Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia
Laboratório de Neuroanatomia e Neuropsicobiologia

PRISCILA DE MEDEIROS

**Envolvimento dos sistemas glutamatérgico, endocanabinoide e
endovaniloide do córtex pré-frontal medial no modelo de dor neuropática e
na comorbidade dor crônica e ansiedade/pânico**

Ribeirão Preto - SP

2017

PRISCILA DE MEDEIROS

**Envolvimento dos sistemas glutamatérgico, endocanabinoide e
endovaniloide do córtex pré-frontal medial no modelo de dor neuropática e
na comorbidade dor crônica e ansiedade/pânico**

Tese apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do Comportamento da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de Pós-graduação: Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto - SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

MEDEIROS, P.

Envolvimento dos sistemas glutamatérgico, endocanabinoide e endovaniloide do córtex pré-frontal medial no modelo de dor neuropática e na comorbidade dor crônica e ansiedade/pânico

206 fl; p.:30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Neurologia

Orientador: Coimbra, Norberto Cysne

1. Dor neuropática crônica 2. Córtex Pré-Limbico 3. Sistema Glutamatérgico
4. Sistema Endocanabinoide 5. Sistema Endovaniloide
6. Comorbidade Psiquiátricas 7. Ansiedade/Pânico

Nome: MEDEIROS, P.

Título: Envolvimento dos sistemas glutamatérgico, endocanabinoide e endovaniloide do córtex pré-frontal medial no modelo de dor neuropática e na comorbidade dor crônica e ansiedade/pânico

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Pós-graduação: Neurologia

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Aparecido da Silva

FFCLRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan

FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Regina Cláudia Barbosa da Silva

UNIFESP – *campus* Baixada Santista

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Presidente da Banca

Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

FMRP-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Ao Leo, fruto do amor mais forte e verdadeiro, minha continuidade.

Agradecimentos

Chegou o momento de expressar meus sinceros agradecimentos a muitos e tantos adorados familiares e amigos. Tenho consciência que não conseguirei dizer esse ‘muitíssimo obrigada’ como é merecido, porque é difícil para mim, expressar a beleza deste momento. Além disso, quero destacar que essa página não é uma mera formalidade, mas que tem um sentido: o da formação de uma verdadeira rede de conhecimento, solidariedade e de muito, muito afeto.

Para maior percepção desse sentido devo contar que esta não foi uma caminhada breve, principalmente pelas intercorrências pessoais de toda ordem, que me atropelaram. Esses percalços, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Talvez esta tese seja o resultado mais visível desse processo de construção em meio a uma conjuração de afetos e amizades. Dessa forma, dando continuidade à história, dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente ou, ainda, pelo fato de simplesmente existirem.

Aos meus pais que sempre me apoiaram durante toda a vida. Devo a eles o que eu sou hoje. Deles eu tiro o exemplo das maiores qualidades do ser humano, como honestidade, determinação e responsabilidade. Às minhas irmãs pelo amor e carinho.

Ao meu marido, pela força que nos une e faz do nosso amor o mais intenso e o maior. Obrigada pela sua força, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Esta vitória é nossa!

Ao querido orientador professor Coimbra, o meu reconhecimento pela oportunidade de realizar este trabalho ao lado de alguém que transpira conhecimento; por sua competência teórica e seus ricos ensinamentos durante todo o doutorado. Meu respeito e admiração.

Aos meus amigos e amigas do laboratório, Jú, Yara, Rebecca, Tati, Thais, Audrey, Taylon, Luiz, Asmat, Rai, Rafa, Marcelo e Ivair pelos momentos de descontração vividos durante esse processo, pelos cafezinhos, pelo carinho, mas principalmente pelas trocas de experiências e conhecimentos.

Ao nosso técnico Daoud e a Vani pela ajuda diária, pelas boas conversas e pelo carinho.

À minha professora de italiano e amiga Fernanda, pelas aulas, pelas trocas de experiências, pelo carinho, pelas boas conversas. Grazie Mille!

Aos alunos de iniciação científica Mari, Rafa, Sylmara (hoje mestranda), Thais, Débora, Nayara, Ana Carolina, Bruna, Ana Carolina Ferreira, Vanessa e Larissa por permitirem apoiar-me durante os primeiros passos da carreira científica, por aceitarem meus conselhos e experiências e pela ajuda.

Aos queridos e admirados professores da banca de defesa, José Aparecido, Regina Barbosa e Valeria por terem aceitado a participação e pelas sugestões que tanto contribuíram para este trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro imprescindível para a realização desse trabalho.

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas e inesquecíveis o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada! Todos vocês são co-autores deste trabalho.

RESUMO

MEDEIROS, P. Envolvimento dos sistemas glutamatérgico, endocanabinoide e endovaniloide do córtex pré-frontal medial no modelo de dor neuropática e na comorbidade dor crônica e ansiedade/pânico. 2017. 206f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A dor crônica (DC) é um problema global de saúde. A incidência da DC no mundo oscila entre 7 e 40% da população e, como consequência da mesma, cerca de 50 a 60% dos que sofrem dela ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a qualidade de vida. Sabe-se que a divisão pré-límbica (PrL) do córtex pré-frontal medial (CPFM) é uma região importante na elaboração da dor e de seus aspectos cognitivos e emocionais. Há evidências que a DC de origem neuropática (DN) é capaz de provocar mudanças morfológicas, resultando em uma reorganização nas redes neurais do CPFM, e existe alta relação de comorbidade entre ansiedade e DC. Sendo assim, necessita-se de estudos que forneçam aprimoramento dos modelos animais em DC para que, assim, investiguem-se as bases neuroanatômicas, neurofisiológicas e psicofarmacológicas da DN e a participação de áreas corticais na gênese e manutenção da dor. Para isso, o presente trabalho foi dividido em três etapas: 1) *Avaliação dos aspectos nociceptivos, motores e afetivo-cognitivos de ratos submetidos a um modelo adaptado de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI: uma ligadura) comparando com o modelo clássico de Bennett e Xie (CCI: quatro ligaduras)*: nossos resultados mostraram que o modelo adaptado de CCI produziu hipersensibilidade ao frio (teste de acetona) e alodinia mecânica (teste de *von Frey*) semelhante ao causado pelo modelo de CCI com quatro ligaduras. Ambos os grupos CCI apresentaram comportamento do tipo ansioso, depressivo e déficits cognitivos, utilizando-se o modelo de campo aberto (*open field*), teste de nado forçado e teste de reconhecimento de objeto, respectivamente. Contudo, o modelo adaptado pode ser uma melhor opção, visto que uma simples ligadura não provoca prejuízos motores, nem tampouco o comportamento de autotomia, diferentemente dos animais com CCI em que foram realizadas 4 ligaduras. 2) *A - Estudo do efeito da Indometacina (2mg/kg), um anti-inflamatório não-esteroidal, administrada por via periférica (IP) sobre a DN*: a indometacina diminuiu a alodinia mecânica no primeiro, segundo e quarto dias, mas não no décimo quarto, vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dias após a CCI adaptada (1 ligadura). Esses dados sugerem que a COX-1 e a COX-2 estão envolvidas na mediação da indução, mas não na manutenção da DN. *B - Envolvimento do córtex PrL sobre a geração, potencialização e manutenção da DN, através da microinjeção local de cloreto de cobalto (CoCl₂: 1mM/200nL), um bloqueador do influxo de cálcio (causando bloqueio de sinapses)*. O CoCl₂ atenuou a alodinia mecânica no vigésimo primeiro e vigésimo oitavo, mas não no sétimo e décimo quarto dias após a CCI com 1 ligadura. Nossos dados também indicam que córtex PrL participa na elaboração da fase tardia da alodinia mecânica em nosso modelo adaptado de DN. *C - Investigação do papel do sistema glutamatérgico, endocanabinoide e endovaniloide do córtex PrL sobre a alodinia mecânica 21 dias após a CCI adaptada*. Os presentes resultados mostraram que a microinjeção do agonista N-metil D-Aspartato (NMDA), nas concentrações de 1 e 4 nmol, foi capaz de aumentar a alodinia mecânica durante o teste de *von Frey*, enquanto que um antagonista de receptores de aminoácidos excitatórios do tipo NMDA, o LY235959, diminuiu a alodinia mecânica quando microinjetado na maior dose (8nmol) no córtex PrL. O AM251, um antagonista de receptores endocanabinoides do tipo CB₁, aumentou a alodinia mecânica em todas as doses (50, 100 e 200pmol) quando microinjetado no PrL. O tratamento do PrL com a menor concentração de anandamida (AEA: 5pmol) não alterou a alodinia mecânica; contudo, a administração de AEA no PrL nas doses intermediárias (de 50 e de 100pmol) reduziu a alodinia mecânica, e este efeito foi bloqueado

pelo pré-tratamento do PrL com AM251 (200pmol). Digno de nota, o tratamento do PrL com a maior dose de AEA (200pmol) aumentou a alodinia mecânica, no entanto, este efeito foi atenuado pelo bloqueio prévio de receptores de potencial transitório vaniloide do tipo 1 (TRPV₁), com microinjeções de 6 Iodo-nor-di-hidrocapsaicina (6-I-CPS) na dose de 3pmol no PrL. Esses dados sugerem que o córtex PrL está envolvido na potenciação e manutenção da DN crônica (DNC), através da ativação dos receptores NMDA e dos receptores TRPV₁. O efeito da atenuação da alodinia mecânica foi causado pela ativação dos receptores endocanabinoides do tipo CB₁ em roedores com DNC após 21 dias da CCI. 3) *Investigação da comorbidade entre a DNC com ansiedade/pânico e o efeito dos agonistas e antagonistas de receptores NMDA e CB₁ no PrL em roedores confrontados com serpente após 21 dias da CCI pelo método adaptado*: o confronto entre roedores e serpentes constrictoras induziu nos ratos respostas relacionadas ao medo, tais como avaliação de risco, imobilidade defensiva e fuga em animais com DNC e *Sham*. Além disso, após terem sido confrontados com a serpente, os animais com DNC tiveram a alodinia mecânica aumentada. O pré-tratamento do PrL com NMDA (4nmol) aumentou o índice e porcentagem de avaliação de risco e a porcentagem de fuga, e a dose intermediária de NMDA (1nmol) aumentou o índice de fuga em animais neuropáticos confrontados com uma serpente constrictora. Além disso, a alodinia mecânica foi intensificada após o confronto em animais que receberam NMDA (4nmol) no PrL. Adicionalmente, os animais tratados com LY235959 diminuíram os comportamentos defensivos apresentados por animais com DNC quando confrontados com a salamanta. Além disso, esses animais pré-tratados com o antagonista de receptores NMDA tiveram seus limiares de *von Frey* aumentados após o confronto. O bloqueio de receptores endocanabinoides do tipo CB₁, com o antagonista AM251, aumentou o comportamento de avaliação de riscos dos animais com DN crônica durante a exposição com a serpente e tiveram seus limiares de retirada de pata no teste de *von Frey* diminuídos após o confronto. Contudo, o pré-tratamento do PrL com AEA (100pmol) diminuiu os comportamentos defensivos de avaliação de risco, imobilidade defensiva e de fuga dos animais com DNC confrontados com a serpente, e esses animais também apresentaram aumento do limiar de retirada de pata no teste de *von Frey* após o confronto. Interessantemente, a dose de AEA (200pmol) não alterou comportamento defensivo, mas agravou DNC, através da diminuição do limiar de alodinia mecânica, apresentando um clássico efeito em “U invertido”, pois menor e a maior dose de AEA (50 e 200pmol) induziram valores de comportamentos defensivo elevados, semelhante ao controle (veículo). Concluindo, os presentes dados obtidos no nosso trabalho, sugerem que o modelo adaptado de CCI, através da realização de uma ligadura do nervo isquiático, é um modelo animal eficaz para se estudarem as comorbidades entre DC e alterações cognitivas e emocionais. A diminuição da atividade das enzimas COX-1 e COX-2 atenuou a alodinia mecânica apenas durante a gênese da DN. Além disso, evidenciou-se que o córtex PrL é recrutado para elaborar a DN durante sua manutenção e potencialização. A ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e vaniloides do tipo TRPV₁ potencializam a DNC e o sistema endocanabinoide via receptor CB₁ a diminui. Finalmente, roedores com DNC tiveram seus limiares de alodinia mecânica diminuídos após o confronto com a serpente. Os comportamentos defensivos foram intensificados em animais com DNC, mostrando, assim, o estabelecimento da comorbidade entre DC e ansiedade/pânico e a participação do neocórtex na elaboração da DNC, em um modelo de neuropatia periférica induzida pela constrição crônica no nervo isquiático em ratos Wistar. A comorbidade entre ansiedade/pânico e DNC sensibiliza os animais, agravando o quadro de dor crônica.

Palavras-chave: Dor neuropática crônica. Córtex Pré-Límbico. Sistema Glutamatérgico. Sistema Endocanabinoide. Sistema Endovaniloide. Comorbidade Psiquiátricas. Ansiedade/Pânico.

ABSTRACT

MEDEIROS, P. Involvement of the glutamatergic, endocannabinoid and endovanyloid systems of the medial prefrontal cortex in the neuropathic pain model and chronic pain and anxiety/panic comorbidities. 2017. 206f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Chronic pain (CP) is a global health problem. The incidence of CP in the world ranges from 7 to 40% of the population and, as a consequence, about 50% to 60% of those suffering from it are partially or totally incapacitated, in a transitory or permanent manner significantly compromising the quality of life. The prelimbic (PrL) division of the medial prefrontal cortex (mPFC) is an important region for the elaboration of cognitive and emotional aspects of pain. In addition, chronic neuropathic pain (CNP) can induce morphological changes, resulting in a reorganisation in the mPFC neurons. Moreover, there is an intrinsic relation between CP and anxiety disorder. Our study aims to investigate the effects of a modification of an animal model of CP and evaluate the neuroanatomical and pharmacological bases of neuropathic pain (NP). The role played by PrL cortex in the modulation of CNP was also investigated. Thus, the present work was divided into three steps: 1) *Ethological analysis of nociceptive, motor and affective-cognitive aspects of rats submitted to an adapted model of chronic constriction of the ischiadicus nervus (CCI: a simple ligature) compared with the classic CCI model performed by Bennett and Xie (CCI: four ligatures)*: our results showed that the adapted-CCI model produced cold hypersensitivity and mechanical allodynia similar to those described in laboratory animals submitted to the model with four ligatures of the *ischiadicus nervus*. Both CCI groups displayed anxiety- and depression-like responses, and cognitive deficits, in the open field test, forced swim test and object recognition test, respectively. However, the adapted model of CCI used in the present work may be a better choice, since a simple ligature of the *ischiadicus nervus* cause neither motor deficits, nor autotomy behaviour, unlike the animals with CCI induced by four ligatures of spinal nerves. 2) *A- Effect of Indomethacin (2mg/kg) a non-steroidal anti-inflammatory drug peripherally administered (IP) on NP*: The peripheral treatment with indomethacin reduced mechanical allodynia on the first, second, and fourth days, but not on the fourteenth, twenty-first, and twenty-eighth days after adapted CCI. These findings suggest that COX-1 and COX-2 are involved in the mediation of NP induction, but not in the maintainance of NP. *B- Involvement of the PrL cortex on the generation, potentiation and maintenance of DN, through the microinjection of cobalt chloride (CoCl₂: 1mM/200nL), a calcium influx blocker (synapse blocker)*: CoCl₂ attenuated mechanical allodynia at twenty-first and twenty-eighth, but not at seventh and fourteenth days after CCI. Our data also indicate that PrL cortex participates in the elaboration of the chronic phase of mechanical allodynia in our adapted NP model. *C- The role of the glutamatergic, endocannabinoid and endovanniloid systems of the PrL cortex on mechanical allodynia 21 days after CCI*: The present data showed that microinjection of the N-methyl D-Aspartate agonist (NMDA), in a dose of 1 and 4nmol, was able to increase the mechanical allodynia threshold during mechanical stimulation by von Frey test filaments, whereas the NMDA receptors antagonist LY235959 decreased mechanical allodynia when microinjected at the highest dose (8nmol) in the PrL. The PrL cortex pretreatment with the CB₁-cannabinoid receptor antagonist AM251 increased mechanical allodynia at all doses (50, 100 and 200 pmol). Microinjections of anandamide (AEA) at the smaller dose (5pmol) in PrL did not cause influence in the mechanical allodynia. However, the PrL treatment with AEA at the intermediate doses (50 and 100pmol) reduced mechanical allodynia and that effect were blocked by the pretreatment of the PrL cortex with AM251 (200pmol). Interestingly, the higher dose of AEA (200pmol) increased mechanical allodynia. Furthermore, this effect was attenuated by the PrL pretreatment with the transient potential receptor antagonist type 1

(TRPV₁) ion channel selective antagonist 6 Iodonordihidrocapsaicin (6-I-CPS) in a dose of 3 pmol. These findings suggest that the PrL cortex is involved in the potentiation and maintenance of CNP through the activation of NMDA receptors and TRPV₁ receptors in PrL cortex. The effect of attenuation of mechanical allodynia was caused by the activation of CB₁ endocannabinoid receptors in rodents with CNP after 21 days of CCI. 3) *Investigation of the comorbidity between CNP with anxiety/panic and the effect of NMDA glutamatergic and CB₁ endocannabinoid receptors on PrL cortex after 21 days of CCI in rodents.* The confrontation between a constrictor snake and the rodent elicited innate fear-related responses in prey, such as risk assessment, defensive immobility, and escape behaviour that were enhanced in CNP rodents and *Sham*. Also, after a confrontation with a potential predator, the CNP animals increased their mechanical allodynia thresholds. In addition, the microinjection of NMDA (4nmol) PrL, increased innate fear-related responses, such as risk assessment, and the treatment of PrL with NMDA at 1nmol increased escape behaviour in rodents with CNP. The treatment of the PrL with NMDA in a dose of 4nmol increased the mechanical allodynia threshold during mechanical stimulation by von Frey test filaments, after confrontation, whereas PrL pretreatment with LY235959 decreased innate fear-related responses, such as risk assessment, defensive immobility, and escape behavior and decreased mechanical allodynia when microinjected (4 and 8nmol). The PrL Pretreatment with the CB₁-cannabinoid receptor antagonist AM251 (all doses) increased unconditioned fear-related responses, such as risk assessment. Moreover, AM251 (100 and 200pmol) microinjections in the PrL increased mechanical allodynia after prey versus predator confrontation. The microinjections of AEA (100pmol) in the PrL decreased risk assessment, defensive immobility, and escape behaviour and reduced mechanical allodynia. Interestingly, the pretreatment of the PrL with the higher dose of AEA (200pmol) did not change the fear-induced behaviour elicited by predators, but increased the CNP. There was a classical inverted U-shape curve from the lower to the higher dose of AEA. These data suggest that the anxiety/panic and pain comorbidity increases CNP symptoms. The present findings also indicate that the CCI-adapted model, by *ischadicus nervus* ligation with a single ligature is an effective animal model for studying comorbidities between CP and cognitive/emotional disturbances. In conclusion, we observed that nonsteroidal anti-inflammatory drugs are efficient to attenuate the mechanical allodynia only during NP genesis. The PrL cortex is recruited during the maintenance and potentiation of NP. The PrL glutamatergic system via NMDA activation and endovaniloid mechanisms related to TRPV₁ ion channel activation potentiate CNP, and the endocannabinoid mechanisms via CB₁ receptors recruitment decrease the CNP. Finally, rodents with CNP had their mechanical allodynia thresholds decreased after the confrontation with wild snakes. In addition, their defensive behaviours were itemised, thus showing the anxiety/panic and CNP potential comorbidity and the participation of the neocortex in the elaboration of CP in a model of peripheral neuropathy induced by injury of the *ischadicus nervus* through its chronic constriction in Wistar rats.

Keywords: Chronic neuropathic pain. Prelimbic cortex. Glutamatergic system. Endocannabinoid system. Endovaniloid system. Psychiatric comorbidity. Anxiety/panic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da via espinotalâmica na percepção de dor (e temperatura). Os neurônios aferentes primários (situados no gânglio da raiz dorsal do enrvio espinal) fazem conexão com o segundo neurônio no corno posterior da medula espinal (representados em nível lombar e cervical no presente esquema) que, por sua vez, envia projeções para o núcleo ventral-pósterolateral do tálamo doirsal, que se conecta com o córtex somatossensorial, onde é processado o estímulo nociceptivo em dor, segundo Purves e cols., Neuroscience, 2001.	29
Figura 2 - Representação esquemática de diferentes modelos experimentais de dor neuropática.	33
Figura 3 - Medida da alodinia mecânica com o uso do filamento de von Frey (10g).	48
Figura 4 - Medida da sensibilidade ao frio avaliada pelo teste da acetona.	49
Figura 5 - Percurso na plataforma de caminhada. (A) dimensões e (B) visão frontal.	51
Figura 6 - A: Visão frontal da arena poligonal enriquecida, com plataformas de escape e toca artificial, contendo ratos Wistar em habituação por 3 dias, com oferta de comida e água ad libitum. B: Visão lateral da arena durante a habituação.	54
Figura 7 - Desenho experimental da avaliação da sensibilidade nociceptiva de animais após 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias da CCI proposta por Bennett e Xie em 1988 (4 ligaduras), da CCI adaptada (1 ligadura), ou do procedimento Sham.	57
Figura 8 - Desenho experimental da avaliação da atividade motora de aniamais após 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias da CCI proposta por Bennett e Xie em 1988 (4 ligaduras), da CCI adaptada (1 ligadura), ou do procedimento Sham.	57
Figura 9 - Desenho experimental da avaliação dos aspectos afetivos e cognitivos, através do teste relacionado à atenção e memória (teste de reconhecimento: interação com objetos novos e velhos), do teste relacionado à ansiedade (open-field) e do teste relacionado à depressão (teste de nado forçado) após 21 dias da CCI adaptada ou do procedimento Sham em ratos.	58
Figura 10 - Desenho experimental do estudo efeito de um anti-inflamatório não-esteroidal na atenuação da DN periférica induzida pela CCI.	59
Figura 11 - Desenho experimental do estudo do efeito da inativação das redes neurais do córtex PrL durante a geração, potencialização e manutenção da DN periférica induzida pela CCI.	60
Figura 12 - Desenho experimental do estudo da investigação glutamatérgica, endocanabinoide e endovaniloide do PrL durante a DNC induzida pela CCI.	65

Figura 13 - Desenho experimental do estudo da investigação da comorbidade dor crônica e ansiedade/pânico e da participação do sistema glutamatérgico do córtex PrL durante a DNC induzida pela CCI.	66
Figura 14 - Ilustração da evolução da neuropatia na pata contralateral (esquerda) e na pata ipsilateral (direita) após lesão de constrição crônica (CCI) do nervo isquiático e procedimento Sham em 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia.	70
Figura 15 - Efeito da lesão pela constrição crônica (CCI) através de 4 ou uma simples ligadura do nervo isquiático no teste de von Frey.	71
Figura 16 - Efeito da lesão pela constrição crônica (CCI) através de 4 ou de uma simples ligadura do nervo isquiático no teste de von Frey.	72
Figura 17 - Efeito da lesão nervosa pela constrição crônica (CCI) através de 4 ou uma simples ligadura do nervo isquiático na sensibilidade ao teste da acetona.	74
Figura 18 - Ausência de efeito da lesão nervosa causada pela constrição crônica (CCI) através de 4 ou uma simples ligadura do nervo isquiático na sensibilidade da para esquerda (contralateral) ao teste da acetona.	74
Figura 19 - Parametros lineares da marcha.	76
Figura 20 - Efeito da lesão neural pela constrição crônica (CCI), através de quatro ou de uma única ligadura, do nervo isquiático na frequência de levantamento (A), frequência de cruzamentos (B), frequência de autolimpeza (C), frequência de alerta defensivo (D), tempo gasto na periferia da arena (E) e tempo gasto na área central da arena (F) 21 dias após a cirurgia.	78
Figura 21 - Efeito da lesão neural pela constrição crônica (CCI) de nervo espinal, através de quatro ou de uma única ligadura do nervo isquiático na frequência e duração da imobilidade evocada durante o teste de nado forçado 21 dias após a CCI ou após o procedimento Sham.	79
Figura 22 - Efeito da lesão neural pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI), através de quatro ou de uma ligadura, no índice de reconhecimento de objetos (A), na duração da exploração dos objetos idênticos (B) e na duração da exploração do novo objeto (C) no teste de reconhecimento de objetos.	80
Figura 23 - Efeito da administração de indometacina (IP) sobre a neuropatia induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI).	83
Figura 24 - Efeito da administração de indometacina (IP) sobre a neuropatia induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI).	85
Figura 25 - Efeito de microinjeções de cloreto de cobalto (CoCl ₂) no córtex pré-límbico na dor neuropática causado pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI).	87

Figura 26 - Ausência de efeito de microinjeções de cloreto de cobalto (CoCl_2) no córtex pré-límbico na dor neuropática causado pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)...	88
Figura 27 - Efeito de microinjeções de cloreto de cobalto (CoCl_2) no córtex pré-límbico na dor neuropática causado pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)..	90
Figura 28 - Ausência de efeito de microinjeções de cloreto de cobalto (CoCl_2) no córtex pré-límbico na dor neuropática causado pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI)...	91
Figura 29 - Representação dos sítios de microinjecção de cloreto de cobalto ou solução salina fisiológica na divisão pré-límbica do córtex “pré-frontal” medial, de acordo com o atlas esteotático de Paxinos e Watson (1997).....	92
Figura 30 - BL1: linha de base registrada antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; BL2: linha de base medida após 21 dias da CCI; Seta B: microinjeção de antagonista glutamatérgico no córtex PrL dos animais após o registro da BL2. O teste de von Frey (pata esquerda) foi, então, realizado até 60 minutos.	93
Figura 31 - BL1: linha de base tomada antes dos procedimentos; Seta A: procedimento CCI; BL2: linha de base registrada após 21 dias da cirurgia; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2. O teste de von Frey (pata direita) foi realizado até 60 minutos	94
Figura 32 - BL1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; BL2: linha de base média após 21 dias da CCI; Seta B: microinjeção do antagonista CB1 no córtex PrL dos animais após a medida da BL2. O teste de von Frey (pata esquerda) foi, então, realizado até 60 minutos.	95
Figura 33 - Gráfico sem os valores da linha de base 1 para melhor vizualização das curvas.....	96
Figura 34 - BL1: linha de base registrada antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; BL2: linha de base medida após 21 dias da CCI; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PRL dos animais feita após a BL2.	97
Figura 35 - BL1: linha de base registrada antes dos procedimentos; Seta A: procedimento CCI; BL2: linha de base medida após 21 dias da cirurgia; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PRL dos animais após a medida da BL2.	99
Figura 36 - BL1: linha de base registrada antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; BL2: linha de base medida após 21 dias da CCI; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PRL dos animais após a BL2.....	100
Figura 37 - Gráfico sem os valores da linha de base 1 para melhor discriminação entre as curvas. BL2: linha de base tomada após 21 dias da cirurgia; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2..	102

Figura 38 - BL1: linha de base antes dos procedimentos realizados; Seta A: procedimento Sham; BL2: linha de base medida após o procedimento Sham; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2.	103
Figura 39 - BL1: linha de base medida antes dos procedimentos realizados; Seta A: procedimento Sham; BL2: linha de base medida após o procedimento Sham; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2.....	103
Figura 40 - A: Representação esquemática dos sítios de microinjecção histologicamente confirmados na divisão pré-límbica do córtex “pré-frontal” medial de (○) véculo, (■) NMDA em diferentes doses, (▲) LY235959 em diferentes doses (●) AEA em diferentes doses, (□) AM251 em diferentes doses, (△) 6- ICPS 3pmol, (★) associações farmacológicas de acordo com o atlas esteróxico de Paxinos e Watson (1997). B: Fotomicrografia representativa de uma seção transversal do cérebro que de um rato Wistar, mostrando um local de microinjeção de droga no córtex PrL. Microinjeções realizadas no hemisfério cerebral contralateral à CCI ou ao procedimento Sham.....	104
Figura 41 - Efeito do confronto entre ratos Wistar e serpente constritora após 21 dias da CCI ou do procedimento Sham sobre os comportamentos de avaliação de risco (A-B), de imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E- F) evocados pelo roedor.....	106
Figura 42 - Efeito do confronto entre ratos Wistar e serpente constritora após 21 dias da CCI ou do procedimento Sham sobre a respostas aferidas no teste de von Frey.	108
Figura 43 - Efeito do tratamento do córtex PrL com o agonista NMDA de ratos Wistar após 21 dias da CCI sobre o sobre o comportamento de avaliação de risco (A-B), imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E- F) evocados pelo roedor ameaçados por serpentes.	110
Figura 44 - Efeito do tratamento do córtex PrL com o agonista NMDA em ratos Wistar após 21 dias do procedimento CCI sobre o teste de von Frey.....	112
Figura 45 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um antagonista NMDA, o LY235959, em ratos Wistar após 21 dias da CCI sobre o sobre o comportamento de avaliação de risco (A-B), imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E- F), evocados pelo roedor com DNC na presença do predador.....	114
Figura 46 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um antagonista NMDA, o LY235959, em ratos Wistar após 21 dias do procedimento CCI sobre as respostas aferidas pelo teste de von Frey em animais com DNC.	116
Figura 47 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um antagonista CB1, o AM251, de ratos Wistar após 21 dias da CCI sobre o comportamento de avaliação de risco (A-B), de imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E- F) evocados pelo roedor na presença da serpente.....	118

Figura 48 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um antagonista CB1, o AM251, em ratos Wistar após 21 dias do procedimento CCI sobre o teste de von Frey em animais com DNC.....	120
Figura 49 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um agonista CB1, o AEA, em ratos Wistar com DNC após 21 dias da CCI sobre o comportamento de avaliação de risco.....	122
Figura 50 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um agonista CB1, o AEA, em ratos Wistar com DNC após 21 dias do procedimento CCI sobre as respostas registradas no teste de von Frey.....	124
Figura 51 - Ilustração dos comportamentos defensivos evocados por ratos Wistar com DNC após 21 dias da CCI confrontados com serpente constritora, a salamanta (<i>Epicrates cenchria crassus</i>), em um modelo proposto de comorbidade de DNC com ansiedade/pânico.....	125
Figura 52 - Representação esquemática dos sítios de microinjeção de drogas na divisão pré-límbica do córtex “pré-frontal” medial de (○) veículo, (■) NMDA em diferentes doses, (□) LY235959 em diferentes doses (△) AEA em diferentes doses, (★) AM251 em diferentes doses, de acordo com o atlas esteróxico de Paxinos e Watson (1997).....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico do tratamento por via IP com a indometacina.	59
Tabela 2 - Distribuição dos grupos do estudo neurofisiológico realizados na divisão PrL do CPFM (hemisfério direito e esquerdo).	60
Tabela 3 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.	61
Tabela 4 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.	62
Tabela 5 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.	63
Tabela 6 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.	64
Tabela 7 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.	67
Tabela 8 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.	67
Tabela 9 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.	68
Tabela 10 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.	68
Tabela 11 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da Avaliação dos aspectos nociceptivos, motores e afetivo-cognitivos de ratos submetidos a um modelo adaptado de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI: uma ligadura) comparando com o modelo clássico de Bennett e Xie (CCI: quatro ligaduras) O símbolo – significa que não houve alteração; ↑ causou e ↓ não causou alteração nos comportamentos avaliados.	127
Tabela 12 - Resumo dos resultados obtidos no estudo do efeito da administração por via periférica (IP) de Indometacina sobre a alodinia mecânica aferida pelo teste de von Frey. O símbolo – significa que não houve alteração do limiar de von Frey; ↑ aumentou ou ↓ diminuiu a alodinia mecânica nos animais.	127

Tabela 13 - Resumo dos resultados obtidos no estudo do efeito da microinjeção (ipsi e contralateral, em relação ao lado do Sham ou CCI) de cloreto de cobalto (1mM/200nL) na região PrL do CPFM sobre a alodinia mecânica aferida pelo teste de von Frey. O símbolo – significa que não houve alteração do limiar de von Frey; ↑ aumentou ou ↓ diminuiu a alodinia mecânica nos animais. 128

Tabela 14 - Resumo dos resultados obtidos no estudo dos sistemas glutamatérgico, endocanabinoide e endovaniloide na região PrL do CPFM sobre a alodinia mecânica aferida pelo teste de von Frey. O símbolo – significa que não houve alteração do limiar de von Frey; ↑ aumentou ou ↓ diminuiu a alodinia mecânica nos animais. 128

Tabela 15 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da comorbidade entre DNC com ansiedade/pânico através da realização do confronto entre ratos com 21 dias de CCI ou procedimento Sham e a salamanta, uma serpente constritora. O símbolo – significa que não houve alteração do limiar de von Frey; ↑ aumentou ou ↓ diminuiu a alodinia mecânica ou medo nos animais. 129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: micrograma

µL: microlitro

µm: micrômetro

AEA: anandamida

CB₁: receptor canabinoide do tipo CB₁

CCA: parte anterior do giro do cíngulo

CCI: constrição crônica do nervo isquiático

CPFM: córtex “pré-frontal medial”

DMSO: dimetilsulfóxido

DC: dor crônica

DN: dor neuropática

DNC: dor neuropática crônica

EPM: erro padrão da média

GABA: ácido gama-aminobutírico

LTP: potencial de longa duração

mg: miligrama

min: minutos

n: número de animais por grupo

NMDA: N-metil D-Aspartato

NMgR: núcleo magno da rafe

PrL: córtex pré-límbico

s: segundos

S1: córtex somatossensorial primário

S2: córtex somatossensorial secundário

SCP: substância cinzenta periaquedutal

SNL: ligadura do nervo espinal

TRPV₁: receptor vaniloide (canal iônico) de potencial transitório

GLOSSÁRIO DE TERMOS USADOS NO ESTUDO DA DOR NEUROPÁTICA (IASP, 2014)

Alodinia: dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor.

Analgesia: Ausência de dor em resposta a estimulação que normalmente seria dolorosa.

Autotomia: termo usado para descrever uma forma de automutilação que pode resultar no aparecimento de feridas ou na amputação dos dígitos.

Causalgia: uma síndrome de dor ardente sustentada, alodinia e hiperpatia após uma lesão traumática do nervo, muitas vezes combinada com disfunção vasomotora e sudomotora e alterações tróficas posteriores.

Desaferentação: perda de fibras nervosas sensoriais que normalmente conduzem informações sensoriais dos tecidos periféricos para a medula espinal.

Disestesia: sensação anormal desagradável, sendo espontânea ou provocada.

Dor: uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos.

Dor por desaferentação: dor iniciada ou causada por uma lesão primária do sistema nervoso central ou periférico.

Dor Neuropática: dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial.

Dor Neuropática central: dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial central.

Dor Neuropática periférica: dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial periférico.

Dor Nociceptiva: dor decorrente de dano real ou potencial ao tecido não neural, devido à ativação de nociceptores.

Estímulo nocivo: um estímulo que é danoso para o tecido normal.

Hiperalgesia: aumento da dor de um estímulo que normalmente provoca dor.

Hipoalgesia: sensação dolorosa diminuída em resposta a um estímulo normalmente doloroso.

Limiar de Dor: intensidade mínima de um estímulo que é percebido como doloroso.

Neuropatia: distúrbio da função ou mudança patológica de um nervo. Acometimento de um nervo: mononeuropatia; acometimento de vários nervos: multiplexação mononeuropatia; se difusa e bilateral: polineuropatia.

Nocicepção: processo neural de codificação de estímulos nocivos.

Neurônio Nociceptivo: neurônio central ou periférico do sistema nervoso somatossensorial que é capaz de codificar estímulos nocivos.

Nociceptor: um receptor sensorial de alto limiar do sistema nervoso somatossensorial periférico que é capaz de transduzir e codificar estímulos nocivos.

Sensibilização: aumento da capacidade de resposta dos neurônios nociceptivos para sua entrada normal e /ou recrutamento de uma resposta para entradas normalmente sublimítrofes.

Sensibilização Central: maior capacidade de resposta dos neurônios nociceptivos no sistema nervoso central à sua entrada aferente normal ou sublimiar.

Sensibilização periférica: maior capacidade de resposta e limiar reduzido de neurônios nociceptivos na periferia para a estimulação de seus campos receptivos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Dor.....	24
1.2 Da nocicepção a percepção da dor	27
1.3 Dor neuropática	30
1.4 Modelos animais de dor neuropática	31
1.5 Dor neuropática e ansiedade/pânico	34
1.6 Sistemas glutamatérgicos, endocanabinoides e endovaniloides.....	37
 2 OBJETIVOS	 40
2.1 Objetivos geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
 3 MATERIAL E MÉTODOS.....	 46
3.1 animais.....	46
3.2 Modelo de dor neuropática	46
3.3 Testes nociceptivos.....	47
3.3.1 Teste de alodinia mecânica.....	47
3.3.2 Teste de sensibilidade ao frio	49
3.4 Teste locomotor	50
3.4.1 Teste da caminhada pela plataforma	50
3.5 Testes comportamentais relacionados a emoções	52
3.5.1 Teste do campo aberto (open field)	52
3.5.2 Teste de reconhecimento	52
3.5.3 Teste do nado forçado.....	53
3.5.4 Teste do confronto entre presa e predador: comorbidade entre dor crônica e ansiedade/pânico.....	53
3.6 Cirurgia estereotáxica	55
3.7 Microinjeção de drogas	55
3.8 Histologia	56
3.9 Análise estatística	56
3.10 Procedimentos experimentais	57

4 RESULTADOS	70
4.1 Parte I.....	70
4.2 Parte II	81
4.3 Parte III	105
4.4 Resumos dos Resultados	127
 5 DISCUSSÃO	 131
 6 CONCLUSÕES.....	 153
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 155
 APÊNDICES	 172

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A proposta pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, sigla em inglês para *International Association Study for Pain*), inclui elementos subjetivos, que descrevem dor como “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nos termos dessa lesão” (Merskey e Bogduk, 2014 - IASP, 2014). De acordo com Katz e Melzack (1999), dor é uma experiência pessoal e subjetiva que pode apenas ser sentida pelo sofredor. Visão esta também suportada por McCaffery (1989) que afirma que “dor é tudo o que a pessoa vivenciando-a diz que é e existe todas as vezes que a pessoa diz que existe”.

Embora dor seja algo altamente subjetivo, o entendimento de seus mecanismos e/ou processos é essencial para um melhor controle e manejo da mesma. Entretanto, tentativas para entendê-la, e quantificá-la, enfrentam dificuldades especiais, oriundas da associação de sua sensação a um conjunto variado de fatores emocionais, motivacionais, culturais, raciais e de gênero, cuja influência é inegável. Por consequência, a dor é considerada um fenômeno intrigante e enigmático.

O livro de Melzack, intitulado “*The Puzzle of Pain*” (1973), reflete a complexidade da sensação e experiência de dor, onde o autor argumenta que, devido a sua inadequada avaliação inicial, especificamente dos limiares de sua detecção e tolerância, a dor, especialmente a dor crônica (DC), não é corretamente tratada e documentada, tanto por parte dos clínicos, quanto pelos demais cuidadores do paciente. O autor entende que sua mensuração e avaliação são áreas, nas quais muitos melhoramentos poderiam e deveriam ser

feitos, podendo, assim, resultar em um melhor manejo da mesma, redução de sua frequência e da severidade do sofrimento por ela provocado.

Tentativas, todavia, para reduzir toda a dor percebida a zero, considerada, esta, numa escala de zero a dez, parece algo ilusório, não fisiológico e contraditório à visão de como nossa cultura a aborda enquanto fenômeno. Para muitos de nós, mal sentimos o fenômeno álgico, já buscamos remover, através de analgésicos, a dor, sem sequer atentarmos ao fator que a desencadeou. Do mesmo modo, há aqueles que buscam distrair-se para esquecer seus sintomas, quando não aguardam, simplesmente, que a dor diminua, ou finalize, espontaneamente.

Neste contexto, cumpre lembrar que, assim como nossa tolerância para algum grau de dor é relativamente alta, há o reverso da moeda, no qual queixas sobre dor são, usualmente, vistas como fraquezas, configurando uma espécie de limiar sensorial-mental expresso em imperativos do tipo “Não pergunte, nem nada diga sobre isso”, os quais, semanticamente analisados, revelam ser limitada nossa tolerância em relação aos que “se queixam muito”. Com isso, “avaliação de dor isoladamente não é o problema crucial”, já “o limiar-mental que tolera a dor, o é”. O que isso significa? Que nós temos encontrado o inimigo e ele, surpreendentemente, somos nós mesmos (Melzack e Casey, 1968).

Apesar de ser uma experiência corriqueira e conhecida por todos, a definição de dor não é tão simples quanto parece. Por ser uma experiência, com conotações subjetivas, que varia individualmente em função dos aspectos emocionais, culturais e ambientais, sua definição deixa clara a complexidade e natureza multidimensional que envolve aspectos fisiológicos, sensoriais, afetivos, cognitivos, comportamentais e socioculturais. Por essa grande variedade de aspectos envolvidos, é natural que sua avaliação e tratamento sejam amplos e complexos (Ferreira de Souza, 2012). Fisiologicamente, existem três componentes da dor: o primeiro é o *sensitivo-discriminativo*, que nos permite distinguir, por exemplo,

temperaturas nocivas dentre aquelas inócuas à pele, além da localização precisa do estímulo; o segundo é o *motivacional-afetivo*, que está relacionado às reações emocionais (medo e ansiedade), e neurovegetativas (sudorese, taquicardia, hipotensão), evocados segundo fatores inatos de cada espécie, aprendizagem e memória; e o terceiro, o *cognitivo*, relacionado à atenção e à tomada de decisão (Brandão, 2001, 2014, da Silva e Ribeiro-Filho, 2011).

A dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda está relacionada a afecções traumáticas, infecciosas ou inflamatórias; há expectativa do seu desaparecimento após a cura da lesão e existe delimitação temporal. Durante a dor aguda, observam-se no indivíduo respostas neurovegetativas, como aumento da pressão arterial, taquicardia, taquipneia, ansiedade e agitações psicomotoras (Melzack, 1999; Pimenta, 2000; Marchand, 2014). Contudo, a DC não desempenha nenhum papel fisiológico útil fundamental para a sobrevivência. Normalmente, não há respostas neurovegetativas associadas ao sintoma; mas, ansiedade, depressão, além de fadiga intensa são respostas frequentes neste tipo de dor (Melzack, 1999; Pimenta, 2000; Marchand, 2014). Dessa forma, a dor crônica pode prejudicar a qualidade de vida e capacidade funcional do indivíduo (Elliott e cols., 1999, Vartiainen e cols., 2017).

A recente evolução do conhecimento sobre as bases neurofisiológicas da dor nos ajuda a entender melhor a complexidade do fenômeno doloroso. Atualmente, é bem conhecido que, desde a estimulação nociceptiva até a percepção, há uma ampla gama de mecanismos endógenos que influenciam a nossa experiência de dor. Mecanismos endógenos excitatórios e inibitórios aumentam ou diminuem o sinal nociceptivo que resulta em mais ou menos dor. Uma visão puramente linear não é mais adequada para entender como a dor pode persistir ou mesmo aparecer sem lesões aparentes. Para entendermos a neurofisiologia da dor, não devemos olhar apenas para os impulsos nociceptivos aferentes que se originam na periferia para as grandes áreas, mas também olharmos atentamente para todos os mecanismos

endógenos envolvidos na manutenção e modulação da dor em todos os níveis do sistema nervoso central (Marchand, 2014). Sendo assim, o presente trabalho pretende oferecer novos subsídios e ferramentas para o entendimento da dor, assim como abordar seus aspectos cognitivos e emocionais decorrentes de sua cronificação.

1.2 Da nocicepção a percepção da dor

A sensibilização das fibras sensitivas, dentre elas as nociceptivas, é o denominador comum após injúria ou inflamação, que resulta a liberação de mediadores químicos originados de diferentes células. Os mediadores químicos liberados atuam ativando diretamente os nociceptores ou mesmo sensibilizando-os (Kandel e cols., 2000; Julius e Basbaum, 2001).

Os mediadores químicos podem ativar ou sensibilizar os nociceptores, que são terminações nervosas livres de neurônios pseudo-unipolares, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais do nervo espinal e nos gânglios trigeminais e processam esses estímulos traumáticos ou inflamatórios (Messlinger, 1997; Millan, 1999; Kandel e cols, 2000). Os axônios desses neurônios pseudo-unipolares, denominados fibras aferentes primárias, conduzem as informações nociceptivas ao sistema nervoso central.

Três tipos de receptores das terminações nervosas livres estão associados com dois tipos de fibras nervosas aferentes primárias. Considerando um critério funcional, são eles: 1) Nociceptores mecanossensitivos com fibras A δ (delta), mielinizadas e de diâmetro médio, com velocidade de condução de 5 a 30 m/s; 2) Nociceptores mecanotérmicos com fibras A δ e 3) Nociceptores Polimodais com fibras C, não mielinizadas, de pequeno diâmetro e com velocidade de condução de cerca de 1 m/s, os quais respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

Como podemos ver na figura 1, o estímulo noceptivo recruta nociceptores periféricos que conduzem o sinal noceptivo para o primeiro neurônio somatossensorial situado no gânglio da raiz dorsal do nervo espinal, que se conecta com o neurônio de segunda ordem situado no corno dorsal da medula espinal. É precisamente nas lâminas II, III, e V de Rexed, do corno dorsal da medula espinal, que o neurônio aferente primário faz a primeira sinapse com o segundo neurônio. O segundo neurônio envia axônios que formarão os tratos neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico, após cruzarem o plano mediano da medula espinal e enviam projeções ascendentes aferentes para os grandes centros supraespinais, como a formação reticular, o sistema límbico, os núcleos ventral pósterolateral (trato neoespinotalâmico) e intralaminares (trato paleoespinotalâmico) do tálamo dorsal.

O componente trigeminal do sistema ântero-lateral tem seu primeiro neurônio no gânglio semilunar de Gasser, que faz sinapse no núcleo espinal do nervo trigêmeo, onde se localizam os neurônios de segunda ordem da via, cujos axônios cruzam a linha mediana e formam o lemnisco trigeminal, o qual se dirige para o núcleo ventral pósteromedial do tálamo dorsal. Do tálamo dorsal, por meio da corona radiata, os neurônios de terceira ordem conectam-se com o córtex somestésico, onde se espalham somatotopicamente.

É importante enfatizar que o segundo neurônio pode conectar-se com diferentes núcleos do tronco cerebral, incluindo a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e núcleo magno da Rafe (NMgR), que são áreas envolvidas na modulação endógena descendente da dor. Os córtices somatossensoriais primário (S1) e secundário (S2), que recebem aferências do tálamo dorsal estão envolvidos na qualidade da percepção sensorial da dor, em que se incluem localização, duração e intensidade da dor. Os neurônios terciários também se projetam para estruturas límbicas, incluindo a região anterior do córtex do giro do cíngulo (Cg1) e a *ínsula*, que estão envolvidos com os componentes afetivos e emocionais da dor (Marshand, 2012),

assim como os núcleos hipotalâmicos, área parabraquial e complexo amigdalóide (Hammond 1989).

Figura 1 - Representação esquemática da via espinotalâmica na percepção de dor (e temperatura). Os neurônios aferentes primários (situados no gânglio da raiz dorsal do envro espinal) fazem conexão com o segundo neurônio no corno posterior da medula espinal (representados em nível lombar e cervical no presente esquema) que, por sua vez, envia projeções para o núcleo ventral-pósterolateral do tálamo doirsal, que se conecta com o córtex somatossensorial, onde é processado o estímulo nociceptivo em dor, segundo Purves e cols., *Neuroscience*, 2001.

1.3 Dor neuropática

A dor neuropática (DN) é um dos principais problemas de saúde nos países desenvolvidos. A DN é um problema comum na clínica e faz parte de várias síndromes neurológicas, representando 25% dos pacientes atendidos nas grandes clínicas de dor. Estima-se que a prevalência da DN na população seja aproximadamente de 7 a 8% da população, sendo ocasionada por complicação de traumas acidentais, procedimentos cirúrgicos e doenças que afetam o sistema nervoso central ou periférico (Alves e cols., 2010).

A DC é um problema global que atingiu proporções epidêmicas. Estima-se que 30% dos adultos sofram de DC e que outros 10% serão diagnosticados com DC a cada ano (Goldberg e McGee, 2011). Apesar da alta prevalência de DC, cerca de 1,5 bilhão de pessoas ainda estão aflitas em todo o mundo, devido seu difícil tratamento (Goldberg e McGee, 2011). Assim, muito resta a ser compreendido sobre as causas subjacentes a esta patologia.

A DN é uma patologia desafiadora em relação ao seu tratamento, necessitando, assim, do uso de modelos experimentais em animais de laboratório para melhor compreensão de suas bases neurais. As neuropatias dolorosas normalmente estão associadas à dor persistente, à dor paroxística espontânea, à alodinia (condição em que estímulos normalmente inócuos são percebidos como nociceptivo) e à hiperalgesia (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos) (Merskey e Bogduk, 1994). Os mecanismos neurais relacionados à DN não são completamente esclarecidos; contudo, experimentos em animais de laboratório indicam o envolvimento da sensibilização de neurônios aferentes periféricos e centrais (Koltzenburg e Scadding, 2001; Boyce-Rustay e Jarvis, 2009).

De fato, a DN se manifesta através de alterações neuroquímicas no sistema nervoso central e periférico, afetando o nervo periférico, estruturas espinais e corticais (Xu e cols.,

2012). Na periferia, a DN está associada a alterações na excitabilidade dos nociceptores e, em nível de medula espinal, a potenciação excitatória de longo prazo (LTP) (Xu e cols., 2012).

Na periferia, as lesões neuropáticas desencadeiam a sensibilização periférica que induzem uma atividade neural anormal de longo prazo (LTP) ao longo das vias aferentes primárias (Basbaum e cols., 2009). Na medula espinal, os neurônios do corno dorsal exibem respostas excitatórias potenciadas e diminuição do limiar de disparo em resposta à dor (Ikeda e cols., 2006; Sandkuhler, 2007). Atualmente, pesquisas recentes se concentraram em apontar as mudanças moleculares em regiões supraespinais que mediarão a DN crônica. Curiosamente, a plasticidade sináptica nas principais áreas corticais envolvidas na dor foi observada em correspondência com a DN crônica (Zhuo, 2005), especificamente, os estudos fornecem consistentemente evidências de mudanças na transmissão excitadora em modelos animais de dor neuropática (Zhuo, 2016).

De fato, há necessidade de mais trabalhos que abordem os fenômenos neuroquímicos centrais, assim como a participação de neurotransmissores e neuromoduladores específicos do sistema nervoso central na elaboração da DN crônica. Sendo assim, o presente trabalho pretende avançar no entendimento dos mecanismos neurais, moleculares e farmacológicos do neocórtex envolvidos na geração e manutenção da DN, bem como fornecer dados que colaborem no desenvolvimento de novas perspectivas e estratégias terapêuticas para o tratamento da DC de característica neuropática.

1.4 Modelos animais de dor neuropática

Modelos experimentais em animais foram desenvolvidos para investigar e tentar compreender os mecanismos relacionados à DN (veja a figura 2). Em roedores, o experimento mais comum é a indução da neuropatia periférica através da lesão do nervo isquiático. Sendo

esta lesão (total ou parcial) causada por ligadura, transecção ou compressão do nervo periférico (Mogil, 2009).

A transecção completa do nervo isquiático foi o primeiro modelo animal de NP (Wall e cols., 1979). No entanto, aqueles mais utilizados, hoje, são a ligadura do nervo espinal (SNL), consistindo na ligadura do nervo espinal próximo ao gânglio da raiz dorsal do nervo espinal em nível dos segmentos L5 e L6 (Kim e Chung, 1992). O modelo experimental de DN proposto por Seltzer e colaboradores (1990) consiste em amarrar firmemente 1/3-1/2 do nervo isquiático. Lee e colaboradores (2000) transeccionaram uma combinação diferente dos três ramos neurais (tibial, sural e peroneal) do nervo isquiático para induzir NP.

Finalmente, Bennett e Xie (1988) introduziram um novo modelo animal de neuropatia periférica. Esse modelo experimental consiste em lesão por constrição crônica (CCI) do nervo isquiático em roedores, compreendendo quatro ligaduras frouxas amarradas ao redor do nervo isquiático proximal à sua trifurcação. Essa constrição leva a um edema intraneural, à isquemia focal e à degeneração do tipo Walleriana. Consequentemente, esse modelo experimental resulta em hipernocicepção causada por substâncias química e provocada pelo calor, alodinia ao frio e a estímulos mecânicos e também em sintomas de dor espontânea que duram mais de dois meses (Bennett e Xie, 1988; Attal e cols., 1990). Sendo assim, no presente trabalho foi realizada uma adaptação da CCI proposta inicialmente por Bennett e Xie (1988). Tanto os aspectos sensoriais, quanto os cognitivos, emocionais e motores foram registrados neste trabalho. Esta adaptação de um modelo para indução de neuropatia periférica foi feita por meio da realização de uma ligadura no nervo isquiático de ratos Wistar.

Figura 2 - Representação esquemática de diferentes modelos experimentais de dor neuropática. Ligadura de raízes (SNL), ligadura parcial do nervo (PNL), constrição crônica do nervo (CCI), rizotomia, contusão mecânica da medula, lesão poupadora de nervo. Adaptada de Garcia-Larrea e Magnin, 2008.

Há relatos na literatura de que a percepção da dor pode ser alterada pelo humor, pela cognição e pela atenção, ou por estimulação direta do córtex cerebral; porém, pouco é sabido sobre os mecanismos neurais subjacentes à modulação cortical da dor. O córtex pré-frontal medial (CPFM) está associado a funções cognitivas, tais como atenção, tomada de decisão, e memória (Gusnard e cols., 2001; Phelps e cols., 2004).

Entre as estruturas cerebrais envolvidas em condições de DC, o CPFM é de importância crucial tanto nos componentes afetivos como sensoriais inerentes a esse fenômeno nociceptivo. Alterações nessa área do neocórtex foram relatadas em muitas condições de DC, bem como em comorbidades relacionadas à dor, tais como ansiedade, depressão e cognição (Krishnan e cols., 1985a, b; Massart e cols., 2016). De fato, há evidências da existência de *déficits* cognitivos e emocionais após a lesão de nervo de roedores e o CPFM parece estar envolvido nestas respostas comportamentais (Seminowicz e cols., 2009; Low e cols., 2012; Tajerian e cols., 2013).

Em adição, foi demonstrado que a divisão pré-límbica (PrL) do CPFM está envolvida na elaboração do aumento do limiar nociceptivo (aferido através do teste de retirada de cauda) induzido por respostas comportamentais defensivas de fuga elaborada em animais (de Freitas e cols., 2013, 2014). Além disso, Falconi-Sobrinho e colaboradores (2017) mostraram que o pré-tratamento do Cg1 com lidocaína, diminuiu o efeito pró-aversivo e a antinocicepção evocada pelo bloqueio do receptor do tipo GABA_A no hipotálamo posterior de roedores. De fato, o CPFM tem diferentes funções que podem resultar em diferentes tipos de reações comportamentais, uma vez que Wang e colaboradores (2015) mostraram que a lesão bilateral do córtex PrL, foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata em animais com inflamação crônica. Corroborando esses dados, Millicamps e colaboradores (2007), mostraram o envolvimento do CPFM na elaboração do efeito analgésico induzido pela administração de D-cycloserina, um agonista parcial de receptor NMDA, no modelo de DN.

Muito embora tenha sido evidenciada sua participação em processos antinociceptivos, esta área cortical também está ligada a processos cognitivos e emocionais associados à DC, e suas mudanças morfológicas podem promover o declínio cognitivo e a depressão durante fases crônicas da dor (Metz e cols., 2009). O exato papel do CPFM na elaboração da DN crônica ainda não está bem esclarecido. Sendo assim, estudar a participação da subdivisão PrL do CPFM durante a gênese e manutenção da DN induzida pela CCI em roedores pode nos oferecer dados importantes para a elucidação desta patologia e das suas consequências.

1.5 Dor neuropática e ansiedade/pânico

Segundo a IASP, cerca de uma em cada cinco pessoas sofrem de DC em todo o mundo. Os efeitos na qualidade de vida são arrasadores. Um estudo publicado em 2006, no *European Journal of Pain*, analisou 126 pacientes com DNC e identificou que o grupo

apresentava problemas como insônia (60%), dificuldade de concentração (36%), depressão (33%) e ansiedade (27%). Até mesmo a vida profissional das pessoas acometidas parece ser afetada: 52% dos participantes tiveram prejuízos no trabalho devido à dor (Breivik e cols., 2006).

Durante as últimas décadas, a influência da ansiedade na percepção da dor tem sido bastante investigada. A ansiedade é aceita como um dos fatores psicológicos determinantes na experiência subjetiva da dor (Tang e Gibson, 2005). Um número substancial de trabalhos sobre dor tem considerado a influência da ansiedade na dor. Alguns estudos têm sido direcionados para a investigação do transtorno de ansiedade generalizada e do transtorno de pânico em quadros álgicos. Asmundson e colaboradores (1996) apontaram a existência de um elo entre transtorno de ansiedade e dor, demonstrando que a prevalência da ansiedade é maior em pessoas que sofrem de dores crônicas.

Knaster e colaboradores (2011) mostraram que o diagnóstico do transtorno de ansiedade precede o início da dor em mais de 75% dos indivíduos. Similarmente, Shaw e colaboradores identificaram que pacientes que sofriam de lombalgia apresentavam 2,45 vezes mais chance de desenvolverem lombalgia crônica quando os mesmos tinham o diagnóstico de transtorno de ansiedade generalizada.

De fato, existe uma alta associação de comorbidade entre ansiedade e DNC, sendo que alguns pesquisadores postulam que este tipo de dor pode ser uma expressão do transtorno de estresse pós-traumático crônico (Otis e cols., 2003; Grande e cols., 2004). Com efeito, há semelhanças funcionais e metabólicas entre a DN e transtorno de estresse pós-traumático, tendo o CPFM participação importante na integração entre essas duas comorbidades (Liberizon e Phan, 2003; Feldman, 2004). Há relatos na literatura mostrando, tanto em pacientes humanos como em animais de laboratório, que a presença da DNC provoca alterações nas reorganizações funcionais em estruturas corticais e subcorticais, incluindo o

CPFM (Baliki e cols, 2006, 2008; Metz e cols., 2009), tálamo (Apkarian e cols., 2004), o complexo amigdalóide (Han e Neugebauer, 2005; Ji e cols., 2010), e o Cg₁ (Li e cols., 2010).

Muitos autores têm considerado as desordens de ansiedade como o resultado de patologias associadas ao sistema neural que organiza o comportamento de defesa (Graeff, 1994; Stein e Bouwer, 1997; Gray e Mcnaughton, 2000; Blanchard e cols., 2001; Freitas e cols 2009; de Freitas e cols., 2013, 2014; Biagioni e cols., 2016). Dessa forma, associações entre as respostas defensivas e os ataques predatórios têm sido propostas para estudar patologias, como o distúrbio de ansiedade generalizada e a síndrome do pânico (Blanchard e cols., 1997; Blanchard e cols., 2001; Guimarães-Costa e cols, 2007; Coimbra e cols., 2017). Tais associações fundamentam-se em trabalhos experimentais, como os realizados por Blanchard e Blanchard (1988) e por Blanchard e cols. (1993). Coimbra e colaboradores (2017) caracterizaram o repertório comportamental defensivo de ratos Wistar spf e de serpentes peçonhentas (cascaveis) em um modelo de confronto entre presa e predador. Segundo esses pesquisadores, o confronto entre roedores e serpentes evoca respostas de medo relacionadas à ansiedade generalizada e a ataques de pânico em arenas poligonais para serpentes, as quais oferecem um ambiente experimental mais etológico para abordar os comportamentos induzidos pelo medo inato e condicionando.

Considerando que o comportamento de medo relacionado ao pânico e à ansiedade provoca alteração do limiar nociceptivo (Coimbra e cols., 2006; Freitas e cols., 2009; de Freitas e cols., 2013, 2014, Coimbra e cols., 2017; de Oliveira e cols., 2017), o presente trabalho também pretende estudar as respostas comportamentais defensivas relacionadas ao medo inato em roedores com DNC, assim como o envolvimento da divisão PrL do CPM na elaboração desta comorbidade em ratos Wistar.

1.6 Sistemas glutamatérgicos, endocanabinoides e endovaniloides

O envolvimento do receptor endocanabinoide do tipo CB₁ na elaboração da antinocicepção induzida por endocanabinoide foi elucidado através de estudos com camundongos *knockout* para este receptor (Elphick e cols., 2001). Além disso, no teste de placa quente e no teste de formalina, animais *knockout* para o receptor CB₁ produzem hipalgesia quando comparados com os animais selvagens (Zimmer e cols., 1999). Há relatos na literatura de que a ativação do sistema endocanabinoide atua via proteína Gi, inibindo, portanto, a adenilato-ciclase e canais de Ca⁺², o que reduz a excitabilidade neuronal e, por consequência, a liberação de neurotransmissores, como o GABA e o glutamato (Mackie e Hille, 1992; Felder e cols., 1993, 1995; Fride e Mechoulam, 1993; Mackie e cols., 1993, 1995). O receptor CB₁ é altamente expresso em algumas áreas do sistema nervoso central, e a porção ventral do CPFM é especialmente rica neste tipo de receptor canabinoide (Herkenham e cols., 1991; Tsou e cols., 1998).

Não obstante, além da ação em receptores CB₁, o agonista endocanabinoide anandamida (AEA) também pode ativar receptores endovaniloides de potencial transitório do tipo 1 (TRPV₁), quando em altas doses (dos Anjos-Garcia e cols., 2017), ligados a um canal iônico permeável ao cálcio que, ao contrário do CB₁, pode facilitar a liberação de glutamato (Xing e Li, 2007). A administração de AEA na medula espinal reduz ou aumenta a DN, via ativação de receptor CB₁ ou TRPV₁, dependendo da concentração administrada (Starowicz e cols., 2007; Starowicz e Przewlocka, 2012). Portanto, uma das propostas do presente trabalho foi estudar a interação entre os sistemas endocanabinoide e endovaniloide e o envolvimento dos receptores CB₁ ou de canais iônicos TRPV₁ localizados na região PrL do CPFM no modelo de DNC induzida pela CCI em animais.

No que concerne ao o glutamato, este é um importante neurotransmissor presente no CPFM (Gigg e cols., 1994). Corroborando esta evidência, um estudo com ligantes marcados revelou que o CPFM apresenta grande quantidade de receptores glutamatérgicos do tipo ionotrópico e, dentre eles, o receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (Nicolle e Baxter, 2003). De fato, estudos clínicos mostraram que o antagonista do receptor NMDA pode reduzir tanto a hiperalgesia quanto a alodinia em pacientes com DN (Kristensen e cols., 1992; Eide e cols., 1994; Felsby e cols., 1996), entretanto, os mecanismos corticais da ativação do receptor NMDA que embasem tal efeito ainda não estão bem esclarecidos, e o presente trabalho pretende dar um passo adicional no entendimento do papel exercido pela tanto pela neurotransmissão glutamatérgica, via ativação do receptor NMDA, quanto por outros sistemas neurais, tais como o endovaniloide e o endocanabinoide do córtex PrL de ratos com DNC induzida pela CCI.

Além disso, vários estudos têm investigado a participação da neurotransmissão glutamatérgica em diversas ações dos endocanabinoides. A abordagem da neurotransmissão glutamatérgica por agonistas endocanabinoides é relatada em estruturas encefálicas, como o hipocampo, o cerebelo, o CPFM, o complexo amigdalóide, o núcleo accumbens, o corpo estriado e a substância negra (Piomelli, 2003).

Diante das evidências da participação do CPFM na elaboração da DC de origem neuropática e da forte correlação de comorbidades entre DNC e ansiedade/pânico, o objetivo do presente trabalho foi investigar os mecanismos glutamatérgicos, endocanabinoides e endovaniloides da divisão PrL do CPFM na mediação da DNC. Além disso, fora estudado aa comorbidade entre DNC e alterações emocionais relacionadas à ansiedade/pânico em ratos Wistar.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Estudar as bases neurais e psicofarmacológicas da DN e o envolvimento dos sistemas glutamatérgicos, endocanabinoide e endovaniloide da divisão pré-limbica (PrL) do córtex “pré-frontal” medial (CPFM) de ratos com dor crônica de origem neuropática. Investigar, também, o envolvimento do PrL e dos sistemas glutamatérgico e endocanabinoide na comorbidade entre DC e ansiedade/pânico, através do confronto entre serpentes constritoras e roedores com DNC.

2.2 Objetivos específicos

PARTE I

- Avaliar o efeito na sensibilidade ao estímulo mecânico e térmico causado pela modificação do modelo de DN de Bennett e Xie (1988), através da realização de uma única ligadura frouxa no nervo isquiático (CCI), ao invés de quatro ligaduras como proposto originalmente. Os testes foram feitos após 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias da CCI ou do procedimento Sham em ratos;
- Avaliar o efeito no comportamento locomotor em animais submetidos à CCI (1 ou 4 ligaduras), através do teste de caminhada pela plataforma após 7, 14, 21 e 28 dias da CCI ou do procedimento Sham em ratos, em grupos independentes de animais;

- Avaliar as alterações emocionais e cognitivas ocasionadas pela DNC, através do teste relacionado à atenção e à memória (teste de reconhecimento: interação com objetos novos e velhos), do teste relacionado à ansiedade (*open-field*) e de um teste de depressão (teste de nado forçado) após 21 dias da CCI ou do procedimento *Sham* em ratos, em grupos independentes de animais;

PARTE II

- Estudar o efeito de um anti-inflamatório não-esteroidal na atenuação da DN periférica induzida pela CCI, por meio da administração, por via intraperitoneal (IP), de indometacina (2mg/kg), um inibidor não seletivo da enzima ciclo-oxigenase (COX), avaliando-se efeito da inibição da COX no teste de alodinia mecânica 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a CCI ou procedimento *Sham* nos tempos de 0, 15, 30 min, em grupos independentes de animais;
- Estudar o efeito da administração por via intraperitoneal (IP) de indometacina (2mg/kg) na atenuação da DN periférica induzida pela CCI, avaliando-se o efeito da inibição da COX no teste de alodinia mecânica 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a CCI ou procedimento *Sham* nos tempos de 0, 15, 30 min, em grupos independentes de animais;
- Estudar o efeito da inativação das redes neurais do córtex PrL durante a geração, potencialização e manutenção da DN periférica induzida pela CCI, por meio da microinjeção (ipsilateral ou contralateral à CCI) de cloreto de cobalto (CoCl_2 ; 1mM/200nL) na divisão PrL do CPFM, por meio do teste de alodinia mecânica 7, 14, 21 e 28 dias após a CCI ou procedimento *Sham*, nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min, em grupos independentes de animais;

- Estudar a participação do sistema glutamatérgico do córtex PrL na DNC induzida pela CCI, através do pré-tratamento do PrL com um agonista de receptores NMDA (0,25, 1, 4nmol/200nl), ou de um antagonista de receptores NMDA, o LY235959 (2, 4 e 8nmol/200nl), por meio do teste de alodinia mecânica 21 dias após a CCI ou procedimento *Sham*, nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min, em grupos independentes de animais;
- Estudar a participação do sistema endocanabinoide do córtex PrL na DNC induzida pela CCI, através do pré-tratamento do PrL com anadaminda (AEA: a 5, 50, 100, 200pmol/200nL) ou com um antagonista de receptores CB₁, o AM251 (50, 100 e 200pmol/200nL), por meio do teste de alodinia mecânica 21 dias após a CCI ou procedimento *Sham*, nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min, em grupos independentes de animais;
- Estudar o efeito da interação do sistema endocanabinoide com o sistema endovaniloide na DNC através do pré-tratamento do córtex PrL com um antagonista TRPV₁, a 6 Iodo-nor-di-hidrocapsaicina (6-I-CPS) (3pmol/200nL), seguido pela microinjeção de um agonista endocanabinoide, a AEA, na concentração de 200pmol/200nl no córtex PrL, por meio do teste de alodinia mecânica 21 dias após a CCI ou procedimento *Sham*, nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min, em grupos independentes de animais;
- Estudar o efeito da interação do sistema endocanabinoide com o sistema glutamatérgico na DNC através do pré-tratamento do córtex PrL com um antagonista de receptores endocanabinoides do tipo CB₁, o AM251 na dose de 200pmol/200nL, seguido da microinjeção de um agonista glutamatérgico, o NMDA, na concentração de 1nmol/200nL, no córtex PrL, por meio do teste de alodinia mecânica 21 dias após a

CCI ou procedimentos *Sham*, nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min, em grupos independente de animais;

- Estudar o efeito da interação do sistema endocanabinoide com o sistema glutamatérgico na DNC através do pré-tratamento do córtex PrL com um agonista de receptores NMDA (1nmol/200nL), seguido da microinjeção do agonista endocanabinoide, AEA, na dose de 100pmol/200nL, por meio do teste de alodinia mecânica 21 dias após a CCI ou procedimento *Sham*, nos tempos de 0, 15, 30, 45 e 60 min, em grupos independente de animais.

PARTE III

- Estudar a comorbidade entre DNC com ansiedade/pânico através da realização do confronto entre ratos com 21 dias de CCI ou procedimento *Sham* e a salamanta, uma serpente constritora. Os comportamentos defensivos (avaliação de risco, imobilidade defensiva e fuga) evocados pelos roedores durante o confronto com a serpente, assim como a alodinia mecânica dos ratos 21 dias após a CCI ou procedimento *Sham*, foram aferidos nos tempos de 0, 15 e 30 min após o confronto;
- Estudar o possível envolvimento do sistema glutamatérgico do córtex PrL na comorbidade entre DNC com ansiedade /pânico, através do pré-tratamento dos roedores com o agonista NMDA (0,25, 1 e 4nmol/200nL) ou o antagonista LY235959 no córtex PrL 5 min antes do confronto com a serpente, avaliando, assim, o comportamento defensivo evocado durante o confronto e alteração na alodinia mecânica 21 dias após a CCI, e nos tempos de 0, 10, 20 e 30 min após o confronto.
- Estudar o possível envolvimento do sistema endocanabinoide do córtex PrL na comorbidade entre DNC com ansiedade /pânico, através do pré-tratamento do córtex

PrL de ratos com o agonista AEA (50, 100 e 200pmol/200nL) ou com o antagonista AM251 (50, 100 e 200pmol/200nL) 5 min antes do confronto com a serpente, avaliando, assim, o comportamento defensivo evocado durante o confronto e alteração na alodinia mecânica 21 dias após a CCI, e nos tempos de 0, 10, 20 e 30 min após o confronto.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*) da linhagem *Wistar*, pesando inicialmente 100g. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo claro-escuro de 12/12h) e tiveram livre acesso à água e a alimento. Os experimentos foram realizados segundo os princípios éticos elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (CEUA-FMRP-USP, Processos: 067/2012 e 036/2017) e segundo as diretrizes da *IASP* para pesquisa com estímulos nociceptivos em animais (Zimmermann, 1983). Os animais foram usados em apenas um único grupo experimental, e todos os esforços foram feitos para minimizar o desconforto dos animais.

3.2 Modelo de dor neuropática

Para induzir a mononeuropatia periférica experimental, os animais foram submetidos ao procedimento de lesão por constrição crônica do nervo isquiático (CCI), como previamente descrito por Bennett e Xie em 1988. O modelo de CCI consiste na realização de quatro ligaduras do nervo isquiático. Essa constrição provoca um edema intraneural, isquemia focal e degeneração axonal. Como consequência, o modelo resulta em alodinia mecânica e sensibilidade ao frio. No presente trabalho, foram utilizados tanto o modelo proposto por Bennett e Xie, como também o modelo adaptado da CCI, fazendo uma simples ligadura do nervo isquiático direito do roedor.

Inicialmente, os animais foram anestesiados através da administração por via intramuscular (IM) de uma solução na proporção de 0,1 ml de cetamina (92mg/kg) (Ketamina[®]) para 0,2ml de xilasina (9,2mg/kg) (Dopaser[®]). Foi realizada tricotomia do membro posterior direito e a desinfecção local com iodopolividina. Em seguida, realizou-se uma incisão longitudinal de 15 mm na altura da coxa, região dorso-lateral, em nível de trocáter/fêmur. O nervo isquiático foi exposto através da dissecação dos músculos grande glúteo e bíceps femural, e foi realizada quatro ou apenas uma ligadura com fio *Cat-gut* 4-0 no nervo isquiático da pata direita. As incisões na pele foram suturadas com o fio mononylon 5-0. Em seguida, água oxigenada foi passada no membro posterior direito do roedor. O grupo controle “falso operado” (*Sham*) foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos; entretanto, com a exposição do nervo isquiático, mas sem a ligadura do mesmo (sem a CCI).

3.3 Testes nociceptivos

3.3.1 Teste de alodinia mecânica

Foi utilizado o teste de *von Frey* (*Bonther* Equipamentos Científicos, Brasil) para avaliar o limiar nociceptivo ao estímulo mecânico. Esse teste consiste em um conjunto de monofilamentos de *nylon* (ExactTM) de várias espessuras que exercem diferentes graus de força quando aplicados sobre a área glabra da pata. Essa técnica permite avaliar a quantidade de força necessária para evocar o comportamento de retirada da pata (Chaplan e cols., 1994). Os animais foram individualmente colocados em caixas acrílicas, medindo 23x20x18 cm, dispostas sobre uma mesa com assoalho de grade de aço não maleável, com 5 mm² de espaço entre as malhas. Os filamentos do teste de *von Frey* foram então aplicados em ordem crescente de 2 a 100 g para a superfície plantar no centro da pata ou a base do terceiro ou

quarto dedos da pata lesada ou controle através assoalho de grade por cerca de 3-4 s para induzir o reflexo de retirada. O intervalo de tempo antes da aplicação do próximo filamento foi de pelo menos 10 s. Os dados foram expressos como limiar de alodinia mecânica em gramas (g). O limiar de *von Frey* foi avaliado antes do CCI ou procedimento *Sham* (linha de base 1: LB1) e antes e depois dos tratamentos farmacológicos ou do confronto com a serpente (LB2). O teste com os filamentos de *von Frey* foi repetido três vezes para ambas as patas traseiras direita e esquerda (ipsilaterais e contralaterais à lesão), alternativamente, com um intervalo de pelo menos 2 min entre cada medição. Antes da cirurgia, foi confirmado que não houve diferenças nas respostas basais das patas direita e esquerda (von Frey, 1896, Vivancos et al., 2004), procedimento nomeado de LB1.

Figura 3 - Medida da alodinia mecânica com o uso do filamento de *von Frey* (10g).

3.3.2 Teste de sensibilidade ao frio

Para avaliar a hipernocicepção ao estímulo frio, os animais submetidos aos modelos de neuropatia induzida pela CCI ou do procedimento *Sham*. Os ratos foram individualmente colocados no aparato utilizado para o teste de *von Frey*, e a hipernocicepção ao frio foi avaliada através da aplicação de 50µL de acetona na pata traseira dos animais ipsilateral e contralateralmente à lesão. O tempo gasto durante 60 segundos pelo animal lambendo a pata, passando a pata no corpo ou mordendo-a foi cronometrado e considerado indicativo de hipernocicepção ao frio (Eliav e cols., 1999; Paszcuk e cols., 2007).

Figura 4 - Medida da sensibilidade ao frio avaliada pelo teste da acetona.

3.4 Teste locomotor

3.4.1 Teste da caminhada pela plataforma

Os ratos foram treinados para caminharem sobre uma plataforma de metal (1000 mm de comprimento, 50 mm de largura), que foi proposta por Irintchev e colaboradores (2005). Na extremidade oposta da plataforma em que é posicionado inicialmente o animal, existe uma câmara de 20 x 20 x 20 cm que serve de abrigo após o final da caminhada. A presença da câmara é um forte estímulo para que os animais aprendam a andar sem pausas exploratórias e a uma velocidade constante em dois ou três treinamentos. Depois da fase de aprendizagem, antes e após a cirurgia de CCI ou procedimento *Sham*, uma avaliação da caminhada foi realizada com a gravação de um vídeo de cada animal.

A análise funcional da marcha foi realizada através da obtenção das imagens por meio de vídeo utilizando a plataforma citada anteriormente. O registro da marcha foi realizado por meio de uma filmadora (*Sony Handyca*, Tóquio, Japão), dotada de um cabo USB conectada diretamente a um computador portátil. As imagens foram submetidas ao *software open source Kinovea* (<http://www.kinovea.org/>), que permite a identificação e análise das imagens (Caggiano, e cols., 2014), segundo os parâmetros previamente selecionados, e o armazenamento apropriado dos dados.

O ângulo de movimento de flexão da parte traseira durante a marcha foi calculado nas imagens gravadas do plano sagital (perfil). As gravações de vídeo foram analisadas para selecionar os quadros em que o ciclo de marcha subsequente foi observado: (a) velocidade do trajeto e da passada (distância percorrida durante o movimento do membro afetado); (b) tempo (tempo total gasto) trajeto e da passada; (c) comprimento do passo (soma da distância do passo da pata direita com o passo da pata esquerda) e passada; (d) flexão do tornozelo

durante o contato inicial (toque inicial do membro afetado com o solo) e contato final (momento final de contato do membro afetado pela plataforma). Esses parâmetros avaliam precisamente o movimento durante a marcha e o comprometimento motor induzido por danos causados em nervos. A marcha foi monitorada para todos os grupos de ratos que passaram pela investigação antes da cirurgia e 7, 14, 21 ou 28 dias após a cirurgia.

Figura 5 - Percurso na plataforma de caminhada. (A) dimensões e (B) visão frontal.

3.5 Testes comportamentais relacionados a emoções

3.5.1 Teste do campo aberto (open field)

O aparato de campo aberto consiste em uma arena circular em acrílico cristal (97 cm de diâmetro e paredes de 32,5 cm de altura, topo aberto e piso dividido em 19 seções semelhantes). Cada animal foi colocado suavemente no centro do recinto e o comportamento foi filmado (*Sony Handycam*) durante 5 minutos. O teste avalia a exploração ambiental e a atividade locomotora geral, e permite avaliar um comportamento relacionado à ansiedade em roedores: a preferência por posicionamento junto à amurada da arena. Assim, mediu-se o tempo de permanência do centro ou na periferia da arena.

3.5.2 Teste de reconhecimento

O experimento relacionado à atenção e memória iniciou-se com um período de habituação, durante o qual os animais foram deixados a explorar livremente o local durante 1 h. O local consiste em uma caixa aberta retangular (40 × 30 × 30 cm de largura x comprimento x altura) feita de cloreto de polivinilo cinzento (PVC) iluminada por uma luz fraca. Duas horas depois da habituação, os animais eram colocados na caixa, individualmente, e exploravam-na por 5 minutos, havendo dois objetos idênticos em seu interior (fase de aquisição de memória). A câmera registrou o tempo gasto na exploração de cada objeto. Após 2 h da aquisição de memória, um dos dois objetos foi substituído por um novo objeto, sendo este diferente do anterior, em sua cor e formato. O tempo gasto explorando o objeto foi determinado quando o animal se dirigia com o focinho a uma distância mínima de 1 cm do mesmo. O comportamento dos roedores também foi registrado para posterior análise. Os

dados foram expressos em percentagem do índice de reconhecimento (IR%), que foi calculado como $[(\text{percentagem do tempo gasto explorando objeto novo} / \text{tempo gasto explorando o objeto novo}) + \text{tempo gasto explorando o objeto familiar}] \times 100$ (Pallazzo e cols., 2015).

3.5.3 Teste do nado forçado

Os animais foram submetidos ao teste do nado forçado descrito por Porsolt e cols. (1978), com algumas modificações descritas por Hu e cols. (2009). Os animais foram colocados individualmente em cilindros de acrílico (18 cm de diâmetro e 40 cm de altura) preenchidos com água a $25 \pm 1^\circ \text{C}$. A profundidade da água foi de 30 cm. Foram realizadas duas sessões de natação: uma sessão inicial de 15 minutos seguida de uma sessão de 5 min realizada após 24 horas. Ambas as sessões foram gravadas por meio de uma câmera digital (*Sony Handcam*) e os vídeos foram analisados por meio de um *software* (XPLORAT). O tempo de imobilidade foi determinado quando nenhuma atividade adicional foi observada, além dos movimentos necessários para manter a cabeça acima da linha da água.

3.5.4 Teste do confronto entre presa e predador: comorbidade entre dor crônica e ansiedade/pânico

O modelo para se estudarem as respostas relacionadas à ansiedade e pânico foi o confronto defensivo entre roedores (*Rattus norvegicus*) e serpentes constritoras (*Epicrates cenchria crassus*). Os ratos Wistar, após 21 dias da CCI ou do procedimento *Sham*, foram submetidos à habituação em uma arena poligonal enriquecida (Figura 6), com toca e escadas. A arena poligonal (com 154cmx72cmx64cm) é construída de acrílico cristal, revestido de

insulfim, disposta sobre uma superfície de granito (medindo 170cmx85cmx02cm), e munida com uma toca artificial, medindo 36 cm x 26 cm x 12,5 cm, com duas saídas diametralmente opostas.

Foi realizada a análise quantitativa do comportamento de defesa dos roedores submetidos previamente ao modelo de CCI ou ao procedimento *Sham* eliciado mediante o confronto defensivo com a serpente constritora. Os seguintes comportamentos de roedores foram quantificados: avaliação de risco [compreendendo: atenção defensiva (alerta), que foi definida operacionalmente como a interrupção do comportamento em curso com duração menor do que 5s, seguida por farejos e perscrutação do meio, (pequenos movimentos de cabeça) e /ou aproximação cautelosa, que consistem em alongamento do corpo com o ventre raste ao assoalho da arena], imobilidade defensiva (“congelamento”), definido como imobilidade durante pelo menos 6s em uma postura defensiva de dorsiflexão, seguida de reações autonômicas, como defecação, exoftalmia e/ou micção, respostas de fuga (definidas por uma corrida em direção oposta ao local ocupado pelo predador).

Figura 6 - A: Visão frontal da arena poligonal enriquecida, com plataformas de escape e toca artificial, contendo ratos Wistar em habituação por 3 dias, com oferta de comida e água *ad libitum*. **B:** Visão lateral da arena durante a habituação.

3.6 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com uma solução na proporção de 0,1 ml de cetamina, na dose de 92mg/kg (Ketamina®), para 0,2ml de xilasina, na dose de 9,2mg/kg (Dopaser®), e fixados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, USA). A barra de fixação dos incisivos foi colocada a 3,3 mm abaixo da linha interaural, o que permitia que o crânio ficasse em uma posição horizontal entre bregma e lambda. Foi realizada a implantação unilateral de uma cânula-guia de aço inoxidável (o.d. 0.6 mm, i.d. 0.4mm) na divisão pré-límbica (PrL) do córtex “pré-frontal” medial (CPFM), utilizando-se as seguintes coordenadas, tendo bregma como referência: ântero-posterior = +3 mm e dorso-ventral = -2,6 mm. A fim de estudar a participação de ambos os hemisférios (Parte II: direito e esquerdo em grupos distintos) foi utilizada a coordenada médio-lateral +0,5 ou -0,5 mm (Paxinos and Watson, 1997). Depois de implantada, a cânula-guia foi fixada na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável que, por sua vez, era ancorada por dois parafusos de forniture de aço inoxidável.

3.7 Microinjeção de drogas

Após 21 dias da CCI ou do procedimento *Sham* e 7 dias da cirurgia estereotáxica, foram realizadas as microinjeções dos fármacos na divisão PrL do CPFM de ratos, organizadas conforme especificado nas tabelas abaixo. Uma agulha injetora (Mizzi), conectada a uma seringa de 10µL (Hamilton), foi introduzida na cânula-guia, ultrapassando a sua extremidade final em 1 mm. Um catéter de polietileno foi acoplado à agulha injetora para monitorização das microinjeções, as quais foram feitas através de uma bomba de infusão de drogas (Stoelting).

3.8 Histologia

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram perfundidos, e o encéfalo delicadamente removido das fossas cranianas. Secções coronais de 40 μm de espessura foram realizadas, sendo os cortes histológicos montados em lâminas de vidro e coradas com azul de metileno. Posteriormente, os cortes foram analisados com o auxílio de microscopia de luz (AxioImager Z1; Zeiss). Somente animais, cujas cânulas atingiram na divisão PrL do CPFM, foram incluídos na análise estatística.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média nos estudos comportamentais de alodinia mecânica. Os resultados da avaliação da alodinia mecânica e sensibilidade ao frio foram analisados através da análise de variância (*split-plot ANOVA*) para medidas repetidas, seguida, quando apropriado, pelo teste *post hoc* de Duncan. O procedimento (microinjeção dos diferentes fármacos no córtex PrL) foi considerado como fator independente, e as medidas do limiar de *von Frey*, tomadas em diferentes tempos, foram consideradas medidas repetidas. Os comportamentos defensivos evocados pelos roedores quando confrontados com a serpente constrictora foram analisados através do teste de análise de variância (Manova), seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

3.10 Procedimentos experimentais

PARTE I:

EXPERIMENTO 1: Avaliação da sensibilidade aos estímulos mecânico e térmico (frio) em animais submetidos à técnica cirúrgica de CCI modificada a partir do modelo de DN proposto por Bennett e Xie (1988) após 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias da CCI ou do procedimento Sham em ratos.

Figura 7 - Desenho experimental da avaliação da sensibilidade nociceptiva de animais após 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias da CCI proposta por Bennett e Xie em 1988 (4 ligaduras), da CCI adaptada (1 ligadura), ou do procedimento *Sham*.

EXPERIMENTO 2: Avaliação do comportamento locomotor em animais submetidos à técnica cirúrgica de CCI modificada a partir do modelo de DN proposto por Bennett e Xie (1988) através do teste de caminhada pela plataforma após 7, 14, 21 e 28 dias da CCI ou do procedimento *Sham* em ratos.

Figura 8 - Desenho experimental da avaliação da atividade motora de animais após 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias da CCI proposta por Bennett e Xie em 1988 (4 ligaduras), da CCI adaptada (1 ligadura), ou do procedimento *Sham*.

EXPERIMENTO 3: Avaliação das alterações emocionais e cognitivas ocasionadas pela DNC.

Figura 9 - Desenho experimental da avaliação dos aspectos afetivos e cognitivos, através do teste relacionado à atenção e memória (teste de reconhecimento: interação com objetos novos e velhos), do teste relacionado à ansiedade (*open-field*) e do teste relacionado à depressão (teste de nado forçado) após 21 dias da CCI adaptada ou do procedimento *Sham* em ratos.

PARTE II

EXPERIMENTO 1: Efeito da administração, por via intraperitoneal (IP), de indometacina (2mg/kg) sobre a alodinia mecânica.

Os animais receberam o veículo farmacológico ou a indometacina (2mg/kg, IP), um analgésico e anti-inflamatório não-esteroidal, cujo mecanismo consiste em inibir de maneira não seletivo a enzima ciclo-oxigenase (COX), avaliando-se seu efeito no teste de alodínia mecânica 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 dias após a CCI ou procedimento *Sham* nos tempos de 0, 15, 30 min, em grupos independentes de animais. A indometacina (Sigma) foi diluída em Tris / HCl (2-amino-2-hidroxi-1-metilpropan-1,3-diol / ácido clorídrico), sendo este o veículo farmacológico.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico do tratamento por via IP com a indometacina.

Procedimento Cirúrgico	Tratamento Farmacológico
<i>Sham</i>	Veículo
<i>Sham</i>	Indometacina (2mg/kg)
CCI	Veículo
CCI	Indometacina (2mg/kg)

Figura 10 - Desenho experimental do estudo efeito de um anti-inflamatório não-esteroidal na atenuação da DN periférica induzida pela CCI.

EXPERIMENTOS 2 e 3: Efeito da inativação das redes neurais do córtex PrL, por meio da microinjeção (ipsilateral ou contralateral à CCI) de cloreto de cobalto (CoCl_2 ; 1mM/200nL) sobre a alodinia mecânica.

Neste estudo, foi realizado o pré-tratamento do córtex PrL com 200 nL de veículo (solução salina fisiológica) ou CoCl_2 (1,0 mM) (Restel e cols., 2005; de Freitas e cols., 2013, 2014) no hemisfério cerebral direito ou esquerdo, em grupos independentes, 7, 14, 21 ou 28 dias após a cirurgia de CCI ou procedimento *Sham*. Cinco minutos após a microinjeção (tempo zero), a alodinia mecânica foi aferida de 15 em 15 minutos, portanto, nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Tabela 2 - Distribuição dos grupos do estudo neurofisiológico realizados na divisão PrL do CPFM (hemisfério direito e esquerdo).

Procedimento Cirúrgico	Tratamento Farmacológico 7, 14, 21 ou 28 dias
<i>Sham</i>	Veículo
<i>Sham</i>	Cloreto de Cobalto 1Mm (200nl)
CCI	Veículo
CCI	Cloreto de Cobalto 1Mm (200nl)

Figura 11 - Desenho experimental do estudo do efeito da inativação das redes neurais do córtex PrL durante a geração, potencialização e manutenção da DN periférica induzida pela CCI.

EXPERIMENTO 4: Efeito do pré-tratamento do córtex PrL com um antagonista de receptores NMDA, o LY235959 (2, 4 e 8nmol/200nL), sobre a alodinia mecânica

A participação do sistema glutamatérgico do córtex PrL na DNC induzida pela CCI foi avaliada em grupos independentes de animais. Após 7 dias da cirurgia estereotáxica e após 21 dias da CCI ou do procedimento *Sham*, foram realizadas as microinjeções das drogas no PrL, organizadas conforme especificado nas tabelas seguintes. Cinco minutos após a microinjeção (tempo zero), a alodinia mecânica foi aferida de 15 em 15 minutos, portanto, nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Tabela 3 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPM.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Tratamento Farmacológico
Grupo 1	<i>Sham</i>	Salina fisiológica(200nL)
Grupo 2	<i>Sham</i>	LY235959 8nmol (200nL)
Grupo 3	CCI	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 4	CCI	LY235959 2nmol (200nL)
Grupo 5	CCI	LY235959 4nmol (200nL)
Grupo 6	CCI	LY235959 8nmol (200nL)

EXPERIMENTO 5: Efeito do antagonista de receptor CB1, o AM251, no córtex PrL sobre a alodinia mecânica

A participação do sistema endocanabinoide no córtex PrL sobre a DNC induzida pela CCI foi avaliada em grupos independentes de animais. Após 7 dias da cirurgia estereotáxica e após 21 dias da CCI ou do procedimento *Sham*, foram realizadas as microinjeções das drogas no PrL, organizadas conforme especificado nas tabelas seguintes. Cinco minutos após a microinjeção (tempo zero), a alodinia mecânica foi aferida de 15 em 15 minutos, portanto, nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Tabela 4 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPM.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Tratamento Farmacológico
Grupo 1	<i>Sham</i>	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 2	<i>Sham</i>	AM251 200pmol (200nL)
Grupo 3	CCI	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 4	CCI	AM251 50pmol (200nL)
Grupo 5	CCI	AM251 100pmol (200nL)
Grupo 6	CCI	AM251 200pmol (200nL)

EXPERIMENTO 6: Efeito do agonista de receptor NMDA e da interação com o sistema endocanabinoide no córtex PrL sobre a alodinia mecânica

A participação do sistema glutamatérgico e sua interação com o sistema endocanabinoide no córtex PrL sobre a DN crônica induzida pela CCI foi avaliada em grupos independentes de animais. Após 7 dias da cirurgia estereotáxica e após 21 dias da CCI ou do procedimento *Sham*, foram realizadas as microinjeções das drogas no PrL, organizadas conforme especificado nas tabelas seguintes. Cinco minutos após a microinjeção (tempo zero), a alodinia mecânica foi aferida de 15 em 15 minutos, portanto, nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Tabela 5 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Tratamento Farmacológico
Grupo 1	<i>Sham</i>	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 2	<i>Sham</i>	NMDA 4nmol (200nL)
Grupo 3	CCI	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 4	CCI	NMDA 0,25nmol (200nL)
Grupo 5	CCI	NMDA 1nmol (200nL)
Grupo 6	CCI	NMDA 4nmol (200nL)
Grupo 7	CCI	AM251 200pmol + NMDA 1nmol
Grupo 8	CCI	NMDA 1nmol + AEA 100pmol

EXPERIMENTO 7: Efeitos dos canabinoides endógenos e sua interação com sistemas endovanilídeos em córtex PrL sobre a alodinia mecânica.

A participação do sistema endocanabinoide e de sua interação com o sistema endovaniloide no córtex PrL sobre a DNC induzida pela CCI foi avaliada em grupos independentes de animais. Após 7 dias da cirurgia estereotáxica e após 21 dias da CCI ou procedimento *Sham*, foram realizadas as microinjeções das drogas de AEA (tabela 5) e AM251 (tabela 6). Cinco minutos após a microinjeção (tempo zero), a alodinia mecânica foi aferida de 15 em 15 minutos, portanto, nos seguintes tempos: 0, 15, 30, 45 e 60 minutos.

Tabela 6 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Tratamento Farmacológico
Grupo 1	<i>Sham</i>	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 2	<i>Sham</i>	AEA 100pmol (200nL)
Grupo 3	CCI	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 4	CCI	AEA 5pmol (200nL)
Grupo 5	CCI	AEA 50pmol (200nL)
Grupo 6	CCI	AEA 100pmol (200nL)
Grupo 7	CCI	AEA 200pmol (200nL)
Grupo 8	CCI	AM251 200 + AEA 100 pmol (200nL)
Grupo 9	CCI	6- ICPS 3pmol + AEA 200pmol (200nL)

Figura 12 - Desenho experimental do estudo da investigação glutamatérgica, endocanabinoide e endovaniloide do PrL durante a DNC induzida pela CCI.

PARTE III

EXPERIMENTO 1: Estudo da comorbidade entre DNC com ansiedade/pânico através da realização do confronto entre ratos após 21 dias da CCI, com a salamanta, uma serpente constritora.

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da neuropatia (CCI) ou ao procedimento *Sham* e, posteriormente, para implantação de uma cânula-guia para microinjeção de drogas no córtex PrL. Após a recuperação cirúrgica, foi realizado o confronto defensivo entre roedores (*Rattus norvegicus*) e serpentes constritoras (*Epicrates cenchria crassus*) durante 5 minutos. Os comportamentos defensivos (atenção defensiva, imobilidade defensiva e fuga) evocados pelos roedores durante o confronto com a serpente foram avaliados, assim como a alodinia mecânica dos ratos foi aferida nos tempos de 0, 15 e 30 min após o confronto através do teste de *von Frey*.

Figura 13 - Desenho experimental do estudo da investigação da comorbidade dor crônica e ansiedade/pânico e da participação do sistema glutamatérgico do córtex PrL durante a DNC induzida pela CCI.

EXPERIMENTO 2: Envolvimento dos receptores NMDA do córtex PrL sobre o comportamento defensivo evocado pelos roedores com DNC em confronto com serpente constritora

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da neuropatia (CCI) e, posteriormente, para implantação de uma cânula-guia para microinjeção de drogas no córtex PrL. Foi realizado o pré-tratamento dos roedores com o agonista NMDA (0,25, 1 e 4nmol/200nL) ou LY235959 (2, 4 e 8nmol/200nL) no córtex PrL 5 min antes do confronto defensivo entre roedores (*Rattus norvegicus*) e serpentes constritoras (*Epicrates cenchria crassus*) durante 5 minutos, avaliando-se, assim, o comportamento defensivo e a alteração da alodinia mecânica nos tempos de 0, 15 e 30 min após o confronto.

Tabela 7 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Arena	Tratamento Farmacológico
Grupo 1	CCI	Sem Serpente	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 2	CCI	Serpente	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 3	CCI	Serpente	NMDA 0,25nmol (200nL)
Grupo 4	CCI	Serpente	NMDA 1nmol (200nL)
Grupo 5	CCI	Serpente	NMDA 4nmol (200nL)

Tabela 8 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Arena	Tratamento Farmacológico
Grupo 1	CCI	Sem Serpente	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 2	CCI	Serpente	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 3	CCI	Serpente	L235959 2nmol (200nL)
Grupo 4	CCI	Serpente	L235959 4nmol (200nL)
Grupo 5	CCI	Serpente	L235959 8nmol (200nL)

EXPERIMENTO 3: Envolvimento dos receptores CB₁ do córtex PrL no comportamento defensivo evocado pelos roedores com DNC em confronto com serpente constritora

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução da neuropatia (CCI) e, posteriormente, para implantação de uma cânula-guia para microinjeção de drogas no córtex PrL. Foi realizado o pré-tratamento dos roedores com o agonista de receptor CB₁, a AEA (50, 100 e 200pmol/200nL), ou com o antagonista de receptor CB₁, o AM251 (50, 100 e 200pmol/200nL), no córtex PrL 5 min antes do confronto defensivo entre roedores (*Rattus*

novergicus) e serpentes constritoras (*Epicrates cenchria crassus*) durante 5 minutos, avaliando-se, assim, o comportamento defensivo e a alteração na alodinia mecânica nos tempos de 0, 15 e 30 min após o confronto.

Tabela 9 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Arena	Tratamento Farmacológico
Grupo 1	CCI	Sem Serpente	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 2	CCI	Serpente	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 3	CCI	Serpente	AEA 50pmol (200nL)
Grupo 4	CCI	Serpente	AEA 100pmol (200nL)
Grupo 5	CCI	Serpente	AEA 200pmol (200nL)

Tabela 10 - Distribuição dos grupos do estudo farmacológico realizados na divisão PrL do CPFM.

Grupos	Procedimento Cirúrgico	Arena	Tratamento Farmacológico
Grupo 1	CCI	Sem Serpente	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 2	CCI	Serpente	Salina fisiológica (200nL)
Grupo 3	CCI	Serpente	AM251 50pmol (200nL)
Grupo 4	CCI	Serpente	AM251 100pmol (200nL)
Grupo 5	CCI	Serpente	AM251 200pmol (200nL)

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Parte I

EXPERIMENTO 1: Avaliação da sensibilidade aos estímulos mecânico e térmico (frio) em animais submetidos à técnica cirúrgica de CCI, modificada a partir do modelo de DN de Bennett e Xie (1988) após 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias da CCI ou procedimento Sham em ratos.

As medidas da alodinia mecânica avaliadas através do teste de *von Frey* foram realizadas 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia CCI ou do procedimento *Sham*. A alodinia mecânica foi evidente nos animais submetidos tanto ao procedimento CCI proposto por Bennett e Xie (quatro ligaduras), quanto naqueles que foram submetidos ao modelo adaptado de CCI (uma ligadura). Abaixo, segue a ilustração da evolução da neuropatia na pata contralateral (esquerda) e ipsilateral (direita) após a lesão por constricção crônica do nervo isquiático (CCI) e procedimento *Sham* (Figura 14).

Figura 14 - Ilustração da evolução da neuropatia na pata contralateral (esquerda) e na pata ipsilateral (direita) após lesão de constricção crônica (CCI) do nervo isquiático e procedimento *Sham* em 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia.

No que se refere ao limiar de alodinia mecânica, os animais que passaram pela CCI quatro ou uma simples ligadura e o teste foi aferido na **pata direita** (ipsilateral em relação à cirurgia de CCI), segundo a ANOVA de medidas repetidas, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(2,25) = 184,10$ $P < 0,001$], do tempo [$F(6,20) = 98,73$, $P < 0,001$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F(12,38) = 78,11$, $P < 0,001$] quando comparado ao grupo *Sham*. Segundo o teste *post-hoc* de Duncan, a lesão do nervo isquiático com a realização da cirurgia de CCI causou alodinia mecânica nos animais em todos os tempos avaliados quando o teste de *von Frey* foi aferido na pata direita do animal ($P < 0,05$) (Figura 15). Além disso, não houve diferenças significativas no limiar de alodinia mecânica quando foram comparados os dois grupos de ratos CCI (uma única ligadura do nervo isquiático *versus* quatro ligaduras) ($P > 0,05$ em todos os casos) (Fig. 15).

Figura 15 - Efeito da lesão pela constrição crônica (CCI) através de 4 ou uma simples ligadura do nervo isquiático no teste de von Frey. LB indica a linha de base registrada antes da cirurgia, e a seta indica a cirurgia. Os dados foram representados como média $\pm$ S.E.M. * $P < 0,05$ em comparação com o procedimento *Sham*, segundo a ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste *pos hoc* de Duncan.

O limiar de *von Frey* também foi aferido na **pata esquerda** (contralateralmente em relação à cirurgia de CCI ou ao procedimento *Sham*) nos animais que passaram pela CCI ou pelo procedimento *Sham*. Segundo a ANOVA de medidas repetidas, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(2,25) = 2,43$; $P > 0,05$], nem interação tratamento *versus* tempo [$F(12,38) = 2,03$; $P > 0,05$], mas sim do tempo [$F(6,20) = 507,33$; $P < 0,05$], nos grupos cujos limiares foram aferidos na **pata esquerda** (Figura 16).

Figura 16 - Efeito da lesão pela constrição crônica (CCI) através de 4 ou de uma simples ligadura do nervo isquiático no teste de *von Frey*. LB: Linha de base registrada antes da cirurgia (seta). Os dados foram representados como média $\pm$ S.E.M. $P > 0,05$ em todos os casos.

No teste para avaliação da sensibilidade térmica ao frio, os ratos submetidos à cirurgia CCI (quatro ou uma única ligadura) apresentaram maior reatividade ao estímulo frio (com lambidas e sacudidas na pata) em comparação com o grupo *Sham* (Figura 17). Segundo a ANOVA de medidas repetidas, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento

[F (2,22) = 8,64; P > 0,05], mas não do tempo [F (6,17) = 2,54; P > 0,05], nem da interação tratamento *versus* tempo [F (12,32) = 1,76; P > 0,05] em animais CCI quando o teste de acetona fora realizado na **pata direita**.

Contudo, esse comportamento só foi evidenciado 7 dias após a CCI. Segundo a ANOVA de medidas repetidas, houve diferença estatisticamente significativa no tempo gasto agitando e lambendo a **pata direita** (ipsilateral à cirurgia de CCI) entre os grupos CCI induzido por quatro ligaduras do nervo periférico [F (2,22 = 8,64; P <0,001) em comparação ao grupo CCI induzido por uma ligadura e ao grupo *Sham*. Os comportamentos de agitar e lamber a pata foram significativamente aumentados nos dois grupos de ratos com CCI (com uma ou quatro ligaduras do nervo isquiático) 14 e 21 dias após a cirurgia [F (2,22) = 8,64; P <0,001] em comparação com o grupo *Sham*. Curiosamente, 28 dias após a CCI, apenas o grupo com uma única ligadura do nervo isquiático mostrou um efeito estatisticamente significativo neste comportamento [F (2,22) = 8,64; P <0,001) em comparação com o grupo CCI causado por quatro ligaduras e com o grupo *Sham*. Assim, a cirurgia de CCI com quatro ou com uma única ligadura de nervo periférico aumentou a sensibilidade ao frio na pata ipsilateral à cirurgia aos 7, 14, 21 e 28 dias após a lesão em comparação com os animais *Sham* (teste *post hoc* de Duncan: P <0,05) (Figura 17). Como esperado, não houve diferenças significativas entre os grupos CCI e *Sham* quando o teste de acetona foi realizado na **pata esquerda** (teste *post hoc* de Duncan: P > 0,05) durante todo o tempo de observação (Figura 18).

Figura 17 - Efeito da lesão nervosa pela constrição crônica (CCI) através de 4 ou uma simples ligadura do nervo isquiático na sensibilidade ao teste da acetona. LB indica a linha de base registrada antes da cirurgia e a seta indica o momento da cirurgia. Os dados foram apresentados como média $\pm$ S.E.M. * $P < 0,05$, em comparação com o procedimento *Sham*, + $P < 0,05$ em comparação com o grupo CCI causado por uma ligadura do nervo isquiático, segundo a ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste *post hoc* de Duncan.

Figura 18 - Ausência de efeito da lesão nervosa causada pela constrição crônica (CCI) através de 4 ou uma simples ligadura do nervo isquiático na sensibilidade da para esquerda (contralateral) ao teste da acetona. LB indica a linha de base registrada antes da cirurgia e a seta indica a cirurgia. Os dados foram representados como média $\pm$ S.E.M. $P > 0,05$, segundo a ANOVA para medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

EXPERIMENTO 2: Avaliação do comportamento locomotor em animais submetidos à técnica cirúrgica de CCI através de 1 ou 4 ligaduras do nervo isquiático foi investigada através do teste de caminhada pela plataforma após 7, 14, 21 e 28 dias da CCI ou procedimento *Sham* em ratos.

De acordo com a análise de variância, seguida do teste *post hoc* de *Newman Keuls*, não houve diferença significativa entre os grupos estudados na **velocidade** do trajeto [$F(2,15) = 0,14$; $P > 0,05$] e da passada [$F(2,15) = 0,08$; $P > 0,05$], nem no **tempo** do trajeto [$F(2,15) = 3,47$; $P > 0,05$], mas sim da passada [$F(2,15) = 2,17$; $P < 0,05$]. De fato, análise *post hoc* mostrou que o **tempo da passada** do animal CCI 4 ligaduras foi significativamente maior quando comparado com o animal *Sham* 21 dias após as respectivas cirurgias ($P < 0,05$) (Fig. 19D). Além disso, não houve diferença estatística do **comprimento** do passo [$F(2,15) = 0,4679$; $P < 0,001$], e da passada [$F(2,15) = 5,24$; $P < 0,01$] durante todos os dias estudados, como pode ser visto na figura 19 (A-G).

No entanto, houveram diferenças estatísticas na análise **do ângulo do tornozelo** no contato inicial [$F(2,15) = 1,43$; $P > 0,05$] de **flexão do ângulo** do tornozelo (contato final) dos grupos CCI (1 e 4 ligaduras) quando comparando com o grupo *Sham* [$F(2,15) = 7,37$; $P < 0,001$;] nos dias 7, 14 e 21 dias após a cirurgia (Fig 19 H). Análise *post hoc* de *Newman-Keuls* mostrou que a **flexão do ângulo** do animal CCI 4 ligaduras foi significativamente menor em comparação com o animal CCI 1 ligadura 21 dias após as cirurgias ($P < 0,05$) (Fig. 19G). Em relação à **flexão do ângulo** durante o contato final, o *post hoc* de *Newman Keuls* evidenciou que a CCI 1 ou 4 ligaduras foram significamente menores quando comparados ao *Sham* em todos os dias estudados ($P < 0,05$) (Fig. 19H).

Figura 19 - Parametros lineares da marcha. * $P < 0.05$ diferença comparada ao grupo Sham, # $P < 0.05$ diferença comparada aos grupos CCI 1 ligadura e Sham; * $P < 0.05$ diferenças comparada ao grupo CCI 1 Ligadura.

EXPERIMENTO 3: Avaliação das alterações emocionais e cognitivas ocasionadas pela DNC.

TESTE DO CAMPO ABERTO (OPEN FIELD)

Vinte e um dias após a cirurgia, os ratos de ambos os grupos (*Sham* e CCI) foram testados no teste de campo aberto (*Open Field*) para avaliar o comportamento exploratório em uma arena circular. Os parâmetros registrados foram: tempo de permanência na área central e periférica, levantamento, cruzamento, autolimpeza e alerta (Atenção defensiva). Houve diferenças significativas no número total de levantamentos nos grupos CCI com uma única ligadura [$F(2,17) = 6,69$; $P < 0,05$] e quatro ligaduras [$F(2,17) = 6,69$; $P < 0,01$], em comparação com o grupo *Sham* (Figura 20A). Além disso, apresentaram-se diferenças estatisticamente significativas no número de cruzamentos [$F(2,17) = 4,5$; $P < 0,05$] nos grupos CCI com uma única ligadura ou quatro ligaduras em comparação ao grupo *Sham* (Figura 20A).

Houve, também, diferenças significativas no número total de autolimpeza [$F(2,17) = 4,45$; $P < 0,05$] em ratos CCI, quer aqueles com uma única ligadura ou com quatro ligaduras do nervo isquiático em comparação como grupo *Sham* (Figura 20C). Curiosamente, ratos CCI com uma [$F(2,17) = 7,14$; $P < 0,01$] ou com quatro ligaduras [$F(2,17) = 7,14$; $P < 0,05$] do nervo isquiático exibiram o comportamento de alerta defensivo aumentado em comparação com o grupo *Sham*, como mostrado na Figura 20D. O tempo de permanência na periferia da arena circular [$F(2,17) = 16,09$; $P < 0,001$] nos grupos CCI aumentou em comparação com o grupo *Sham* (Figura 20E). Além disso, os ratos CCI não frequentaram a área central da arena, enquanto que os ratos *Sham* exploraram-na [$F(2,17) = 17,09$; $P < 0,001$] (Figura 20F). Os grupos de ratos CCI, usando quatro ou uma ligadura do nervo isquiático, mostraram

mudanças em todos os parâmetros analisados (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $P < 0,05$), sugerindo um comportamento semelhante ao de ansiedade (Figura 20A-F).

Figura 20 - Efeito da lesão neural pela constrição crônica (CCI), através de quatro ou de uma única ligadura, do nervo isquiático na frequência de levantamento (A), frequência de cruzamentos (B), frequência de autolimpeza (C), frequência de alerta defensivo (D), tempo gasto na periferia da arena (E) e tempo gasto na área central da arena (F) 21 dias após a cirurgia. Os dados foram representados como média ± S.E.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ em comparação com o grupo *Sham* (procedimento cirúrgico simulado), segundo a ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

TESTE DO NADO FORÇADO

O teste de nado forçado foi realizado vinte e um dias após a cirurgia para indução da neuropatia ou do procedimento *Sham*, para investigar o comportamento do tipo depressivo nos diferentes grupos de ratos.

Segundo a análise de variância de uma via, durante o teste de nado forçado, houve diferença significativa na frequência de imobilidade [$F(2,19) = 25,78$; $P < 0,001$] em animais CCI submetidos a quatro ligaduras no nervo isquiático, em comparação com o grupo submetido a uma única ligadura do nervo espinal, ou com o grupo *Sham*. A duração da imobilidade aumentou significativamente [$F(2,19) = 6,76$; $P < 0,001$] nos grupos com CCI causada por uma única ou por quatro ligaduras do nervo isquiático, em comparação com o grupo *Sham*. A mononeuropatia periférica usando quatro ou uma ligadura em torno do nervo isquiático aumentou o comportamento do tipo depressivo (testes *post hoc* de Newman-Keuls; $P < 0,05$), como mostrado na Figura 21A-B.

Figura 21 - Efeito da lesão neural pela constrição crônica (CCI) de nervo espinal, através de 4 ou de uma única ligadura do nervo isquiático na frequência e duração da imobilidade evocada durante o teste de nado forçado 21 dias após a CCI ou após o procedimento *Sham*. Os dados foram apresentados como média E.P.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado ao procedimento *Sham*; ### $P < 0,001$ em comparação com o grupo submetido à CCI causada por quatro ligaduras do nervo isquiático, segundo a ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls.

TESTE DE RECONHECIMENTO DE OBJETO

No teste de reconhecimento de objetos, de acordo com a *one-way* ANOVA, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls, durante a fase de aquisição de memória, não houve diferenças significativas no tempo de exploração dos objetos idênticos em qualquer dos grupos estudados [$F(2,17) = 0,91$; $P > 0,05$], como mostrado na Figura 22B. Contudo, o tempo de exploração do novo objeto foi menor nos grupos CCI (seja causada por uma ou por quatro ligaduras do nervo isquiático) em comparação com o grupo *Sham* [$F(2,17) = 7,07$; $P < 0,01$] (Figura 22C). Além disso, os grupos CCI mostraram uma diminuição na porcentagem de índice de reconhecimento de objetos ([RI], em %) em comparação com o grupo *Sham* [$F(2,17) = 6,16$; $P < 0,05$] (Figura 22A). De acordo com o teste *post hoc* de Newman-Keuls, os grupos submetidos à CCI com uma ou com quatro ligaduras do nervo isquiático diminuíram significativamente o índice de reconhecimento de objeto quando comparados ao grupo *Sham* ($P < 0,05$).

Figura 22 - Efeito da lesão neural pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI), através de quatro ou de uma ligadura, no índice de reconhecimento de objetos (A), na duração da exploração dos objetos idênticos (B) e na duração da exploração do novo objeto (C) no teste de reconhecimento de objetos. Os dados foram representados como médias e E.P.M. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado ao grupo *Sham* (procedimento simulado), segundo a ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Newman-Keuls.

4.2 Parte II

EXPERIMENTO 1: Efeito da administração, por via intraperitoneal (IP), de indometacina (2mg/kg) sobre a alodinia mecânica aferida durante 30 minutos.

Com o intuito de estudar o efeito de um analgésico e anti-inflamatório não esteroideal na atenuação da dor neuropática periférica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI), foi administrado o anti-inflamatório indometacina (inibidor de COX), que foi capaz de aumentar o limiar de alodinia mecânica na **pata direita**, avaliada através do teste de *von Frey* 1, 2 e 4 dias após a cirurgia de CCI.

De acordo com a ANOVA para medidas repetidas seguidas pelo teste *post hoc* de Duncan, no primeiro dia após a CCI, houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,28) = 18.89$; $P < 0.001$], do tempo [$F(4,25) = 15.53$; $P < 0.001$] e interação tratamento *versus* tempo [$F(12,71) = 11.43$; $P < 0.001$] no limiar de alodinia mecânica. Houve uma diminuição significativa na alodinia mecânica após a administração de indometacina (2 mg/kg, ip) quando comparado ao grupo tratado com veículo nos tempos 15 e 30 minutos ($P < 0,05$) (Fig. 23A) após o tratamento.

No segundo dia após a CCI, houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,25) = 12,55$; $P < 0,001$], do tempo [$F(4,22) = 5,70$; $P < 0,01$] e interação tratamento *versus* tempo [$F(12,62) = 3,26$; $P < 0,01$] no limiar de alodinia mecânica, de acordo com a ANOVA para medidas repetidas. O tratamento com indometacina atenuou significativamente a alodinia mecânica (teste *post hoc* de Duncan; $P < 0,05$) (Fig. 23B) 15 minutos após a sua administração em ratos submetidos à CCI. A indometacina também aumentou o limiar de alodinia mecânica no tempo 15 min (Fig. 23B) nos animais submetidos ao procedimento *Sham* em comparação com os animais do grupo *Sham* que receberam veículo.

No quarto dia de CCI, também houve um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,27) = 16,43$; $P < 0,001$], do tempo [$F(4,24) = 3,71$; $P > 0,05$] e interação tratamento *versus* tempo [$F(12,68) = 4,63$; $P < 0,001$] no limiar de alodinia mecânica. A indometacina (2 mg / kg, i.p.) diminuiu a alodinia mecânica nos tempos 15 e 30 minutos após a sua administração (teste *post hoc* de Duncan; $P < 0,05$) (Fig. 23C). Contudo, não houve alteração significativa no limiar de alodinia mecânica dos animais que receberam indometacina após 7, 14, 21 dias de cirurgia ($p > 0,05$) como pode ser visto na figura 23 D-G.

Vinte e oito dias após a CCI, houve efeitos significativos do tratamento [$F(3,20) = 10,81$; $P < 0,001$], do tempo [$F(4,17) = 10,86$; $P < 0,001$] e interação tratamento *versus* tempo [$F(12,47) = 4,21$; $P < 0,001$] no limiar de alodinia mecânica de acordo com ANOVA para medidas repetidas. O limiar mecânico dos animais submetidos ao procedimento *Sham* tratados com indometacina (2mg/kg, IP) foi significativamente diferente na segunda linha de base (teste *post hoc* de Duncan; $P < 0,05$) (Fig. 23G).

Figura 23 - Efeito da administração de indometacina (IP) sobre a neuropatia induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: Cirurgia CCI e procedimento *Sham*; LB2: linha de base medida após 1, 2, 4, 7, 14, 21 ou 28 dias do procedimento cirúrgico; Seta B: após a LB2, administração de indometacina ou veículo, por via IP em ratos com CCI ou procedimento *Sham* submetidos ao teste de *von Frey* até 30 minutos. Os dados foram apresentados como médias e erro padrão da média. * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo + procedimento *Sham*; # $p < 0,05$, em relação ao grupo tratado com CCI + veículo, segundo o teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

A indometacina produziu um efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,29) = 2,73$; $P > 0,05$], do tempo [$F(4,26) = 3,44$; $P < 0,01$], e interação tratamento *versus* tempo [$F(12,74) = 1,54$; $P > 0,05$] no limiar mecânico na pata esquerda (contralateral a CCI) de acordo com a ANOVA para medidas repetidas seguidas pelo teste *post hoc* da Duncan apenas no dia 1 após o procedimento *Sham* ou CCI (Fig. 24A).

Não houve efeitos significativos do tratamento [$F(3,28) = 1,08$; $P > 0,05$], nem da interação tratamento *versus* tempo [$F(12,71) = 0,70$; $P > 0,05$], mas sim do tempo [$F(4,25) = 4,43$; $P < 0,05$] no dia 2, e no dia 4 [tratamento, $F(3,28) = 1,68$; $P > 0,05$; tempo $F(4,25) = 3,40$; $P < 0,05$; interação tratamento *versus* tempo, $F(12,71) = 0,88$; $P > 0,05$], mas não no dia 7 [tratamento, $F(3,28) = 0,47$; $P > 0,05$; tempo $F(4,25) = 0,21$; $P > 0,05$; interação tratamento *versus* tempo, $F(12,71) = 0,32$; $P > 0,05$], nem no dia 14 [tratamento, $F(3,28) = 0,88$; $P > 0,05$; tempo, $F(4,25) = 1,84$; $P > 0,05$; interação tratamento *versus* tempo, $F(12,71) = 0,79$; $P > 0,05$], nem no dia 21 [tratamento, $F(3,28) = 0,47$; $P > 0,05$; tempo $F(4,25) = 0,21$; $P > 0,05$; interação tratamento *versus* tempo, $F(12,71) = 0,32$; $P > 0,05$] nem no dia 28 [tratamento, $F(3,20) = 2,37$; $P > 0,05$; tempo $F(4,17) = 4,69$; $P > 0,05$; interação tratamento *versus* tempo, $F(12,71) = 2,47$; $P > 0,05$] após CCI em relação ao limiar de alodinia mecânica da **pata esquerda** (contralateral à cirurgia CCI ou ao procedimento *Sham*) de acordo com ANOVA para medidas repetidas (Fig. 24B-G).

Teste de von Frey: Pata Contralateral

Figura 24 - Efeito da administração de indometacina (IP) sobre a neuropatia induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). BL1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: Cirurgia de CCI e Sham; BL2: Nova linha de base medida após 1, 2, 4, 7 ou 14 dias da cirurgia ; Seta B: após a BL2, administração IP de indometacina ou veículo em ratos com CCI e Sham, submetidos ao teste de von Frey por até 30 minutos. Os dados foram apresentados como médias e erro padrão da média. $P > 0,05$ em todos os casos, segundo o teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

EXPERIMENTO 2: Efeito da inativação das redes neurais do córtex PrL, por meio da microinjeção (ipsilateral à CCI) de cloreto de cobalto (CoCl_2 ; 1mM/200nL) sobre a alodinia mecânica

A fim de estudar a participação do córtex pré-límbico na potencialização e manutenção da dor neuropática periférica induzida pela CCI, foi microinjetado o cloreto de cobalto no neocórtex (PrL) ipsilateralmente à pata operada (1,0 mM/200 nL), o que foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata avaliado através do teste de von Frey após 21 e 28 dias da cirurgia de CCI. Contudo, tal efeito não foi verificado nem aos 7, nem aos 14 dias de neuropatia.

Após 21 dias de CCI e do procedimento *Sham*, como pode ser visto na figura 25C, a microinjeção de cloreto de cobalto foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata através do teste de von Frey nos animais com neuropatia. Houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,22)= 25,26$; $p<0,0001$], do tempo [$F(6,17)= 3,96$; $p<0,05$] e interação do tratamento *versus* tempo [$F(18,47)= 4,79$; $p<0,0001$]. Análises *post-hoc* mostraram que a microinjeção de cloreto de cobalto na PrL do CPFM foi capaz de aumentar o limiar de alodinia mecânica até 30 minutos após o tratamento (Figura 25C).

Efeito semelhante foi demonstrado 28 dias após a cirurgia. Houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,20)= 43,98$; $p<0,0001$], do tempo [$F(6,15)= 4,38$; $p<0,01$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F(18,41)= 5,99$; $p<0,0001$]. O teste de *post-hoc* mostrou que a microinjeção de cloreto de cobalto aumentou o limiar de alodina mecânica até 30 minutos após o tratamento, como pode ser visto na figura 25D.

As análises no sétimo e décimo quarto dias após a CCI e procedimento *Sham* mostraram que não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento com cloreto de cobalto ($p>0,05$), como demonstrado na figura 25A e B. Além disso, o tratamento do córtex

PrL com cloreto de cobalto não alterou o limiar mecânico quando analisado na pata esquerda (contralateral), em nenhum dos dias avaliados (Figura 26 A-D).

Figura 25 - Efeito de microinjeções de cloreto de cobalto (CoCl_2) no córtex pré-límbico na dor neuropática causado pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI ou procedimento *Sham*; LB2: nova linha de base medida após 7, 14, 21, ou 28 dias da cirurgia; Seta B: após a LB2, microinjeção de cloreto de cobalto na divisão PrL do córtex pré-frontal medial (CPFM) dos animais submetidos ao teste de *von Frey* durante 60 min na pata ipsilateral à lesão. Os dados foram apresentados como médias e erro padrão da média. * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo + *Sham*; # $p < 0,05$, em relação ao grupo tratado com CCI + veículo, segundo o teste de variância de medidas repetidas, seguido pelo teste *post hoc* de Duncan.

Figura 26 - Ausência de efeito de microinjeções de cloreto de cobalto (CoCl_2) no córtex pré-límbico na dor neuropática causado pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI ou Sham; LB2: nova linha de base medida após 7, 14, 21, ou 28 dias da cirurgia; Seta B: após a LB2 microinjeção de cloreto de cobalto na divisão PrL do córtex pré-frontal medial (CPFM) dos animais submetidos ao teste de *von Frey* durante 60 minutos, na pata contralateral à lesão.

EXPERIMENTO 3: Efeito da inativação das redes neurais do córtex PrL, por meio da microinjeção (contralateral à CCI) de cloreto de cobalto (CoCl_2 ; 1mM/200nL) sobre a alodinia mecânica

Com o objetivo de investigar a participação do córtex pré-límbico na geração e ou potencialização da dor neuropática periférica induzida pela CCI, foi microinjetado o CoCl_2 (1,0 mM/200 nL) contralateralmente à pata operada, o que foi capaz de aumentar o limiar de alodinia mecânica avaliada através do teste de *von Frey* após 21 e 28 dias da cirurgia de CCI. Contudo, tal efeito não foi verificado após 7 e 14 dias da neuropatia.

Resultado semelhante foi observado nos animais que receberam a microinjeção de CoCl_2 na região PrL contralateral à pata operada 21 e 28 dias, após a cirurgia, tendo havido efeito do tratamento [$F(3,36) = 10,11$; $p < 0,0001$] e [$F(3,20) = 8,26$; $p < 0,05$], do tempo [$F(6,21) = 6,04$; $p < 0,0001$] e [$F(6,15) = 6,20$; $p < 0,01$], e da interação tratamento *versus* tempo [$F(18,59) = 3,83$; $p < 0,0001$] e [$F(18,41) = 3,45$; $p < 0,0001$], respectivamente. As análises de *post hoc* mostraram que o efeito de atenuar a dor neuropática nos animais após a microinjeção de cloreto de cobalto foi significativo nos grupos 21 dias até 30 minutos e 28 dias 15 e 30 minutos após o tratamento. Como pode ser visto no gráfico 27C e D.

A análise da resposta da alodinia mecânica, aferida no sétimo e décimo quarto dias após a CCI e procedimento *Sham*, mostrou que não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento ($p > 0,05$), como visto na figura 27A e B.

Tratamento Contralateral Pata Ipsilateral

Figura 27 - Efeito de microinjeções de cloreto de cobalto (CoCl_2) no córtex pré-límbico na dor neuropática causado pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI ou procedimento *Sham*; LB2: nova linha de base aferida após 7, 14, 21, ou 28 dias da cirurgia para CCI; Seta B: após a LB2 microinjeção de cloreto de cobalto na divisão PrL do córtex pré-frontal medial (CPFM) dos submetidos ao teste de *von Frey* durante 60 min na pata ipsilateral à lesão. Os dados foram apresentados como médias e erro padrão da média. * $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado com veículo + *Sham*; # $p < 0,05$, em relação ao grupo tratado com CCI + veículo, segundo o teste de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

Adicionalmente, foi realizado o teste de *von Frey* na pata **esquerda** dos animais que passaram pela cirurgia de CCI e pelo procedimento *Sham*, mas não houve alterações estatisticamente significantes em 7, 14 e 21 dias após a cirurgia ($p > 0,05$), como pode ser observado na Fig. 28. Contudo, de acordo com ANOVA para medidas repetidas, 28 dias após

a cirurgia, houve efeitos significativos do tratamento [$F(3,20)=2.15$; $p>0.05$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F(9,50)=2.85$; $p<0.01$], mas não do tempo [$F(3,18)=3.09$; $p>0.05$] entre os grupos CCI e *Sham* 45 e 60 minutos após o tratamento (Fig. 28).

Figura 28 - Ausência de efeito de microinjeções de cloreto de cobalto (CoCl_2) no córtex pré-límbico na dor neuropática causado pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI). BL1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI ou procedimento *Sham*; BL2: após 7, 14, 21, ou 28 dias da cirurgia foi medida nova linha de base; Seta B: após a BL2 microinjeção de cloreto de cobalto na divisão PrL do córtex pré-frontal medial (CPFM) dos animais e o teste de *von Frey* foi (teste contralateral) realizada até 60 minutos.

Figura 29 - Representação dos sítios de microinjecção de cloreto de cobalto ou solução salina fisiológica na divisão pré-límbica do córtex “pré-frontal” medial, de acordo com o atlas esteotáxico de Paxinos e Watson (1997). A: Fotomicrografia representativa da seção transversal do cérebro de um rato Wistar, mostrando um sítio representativo de microinjecção no córtex PrL. B e C: Representações esquemáticas de sítios de microinjecção histologicamente identificados realizada no hemisfério cerebral contralateral (B) ou ipsilateral (C) à CCI ou ao procedimento *Sham*.. D: Representação esquemática da CCI ou do procedimento *Sham* na pata direita.

EXPERIMENTO 4: Efeito do pré-tratamento do córtex PrL com um antagonista de receptores NMDA, o LY235959 (2, 4 e 8nmol/200nL), sobre a alodinia mecânica com o intuito de estudar o efeito da microinjeção do antagonista glutamatérgicos sobre a dor neuropática periférica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI), foram administradas três doses do antagonista de receptores NMDA, LY 235959 (2, 4 e 8 nmol), no córtex PrL em animais que foram (CCI) ou não (Sham) submetidos à indução da DNC.

Segundo a ANOVA de medidas repetidas, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,25) = 1,57$; $P > 0,05$], do tempo [$F(5,21) = 2,39$; $P > 0,05$], nem interação tratamento *versus* tempo [$F(15,59) = 0,71$; $P > 0,05$] (figura 30). Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que a neuropatia induzida pela cirurgia de CCI não alterou os limiares nociceptivos, ou seja, não provocou alodinia mecânica na **pata esquerda**, contralateralmente à pata lesada dos animais. Além disso, os tratamentos farmacológicos realizados no córtex PrL não alteraram os valores do limiar nociceptivo dos animais quando o mesmo foi mensurado na **pata esquerda** (Figura 30).

Figura 30 - BL1: linha de base registrada antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; BL2: linha de base medida após 21 dias da CCI; Seta B: microinjeção de antagonista glutamatérgico no córtex PrL dos animais após o registro da BL2. O teste de *von Frey* (**pata esquerda**) foi, então, realizado até 60 minutos.

Considerando o tratamento do córtex PrL com o antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, LY 235959, em animais que passaram pela CCI e, nos quais o limiar de von Frey fora aferido na **pata direita** (ipsilateral em relação à cirurgia de CCI), houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,25) = 8,68$; $p < 0,05$], do tempo [$F(6,20) = 90,0$; $p < 0,05$], e interação tratamento *versus* tempo [$F(18,56) = 35,56$; $p < 0,05$]. Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que a lesão do nervo isquiático com a realização da cirurgia de CCI causou alodinia mecânica nos animais em todos os tempos avaliados no teste de *von Frey*. As respostas nociceptivas de animais com alodinia mecânica que foram tratados com LY 235959 (2 e 4nmol) no PrL não foram significativamente diferentes das de seu respectivo controle ($P > 0,05$) (figura 31). Contudo, animais com DNC e que foram tratados com a maior concentração de LY 235959 (8nmol) no córtex PrL apresentaram uma diminuição da alodinia mecânica no teste de von Frey realizado na pata direita, quando comparado com o grupo controle e com os grupos tratados com as demais doses ($P < 0,05$) nos tempos de 5, 15, 30 min (figura 31).

Figura 31 - LB1: linha de base tomada antes dos procedimentos; Seta A: procedimento CCI; LB2: linha de base registrada após 21 dias da cirurgia; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a LB2. O teste de von Frey (**pata direita**) foi realizado até 60 minutos. * $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + veículo (PrL); # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + LY 235959 2nmol; + $P < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo (PrL) + LY 235959 4nmol, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

EXPERIMENTO 5: Efeito do antagonista de receptor CB1 (AM251) no córtex PrL sobre alodinia mecânica

No que se refere aos grupos de animais com DNC que receberam AM251 no córtex PrL e o limiar de von Frey foi aferido na pata contralateral à cirurgia de CCI (**pata esquerda**), a ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,24) = 0,99$; $p > 0,05$], do tempo [$F(5,20) = 0,61$; $p > 0,05$], nem interação tratamento *versus* tempo [$F(15,56) = 0,57$; $p > 0,05$], como pode ser visto na figura 32.

Figura 32 - BL1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; BL2: linha de base média após 21 dias da CCI; Seta B: microinjeção do antagonista CB1 no córtex PrL dos animais após a medida da BL2. O teste de *von Frey* (**pata esquerda**) foi, então, realizado até 60 minutos.

Os animais neuropáticos que receberam doses crescentes de AM251 no córtex PrL e tiveram seus limiares de von Frey aferidos na **pata direita** (ipsilateral à pata lesada) não apresentaram efeito estatisticamente significantes do tratamento [$F(3,24) = 7,97$; $p > 0,05$], do tempo [$F(6,19) = 13,72$; $p > 0,05$], nem interação tratamento *versus* tempo [$F(18,53) = 1,85$;

$p>0,05$]. Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que a neuropatia induzida pela cirurgia de CCI alterou os limiares nociceptivos, ou seja, provocou alodinia mecânica na **pata direita**, ipsilateralmente ao nervo lesado dos animais. Além disso, os tratamentos farmacológicos realizados no córtex PrL alteraram os valores do limiar nociceptivo dos animais quando o mesmo foi mensurado na **pata direita** (Figuras 33). A microinjeção das três doses do antagonista de receptor do tipo CB₁ no PrL foi capaz de aumentar a alodinia mecânica quando comparado ao grupo controle ($P<0,05$) em todos os tempos estudados.

Figura 33 - Gráfico sem os valores da linha de base 1 para melhor visualização das curvas. BL2: linha de base tomada após 21 dias da cirurgia CCI; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2. O teste de *von Frey* (**pata direita**) foi, então, realizado por 60 minutos. * $P<0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + veículo (PrL), segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

EXPERIMENTO 6: Efeito do agonista de receptor NMDA e da interação com o Sistema endocanabinoide no cortex PrL sobre alodinia mecânica

Para estudar o efeito da microinjeção de agonista glutamatérgico sobre a dor neuropática periférica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI), foram administradas três doses de um agonista de receptores NMDA (0,25, 1 e 4nmol) no córtex PrL em animais que foram (CCI) ou não (*Sham*) submetidos à indução da DNC. Além disso, fora investigado o envolvimento do sistema endocanabinoide na neurotransmissão glutamatérgica do córtex PrL, através do pré-tratamento do córtex PrL com o antagonista de receptores de endocanabinoides do tipo CB₁, o AM251 (200pmol), seguido do agonista do receptor NMDA (1nmol) com o intuito de promover a ativação da neurotransmissão glutamatérgica, seguida da ativação do sistema endocanabinoide através da microinjeção local de AEA (100pmol) no córtex PrL.

Em animais que passaram pela CCI, o limiar de *von Frey* fora aferido na **pata esquerda** (contralateralmente em relação à cirurgia de CCI). Nos animais neuropáticos, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(5,38) = 0,23$; $p > 0,05$], do tempo [$F(6,33) = 17,09$; $p > 0,05$], nem interação tratamento *versus* tempo [$F(30,157) = 2,16$; $p > 0,05$] nos grupos, cujo limiar de retirada da pata fora aferido na **pata esquerda** e que receberam o agonista NMDA e ou AM251 (200pmol) previamente à microinjeção de NMDA (1nmol) e/ou AEA (100pmol) após a microinjeção intracortical de NMDA na dose de 1nmol (figura 34).

Figura 34 - BL1: linha de base registrada antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; BL2: linha de base medida após 21 dias da CCI; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais feita após a BL2. O teste de *von Frey* (**pata esquerda**) foi, então, realizado até 60 minutos.

No que se refere aos animais que passaram pela CCI e, nos quais o limiar de *von Frey* fora aferido na **pata direita** (ipsilateral em relação à cirurgia de CCI), segundo a ANOVA de medidas repetidas, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(5,36) = 19,62$; $p < 0,05$], do tempo [$F(6,31) = 51,94$; $p < 0,05$], e interação tratamento *versus* tempo [$F(30,147) = 5,31$; $p < 0,05$]. Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que a lesão do nervo isquiático com a realização da cirurgia de CCI causou alodinia mecânica nos animais em todos os tempos avaliados quando o teste de *von Frey* foi aferido na pata direita do animal ($P < 0,05$) (Figura 35). As respostas nociceptivas do grupo de animais com alodinia mecânica que foi tratado com NMDA (0,25nmol) no PrL não foi significativamente diferente das de seu controle em nenhum dos tempos analisados ($P > 0,05$). A dose intermediária de NMDA (1nmol) apresentou diferença estatisticamente significante apenas no tempo 15 ($P < 0,05$), com aumento da alodinia mecânica. Contudo, animais com DNC e que foram tratados com a maior concentração de NMDA (4nmol) no córtex PrL tiveram os limiares de alodinia mecânica diminuídos no teste de *von Frey* realizado na **pata direita**, quando comparados com o grupo controle e os grupos tratados com NMDA nas doses de 0,25nmol e de 1nmol ($P < 0,05$) nos tempos de 5, 15, 30 min (figura 35).

Em adição, o bloqueio prévio de receptores CB1 com AM251, seguido pela microinjeção de NMDA (1nmol) no PrL, foi capaz de aumentar a alodinia mecânica quando comparado ao grupo que recebeu apenas a microinjeção de NMDA na dose de 1nmol e ao grupo controle ($P < 0,05$). A microinjeção de NMDA (1nmol) no PrL, seguida de AEA (100pmol), também no PrL, foi capaz de atenuar a alodinia mecânica induzida pela CCI quando comparado aos grupos NMDA 1nmol e controle, como pode ser visto na figura 35.

Figura 35 - BL1: linha de base registrada antes dos procedimentos; Seta A: procedimento CCI; BL2: linha de base medida após 21 dias da cirurgia; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a medida da BL2. O teste de *von Frey* (pata direita) foi, então, realizado até 60 minutos. Gráfico apresentado sem os valores da linha de base 1 para melhor análise das curvas. BL2: linha de base média após 21 dias da cirurgia; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2. O teste de *von Frey* (pata direita) foi realizada até 60 minutos. * $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + veículo (PrL); # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + NMDA 1nmol; + $P < 0,05$ quando comparado com o grupo veículo (PrL) + NMDA 0,25nmol, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

EXPERIMENTO 7: Efeitos dos canabinoides endógenos e sua interação com o sistema endovanniloide no córtex PrL sobre a alodinia mecânica.

Com o intuito de estudar o papel do sistema endocanabinoide e de sua interação com o sistema endovanniloide do córtex PrL na DNC induzida pela CCI foram administradas três concentrações do agonista endocanabinoide AEA, assim como foi realizado o pré-tratamento do PrL com o antagonista de canais iônicos TRPV₁ na dose de 9pmol, seguido da administração de AEA (200pmol) no córtex PrL em animais que foram submetidos à indução da DN.

Em animais que passaram pela cirurgia de CCI e o limiar de retirada de pata no teste de *von Frey* foi aferido na **pata esquerda** (contralateralmente à CCI), não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(6,51) = 2,10$; $p > 0,05$], do tempo [$F(6,46) = 15,75$; $p > 0,05$], nem interação tratamento *versus* tempo [$F(36,266) = 1,14$; $p > 0,05$]. Análises *post-hoc* de Duncan mostraram que a cirurgia de CCI realizada no lado direito dos animais não foi capaz de provocar alodinia mecânica na **pata esquerda** dos animais. Além disso, os tratamentos farmacológicos realizados no córtex PrL não alteraram os valores do limiar nociceptivo dos animais (Figura 36).

Figura 36 - BL1: linha de base registrada antes dos procedimentos; Seta A: cirurgia de CCI; BL2: linha de base medida após 21 dias da CCI; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2. O teste de *von Frey* (**pata esquerda**) foi, então, realizado até 60 minutos.

Além disso, foi realizado o bloqueio de receptores do tipo CB₁ com AM251 em três diferentes doses no PrL em animais com DNC ou submetidos ao procedimento *Sham*.

Em grupo de animais que passaram pela cirurgia de CCI e o limiar de retirada de pata no teste de von Frey foi aferido na **pata direita** do animal (ipsilateral à CCI), houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(6,51) = 19,39$; $p < 0,05$], do tempo [$F(6,46) = 25,82$; $p < 0,05$] e interação tratamento *versus* tempo [$F(36,266) = 3,81$; $p < 0,05$]. A cirurgia de CCI realizada no lado direito dos animais causou alodinia mecânica na pata direita dos roedores. Além disso, o tratamento do PrL com AEA na dose de 5pmol, a menor concentração aqui utilizada no presente trabalho, não foi diferente do grupo controle geral (veículo + veículo – CCI). Contudo, a AEA nas concentrações de 50 e 100pmol foram capazes de reduzir significativamente a alodinia mecânica dos animais quando comparado com seu controle farmacológico, ou seja, o tratamento do córtex PrL com AEA diminuiu a DNC na primeira medida de aferição no teste de *von Frey* (teste *post-hoc* de Duncan; $P < 0,05$). A dose de 50pmol de AEA teve um efeito estatisticamente significante quando comparado ao controle nos tempos de 5, 15 e 30 min no teste de *von Frey*. Contudo, a dose de 100pmol de AEA atenuou significativamente a neuropatia em todos os tempos avaliados. A maior dose de AEA (200pmol) microinjetada no córtex PrL causou aumento da alodinia mecânica, ou seja, efeito oposto àquele causado pelas outras concentrações de AEA (teste *post-hoc* de Duncan; $P < 0,05$) nos tempos 5, 15 e 30min (figura 37) em animais com DNC.

Em adição, o grupo tratado no PrL com AM251 na dose de 200pmol, seguido da microinjeção de AEA na dose de 100 pmol teve aumento da alodinia mecânica ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo tratado com veículo, seguido de AEA na dose de 100pmol. O aumento da alodinia foi evidente nos tempos 5, 15 e 30min, como pode ser visto na figura 37.

O pré-tratamento do córtex PrL com 6-Iodo-capsaisina (3pmol), um antagonista dos canais iônicos TRPV₁ endovaniloides, seguido da microinjeção da maior dose de AEA (200pmol) no PrL, foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata avaliado pelo teste de

von Frey ($P<0,05$) no tempo de 15min quando comparado ao grupo que foi tratado no PrL com veículo, seguido de AEA na dose de 200pmol (figura 37).

Figura 37 - Gráfico sem os valores da linha de base 1 para melhor discriminação entre as curvas. BL2: linha de base tomada após 21 dias da cirurgia; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2. O teste de *von Frey* (**pata direita**) foi, então, realizado até 60 minutos. * $P<0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + veículo (PrL); # $P<0,05$, quando comparado com o grupo veículo (PrL) + AEA 100pmol; + $P<0,05$ quando comparado com o grupo veículo (PrL) + AEA 200pmol, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

Em animais que passaram pelo procedimento **Sham** (sem a indução da dor neuropática) o limiar de *von Frey* também fora aferido na **pata esquerda** (contralateral em relação a falsa cirurgia) e na **pata direita** pseudo-operada. Segundo a ANOVA de medidas repetidas, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,28) = 0,42$; $p>0,05$], do tempo [$F(6,23) = 7,80$; $p>0,05$], nem interação tratamento *versus* tempo [$F(24,86) = 2,42$; $p>0,05$] nos grupos, cujo limiar de retirada da pata fora aferido na pata esquerda (figura 38). Assim também, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,28) = 0,57$; $p>0,05$], do tempo [$F(6,23) = 7,06$; $p>0,05$], nem da interação entre tratamento *versus* tempo [$F(24,86) = 1,86$; $p>0,05$] nos grupos cujos limiares de retirada da pata foram aferidos na **pata direita** (pseudo-operada) (figura 39). Os animais *Sham* não alteraram os limiares nociceptivos, ou seja, não houve alodinia mecânica sem

pata direita, nem na pata **esquerda** (teste *post-hoc* de Duncan; $P > 0,05$). Além disso, os tratamentos farmacológicos realizados no córtex PrL não alteraram os valores do limiar nociceptivo dos animais mensurados em nenhuma das patas estudadas (figuras 38 e 39).

Figura 38 - BL1: linha de base antes dos procedimentos realizados; Seta A: procedimento *Sham*; BL2: linha de base medida após o procedimento *Sham*; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2. O teste de *von Frey* (**pata esquerda**) foi, então, realizado por 60 minutos.

Figura 39 - BL1: linha de base medida antes dos procedimentos realizados; Seta A: procedimento *Sham*; BL2: linha de base medida após o procedimento *Sham*; Seta B: microinjeção de drogas no córtex PrL dos animais após a BL2. O teste de *von Frey* (**pata direita**) foi, então, realizado por 60 minutos.

Figura 40 - A: Representação esquemática dos sítios de microinjecção histologicamente confirmados na divisão pré-límbica do córtex “pré-frontal” medial de (○) veículo, (■) NMDA em diferentes doses, (▲) LY235959 em diferentes doses (●) AEA em diferentes doses, (□) AM251 em diferentes doses, (△) 6- ICPS 3pmol, (★) associações farmacológicas de acordo com o atlas esteróxico de Paxinos e Watson (1997). B: Fotomicrografia representativa de uma seção transversal do cérebro que de um rato Wistar, mostrando um local de microinjecção de droga no córtex PrL. Microinjecções realizadas no hemisfério cerebral contralateral à CCI ou ao procedimento *Sham*.

4.3 Parte III

EXPERIMENTO 1: Estudo da influência da comorbidade entre DNC com ansiedade/pânico na percepção da dor, através da realização do confronto entre ratos após 21 dias da CCI para indução da DN, com a salamanta, uma serpente constritora.

Com o intuito de estudar o efeito da comorbidade entre a dor crônica do tipo neuropática com a ansiedade/pânico nas respostas de retirada de pata no teste de von Frey, fora realizado o confronto entre a serpente constritora e os ratos com dor neuropática crônica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático (CCI) ou submetidos ao procedimento *Sham*. Esses animais foram avaliados no teste de *von Frey* (alodinia mecânica) após o confronto com o predador.

Segundo a análise de variância de uma via, houve aumento significativo do índice comportamental ($F_{(3,26)}=18,81$; $P<0,0001$) e da porcentagem de comportamento ($F_{(3,26)}=6,07$; $P<0,001$) de **avaliação de risco** e do índice comportamental ($F_{(3,26)}=9,77$; $P<0,001$) e da porcentagem de comportamento ($F_{(3,26)}=5,80$; $P<0,01$) de **imobilidade defensiva** (congelamento) e do índice comportamental ($F_{(3,26)}=13,61$; $P<0,0001$) e porcentagem de comportamento ($F_{(3,26)}=26,58$; $P<0,0001$) de **fuga** do grupo tratado com veículo/CCI e confrontado com serpente em comparação com o grupo tratado com veículo/CCI e submetido ao contexto experimental, sem a serpente (teste *post hoc* de Neuman Keuls; $P < 0,05$) (Figura 41). As respostas de defesa apresentadas por animais sem DNC (veículo/*Sham*) confrontados com serpente também foram estatisticamente significantes quando comparadas às do grupo tratado com veículo/*Sham* e submetido ao contexto experimental, sem a serpente, em relação aos comportamentos defensivos acima mencionados (Figura 41). Além disso, os animais com dor neuropática veículo/CCI e confrontado com serpente apresentaram respostas de defesa aumentadas em comparação ao grupo sem DNC (veículo/*Sham*) confrontados com serpente.

Figura 41 - Efeito do confronto entre ratos Wistar e serpente constritora após 21 dias da CCI ou do procedimento *Sham* sobre os comportamentos de avaliação de risco (A-B), de imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E- F) evocados pelo roedor. + $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo/*Sham* sem serpente; * $P < 0,05$, quando comparado com o grupo CCI tratado com veículo sem serpente; # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo/*Sham* – serpente, segundo a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Imediatamente após o confronto ou à exposição ao contexto, os animais que passaram pelo procedimento de CCI e *Sham* (sem a indução da DN) e o limiar de von Frey fora aferido na pata esquerda (contralateral em relação a cirurgia de CCI ou *Sham*), não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,26) = 1,27$; $p > 0,05$], mas sim do tempo [$F(4,19) = 14,39$; $p < 0,001$] e interação do tratamento *versus* tempo [$F(12,53) = 4,80$; $p < 0,0001$]. Sejam animais com DNC com CCI, sejam aqueles submetidos ao procedimento *Sham*, confrontados ou não com serpente constritora, não tiveram os limiares nociceptivos significativamente alterados quando o teste de *von Frey* foi realizado na pata esquerda (teste *post-hoc* de Duncan; $P > 0,05$ em todos os casos) (Figura 42B).

Interessantemente, em animais que sofreram o procedimento de cirurgia de CCI e o limiar de *von Frey* fora aferido na pata direita (ipsilateral em relação à cirurgia de CCI ou *Sham*) após o confronto com a serpente, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(3,26) = 76,11$; $p < 0,0001$] e da interação do tratamento *versus* tempo [$F(15,50) = 9,87$; $p < 0,0001$] mas não do tempo [$F(5,18) = 1,32$; $p > 0,05$]. Os animais com DNC que foram tratados com salina e confrontados com a serpente, tiveram seus limiares de alodinia mecânica no teste de *von Frey* diminuídos significativamente quando comparados com os animais com DNC tratados com salina sem o confronto com a serpente ($P < 0,05$) até 10 minutos após o confronto (teste *post-hoc* de Duncan; $P < 0,05$) (Figura 42A). Animais submetidos ao procedimento *Sham* (sem a indução da DN) não tiveram seus limiares de resposta no teste de *von Frey* alterados após o confronto com a serpente, em comparação ao grupo não exposto ao predador.

Figura 42 - Efeito do confronto entre ratos Wistar e serpente constritora após 21 dias da CCI ou do procedimento *Sham* sobre a respostas aferidas no teste de von Frey. LB1: linha de base antes dos procedimentos; Seta A: procedimento *Sham* ou CCI; LB2: nova linha de base aferida após 21 dias da cirurgia ; Seta B: após a LB2 microinjeção de salina fisiológica no córtex PrL dos animais. Exposição de ratos à arena poligonal com ou sem a serpente por 5 minutos e, em seguida, realização do teste de *von Frey* (pata direita em A) (pata esquerda em B) por 30 minutos. # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo salina (PrL) sem serpente, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

EXPERIMENTO 2: Envolvimento dos receptores NMDA do córtex pré-límbico (PrL) sobre o comportamento defensivo evocado pelos roedores com DNC em confronto com serpente constrictora

A análise de variancia Anova seguida do teste de *post hoc* de Neuman Keuls mostrou que houve aumento significativo do índice comportamental ($F_{(4,31)}=16,09$; $P<0,0001$) e da porcentagem de comportamento ($F_{(4,31)}=8,28$; $P<0,0001$) de **avaliação de risco** e do índice comportamental ($F_{(4,31)}=5,56$; $P<0,01$) mas não da porcentagem de comportamento ($F_{(4,31)}=2,56$; $P>0,05$) de **imobilidade defensiva** (congelamento) nem do índice comportamental ($F_{(4,31)}=6,26$; $P<0,001$) mas sim porcentagem de comportamento ($F_{(4,31)}=8,92$; $P<0,001$) de **fuga** do grupo tratado com veículo/CCI e confrontado com serpente em comparação com o grupo tratado com veículo/CCI e submetido ao contexto experimental, sem a serpente (teste *post hoc* de Neuman Keuls; $P < 0,05$) (Figura 43).

Os grupos de animais com dor neuropática tratados com NMDA 4nmol no córtex PrL, seguido da exposição à serpente tiveram seus índices comportamentais ($F_{(4,31)}=16,09$; $P<0,0001$) de **avaliação de risco** significativamente aumentados quando comparado com seu controle, o grupo veículo/CCI + serpente, NMDA 0,25nmol e NMDA 1nmol ($P<0,01$), e porcentagem de comportamento ($F_{(4,31)}=8,28$; $P<0,0001$) de **avaliação de risco** significativamente aumentados quando comparado com NMDA 0,25nmol e NMDA 1nmol confrontados com a serpente ($P<0,01$). Além disso, os índices comportamentais e porcentagem de comportamento de imobilidade defensiva não se alteraram significativamente (teste *post hoc* de Newman-Keuls; $P>0,05$) em animais tratados com NMDA. Contudo, animais tratados com NMDA na dose de 1nmol apresentaram aumento no índice comportamental de fuga ($F_{(4,31)}=6,26$; $P<0,001$) quando comparados com aqueles tratados com NMDA na dose de 0,25nmol ($P<0,01$), assim como houve aumento percentual da duração do comportamento de fuga ($F_{(4,31)}=8,92$; $P<0,001$) após o tratamento com NMDA na dose de 4nmol quando comparado ao NMDA na dose de 0,25nmol ($P<0,01$) (Figura 43).

Figura 43 - Efeito do tratamento do córtex PrL com o agonista NMDA de ratos Wistar após 21 dias da CCI sobre o comportamento de avaliação de risco (A-B), imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E- F) evocados pelo roedor ameaçado por serpentes. + $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo/CCI sem serpente # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo salina (PrL) + serpente; & $P < 0,05$ quando comparado com o grupo NMDA 0,25nmol; \$ $P < 0,05$ com o grupo NMDA 1nmol segundo a análise de variância de *one-way ANOVA*, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

No que diz respeito aos animais que sofreram o procedimento de cirurgia de CCI e o limiar de *von Frey* fora aferido na pata direita (ipsilateral à cirurgia de CCI) após o confronto com a serpente, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,31) = 11,84$; $p < 0,0001$] e do tempo [$F(5,27) = 26,68$; $p < 0,0001$] e da interação do tratamento *versus* tempo [$F(20,102) = 5,84$; $p < 0,0001$]. Animais com dor neuropática que foram tratados com salina e confrontado com a serpente, tiveram seus limiares de alodinia mecânica no teste de *von Frey* diminuídos significativamente quando comparado com os animais com dor neuropática tratados com veículo sem o confronto com a serpente (teste *post-hoc* de Duncan; $P < 0,05$) em todos os tempos analisados. Além disso, o tratamento com NMDA na dose de 4nmol de animais com CCI diminuiu ainda mais os limiares de *von Frey* quando comparado aos grupo que recebeu veículo /CCI e ou NMDA na dose de 1 nmol até 20 minutos, ou NMDA na dose de 0,25 nmol até 30 minutos após o confronto (Figura 44A).

Imediatamente após o confronto os animais que sofreram o procedimento de cirurgia de CCI e o limiar de *von Frey* fora aferido na pata esquerda (contralateral à cirurgia de CCI) após o confronto com a serpente, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,31) = 0,33$; $p > 0,05$], mas sim do tempo [$F(4,31) = 10,05$; $p < 0,0001$] e interação do tratamento *versus* tempo [$F(20,102) = 2,19$; $p < 0,01$]. Animais com dor neuropática causada por CCI, confrontados ou não com serpentes, e que receberam NMDA na dose de 0,25 nmol, não tiveram seus limiares nociceptivos significativamente alterados quando o teste de *von Frey* foi realizado na pata esquerda no tempo 20 e 30 minutos respectivamente (teste *post-hoc* de Duncan; $P > 0,05$) (Figura 44B).

Figura 44 - Efeito do tratamento do córtex PrL com o agonista NMDA em ratos Wistar após 21 dias do procedimento CCI sobre o teste de *von Frey*. LB1: linha de base antes da CCI; Seta A: procedimento CCI; LB2: nova linha de base aferida após 21 dias após a cirurgia; Seta B: após a LB2, microinjeção de salina ou de NMDA (0,25, 1 ou 4nmol) no córtex PrL dos animais. Realização do confronto com a serpente ou exposição ao contexto, sem a serpente, por 5 minutos e, em seguida, realização do teste de *von Frey* (pata direita em A e pata esquerda em B) por até 30 minutos. * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo veículo sem serpente; # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo veículo + serpente; & $P < 0,05$ quando comparado com o grupo NMDA na dose de 0,25nmol; ! $P < 0,05$, quando comparado com o grupo NMDA na dose de 1nmol, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

Além disso, foi estudado em animais com DNC o efeito do tratamento com o antagonista de receptor NMDA, o LY235959, em doses crescentes (2, 4 e 8nmol), no comportamento de defesa.

Segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Neuman Keuls, houve aumento significativo do índice comportamental ($F_{(4,31)}=6,09$; $P<0,001$) e da porcentagem de comportamento ($F_{(4,31)}=4,38$; $P<0,0$) da **avaliação de risco** e do índice comportamental ($F_{(3,22)}=8,72$; $P<0,0001$) mas não da porcentagem de comportamento ($F_{(4,31)}=1,80$; $P>0,05$) de **imobilidade defensiva** (freezing) e do índice comportamental ($F_{(4,31)}=14,65$; $P<0,0001$) e porcentagem de comportamento ($F_{(4,31)}=5,46$; $P<0,01$) de **fuga** do grupo tratado com veículo/CCI e confrontado com serpente em comparação com o grupo tratado com veículo/CCI e submetido ao contexto experimental, sem a serpente (Figura 45).

Além disso, animais com DNC confrontados com serpente e tratados com LY235959 no córtex PrL tiveram uma diminuição dos comportamentos defensivos induzidos pela serpente. Houve diminuição índice comportamental de avaliação de risco em animais tratados com LY235959 na dose de 4nmol em comparação ao grupo veículo + serpente (teste *post hoc* de Neuman Keuls; $P < 0,05$). Contudo, porcentagem duração do comportamento de **avaliação de risco** foi significativamente diminuída em animais neuropáticos que receberam LY235959 no córtex PrL, nas doses de 4 e 8 nmol, em comparação ao grupo veículo + serpente (teste *post hoc* de Neuman Keuls; $P < 0,05$). Quanto ao índice comportamental de **imobilidade defensiva**, todos os animais tratados com LY235959 no córtex PrL tiveram esse comportamento diminuído em comparação ao grupo veículo. Entretanto, a duração desse comportamento foi estatisticamente diferente em comparação ao grupo tratado com veículo na presença da serpente, apenas no grupo que recebeu LY235959 nas doses de 4nmol e fora ameaçado pela serpente (Figura 45).

Não obstante, houve diminuição do índice comportamental e porcentagem de comportamento de **fuga** do grupo tratado com LY235959 em todas as doses e confrontado com serpente, em comparação com o grupo tratado com veículo e ameaçado pela serpente (Figura 45).

Figura 45 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um antagonista NMDA, o LY235959, em ratos Wistar após 21 dias da CCI sobre o comportamento de avaliação de risco (A-B), imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E- F), evocados pelo roedor com DNC na presença do predador. + $P < 0,05$, quando comparado com o grupo salina sem serpente; # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo tratado com veículo e confrontado com a serpente, segundo a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

No que diz respeito aos animais que sofreram o procedimento de cirurgia de CCI e o limiar de *von Frey* fora aferido na pata direita (ipsilateral à cirurgia de CCI) após o confronto com a serpente, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,31) = 9,29$; $p < 0,0001$] e do tempo [$F(5,28) = 31,51$; $p < 0,0001$] e da interação do tratamento *versus* tempo [$F(20,106) = 7,95$; $p < 0,0001$] (*one-way ANOVA*). Animais com dor neuropática que foram tratados com veículo e confrontados com a serpente, tiveram seus limiares de alodinia mecânica no teste de *von Frey* diminuídos significativamente quando comparados com os animais com dor neuropática tratados com salina sem o confronto com a serpente (teste *post-hoc* de Duncan; $P < 0,05$) imediatamente após o confronto. Além disso, o tratamento do córtex PrL com LY235959 nas doses de 4 e 8 nmol aumentou os limiares de *von Frey* quando comparado aos grupos que receberam salina/CCI confrontados ou não com a serpente e LY235959 na dose de 2nmol até 20 minutos após o confronto ou exposição ao contexto. Além disso, as respostas do grupo tratado com LY235959 no córtex PrL na dose de 8 nmol foi significativamente diferente do grupo tratado com CCI + salina no PrL e confrontado com serpente (Figura 46A).

Imediatamente após o confronto, em relação aos animais que sofreram o procedimento de cirurgia de CCI e o limiar de *von Frey* fora aferido na pata esquerda (contralateral à cirurgia de CCI) após o confronto com a serpente, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,31) = 10,13$; $p < 0,05$], do tempo [$F(5,28) = 8,15$; $p < 0,0001$] e interação do tratamento *versus* tempo [$F(20,106) = 4,46$; $p < 0,01$] (*one-way ANOVA*). Animais com dor neuropática confrontados com serpente e que receberam LY235959 na dose de 4nmol ou veículo no córtex PrL, tiveram seus limiares nociceptivos significativamente menores quando o teste de *von Frey* foi realizado na pata esquerda até 20 minutos minutos respectivamente (teste *post-hoc* de Duncan; $P > 0,05$) (Figura 46B).

Figura 46 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um antagonista NMDA, o LY235959, em ratos Wistar após 21 dias do procedimento CCI sobre as respostas aferidas pelo teste de *von Frey* em animais com DNC. BL1: linha de base antes da CCI; Seta A: procedimento CCI; BL2: nova linha de base aferida após 21 dias da cirurgia; Seta B: após a BL2, microinjeção de salina ou de LY235959 (2, 4 ou 8nmol) no córtex PrL dos animais. Realização da exposição ou não à serpente por 5 minutos e, em seguida, realização do teste de *von Frey* (pata direita em A) (pata esquerda em B) por 30 minutos. * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com veículo sem serpente; # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo tratado com veículo + serpente; & $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado no córtex PrL com LY235959 (2nmol), segundo a análise de variância de medidas repetidasseguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

EXPERIMENTO 3: Envolvimento dos receptores CB₁ do córtex pré-límbico (PrL) sobre o comportamento defensivo evocado pelos roedores com DNC em confronto com serpente constrictora

Segundo a análise de variância de uma via (one-way ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Neuman Keuls, houve aumento significativo do índice comportamental ($F_{(4,33)}=17,41$; $P<0,0001$) e da porcentagem de comportamento ($F_{(4,33)}=7,06$; $P<0,001$) da **avaliação de risco** e do índice comportamental ($F_{(4,33)}=4,12$; $P<0,01$) mas não da porcentagem de comportamento ($F_{(4,33)}=1,88$; $P>0,05$) de **imobilidade defensiva** (freezing) e do índice comportamental ($F_{(4,33)}=9,35$; $P<0,0001$) e porcentagem de comportamento ($F_{(4,33)}=6,99$; $P<0,001$) de **fuga** do grupo tratado com veículo/CCI e confrontado com serpente em comparação com o grupo tratado com veículo/CCI e submetido ao contexto experimental, sem a serpente (Figura 47).

Os grupos de animais com DNC tratados com AM251 em todas as doses no córtex PrL, seguido da exposição à serpente, tiveram seus índices comportamentais ($F_{(4,33)}=17,41$; $P<0,0001$) de **avaliação de risco** significativamente aumentados quando comparados com seus controles, o grupo salina (PrL)/CCI + serpente, e a duração desse comportamento ($F_{(4,33)}=7,06$; $P<0,001$) de **avaliação de risco** foi também significativamente aumentada quando comparado o grupo tratado com AM251 no córtex PrL nas doses de 100 e 200pmol com seu controle, o grupo salina (PrL)/CCI + serpente (teste *post hoc* de Neuman Keuls; $P < 0,01$). Além disso, não houve alteração significativa no que se refere ao índice comportamental ($F_{(4,33)}=4,12$; $P>0,05$) e duração do comportamento de **imobilidade defensiva** ($F_{(4,33)}=1,88$; $P>0,05$) e do índice comportamental ($F_{(4,33)}=9,35$; $P<0,05$) e porcentagem de comportamento ($F_{(4,33)}=6,99$; $P<0,05$) de **fuga** (teste *post hoc* de Neuman Keuls; $P > 0,05$) em animais tratados com AM251 no córtex PrL.

Figura 47 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um antagonista CB1, o AM251, de ratos Wistar após 21 dias da CCI sobre o comportamento de avaliação de risco (A-B), de imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E-F) evocados pelo roedor na presença da serpente. + $P < 0,05$, quando comparado com o grupo tratado com salina (PrL) sem serpente; # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo salina (PrL) + serpente; segundo a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

No que diz respeito aos animais que sofreram o procedimento de cirurgia de CCI e o limiar de *von Frey* fora aferido na pata direita (ipsilateral à cirurgia de CCI) após o confronto com a serpente, segundo a análise de variância de medidas repetidas, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,33) = 14,19$; $p < 0,0001$], do tempo [$F(5,29) = 24,82$; $p < 0,0001$] e da interação do tratamento *versus* tempo [$F(20,110) = 6,46$; $p < 0,0001$]. Animais com dor neuropática que foram tratados no córtex PrL com salina e confrontados com a serpente, tiveram seus limiares de alodinia mecânica no teste de *von Frey* diminuídos significativamente quando comparados com os animais com DNC tratados no córtex PrL com salina, sem o confronto com a serpente (teste *post hoc* de Duncan; $P < 0,05$) em todos os tempos analisados. Além disso, o tratamento do corte PrL com AM251 na dose de 200pmol diminuiu os limiares de *von Frey* quando comparado aos grupos que receberam salina (PrL)/CCI confrontados ou não com a serpente; o AM251 na dose de 50pmol diminuiu o limiar de *von Frey* até 20 minutos após o confronto com a serpente ou submissão ao contexto experimental sem a serpente. Além disso, o grupo tratado no córtex PrL com AM251 na dose de 100pmol foi estatisticamente diferente do grupo tratado no córtex PrL com AM251 na dose de 50pmol, quando confrontado com serpente e também foi significativamente diferente em relação ao grupo tratado no córtex PrL com veículo sem o confronto com a serpente no tempo 20 minutos. Nos últimos 30 minutos de análises, todos os grupos foram diferentes em relação ao grupo que recebeu veículo no córtex PrL e não foi submetido ao confronto com a serpente (Figura 48A).

Imediatamente após o confronto com a serpente, os animais com DNC tiveram o limiar de *von Frey* aferido na pata esquerda (contralateral à cirurgia de CCI). Segundo a análise de variância de medidas repetidas, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,33) = 2,03$; $p > 0,05$], mas sim do tempo [$F(5,29) = 59,46$; $p < 0,001$] e interação do tratamento *versus* tempo [$F(20,110) = 4,38$; $p < 0,001$]. Sejam animais com dor neuropática com CCI confrontados com a serpente e que receberam no córtex PrL AM251 em todas as doses ou aqueles não confrontados com serpente constritora, não tiveram seus limiares nociceptivos significativamente alterados quando o teste de *von Frey* foi realizado na pata esquerda no tempo 10 minutos (teste *post-hoc* de Duncan; $P > 0,05$) (Figura 48B), quando comparado com o grupo DNC que recebeu veículo e foi confrontado com a serpente.

Figura 48 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um antagonista CB1, o AM251, em ratos Wistar após 21 dias do procedimento CCI sobre o teste de von Frey em animais com DNC. BL1: linha de base antes da CCI; Seta A: procedimento CCI; BL2: medida de nova linha de base após 21 dias da cirurgia para CCI; Seta B: após a BL2, microinjeção de salina ou de AM251 (50, 100 OU 200pmol) no córtex PrL dos animais. Realização de confronto a serpente ou exposição ao contexto experimental sem a serpente por 5 minutos e, em seguida, realização do teste de *von Frey* (pata direita, em A, e pata esquerda, em B) por 30 minutos. * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com veículo (PrL) sem serpente; # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo tratado com veículo (PrL) + serpente; & $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado com AM251 50pmol (PrL); + $P < 0,05$, quando comparado a todos os grupos, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Em adição, foi estudado em animais com DNC o efeito do tratamento do córtex PrL com um agonista de receptor CB1, o AEA, em doses crescentes (50, 100 e 200 pmol). Segundo a análise de variância de uma via, houve aumento significativo do índice comportamental ($F_{(4,28)}=6,70$; $P<0,0001$) mas não da duração do comportamento ($F_{(4,28)}=2,91$; $P<0,05$) da **avaliação de risco** e do índice comportamental ($F_{(4,28)}=3,40$; $P<0,05$) mas não da duração do comportamento ($F_{(4,28)}=2,39$; $P>0,05$) de **imobilidade defensiva** (*freezing*) e do índice comportamental ($F_{(4,28)}=5,06$; $P<0,01$) e da duração do comportamento ($F_{(4,28)}=5,69$; $P<0,01$) de **fuga** eliciado pelo grupo tratado com veículo (PrL)/CCI e confrontado com a serpente, em comparação com o grupo tratado com veículo (PrL)/CCI e submetido ao contexto experimental, sem a serpente (teste *post hoc* de Neuman-Keuls; $P < 0,05$) (Figuras 49).

Além disso, animais com dor neuropáticos crônica, confrontados com a serpente e tratados com AEA no córtex PrL tiveram uma diminuição dos comportamentos defensivos. Segundo a análise de variância de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Neuman Keuls, houve diminuição significativa do índice comportamental de avaliação de risco em animais tratados no córtex PrL com AEA na dose de 100pmol, em comparação ao grupo veículo (PrL) + serpente. Quanto ao índice comportamental de **imobilidade defensiva**, os animais tratados no córtex PrL com AEA na dose de 100pmol tiveram esse comportamento diminuído em comparação ao grupo tratado com veículo. Além disso, houve uma diminuição significativa do índice comportamental **fuga** apresentado pelo grupo tratado no córtex PrL com AEA na dose de 100pmol e confrontado com serpente, em comparação com o grupo tratado com AEA 200pmol (PrL) + serpente, e da duração do comportamento de **fuga apresentado pelo** grupo tratado com as AEA 100pmol (PrL) e confrontado com serpente, em comparação com o grupo veículo (PrL)+ serpente (Figura 49).

Figura 49 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um agonista CB1, o AEA, em ratos Wistar com DNC após 21 dias da CCI sobre o comportamento de avaliação de risco (A-B), de imobilidade defensiva (C-D) e de fuga (E-F) evocados pelo roedor ameaçado pela serpente. + P<0,05, quando comparado com o grupo salina (PrL) sem serpente; # P<0,05, quando comparado com o grupo salina (PrL) + serpente; - P<0,05, quando comparado com o grupo AEA 200pmol (PrL), segundo a análise de variância de uma via (*one-way ANOVA*), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

Em relação aos animais que sofreram o procedimento de cirurgia de CCI e o limiar de *von Frey* fora aferido na pata direita (ipsilateral à cirurgia de CCI) após o confronto com a serpente, segundo a análise de variância de medidas repetidas, houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,28) = 6,81$; $p < 0,001$], do tempo [$F(5,24) = 9,87$; $p < 0,0001$] e da interação do tratamento *versus* tempo [$F(20,90) = 8,37$; $p < 0,0001$]. Os animais com dor neuropática que foram tratados no córtex PrL com salina e confrontados com a serpente tiveram seus limiares de alodinia mecânica no teste de *von Frey* diminuídos significativamente quando comparado com os animais com dor neuropática tratados com salina no córtex PrL sem o confronto com a serpente (Teste *post hoc* de Duncan; $P < 0,05$) em todos os tempos analisados. Além disso, o tratamento do córtex PrL com AEA na dose de 100pmol aumentou os limiares de *von Frey* quando comparado a todos os grupos no tempo de 10 minutos e aos grupos que receberam salina (PrL)/CCI confrontados com a serpente, e AEA 50pmol, AEA 200pmol (PrL) aos 20 minutos após o confronto. Além disso, o grupo tratado no córtex PrL com AM251 na dose de 200pmol teve seus limiares de *von Frey* diminuídos em comparação ao grupo não ameaçado pela serpente durante todos os tempos presentemente avaliados, com com aquele confrontado com a serpente e tratado com AEA no córtex PrL na dose de 50pmol, 20 minutos após o confronto ou submissão ao contexto (teste *post-hoc* de Duncan; $P < 0,05$ em todos os casos) (Figura 50A).

No que diz respeito ao teste de *von Frey*, imediatamente após o confronto, os animais que sofreram o procedimento de cirurgia de CCI e o limiar de *von Frey* fora aferido na pata esquerda (contralateral à cirurgia de CCI) após o confronto com a serpente, segundo a análise de variância de medidas repetidas, não houve efeito estatisticamente significativo do tratamento [$F(4,28) = 0,32$; $p > 0,05$], e nem da interação do tratamento *versus* tempo [$F(20,90) = 1,10$; $p > 0,05$] mas sim do tempo [$F(5,24) = 15,03$; $p < 0,0001$]. Sejam animais com DNC confrontados com a serpente e que receberam veículo ou AEA no córtex PrL em todas as doses, ou aqueles não confrontados com serpente constritora, não tiveram seus limiares nociceptivos significativamente alterados quando o teste de *von Frey* foi realizado na pata esquerda (teste *post-hoc* de Duncan; $P > 0,05$ em todos os casos) (Figura 50B).

Figura 50 - Efeito do tratamento do córtex PrL com um agonista CB1, o AEA, em ratos Wistar com DNC após 21 dias do procedimento CCI sobre as respostas registradas no teste de *von Frey*. LB1: linha de base antes da CCI; Seta A: procedimento CCI; LB2: medida nova linha de base após 21 dias da cirurgia para CCI; Seta B: após a LB2, microinjeção de salina ou de AEA (50, 100 ou 200pmol) no córtex PrL dos animais. Realização de confronto com a serpentes ou submissão ao contexto por 5 minutos e, em seguida, realização do teste de *von Frey* (pata direita em A) (pata esquerda em B) por 30 minutos. * $P < 0,05$, quando comparado ao grupo tratado com veículo (PrL) sem serpente; # $P < 0,05$, quando comparado com o grupo tratado com veículo (PrL) + serpente; & $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado com AM251 50pmol (PrL); \$ $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado com AM251 200pmol (PrL); + $P < 0,05$, quando comparado a todos os grupos, segundo a análise de variância de medidas repetidas, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.

Figura 51 - Ilustração dos comportamentos defensivos evocados por ratos Wistar com DNC após 21 dias da CCI confrontados com serpente constritora, a salamanta (*Epicrates cenchria crassus*), em um modelo proposto de comorbidade de DNC com ansiedade/pânico. **A:** Visão frontal da arena com a habituação por 3 dias dos animais com comida e água à vontade, além da plataforma de escape e a toca artificial; **B:** Visão lateral da arena poligonal durante a habituação; **C:** Local, no centro da arena, onde a serpente permanece no momento inicial do confronto; **D:** Comportamento de fuga direcionada para a porta por onde o roedor foi colocado na arena poligonal; **E:** Comportamento de fuga direcionada para a plataforma, seguida de comportamentos de alerta defensivo e de imobilidade defensiva; **F:** Comportamento de imobilidade defensiva evocado pelo roedor debaixo da plataforma com a aproximação da serpente; **G:** Comportamento de alerta defensivo seguido de fuga orientada do animal para a toca; **H:** Comportamento de avaliação de risco e de esquiva inibitória, após fuga orientada para a toca; **I e J:** Comportamento de alerta defensivo e de imobilidade defensiva com a aproximação da serpente; **K:** Comportamento de fuga orientada para a parte superior da toca, seguida de avaliação de risco.

Figura 52 - Representação esquemática dos sítios de microinjecção de drogas na divisão pré-límbica do córtex “pré-frontal” medial de (○) veículo, (■) NMDA em diferentes doses, (□) LY235959 em diferentes doses (△) AEA em diferentes doses, (★) AM251 em diferentes doses, de acordo com o atlas esteróxico de Paxinos e Watson (1997).

4.4 Resumos dos Resultados

Tabela 11 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da Avaliação dos aspectos nociceptivos, motores e afetivo-cognitivos de ratos submetidos a um modelo adaptado de injúria por constrição crônica do nervo isquiático (CCI: uma ligadura) comparando com o modelo clássico de Bennett e Xie (CCI: quatro ligaduras) O símbolo – significa que não houve alteração; ↑ causou e ↓ não causou alteração nos comportamentos avaliados.

Comportamentos	Grupo Sham	Grupo CCI 1 ligadura	Grupo CCI 4 ligaduras
Alodinia mecânica	-	↑	↑
Alodinia ao frio	-	↑	↑
Autotomia	-	-	↑
Locomotor	-	↓	↓
Cognitivo (Reconhecimento)	-	↓	↓
Ansiedade (Campo aberto)	-	↑	↑
Depressão (Nado forçado)	-	↑	↑

Tabela 12 - Resumo dos resultados obtidos no estudo do efeito da administração por via periférica (IP) de Indometacina sobre a alodinia mecânica aferida pelo teste de von Frey. O símbolo – significa que não houve alteração do limiar de von Frey; ↑ aumentou ou ↓ diminuiu a alodinia mecânica nos animais.

Dias após a cirurgia	Veículo/Sham	Veículo/CCI	Indometacina/Sham	Indometacina/CCI
2 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	↓ (alodinia mecânica)
4 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	↓ (alodinia mecânica)
7 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	-
14 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	-
21 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	-
28 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	-

Tabela 13 - Resumo dos resultados obtidos no estudo do efeito da microinjeção (ipsi e contralateral, em relação ao lado do Sham ou CCI) de cloreto de cobalto (1mM/200nL) na região PrL do CPFM sobre a alodinia mecânica aferida pelo teste de von Frey. O símbolo – significa que não houve alteração do limiar de von Frey; ↑ aumentou ou ↓ diminuiu a alodinia mecânica nos animais.

Dias após a cirurgia	Salina/Sham	Salina/CCI	Cobalto/Sham	Cobalto/CCI
7 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	-
14 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	-
21 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	↓ (alodinia mecânica)
28 dias	-	↑ (alodinia mecânica)	-	↓ (alodinia mecânica)

Tabela 14 - Resumo dos resultados obtidos no estudo dos sistemas glutamatérgico, endocanabinoide e endovaniloide na região PrL do CPFM sobre a alodinia mecânica aferida pelo teste de von Frey. O símbolo – significa que não houve alteração do limiar de von Frey; ↑ aumentou ou ↓ diminuiu a alodinia mecânica nos animais.

Dias após a cirurgia	Tratamento Farmacológico	Trat/CCI
21 DIAS	NMDA	↑ (alodinia mecânica)
	LY235959	↓ (alodinia mecânica)
	AM251	↑ (alodinia mecânica)
	AEA 50 e 100pmol	↓ (alodinia mecânica)
	AEA 200pmol	↑ (alodinia mecânica)
	AM251 + AEA 100pmol	↑ (alodinia mecânica)
	6-I-CPS + AEA 200pmol	↓ (alodinia mecânica)
	AM251 + NMDA	↑ (alodinia mecânica)
	NMDA + AEA 100pmol	↓ (alodinia mecânica)
	Tratamentos Farmacológicos nos Sham	-

Tabela 15 - Resumo dos resultados obtidos no estudo da comorbidade entre DNC com ansiedade/pânico através da realização do confronto entre ratos com 21 dias de CCI ou procedimento *Sham* e a salamanta, uma serpente constritora. O símbolo – significa que não houve alteração do limiar de von Frey; ↑ aumentou ou ↓ diminuiu a alodinia mecânica ou medo nos animais.

Dias após a cirurgia	Tratamento	Medo/Ansiedade e Pânico	CCI
21 DIAS	Salina fisiológica sem Serpente	-	-
	Salina fisiológica Serpente	↑ medo	↑ (alodinia mecânica)
	NMDA	↑ medo	↑ (alodinia mecânica)
	LY235959	↓ medo	↓ (alodinia mecânica)
	AEA	↓ medo	↓ (alodinia mecânica)
	AM251	↑ medo	↑ (alodinia mecânica)

Discussão

5 DISCUSSÃO

A proposta da primeira parte do trabalho foi avaliar a sensibilidade ao estímulo mecânico e térmico causado pela modificação do modelo de mononeuropatia periférica proposta por Bennett e Xie (1988). O modelo adaptado consiste na realização uma única ligadura do nervo isquiático (CCI), ao invés de quatro ligaduras, como previamente proposto. Também avaliamos o comportamento locomotor causado pela modificação do modelo da CCI através do teste de caminhada pelo teste da plataforma de deambulação, comparando com o método de CCI clássico e o procedimento *Sham*. Além disso, investigamos as alterações emocionais e cognitivas ocasionadas pela DNC, através do teste relacionado à atenção e memória (teste de reconhecimento de objeto), do teste relacionado à ansiedade (teste do campo aberto/*open-field*) e do teste relacionado à depressão (teste de nado forçado).

A utilização do modelo adaptado de Bennet e Xie foi um grande avanço metodológico para o estudo da DC, pois os animais não apresentaram prejuízos motores, e tampouco o comportamento de autotomia, quando comparado com o modelo clássico proposto por Bennett e Xie. Além disso, realizamos a avaliação do limiar nociceptivo, e os animais neuropáticos foram responsivos ao teste de alodinia mecânica e de sensibilidade ao frio.

Com o uso do teste de *von Frey*, foi possível avaliar e quantificar a força necessária para evocar o comportamento de retirada da pata ipsi (pata direita) e contralateralmente (pata esquerda), em relação ao lado da CCI (membro posterior direito), podendo, assim, avaliar o limiar de alodinia mecânica. A escolha do teste de *von Frey*, como teste para ser aplicado para avaliação da neuropatia também está de acordo com a literatura pertinente. Chaplan e colaboradores (1994) descreveram que, apesar de vários outros existentes, o teste de *von Frey* continua a ser o único teste mecânico que pode ser utilizado em todos os roedores e que é

derivado a partir de um procedimento clínico para avaliar a alodinia em pacientes com neuropatia.

Quanto ao teste de acetona, ele é utilizado para investigar a alodinia ao frio, sinal característico na DN e que fora descrito por Flatters e Bennett (2004). Este modelo se utiliza da propriedade volátil da acetona para induzir a sensação de frio (10° C). De fato, estudos que empregam modelos animais, especialmente aqueles que simulam certas condições clínicas dolorosas, melhoraram acentuadamente nosso conhecimento sobre a neurofisiopatologia da DC. Os modelos animais devem reproduzir condições de dor específicas, embora possa haver um mecanismo subjacente comum de sensibilização nas diferentes condições de DC. A DN, uma forma de DC de difícil tratamento, tem como principais sintomas sensoriais a alodinia e hiperalgesia (Bennett, 1999; Chapman, 1990; Zimmernann, 2001).

A realização de uma simples ligadura do nervo isquiático foi realizada previamente por Dias e colaboradores (2013). Contudo, a ligadura ao redor do nervo foi realizada com fio 100% algodão e a alodinia mecânica foi avaliada no máximo 14 dias após o procedimento cirúrgico, diferente do que propusemos a fazer. De fato, no modelo original de Bennett e Xie, como também no presente trabalho, foi utilizado catgut crômico que é uma sutura absorvível, feita por torção de fios de colágeno purificado, retirados dos intestinos de bovinos.

Adicionalmente, no estudo atual, as respostas comportamentais à dor foram monitoradas por um período mais longo (até 28 dias após a cirurgia de CCI ou *Sham*), e a alodinia mecânica foi medida por monofilamentos de *von Frey* (Chaplan e cols., 1994) e pelo teste de acetona (Flatters e Bennett, 2004), para o estudo das respostas ao estímulo mecânico e térmico (frio), respectivamente. Nossos dados demonstraram que uma única ligadura em torno do nervo isquiático com catgut crômico foi suficiente para induzir uma mononeuropatia periférica associada à alodinia mecânica e hipersensibilidade ao frio.

Certamente, os modelos de ligadura do nervo periférico são ferramentas úteis que mimetizam os sintomas clínicos de DN caracterizada em seres humanos por dor espontânea e alodinia (Latremoliere e Woof, 2009). Por conseguinte, animais que foram submetidos à lesão do nervo periférico apresentaram limiares mecânicos reduzidos e respostas exageradas a estímulos nocivos (hiperalgesia) (Wu e cols., 2005; Zhuo, 2008; Pallazo e cols., 2015; D'Aniello, e cols., 2017). Da mesma forma, a adaptação do modelo CCI clássico cunhado por Bennett e Xie pode ser utilizada como modelo de DN, uma vez que não somente o limiar reduzido de resposta de alodinia a estímulos mecânicos foi identificado, mas também, o aumento da resposta comportamental a um estímulo químico que induz sensações de frio, o que se evidenciou no teste de acetona (Flatters e Bennett, 2004; Allchorne e cols., 2005).

No que diz respeito à função motora avaliada na plataforma de deambulação, o comprimento do passo e os ângulos do tornozelo durante o contato inicial e final foram alterados pela CCI 1 e 4 ligaduras em relação ao grupo submetido ao procedimento *Sham*. O ângulo de flexão-extensão do tornozelo durante o contato final diminuiu em ratos submetidos a ambos os modelos de CCI. A lesão do nervo periférico faz com que os músculos afetados não consigam manter o tornozelo estável. Assim, os aumentos nas médias de comprimento de passo compensam esse possível *déficit*, de modo que o tempo e a velocidade para percorrer a plataforma permaneceram os mesmos ao longo do período experimental.

As quatro ligaduras do nervo isquiático, como proposto por Bennett e Xie (1988), causaram deficiências motoras mais graves quando comparadas com ratos com CCI induzida por uma única ligadura do nervo isquiático e com aqueles submetidos ao procedimento *Sham*. As mudanças de comportamento motor encontradas nos grupos de ratos CCI podem representar uma compensação para realizar movimentos para passar pela plataforma (Irintchev e cols., 2005, Kruspe e cols., 2014). Vale ressaltar que sete dias após o procedimento CCI, os ratos com CCI mostraram diferenças de marcha maiores quando

comparados ao grupo *Sham*. Talvez essas mudanças de marcha sejam devidas à fase inflamatória da DN e não a um *déficit* motor real.

Em relação aos aspectos emocionais e cognitivos relacionados à DN analisados no presente trabalho, mostramos que os dois grupos de animais que passaram pela cirurgia de CCI (com 1 e 4 ligaduras) apresentaram comportamento do tipo ansioso, depressivo e *déficits* cognitivos após 21 dias da neuropatia. Nossos resultados mostraram que ambas as técnicas de CCI diminuíram a exploração (cruzamento e levantamento) e aumentaram o estado de alerta no teste de campo aberto (*open field*) em comparação com os ratos *Sham*. Os ratos com CCI não exploraram a área central da arena; no entanto, o grupo *Sham* ficou mais tempo na área central. Com sabemos, a evitação do animal em explorar a área central da arena é um indicativo de ansiedade em roedores (Pruet e Belzung, 2002). A ansiedade está fortemente associada à DC, e corroborando esses dados, há relatos na literatura que evidenciam que a DN é uma expressão do transtorno de estresse pós-traumático crônico (Otis e cols., 2003; Grande e cols., 2004).

Estes dados corroboram os resultados clínicos, que mostram que os pacientes que sofrem de DC relatam frequentemente sintomas debilitantes, como distúrbios profundos das relações familiares e sociais, interrupção do sono, diminuição do apetite, disfunções metabólicas, endócrinas e sexuais, capacidade reduzida de concentração, perda de interesse em eventos externos e, menos frequentemente, depressão de moderada a grave (Procacci e col., 1979; Reuler e cols., 1980; Tumer e Romano, 1990; Meyer-Rosberg e cols., 2001; Bushnell e cols., 2013).

Nessa primeira parte do trabalho, também mostramos que a CCI induzida por uma ou por quatro ligaduras do nervo isquiático aumentou o tempo de imobilidade no teste de nado forçado, sugerindo um comportamento semelhante ao causado pela depressão (Lucki, 1997; Porsolt e cols., 2001, Bogdanova e cols., 2013). Além do desenvolvimento de comorbidades

psiquiátricas, como depressão e ansiedade, a NP também está associada a deficiências cognitivas (Kreitler, 2007; Elliot, 1999, Guida e cols., 2015). Animais com DNC apresentaram, efetivamente, deficiência no teste de reconhecimento de objetos, visto que a CCI induzida por uma ou por quatro ligaduras de nervo espinal causou prejuízos no reconhecimento de novos objetos no presente estudo, o que é corroborado por um estudo anterior (Low e cols., 2012).

Em resumo, a primeira parte de nosso estudo mostrou que a adaptação do modelo utilizando uma ligadura no nervo isquiático, por meio da constrição crônica, foi capaz de induzir neuropatia sem comprometimento significativo do desempenho motor e sem autotomia. É importante enfatizar que, no modelo clássico de CCI, o animal geralmente pode exibir autotomia, isso foi evidente no presente estudo 9,75% dos ratos com CCI submetidos a quatro ligaduras do nervo isquiático. Além de ser operacionalmente mais simples de se fazer, o modelo de uma ligadura desse nervo espinal também foi suficiente para produzir deficiências afetivas e cognitivas. Finalmente, o modelo de CCI adaptado mostrou-se ser um modelo animal interessante para estudar doenças crônicas e suas comorbidades.

Sabendo-se que a DN causada pela lesão do nervo manifesta-se através de alterações neurais em nível periférico, espinal e cortical (Xu e cols., 2012), é possível que a lesão provocada pela CCI em nível periférico certamente tenha provocado à liberação de mediadores inflamatórios, levando, assim, ao desenvolvimento do sintoma de alodinia, como foi evidenciado nos nossos experimentos.

De fato, Kidd e Urban (2001) já descreveram que o estímulo nocivo tecidual resulta na liberação de mediadores inflamatórios e que esses mediadores provocam respostas nociceptivas e sensibilização dos receptores, contribuindo, assim, para o desenvolvimento de sintomas como a hiperalgesia e alodinia, sendo que tal efeito pode ser atenuado quando administrada uma droga anti-inflamatória. Vargaftig e Ferreira (1981) mostraram o

envolvimento da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) após a indução da DN por meio da administração por via periférica do anti-inflamatório não esteroide indometacina.

Resultados semelhantes foram encontrados em nossos experimentos, uma vez que animais que apresentavam a neuropatia tiveram um aumento do limiar de alodinia mecânica mediante a administração por via periférica de indometacina (2mg/kg) após 1, 2 e 4 dias da CCI. Diante disso, o uso de drogas anti-inflamatórias consiste em uma ferramenta interessante para estudar seus efeitos na DN e, em nosso presente modelo de ligadura única do nervo isquiático de ratos, parece que a COX é uma importante enzima que estaria envolvida na gênese, mas não na manutenção da DN, uma vez que o pré-tratamento com indometacina de animais com DN não atenuou a alodinia mecânica após 7 até 28 dias da cirurgia de CCI.

A indometacina é um AINE sintético introduzido no início da década de 1960 (Guyer, 1964) e fora inicialmente utilizado para o tratamento da dor e inflamação em doenças reumatológicas. Suas propriedades antipiréticas, analgésicas e anti-inflamatórias (Rainsford, 2007; Steinmeyer e cols., 2000;) foram atribuídas à liberação de prostaglandinas e à inibição da sua biossíntese nos anos 70 (Ferreira e cols., 1971, Flower e Vane, 1974).

Contudo, a DC é um evento complexo, pois, além de mecanismos periféricos, mecanismos centrais também estão envolvidos. Segundo Quintero (2013), a dor é um fenômeno composto não somente de aspectos sensório-discriminativo, mas também de componentes emocionais, cognitivos, motivacionais e afetivos, e existe uma extensa rede cortical associada com o seu processamento. Esta rede inclui o córtex cingulado anterior (Cg1), o córtex insular, o córtex orbital ventrolateral, o córtex somatossensorial, córtex occipital, o córtex retrosplenial, córtex motor e o córtex pré-frontal (CPF).

Os presentes resultados referentes ao estudo neurofisiológico mostraram que a microinjeção de cloreto de cobalto (CoCl_2) no CPFM inativou as redes neurais de sua região pré-límbica (PrL), e que a inativação desta área foi capaz de atenuar a alodinia

mecânica/aumento do limiar de alodinia mecânica em estágios mais crônicos ou tardios da neuropatia, ou seja, após 21 e 28 dias da CCI com uma ligadura do nervo isquiático. De fato, a divisão PrL do CPFM parece ser recrutado na potencialização e manutenção e não na gênese da DN. O uso do CoCl_2 como um bloqueador não seletivo de sinapses já foi estabelecido por alguns autores. Seu mecanismo de ação dá-se através do bloqueio do influxo de Ca^{++} nos terminais pré-sinápticos, o que resulta no bloqueio da sinapse devido à inibição da liberação de neurotransmissores de neurônios eferentes (Hagiwara e Byerly, 1981; Kretz, 1984).

Trabalhos do nosso grupo já demonstraram que a divisão PrL do CPFM está envolvida na elaboração do aumento do limiar nociceptivo (aferido através do teste de retirada de cauda) induzido por respostas comportamentais defensivas de fuga elaborada em animais (de Freitas e cols., 2013, 2014). Há evidências de que o CPFM possa estar ligado a processos cognitivos associados à DC e que mudanças morfológicas nessa área cortical possam promover o declínio cognitivo e a depressão durante a DC (Bogdanov e cols., 2015; Guida e cols., 2015; Jahn e cols., 2016).

Tais alterações foram demonstradas por Metz e colaboradores (2009) através de técnicas *patch-clamp* e análise morfológica de neurônios piramidais do CPFM de animais com neuropatia. Neurônios de animais com DN apresentavam um aumento da complexidade e densidade de espinhos dendríticos quando comparados com os de animais *Sham*. A reorganização neuronal associada à dor já é esperada em modelos animais de DC, e mudanças funcionais têm sido descritas em associação com córtex somatossensorial primário, bem com o Cg1 na *up-regulation* de subunidades de receptores NMDA após inflamação periférica (Wu e cols., 2005). Embora a participação CPFM na dor neurogênica precise ser mais bem investigada, já existem relatos na literatura de que a região é responsável pela elaboração do efeito analgésico, induzido pela administração de D-cycloserina, um agonista

parcial de receptor NMDA, no modelo de DN e que a área seria responsável pela percepção da dor (Millecamps e cols., 2007).

Nossos dados mostraram que o bloqueio da região PrL do CPFM foi capaz de produzir analgesia, através do aumento do limiar de alodinia mecânica, ou seja, essa área do neocórtex, quando ativada, seria responsável pela potencialização e manutenção da dor durante a neuropatia. Contudo, a reorganização morfológica induzida pela neuropatia, conforme foi mencionado acima, levaria a uma reorganização de circuitos intracorticais e extracorticais e, talvez devido a isso, registram-se alguns resultados contraditórios (Metz e cols, 2009). Em adição, o CoCl_2 administrado na divisão PrL do CPFM foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata tanto quando administrado no neocórtex ipsilateralmente à CCI, como quando administrado contralateralmente à ligadura do nervo isquiático para indução da neuropatia dolorosa 21 e 28 dias após a CCI. Esse interessante resultado evidencia que realmente há uma participação crucial da região PrL do CPFM na DN, e que ambos os hemisférios cerebrais são recrutados para potencializar e manter a DNC, possivelmente através de um rearranjo morfológico e induzido por plasticidade neuronal.

Metz e colaboradores (2009) sugeriram que o aumento do número de espinhos dendríticos e de receptores NMDA provocados pela neuropatia levaria a um aumento da excitabilidade local e a uma excitotoxicidade glutamatérgica, com morte neuronal. Além disso, o sistema anterolateral espinotalâmico é um componente clássico da via ascendente da dor, processando também impulsos neurais relacionados à temperatura e às sensações de tato protopático. Através dessas projeções ascendentes, os impulsos originados nos nociceptores localizados no tronco e nos membros do lado oposto ao trato espinotalâmico atingem o córtex sensorial. Além das conexões entre a periferia e o sistema nervoso central, existem fibras comissurais que fazem a união entre as áreas simétricas dos dois hemisférios cerebrais (Munger, 1982).

Os mecanismos subjacentes às alterações moleculares, celulares e funcionais são observados em muitos locais denominados de *matrix* da dor após lesão do nervo periférico. De fato, há um aumento substancial da atividade ectópica espontânea nos corpos celulares do gânglio da raiz dorsal do nervo espinal (DRG) e fibras axônicas sensoriais aferentes lesadas (Wall e Gutnick, 1974), contatos anormais entre sistemas nervosos simpáticos e sensoriais (McLachlan e cols 1993), e alterações nos substratos neuronais da medula espinal e do encéfalo. Em nível periférico, as lesões nervosas levam à sensibilização e podem evocar a atividade neural anormal em longo prazo (LTP), ao longo das vias aferentes primárias (Basbaum e cols 2003; Zhuo e cols 2013). Em nível da medula espinal, os neurônios do corno dorsal exibem respostas excitatórias potenciadas e diminuição no limiar de disparo nas condições NP (Sandkuhler e Liu, 1998; Ikeda e cols, 2006; Sandkuhler, 2007).

Além das alterações periféricas, muito se tem falado do papel do córtex cerebral durante a DC. Estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que uma hora após uma lesão medular já é possível observar modificações na função cortical e que esta diferente reorganização do córtex cerebral pode levar a consequências patológicas, tais como dor fantasma e DN (Nardone e cols.; 2013). Assim também, estudos de neuroimagem demonstraram que pacientes com DN apresentavam modificações em áreas relacionadas à percepção sensorial e afetiva da dor, tais como o tálamo, o CPF, o complexo amigdalóide, a *insula*, e o lóbulo parietal posterior (Geha e cols.; 2008; Gustin e cols.; 2010).

Os nossos resultados demonstraram o envolvimento do córtex PrL na DNC, assim como a neuroquímica subjacente a esse processo doloroso. De fato, a ativação do sistema glutamatérgico através do pré-tratamento do córtex PrL com o agonista NMDA nas doses de 1 e 4 nmol foi capaz de diminuir o limiar de alodinia mecânica avaliada pelo teste de *von Frey*. O bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica do PrL com LY 235959, um antagonista de receptores NMDA, na maior dose estudada (8nmol), causou analgesia,

aumentando o limiar de retirada da pata em animais com a neuropatia periférica 21 dias após a CCI.

Nossos dados corroboram os de Latremoliere e Woolf (2009), que mostraram que tanto o NMDA como outros subtipos de receptores glutamatérgicos estão envolvidos na indução e manutenção da dor persistente, causando a sensibilização da via nociceptiva durante a dor inflamatória e neuropática. Além disso, Wang e colaboradores (2015) evidenciaram que a lesão bilateral e contralateral da região PrL do CPFM foi capaz de aumentar o limiar de retirada da pata em animais com lesão do tipo inflamatória crônica, induzida pelo completo adjuvante de Freund (CFA). A neurotransmissão glutamatérgica parece estar realmente envolvida na nocicepção, mediando a DC, uma vez que dados clínicos mostraram que o antagonista do receptor NMDA pode reduzir tanto a hiperalgesia quanto a alodinia em pacientes com DN (Kristensen e cols., 1992; Eide e cols., 1994; 1995; Felsby e cols., 1996).

Esses dados podem ser explicados por resultados prévios de Wu e colaboradores (2005), que sugerem que a reorganização neuronal associada à dor já é esperada em modelos animais de DC, e mudanças funcionais têm sido descritas em associação com córtex somatossensorial primário, bem como com o córtex da parte anterior do Cg1 na *up-regulation* de subunidades de receptores NMDA após inflamação periférica (Wu e cols., 2005).

Não obstante, a participação do CPFM durante a DC ainda pode parecer paradoxal, uma vez que dados da literatura apontam para o fato de que a microinjeção de antagonista NMDA e do antagonista mGluRS nos córtices PrL e infralímbico aumentaram a alodinia mecânica (Giordano e cols., 2012). Palazzo e colaboradores (2015) também mostraram que a microinjeção de um modulador alostérico de receptores metabotrópicos no córtex límbico reverte a DN, como também as deficiências cognitivas provocadas pelas mesmas. Muito embora esses resultados se contraponham aos dados obtidos no presente trabalho, é importante mencionar que ambos os autores abordaram o córtex “pré-frontal” medial

indiscriminadamente e não apenas a divisão do córtex PrL, como fizemos no presente estudo. Além disso, os modelos utilizados para a indução de DN são diferentes em tais abordagens experimentais. Isso reforça a importância do nosso trabalho para a investigação da participação glutamatérgica da região PrL no nosso modelo de CCI, adaptado de Bennett e Xie (1988).

Adicionalmente, ainda mostramos a participação do sistema endocanabinoide da região PrL do CPFM sobre a DNC. Duas concentrações intermediárias de anandamida (AEA a 50 e a 100pmol) causaram analgesia, atenuando a alodinia mecânica dos animais, sendo que a AEA na menor concentração (5pmol) não alterou a DNC dos roedores. A maior concentração de AEA (200pmol) apresentou efeito contrário àquele causado pelas doses intermediárias, pois aumentou a alodinia mecânica induzida pela CCI, potencializando assim, a DNC nos roedores. Além disso, o bloqueio de receptores endocanabinoides do tipo CB₁ no córtex PrL, através da microinjeção local de AM251 (50, 100 e 200pmol), causou aumento da alodinia mecânica, através da diminuição do limiar de alodinia mecânica dos animais.

De fato, o sistema endocanabinoide está bem elucidado como um sistema envolvido em antinocicepção, e este fenômeno pode ser provavelmente mediado pelos receptores do tipo CB₁ (Elphick e cols., 2001). Este subtipo de receptor endocanabinoide pode estar presentes em neurônios glutamatérgicos e GABAérgico, e sua ativação recruta a via neuroquímica relacionada à proteína Gi, inibindo a adenilato-ciclase e canais de Ca⁺², o que reduz a excitabilidade neuronal e, por consequência, a liberação de neurotransmissores, como o GABA e o glutamato (Mackie & Hille, 1992; Felder e cols., 1993; Mackie e cols., 1993; Felder e cols., 1995; Mackie e cols., 1995).

O receptor endocanabinoide do tipo CB₁ é altamente expresso em algumas áreas do sistema nervoso central, e a porção ventral do CPFM é especialmente rica neste tipo de receptor canabinoide (Herkenham e cols., 1991; Tsou e cols., 1998). Não obstante, além da

ação em receptores CB₁, o agonista AEA também pode ativar receptores endovaniloides do tipo TRPV₁ (*transient receptor potential vanilloid* tipo 1), que são ligados a um canal iônico permeável ao cálcio que, ao contrário do CB₁, pode facilitar a liberação de glutamato (Xing e Li, 2007). Isto pode explicar porque a microinjeção de AEA em sua maior concentração (200pmol) apresentou um efeito oposto ao das doses menores, causando aumento da alodinia mecânica. O papel duplo da AEA também foi observado em trabalhos, nos quais sua administração na medula espinal reduz a DN, via ativação de receptor CB₁ ou TRPV₁, dependendo da concentração administrada (Starowicz e cols., 2012; Starowicz e Przewlocka, 2012).

Um dos interesses do presente trabalho, além de elucidar o efeito antinociceptivo da AEA em animais com DNC, foi também evidenciar a possível ação desse agonista endocanabinoide em concentrações altas, visando uma possível ação sobre os canais endovaniloides do tipo TRPV₁. De fato, no presente trabalho, a AEA em sua menor dose (5pmol) não alterou os valores de alodinia mecânica em animais com DNC, mas na concentração intermediária (50 e 100pmol) causou analgesia em animais com DNC.

Corroborando com a literatura, a maior concentração de AEA (200pmol) foi capaz de ativar os canais TRPV₁. Isso foi confirmado quando mostramos que o bloqueio prévio no PrL dos canais TRPV₁ com a microinjeção de 6 Iodo-capsaisina (9pmol), um antagonista seletivo desse canal iônico, seguida da microinjeção, na mesma estrutura, de AEA na dose hiperalgésica (200pmol), diminuiu a alodinia mecânica, ou seja, apresentou o mesmo efeito analgésico das doses intermediárias. Também foi possível confirmar que o efeito da AEA na maior dose analgésica (100pmol) era devido apenas à ativação de receptores CB₁. Tal resposta foi obtida bloqueando estes mesmos receptores com a microinjeção prévia do antagonista AM251 (200pmol) no PrL, seguida da administração de AEA (100pmol) no mesmo sítio, o que foi seguido por uma diminuição significativa da alodinia mecânica.

Sendo assim, com a microinjeção de AEA em doses crescentes (5, 50, 100 e 200pmol), conseguimos observar o clássico gráfico em “U invertido”. Essa característica de resultados produzida pela administração de concentrações crescentes de AEA já foi evidenciada em trabalhos anteriores (Fogaça e cols., 2012; Lisboa e cols., 2012; Batista e cols., 2015). Além disso, mostrarmos a interação entre os sistemas endocanabinoide e endovaniloide através do bloqueio prévio dos canais TRPV₁, seguida pela AEA na divisão PrL do CPFM de ratos com DNC.

Não obstante, a fim de estudar a possível interação entre os sistemas glutamatérgico e endocanabinoide do córtex PrL de ratos com DC de origem neuropática, microinjetou-se o antagonista de receptores CB₁, o AM251 na dose de 200pmol no PrL, seguido da administração de NMDA na dose (1nmol) que, isoladamente, em apenas um momento dos tempos estudados, apresentou aumento da alodinia mecânica. Observamos que este bloqueio prévio de receptores do tipo CB₁, seguido do NMDA (1nmol) foi capaz de aumentar a alodinia mecânica em todos os tempos observados. Além disso, quando os animais neuropáticos eram previamente tratados com NMDA (1nmol) e, em seguida, a ativação do sistema endocanabinoide com AEA na dose de 100pmol (dose analgésica) foi realizada, os mesmos apresentaram redução da DNC, através do aumento do limiar de retirada da pata no teste de *von Frey*. Portanto, a possível ativação dos receptores CB₁ no córtex PrL, responsáveis pela produção de analgesia, prevaleceu e reverteu a hipernocicepção causada pelo NMDA no mesmo local do CPFM. Este efeito pode ser explicado devido à interação farmacológica entre os sistemas glutamatérgico e endocanabinoide, como já foi mencionado por vários autores.

Foi descrito que agonistas de receptores canabinoide são capazes de reduzir a amplitude de potencial pós-sináptico excitatório no hipocampo de camundongos, segundo Misner e Sullivan (1999). Tal efeito também foi observado no córtex pré-frontal de ratos (Auclair e cols.; 2000), bem como no núcleo lateral do complexo amigdalóide (Azad e cols.;

2003). Desta forma, nossos resultados reforçam o envolvimento de áreas corticais na elaboração e modulação da dor crônica do tipo neuropática. Além disso, evidenciamos que a neurotransmissão glutamatérgica, via receptores do tipo NMDA, da região PrL do CPFM é responsável pela potencialização e manutenção da dor crônica, e o sistema endocanabinoide está envolvido na modulação da DNC em animais, 21 dias após a CCI.

Adicionalmente, investigamos a comorbidade entre dor crônica e ansiedade/pânico e o possível envolvimento de áreas corticais nestas fisiopatologias, em modelo animal. Os roedores com DNC e aqueles submetidos ao procedimento *Sham* foram confrontados com uma serpente constritora, a salamanta, e os comportamentos defensivos evocados pelos roedores durante o confronto com o predador, foram avaliados, assim como os limiares de alodinia mecânica após o confronto.

O modelo animal de confronto entre presa e predador, proposto por Blanchard e colaboradores (2003), e o modelo de confronto entre roedores e serpentes proposto por Coimbra e colaboradores (2017a, b) consiste na elaboração de reações defensivas devido à natureza do encontro entre as duas espécies e o risco iminente de morte para a presa, a qual entra em pânico. Sendo assim, o comportamento defensivo intimamente relacionado a cenários ameaçadores são consistentemente evocados pela presa (Coimbra e cols., 2017a), alguns deles estudados no presente trabalho. Os comportamentos defensivos avaliados foram de avaliação de risco, relacionado a ansiedade, imobilidade defensiva e fuga, estes relacionados a ataques de pânico.

Como esperado, evidenciamos o efeito aversivo do confronto entre presa e predador, eliciando comportamentos defensivos de animais com DNC crônica que foram confrontados com a serpente constritora, quando comparados com os grupos submetidos ao procedimento *Sham*. Os comportamentos defensivos apresentados pelos animais expostos ao predador, como a avaliação de risco, que é uma resposta a situações de perigo potencial em que um

estímulo aversivo está a uma certa distância ou a sua fonte não foi ainda identificada (Blanchard e cols., 2003; Motta e cols., 2009). No entanto, respostas, como fuga e imobilidade defensiva (congelamento), são exibidas em circunstâncias em que o estímulo aversivo não é só presente, mas encontra-se dentro de uma distância proximal e representa uma clara ameaça para a sobrevivência da presa (Blanchard e cols., 2003; Guimarães-Costa e cols., 2007). A fuga também pode ser orientada, e tem sido associada com cenários aversivos que contêm uma rota disponível de escape e que forneça um modo seguro de se livrar da situação ameaçadora (Coimbra e cols., 2017b). Em alguns de nossos animais analisados, eles apresentavam um comportamento de direcionamento durante a fuga. Isso foi evidenciado em nossos dados, uma vez que os animais confrontados apresentaram um aumento do comportamento de fuga orientada para toca e para a plataforma de escape. O galgar da escada que dava acesso à plataforma elevada, também foi relacionado a um ambiente mais seguro diante da ameaça. Sendo assim, decidimos analisar os resultados em forma de índice e porcentagem de comportamento dos animais quando estes estavam fora da toca ou da proteção da escada.

O confronto entre o roedor e a serpente, modelo experimental desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, de fato é uma ferramenta de análise etológica importante para o estudo da ansiedade e de ataques de pânico, como já demonstrado previamente (Uribe-Mariño e cols., 2012; Twardowschy e cols., 2013, Coimbra e cols., 2017a, b). Para estudarmos a possível relação entre DNC e ansiedade/pânico antes e após o confronto, os animais submetidos à CCI e ao procedimento *Sham* tiveram seus limiares de alodinia mecânica avaliados. Os animais do grupo *Sham* após o confronto tiveram seus limiares de sensibilidade aos estímulos mecânicos alterados, sugerindo tolerância ao estímulo mecânico. Tal efeito similar a antinocicepção era esperado, uma vez que as reações defensivas desencadeiam o processo da antinocicepção induzida pelo medo (Freitas e cols., 2009, Coimbra e cols., 2006, 2017a); considerando que os

animais com DNC (21 dias após a CCI) estão em estado de estresse crônico, evidenciamos, no presente trabalho, diminuição do limiar de *von Frey* imediatamente após o confronto com a serpente. Portanto, podemos propor que, de fato, a comorbidade entre DC e ansiedade/pânico no presente modelo animal proposto altera a percepção sensorial, causando alodinia mais acentuada.

De Freitas e colaboradores (2013, 2014) também demonstraram que a divisão PrL do CPFM está envolvida na elaboração do aumento do limiar nociceptivo (aferido através do teste de retirada de cauda) induzido por respostas comportamentais defensivas de fuga elaborada em animais. Está bastante claro na literatura que as situações de perigo iminente ou proximal, tais como a presença de um predador, levam o sistema encefálico de aversão ativar estruturas que compõem o sistema endógeno de inibição da dor, permitindo, assim, que o organismo apresente as respostas defensivas sem afetar seu desempenho, devido a um processo doloroso (Fields e cols., 1977; Basbaum e Fields, 1984; de Oliveira e cols., 2017; da Silva Soares e cols., 2017).

Contudo, interessante, nossos dados também mostraram que animais com DC de origem neuropática, após o confronto com a serpente, tiveram seus limiares de alodinia mecânica diminuídos, ou seja, após o confronto, apresentaram hiperalgesia, ao invés de antinocicepção. Esses resultados podem ser explicados por Hasnei e colaboradores (2007); segundo os autores, nos modelos animais para o estudo da DN, o grau de hipersensibilidade mecânica está relacionado à ansiedade e a ansiedade crônica causa hipernocicepção.

Em harmonia com nossos resultados, Roeska e colaboradores (2009) mostraram que animais com DN induzida pela lesão do nervo isquiático apresentaram diminuição do tempo nos braços abertos no teste do labirinto e cruz elevado, bem como redução do limiar de retirada da pata, evidenciando, assim, aumento nas respostas comportamentais relacionadas à ansiedade e ao pânico. Além disso, Narita e colaboradores (2006) mostraram que a dor

persistente causa efeito ansiogênico em animais com DC. Em adição, estudos mostraram que a DN induzida pela ligação do nervo isquiático produziu um comportamento do tipo depressivo e ansioso em animais (Kontine e cols., 1999).

Além de estudarmos as comorbidades entre DC e ansiedade/pânico, outro objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do sistema glutamatérgico da divisão PrL do CPFM, avaliando, assim, o comportamento defensivo durante situações ameaçadoras, e a alteração na alodinia mecânica após o confronto dos animais com DNC e pré-tratados com o agonista ou com um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA.

Neste estudo, o pré-tratamento com NMDA na divisão PrL do CPFM, na maior dose (4nmol), foi capaz de aumentar o índice e a duração de avaliação de risco e a duração do comportamento de fuga. A dose intermediária de NMDA (1nmol) foi capaz de aumentar o índice de fuga em animais neuropáticos confrontados com uma serpente constritora. Quanto ao teste de *von Frey*, o animal com DNC tratado com veículo no PrL teve diminuição do limiar de alodinia mecânica após o confronto, e essa resposta foi intensificada em animais que foram tratados com a maior dose de NMDA (4nmol) no PrL.

Quanto ao efeito do pré-tratamento do PrL com LY235959, um antagonista de receptor do tipo NMDA, de maneira geral, o LY diminuiu os comportamentos defensivos analisados em animais com DNC quando confrontados com a salamanta. Além disso, esses animais pré-tratados com o antagonista de receptores NMDA tiveram seus limiares de resposta ao teste de *von Frey* aumentados após o confronto. Sendo assim, podemos postular que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no córtex PrL diminuiu a resposta de medo relacionada à ansiedade e ao pânico, e também, os limiares de alodinia mecânica, caracterizando um efeito analgésico.

De fato, o sistema glutamatérgico está envolvido na manutenção da DC em animais com neuropatia, assim como na expressão de comportamentos defensivos relacionados à

ansiedade e ao pânico. Esses resultados podem ser explicados por Campos e colaboradores (2013) que verificaram que o tratamento do CPFM com antagonista glutamatérgico é capaz de provocar mudanças comportamentais do tipo ansiolíticas em roedores. De fato, os receptores NMDA parecem estar mais envolvidos na elaboração de diversas respostas fisiológicas do que os receptores AMPA/cainato. Um estudo com ligantes marcados revelou que o CPFM apresenta grande quantidade de receptores ionotrópicos glutamatérgicos; dentre eles, o receptor NMDA (Nicolle e Baxter, 2003).

De Freitas e colaboradores (2014) mostraram que os receptores NMDA do CPFM estão crucialmente envolvidos na organização dos comportamentos de medo inato e pânico induzidos pelo bloqueio GABAérgico no hipotálamo medial, visto que o bloqueio do receptor NMDA diminuiu as respostas comportamentais de medo. Além disso, há evidências de que a taquicardia induzida por interações sociais, a taquipneia, e o aumento dos níveis de ansiedade evocados por inibição crônica da síntese de GABA e, consequentemente, o aumento da ativação glutamatérgica no hipotálamo medial, são modulados ou revertidos pela injeção intra-hipotalâmica do antagonista de receptores NMDA (Johnson e cols., 2006). Contudo, de Freitas e colaboradores (2014) sugeriram que, tanto os receptores NMDA, quanto os receptores AMPA/cainato do CPFM, parecem estar envolvidos na elaboração da antinocicepção que segue os comportamentos defensivos durante a fuga elaborada.

A parte final de nosso trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento do sistema endocanabinoide do córtex PrL sobre os comportamentos defensivos e alodinia mecânica de animais com DNC confrontados com uma serpente constritora, a salamanta. O bloqueio de receptores endocanabionoides do tipo CB₁, através da microinjeção intra-PrL do antagonista AM251, aumentou o comportamento de avaliação de riscos dos animais com DN crônica durante a exposição com a serpente. Em adição, os animais tratados com AM251 também tiveram seus limiares de *von Frey* diminuídos após o confronto.

O AEA, um agonista endocanabinoide, microinjetado na sua dose intermediária (100pmol) no córtex PrL, diminuiu os comportamentos defensivos de avaliação de risco, imobilidade defensiva e de fuga dos animais com DN crônica confrontados com a serpente. Os animais que receberam AEA (100pmol) no PrL tiveram aumento do limiar de von Frey após o confronto. Portanto, o AEA na dose intermediária, diminui comportamentos relacionados à ansiedade e pânico; contudo, causa um efeito analgésico. Se animais com DN crônica têm aumento das respostas defensivas, espera-se que nestes animais a DNC também diminua. Não obstante, a maior dose de AEA (200pmol), muito embora não alterasse o comportamento defensivo, agravou a DNC, através da diminuição do limiar de *von Frey*. Além disso, podemos relatar um clássico efeito em “U invertido”, porque a menor e a maior dose de AEA (50 e 200pmol) tiveram valores de comportamentos defensivo elevados, semelhante ao seu controle (veículo).

Esses dados do AEA no córtex PrL na investigação da comorbidade DNC com ansiedade/pânico, corroboram os dados apresentados inicialmente neste trabalho, quando registrado apenas o limiar de *von Frey* em animais. Relembrando, a dose intermediária de AEA (100pmol) também produziu efeito analgésico, e esse efeito foi dependente da ativação do receptor endocanabinoide CB₁. O AEA, na sua maior dose (200pmol), agravou a DNC, pois o limiar de alodinia mecânica diminuiu após o tratamento no córtex PrL com AEA nessa dose mais elevada. Este efeito foi dependente da ativação dos canais TRPV₁, via ativação do sistema endocanabinoide. Sendo assim, podemos postular que, na investigação da comorbidade entre DNC e ansiedade e pânico, o sistema endocanabinoide pode ser recrutado sob demanda.

Em resumo, mostramos um avanço no modelo de indução da DN proposta por Bennet e Xi (1988), uma vez que realizamos a constrição crônica com uma ligadura do nervo isquiático (CCI) de ratos, ao invés de quatro ligaduras desse mesmo nervo, como

anteriormente proposto, tendo sido obtidos resultados satisfatórios de DNC. Esta proposta de apenas uma ligadura fora eficaz em produzir a alodinia mecânica e hipersensibilidade ao frio, além de diminuir o sofrimento dos animais e não provocar *déficit* motor ou autotomia. Também mostramos que os mediadores inflamatórios COX-1 e COX-2 estão envolvidos na gênese, mas não na potencialização e manutenção da DN induzida pela CCI adaptada.

Evidenciamos que há crucial participação da divisão PrL do CPFM na potencialização e manutenção da DNC periférica induzida pela CCI em ratos. Assim, reforçamos o entendimento do envolvimento de áreas corticais na elaboração e modulação da DC do tipo neuropática. Também evidenciamos que a neurotransmissão glutamatérgica e o sistema endovaniloide, via receptor NMDA e canal iônico TRPV₁, respectivamente, da região PrL do CPFM, são responsáveis pela potencialização e manutenção da DNC, e o sistema endocanabinoide, via ativação do receptor CB₁, está envolvido na modulação da DNC em animais com 21 dias após a CCI.

Além disso, mostramos que há interação entre a neurotransmissão glutamatérgica com os sistemas endocanabinoide e endovaniloides na divisão PrL do CPFM na elaboração da DNC. A dose hiperalgésica de AEA (200pmol) é dependente da ativação do sistema endovaniloide via canais TRPV₁; a doses analgésicas do AEA (50 e 100pmol) são dependentes da ativação dos receptores endocanabinoides do tipo CB₁ no PrL. A DNC foi intensificada quando bloqueamos previamente os receptores CB₁ e tratamos os animais com uma dose pouco eficaz em causar a hiperalgesia do NMDA. Portanto, os receptores CB₁ parecerem modular a atuação da neurotransmissão glutamatérgica via receptores NMDA no córtex PrL na elaboração da DNC.

Finalmente, os roedores com DNC diminuíram seus limiares de alodinia mecânica após o confronto com a serpente e tiveram seus comportamentos defensivos intensificados, elucidando, assim, a acentuação da dor na comorbidade ansiedade/pânico e DNC. A

neurotransmissão glutamatérgica via receptores do tipo NMDA na divisão PrL do CPFM estão envolvidos na elaboração de comportamentos defensivos e da alodinia mecânica, visto a ativação deste sistema aumentou as respostas defensivas relacionadas à ansiedade e ao pânico durante um quadro clínico de DNC. Considerando o sistema endocanabinoide, mostramos que uma dose específica do AEA (100pmol) diminui as respostas defensivas associadas à ansiedade e pânico e também causa efeito analgésico em um modelo de neuropatia periférica induzida pela CCI em ratos Wistar com DNC.

Atualmente, nosso principal empenho, considerando a pesquisa básica nos estudos da dor, está na investigação e proposição do melhor entendimento dos mecanismos, pelos quais a dor se agrava e prejudica a vida cotidiana em diversos aspectos, tais como cognitivos, emocionais e comportamentais. De fato, no presente trabalho, evidenciamos a participação cortical nesse processo. Além disso, estamos propondo modelos animais eficazes para se estudar tanto a dor, em seus diversos aspectos já mencionados acima, e suas comorbidades como com a ansiedade e pânico. Diante do proposto, evidenciamos que a divisão PrL do CPFM possa ser um possível elo entre a cronificação da dor com a ativação de áreas que são responsáveis pela elaboração das emoções e dos transtornos psiquiátricos. Possivelmente, esse trabalho venha contribuir para o entendimento mais aprofundado de tipos de dor de difícil manejo, como a dor crônica de origem neuropática e suas comorbidades.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Parte I

- O modelo adaptado de CCI produziu hipersensibilidade ao frio e alodinia mecânica;
- O modelo adaptado de CCI não provoca prejuízos motores, nem tampouco o comportamento de autotomia;
- O CCI adaptado é um modelo animal eficaz para estudar as comorbidades entre DC e alterações cognitivas e emocionais;

Parte II

- A COX-1 e COX-2 participam da elaboração durante a gênese da DN;
- O córtex PrL está envolvido na manutenção e potencialização da DN;
- A ativação, no córtex PrL, dos receptores NMDA e vaniloides do tipo TRPV₁ potencializam a DNC; e a ativação do sistema endocanabinoide, no córtex PrL, via receptor CB₁ diminui a DNC;

Parte III

- A comorbidade entre ansiedade/pânico e DNC sensibiliza os animais, agravando o quadro de DC;
- Os comportamentos defensivos foram intensificados em animais com DNC, mostrando, assim, o estabelecimento da comorbidade entre DC e ansiedade/pânico e a participação do neocórtex na elaboração da DNC;
- Ativação dos receptores NMDA no córtex PrL aumenta o medo e a alodinia mecânica dos animais com DNC após o confronto com a serpente;
- A ativação do sistema endocanabinoide no córtex PrL diminui o medo e a alodinia mecânica dos animais com DNC confrontados com a serpente, através dos receptores CB₁.

Referências Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allchorne AJ, Broom DC, Woolf CJ. (2005). Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain* 14:1-36.

Alves ND, Santos TJT, Costa SBC, Costa AMBC, Feijó FMC, Costa CMC. (2010). Comportamentos espontâneos e induzidos em ratos com dor neuropática por constrição crônica do nervo isquiático. *Revista Dor* 11:55-62.

Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, Gitelman DR. (2004). Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. *J Neurosci* 24:10410-10415.

Asmundson GJ, Jacobson SJ, Allardings MD, Norton GR. (1996). Social phobia in disabled workers with chronic musculoskeletal pain. *Behav Res Ther* 34:939-943.

Attal N, Fermanian C, Fermanian J, Lanteri-Minet M, Alchaar H, Bouhassira D. (2008). Neuropathic pain: are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion? *Pain* 138:343-353.

Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F (2000). Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83:3287-3293.

Azad SC, Eder M, Marsicano G, Lutz B, Zieglgansberger W, Rammes G (2003). Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learn Mem* 10:116-128.

Azad SC, Marsicano G, Eberlein I, Putzke J, Zieglgansberger W, Spanagel R, Lutz B, (2001). Differential role of the nitric oxide pathway on delta (9)-THC induced central nervous system effects in the mouse. *Eur J Neurosci* 13:561e568.

Baliki MN, Chialvo DR, Geha PY, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, Apkarian AV. (2006). Chronic pain and the emotional brain: specific brain activity associated with spontaneous fluctuations of intensity of chronic back pain. *J Neurosci* 26:12165-12173.

Baliki MN, Geha PY, Apkarian AV, Chialvo DR. (2008). Beyond feeling: chronic pain hurts the brain, disrupting the default-mode network dynamics. *J Neurosci* 28:1398-1403.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.

Basbaum AI, Fields HL. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7:309-338.

Batista PA, Fogaça MV, Guimarães FS. (2015). The endocannabinoid, endovanilloid and nitrenergic systems could interact in the rat dorsolateral periaqueductal gray matter to control anxiety-like behaviors. *Behav Brain Res* 293:182-188.

Bennett GJ. (1999). New frontiers in mechanisms and therapy of painful peripheral neuropathies. *Acta Anaesthesiol Sin* 37:197-203.

Bennett JG, Xie YK. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.

Biagioni AF, de Oliveira RC, de Oliveira R, da Silva JA, dos Anjos-Garcia T, Roncon CM, Corrado AP, Zangrossi H Jr, Coimbra NC. (2016). 5-Hydroxytryptamine 1A receptors in the dorsomedial hypothalamus connected to dorsal raphe nucleus inputs modulate defensive behaviours and mediate innate fear-induced antinociception. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:532-545.

Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. (2001). Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 205-218.

Blanchard RJ, Griebel G, Henrie JA, Blanchard DC. (1997). Differentiation of anxiety and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. *Neurosci Biobehav Rev* 21:783-789.

Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ. (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* 58:155-166.

Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. (2003). Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: some reflections on stress and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:1177-1185.

Blanchard, R. e Blanchard DC. (1988). Etho experimental approaches to the biology of emotion. *Ann Rev Psychol* 39:43-68.

Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. (2013). Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav* 118:227-239.

Bogdanov VB, Viganò A, Noirhomme Q, Bogdanova OV, Guy N, Laureys S, Renshaw PF, Dallel R, Phillips C, Schoenen J. (2015). Cerebral responses and role of the prefrontal cortex in conditioned pain modulation: an fMRI study in healthy subjects. *Behav Brain Res* 281:187-98.

Jarvis MF, Boyce-Rustay JM. (2009). Neurophatic Pain: Models and Mechanisms. *Curr Pharm Des* 15:1711-1716.

Brandão ML. (2001). *Psicofisiologia. As Bases Fisiológicas do Comportamento*. Atheneu, São Paulo; pp. 152-169; 2001.

Brandão ML, Graeff FG. (2014). *Neurobiologia dos transtornos mentais*. São Paulo: Editora Atheneu.

Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10:287-333.

Bushnell MC, Ceko M, Low LA. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 14:502-511.

Caggiano V, Sur M, Bizzi E. (2014). Rostro-caudal inhibition of hindlimb movements in the spinal cord of mice. *PLoS ONE* 9:e100865.

Campos AC, Piorino EM, Ferreira FR, Guimarães FS. (2013). Increased nitric oxide-mediated neurotransmission in the medial prefrontal cortex is associated with the long lasting anxiogenic-like effect of predator exposure. *Behav Brain Res* 256:391-397.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.

Chapman CR. (1990). The psychophysiology of pain, In: J.J. Bonica (ed), *The Management of Pain*, 2nd Edn, Lea and Fibiger, Philadelphia, pp 461-477.

Coimbra NC, de Oliveira R, Freitas RL, Ribeiro SJ, Borelli KG, Pacagnella RC, Moreira JE, da Silva LA, Melo LL, Lunardi LO, Brandão ML. (2006). Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Exp Neurol* 197: 93-112.

Coimbra NC, Calvo F, Almada RC, Freitas RL, Paschoalin-Maurin T, Dos Anjos-Garcia T, Elias-Filho DH, Ubiali WA, Lobão-Soares B, Tracey I. (2017b). Opioid neurotransmission modulates defensive behavior and fear-induced antinociception in dangerous environments. *Neuroscience* 354:178-195.

Coimbra NC, Paschoalin-Maurin T, Bassi GS, Kanashiro A, Biagioni AF, Felippotti TT, Elias-Filho DH, Mendes-Gomes J, Cysne-Coimbra JP, Almada RC, Lobão-Soares B. (2017a). Critical neuropsychobiological analysis of panic attack- and anticipatory anxiety-like behaviors in rodents confronted with snakes in polygonal arenas and complex labyrinths: a comparison to the elevated plus- and T-maze behavioral tests. *Rev Bras Psiquiatr* 39:72-83.

D'Aniello A, Luongo L, Romano R, Iannotta M, Marabese I, Boccella S, Belardo C, de Novellis V, Arra C, Barbieri A, D'Aniello B, Scandurra A, Magliozzi L, Fisher G, Guida F, Maione S. (2017). d-Aspartic acid ameliorates painful and neuropsychiatric changes and reduces β -amyloid A β 1-42 peptide in a long lasting model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 651:151-158.

da Siva, JA et alii, Mecanismos Psicocomportamentais em Dor. Em: Tratado de Dor, I. De Paula Posso, E. Grossmann, P.R.B. da Fonseca, D.M. Perissinotti, J. O. de Oliveira Jr., J.B. de Souza, S.C. Serrano, e J. Vall (Eds.), Atheneu. (2017).

da Silva, JA, Ribeiro-Filho, NP. (2011). A dor como um problema psicofísico. *Rev Dor* 12:138-151.

de Freitas RL, Salgado-Rhoner CJ, Hallak JEC, Crippa JAS, Coimbra NC. (2013). Involvement of medial prefrontal cortex on panic-like elaborated defensive behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the medial hypothalamus: Role of the encannabinoid CB1 receptor. In *J Neuropsychopharmacol* 16:1781-1798.

de Freitas RL, Salgado-Rohner CJ, Biagione AF, Medeiros P, Hallak JEC, Crippa JA, Coimbra NC. (2014). NMDA and AMPA/kainateglutamatergic receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex modulate the elaborated defensive-behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the medial hypothalamus. *Cereb Cortex* 24:1518-1528.

Dias QM, Rossaneis AC, Fais RS, Prado W.A. (2013). An improved experimental model for peripheral neuropathy in rats. *Braz J Med Biol Res* 46:253-256.

Dick BD, Rashid S. (2007). Disruption of attention and working memory traces in individuals with chronic pain. *Anesth Analg*. 104(5):1223-9.

Eide PK, Jørum E, Stubhaug A, Bremnes J, Breivik H. (1994). Relief of post-herpetic neuralgia with the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist ketamine: a double-blind, cross-over comparison with morphine and placebo. *Pain*. 58:347-354.

Eliav E, Herzberg U, Ruda MA, Bennett GJ. (1999). Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain* 83:169-182.

Elliott AM, Smith BH, Penny KI, Smith WC, Chambers WA. (1999). The epidemiology of chronic pain in the community. *Lancet* 354:1248–1252.

Elphick MR, Egertová M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356:381-408.

Falconi-Sobrinho LL, Anjos-Garcia TD, Elias Filho DH, Coimbra NC. (2017). Unravelling cortico-hypothalamic pathways regulating unconditioned fear-induced antinociception and defensive behaviours. *Neuropharmacology* 113:367-385.

Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. (1993). Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7656-7660.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48:443-450.

Feldman JB. (2004). The neurobiology of pain, affect and hypnosis. *Am J Clin Hypn* 46:187-200.

Felsby S, Nielsen J, Arendt-Nielsen L, Jensen TS. (1996). NMDA receptor blockade in chronic neuropathic pain: a comparison of ketamine and magnesium chloride. *Pain* 64:283-291.

Ferreira de Sousa BP, Fráguas R, Melo Santos D, Figueiró JA. (2012). Critérios diagnósticos e avaliação terapêutica. Apud Fráguas JR, Figueiró JA, Melo Santos, D. *Depressão e Dor*. São Paulo. Editora Atheneu.

Ferreira SH, Moncada S, Vane JR. (1971). Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nat New Biol* 2:237-239.

Fields HL, Basbaum AI, Clanton CH, Anderson SD. (1977). Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Res* 126:441-453.

Flatters, SJL; Bennett GJ. (2004). Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109:150-161.

Flor H. (2002). Phantom-limb pain: characteristics, causes, and treatment. *Lancet Neurol* 1:182-189.

Flower RJ, Vane JR. (1974). Inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Biochem Pharmacol* 15:1439-1450.

Fogaça MV, Aguiar DC, Moreira FA, Guimarães FS. (2012). The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology* 63:202-210.

Freitas RL, Uribe-Mariño A, Castiblanco-Urbina MA, Elias-Filho DH, Coimbra NC. (2009). GABA(A) receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception. *Brain Res* 1305:118-131.

Freitas RL, Bassi GS, Oliveira AM, Coimbra NC. (2008). Serotonergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus recruits in situ 5-HT_{2A/2C} receptors to modulate the post-ictal antinociception. *Exp Neurol* 213:410-418.

Freitas RL, Ferreira CM, Ribeiro SJ, Carvalho AD, Elias-Filho DH, Garcia-Cairasco N, Coimbra NC. (2005). Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study. *Exp Neurol* 191:225-242.

Freitas RL, Ferreira CMR, Urbina MAC, Mariño AU, Carvalho AD, Butera G, Oliveira AM, Coimbra NC. (2009). 5-HT_{1A/1B}, 5-HT₆, and 5-HT₇ serotonergic receptors recruitment in tonic-clonic seizure-induced antinociception: Role of dorsal raphe nucleus. *Exp Neurol* 217:16-24.

Freitas RL, Uribe-Mariño A, Castiblanco-Urbina MA, Elias-Filho DH, Coimbra NC (2009). GABA_A receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception. *Brain Res* 1305:118-131.

Garcia-Larrea L, Magnin M. (2008). Pathophysiology of neuropathic pain: review of experimental models and proposed mechanisms. *Presse Med* 37:315-340.

Gasparini ALP, Barbieri CH, Mazzer N. (2007). Correlação entre diferentes métodos de avaliação funcional da marcha de ratos com lesão por esmagamento do nervo isquiático. *Acta Ortop Bras* 15:285-289.

Guida F, Luongo L, Marmo F, Romano R, Iannotta M, Napolitano F, Belardo C, Marabese I, D'Aniello A, De Gregorio D, Rossi F, Piscitelli F, Lattanzi R, de Bartolomeis A, Usiello A, Di Marzo V, de Novellis V, Maione S. (2015). Palmitoylethanolamide reduces pain-related behaviors and restores glutamatergic synapses homeostasis in the medial prefrontal cortex of neuropathic mice. *Mol Brain* 8:47.

Gigg J, Tan AM, Finch DM. (1944). Glutamatergic Hippocampal Formation Projections to Prefrontal Cortex in the Rat are Regulated by Gabaergic Inhibition And Show Convergence with Glutamatergic Projections From the Limbic Thalamus. *Hippocampus* 4:189-198.

Giordano C, Cristino L, Luongo L, Siniscalco D, Petrosino S, Piscitelli F, Marabese I, Gatta L, Rossi F, Imperatore R, Palazzo E, de Novellis V, Di Marzo V, Maione S. (2012). TRPV1-dependent and -independent alterations in the limbic cortex of neuropathic mice: impact on glial caspases and pain perception. *Cereb Cortex* 22:2495-2518.

Goldberg DS, McGee SJ. (2011). Pain as a global public health priority. *BMC Public Health* 11:770.

Graeff FG. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammal. *Braz J Med Biol Res* 27:811-829.

Grande LA, Loeser JD, Ozuna J, Ashleigh A, Samii A. (2004). Complex regional pain syndrome as a stress response. *Pain* 110:495-498.

McNaughton N, Gray JA. (2002). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* 61:161-176.

Guastella V, Mick G, Laurent B. (2008). Non pharmacologic treatment of neuropathic pain. *Presse Medicale* 37:354-357.

Guimarães-Costa R, Guimarães-Costa MB, Pippa-Gadioli L, Weltson A, Ubiali WA, Paschoalin-Maurin T, Felippotti TT, Elias-Filho DH, Laure CJ, Coimbra NC. (2007). Innate defensive behaviour and panic-like reactions evoked by rodents during aggressive encounters with Brazilian constrictor snakes in a complex labyrinth: behavioural validation of a new model to study affective and agonistic reactions in a prey versus predator paradigm. *J Neurosci Methods*. 165:25-37.

Gusnard DA, Akbudak E, Shulman GL, Raichle ME. (2001). Medial prefrontal cortex and self-referential mental activity: relation to a default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4259-4264.

Gustin SM, Wrigley PJ, Siddall PJ, Henderson LA. (2010). Brain anatomy changes associated with persistent neuropathic pain following spinal cord injury. *Cereb Cortex* 20:1409-1419.

Guyer P. (1964). To-days drugs: indomethacin. *Br Med J* 2:429.

Hagiwara S Byerly L. (1981). Calcium chanel. *Annu. Rev Neurosci* 4:69-125.

Han JS, Li W, Neugebauer V. (2005). Critical role of calcitonin gene-related peptide 1 receptors in the amygdala in synaptic plasticity and pain behavior. *J Neurosci* 25:10717-10728.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563-583.

Hu B, Doods H, Treede RD, Ceci A. (2009). Depression-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the CB2- selective agonist GW405833. *Pain*. 143:206-212.

Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R , Jäger T, Sandkühler J. (2006) Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science* 312:1659-1662.

Irintchev A, Simova O, Eberhardt KA, Morellini F, Schachner M. (2006). Impacts of lesion severity and tyrosine kinase receptor B deficiency on functional outcome of femoral nerve injury assessed by a novel single-frame motion analysis in mice. *Eur J Neurosci* 22:802-808.

Jahn A, Nee DE, Alexander WH, Brown JW. (2016). Distinct Regions within Medial Prefrontal Cortex Process Pain and Cognition. *J Neurosci* 36:12385-12392.

Jensen TD, Baron R, Haanpaa M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152:2204-22205.

Ji G, Sun H, Fu Y, Li Z, Pais-Vieira M, Galhardo V, Neugebauer V. Cognitive impairment in pain through amygdala-driven prefrontal cortical deactivation. *J Neurosci* 30:5451-5464.

Julius D, Basbaum AI. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principle of Neural Science.*, 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

Katz J, Melzack R. (1999). Measurement of pain. *Surg Clin North Am* 79:231-252.

Kidd BL, Urban LA. (2012). Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* 87:3-11.

Kim KJ, Yoon YW, Chung JM. (1997). Comparison of rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 113:200-206.

Kim SH, Chung JM. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50:355-363.

Knaster P, Karlsson H, Estlander AM, Kalso E Psychiatric disorders as assessed with SCID in chronic pain patients: the anxiety disorders precede the onset of pain. *Gen Hosp Psychiatry* 34:46-52.

Koltzenburg M, Scadding J. (2001). Neuropathic pain. *Curr Opin Neurol* 14:641-647.

Kontinem VK, kauppila T, Paananen S, Pertoaara A, Kalso E. (1999). Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation- induced neuropathy. *Pain* 80:341-6.

Kreitler S, Niv D. (2007). Cognitive impairment in chronic pain. *Pain: Clinical Updates* 15:1-4.

Kretz R. (1984). Local Cobalt injection: a method to discriminative presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. *J Neurosci methods* 11:129-135.

Kristensen JD, Svensson B, Gordh T Jr. (1992). The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. *Pain* 51:249-253.

Krishnan KR, France RD, Pelton S, McCann UD, Davidson J, Urban BJ. (1985). Chronic pain and depression. II. Symptoms of anxiety in chronic low back pain patients and their relationship to subtypes of depression. *Pain* 22:289-294.

Kruspe M, Thieme H, Guntinas-Lichius O, Irintchev A. (2014). Motoneuron regeneration accuracy and recovery of gait after femoral nerve injuries in rats. *Neuroscience* 280:73-87.

Latremoliere A, Woolf CJ. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926.

Lee BH, Won R, Baik EJ, Lee SH, Moon CH. (2000). An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *Neuro Report* 11:657-661.

Li XY, Ko HG, Chen T, Descalzi G, Koga K, Wang H, Kim SS, Shang Y, Kwak C, Park SW, Shim J, Lee K, Collingridge GL, Kaang BK, Zhuo M. (2010). Alleviating neuropathic pain hypersensitivity by inhibiting PKMzeta in the anterior cingulate cortex. *Science* 330:1400-1404.

Liberzon I, Phan KL. Brain-imaging studies of posttraumatic stress disorder. *CNS Spectr* 8:641-650.

Lisboa SF, Guimarães FS. (2012). Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 62:2455-2462.

Low LA, Millicamps M, Seminowicz DA, Naso L, Thompson SJ, Stone LS, Bushnell MC. (2012). Nerve injury causes long-term attentional deficits in rats. *Neurosci Lett* 529:103-107.

Lucki I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 8:523-532.

Mackie K, Devane WA, Hille B. (1993). Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 44:498-503.

Mackie K, Hille B. (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastomaglioma cells. *ProcNatlAcadSci U S A* 89:3825-3829.

Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15:6552-6561.

Marchand S (2012) International Association of study of pain. The Phenomenon of pain. IASP Press. Seattle.

Marchand S, Saravane D, Gaumond I. (2014). *Mental, Health and Pain*, Springer- Velag France.

Massart R, Dymov, S, Millecamps, M, Suderman, M, Gregoire, S, Koenigs, K, Alvarado, S, Tajerian, M, Stone, LS, Szyf, M. (2016). Overlapping signatures of chronic pain in the DNA methylation landscape of prefrontal cortex and peripheral T cells. *Sci Rep* 6:19615.

McCaffery M. (1989). *Pain: Clinical Manual for Nursing Practice* (2nd edition). St. Louis, MO: Mosby.

Melzack R, Casey, KL. (1968). Sensory, motivational, and central control determinants of pain (p.423-439). In: Kenshalo D (ed.). *The Skin Senses*. Springfield: Thomas.

Melzack R. (1973). *The Puzzle of Pain*. New York: Penguin.

Melzack R. (1999). Pain – an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 43:880-884.

Merskey H, Bogduk N. (1994). *Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definition of Pain Terms* (pp. 287), 2nded, IASP Press, Seattle, 1994.

Messlinger k. (1997). What is a nociceptor ? *Anaesthesist* 46:142-153.

Metz AE, Yau HJ, Centeno MV, Apkarian AV, Martina M. (2009). Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2423-2428.

Meyer-Rosberg K, Burckhardt CS, Huizar K, Kvarnstrom A, Nordfors LO, Kristofferson A. (2001). A comparison of the SF-36 and Nottingham Health Profile in patients with chronic neuropathic pain. *Eur J Pain* 5:391-403.

Millan MJ. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Progress Neurobiol* 57:1-164.

Millecamps M, Centeno MV, Berra HH, Rudick CN, Lavarello S, Tkatch T, Apkarian AV. (2007). D-cycloserine reduces neuropathic pain behavior through limbic NMDA-mediated circuitry. *Pain* 132:108-123.

Misner DL, Sullivan JM. (1999). Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 19:6795-6805.

- Mogil JS. (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10:283-294.
- Motta SC, Goto M, Gouveia FV, Baldo MV, Canteras NS, Swanson LW (2009). Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4870-4875.
- Munger BL. (1982). Multiple afferent innervation of primate facial hairs-Henry Head and Max von Frey revisited. *Brain Res* 257:1-43.
- Nardone R, Höller Y, Brigo F, Seidl M, Christova M, Bergmann J, Golaszewski S, Trinka E. (2013). Functional brain reorganization after spinal cord injury: Systematic review of animal and human studies. *Brain Research* 504:58-73.
- Narita M, Kancko C, Miyoshi K, Nagumo Y, Kuzumaki N, Nakajima M. (2006). Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic functions in the amygdale. *Neuropsychopharmacology* 31:739-50.
- Nicolle MM, Baxter MG.(2003). Glutamate receptor binding in the frontal cortex and dorsal striatum of aged rats with impaired attentional set-shifting. *Eur J Neurosci* 18(12):3335-42.
- Otis JD, Keane TM, Kerns RD. (2003). An examination of the relationship between chronic pain and post-traumatic stress disorder. *J Rehabil Res Dev* 40:397-405.
- Palazzo E, Romano R, Luongo L, Boccella S, De Gregorio D, Giordano ME, Rossi F, Marabese I, Scafuro MA, de Novellis V, Maione S. (2015). MMP-13, an mGluR7-selective negative allosteric modulator, alleviates pain and normalizes affective and cognitive behavior in neuropathic mice. *Pain* 56:1060-1073.
- Paszczuk AF, Gadotti VM, Tibola D, Quintão NL, Rodrigues AL, Calixto JB, Santos AR. (2007). Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice. *Brain Res* 1159:124-33.
- Phelps EA, Delgado MR, Nearing KI, LeDoux JE. (2004). Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. *Neuron* 43:897-905.
- Pimenta CAM. (2000). Dor – Manual Clínico de Enfermagem. São Paulo: (s.n.).
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. (1999). Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5802-5807.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.

Procacci P, Zoppi M, Maresca M. (1979). Experimental pain in man. *Pain* 6:123–140.

Prut L, Belzung C. (2002). The open field as a paradigm to measure the effect of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3-33.

Quinn H. Hogan. (2007). Role of Decreased Sensory Neuron Membrane Calcium Currents in the Genesis of Neuropathic Pain. *Croat Med J* 48:9-21.

Quintero G. (2013). Advances in cortical modulation of pain. *J Pain Res* 6:713-725.

Rainsford KD. (2007). Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem* 42:3-27.

Resstel LB, Corrêa FM. (2006). Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. *Eur J Neurosci* 23: 481-488.

Reuler JB, Girard DE, Nardone DA. (1980). The chronic pain syndrome: misconceptions and management. *Ann Intern Med* 93:588-596.

Roeska K, Doods H, Arndt K, Treede RD, Ceci A. (2008). Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. *Pain* 139:349-357.

Sandkuhler J, Liu X. (1998). Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *Eur J Neurosci* 10:2476-2480.

Sandkuhler J. (2007). Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain* 3:9.

Schwenkreis P, Witscher K, Pleger B, Malin JP, Tegenthoff M. (2005). The NMDA antagonist memantine affects training induced motor cortex plasticity- a study using transcranial magnetic stimulation. *BMC Neurosci* 6:35.

Seligman ME, Beagley G. (1975). Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88:534-541.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205-218.

Senapati AK, Huntington PJ, LaGraize SC, Wilson HD, Fuchs PN, Peng YB. (2005). Electrical stimulation of the primary somatosensory cortex inhibits spinal dorsal horn neuron activity. *Brain Res* 1057:134-140.

Senapati AK, Huntington PJ, Peng YB. (2005). Spinal dorsal horn neuron response to mechanical stimuli is decreased by electrical stimulation of the primary motor cortex. *Brain Res* 1036:173-179.

Seminowicz DA, Laferriere AL, Millecamps M, Yu JS,Coderre TJ, Bushnell MC (2009). MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. *Neuroimage* 47:1007-1014.

Shaw WS, Means-Christensen AJ, Slater MA, Webster JS, Patterson TL, Grant I, Garfin SR, Wahlgren DR, Patel S, Atkinson JH.(2010). Psychiatric disorders and risk of transition to chronicity in men with first onset low back pain. *Pain Med* 11:1391-1400.

Sjostrom P J, Turrigiano G G, Nelson S B. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 39:641-654.

Sommer C, Lalonde A, Heckman HM, Rodriguez M, Myers RR. (1995). Quantitative neuropathology of a focal nerve injury causing hyperalgesia. *Journal of Neuropathology Exper Neurol* 54:635-643.

Starowicz K, Maione S, Cristino L, Palazzo E, Marabese I, Rossi F, de Novellis V, Di Marzo V. (2007). Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J Neurosci* 27:13739-13749.

Starowicz K, Przewlocka B. (2012). Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloid system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367:3286-3299.

Stein dj; Bouwer C. (1997). A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. *J Anxiety Disord* 4:409-429.

Steinmeyer J. (2000). Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res* 2:379-385.

Tajerian M, Alvarado S, Millecamps M, Vachon P, Crosby C, Bushnell MC, Szyf M, Stone LS. (2013). Peripheral nerve injury is associated with chronic, reversible changes in global DNA methylation in the mouse prefrontal cortex. *PLoS One* 8:e55259.

Tang J, Gibson SJ. (2005). A psychophysical evaluation of the relationship between trait anxiety, pain, perception, and induced state anxiety. *J Pain* 6:612-619.

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. (2008). Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 70:1630-1635.

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411.

Turner JA, Romano JM. (1990). Psychological and psychosocial evaluation, In: J.J. Bonica (ed), *The Management of Pain*, 2nd Ed, Lea and Fibiger, Philadelphia, PA, pp 229–341.

Uribe-Mariño A, Francisco A, Castiblanco-Urbina MA, Twardowschy A, Salgado-Rohner CJ, Crippa JA, Hallak JE, Zuardi AW, Coimbra NC. (2012). Antiaversive effects of cannabidiol on innate-fear behaviours evoked by an ethological model of panic attacks on a prey versus the wild snake *Epicraterescenchriacrassus* confrontation paradigm. *Neuropsychopharmacology* 37:412-421.

Vargaftig BB, Ferreira SH. (1981). Blockade of the inflammatory effects of platelet-activating factor by cyclo-oxygenase inhibitors. *Braz J Med Biol Res.* 14:187-189.

Vivancos GG, Verri WA Jr, Cunha TM, Schivo IR, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res* 37:391-399.

von Frey, M. (1896). Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. *Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften* 23:175-266.

Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM. (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 7:103-113.

Wall PD, Gutnick M. (1974). Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp Neurol* 43:580-593.

Wang GQ, Cen C, Li C, Cao S, Wang N, Zhou Z, Liu XM, Xu Y, Tian NX, Zhang Y, Wang J, Wang LP, Wang Y. (2015). Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. *Nat Commun* 6:7660.

Wu LJ, Toyoda H, Zhao MG, Lee YS, Tang J, Ko SW, Jia YH, Shum FW, Zerbinatti CV, Bu G, Wei F, Xu TL, Muglia LJ, Chen ZF, Auberson YP, Kaang BK, Zhuo M. (2005). Upregulation of forebrain NMDA NR2B receptors contributes to behavioral sensitization after inflammation. *J Neurosci* 25:11107-11116.

Xing J, Li J. (2007). TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. *J Neurophysiol* 97:503-511.

Xu B, Descalzi G, Ye HR, Zhuo M, Wang YW. (2012). Translational investigation and treatment of neuropathic pain. *Mol Pain* 8:15.

Zhuo M (2005). Canadian Association of Neuroscience review: Cellular and synaptic insights into physiological and pathological pain. EJLB-CIHR Michael Smith Chair in Neurosciences and Mental Health lecture. *Can J Neurol Sci* 32:27-36.

Zhuo M. (2008). Cortical excitation and chronic pain. *Trends in Neurosciences* 31:199-207.

Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5780-5785.

Zimmermann M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.

Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:23-37.

Zhuo M. (2016). Contribution of synaptic plasticity in the insular cortex to chronic pain. *Neuroscience* 338:220-229.

Apêndices

APÊNDICES

Manuscrito 1: Submetido para Physiology and Behavior

A single ligature of the sciatic nerve produces sensory, affective and cognitive impairments: peripheral mononeuropathy model for study chronic pain and neurological disorders comorbidities

Running title: Chronic neuropathic pain and neurological disorders

Priscila de Medeiros^{a,b,c}, Ieda Regina dos Santos^f, Ivair Matias Júnio^e, Enza Palazzog, Hélio Rubens Machado^e, Sergio Henrique Ferreira[†], Sabatino Maione^g, Norberto Cysne Coimbra^{a,c,d,f*}, Renato Leonardo de Freitas^{a,b,c,d,f*}

[†] *in memoriam*

^aNeuroelectrophysiology Multi-User Centre, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

^bLaboratory of Pain & Emotions, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

^cLaboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

^dBehavioural Neurosciences Institute (INeC), Av do Café, 2450, Ribeirão Preto (SP), 14050-220, Brazil.

^eLaboratory of Pediatric Surgery, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

^fDepartment of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

^gDepartment of Experimental Medicine, Division of Pharmacology, University of Campania “L. Vanvitelli”, Naples, Italy.

*Corresponding authors: Dr Renato Leonardo de Freitas (defreitas.rl@gmail.com) and Prof. Dr Norberto Cysne Coimbra.*Neuroelectrophysiology Multi-User Centre and Laboratory of Pain & Emotions. Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

Abstract

Chronic constriction injury (CCI) is a widely used peripheral nerve injury model of neuropathic pain (NPP). Depression, anxiety, and cognitive deficit are well-known comorbidities of an NPP. We investigate the alterations of sensory, affective, cognitive and motor using animal models to evaluate the comorbidities of the chronic NPP in rodents. CCI by Bennet and Xie was performed through four ligatures, and an adapted model of CCI was carried out by placing one loose ligature around the sciatic nerve. The von Frey's test and acetone test

were used from 1 to 28 days after the sham or CCI (1 or 4 ligatures). Beam walking test (BWT) was measured until 28 days after surgeries. The anxiety-related behaviour, depression-like behaviour and cognition response were made through of the open field test (OFT), forced swimming test (FST) and object recognition test (ORT), respectively, 21 days after the surgery. Mechanical and cold allodynia were found from 1 to 28 days after the both CCI. Both CCI also increased in the time of immobility in the FST and cognitive impairments in the ORT. Concerning OFT, the exploratory behaviour and the time spent in the central area decreased while the defensive attention behavioural response increased. Functional motor impairments, by BWT and autotomy behaviour (20% of animals) were observed in CCI 4 ligatures. Then, CCI 1 ligature not produced motor deficits, autotomy behaviour and is easier to the performer than CCI 4 ligatures. In addition, the FST, OPT and ORT are appropriate animal models to study the comorbidity of the depression, anxiety and attention/memory, respectively, in animals with chronic NPP induced by CCI.

Keywords: Chronic constriction injury, chronic neuropathic pain, recognition memory impairments, anxiety-like reactions, depression-associated behaviours.

1 Introduction

The incidence rate of chronic pain in the world is about 8% (Eriksen et al., 2004, Elliott et al., 2002, Reitsma et al., 2012, Velly and Mohit, 2017). The prevalence of neuropathic pain (NPP) is estimated to be between 1% and 23% (Velly and Mohit, 2017). The Institute of Medicine related that 100 million Americans suffer from chronic pain at the cost of \$600 billion (2011).

Pain is a signal to prevent further lesion or to avoid tissue injury. Genesis and duration of chronic pain are critically different than those related to acute pain, and the underlying mechanisms of chronic pain need to be more intensely studied (Wang and Wang, 2003). So far, several models of peripheral NPP have been developed in rodents. They aim to mimic clinical symptoms in humans developing following an injury to central or peripheral nerve, diabetic neuropathies, chemotherapy, and inflammation. The majority of NPP models in rodents are based on the compression or section of the nerve (Jarvis and Boyce-Rustay, 2009).

The complete transection of the sciatic nerve was the first animal model of NPP (Wall et al., 1979). However, the most widely used are the spinal nerve ligation (SNL), consisting in the spinal nerve ligation nearby to the dorsal root ganglion of the L5 and L6 spinal nerves (Kim and Chung, 1992). The experimental model of NPP proposed by Seltzer et al. (1990) consists in tightly tying 1/3-1/2 of the sciatic nerve. Lee et al. (2000) transected different combination of the three neural branches (tibial, sural and peroneal) of the sciatic nerve to induce NPP.

Finally, Bennett and Xie (1988) introduced an animal model of peripheral neuropathy. The chronic constriction injury (CCI) model in rodents comprises four ligatures loosely tied around the sciatic nerve proximal to its trifurcation. This constriction leads to intraneural edema, focal ischemia, and Wallerian degeneration (Bennet and Xie, 1988). Consequently, this NPP experimental model results in chemical and heat-evoked hypernociception, cold and mechanical allodynia, and many symptoms of spontaneous pain which last for more than two months (Bennett and Xie, 1988; Attal et al., 1990).

The NPP is an unpleasant painful disability, is a debilitating disease causing a severe impact on the quality of life (Elliott et al., 1999; Alves et al., 2010). The management of patients affected by NPP is complicated, involves a multidisciplinary team for alleviating symptoms, and existing treatments are often ineffective.

Epidemiological studies showed that some neurological and psychiatric disorders are common in the people. There is some evidence relating that chronic pain and neurological/psychiatric disorders are not only common comorbidities. In fact, these mental disorders may increase the risk of chronic pain and pain may evoke psychiatric disorders (Portenoy et al., 2004; Gureje et al., 1998; de Heer et al., 2014; Bruffaerts et al., 2015).

The comorbidity chronic pain and depression are closely associated. However, the link is hard to understand and is often underestimated. Around 40% and 60% of patients with chronic pain have depression, and due to the relation (Bair et al., 2003). Furthermore, depression disorder causes physical symptoms, and, the chronic joint pain, limb pain, back pain is often the presenting symptoms of depression (Madhukar and Trivedi, 2004). When the two conditions coexist, they are harder to treat, and outcomes are worse than when occurring in isolation (Ohayon and Schatzberg, 2003).

Asmundson e collaborators (1996), showed that anxiety is more common in patients with chronic pain in humans. Knaster et al. (2011) demonstrated that the diagnosis of anxiety disorder precedes the onset of pain in more than 75% of individuals. Similarly, Shaw and colleagues identified that patients suffering from low back pain were 2.45 times more likely to develop chronic low back pain when they were diagnosed with generalised anxiety disorder (Shaw et al., 2010).

Moreover, there is also a relationship between chronic pain and psychiatric/neurological disorders in rodents. NPP predicts the development of anxiety and depression symptoms and impairments in cognition (Li, 2015; Low et al., 2012). The development of new animal models of chronic NPP which show the same comorbidity with affective and cognitive impairments appears thus crucial for investigating novel therapeutic strategies.

In addition, patients suffering chronic pain frequently report problems with attention and concentration that affect daily functioning and quality of life. Furthermore, chronic pain is often associated with anxiety and depression. It is still however not known if the unpleasant sensations of pain cause these comorbidities, or if patients suffering chronic pain are more susceptible to risk factors for the development of affective/cognitive disorders (Low et al., 2012).

The aim of the current study was thus to investigate the effect of one loose ligature around the sciatic nerve with chromic catgut on cold hypersensitivity and mechanical allodynia, anxiety and depression-like behaviours, cognitive performances, and locomotor activity and to compare these effect with Bennet and Xie's model and sham-operated rats.

2 Experimental Procedures

2.1 Animals

Male Wistar rats were housed four per cage with free access to food and water under controlled illumination (12:12 h light-dark cycle, light on 07:00), temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity (55-60 %) for at least 1 week before the commencement of experiments in the animal care facility of the University of São Paulo (Campus USP at Ribeirão Preto). All protocols were in compliance with the recommendations of the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CETEA) of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP) (Process 015/2005), which are in accordance with the Animal Research Ethics guidelines adopted by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and with the International Association for the Study of Pain (IASP) guidelines for pain research on animals (Zimmermann, 1983). Experiments were carried out during the light phase of the cycle, and animals were tested randomly across this period. The animals were used only in a single experimental independent group, and all efforts were made to minimise discomfort for the animals.

2.2 Induction of neuropathic pain: Chronic constriction injury (CCI) of the right sciatic nerve

The resume of the experimental procedure and tests performed in this study is illustrated in figure 1. A unilateral mononeuropathy was produced in rats using the CCI of the sciatic nerve by using either the Bennett and Xie's model (four ligatures) or a modification of it (one ligature). Sham-operated rats served as control. On day 0 all

groups of rats were anaesthetised by a mixture of ketamine/xylazine (92 mg/kg and 9.2 mg/kg, respectively, intraperitoneally). The right hindpaw was shaved, moistened with a disinfectant and by a blunt dissection through the biceps femoris the sciatic nerve was exposed. At the level of the middle of the thigh and proximal to trifurcation, about 7 mm of the sciatic was freed from adhering tissues, and four or one loose ligature (4.0 chromic gut) were tied with about 1 mm spacing. The wound was then closed by suturing the muscle using chromic catgut with a continuous suture pattern. Finally, the skin was closed with 3.0 black braided silk sutures using a horizontal mattress suture pattern. Sham surgery was performed by exposing the sciatic nerve as described above, without ligatures neither nerve damaging. The rodents were then transferred to their home cage and left to recover. The animals were separated and allocated by sham, CCI 4 ligatures and CCI 1 ligatures in four animals per home cage in the maximum during all experimental procedures.

2.2.1. Autotomy behaviour

Constriction of the nerve was minimal, and immediately stopped if a brief twitch is observed, to prevent arresting of the epineural blood flow. The same researcher did the sham and CCI (1 or 4 ligatures) surgeries to keep the standardize procedure and avoid an over tightening the ligatures when this is performed by different researchers. Autotomy behaviour begins with a scratches, bites, and finish with self-mutilation of own paw, considering the right limb side wich is made the CCI. The number and percentage of autotomized rats were evaluated, however, we observed the animals until 28 days of CCI. Finally, these animals were not used in any experiments.

2.3 Von Frey test

Mechanical allodynia was evaluated by measuring the paw withdrawal threshold to von Frey filaments (Stoelting, Chicago, IL, USA) in an independent group of animals. Animals (N=8-12) were placed in an acrylic cage (12 x 10 x 17 cm) with a wire-grid floor for approximately 20 min to allow behavioural acclimation to the novel environment. The von Frey filaments were applied in ascending order from 2 to 100 g to the plantar surface at the centre of the paw or the base of the third or fourth toes of the injured and uninjured hindpaw through the mesh floor for about 3-4 s to induce the withdrawal reflex. The time interval before the application of the next filament was at least 10 s. Data were expressed as mechanical withdrawal threshold in grams. The mechanical threshold of the autotomized rats was not evaluated.

2.4 Acetone test

The acetone test, in an independent group, was used for the determination of cold allodynia. Each animal was placed in a transparent acrylic cubicle (22 x 16.5 x 14cm) with a mesh floor. Rats (N= 8-9) were allowed to adapt to the testing environment for at least 10 min. Then a drop of acetone (50 µl) was applied at the centre of the plantar surface of the right hind paw by a glass syringe equipped with a blunted needle. The time the animal spent flicking or licking the stimulated paw during a 1 min period was recorded.

2.5 Motor behaviour- beam walking test

Animals (N= 7) were trained in the experimental walking apparatus consisting of a horizontal metal platform (1000 mm length, 50 mm width). At the end of the platform, the home cage (20 x 20 x 20 cm) served as an attractive stimulus for walking on the platform without exploratory pauses and at a constant speed in two or three training trials (Irintchev et al., 2006). The functional gait analysis was performed by capturing the march through a camcorder camera (Sony Hadcam), equipped with a USB cable connected directly to Kinovea software (<http://www.kinovea.org/>), which enables the identification and analysis of pictures (Caggiano et al., 2014),

according to the parameters previously selected in other studies with some modifications (Kruspe et al., 2014; Irintchev et al. 2006). The angle of flexion movement of the hindpaw during gait was calculated in the recorded images of the sagittal plane (profile). The video recordings were analyzed to select the frames in which the subsequent gait cycle was observed: (i) speed of path and stride (distance traveled during movement of affected limb: right sciatic nerve); (ii) time (total time spent) in path and stride; (iii) length of step (sum of the distance of the step of the right paw with the step of the left paw) and stride; (iv) flexion ankle during initial contact (initial touch of the affected limb with the ground) and final contact (final moment of contact of the platform affected limb). These parameters precisely evaluate the movement during the gait and nerve damage-induced motor impairments. Gait was monitored for all groups of rats under investigation before surgery and 7, 14, 21 or 28 days after surgery. This procedure was realized in an independent group of the animals.

2.6 Affective and Cognitive behavioural tests

All sessions were recorded with a video camera (Sony Handycam, HDR-SR10, Osaki, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan), and the videos were further analysed using the XPLORAT software by another blind to the experiment researcher. The X-Plo-Rat 2005 software was developed by the research team of Dr Morato (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, Brazil).

2.6.1 Open field (OFT)

The open field apparatus consisted of crystal acrylic circular enclosure (97 cm in diameter and walls of 32.5 cm high, open top and floor divided into 19 similar parts). Each rat (independent group: N= 6-7) (sham, CCI with a single ligature or CCI with four ligatures) was gently placed in the centre of the enclosure and behaviour was videotaped during 5 minutes. The test assesses novel environment exploration, general locomotor activity, and provides an initial screen for anxiety-related behaviour in rodents. The OFT test is a procedure to evaluate the animal psychology (Belzung, 1999). The test consists in the confrontation of a rodent with the situation. The animal was placed in the centre, and the following behavioural items were recorded for 5 min: horizontal locomotion (number of crossings of the lines marked on the floor), the frequency of rearing (sometimes termed vertical activity), grooming (protracted washing of the coat) and alertness [defined as an interruption of ongoing behavior and occasionally scanning the environment by smelling the surrounding air (Twardowschy et al., 2013)]. In such a situation, we evaluated the explorations of the rodents in the periphery and the central parts of the apparatus during the OFT, to investigate the anxiety-like behaviour.

2.6.2 Forced swimming test

After 20 days of sham procedure or CCI surgery for induction of neuropathy, the animals were submitted to the forced swimming test according to Porsolt et alii (1978), later modified by Hu et alii. (2009). After at least 1 hour of habituation, the animals were put on a vertical Plexiglas® cylinder-shaped chamber (40 cm high, 20 cm in diameter) filled with water at 25°C to a depth of 20 cm. This test consists of two sessions: 15-min pre-test followed, after 24h, by a 5-min test. Immediately after each session, the rats were dried with a clean towel. The FST involves the score of immobility (freezing and floating) responses displayed when the rodents are forced to swim in a cylinder from which there is no route of escape. Immobility consists in the (i) floating behaviour (rat floating in the water without struggling and only making movements with the tail and paws necessary to keep its head above the water) and (ii) freezing behaviour (operationally defined as the absence of the body movement at least for 5 seconds except that required for respiration keeping its head above water).

2.6.3 Novel object recognition

20 days after surgery, sham or both CCI rats (N=6-7, independent group) (one or four ligatures) were firstly allowed freely exploring the environment, an open rectangular box (40 × 30 × 30 cm; width × lengths × height) without objects for 1 h (habituation). The day after (day 21), each rat was positioned in the same box and allowed to explore two identical objects for a 5 min period session (acquisition), after that the rat was placed in its holding cage. Two hours after the acquisition, rats returned to the open box in which 1 of the 2 identical objects was replaced with a novel different one. The time spent exploring the novel object was considered as the time the rat spent with its nose directed, and within 1 cm, from the novel object. Test sessions were videotaped, and data were expressed as the percentage of recognition index ([RI], in %), which was calculated as the proportion of the time spent exploring the novel object/time spent examining the novel object + time spent exploring the familiar object.

2.7 Analysis of results

The data are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). The results of the mechanical and cold allodynia in von Frey and acetone tests, respectively, were analysed using ANOVA for repeated measures. In cases of a significance of treatment versus time interaction, one-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test at each time interval were performed. Repeated measures Analysis of Variance (ANOVA) uses the same conceptual framework as classical ANOVA followed by Duncan post hoc test (de Freitas et al., 2013, 2014, 2016a,b). The locomotor, affective and cognitive behavioural data were analysed by a One-way analysis of variance (ANOVA). Significant effects in the ANOVA were followed by Newman-Keuls's post hoc test (Irintchev et al. 2006; Freitas et al., 2009; de Freitas et al., 2013, 2014; Kruspe et al., 2014). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Comparison between Bennett and Xi's model and adapted CCI model

3.1.1 Measurement of mechanical allodynia

Measurements of mechanical allodynia by von Frey test were carried out 1, 4, 7, 14, 21 and 28 days after sham or CCI surgery (day 0). Mechanical allodynia was found in a group of rats, those who underwent Bennett and Xie's CCI procedure (four ligatures) and those who underwent present adapted model (one ligature). Our study, show the illustration of the evolution of neuropathy in the contralateral (left) and ipsilateral (right) hindpaw after chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve and sham procedure at 7, 14, 21 and 28 days after surgery (Figure 2).

Considering the injured paw, in which the NPP-induced responses were recorded, there was a significant effect of treatment (CCI surgery) [$F(2,25) = 184.10$, $P < 0.001$], of time [$F(6,20) = 98.73$, $P < 0.001$], and of treatment versus time interaction [$F(12,38) = 78.11$, $P < 0.001$] (ANOVA for repeated measures). CCI of the sciatic nerve using either four or one ligature reduced the mechanical withdrawal threshold for all the time point under observation ($P < 0.001$ in all cases, Duncan's post hoc test) (Figure 3A). Moreover, there were not significant differences in mechanical withdrawal threshold when the two CCI groups of rats (a single ligature of the sciatic nerve versus four ligatures) were compared among them ($P > 0.05$ in all cases; Duncan's post hoc test) (Figure 3A).

As far the uninjured hindpaw concerns, there was not significant effect of treatment [$F(2,25) = 2.43$; $P > 0.05$], time [$F(6,20) = 507.33$; $P > 0.05$] and treatment versus time interaction [$F(12,38) = 2.03$; $P > 0.05$] among all the groups of rats (ANOVA for repeated measures). Thus, the CCI with four or one ligature around the sciatic nerve

did not reduce mechanical withdrawal threshold of the contralateral hindpaw in all groups for all the time of observation ($P>0.05$ in all cases; Duncan's post hoc test) (Figure 3B).

3.1.2 Measurement of cold hypersensitivity

Rats which underwent CCI surgery (four or a single ligature) showed higher reactivity to the cold stimulus compared to the sham group (Figure 3C). The time spent shakes and licking the ipsilateral hindpaw at 1 and 4 days after surgery was not statistically different among the CCI groups (four or a single ligature) and sham group. 7 days after surgery a statistically significant difference in the time spent in shakes/licking was evident in the CCI group with four ligatures [$F(2,22) = 8.64$; $P<0.001$] as compared to the CCI with one ligature group and sham group. Flicking and licking of the injured hindpaw were also significantly increased in the two groups of CCI rats (with either a single or four ligatures) at 14 and 21 days after surgery [$F(2,22) = 8.64$; $P<0.001$] as compared to the sham groups. Interestingly, 28 days after the CCI only the group with a single ligature showed a statistically significant effect in shakes/licking [$F(2,22) = 8.64$; $P<0.001$] as compared to the CCI group with four ligatures and to the sham group. Thus, the CCI of the sciatic nerve, using either four or a single ligature, increased shakes/licking of the ipsilateral hindpaw at 7, 14, 21 and 28 days after surgery as compared to the shams ($P<0.05$; Duncan's post hoc). As expected, there were no significant differences between CCI and sham groups when the acetone test was carried out on the contralateral hind paws ($P>0.05$; Duncan's post hoc) at for all the time of observation (Figure 3D).

3.1.3 Locomotor behaviour test

According to the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls' multiple comparison post hoc tests, there were not significant differences neither in the time of path [$F(2,15) = 0.14$; $P>0.05$] nor the speed of the path [$F(2,15) = 0.08$; $P>0.05$] between the three groups of rats (sham, CCI with one or four ligatures) 7 days after surgery. No significant differences between groups were observed at the time of the stride [$F(2,15) = 3.47$; $P>0.05$] at 7 days after surgery. However, CCI rats, with either a single or four ligatures, showed a significant decrease of the length of step [$F(2,15) = 0.4679$; $P<0.001$] and stride [$F(2,15) = 5.249$; $P<0.01$] and flexion angle of ankle during initial [$F(2,15) = 4.353$; $P<0.01$] and final [$F(2,15) = 7.373$; $P<0.001$] contacts to the platform and the speed of stride [$F(2,15) = 5.771$; $P<0.01$] compared to the sham group. However, there were not significant differences between CCI with a single ligature group as compared to the group with 4 ligatures (Table 1).

Comparisons between the three groups 14 days after surgery showed no statistical differences neither in time of path [$F(2,15) = 1.02$; $P>0.05$], speed of path [$F(2,15) = 0.21$; $P>0.05$] nor in the stride parameters, such as time [$F(2,15) = 1.7$; $P>0.05$] and speed [$F(2,15) = 1.61$; $P>0.05$]. In addition, there were not significant differences in length of stride [$F(2,15) = 1.61$; $P>0.05$], step [$F(2,15) = 1.4$; $P>0.05$], and ankle angle at the initial contact [$F(2,15) = 1.43$; $P>0.05$]. However, the mean values of the final contact were significantly smaller [$F(2,15) = 3.457$; $P<0.05$] in CCI groups of rats compared to the shams ($p<0.05$, Newman-Keuls' post hoc test). Moreover, there were not significant differences among the two CCI groups (four versus 1 ligature).

At 21 days after surgery, there were no significant differences in path parameters such as speed and time of path [$F(2,15) = 0.62$; $P>0.05$] and [$F(2,15) = 0.58$; $P>0.05$], respectively. Furthermore, there were not significant differences in time of stride [$F(2,15) = 0.89$; $P>0.05$] and length of step and stride [$F(2,15) = 0.20$; $P>0.05$], nor in flexion angle of ankles at initial contact [$F(2,15) = 3.77$; $P>0.05$].

Nevertheless, the speed of stride [$F(2,15) = 4.19$; $P<0.05$] and ankle angles at the final contact [$F(2,15) = 6.451$; $P<0.001$] were significantly reduced in the CCI group with four ligatures compared to sham group and CCI group with a single ligature. Thus, CCI by four ligature procedure induced higher motor impairments compared to CCI by a single ligature and sham groups ($P<0.05$; Newman-Keuls post hoc test), as shown in Table 1.

Twenty-eight days after surgery, there were no significant differences in time of path [$F(2,15) = 0.91$; $P > 0.05$], speed of path [$F(2,15) = 0.56$; $P > 0.05$], time of stride [$F(2,15) = 2.02$; $P > 0.05$], speed of stride [$F(2,15) = 0.23$; $P > 0.05$], and ankle angles at initial contact [$F(2,15) = 0.29$; $P > 0.05$] in the three groups of rats (sham, CCI with a single or four ligatures). However, the ankle angle at final contact was significantly reduced [$F(2,15) = 11.76$; $P < 0.001$] in CCI groups of rats with either four or a single ligature. Thus CCI rats with a single or four ligatures showed significant differences in ankle angles at final contact parameters compared to the shams 28 days after surgery (Newman-Keuls post hoc test; $P < 0.05$), as shown in Table 1.

3.1.4 Autotomy behaviour

It was evaluated the autotomy behaviour in animals during the 28 days after sham procedure, CCI 1 ligature or CCI 4 ligatures. Sham ($n=34$) and CCI 1 ligature ($n=38$) not evoked any autotomy behaviour in animals. However, the CCI 4 ligatures ($n=41$) caused autotomy behaviour in 20% ($n=8$) of animals. These data are shown in Table 2

3.2 Affective and Cognitive behavioural tests

3.2.1 Open field test

Twenty-one days after surgery sham and CCI rats were tested in the open field test for evaluating explorative behavior in a circular arena. Recorded parameters were: time of permanency in the central and peripheral area, rearing, crossing, grooming, and alertness. There were significant differences in total frequency of rearing in CCI groups with a single ligature [$F(2,17) = 6.69$; $P < 0.05$] and 4 ligatures [$F(2,17) = 6.69$; $P < 0.01$], compared to sham group (Figure 4A). Also, a statistically significant difference in frequency of crossing [$F(2,17) = 4.5$; $P < 0.05$] was found in CCI groups with a single ligature or four ligatures compared to sham group (Figure 4B).

There were also significant differences in total frequency of grooming [$F(2,17) = 4.45$; $P < 0.05$] in CCI rats either those with a single ligature or four ligatures compared to shams (Figure 4C). Interestingly, CCI rats by a single [$F(2,17) = 7.14$; $P < 0.01$] or four ligatures [$F(2,17) = 7.14$; $P < 0.05$] exhibited increased alertness behaviour in comparison to shams as shown in Figure 3D. The time of peripheral permanency in the open field [$F(2,17) = 16.09$; $P < 0.001$] in CCI groups of rats increased compared to sham rats (Figure 4E). Moreover, CCI rats did not spend time in the central area of the open field arena, while, the sham rats explored it [$F(2,17) = 17.09$; $P < 0.001$] (Figure 4F). CCI groups of rats, using four or one ligatures, showed changes in all the parameters analyzed ($P < 0.05$, Newman-Keuls' post hoc test) thus suggesting an anxiety like-behaviour (Figure 4A-D)

3.2.2 Forced swimming test (depression-like behaviour)

The forced swimming test was performed twenty-one days after surgery to investigate depression-like behavior in the different groups of rats.

During the forced swimming test, there were significant differences in total immobility frequency [$F(2,19) = 25.78$; $P < 0.001$] in CCI by four ligatures in comparison with CCI caused by single ligature or sham group. The duration of immobility was significantly increased [$F(2,19) = 6.76$; $P < 0.001$] in CCI groups by either a single or four ligatures compared to the sham group. The peripheral mononeuropathy using four or one ligature around the sciatic nerve increased the learned helplessness (Newman-Keuls multiple comparison post hoc tests; $P < 0.05$), as shown in Figure 5A-B.

3.2.3 Object recognition test

In the object recognition test, in according to the one-way ANOVA followed by Newman-Keuls's post hoc test, during the test trial (memory acquisition) there were not significant differences in time of exploration of the identical objects in all groups studied [$F(2,17) = 0.91$; $P > 0.05$], as shown in Figure 6B. The time of exploration of the novel object was lower in the CCI groups (one or four ligatures) compared to the sham group [$F(2,17) = 7.07$; $P < 0.01$] (Figure 6C). Furthermore, CCI groups showed a decrease in percentage of object recognition index ([RI], in %) compared to the sham group [$F(2,17) = 6.16$; $P < 0.05$] (Figure 6A). According to Newman-Keuls's post hoc test, the CCI with one or four ligatures decreased the recognition index compared to sham group ($P < 0.05$).

4 Discussion

Studies employing animal models, especially those closely simulating certain painful clinical conditions, have markedly improved our knowledge about the neuropathogenesis of chronic pain. Animal models should reproduce specific pain conditions although there may be a common underlying mechanism of sensitization in the different chronic pain conditions. NPP, an untreatable form of chronic pain, has as main sensory symptoms allodynia and hyperalgesia (Bennett, 1999; Chapman, 1990; Zimmernann, 2001).

In the current study, CCI of the sciatic nerve using either the procedure suggested by Bennett and Xie (four ligatures) or an adapted model using a single ligature of the sciatic nerve was carried out in rats in order to compare the single ligature model to that of Bennett and Xie and sham. Both procedures of CCI of the sciatic nerve produced mechanical and cold allodynia. Until 1988, animal models of peripheral neuropathy were caused mainly by trauma, toxins, and metabolic diseases. The Bennett and Xie's model (1988) was the first model inducing a peripheral neuropathy reproducing the complexity of NPP disorders like those seen in humans. Hereafter many models have been developed.

An experimental model for neuropathy adapted from Bennett and Xie's model of NPP was performed with a single ligature placed around the right sciatic nerve near to the trifurcation using 100% cotton glove thread. This surgery was compared to that executed in SNL model and mechanical allodynia lasting 14 days after the surgical procedure was reported (Dias et al., 2013). However, the Bennett and Xie model used the 4-0 chromic gut sutures placed around the sciatic nerve to perform CCI. In fact, the chromic catgut is an absorbable suture made by twisting together strands of purified collagen taken from bovine intestines.

In our study, behavioural responses to pain have been monitored for a longer period (until 28 days after surgery) and mechanical and cold allodynia measured by von Frey monofilaments (Chaplan et al., 1994) and the acetone test, respectively. Our data demonstrated that a single ligature around sciatic nerve with chromic catgut was sufficient to induce a peripheral mononeuropathy associated with mechanical and cold allodynia. Moreover, we show in the current investigation, impairments on cognitive, emotional and locomotor behaviours. In addition, our adapted model of CCI not caused autotomy behaviour in the animals while the model of CCI proposed by Bennett and Xie, 20% of animals displayed autotomy behaviour in the ipsilateral paw.

Nerve ligation models have served as useful tools mimicking clinical symptoms of NPP characterised in humans by spontaneous pain and allodynia (Latremoliere and Woolf, 2009). Accordingly, mice and rats underwent to peripheral nerve injury displayed reduced mechanical thresholds and exaggerated responses to noxious stimuli (hyperalgesia) (Wu et al., 2005; Zhuo, 2008). Similarly, the adaptation of the classic CCI model suggested by Bennett and Xie can be used as NPP model since a reduced threshold of withdrawal response to a cold chemical stimulus was also evident in the acetone test (Allchorne et al., 2005).

Concerning the motor function found in the walking platform the stride length, stride, the ankle angles during the initial and final contact were changed by the CCI with a single ligature concerning the sham. These parameters may change for maintaining the speed and timing parameters (path) which did not change among CCI and sham groups of rats all along the investigation period. Differently, the flexion-extension angle of the ankle at the end

of the contact period (withdrawal of the contact with the ground) proved decreased in CCI rats possibly since the affected muscles are unable to maintain the ankle stable. Thus, increases in stride length averages compensate this possible deficit, so that the time and speed to traverse the platform remained the same throughout the experimental period.

Four ligatures of the sciatic nerve proposed by Bennett and Xie (1988) caused more severe motor impairments when compared to rats with CCI by a single ligature and shams. The motor behaviour changes found in the CCI groups of rats may represent a compensation for performing movements in order to pass through the platform (Irintchev. et al., 2005, Kruspe et al., 2014). Worth noting that seven days after the CCI procedure both CCI rats showed greater gait differences when compared to sham group. Perhaps, these gait changes are due to the inflammatory phase/component of NPP driving to the avoidance of the contact of the paw on the floor and not to a real motor deficit.

Affective and cognitive impairments related to NPP have been evaluated in the present study and anxiety/depression-like behaviours and cognitive deficits have been found in the two CCI groups of rats. Moreover, patients suffering chronic pain often report debilitating symptoms such as profound disturbances of familial and social relationships, disrupted sleep, decreased appetite, metabolic, endocrine and sexual dysfunctions, a reduced ability to concentrate, a loss of interest in external events and, not infrequently, moderate to severe depression (Meyer-Rosberg et al., 2001; Procacci et al., 1979; Reuler et al., 1980; Tumer and Romano, 1990).

Our results showed that the CCI decreased the exploration (crossing and rearing) and increased the alertness in the open field test compared to sham rats. CCI rats did not explore the central area in the open field arena. However, the sham group stayed more time in the central area. Avoidance of central arena is indicative of anxiety in rodents (Prut and Belzung, 2002). Anxiety is strongly associated with chronic pain, leading to postulate that NPP can be an expression of chronic post-traumatic stress disorder (Otis et al., 2003; Grande et al., 2004).

We also showed that the CCI of the sciatic nerve (single or four ligatures) increased the time of immobility in the forced swimming test suggesting a depression-like behaviour (Porsolt et al., 2001; Lucki, 1997). Coexistence of chronic pain and depression is due to the overlapping of neural substrates, neurotransmitter and pathophysiological mechanisms (Geisset et al., 2000, Bair et al., 2005; Li, 2015). Apart from the development of psychiatric comorbidities, such as depression and anxiety, NPP is also associated with cognitive impairments (Kreitler, 2007; Elliot, 1999). CCI by either a single or four ligatures causes impairments in the recognition of new objects in present study according to a previous study (Low et al., 2012).

The present adaptation of the classical model by Bennett and Xie (1988), using only one ligature around the sciatic nerve with chromic catgut, was able to induce neuropathy without significant motor performance impairments and autotomy behaviour. 20% of CCI rats that were performed by the classical model proposed by Benett and Xie showed autotomy behaviour. It was proposed in the current investigation the adapted from the single ligature of the sciatic nerve also produced affective and cognitive impairments like behaviours as monitored in the open field, swimming forced and object recognition tests, twenty-one days after surgery in Wistar rats. Then, adapted CCI model is an animal model to study chronic pain and psychiatric disorders comorbidities.

Acknowledgments

This research was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Grant Research: 2013/12916-0 and Multi-user Equipment Grant: 2014/11869-0). Renato Leonardo de Freitas was supported by FAPESP (Scientific Initiation Scholarship: 2001/03752-6, M.Sc. fellowship: 2003/05256-1, post-doctoral fellowship 2009/17258-5, and researcher fellowship: 2014/07902-2) and CAPES (Sc.D. Fellowship). FAPESP supported Priscila de Medeiros (Sc. D. fellowship process 2012/25167-2). Norberto Cysne Coimbra is a researcher (level 1A) from CNPq (processes 301905/2010-0 and 301341/2015-0). Sérgio Henrique Ferreira was

supported by FAPESP (Thematic project processes 2011/19670-0, and 2013/08216-2; Centre for Research in Inflammatory Diseases-CRID), by the University of São Paulo Pro-Rector (process NAP-DIN 11.1.21625.01.0). Dr. Sabatino Maione and Enza Palazzo were supported by Regione Campania (FarmaBioNet process FESR 2007-2013 – 00 2.1).

References

Allchorne AJ, Broom DC, Woolf CJ (2005). Detection of cold pain, cold allodynia and cold hyperalgesia in freely behaving rats. *Mol Pain* 14:1-36.

Alves ND, Santos TJT, Castro-Costa SB, Castro-Costa AMB, Feijó FMC, Castro-Costa CM (2010). Comportamentos espontâneos e induzidos em ratos com dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático. *Revista Dor* 11:55-62.

Asmundson GJ, Norton GR, Jacobson SJ (1996). Social, blood/injury, and agoraphobic fears in patients with physically unexplained chronic pain: are they clinically significant? *Anxiety* 2:28-33.

Attal N, Jazat F, Kayser V, Guilbaud G (1990). Further evidence for pain-related behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain* 41:235-251.

Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K (2003). Depression and pain comorbidity: a literature review. *Archives of Internal Medicine* 163:2433-2445.

Belzung C. Measuring exploratory behavior. In: WE Crusio, RT Gerlai (Eds.), *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)*, Elsevier, Amsterdam (1999), pp. 739-749.

Bennett GJ, Xie YK (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33:87-107.

Bennett GJ (1999). New frontiers in mechanisms and therapy of painful peripheral neuropathies. *Acta Anaesthesiol Sin* 37:197-203.

Bruffaerts R, Demyttenaere K, Kessler RC, Tachimori H, Bunting B, Hu C, Florescu S, Haro JM, Lim CC, Kovess-Masfety V, Levinson D, Medina Mora ME, Piazza M, Piotrowski P, Posada-Villa J, Salih Khalaf M, Ten Have M, Xavier M, Scott KM (2015) The associations between preexisting mental disorders and subsequent onset of chronic headaches: a worldwide epidemiologic perspective. *J Pain* 16: 42-52.

Caggiano V, Sur M, Bizzi E (2014). Rostro-caudal inhibition of hindlimb movements in the spinal cord of mice. *PLoS ONE* 9, e100865.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55-63.

Chapman CR (1990). The psychophysiology of pain, In: J.J. Bonica (ed), *The Management of Pain*, 2nd Edn, Lea and Fibiger, Philadelphia, pp 461-477.

de Freitas RL, Salgado-Rohner CJ, Biagioni AF, Medeiros P, Hallak JE, Crippa JA, Coimbra NC (2014). NMDA and AMPA/kainate glutamatergic receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex modulate the elaborated defensive behavior and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the medial hypothalamus. *Cereb Cortex* 24:1518-28.

- de Freitas RL, Medeiros P, Khan AU, Coimbra NC (2016). $\mu 1$ -Opioid receptors in the dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal grey matter are critical for the enhancement of post-ictal antinociception. *Synapse* 70:519-530.
- de Freitas RL, Medeiros P, da Silva JA, de Oliveira RC, de Oliveira R, Ullah F, Khan AU, Coimbra NC (2016). The $\mu 1$ -opioid receptor and 5-HT_{2A}- and 5HT_{2C}-serotonergic receptors of the locus coeruleus are critical in elaborating hypoalgesia induced by tonic and tonic-clonic seizures. *Neuroscience* 336:133-145.
- Dias QM, Rossaneis AC, Fais RS, Prado WA (2013). An improved experimental model for peripheral neuropathy in rats. *Braz J Med Biol Res* 46:253-256.
- Elliott AM, Smith BH, Hannaford PC, Smith WC, Chambers WA (2002). The course of chronic pain in the community: results of a 4-year follow-up study. *Pain* 99:299-307.
- Elliott AM, Smith BH, Penny KI, Smith WC, Chambers WA (1999). The epidemiology of chronic pain in the community. *Lancet* 354:1248-1252.
- Eriksen J, Ekholm O, Sjogren P, Rasmussen NK (2004). Development of and recovery from long-term pain. A 6-year follow-up study of a cross-section of the adult. Danish population. *Pain* 108:154-162.
- Freitas RL, Uribe-Mariño A, Castiblanco-Urbina MA, Elias-Filho DH, Coimbra NC (2009). GABA(A) receptor blockade in dorsomedial and ventromedial nuclei of the hypothalamus evokes panic-like elaborated defensive behaviour followed by innate fear-induced antinociception. *Brain Res* 1305:118-31.
- Freitas RL, Salgado-Rohner CJ, Hallak JE, Crippa JA, Coimbra NC (2013). Involvement of prelimbic medial prefrontal cortex in panic-like elaborated defensive behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei: role of the endocannabinoid CB1 receptor. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:1781-1798.
- Geisser ME, Roth RS, Theisen ME, Robinson ME, Riley 3rd JL (2000). Negative affect, self-report of depressive symptoms, and clinical depression: relation to the experience of chronic pain. *Clin J Pain* 16:110-120.
- Grande LA, Loeser JD, Ozuna J, Ashleigh A, Samii A (2004). Complex regional pain syndrome as a stress response. *Pain* 110: 495-498.
- Gureje O, von Korff M, Simon GE, Gater R (1998). Persistent pain and well-being: a World Health Organization study in primary care. *JAMA*: 280:147-151
- Heer EW, Gerrits MM, Beekman AT, Dekker J, van Marwijk HW, de Waal MW, Spinhoven P, Penninx BW, van der Feltz-Cornelis, C. M (2014). The association of depression and anxiety with pain: a study from NESDA. *PLoS One* 9: e106907
- Hu B, Doods H, Treede RD, Ceci A. 2009. Depression-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the CB2-selective agonist GW405833. *Pain* 143: 206-212.
- Institute of Medicine (IOM) *Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research*. The National Academies Press; Washington, DC: 2011.
- Irintchev A, Simova O, Eberhardt KA, Morellini F, Schachner M (2006). Impacts of lesion severity and tyrosine kinase receptor B deficiency on functional outcome of femoral nerve injury assessed by a novel single-frame motion analysis in mice. *Eur J Neurosci* 22:802-808.
- Jarvis MF, Boyce-Rustay LM (2009). Neuropathic pain: models and mechanisms. *Curr Pharm Des* 15:1711-1716.

- Kim KJ, Yoon YW, Chung JM (1997). Comparison of rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* 113:200-206.
- Knaster P, Karlsson H, Estlander AM, Kalso E Psychiatric disorders as assessed with SCID in chronic pain patients: the anxiety disorders precede the onset of pain. *Gen Hosp Psychiatry*. 34(1):46-52.
- Kreitler S, Niv D (2007). Cognitive impairment in chronic pain. *Pain: Clinical Updates* 15:1-4.
- Kruspe M, Thieme H, Guntinas-Lichius O, Irintchev A (2014). Motoneuron regeneration accuracy and recovery of gait after femoral nerve injuries in rats. *Neuroscience* 280:73-87.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926.
- Lee BH, Won R, Baik EJ, Lee SH, Moon CH (2000). An animal model of neuropathic pain employing injury to the sciatic nerve branches. *NeuroReport* 11:657-661.
- Li JX (2015). Pain and depression comorbidity: a preclinical perspective. *Behav Brain Res* 276:92-98.
- Low LA, Millicamps M, Seminowicz DA, Naso L, Thompson SJ, Stone LS, Bushnell MC (2012). Nerve injury causes long-term attentional deficits in rats. *Neurosci Lett* 529:103-107.
- Lucki I (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 8:523-532.
- Madhukar H, Trivedi MD (2004). The Link Between Depression and Physical Symptoms. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 6: 12-16.
- Meyer-Rosberg K, Burckhardt CS, Huizar K, Kvarnstrom A, Nordfors LO, Kristofferson A (2001). A comparison of the SF-36 and Nottingham Health Profile in patients with chronic neuropathic pain. *Eur J Pain* 5:391-403.
- Nirogi R, Goura V, Shanmuganathan D, Jayarajan P, Abraham R (2012). Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 66:8-13.
- Ohayon MM, Schatzberg AF (2003). Using chronic pain to predict depressive morbidity in the general population. *Arch Gen Psychiatry* 60:39-47.
- Otis JD, Keane TM, Kerns RD (2003). An examination of the relationship between chronic pain and post-traumatic stress disorder. *J Rehabil Res Dev* 40:397-405.
- Portenoy RK, Ugarte C, Fuller I, Haas G (2004). Population-based survey of pain in the United States: differences among white, African American, and Hispanic subjects. *J. Pain* 5:317-328.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229:327-336.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1978). "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51: 291-294.
- Procacci P, Zoppi M, Maresca M (1979). Experimental pain in man. *Pain* 6:123-140.
- Prut L, Belzung C (2002). The open field as a paradigm to measure the effect of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3-33.

- Reitsma M, Tranmer JE, Buchanan DM, Vanderkerkhof EG (2012). The epidemiology of chronic pain in Canada men and women between 1994 and 2007: Results from the longitudinal component of the National Population Health Survey. *Pain Research and Management* 17:166-172.
- Reuler JB, Girard DE, Nardone DA (1980). The chronic pain syndrome: misconceptions and management. *Ann Intern Med* 93:588–596.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205– 218.
- Shaw WS, Means-Christensen AJ, Slater MA, Webster JS, Patterson TL, Grant I, Garfin SR, Wahlgren DR, Patel S, Atkinson JH.(2010). Psychiatric disorders and risk of transition to chronicity in men with first onset low back pain. *Pain Med.*11(9):1391-400.
- Turner JA, Romano JM (1990). Psychological and psychosocial evaluation, In: J.J. Bonica (ed), *The Management of Pain*, 2nd Ed, Lea and Fibiger, Philadelphia, PA, pp 229–341.
- Twardowschy A, Castiblanco-Urbina MA, Uribe-Mariño A, Biagioni AF, Salgado-Rohner CJ, Crippa JA, Coimbra NC (2013). The role of 5-HT1A receptors in the anti-aversive effects of cannabidiol on panic attack-like behaviors evoked in the presence of the wild snake *Epicrates cenchria crassus* (Reptilia, Boidae). *J Psychopharmacol* 27:1149-1159.
- Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, Tomkiewicz MM (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 7:103 –113.
- Wang LX, Wang ZJ (2003). Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Rev* 55:949- 965.
- Willner P (1984). Cognitive functioning in depression: a review of theory and research. *Psychol Med* 14:807-823.
- Wu LJ, Toyoda H, Zhao MG, Lee YS, Tang J, Ko SW, Jia YH, Shum FW, Zerbinatti CV, Bu G, Wei F, Xu TL, Muglia LJ, Chen ZF, Auberson YP, Kaang BK, Zhuo M (2005). Upregulation of forebrain NMDA NR2B receptors contributes to behavioral sensitization after inflammation. *J Neurosci* 25:11107-11116.
- Velly AM, Mohit SM (2017). Epidemiology of pain and relation to psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* S0278-5846(17)30194-X.
- Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16: 109-110.
- Zimmermann M (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:23–37.

Zhuo M (2008). Cortical excitation and chronic pain. Trends in Neurosciences 31:199-207.

Manuscript 2: Submetido para Experimental Neurology

Original article

The prelimbic medial prefrontal cortex plays a role in the maintenance of chronic neuropathic pain by NMDA receptor activation

Running title: Role of the prelimbic cortex in neuropathic pain

Medeiros, P.1,2,3; Negrini-Ferrari, S.E.1,2; Palazzo, E.5; Maione, S.1,5; Ferreira, S.H.4†;

de Freitas, R.L.1,2,3,6**; Coimbra, N.C.1,2,3,6*

1Multiuser Centre of Neuroelectrophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

2Laboratory of Pain and Emotions, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

3Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

4Laboratory of Inflammation and Pain, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil. † In memoriam.

5Department of Experimental Medicine, Division of Pharmacology, University of Campania “L. Vanvitelli”, Naples, Italy.

6Behavioural Neurosciences Institute (INeC), Av. do Café, 2450, Ribeirão Preto (SP), 14050-220, Brazil.

Corresponding authors: Prof. Dr Norberto Cysne Coimbra and Dr Renato Leonardo de Freitas

*Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. nccoimbr@fmrp.usp.br

**Laboratory of Pain and Emotions and Multiuser Centre of Neuroelectrophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. defreitas.rl@gmail.com

Abstract

Background: The enzymes cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 (COX-1 and COX-2) are implicated in the inflammatory process associated with the development of neuropathic pain (NPP). The mechanisms underlying the NPP process involve peripheral and central sensitisation. Aims: The aim of this work was to investigate the participation of the prelimbic (PrL) division of the medial prefrontal cortex (mPFC) in the genesis and maintenance of NPP, as well as the role of NMDA receptors in NPP induced by an adaptation of Bennett and Xie's model of chronic constriction injury (CCI) of the nervus ischiadicus (sciatic nerve), which we generated

by placing a single loose ligature around the nerve. We also investigated the activity of COX-1 and COX-2 in the induction and maintenance of NPP. Methods: The non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) indomethacin (2 mg/kg, i.p.) was administered for 1, 2, 4, 7, 14, 21 or 28 days, starting the day after the CCI or sham procedure. Vehicle (200 nL) or cobalt chloride (1.0 mM/200 nL), a synapse blocker, was also administered in the ipsilateral or contralateral PrL cortex at 7, 14, 21, or 28 days after the CCI or sham procedure. During the late phase (21 days after CCI), the PrL cortex was treated with 200 nL of saline (NaCl 0.9%), N-methyl-D-aspartate (NMDA) (at 0.25, 1 or 4 nmol) or LY235959 (2, 4 or 8 nmol); NMDA and LY235959 are an NMDA receptor agonist and antagonist, respectively. Mechanical allodynia was measured with von Frey filaments. Results: Indomethacin reduced mechanical allodynia on days 1 and 4 after CCI. Synaptic blockade by cobalt chloride in the ipsilateral or contralateral PrL cortex decreased mechanical allodynia at days 21 and 28 after CCI. The microinjection of NMDA, at the higher concentrations of 1 and 4 nmol, increased the mechanical allodynia threshold during the von Frey test, whereas the antagonist LY235959 decreased mechanical allodynia when microinjected at the highest dose (8 nmol). Conclusions: These findings suggest that COX-1 and COX-2 are involved in the induction but not in the maintenance of NPP. Our data also indicate that the PrL cortex participates in enhancing the late phase of mechanical allodynia in our adapted model of NPP. The glutamatergic system potentiates chronic NPP by NMDA receptor activation in the PrL cortex.

Keywords: COX-1 and COX-2; non-steroidal anti-inflammatory drug; neuropathic pain; mechanical allodynia; prelimbic cortex; cobalt chloride; glutamatergic system; NMDA receptors

Introduction

The incidence rate of chronic pain in the world is approximately 8% (Eriksen et al., 2004, Elliott et al., 2002, Reitsma et al., 2012, Velly and Mohit, 2017). The prevalence of neuropathic pain (NPP) is estimated to be between 1% and 23% (Velly and Mohit, 2017). The Institute of Medicine reported that 100 million Americans suffer from chronic pain at a cost of \$600 billion (2011).

NPP is related to the reaction of the nervous system tissue to neural damage. NPP can be induced by lesions of the peripheral nervous system (PNS) caused by tumour invasion, metabolic diseases, infection, neurotoxic chemicals or mechanical trauma leading to pathophysiological changes in either the PNS or the central nervous system (CNS) (Woolf and Mannion 1999, Dworkin et al. 2003). Pain is a signal to prevent further lesion or to avoid tissue injury. The genesis and duration of chronic pain are critically different from those of acute pain, and the underlying mechanisms of chronic pain need to be more intensely studied (Wang and Wang, 2003).

Animal models of sciatic nerve injuries have been used to investigate the mechanisms underlying NPP (Bennett and Xie, 1988; Seltzer et al., 1990; Kim and Chung, 1992; Dias et al., 2013; Medeiros et al., 2017, submitted) and to test the effectiveness of potential analgesics. Non-selective and selective cyclooxygenase (COX) inhibitors are partially effective in reducing NPP symptoms induced by partial sciatic nerve transection (Syriatowicz et al., 1999), indicating that pro-inflammatory prostaglandins are involved in NPP.

Cortical brain regions such as the rostral divisions of the frontal lobe have also been implicated in the amplification of NPP. In fact, the medial prefrontal cortex (mPFC) is involved in signalling the unpleasantness of pain (Lorenz et al., 2002), and the anterior cingulate cortex (ACC) is implicated in the affective component of pain (Rainville et al., 1997). The ACC and mPFC are also involved in the anticipation of pain (Porro et al., 2002), and the prelimbic (PrL) division of the mPFC contributes to innate fear-induced antinociception (de Freitas et al., 2013b, 2014a).

In addition, Falconi-Sobrinho et al. (2017) showed that pretreatment of the ACC with lidocaine decreased the proaversive and antinociceptive effects evoked by GABAA receptor blockade in the hypothalamus, which suggests that there may be descending excitatory pathways from the former region to the latter. In addition, the mPFC has different functions that can result in different types of behavioural reactions. Wang and collaborators (2015) have shown that bilateral or contralateral lesion of the PrL of the mPFC

increased the paw withdrawal threshold in animals with chronic inflammatory lesions. In fact, studies have consistently shown that glutamatergic synapses not only play a significant role in sensory transmission, including pain and itch transmission, but also contribute to nociceptive sensitisation at different levels of the brain (Zhuo, 2008).

Current pharmacological treatments focused on neurochemical modifications at the spinal cord level fail to decrease chronic pain, are often followed by adverse side effects, and decrease in efficacy over time. However, recent studies have focused on molecular and functional changes within brain regions associated with pain modulation and the development of NPP. In fact, synaptic plasticity within key cortical areas is involved in pain facilitation in the context of NPP (Zhuo et al., 2008).

In the present study, we evaluated whether indomethacin, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that inhibits cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1 and COX-2), attenuates mechanical allodynia in an adapted CCI model (Bennett and Xie, 1988; Medeiros et al., 2017, submitted) of NPP, generated by placing a single loose ligature around a peripheral nerve. Moreover, we investigated the involvement of the PrL cortex in the development of NPP. For that purpose, we microinjected a synapse blocker, cobalt chloride (CoCl₂), into the PrL cortex and monitored mechanical allodynia until 28 days after CCI surgery in Wistar rats. In addition, we investigated the involvement of NMDA glutamate receptors localised in the PrL mPFC in the development of mechanical allodynia 21 days after CCI in a chronic NPP model.

Materials and methods

Animals and housing conditions

Male Wistar rats from the animal care facility of the University of São Paulo (USP; Campus of Ribeirão Preto) were used. The animals were housed in groups of four in Plexiglas-walled cages and were given free access to food and water throughout the experiment. The housing room was kept at a constant room temperature (22±1°C) and illuminated on a fixed light-dark cycle (lights on 07:00-19:00 h). All protocols were in compliance with the recommendations of the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CETEA) of the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP) (process 015/2005 and NEW PROCESS), which agree with the animal research ethics adopted by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA) and with the International Association for the Study of Pain (IASP) guidelines for pain research on animals (Zimmermann, 1983). Each animal was used in only a single experimental group, and all efforts were made to minimise their discomfort.

Neuropathic pain (NPP) induction

An adapted model of chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve (Bennett and Xie, 1988) was used to induce NPP. A single ligature consisting of a chromic catgut suture was loosely placed around the right sciatic nerve (see Medeiros et al., 2017 submitted). Each animal in turn was anaesthetised with a mixture of ketamine (União Química Farmacêutica Nacional, Brazil) and xylazine (Hertape/Calier, Juatuba, Minas Gerais, Brazil) (92 mg/kg and 9.2 mg/kg, respectively, i.p.). The right hind leg was shaved and moistened with a disinfectant, and the common sciatic nerve was exposed at mid-thigh level by blunt dissection through the biceps femoris. Then, proximal to the sciatic trifurcation, approximately 7 mm of the nerve was freed of adhering tissues, and one loose ligature made of a 4.0 chromic gut or 4.0 braided silk suture was placed around the nerve with approximately 1 mm spacing between loose ligatures. The wound was then closed by suturing the muscle with chromic catgut in a continuous suture pattern. Sham surgery was performed by exposing the sciatic nerve as described above, without ligation. The animals were then transferred to their home cages and left to recover.

Measurement of mechanical allodynia

Mechanical allodynia was assessed by von Frey filaments (Stoelting, Chicago, IL, USA). Each animal was placed in a transparent acrylic cage (22 x 16.5 x 14 cm) with a wire-grid floor for approximately 20 min to allow behavioural acclimation to the novel environment before testing. Von Frey filaments were then applied through the mesh floor in ascending order from 10 to 100 g to the plantar surface at the centre of the paw or the base of the third or fourth toe of the injured and uninjured hindpaw for approximately 3–4 s per filament to induce the withdrawal reflex. The time interval before the application of the next filament was at least 10 s. The data were expressed as mechanical withdrawal thresholds (MWTs) in grams. MWT was evaluated before and after CCI or sham surgery and before and after pharmacological treatments. The test was repeated three times for both hind paws (ipsilateral and contralateral paws were tested in alternation) with an interval of at least 2 min between measurements. Before surgery, it was confirmed that there were no differences in the basal responses of the right and left paws (von Frey, 1896; Vivancos et al., 2004).

Systemic drug administration

Indomethacin (2 mg/kg) or vehicle was administered i.p. for different durations (1, 2, 4, 7, 14, 21 and 28 days) after CCI or sham surgery (day 0). Mechanical allodynia was measured 40 min after i.p. drug or vehicle administration, as well as 15 and 30 min after the first measurement.

Stereotaxic surgery for PrL cortex infusions

A stainless steel guide cannula (outer diameter 0.6 mm, inner diameter 0.4 mm) was implanted in the PrL division of the mPFC in the CCI and sham groups of rats 7, 14 or 21 days after the CCI or sham procedure. Immediately after the baseline MWT was recorded, the animals were anaesthetised as previously described (2.2) and fixed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, California, USA). Subsequently, a guide cannula was fixed to the skull with acrylic resin and two stainless steel screws above the PrL cortex (anterior–posterior, +1.2 mm from bregma; medial–lateral, ± 0.5 mm from bregma; dorsal–ventral, 2.6 mm from the skull) (Paxinos and Watson, 1997). At the end of the surgery, each guide cannula was sealed with a stainless steel wire to protect it from obstruction.

Blockade of synaptic contacts on neurons situated in the PrL cortex

Pretreatment with 200 nL of vehicle (physiological saline) or CoCl₂ (1.0 mM) (Reestel et al., 2005; de Freitas et al., 2013a,b, 2014b, 2016) was carried out at 7, 14, 21 or 28 days after the CCI or sham procedure to evaluate the involvement of the PrL cortex in the acute and chronic stages of NPP development. In another group of CCI or sham rats, saline or CoCl₂ was microinjected into the PrL cortex ipsilateral or contralaterally to the leg surgery (right side). The microinjection was made through a thin dental needle (Mizzy, outer diameter 0.3 mm), linked by a polyethylene tube to a 1.0 μ L hand-driven syringe (Hamilton) and inserted through the guide cannula until its lower end was 1 mm below the tip. The needle was left in place for an additional 1 minute after the injection. CoCl₂ or vehicle was administered over the course of 5 minutes, and mechanical allodynia was measured at 0, 15, 30, 45 and 60 minutes after the infusion was finished. The time point of 0 min marks the end of the 5-minute PrL cortex pretreatment.

Role of NMDA receptors situated in the PrL cortex

Treatment of the PrL cortex with 200 nL of vehicle or different concentrations of the NMDA receptor agonist (at 0.25, 1 or 4 nmol) or the NMDA receptor antagonist LY235959 (at 2, 4 or 8 nmol) was carried out 21

days after the CCI or sham procedure to evaluate the involvement of NMDA receptors in mechanical allodynia in the chronic stage of NPP. The drugs and vehicle were infused into the PrL cortex contralateral to the surgery (right side). Each drug or vehicle was administered over the course of 5 min, and mechanical allodynia was measured at 0, 15, 30, 45 and 60 min after the infusion was finished. The time point of 0 min marks the end of the 5-min PrL cortex pretreatment.

Histological analysis

After testing, the rats were anaesthetised as previously described (2.2) and perfused through the left ventricle with cold, oxygen-enriched, Ca⁺⁺-free Tyrode's buffer (40 mL at 4°C) and ice-cold paraformaldehyde [200 mL, 4% (w/v) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3) for 15 min at a pressure of 50 mmHg with a perfusion pump (Master Flex® L/STM peristaltic tubing pump, East Bunker Court Vernon Hills, Illinois, USA). The brainstem was quickly sectioned, removed and immersed in fresh fixative for 4 h at 4°C. It was then rinsed for at least 12 h each in 10% and 20% sucrose dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C. Tissue pieces were immersed in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), frozen on dry ice, embedded in Tissue-Tek O.C.T., and cut with a cryostat (CM 1950 Leica, Wetzlar, Germany) at -22°C. Slices were subsequently mounted on glass slides (coated with chrome alum gelatin to prevent detachment) and stained with haematoxylin-eosin by using an Autostainer (CV 5030 Autostainer XL, Leica, Wetzlar, Germany). The positions of the guide cannula tips were defined according to the Paxinos and Watson atlas (2007) under a motorised photomicroscope (AxioImager Z1; Zeiss, Oberkochen, Germany). Statistical analysis was performed exclusively with data from the animals in which evidence showed that the microinjection into PrL cortex had been successfully carried out.

Drugs

Indomethacin (2 mg/kg) (Sigma) was diluted in Tris/HCl (2-amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol/hydrochloric acid) buffer, pH 8.0. CoCl₂ (1.0 mM/0.2 nL, Sigma) was administered in the right or left hemisphere of the PrL cortex; sterile 0.9% NaCl was microinjected into the PrL cortex as a control. N-methyl-D-aspartate (NMDA agonist; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the NMDA antagonist receptor LY235959 (Tocris, USA) were diluted in sterile 0.9% NaCl and administered in the left hemisphere.

Analysis of results

The data are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). The mechanical allodynia results of the von Frey test were analysed by repeated measures ANOVA. In the case of a significant treatment-by-time interaction, one-way ANOVA was performed, followed by Duncan's post hoc test at each time interval. Repeated measures ANOVA uses the same conceptual framework as classical ANOVA followed by a Duncan post hoc test (de Freitas et al., 2013, 2014, 2016a,b).

Results

Effect of indomethacin on mechanical allodynia

Animals that underwent our adapted model of CCI (Bennett and Xie, 1988) by a single loose ligation of the sciatic nerve showed mechanical allodynia at 1, 2, 4, 7, 14, 21 and 28 days after CCI. The systemic administration of indomethacin (2 mg/kg, i.p.) was able to attenuate mechanical allodynia at 1, 2 and 4 days after CCI induction.

According to repeated measures ANOVA at day 1 after CCI, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,28)=18.89$; $p<0.0001$] and time [$F(4,25)=15.53$; $p<0.0001$], on MWT, as well as a significant treatment-by-time interaction [$F(12,71)=11.43$; $p<0.0001$]. There was a significant decrease in mechanical allodynia after indomethacin (2 mg/kg, i.p.) compared with the vehicle-treated group at the 15 min and 30 min time points ($P<0.05$), according to repeated measures ANOVA followed by Duncan's post hoc test (Fig. 1A).

At day 2 after CCI induction, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,25)=12.55$; $p<0.0001$] and time [$F(4,22)=5.70$; $p<0.05$] on MWT, as well as a significant treatment-by-time interaction [$F(12,62)=3.26$; $p<0.01$], according to repeated measures ANOVA. Treatment with indomethacin significantly attenuated mechanical allodynia ($p<0.05$, Duncan's post hoc test) (Fig. 1B) at 15 min after administration in CCI rats. Indomethacin also increased MWT at 15 min after administration in the sham group compared with the vehicle-treated sham group (Fig. 1B), and this effect was statistically significant.

At day 4, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,27)=16.43$; $p<0.0001$] and time [$F(4,24)=3.71$; $p>0.05$] on MWT, as well as a significant treatment-by-time interaction [$F(12,68)=4.63$; $p<0.0001$]. Indomethacin (2 mg/kg, i.p.) decreased mechanical allodynia at 15 and 30 min after administration (Duncan's post hoc test; $p<0.05$) (Fig. 1C).

At 7 days after CCI, analysis of MWT by repeated measures ANOVA showed significant effects of treatment [$F(3,28)=54.97$; $p<0.0001$] and time [$F(4,25)=4.25$; $p<0.05$], as well as a significant treatment-by-time interaction [$F(12,71)=4.28$; $p<0.0001$]; at 14 days after CCI, the analysis showed significant effects of treatment [$F(3,28)=27.56$; $p<0.0001$] and time [$F(4,25)=4.02$; $p<0.05$], as well as a significant treatment-by-time interaction [$F(12,71)=7.09$; $p<0.0001$]; at 21 days after CCI, there were significant effects of treatment [$F(3,24)=24.72$; $p<0.0001$] and time [$F(4,21)=3.28$; $p>0.05$], as well as a significant treatment-by-time interaction [$F(12,59)=7.05$; $p<0.0001$]. Indomethacin (2 mg/kg, i.p.) did not modify MWT in sham or CCI rats at day 7, 14 or 21 after surgery (Fig. 1D-F).

At 28 days after CCI, there were significant effects of treatment [$F(3,20)=10.81$; $p<0.0001$] and time [$F(4,17)=10.86$; $p<0.0001$] on MWT, as well as a significant treatment-by-time interaction [$F(12,47)=4.21$; $p<0.0001$], according to repeated measures ANOVA. The postsurgical baseline MWT values of sham rats treated with vehicle were significantly different from those of sham rats treated with indomethacin (2 mg/kg, i.p.) (Duncan's post hoc test, $p<0.05$) (Fig. 1G).

For indomethacin, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,29)=2.73$; $p>0.05$] and time [$F(4,26)=3.44$; $p<0.05$] on the MWT of the contralateral hind paw, as well as a significant treatment-by-time interaction [$F(12,74)=2.73$; $p>0.05$], according to repeated measures ANOVA followed by Duncan's post hoc test only at day 1 after sham or CCI procedure (Fig. 2A).

According to repeated measures ANOVA, the following effects on the MWT of the contralateral hind paw were nonsignificant: treatment [$F(3,28)=1.08$; $p>0.05$], time [$F(4,25)=4.43$; $p<0.05$] and treatment-by-time interaction [$F(12,71)=0.70$; $p>0.05$] on day 2 after CCI induction; treatment [$F(3,28)=1.68$; $p>0.05$], time [$F(4,25)=3.40$; $p<0.05$], and treatment-by-time interaction [$F(12,71)=0.88$; $p>0.05$] on day 4; treatment [$F(3,28)=0.47$; $p>0.05$], time [$F(4,25)=0.21$; $p>0.05$], and treatment-by-time interaction [$F(12,71)=0.32$; $p>0.05$] on day 7; treatment [$F(3,28)=0.88$; $p>0.05$] time [$F(4,25)=1.84$; $p>0.05$], and treatment-by-time interaction [$F(12,71)=0.79$; $p>0.05$] on day 14; treatment [$F(3,28)=0.47$; $p>0.05$]; time [$F(4,25)=0.21$; $p>0.05$], and treatment-by-time interaction [$F(12,71)=0.32$; $p>0.05$] on day 21; and treatment [$F(3,20)=2.37$; $p>0.05$], time [$F(4,17)=4.69$; $p>0.05$], and treatment-by-time interaction [$F(12,71)=2.47$; $p>0.05$] on day 28 (Fig. 2B-G).

Effect of synaptic blockade in the PrL cortex on the development of mechanical allodynia

To evaluate the involvement of ipsilateral PrL cortex in the genesis and maintenance of NPP induced by our adapted model of CCI, we microinjected CoCl₂ (1.0 mM/200 nL) into the PrL cortex (right hemisphere) at 7, 14, 21 or 28 days after the CCI or sham procedure (right hind paw).

According to repeated measures ANOVA, there were statistically significant effects of treatment [$F(1,23)=19.44$; $p<0.0001$] and treatment-by-time interaction [$F(5,19)=5.94$; $p<0.05$], but not of time [$F(15,53)=2.78$; $p<0.05$], on mechanical allodynia at day 7 after CCI induction and of treatment [$F(3,22)=12.98$; $p<0.0001$], time [$F(5,18)=9.23$; $p<0.0001$], and treatment-by-time interaction [$F(15,50)=3.98$; $p<0.0001$] on mechanical allodynia 14 days after CCI. Microinjection of CoCl₂ into the right PrL cortex did not significantly alter mechanical allodynia at day 7 or 14 after CCI induction in the right hind limb (Duncan post hoc test, $P>0.05$) (Fig. 4A-B).

Mechanical allodynia was also measured on the contralateral hind paw of the sham and CCI rats at 7 and 14 days after surgery. Microinjections of CoCl₂ (1.0 mM/200 nL) into the PrL cortex (right hemisphere) did not cause any significant change in MWT. There were no effects of treatment [$F(3,23)=0.37$; $p>0.05$], time [$F(2,22)=0.88$; $p>0.05$], or treatment-by-time interaction [$F(6,42)=0.69$; $p>0.05$] on the MWT of the contralateral hind paw at day 7 after CCI induction. At day 14 after CCI induction, there were no effects of treatment [$F(3,22)=2.75$; $p>0.05$], time [$F(3,20)=2.11$; $p>0.05$], or treatment-by-time interaction [$F(9,56)=1.07$; $p>0.05$], according to repeated measures ANOVA (Fig. 5A-B).

At day 21 after CCI, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,22)=25.26$; $p<0.0001$], time [$F(6,17)=3.96$; $p<0.05$], and treatment-by-time interaction [$F(18,47)=4.79$; $p<0.0001$]. Microinjection of CoCl₂ (1.0 mM/200 nL) into the right PrL cortex 21 days after CCI induction decreased mechanical allodynia from 5 to 30 min compared with CCI rats that received NaCl 0.9% in the PrL cortex (Duncan post hoc test; $P<0.05$) (Fig. 4C). However, there was no significant difference in MWT ($P>0.05$) for the contralateral hind paws of sham and CCI rats. Indeed, there were no statistically significant effects of treatment [$F(3,22)=3.22$; $p>0.05$], time [$F(6,17)=0.89$; $p>0.05$], or treatment-by-time interaction [$F(18,47)=0.70$; $p>0.05$] on mechanical allodynia (Fig. 5C).

At day 28 after CCI induction, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,20)=43.98$; $p<0.0001$], time [$F(6,15)=4.38$; $p<0.01$], and treatment-by-time interaction [$F(18,41)=5.99$; $p<0.0001$] on mechanical allodynia, according to repeated measures ANOVA. Synaptic blockade with CoCl₂ (1.0 mM/200 nL) in the right PrL cortex also decreased mechanical allodynia 21 days after CCI induction, suppressing MWT from 5 to 30 min after infusion compared with CCI rats that received physiological saline (200 nL) in the PrL cortex (Duncan post hoc test; $P<0.05$) (Fig. 4D). For the contralateral hind paws of sham and CCI rats, there was no significant effect of treatment [$F(3,20)=0.32$; $p>0.05$], of time [$F(5,16)=0.31$; $p>0.05$], or of treatment-by-time interaction [$F(15,44)=0.74$; $p>0.05$] on MWT 28 days after surgery, according to repeated measures ANOVA (Fig. 5D).

Effect of synaptic blockade in the contralateral PrL cortex on the development of mechanical allodynia

We also evaluated the participation of the contralateral PrL cortex in the genesis and maintenance of NPP. For that purpose, we microinjected CoCl₂ (1.0 mM/200 nL) into the PrL cortex of the left hemisphere at 7, 14, 21 and 28 days after the CCI or sham procedure (right hind paw).

There was no statistically significant effect of treatment [$F(3,20)=39.25$; $p<0.0001$], time [$F(5,16)=1.63$; $p>0.05$], or treatment-by-time interaction [$F(15,44)=1.48$; $p>0.05$] 7 days after CCI, whereas there were significant effects of treatment [$F(3,20)=539.62$; $p<0.0001$] and treatment-by-time interaction [$F(9,50)=3.07$; $p<0.01$], but not of time [$F(3,18)=1.31$; $p>0.05$], on mechanical allodynia 14 days after CCI induction. Microinjection of CoCl₂ (1.0 mM/200 nL) into the left PrL did not modify mechanical allodynia at 7 or 14 days after CCI induction (ipsilateral hind paw) (Duncan post hoc test; $P>0.05$) (Fig. 6A-B).

At 7 and 14 days after surgery, there were no significant differences in the MWT of the contralateral hind paw between sham and CCI rats (Duncan post hoc test; $P>0.05$). There were no statistically significant effects of treatment [$F(3,20)=2.05$; $p>0.05$], time [$F(4,17)=2.38$; $p>0.05$], or treatment-by-time interaction [$F(12,47)=0.68$; $p>0.05$] on mechanical allodynia at day 7 after CCI induction. Although there were no

significant effects of treatment [$F(3,20)=0.29$; $p>0.05$] or time [$F(5,16)=2.34$; $p>0.05$] or the interaction between treatment versus time on MWT, [$F(15,44)=0.92$ $p>0.05$] at day 14 after CCI induction (Fig. 7A-B).

At day 21 after sham or CCI procedures, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,26)=10.11$; $P<0.0001$], time [$F(6,21)=6.04$; $P<0.001$], and treatment-by-time interaction [$F(18,59)=3.83$; $P<0.0001$], according to repeated measures ANOVA. Microinjections of CoCl₂ (1.0 mM/200 nL) into the contralateral PrL cortex 21 days after CCI induction decreased mechanical allodynia at 5 to 30 min compared with that of CCI rats that received physiological saline in the contralateral PrL cortex (Duncan post hoc test; $P<0.05$) (Fig. 6C).

At day 28 after CCI induction, there was no statistically significant effect of treatment [$F(3,20)=8.26$; $p>0.05$] or time [$F(6,15)=6.20$; $p>0.01$] on mechanical allodynia and no interaction between treatment and time [$F(18,41)=3.45$; $p>0.001$], according to repeated measures ANOVA. However, synaptic blockade in the contralateral PrL cortex by local administration of CoCl₂ at 1.0 mM/200 nL 28 days after CCI induction decreased mechanical allodynia from 15 to 30 min compared with that of CCI rats that received saline in the contralateral PrL cortex, according to Duncan post hoc tests (Fig. 6D).

Mechanical allodynia was also measured for the contralateral hind paw at 21 and 28 days after sham or CCI surgery. According to repeated measures ANOVA, there was no significant effect of treatment [$F(3,27)=2.77$; $p>0.05$] or time [$F(6,22)=2.98$; $p>0.05$] and no significant interaction between those factors [$F(18,62)=0.82$; $p>0.05$] 21 days after CCI induction, and there was no effect of treatment [$F(3,20)=2.15$; $p>0.05$], time [$F(3,18)=3.09$; $p>0.05$], or treatment-by-time interaction [$F(9,50)=2.85$; $p<0.01$] 28 days after CCI induction; however, the MWT values at baseline and at 45 to 60 min were significantly different between the CCI group and the sham group, according to Duncan's post hoc analyses (Fig. 7 C-D).

Effect of an NMDA receptor agonist in the PrL cortex on the development of mechanical allodynia

Animals that underwent our adapted model of CCI by one loose ligation of the sciatic nerve showed mechanical allodynia at 21 days after the CCI procedure. Treatment of the PrL cortex increased the MWT at 21 days after CCI induction.

According to repeated measures ANOVA, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,26)=13.29$; $p<0.0001$] and time [$F(6,21)=38.43$; $p<0.0001$] on MWT, as well as a significant interaction between those factors [$F(18,59)=4.08$; $p<0.0001$]. There was a significant increase in mechanical allodynia in the ipsilateral paws after PrL treatment with the highest dose of NMDA (4 nmol) compared with the vehicle-treated group at the 5 min to 30 min time points ($P<0.05$), according to repeated measures ANOVA followed by Duncan's post hoc test. The intermediate dose of NMDA (1 nmol) made a statistically significant difference in MWT only at 15 min ($P<0.05$), and the lowest dose of NMDA (0.25 nmol) produced no significant difference from the control at any of the times analysed ($P>0.05$) (Fig. 8A). At 21 days after CCI induction, there was no significant effect of treatment [$F(3,26)=0.31$; $p>0.05$] or time [$F(6,21)=6.83$; $p<0.0001$] on the MWT of the contralateral hind paw and no significant treatment-by-time interaction [$F(18,59)=2.22$; $p>0.05$] according to repeated measures ANOVA (Fig. 8B).

Effect of an NMDA receptor antagonist in the PrL cortex on the development of mechanical allodynia

To evaluate the effect of NMDA receptor blockade, we pretreated the PrL cortex with LY235959 (at 2, 4 and 8 nmol) 21 days after the sham or CCI procedure and tested mechanical allodynia. PrL cortex pretreatment decreased the MWT at 21 days after CCI induction.

According to repeated measures ANOVA, there were statistically significant effects of treatment [$F(3,25)=8.68$; $p<0.0001$] and time [$F(6,20)=90.0$; $p<0.0001$] on MWT, as well as a treatment-by-time

interaction [$F(18.56)=35.56$; $p<0.0001$]. Compared with the vehicle-treated group, there was a significant decrease in mechanical allodynia at 0 to 30 min ($P<0.05$) in the ipsilateral paws after the PrL cortex was treated with the highest dose of LY235959 (8 nmol), according to repeated measures ANOVA followed by Duncan's post hoc test. The intermediate and lowest doses of LY235950 (4 and 2 nmol) produced no significant difference from their control at any of the times analysed ($P>0.05$) (Fig. 9A).

At 21 days after CCI, there was no significant effect of treatment [$F(3.25)=1.57$; $p>0.05$], time [$F(5.21)=2.39$; $p>0.05$], or treatment by time [$F(15.59)=0.71$; $p>0.05$] on the MWT of the contralateral hind paw for any dose, according to repeated measures ANOVA (Fig. 9B).

In addition, animals that underwent our sham procedure did not show mechanical allodynia at 21 days after surgery. Treatment of the PrL cortex did not change the MWT at 21 days. At that time point, repeated measures ANOVA showed that there was no significant effect of treatment [$F(2.17)=0.55$; $p>0.05$], time [$F(4.14)=6.75$; $p>0.05$], or their interaction [$F(8.26)=2.39$; $p>0.05$] on the MWT of the ipsilateral hind paw for any dose and no effect of treatment [$F(2.17)=0.35$; $p>0.05$], time [$F(6.12)=7.80$; $p>0.05$], or their interaction [$F(12.22)=3.63$; $p>0.05$] on the MWT of the contralateral paw (Fig. 10 A-B).

Discussion

The first finding of the study is that an adapted model of CCI using only one ligature around the sciatic nerve was able to produce mechanical allodynia in rats. Moreover, the NSAID indomethacin, a non-selective COX inhibitor, attenuated mechanical allodynia during the first stage of NPP development, days 1-4, in this model.

Indomethacin is a synthetic NSAID introduced in the early 1960s (Guyer, 1964) and initially utilised for the treatment of pain and inflammation from rheumatologic diseases. It exerts its antipyretic, analgesic and anti-inflammatory properties (Steinmeyer et al., 2000; Rainsford, 2007) by inhibiting the release and biosynthesis of prostaglandin, as discovered in the 1970s (Ferreira et al. 1971; Flower and Vane, 1974). In the current study, indomethacin attenuated mechanical allodynia until the fourth day after CCI induction, whereas it proved ineffective from seven to twenty-eight days after CCI. Thus, the unselective blockade of the enzymes COX-1 and COX-2 reduced the development but not the maintenance of NPP in our adapted model of CCI of the sciatic nerve in rats.

Von Frey monofilaments are widely used tools for the evaluation of mechanical allodynia (Chaplan et al., 1994), a characteristic sensory symptom associated with NPP. Tactile impulses from the periphery travel through the sensory pathways and reach the cerebral cortex, after which they become conscious and interpreted (Munger, 1982). In the current study, we evaluated the involvement of the PrL division of the mPFC in the genesis and maintenance of NPP. The local afferent neurons of the mPFC consist mainly of excitatory pyramidal cells (80–90% of the total local cortical neuron population), which, in turn, are modulated by local inhibitory GABAergic interneurons (10–20% of the total local cortical neuron population).

The mPFC is associated with cognitive and emotional functions, such as attention, decision-making responses, goal-directed behaviour, and working memory (Gusnard et al., 2001; Phelps et al., 2004). The mPFC is also involved in the cortical plastic changes associated with peripheral nerve injury and the central sequelae associated with NPP (de Novellis et al., 2011, Luongo et al., 2013). The mPFC is also reported to play a crucial role in chronic-pain-related affective disorders such as depression and anxiety, which frequently co-occur with chronic pain. The mPFC may represent the neural substrate of the interactions between chronic pain and affective disorders (Guida et al., 2015).

Indeed, our results showed that microinjection of the synaptic activity blocker CoCl₂ (Reestel et al., 2006, de Freitas et al., 2013a,b, 2014a, 2016) in either the contralateral or ipsilateral PrL cortex of CCI rats attenuated mechanical allodynia in the late stage of NPP, specifically, at days 21 and 28 after CCI. By contrast, CoCl₂ administration into the PrL cortex in either hemisphere had no activity at day 7 or day 14 after CCI.

The spinothalamic anterolateral system is a standard component of the ascending pain pathway, also processing temperature and protopathic sensations. Through those ascending projections, impulses originating in nociceptors located in the trunk and limbs travel through the contralateral spinothalamic tract and reach the sensory cortex. In addition to the connexions between the periphery and the central nervous system, there are commissural fibres that unite corresponding areas of the two cerebral hemispheres (Munger, 1982). In the present study, the CCI procedure was performed on the right hind paw, and considering that the ascending sensory pain pathways cross the median plane before the nociceptive information reaches the somatosensory cortex, it is of great importance to study the level of participation of the PrL division of the mPFC of both the right and left hemispheres in the modulation of NPP. The corpus callosum allows the harmonious transfer of information from one hemisphere to the other (Munger, 1982).

The synaptic activity blocker significantly decreased mechanical allodynia in at 21 and 28 days after the CCI procedure, regardless of the side – ipsilateral or contralateral – where it was microinjected into the PrL cortex. Thus, the PrL cortex seems to be crucially involved in the maintenance but not the development of NPP in our adapted model of NPP induced by single ligation of the sciatic nerve.

Regarding the mechanisms underlying NPP, molecular, cellular and functional alterations are observed at many sites in the pain matrix after peripheral nerve injury. In fact, there is a substantial increase in spontaneous ectopic activity in dorsal root ganglion (DRG) cell bodies and injured afferent sensory axonal fibres (Wall and Gutnick, 1974), and there are abnormal contacts between the sympathetic and sensory nervous systems (McLachlan et al., 1993), as well as changes in the spinal cord and brain neuronal substrates of pain. At the peripheral level, nerve injuries that drive NPP trigger sensitisation and may evoke long-term abnormal neural activity along primary afferent pathways (Basbaum et al., 2003; Zhuo et al., 2014). At the spinal cord level, dorsal horn neurons display potentiated excitatory responses and a lowered firing threshold in NPP conditions (Sandkuhler and Liu, 1998; Ikeda et al., 2006; Sandkuhler, 2007).

Aside from the peripheral alterations, extensive research has been conducted on the role of the cortex in chronic pain. Electrophysiological studies have shown that it is possible to observe changes in cortical function one hour after a spinal cord lesion and that this reorganisation of the cerebral cortex can lead to pathological consequences, such as phantom pain and NPP (Nardone et al., 2013). Additionally, neuroimaging studies showed that patients with NPP had modifications in areas related to the sensory and affective perception of pain, such as the thalamus, prefrontal cortex, amygdaloid complex, insula, and posterior parietal lobe (Geha et al., 2008; Gustin et al., 2010).

Our data demonstrated the involvement of the PrL cortex, and the activation of its glutamatergic receptors by NMDA pretreatment (at 1 and 4 nmol) decreased the mechanical allodynia threshold assessed by the von Frey test. In other words, NMDA activation worsened NPP in rodents after 21 days of CCI. Interestingly, the blockade of NMDA receptors in the neocortex caused an analgesic effect: treatment of the PrL cortex with the antagonist LY 235959 at the highest dose (8 nmol) decreased mechanical allodynia in animals with peripheral neuropathy.

Latremoliere and Woolf (2009) showed that NMDARs and other subtypes of glutamatergic receptors are involved in the induction and maintenance of persistent pain and induced sensitisation of the nociceptive pathway during inflammation and NPP. In addition, Wang and collaborators (2015) have shown that bilateral and contralateral lesion of the PrL region of the mPFC increased the paw withdrawal threshold in animals with chronic inflammatory lesions.

There is even further evidence that glutamatergic neurotransmission is involved in nociception, mediating chronic pain. Clinical data have shown that NMDA receptor antagonists can reduce both hyperalgesia and allodynia in NPP patients (Kristensen et al., 1992; Eide et al., 1994; Felsby et al., 1996). An explanation has been proposed by Wu and colleagues, who suggest that neuronal reorganisation associated with pain is expected on the basis of animal models of chronic pain; functional changes have been described in the primary somatosensory cortex and the anterior cortex of the cingulate gyrus in the form of upregulation of NMDA receptor subunits after peripheral inflammation (Wu et al., 2005a).

Nevertheless, the involvement of the mPFC during chronic pain may still seem paradoxical. Millecamps and collaborators showed that the mPFC is responsible for the analgesic effect induced by the administration of D-cycloserine, a NMDA receptor partial agonist, in an NPP model, and they showed that the area would be responsible for the modulation of pain (Millecamps et al., 2007). However, Millecamps and collaborators gave the microinjections in different regions of the mPFC [PrL and infralimbic (IL) divisions]. It is known that these divisions of the prefrontal cortex can be distinguished anatomically and functionally in rats (Heidbredera and Groenewegenb, 2003). In our present study, we specifically evaluated the involvement of the PrL division in pain perception.

In addition, the microinjection of an NMDA antagonist and a metabotropic glutamate receptor (mGluR) antagonist in the PrL and IL cortices increased mechanical allodynia (Giordano et al., 2012). Palazzo and colleagues (2015) also showed that the microinjection of an allosteric modulator of metabotropic receptors in the limbic cortex reverses NPP, as well as the cognitive deficits caused by it. Although these data contrast with the data obtained in the present study, it is important to mention that both the abovementioned groups examined the medial prefrontal cortex in its entirety and did not specifically target the PrL cortex, as we did in the present study. In addition, the cited studies used different models of NPP in their experimental approaches. This inconsistency reinforces the importance of our efforts to investigate the glutamatergic participation of the PrL region in our CCI model, adapted from Bennett and Xie (1988).

Furthermore, genetic and pharmacological studies have demonstrated the involvement of NMDA receptors containing the NR2B subunit in the anterior cingulate cortex and insular cortex. The overexpression of NR2B in the mouse forebrain causes an increase in the behavioural response to pain (Wei et al., 2001). Additionally, microinjection of an NMDA-NR2B antagonist into the cortex, especially the ACC or insular cortex (IC), produces an analgesic effect in rodents (Qiu et al., 2013; Wu et al., 2005b; Zhuo, 2009). According to biochemical and electrophysiological analyses, animals with peripheral inflammation show increases in expression of the NMDA NR2B subunit and NMDA-NR2B-mediated synaptic currents in the ACC (Xu et al., 2008).

Caveolin-1 has been identified to modulate the upregulation of NMDA receptors in response to injury (Yang et al., 2015). In freely moving mice, the increase in NR2B-containing receptors after inflammation contributed to enhanced NMDA receptor-mediated responses in the ACC (Yang et al., 2015; Zhuo, 2009). Similar findings have been made in the IC (Qiu et al., 2013). Peripheral nerve injury leads to the development of NPP, and the IC shows a long-term increase in the abundance of synaptic NMDA receptors. Such increases are not found with extrasynaptic NMDA receptors.

Furthermore, the increase in the abundance of NMDA receptors relies on phosphorylation of the GluN2B subunit at Tyr1472 by a pathway involving adenylyl cyclase subtype 1 (AC1), protein kinase A (PKA), and Src family kinases. Changes in NMDA receptor-mediated responses have also been reported in animals with cancer pain (Yanagisawa et al., 2010; Zhang et al., 2012), and functional inhibition of these receptors has an analgesic effect. In fact, excitatory synaptic transmission in the central nervous system is mainly mediated by glutamate.

At the level of the cortex, where pain perception is processed, glutamatergic synapses again play a major role in the storage and generation of long-term memory of pain. Interestingly, it seems that ionotropic and metabotropic glutamate receptors have different functions in the mPFC, which may explain the different results found in the literature. (Zhuo, 2014).

In conclusion, the effectiveness of indomethacin in reducing mechanical allodynia only in the early stage of NPP suggests that COX-1 and COX-2 activation are involved in the genesis but not in the maintenance of NPP. Considering that mechanical allodynia is a typical sensory symptom of NPP and that pain signals are processed by pathways ascending contralaterally from the spinal cord to the cerebral cortex, these findings suggest that a morphological reorganisation of the PrL division of the mPFC occurred, leading to the potentiation and maintenance of chronic pain. In an animal model of chronic pain, the blockade of NMDA receptors in the neocortex decreased chronic NPP, and glutamatergic activation through the NMDA receptors potentiated NPP.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (grant number: 2013/12916-0) and CNPPq (301341/2015-0). Neither of these funding sources had any role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication. The authors thank Daoud Hibriahim Elias-Filho, Ieda R. dos Santos, and Maria Rossatto for their expert technical assistance.

Funding

This research was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (Research Grant 2013/12916-0 and Multi-user Equipment Grant 2014/11869-0). Renato Leonardo de Freitas was supported by FAPESP (Scientific Initiation Scholarship 2001/03752-6, M.Sc. fellowship 2003/05256-1, post-doctoral fellowship 2009/17258-5, and researcher fellowship 2014/07902-2) and CAPES (Sc.D. fellowship). FAPESP supported Priscila de Medeiros (Sc.D. fellowship process 2012/25167-2). Norberto Cysne Coimbra is a researcher (level 1A) from CNPPq (processes 301905/2010-0 and 301341/2015-0). Sérgio Henrique Ferreira was supported by FAPESP (thematic project processes 2011/19670-0 and 2013/08216-2; Centre for Research in Inflammatory Diseases – CRID), the University of São Paulo Pro-Rector (process NAP-DIN 11.1.21625.01.0), the European Union Seventh Framework Programme (FP7-2007-2013; HEALTH-F4-2011-281608), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPPq, Brazil). Dr Sabatino Maione was supported by Regione Campania (FarmaBioNet process FESR 2007-2013 – 00 2.1).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning the work presented herein.

References

- Basbaum, A.I., et al., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 139, 267-284.
- Bennett, G.J., Xie, Y.K., 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 33, 87-107.
- Chaplan, S.R., et al., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci. Methods*. 53, 55-63.
- de Freitas, R.L., et al., 2016. The μ 1-opioid receptor and 5-HT_{2A}- and 5HT_{2C}-serotonergic receptors of the locus coeruleus are critical in elaborating hypoalgesia induced by tonic and tonic-clonic seizures. *Neuroscience*. 336, 133-145.
- de Freitas, R.L., et al., 2014a. NMDA and AMPA/kainateglutamatergic receptors in the prelimbic medial prefrontal cortex modulate the elaborated defensive-behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the medial hypothalamus. *Cereb. Cortex*. 24, 1518-1528.
- de Freitas, R.L., et al., 2014b. The role of dorsomedial and ventrolateral columns of the periaqueductal gray matter and in situ 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonergic receptors in post-ictal antinociception. *Synapse*. 68, 16-30.
- de Freitas, R.L., et al, 2013a. Neuroanatomical and neuropharmacological approaches to postictal antinociception-related prosencephalic neurons: the role of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors. *Brain Behav*. 3, 286-301.

- de Freitas, R.L., et al., 2013b. Involvement of medial prefrontal cortex on panic-like elaborated defensive behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the medial hypothalamus: Role of the encannabinoid CB1 receptor. In. *J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1781-1798.
- de Novellis, V., et al., 2011. The blockade of the transient receptor potential vanilloid type 1 and fatty acid amide hydrolase decreases symptoms and central sequelae in the medial prefrontal cortex of neuropathic rats. *Mol. Pain.* 17, 7-7.
- Dias, Q.M., et al., 2013. An improved experimental model for peripheral neuropathy in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46, 253-256.
- Dworkin, R.H., et al., 2003. Advances in NPP: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch. Neurol.* 60, 1524–1534.
- Eide, P.K., et al., 1994. Relief of post-herpetic neuralgia with the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist ketamine: a double-blind, cross-over comparison with morphine and placebo. *Pain.* 58, 347-354.
- Elliott, A.M., et al., 2002. The course of chronic pain in the community: results of a 4-year follow-up study. *Pain.* 99, 299-307.
- Eriksen, J., et al., 2004. Development of and recovery from long-term pain. A 6-year follow-up study of a cross-section of the adult. Danish population. *Pain.* 108, 154-162.
- Felsby, S., et al., 1996. NMDA receptor blockade in chronic NPP: a comparison of ketamine and magnesium chloride. *Pain.* 64, 283-91.
- Ferreira, S.H., et al., 1971. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nat. New. Biol.* 231, 237-239.
- Flower, R.J., Vane, J.R., 1974. Inhibition of prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Pharmacol.* 15, 1439-1450.
- Geha, P.Y., et al., 2008. Brain dynamics for perception of tactile allodynia (touch-induced pain) in postherpetic neuralgia. *Pain.* 138, 641-656
- Giordano, C., et al., 2012. TRPV1-dependent and -independent alterations in the limbic cortex of neuropathic mice: impact on glial caspases and pain perception. *Cereb. Cortex.* 22, 2495-2518.
- Guida, F., et al., 2015. Palmitoylethanolamide reduces pain-related behaviors and restores glutamatergic synapses homeostasis in the medial prefrontal cortex of neuropathic mice. *Mol. Brain.* 8-47.
- Gusnard, D.A., et al., 2001. Medial prefrontal cortex and self-referential mental activity: relation to a default mode of brain function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 4259–4264.
- Gustin, S.M., et al., 2010. Brain anatomy changes associated with persistent NPP following spinal cord injury. *Cereb. Cortex.* 20, 1409–1419.
- Guyer, P., 1964. To-days drugs: indomethacin. *Br. Med. J.* 2,429.
- Heidbreder, C.A., Groenewegenb, H.J., 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehavi. Rev.* 27, 555-579.
- Ikeda, H., et al., 2006. Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science.* 312, 1659-1662.
- Kim, S.H., Chung, J.M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain.* 50, 355-363.

- Kristensen, J.D., et al., 1992. The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. *Pain*. 51, 249-253.
- Latremoliere, A., Woolf, C.J., 2009. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J. Pain*. 10, 895-926.
- Lorenz, J., et al., 2002. A unique representation of heat allodynia in the human brain. *Neuron*. 35, 383–393.
- Luongo, L., et al., 2013. Role of metabotropic glutamate receptor 1 in the basolateral amygdala-driven prefrontal cortical deactivation in inflammatory pain in the rat. *Neuropharmacology*. 66, 317-329.
- McLachlan, E.M., et al., 1993. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature*. 363, 543-546.
- Millecamps, M., et al., 2007. D-cycloserine reduces NPP behavior through limbic NMDA-mediated circuitry. *Pain*. 132,108-23.
- Munger, B.L., 1982. Multiple afferent innervation of primate facial hairs--Henry Head and Max von Frey revisited. *Brain Res*. 257, 1-43.
- Nardone, R., et al., 2013. Functional brain reorganization after spinal cord injury: Systematic review of animal and human studies. *Brain Res*. 1504, 58-73.
- Palazzo, E., et al., 2015. MMPIP, an mGluR7-selective negative allosteric modulator, alleviates pain and normalizes affective and cognitive behavior in neuropathic mice. *Pain*. 156, 1060-1073.
- Paxinos, G., Watson, C., 1997. The rat brain in stereotaxic coordinates (London: Academic Press).
- Phelps, E.A., et al., 2004. Extinction learning in humans: role of the amygdala and vmPFC. *Neuron*. 43, 897–905.
- Porro, C.A., et al., 2002. Does anticipation of pain affect cortical nociceptive systems? *J. Neurosci*. 22, 3206–3214.
- Qiu, S., et al., 2013. An increase in synaptic NMDA receptors in the insular cortex contributes to NPP. *Sci. Signal*. 6, ra34.
- Rainsford, K.D., 2007. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell. Biochem*. 42, 3-27.
- Rainville, P., et al., 1997. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science*. 277, 968–971.
- Reitsma, M., et al., 2012. The epidemiology of chronic pain in Canada men and women between 1994 and 2007: Results from the longitudinal component of the National Population Health Survey. *Pain Res. Manag.*17, 166-172.
- Resstel, L.B., Corrêa, F.M., 2006. Medial prefrontal cortex NMDA receptors and nitric oxide modulate the parasympathetic component of the baroreflex. *Eur. J. Neurosci*. 23: 481-488.
- Sandkuhler, J., 2007. Understanding LTP in pain pathways. *Mol. Pain*. 3, 3-9.
- Sandkuhler, J., Liu, X., 1998. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *Eur. J. Neurosci*. 10, 2476-2480.
- Seltzer, Z., et al., 1990. A novel behavioral model of NPP disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 43, 205-218.

- Steinmeyer, J., 2000. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res.* 2, 379–385.
- Syriatowicz, J.P., et al., 1999. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. *Neuroscience*. 94, 587-594.
- Velly, A.M., Mohit, S., 2017. Epidemiology of pain and relation to psychiatric disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr.* S0278-846(17)30194-X.
- Vivancos, G.G., et al., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 391-399.
- von Frey, M., 1896. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. *Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften*, 23, 175-266.
- Wall, P.D., Gutnick, M., 1974. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp. Neurol.* 43, 580-593.
- Wang, G.Q., et al., 2015. Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. *Nat. Commun.* 6, 7660.
- Wang, L.X., Wang, Z. J., 2003. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 949-965.
- Wei, F., et al., 2001. Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat. Neurosci.* 4, 164-169.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J., 1999. NPP: a etiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet.* 353, 1959–1964.
- Wu, L.J., et al., 2005a. Upregulation of forebrain NMDA NR2B receptors contributes to behavioral sensitization after inflammation. *J. Neurosci.* 25, 11107-11116.
- Wu, L.J., et al., 2005b. Kainate receptor-mediated synaptic transmission in the adult anteriorcingulate cortex. *J. Neurophysiol.* 94, 1805-1813.
- Xu, H., et al., 2008. Presynaptic and postsynaptic amplifications of NPP in the anterior cingulate cortex. *J. Neurosci.* 28, 7445-7453.
- Yanagisawa, Y., et al., 2010. Bone cancer induces a unique central sensitization through synaptic changes in a wide area of the spinal cord. *Mol. Pain.* 6, 38.
- Yang, J.X., et al., 2015. Caveolin1 in the anterior cingulate cortex modulates chronic NPP via regulation of NMDA receptor 2B subunit. *J. Neurosci.* 35, 36-52.
- Zhang, R., et al., 2012. Intrathecal administration of roscovitine attenuates cancer pain and inhibits the expression of NMDA receptor 2B subunit mRNA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 102, 139-145.
- Zhuo, M., 2014. Long-term potentiation in the anterior cingulate cortex and chronic pain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 369, 20130146.
- Zhuo, M., 2009. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Mol. brain.* 2, 4.
- Zhuo, M., 2008. Cortical excitation and chronic pain. *Trends Neurosci.* 31, 199-207.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16, 109–110.

MECHANISMS AND EFFECTS

Manuscrito 3: referente ao estágio na Itália (em fase final de elaboração)

Electrophysiological and behavioural characterisation of cognitive and nociceptive aspects of pain using a modified model of peripheral neuropathic pain in mice.

Medeiros, P.^{1,2,3,;}; de Freitas, R.L.^{1,2,3,5**}; Coimbra, N.C.^{1,2,3,5}, Maione, S.^{1,4*}

¹Multiususer Centre of Neuroelectrophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

²Laboratory of Pain & Emotions, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

³Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

⁴Department of Experimental Medicine, Division of Pharmacology, University of Campania “L. Vanvitelli”, Naples, Italy.

⁵Behavioural Neurosciences Institute (INeC), Av do Café, 2450, Ribeirão Preto (SP), 14050-220, Brazil.

Corresponding authors: Prof Dr Renato Leonardo de Freitas* and Sabatino Maione **

*Laboratory of Pain and Emotions and Multiususer Centre of Neuroelectrophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. defreitas.rl@gmail.com

** Pharmacology Division, Department of Experimental Medicine, The Second University of Naples, via Costantinopoli 16, 80138 Naples, Italy. sabatino.maione@unina2.it

Abstract

Chronic constriction injury of sciatic nerve (CCI) is peripheral nerve injury model of neuropathic pain (NPP). The presence of NPP causes changes in a functional reorganisation in cortical structures including the medial prefrontal cortex (mPFC) which are also involved in the affective and emotional processing of the brain. Depression, anxiety, and cognitive deficit are well-known comorbidities of an NPP. Then, this work aimed to investigate the electrophysiological aspect and the changes amino acids concentrations of prelimbic division (PrL) of the mPFC. Moreover, we examine the alterations of sensory, affective, cognitive and motor using an adapted model of CCI. Mechanical allodynia by von Frey test was found from 7, 14 and 21 days compared to the pre-surgery CCI mice. Changes have been found in motor tasks assessment through motor coordination by rotarod test only 7 days after surgery compared to pre-surgery CCI mice; motor disorders by pole test 7, 14 and 21 days after surgery compared to pre-surgery CCI mice and gait performance by footprint test in stride length in the ipsilateral hind paw compared to sham mice. Electrophysiological aspects were investigated the PrL (mPFC) neurons with an ongoing activity that responded with excitation mPFC(+) or inhibition mPFC(-) to mechanical stimulation. Adapted CCI mice showed an increase in the spontaneous firing rate and frequency and duration of excitation mPFC (+) neurons were observed after mechanical stimulation. Also showed a decrease in the frequency of firing rate and a slight increase in the duration of inhibition in PrL mPFC (-) neurons. The amino acids levels during in vivo microdialysis showed GABA levels significantly increased, D-Aspartate levels resulted significantly decreased compared to SHAM animals. The levels of L-Aspartate and L-Glutamate in the PLC were not different. Adapted CCI mice induced an anxiety-related behaviour evaluated in marble burring test. The NPP increased the number of marbles buried and the number of digging events. And a significant increase in the duration of immobility related depression-like behaviour by tail suspension. The adapted neuropathy model does not alter cognitive performance. Altogether these findings demonstrate that the adapted CCI using a single ligature around the sciatic nerve induced alterations of sensory and affective disorder besides evoked disturbance in PrL cortex in electrophysiological aspect and the changes amino acids concentrations. Considering all the changes found, the adapted CCI are appropriate animal models to study pain and comorbidity.

Keywords: Chronic constriction injury, chronic neuropathic pain, cortical reorganisation, anxiety-like reactions, depression-associated behaviours.

Manuscrito 4: referente a Tese (em fase final de elaboração)

Glutamatergic, endocannabinoid and endovanilloid systems interacts into the prelimbic prefrontal cortex to signaling the chronic neuropathic pain

Medeiros, P.^{1,2,3}; Silva, M.O.^{1,2}; Palazzo, E.⁵; Maione, S.^{1,5};

Ferreira, S.H.^{4†}; Coimbra, N.C.^{1,2,3,6*}; de Freitas, R.L.^{1,2,3,6**}

¹Multiususer Centre of Neuroelettrophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

²Laboratory of Pain & Emotions, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

³Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14049-900, Brazil.

⁴Laboratory of Inflammation and Pain, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, São Paulo, Brazil.

⁵Department of Experimental Medicine, Division of Pharmacology, University of Campania “L. Vanvitelli”, Naples, Italy.

⁶Institute for Neuroscience and Behaviour (INeC), University of São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto (SP), 14040-901, Brazil.

Corresponding authors: **Prof. Dr Norberto Cysne Coimbra and *Dr Renato Leonardo de Freitas

*Laboratory of Neuroanatomy and Neuropsychobiology, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo (FMRP-USP), Av. dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

**Laboratory of Pain and Emotions and Multiususer Centre of Neurophysiology, Department of Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo, Av. dos Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

Running title: *Endocannabinoid, endovanilloid and glutamatergic interacts in the prelimbic cortex to signaling NPP.*

ABSTRACT

Background: Neuropathic pain (NPP) is a challenge due to our limited understanding of the mechanisms that initiate and maintain chronic pain. The medial prefrontal cortex (mPFC) is an important area for the emotional and cognitive components of pain and pharmacological systems can interact into the neocortex to elaborate the pain. **Methods:** Investigate the interactions between endocannabinoid (by CB₁ receptors), endovanilloid (by TRPV₁ receptors) and glutamatergic (by NMDA receptors) systems into the prelimbic division (PrL) of the mPFC in neuropathic rats 21 days after chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI) in rats. The von Frey's test was performed to evaluating the mechanical allodynia threshold (MWT)

during 60 minutes. **Results:** The AM251, a CB₁ antagonist receptors, decreased the MWT (at 50, 100 and 200pmol). The 6-ICPS (at 3nmol), a TRPV₁ antagonist receptors, increased the MWT. AEA agonist (at 50 and 100 pmol) increased the MWT. AEA at 200 pmol decreased the MWT, and this effect was blockaded by AM251 (at 200pmol). The analgesic effect of AEA (at 100pmol) was attenuated by 6-ICPS (at 3nmol). OLDA (at 10μM), a TRPV₁ receptors agonist, decreased the MWT. The NMDA receptor antagonist LY235959 (at 8nmol) reverted the hyperalgesic effect of OLDA. 6-ICPS (at3nmol) plus OLDA (at 10 μM) caused increased the MWT. NMDA (at 1nmol) altered the MWT. CB₁ blockade with AM251 (pmol) or TRPV₁ activation with AEA (at 200pmol) plus NMDA (at 1nmol) decreased the MWT. **Conclusions:** These findings suggest that PrL cortex is involved in the potentiation and maintenance of mechanical allodynia through activation of NMDA and TRPV₁ receptors and the effect of attenuating the mechanical allodynia is responsible by endocannabinoids CB₁ receptors in chronic NPP rodents.

Keywords: Chronic neuropathic pain; mechanical allodynia; prelimbic medial prefrontal cortex; endocannabinoid CB1 receptors; TRPV1 endovanilloid receptors; NMDA glutamatergic receptors;