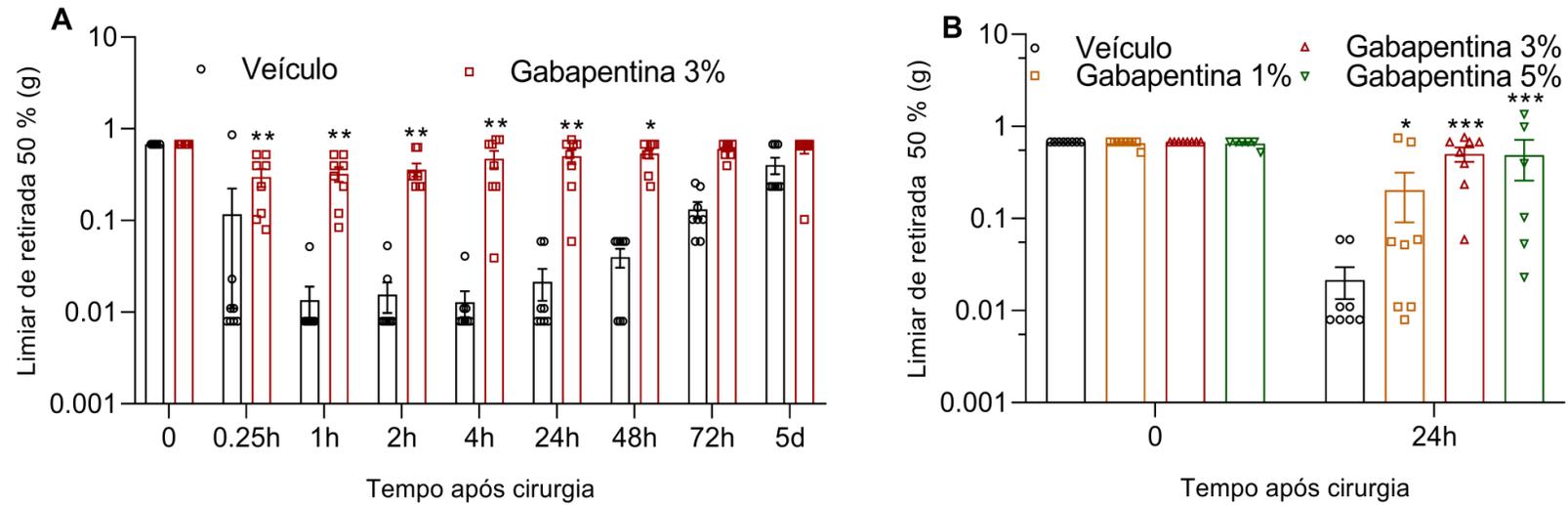
## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS RELACIONADAS À NOCICEPÇÃO

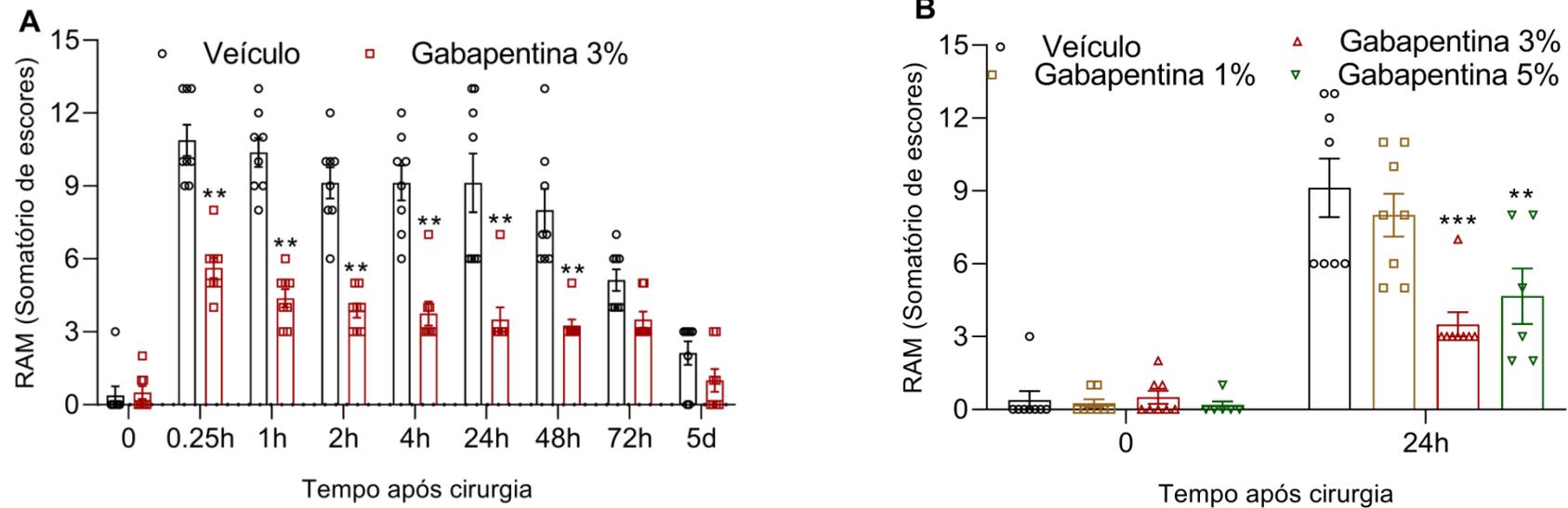
Inicialmente, avaliamos a hiperalgesia mecânica, para isso detectamos os limiares de retirada de pata nos animais machos. A incisão na pata direita traseira de camundongos levou a uma redução dos limiares de retirada de pata (hiperalgesia mecânica) em animais pré-tratados com veículo (PBS). Essa hiperalgesia foi observada 15 min após a cirurgia e durou por até 48 horas após a incisão na pata (Fig. 1A). Por outro lado, a infiltração com gabapentina (3%) preveniu amplamente o desenvolvimento e a manutenção desta hiperalgesia. Esse efeito anti-hiperalgésico foi observado de 0,25 a 48 horas após a cirurgia (Fig. 1A). O efeito anti-hiperalgésico da infiltração da gabapentina se mostrou ser dependente da dose, com efeito parcial obtido com a dose de 1% e com inibições máximas nas doses de 3 e 5% (Fig. 1B).

Com relação às respostas afetivas-motivacionais evocada após cada resposta positiva aos filamentos do teste de von Frey (Fig. 2A), observamos que também ocorreu um aumento dos compartamentos afetivos motivacionais relacionados a nocicepção em animais machos pré-tratados com veículo (PBS). Um efeito observado desde os primeiros 15 min após a cirurgia e que durou por até 48 horas após a cirurgia (Fig. 2A). Por outro lado, a infiltração com gabapentina (3%) preveniu amplamente o desenvolvimento e a manutenção destes comportamentos afetivos motivacionais desde 0,25 a 48 horas após a cirurgia (Fig. 2A). Diferente do limiar de retirada da pata, a redução dos compartamentos afetivos motivacionais da infiltração da gabapentina não foi dependente da dose, com inibições significativas e semelhantes nas doses de 3 e 5% (Fig. 2B).

**Figura 1. Efeito da infiltração de gabapentina na hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de dor pós-operatória em camundongos machos.** A - Decurso temporal da hiperalgesia pós-operatória em machos demonstrada pela queda no limiar de retirada da pata 50% (g) avaliada pelo teste de von Frey em animais tratados com Veículo (PBS) ou Gabapentina 3%. B - Curva dose resposta do tratamento com Veículo (PBS) ou Gabapentina (1%, 3% e 5%) no basal e 24 horas após a cirurgia. Dados representados como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8/grupo) e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Sidak (A) ou Dunnett (B). Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Para verificar a presença de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs, não foram encontrados *outliers*.



**Figura 2. Efeito da infiltração de gabapentina nas respostas afetivas motivacionais (RAM) induzida pelo modelo de dor pós-operatória em camundongos machos.** A - Decurso temporal das respostas afetivo-motivacionais (RAM) evocadas após cirurgia em animais machos demonstrada pelo somatório dos escores de respostas positivas após teste de von Frey em animais tratados com Veículo (PBS) e Gabapentina 3%. B - Curva dose resposta do tratamento com Veículo (PBS) e Gabapentina 1%, 3% e 5% ao longo do decurso temporal até o retorno ao limiar basal. Dados representados como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8/grupo) e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Sidak (A) ou Dunnett (B). Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Para verificar a presença de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs, não foram encontrados *outliers*

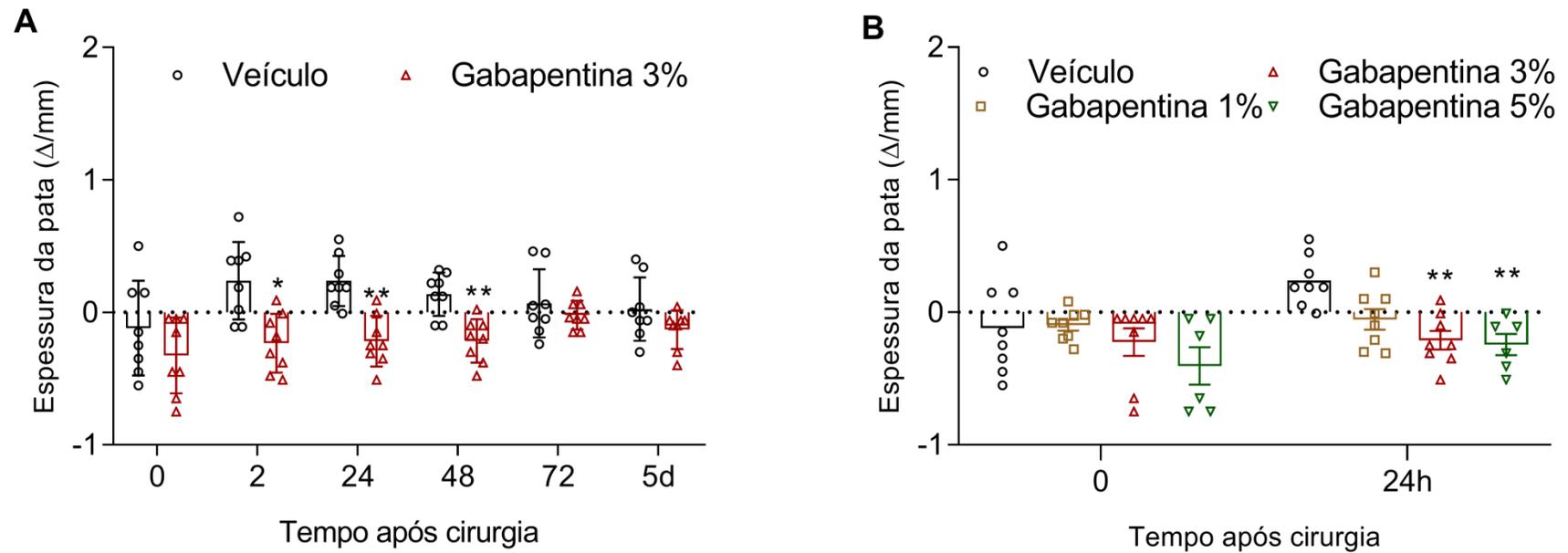


## 4.2 ANÁLISES DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS

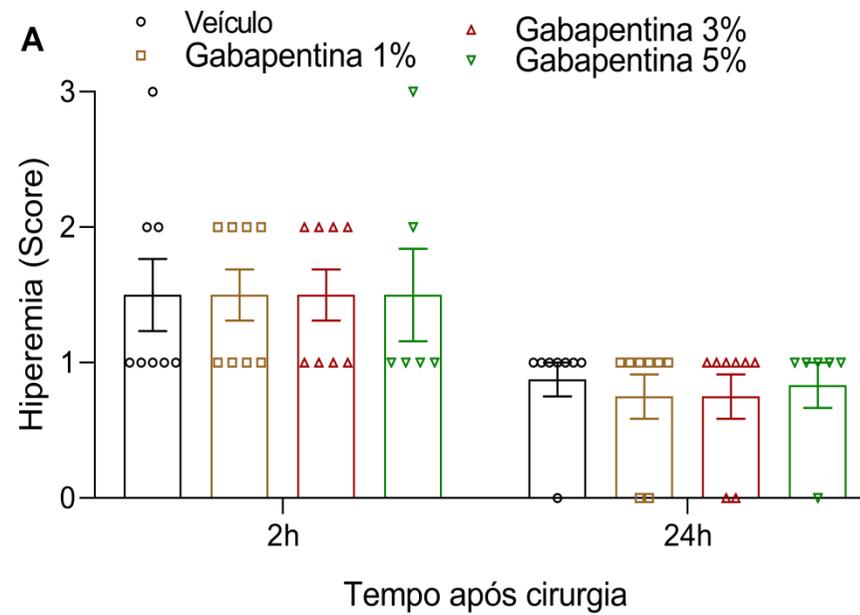
Em relação aos parâmetros inflamatórios, verificamos a presença de edema de 2 até 48 horas após a cirurgia em camundongos machos (Fig. 3A). A infiltração de gabapentina 3% foi capaz de prevenir de maneira muito eficaz esse edema pós-operatório, com efeito antiedematogênico observado tão cedo quanto 2 horas após a cirurgia, mantendo-se por até 48 horas após a cirurgia (Fig. 3A). O efeito antiedematogênico da infiltração da gabapentina não foi dependente da dose, com inibições significativas nas doses de 3 e 5% (Fig. 3B).

Como pode ser observado na Figura 4, a cirurgia também levou a hiperemia da pata operada de camundongos machos, especialmente 2 horas após a cirurgia, mas também observada 24 horas após a cirurgia. Não observamos hiperemia 48 horas após a cirurgia (dados não mostrados). Diferente o edema, o pré-tratamento com gabapentina (1%, 3 % ou 5%) não alterou a hiperemia em nenhum dos tempos analisados.

**Figura 3. Efeito do tratamento com Veículo (PBS) ou Gabapentina (1%, 3 % e 5%) no edema observado no modelo de dor pós-operatória em machos.** A – Decurso temporal de animais tratados com Veículo (PBS) ou Gabapentina 3% avaliados pela espessura da pata traseira direita ( $\Delta$ /mm). B - Curva dose resposta do tratamento com Veículo (PBS) ou Gabapentina (1%, 3% e 5%) avaliados pela espessura da pata traseira direita ( $\Delta$ /mm). Dados representados como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8/grupo) e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de de Sidak (A) ou Dunnett (B). Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Para verificar a presença de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs, não foram encontrados *outliers*.



**Figura 4. Efeito do tratamento com Veículo (PBS) ou Gabapentina (1%, 3 % e 5%) na hiperemia induzida pelo modelo de dor pós-operatória em machos.** A - Curva dose resposta do tratamento com gabapentina na hiperemia em 2 e 24 horas após cirurgia, avaliado por meio de escores (0-3). Dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8/grupo) e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Para verificar a presença de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs foi encontrado 1 *outlier* no grupo Veículo (PBS).



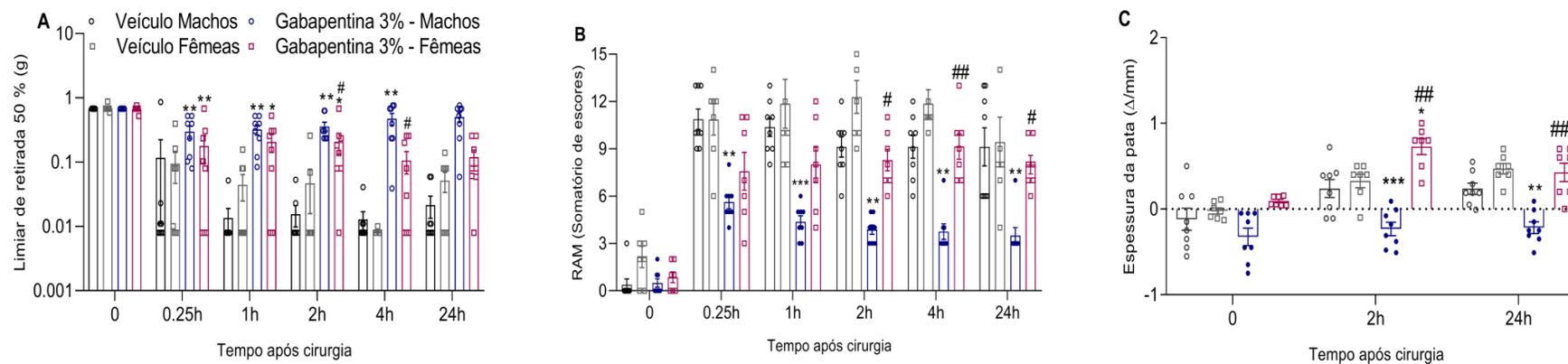
### 4.3 COMPARAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-EDEMATOGÊNICO DA GABAPENTINA EM MACHOS E FÊMEAS

Como descrito anteriormente e comparado ao tratamento com o veículo, a infiltração com gabapentina (3%) em animais machos causou efeito anti-hiperalgésico precoce (tão cedo quanto 15 min) e de longa duração (por até 24 horas) na hiperalgesia induzida pela incisão em (Fig. 5A). Por outro lado, a infiltração de gabapentina (3%) em fêmeas reduziu a hiperalgesia pós-operatória de maneira significativa somente 2 horas após a cirurgia, quando comparada ao veículo PBS (Fig. 5A). Verificamos também que o efeito anti-hiperalgésico da gabapentina em fêmeas foi de curta duração, não sendo mais detectado de 4 à 24 horas após a cirurgia e sendo estatisticamente diferente do efeito observado em machos nesses tempos.

Semelhante ao observado na hiperalgesia, as fêmeas apresentaram redução significativa do comportamento afetivo motivacional somente 2 horas após a cirurgia, mas com eficácia menor do que nos machos (Fig. 5B). Por outro lado, os machos também tiveram uma redução nos comportamentos afetivos motivacionais iniciando-se às 0,25 e mantendo-se por até 24 horas após a cirurgia. Verificamos também que a redução do comportamento afetivo-motivacional da gabapentina no modelo de dor pós-operatória em fêmeas foi de curta duração, não sendo mais detectado de 4 à 24 horas após a cirurgia e sendo estatisticamente diferente do efeito observado em machos nesses tempos.

Por fim, a infiltração com gabapentina (3%) foi capaz de produzir efeito antiedematogênico apenas em animais machos, tanto em 2 quanto 24 horas após a cirurgia (Fig. 5C). Quando comparado o efeito entre os diferentes sexos, observamos uma diferença significativa entre machos e fêmeas desde 2 até 24 horas após a cirurgia. Curiosamente, a infiltração com gabapentina em fêmeas aumentou o edema observado 2 horas após a cirurgia, quando comparado às fêmeas tratadas com PBS.

**Figura 5. Efeito da gabapentina na nocicepção e edema pós-operatórios em animais machos e fêmeas.** A – Hiperalgisia mecânica demonstrada pela queda no limiar de retirada da pata 50% (g) avaliada pelo teste de von Frey em animais tratados com Veículo (PBS) ou Gabapentina 3% em machos e fêmeas. B - Decurso temporal das respostas afetivo-motivacionais (RAM) evocadas após cirurgia em animais machos e fêmeas demonstrada pelo somatório dos escores de respostas positivas após teste de von Frey em animais tratados com Veículo (PBS) ou Gabapentina 3%. C - Caracterização do efeito edematogênico ocasionado pela cirurgia ao longo do tempo em animais machos e fêmeas tratados com Veículo (PBS) ou Gabapentina 3%. Dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8/grupo) analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes post-hoc post-hoc de Sidak ou Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . (## ou #) – Representa diferença significativa ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ) quando comparados aos valores entre os diferentes sexos. Para verificar a presença de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs, não foram encontrados *outliers*.



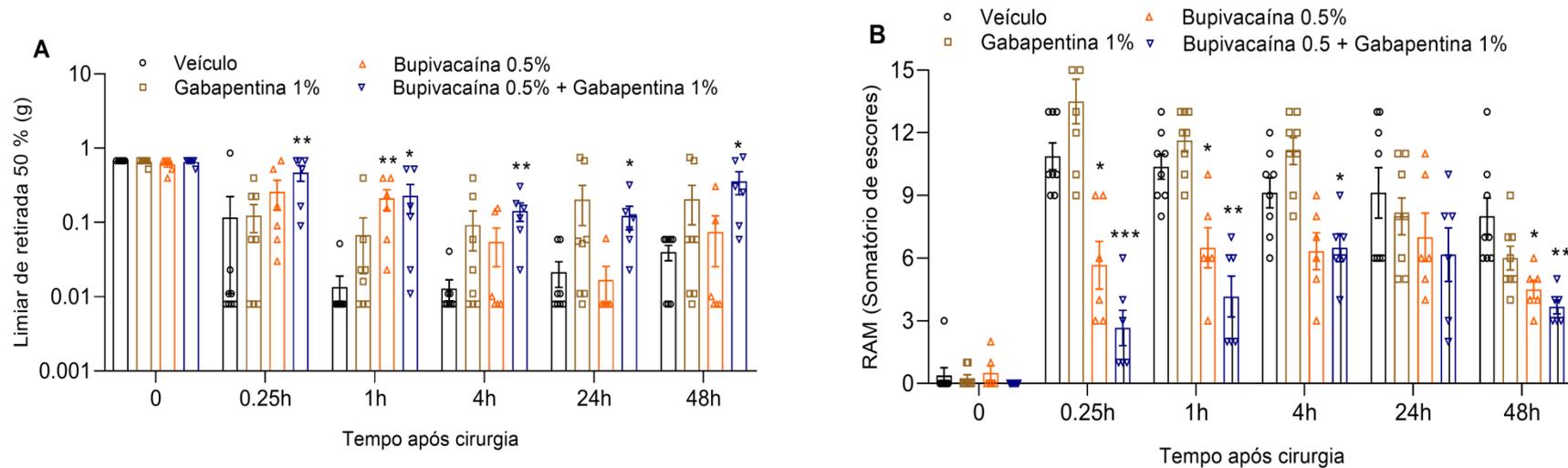
#### 4.4 EFEITOS DA INFILTRAÇÃO COMBINADA DE BUPIVACAÍNA E GABAPENTINA

Buscando avaliar o possível efeito adjuvante da gabapentina na infiltração com anestésicos locais antes da cirurgia, associamos uma dose baixa de gabapentina (1%) com o anestésico local bupivacaína (0,5%) em nosso modelo de dor e inflamação pós-operatória em camundongos machos (Fig. 6). Na Figura 6A abaixo, podemos observar que o tratamento com gabapentina 1% isoladamente não foi capaz de prevenir a hiperalgesia pós-operatória. Já a bupivacaína isoladamente preveniu a hiperalgesia pós-operatória com um efeito de curta duração, iniciando 0,25 h e mantendo-se por até 1 hora após a cirurgia. A combinação de bupivacaína 0,5% + gabapentina 1% reduziu a hiperalgesia significativamente com efeito precoce e de longa duração, iniciando em 0,25h e mantendo-se por até 48 horas após a cirurgia.

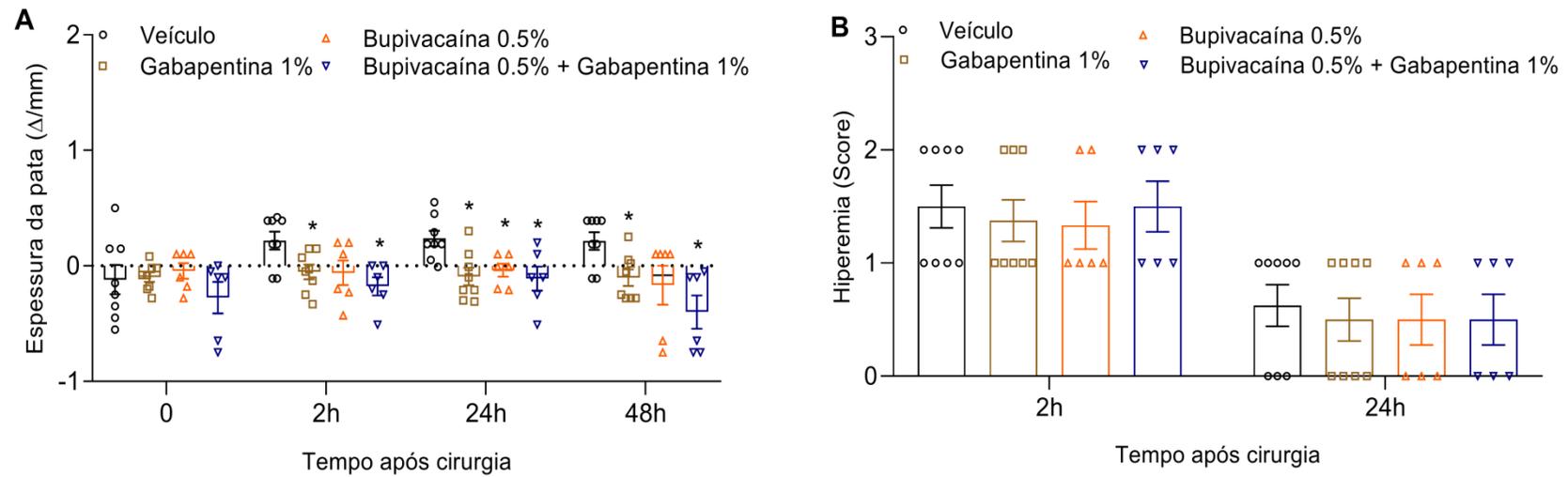
Como pode ser observado na Figura 6B e comparado ao veículo, o tratamento com a gabapentina 1% isoladamente não alterou as respostas nociceptivas afetivo-motivacionais induzidas pela aplicação de filamentos de von Frey na pele próxima a incisão. Por sua vez, o tratamento com bupivacaína isoladamente preveniu estes comportamentos significativamente, de 0,25, 1 e 48 horas após a cirurgia (Fig. 6B). A associação de gabapentina com bupivacaína também reduziu os comportamentos afetivo-motivacionais induzidos pela cirurgia, porém com maior eficácia do que o anestésico local usado isoladamente (Fig. 6B).

Por fim, o tratamento com a gabapentina 1% foi capaz alterar o edema pós-operatório, reduzindo significativamente o edema com início do efeito 2 horas após a cirurgia e mantendo-se por até 48 horas (Fig. 7A). A bupivacaína isoladamente reduziu o edema 24 horas após a cirurgia. A combinação de bupivacaína 0,5% + gabapentina 1% reduziu o edema 2, 24 e 48 horas após a cirurgia. Por fim, o tratamento com veículo (PBS), gabapentina 1%, bupivacaína 0,5% ou a combinação de bupivacaína 0,5% + gabapentina 1% não alteraram a hiperemia em nenhum dos tempos analisados (Fig. 7B).

**Figura 6. Decurso temporal do tratamento com gabapentina (1%), bupivacaína 0,5% e sua associação na nocicepção pós-operatória em machos.** A - Hiperalgisia mecânica demonstrada pela queda no limiar de retirada da pata 50% (g) avaliada pelo teste de von Frey em animais tratados com Veículo (PBS), Gabapentina 1%, bupivacaína 0,5% ou combinação bupivacaína 0,5% + gabapentina 1%. B - Decurso temporal das respostas afetivo-motivacionais (RAM) evocadas após cirurgia em animais machos e fêmeas demonstrada pelo somatório dos escores de respostas positivas após teste de von Frey em animais tratados com Veículo (PBS), Gabapentina 1%, bupivacaína 0,5% ou combinação bupivacaína 0,5% + gabapentina 1%. Dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8/grupo) analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes post-hoc de Sidak ou Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Para verificar a presença de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs, não foram encontrados *outliers*.



**Figura 7. Decurso temporal do tratamento com gabapentina (1%), bupivacaína 0,5% e sua associação na nocicepção pós-operatória em machos.** A- Caracterização do efeito edematogênico ocasionado pela cirurgia ao longo do tempo em animais machos tratados com Veículo (PBS), Gabapentina 1%, bupivacaína 0,5% ou combinação bupivacaína 0,5% + gabapentina 1%. B - Efeito do tratamento com Veículo (PBS), Gabapentina 1%, bupivacaína 0,5% ou combinação bupivacaína 0,5% + gabapentina 1% na hiperemia decorrente da cirurgia em machos em 2 e 24 horas após cirurgia. Dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8/grupo) analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelos testes post-hoc de Sidak ou Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Para verificar a presença de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs, não foram encontrados *outliers*.



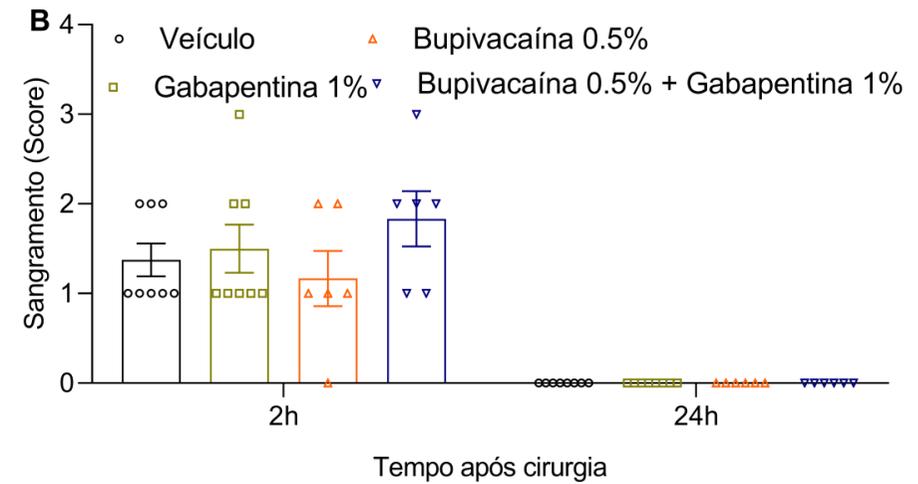
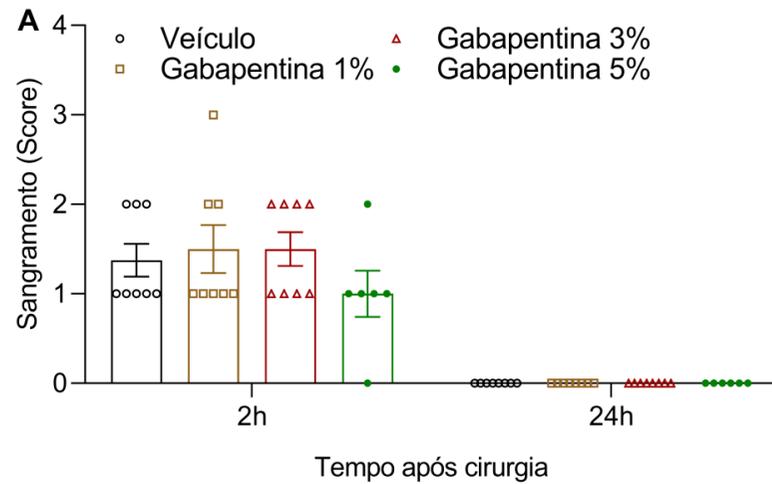
#### 4.5 AVALIAÇÃO DE EFEITOS ADVERSOS

Como pode ser observado na Tabela 1, nenhum tratamento utilizado em machos alterou parâmetros neurológicos/motores avaliados pelos comportamentos de pinçar, pisar e agarrar. Na Figura 8, os tratamentos alteraram o sangramento local observado 2 horas, mas não 24 horas, após a cirurgia.

**Tabela 1.** Efeitos adversos em animais machos tratados com veículo (PBS), gabapentina nas doses de 1%, 3% e 5%, bupivacaína 0,5% e bupivacaína 0,5% + gabapentina 1%. Dados foram expressos como presença ou ausência de reflexo/número total de animais testados.

Substância	DOSE (Sítio 10+5 uL)	n	2 horas após cirurgia			24 horas após cirurgia		
			Pinçar	Pisar	Agarrar	Pinçar	Pisar	Agarrar
PBS	0	8	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8
Gabapentina	1%	8	2/8	0/8	0/8	1/8	0/8	1/8
Gabapentina	3%	8	0/8	0/8	1/8	0/8	1/8	0/8
Gabapentina	5%	6	2/6	0/6	0/6	1/6	0/6	1/6
Bupivacaína	0.5%	6	1/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6
Bupivacaína + Gabapentina	0.5%+ 1%	6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

**Figura 8. Efeito do tratamento com gabapentina no sangramento pós-cirurgia.** A – Curva dose-resposta do tratamento com Veículo (PBS) ou gabapentina (1%, 3% e 5%) no sangramento após a cirurgia, expresso por escores de sangramento (0-4). B - Curva dose-resposta do tratamento com Veículo (PBS), gabapentina 1%, bupivacaína 0,5% ou combinação gabapentina 1% e bupivacaína 0,5% na intensidade do sangramento decorrente da cirurgia e no pós-operatório em machos. Dados estão representados como média  $\pm$  E.P.M. (N = 8/grupo) analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post-hoc de Dunnett. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado ao grupo controle. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Para verificar a presença de *outliers* foi utilizado o teste de Grubbs, não foram encontrados *outliers*.

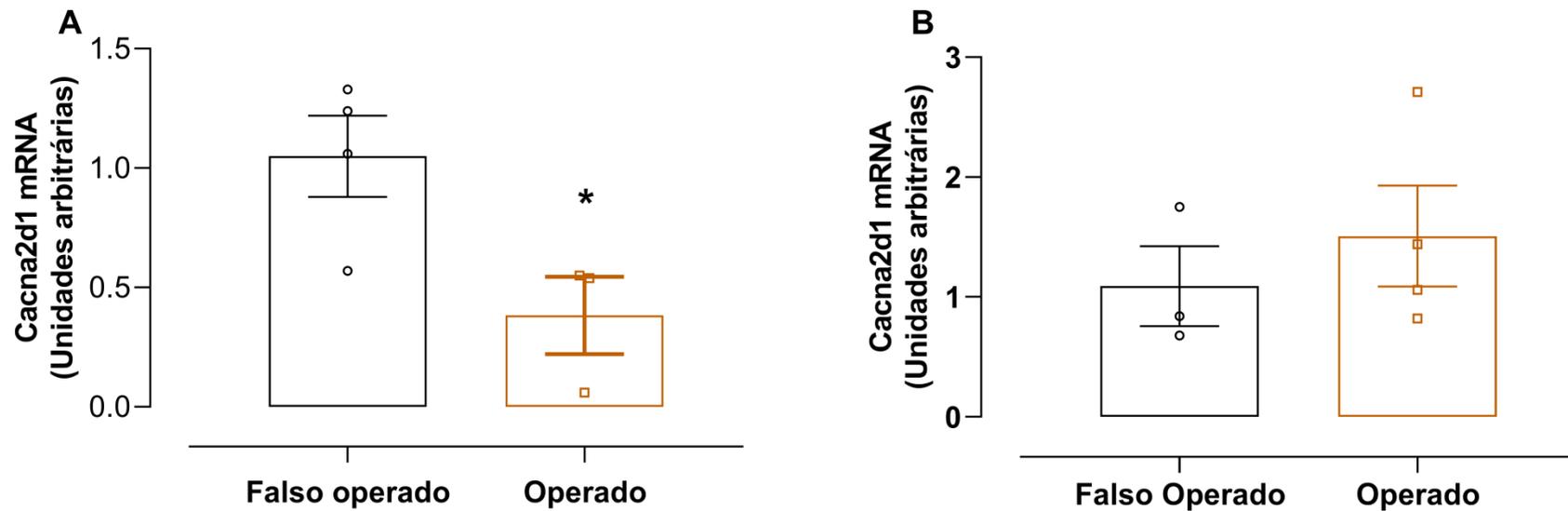


## 4.6 ANÁLISE MOLECULAR

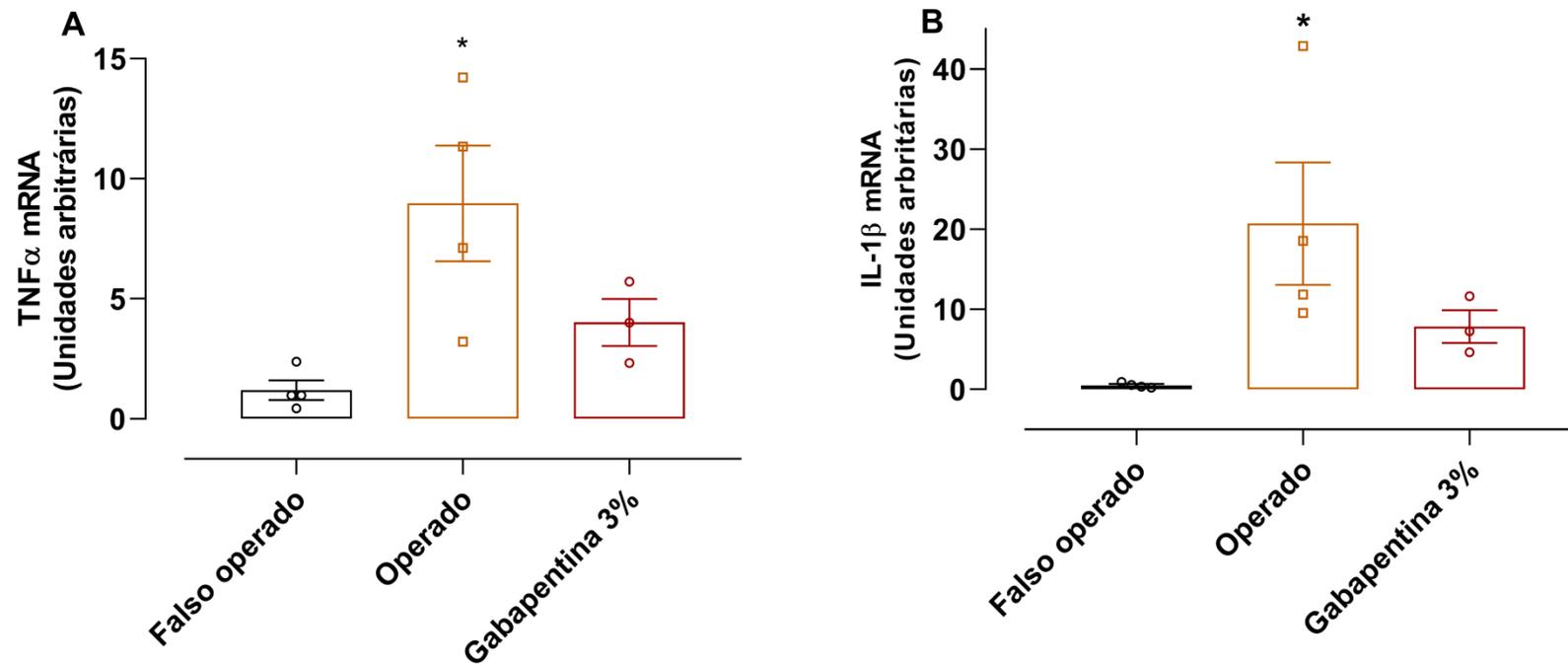
Finalmente, detectamos RNAm de genes selecionados no pico da nocicepção (3 horas) após falsa cirurgia ou após incisão da pata de camundongos tanto no local da incisão quanto na medula espinal. Em relação ao gene que codifica o alvo farmacológico da gabapentina, ou seja, o *Cacna2d1* codificador da subunidade acessória alfa2delta1 de canais de cálcio, verificamos uma redução do seu nível no local da incisão em comparação com a falsa cirurgia, sem nenhuma alteração significativa na medula espinal (Figura 9).

Também foi avaliada a expressão de marcadores de inflamação (genes codificantes para interleucina 1beta, fator de necrose tumoral-alfa e do fator inflamatório de aloenxerto 1) no local da incisão e de marcadores de ativação e lesão neuronal (Fos e Atf3) e de ativação de astrócitos (Gfap) na medula espinal. Verificamos um aumento significativo para a interleucina 1beta e para o fator de necrose tumoral-alfa no tecido operado em comparação com a falsa cirurgia (Figura 10). Por outro lado, não fomos capazes de detectar mudanças significativas nos outros genes analisados, comparando animais operados e falso operados (dados não mostrados). Apesar de uma redução numérica, a infiltração de gabapentina não foi capaz de alterar significativamente o aumento de interleucina 1beta e de fator de necrose tumoral-alfa no tecido operado (Figura 10).

**Figura 9 - Expressão do Cacna2d1 após falsa cirurgia e cirurgia.** A – Quantificação dos níveis de RNAm para o Cacna2d1 na pata 3 horas após falsa cirurgia e cirurgia. B – Quantificação dos níveis de RNAm para o Cacna2d1 na medula após falsa cirurgia e cirurgia. Dados expressos como unidades arbitrárias (n= 3/4 por grupo), analisados pelo teste-t de Student. (\*) Representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle (falso operado). Foi utilizado teste de Grubbs para detecção de possíveis *outliers*, mas não foram encontrados.



**Figura 10 - Expressão do TNF  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  após falsa cirurgia, cirurgia e tratamento com gabapentina 3%.** A – Quantificação dos níveis de RNAm para o TNF  $\alpha$  na pata 3 horas após falsa cirurgia, cirurgia e tratamento com gabapentina 3%. B – Quantificação dos níveis de RNAm para IL-1 $\beta$  na pata após falsa cirurgia, cirurgia e tratamento com gabapentina 3%. Dados expressos como unidades arbitrárias (n= 3/4 por grupo), analisados pelo teste-t de Student. (\*) Representa diferença significativa (p<0,05) quando comparados ao grupo controle (falso operado). Foi utilizado teste de Grubbs para detecção de possíveis *outliers*, foi encontrado um *outlier* no grupo falso operado para o IL-1 $\beta$ .



## 5 DISCUSSÃO

A gabapentina é um fármaco anticonvulsivante aprovado para uso oral que tem sido uma importante ferramenta no manejo farmacológico da dor, especialmente da dor neuropática (DOLPHIN, 2016). Seu uso aumentou nos últimos anos, após dados iniciais promissores com relação ao controle da dor pós-operatória aguda (KUMAR; HABIB, 2019). Estudos já demonstraram que a gabapentina é eficaz na melhora do controle da dor operatória, auxiliando na diminuição da necessidade de opioides (FELDER et al., 2018). Porém, na literatura já é claro o seu uso limitado por conta dos efeitos adversos tais como: tontura, vertigem e confusão mental, associados principalmente a fármacos depressores do sistema nervoso central (KRAUSE; SREDNI, 2016). O presente estudo teve como finalidade investigar o possível efeito tipo analgésico da infiltração de gabapentina no local da incisão na redução da dor pós-operatória e na prevenção dos efeitos adversos sistêmicos.

Inicialmente, verificamos que a infiltração com a gabapentina 3% na pata dos camundongos foi capaz de prevenir a hiperalgisia pós-operatória significativamente com um efeito rápido e de longa duração. Nosso resultado está de acordo com o trabalho de Field et al. (1997), onde a gabapentina administrada sistemicamente demonstrou prevenir a resposta hiperalgésica até 24 horas após a cirurgia. Já o estudo de Whiteside et al. (2004), demonstrou que a gabapentina administrada sistemicamente 24 horas após a cirurgia reduziu a hiperalgisia mecânica, porém apresentando um efeito de curta duração (01 hora). Também vimos que o efeito anti-hiperalgésico foi dose dependente, iniciando com a dose de gabapentina 1% e tendo efeito máximo com a dose de 3%. Um estudo pioneiro sobre seu efeito periférico demonstrou que a infiltração local de gabapentina diminuiu significativamente os comportamentos relacionados à dor induzidos pela injeção subcutânea do agente irritante formalina em ratos, o efeito foi dose dependente, sendo verificada já com a dose de 0,3% e atingindo efeito máximo na dose de 3% (CARLTON; ZHOU, 1998), semelhante ao observado por nós.

Poderia se questionar se efeito anti-hiperalgésico da gabapentina no modelo de dor pós-operatória poderia ter sido causado por efeito *per se* (independente da cirurgia) sobre os limiares de nocicepção dos animais. De fato, foi relatado que a administração subcutânea de gabapentina aumenta os limiares para a nocicepção induzida por calor em ratos, de maneira potente (ocorrendo com doses 0,25 e 0,85%/sítio), porém de maneira muito transitória, não

durando mais do que 10 minutos (TODOROVIC et al., 2003). O efeito antinociceptivo prolongado apresentado pela gabapentina em nosso modelo de POP vai contra essa ideia. Por outro lado, Zhou & Carlton (1998) demonstraram que a administração subcutânea de gabapentina não altera os limiares para a nocicepção induzida por estímulo mecânico nocivo calor em ratos, mesmo em dose alta (3%). Isso indica que a gabapentina aplicada localmente pode ser mais eficaz na melhora da nocicepção térmica do que mecânica e pode afetar diferentes manifestações de dor em diferentes condições patológicas.

A hiperalgesia detectada com filamentos de von Frey em roedores pode ser considerado uma medida do reflexo espinal, sendo assim limitada como uma avaliação mais global da dor (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). Desta forma, verificamos não somente o reflexo sensorial de retirada de pata em nosso modelo, mas também incluímos a avaliação de parâmetros mais elaborados para caracterização do processo nociceptivo ao longo do tempo no pós-operatório, incluindo as respostas afetivos-motivacionais (RAM) dos animais após aplicação dos filamentos. RAMs são comportamentos complexos que requerem processamento por circuitos límbicos e corticais no cérebro, cuja aparência indica a motivação e a excitação do sujeito para fazer cessar as sensações aversivas, lambendo o tecido afetado, protegendo-o ou buscando uma rota de fuga (CORDER et al., 2017). Durante estados de hiperalgesia, a amígdala basolateral codifica as mudanças no limiar nociceptivo e traduz esse estímulo somatossensorial em uma resposta comportamental aversiva e protetiva do local estimulado (CORDER et al., 2019). Em nosso estudo, os animais tratados com a gabapentina apresentaram diminuição das respostas afetivas motivacionais, efeito também observado de maneira rápida e longa. Assim, a infiltração com gabapentina não foi somente eficaz em reduzir o componente reflexivo-sensorial da nocicepção, mas também foi efetiva em reduzir o componente afetivo-motivacional relacionado à dor pós-operatória.

Outro parâmetro avaliado por nós foi o edema da pata operada. O edema é o inchaço de uma parte do corpo devido ao acúmulo de líquido nos tecidos e é um dos maiores desconfortos para pacientes submetidos a alguns tipos de cirurgia, como a extração de terceiro molar e a rinoplastia (JEONG et al., 2021). O edema do local operado foi avaliado por nós como parâmetro de inflamação tecidual, já que a ocorrência de inflamação periférica na fase aguda após cirurgia está intimamente ligada ao desenvolvimento da dor pós-operatória (XING et al., 2018). Nossos resultados demonstraram que a gabapentina infiltrada foi capaz de prevenir o edema pós-operatório de maneira rápida e sustentada.

Nossos resultados estão de acordo com poucos estudos que indicam efeito anti-inflamatório da gabapentina administrada sistemicamente (AHMAD et al., 2021; DIAS et al., 2014;

YOSRI et al., 2018). Foi demonstrado que a gabapentina apresentou um efeito antiedematogênico significativo e de longa duração frente ao edema induzido por carragenina, histamina, serotonina, bradicinina, composto 48/80 e prostaglandina E2 em ratos e camundongos (AHMAD et al., 2021; DIAS et al., 2014). Esse efeito foi relacionado com reduzindo a ação de mediadores inflamatórios, a migração de neutrófilos e os níveis de citocinas pró-inflamatórias, além de propriedade antioxidante (DIAS et al., 2014). Diferente desses achados, não fomos capazes de detectar redução significativa no RNAm para citocinas pró-inflamatória no local da cirurgia infiltrado com gabapentina. Outro estudo analisou o efeito da administração da gabapentina no desenvolvimento de inflamação alérgica das vias aéreas (ROSA et al., 2018). Esse efeito da gabapentina na inflamação alérgica está relacionada com a redução do influxo de cálcio acionada pelo receptor de células T e da produção de citocinas, associada à perda da proteína  $\alpha 2\delta 2$  em células  $T_H2$  (ROSA et al., 2018). O efeito antiedematogênico da gabapentina infiltrada não foi dependente da dose como já demonstrado previamente para a gabapentina sistêmica (ABDEL-SALAM & SLEEM, 2009). Verificamos também que a gabapentina não foi capaz de reduzir a hiperemia induzida pela cirurgia, o que indica que o seu efeito antiedematogênico não está relacionado à redução da vasodilatação, mas provavelmente à diminuição do extravasamento plasmático e/ou aumento da drenagem linfática. Essa hipótese deve ser estudada no futuro para conhecer o mecanismo exato do efeito antiedematogênico da gabapentina infiltrada no local da cirurgia.

Experimentalmente, a especificidade sexual dos mecanismos neurais que modulam a nocicepção já foi demonstrada em roedores e parecem ser relevantes (MOGIL et al., 2020). Por exemplo, foi demonstrado que a analgesia induzida pelo estresse resultante da natação forçada pode ser revertida pelo antagonista do receptor opioide naloxona em camundongos machos, mas não fêmeas. Outra diferença é encontrada para a analgesia dos agonistas dos receptores kappa-opioides, uma classe de medicamentos relatada como clinicamente eficaz apenas em homens (MOGIL et al., 2020). Um estudo que comparou eficácia e segurança de anti-inflamatórios não esteroides e opioides no tratamento da dor aguda após cirurgia descompressiva lombar, teve como resultado que o tratamento com medicamentos opioides mostrou um maior grau de alívio da dor em indivíduos do sexo masculino do que indivíduos do sexo feminino (KIM et al., 2019).

Em nosso estudo, observamos que a infiltração com gabapentina (3%) em animais machos causou efeito anti-hiperalgésico precoce e de longa duração na hiperalgesia induzida pela incisão. Diferente do que ocorreu em fêmeas, onde o efeito anti-hiperalgésico da gabapentina foi de curta duração. Semelhante ao observado na hiperalgesia, as fêmeas apresentaram redução significativa do comportamento afetivo motivacional de curta duração. Diferente do que foi encontrado por nós, o efeito anti-hiperalgésico da gabapentina sistêmica em modelo de dor pós-operatória não diferiram entre ratos machos e fêmeas (KROIN et al., 2003). Por outro lado, Pandey et al. (2004) avaliando os efeitos preventivo da gabapentina na dor pós-operatória em colecistectomia laparoscópica, demonstrou que uma dose oral única de gabapentina diminuiu significativamente a incidência de dor pós-operatória e também o consumo total de fentanil. Similar ao nosso achado, pacientes do sexo masculino tratados com gabapentina necessitaram significativamente menos de fentanil do que pacientes do sexo feminino. Finalmente verificamos que a infiltração com gabapentina (3%) foi capaz de produzir efeito antiedematogênico apenas em animais machos. Curiosamente, a infiltração com gabapentina em fêmeas aumentou o edema observado 2 horas após a cirurgia. O mecanismo desse efeito pró-edematogênico da gabapentina em fêmeas não é ainda conhecido por nós, mas sabe-se que a gabapentina sistêmica causa edema periférico como efeito adverso (PARSONS et al., 2004).

Os anestésicos locais têm um longo registro de segurança e eficácia para anestesia e analgesia cirúrgica e analgesia, pelo bloqueio de canais de sódio ativados por voltagem e induzindo bloqueio somatossensorial (BAI et al., 2020). Particularmente interessante é a infiltração local de anestésicos, um procedimento simples, seguro e eficaz para reduzir a dor pós-operatória, mas com a limitação da curta duração de efeito. De fato, verificamos que a infiltração com bupivacaína isoladamente produziu efeito antinociceptivo eficaz, mas de curta duração em nosso modelo de dor pós-operatória em camundongos. Para resolver esse problema, vários métodos têm sido aplicados para prolongar a duração e aumentar a eficácia da atividade dos anestésicos locais, incluindo a adição de fármacos adjuvantes ao anestésico local (BAI et al., 2020). Assim, adicionamos uma dose minimamente efetiva de gabapentina (1%) à bupivacaína para verificar seu potencial como adjuvante à anestesia infiltrativa. De fato, verificamos que a adição de gabapentina foi capaz de prolongar o efeito antinociceptivo e antiedematogênico do anestésico local, indicando que a gabapentina poderia ser um adjuvante útil na anestesia infiltrativa. O mecanismo responsável pelo efeito adjuvante da gabapentina é ainda desconhecido, mas não parece envolver o bloqueio de canais de sódio

ativados por voltagem, já que alguns estudos demonstraram que a gabapentina é desprovida desse tipo de ação (BRÄU et al., 2001; YOSHIZAWA et al., 2018).

Em relação aos possíveis efeitos adversos das drogas utilizadas, foram feitos testes com objetivo de avaliar comportamentos sensoriais e motores anormais. A função motora-sensorial foi avaliada por reflexo de pisar, pelo reflexo de retirada ao pinçamento da pata ipsilateral e pelo teste de agarrar. O reflexo de pisar é visto através do levantamento da pata traseira e plantação da pata através do arrastamento do dorso da pata sobre a borda de uma mesa. Um estudo que avaliou o tratamento com o gabapentinoide pregabalina, na prevenção da dor persistente da após lesão de nervo periférico em ratos, demonstrou que o tratamento não alterou o reflexo de pisar (YANG et al., 2013). O que está de acordo com os resultados apresentados em nosso trabalho, onde o tratamento com a gabapentina também não apresentou alteração nesse reflexo. Outra avaliação feita por nós foi à do reflexo de retirada ao pinçamento da pata ipsilateral, o estudo de Suter et al. (2009) demonstrou que a aplicação intraneural de bupivacaína em microesferas alterou significativamente o reflexo ao pinçamento. Nossos resultados não apresentaram diferença significativa quanto ao reflexo de pinçamento, o que pode ser explicado pelos tempos tardios que foram avaliados em nosso modelo. Por fim, realizamos o teste de agarrar, no qual o animal é colocado em uma grade que é imediatamente rotacionada para verificação da capacidade de permanecer agarrado à mesma (DEACON, 2013). Um estudo que avaliou a propriedade relaxante do músculo utilizando pregabalina e gabapentina em ratos albinos demonstrou que os gabapentínicos, apresentaram propriedades relaxantes comparáveis ao diazepam e resultados significativos no teste de agarrar (NAIDU et al., 2019). Já o estudo de Gasior et al. (1999) o qual realizou a avaliação pré-clínica de drogas antiepilépticas contra convulsões induzidas por cocaína, demonstrou que a gabapentina não apresentou respostas significativas quanto ao teste de agarrar. Nosso resultado está de acordo com o último estudo, nossos tratamentos não alteraram de maneira significativa a resposta ao teste de agarrar.

Cirurgia e procedimentos invasivos podem estar associados a sangramento que é influenciado por fatores relacionados ao paciente e o tipo de intervenção. O sangramento excessivo na cirurgia é uma complicação temida e é empiricamente prevenida ou tratada com transfusões de plaquetas, agentes antifibrinolíticos, desmopressina ou fator VII, embora as evidências da eficácia dessas medidas sejam subjetivas (ORSINI et al., 2017). Assim, avaliamos o sangramento como parâmetro de efeito adverso dos nossos tratamentos. Nossos

resultados demonstraram que os tratamentos não alteraram o sangramento local o qual foi observado 2 horas, mas não 24 horas, após a cirurgia.

Finalmente, verificamos uma redução no RNAm do gene que codifica o alvo farmacológico da gabapentina (o Cacna2d1 codificador da subunidade acessória alfa2delta1 de canais de cálcio) no local da incisão, mas não na medula, 3 horas após a cirurgia. Nossos achados estão de acordo com resultados recente do transcriptoma de tecido operado de ratos, que também indicou redução desse gene nas primeiras horas após a cirurgia (GOTO et al, 2021). Essa redução pode ser explicada pelo uso do Cacna2d1 (RNAm) para síntese de alfa2delta1 (proteína), porém devemos avaliar diretamente no futuro não somente a expressão da proteína acessória alfa2delta1, bem como sua função no tecido operado.

## **6 CONCLUSÃO**

Vimos que a gabapentina infiltrada apresentou efeito antinociceptivo e antiedematogênico de maneira eficaz e segura em modelo de dor pós-operatória de maneira sexualmente distinta, indicando sua viabilidade como ferramenta farmacológica útil no manejo da dor pós-operatória.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL, Salam; SLEEM, A. Study of the analgesic, anti-inflammatory, and gastric effects of gabapentin. **Drug Discov Ther**, v.3, n. 3, p. 18-26, 2009.
- AHMAD, Nisar; SUBHAN, Fazal; ISLAM, Nazar Ul; SHAHID, Muhammad; ULLAH, Naseem; ULLAH, Rahim; KHURRAM, Muhammad; AMIN, Muhammad Usman; AKBAR, Shehla; ULLAH, Ihsan. Pharmacological evaluation of the gabapentin salicylaldehyde derivative, gabapentalsal, against tonic and phasic pain models, inflammation, and pyrexia. **Naunyn-Schmiedeberg'S Archives Of Pharmacology**, v. 394, n. 10, p. 2033-2047, 2021.
- ATWAL, Nicholas; CASEY, Sherelle L.; MITCHELL, Vanessa A.; VAUGHAN, Christopher W. THC and gabapentin interactions in a mouse neuropathic pain model. **Neuropharmacology**, v. 144, p. 115–121, 2019.
- BAI, Johnny Wei; AN, Dong; ANAHI, Perlas; CHAN, Vincent. Adjuncts to local anesthetic wound infiltration for postoperative analgesia: a systematic review. **Reg Anesth Pain Med**, v. 45, p. 645-655, 2020.
- BELLIOTTI, Thomas R. et al. Structure-activity relationships of pregabalin and analogues that target the  $\alpha 2\text{-}\delta$  protein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2294–2307, 2005.
- BRÄU, Me; DREIMANN, M; OLSCHIEWSKI, A; VOGEL, W; HEMPELMANN, G. Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na(+) currents in rat sensory neurons. **Anesthesiology**, v. 94, n. 1, p. 44-137, 2001.
- CARLTON, Susan M.; ZHOU, Shengtai. Attenuation of formalin-induced nociceptive behaviors following local peripheral injection of gabapentin. **Pain**, v. 76, n. 1–2, p. 201–207, 1998.
- CHAPLAN, S. R.; POGREL, J. W.; YAKSH, T. L. Role of voltage-dependent calcium channel subtypes in experimental tactile allodynia. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 269, n. 3, 1994.
- CHINCHOLKAR, M. Analgesic mechanisms of gabapentinoids and effects in experimental pain models: a narrative. **British Journal of Anaesthesia**, v. 120, n. 6, p. 1315-1334, 2018.
- CHOU, Roger et al. Management of postoperative pain: A clinical practice guideline from the American pain society, the American society of regional anesthesia and pain medicine, and the American society of anesthesiologists' committee on regional anesthesia, executive committee, and administrative council. **Journal of Pain**, v. 17, n. 2, p. 131–157, 2016.
- CORDER, Gregory; AHANONU, Biafra; GREWE, Benjamin F.; et al. An amygdalar neural ensemble that encodes the unpleasantness of pain. *Science*, v. 363, n. 6424, p.

276–281, 2019.

CORDER, Gregory et al. Loss of  $\mu$  opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. **Nature Medicine**, v.23, n. 2, p. 164–173, 2017.

CRUCCU, G. et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: Revised 2009. **European Journal of Neurology**, v. 17, n. 8, p. 1010–1018, 2010.

DE AMORIM, Marcella; LÜCKEMEYER, Débora; JOSÉ MACEDO, Sérgio; et al. Sex-dependent Cav2.3 channel contribution to the secondary hyperalgesia in a mice model of central sensitization. **Brain Research**, p. 147438, 2021.

DEACON, Robert M.J. Measuring the Strength of Mice. **Journal Of Visualized Experiments**, n. 76, p. 1-4, 2013.

DE TOLEDO-PIZA, Ana Rita; MARIA, Durvanei Augusto. Healing process in mice model of surgical wounds enhanced by *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. **Advances in Skin and Wound Care**, v. 27, n. 12, p. 538–547, 2014.

DEUIS, Jennifer R.; DVORAKOVA, Lucie S.; VETTER, Irina. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1–17, 2017.

DIAS, Jm; DE BRITO, Tarcisio; MAGALHÃES, Diva; DA SILVA SANTOS, Pammela; BATISTA, Jalles; DIAS, Eulina; FERNANDES, Heliana; DAMASCENO, Samara; SILVA, Renan. Gabapentin, a synthetic analogue of gamma aminobutyric acid, reverses systemic acute inflammation and oxidative stress in mice. **Inflammation**. v. 37, n. 5, p. 36-1826, 2014.

DIXON, W. J. The Up-and-Down Method for Small Samples. **Journal of the American Statistical Association**, v. 60. n.312, p.967-978, 1965.

DOLPHIN, Annette C. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 19, p.5369–5390, 2016.

FIELD, Mark J. Evaluation of Gabapentin and S-(1)-3-Isobutylgaba in a Rat Model of Postoperative Pain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1242-1246, ago. 1997.

GASIOR, M. Preclinical evaluation of newly approved and potential antiepileptic drugs against cocaine-induced seizures. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 290, n. 3, p. 56-1148, 1999.

GLARE, Paul; AUBREY, Karin R.; MYLES, Paul S. Transition from acute to chronic

pain after surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1537–1546, 2019.

GOTO, Taichi; SAPIO, Matthew R.; MARIC, Dragan; ROBINSON, Jeffrey M.; DOMENICHIELLO, Anthony F.; SALIGAN, Leorey N.; MANNES, Andrew J.; IADAROLA, Michael J. Longitudinal peripheral tissue RNA-Seq transcriptomic profiling, hyperalgesia, and wound healing in the rat plantar surgical incision model. **The FASEB Journal**, v. 35, n. 10, p. 350-367, 2021.

GUPTA, Akriti; KUMAR, Pramod. Assessment of the histological state of the healing wound. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 2, n. 5, p. 239, 2015.

HIOM, S.; PATEL, G. K.; NEWCOMBE, R. G.; KHOT, S.; MARTIN, C. Severe postherpetic neuralgia and other neuropathic pain syndromes alleviated by topical gabapentin. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 1, p. 2-300, 2015.

JAMES, Sabu Kumar. Chronic postsurgical pain: is there a possible genetic link? **British Journal of Pain**, v. 11, n. 4, p. 178–185, 2017.

JEONG, Yeong Kon; KU, Jeong-Kui; BAIK, Sung Hyun; YOU, Jae-Seek; LEEM, Dae Ho; CHOI, Sun-Kyu. Classification of postoperative edema based on the anatomic division with mandibular third molar extraction. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 43, n. 1, p. 94-108, 2021.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 234, p. 139-146, 2014.

KARLSEN, Anders Peder Højer.; GEISLER, Anja.; PETERSEN, Pernille Lykke.; et al. Postoperative pain treatment after total hip arthroplasty: A systematic review. **Pain**, v. 156, n.1, p. 8-30, 2015.

KEHLET, Henrik; JENSEN, Troels S.; WOOLF, Clifford J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **The Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1618–1625, 2006.

KIM, Young Chan; LEE, Sang Eun; KIM, Somi K.; et al. Toll-like receptor mediated inflammation requires FASN-dependent MYD88 palmitoylation. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 9, p. 907–916, 2019.

KIM, Sang-Il; HA, Kee-Yong; AN, Howard S.; RHYU, Kee-Won; LEE, Hyun-Woo; OH, In-Soo. Sex-specific and Age-specific Analgesia for Early Postoperative Pain Management After Lumbar Decompressive Surgery. **Clinical Spine Surgery**, v. 32, n. 7, p. 311-318, 2019.

KRAUSE, Lilian; SREDNI, Sidney. Systemic drug therapy for neuropathic pain. **Pain**, v. 17, n. 1, p. 91-94, 2016.

KROIN, Jeffrey S.; BUVANENDRAN, Asokumar; NAGALLA, Subhash K. S.; TUMAN, Kenneth J. Postoperative pain and analgesic responses are similar in male and female Sprague-Dawley rats. **Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien D'Anesthésie**, v. 50, n. 9, p. 904-908, 2003.

KUMAR, Amanda H.; HABIB, Ashraf S. The role of gabapentinoids in acute and chronic pain after surgery. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 32, n. 5, p. 629-634, 2019.

LAVAND'HOMME, Patricia. 'Why me?' The problem of chronic pain after surgery. **British Journal of Pain**, v. 11, n. 4, p. 162-165, 2017.

LOESER, J. *et al.* The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p.473-477, 2008.

MOGIL, Jeffrey S. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 21, n. 7, p. 353-365, 2020.

NAIDU, Sushma V.; RANI, Vibha. A study to evaluate the skeletal muscle relaxant property of Pregabalin and Gabapentin in albino rats. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 8, n. 6, p. 1381, 23 maio 2019.

NEUMAIER, Felix; DIBUÉ-ADJEI, Maxine; HESCHELER, Jürgen; SCHNEIDER, Toni. Voltage-gated calcium channels: Determinants of channel function and modulation by inorganic cations. **Progress in Neurobiology**, v. 129, p. 1-36, 2015.

NEUMAN, Mark D.; BATEMAN, Brian T.; WUNSCH, Hannah. Inappropriate opioid prescription after surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1547-1557, 2019.

ORSINI, Sara; NORIS, Patrizia; BURY, Loredana; HELLER, Paula G.; SANTORO, Cristina; KADIR, Rezan A.; BUTTA, Nora C.; FALCINELLI, Emanuela; CID, Ana Rosa; FABRIS, Fabrizio. Bleeding risk of surgery and its prevention in patients with inherited platelet disorders. **Haematologica**, v. 102, n. 7, p. 1192-1203, 2017.

ORTIZ, Mario I.; MEDINA-TATO, David A.; SARMIENTO-HEREDIA.; *et al.* Possible activation of the NO-cyclic GMP-protein kinase G-K<sup>+</sup> channels pathway by gabapentin on the formalin test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 3, p. 420-427, 2006.

PANDEY, Chandra Kant; PRIYE, Shio; SINGH, Surendra; SINGH, Uttam; SINGH, Ram Badan; SINGH, Prabhat Kumar. Preemptive use of gabapentin significantly decreases postoperative pain and rescue analgesic requirements in laparoscopic cholecystectomy. **Canadian Journal Of Anesthesia/Journal Canadien D'Anesthésie**, v. 51, n. 4, p. 358-363, 2004.

PARSONS, Bruce; TIVE, Leslie; Huang, Sue. Gabapentin: a pooled analysis of adverse events from three clinical trials in patients with postherpetic neuralgia. **The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**, v. 3, n. 2, p. 62-157, 2004.

PATEL, Ryan; DICKENSON, Anthony H. Mechanisms of the gabapentinoids and  $\alpha\delta$ -1 calcium channel subunit in neuropathic pain. **Pharmacology Research and Perspectives**, v.4, n.2, p. 205, 2016.

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

RIBEIRO, Leandro Rodrigo et al. Methylmalonate-induced seizures are attenuated in inducible nitric oxide synthase knockout mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 2, p. 1, 7–163, 2009.

ROSA, Nicolas; TRIFFAUX, Emily; ROBERT, Virginie; MARS, Marion; KLEIN, Martin. The  $\beta$  and  $\alpha\delta$  auxiliary subunits of voltage-gated calcium channel 1 (Cav1) are required for TH2 lymphocyte function and acute allergic airway inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 142, n. 3, p. 892-903, 2018.

SHAHID, M.; SUBHAN, F.; AHMAD, N.; et al. Topical gabapentin gel alleviates allodynia and hyperalgesia in the chronic sciatic nerve constriction injury neuropathic pain model. **European Journal of Pain**. v. 4, p. 668-680, 2017.

SHAHID, M.; SUBHAN, F.; AHMAD, N.; et al. Efficacy of a topical gabapentin gel in cisplatin paradigm of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **BMC Pharmacol Toxicol**, v. 51, p. 20-28, 2019.

SUTER, Marc R; BERTA, Temugin; GAO, Yong-Jing; DECOSTERD, Isabelle; JI, Ru-Rong. Large A-Fiber Activity is Required for Microglial Proliferation and P38 MAPK Activation in the Spinal Cord: different effects of resiniferatoxin and bupivacaine on spinal microglial changes after spared nerve injury. **Molecular Pain**, v. 5, p. 1744-8069, 2009.

TERASHIMA, Tetsuji; XU, Qinghao; YAMAGUCHI, Shigeki; YAKSH, Tony L. Intrathecal P/Q and R-type calcium channel blockades on spinal substance P release and c-Fos expression. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 1-8, 2013.

TODOROVIC, Slobodan M; RASTOGI, A J; JEVTOVIC-TODOROVIC, Vesna. Potent analgesic effects of anticonvulsants on peripheral thermal nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 255-260, 2003.

TONELLO, Raquel. Ph $\alpha$ 1 $\beta$ , a dual blocker of TRPA1 and Cav2.2, as an adjuvant drug in opioid therapy for postoperative pain. **Toxicon**, v. 188, p. 80-88, 2020.

WHITESIDE, Garth T; HARRISON, James; BOULET, Jamie; MARK, Lilly; PEARSON, Michelle; GOTTSALL, Susan; WALKER, Katharine. Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 85-91, 2004.

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

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

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

YOKOYAMA, Kazuaki; KURIHARA, Takashi; SAEGUSA, Hironao; ZONQ, Shuqin; MAKITA, Koshi; TANABLE, Tsutomu. Blocking the R-type (Cav2.3) Ca<sup>2+</sup>channel enhanced morphine analgesia and reduced morphine tolerance. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 3516–3519, 2004.

YOSHIZAWA, Kazumi; ARAI, Narumaki; SUZUKI, Yukina; NAKAMURA, Toka; TAKEUCHI, Kota; SAKAMOTO, Reini; MASUDA, Ritsuko. Evaluation of the antinociceptive activities of several sodium channel blockers using veratrine test in mice. **Synapse**, v. 25, n. 3, p. 278- 980, 2018.

YANG, Fang; WHANG, John; DERRY, William T.; VARDEH, Daniel; SCHOLZ, Joachim. Analgesic treatment with pregabalin does not prevent persistent pain after peripheral nerve injury in the rat. **Pain**, v. 155, n. 2, p. 356-366, 2014.

YOSRI, Haidy; SAID, Eman; ELKASHEF, Wagdi F.; GAMEIL, Nariman M. Modulatory role of gabapentin against ovalbumin-induced asthma, bronchial and airway inflammation in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 64, p. 18-25, 2018.

ZAMPONI, Gerald W.; STRIESSNIG, Joerg; KOSCHAK, Alexandra; DOLPHIN, Anette C. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacology Review**, v. 67, p. 821–870, 2015.

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