Joyce Teixeira da Silva

Ressonância magnética e ativação neuronal supraespinal em modelo de dor neuropática crônica em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2016

Joyce Teixeira da Silva

Ressonância magnética e ativação neuronal supraespinal em modelo de dor neuropática crônica em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Marucia Chacur Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Amaro Jr.

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Dissertações e Teses da USP (BDTD);

São Paulo 2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Teixeira da Silva, Joyce Ressonância magnética e ativação neuronal supraespinal em modelo de dor neuropática crônica em ratos / Joyce Teixeira da Silva; orientadora Marucia Chacur; coorientador Edson Amaro Jr. --São Paulo, 2016. 82 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Dor neuropática. 2. Fator de Crescimento Neural. 3. Substância P. 4. Anti-NGF. 5. Ressonância magnética. I. Chacur, Marucia , orientador. II. Amaro Jr, Edson, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	
Título da Tese:	
Orientador(a):	
A Comissão J públi	lulgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão ica realizada a////, considerou () Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

5 E

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 011 nas fls. 02 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Marucia Chacur, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Ressonância magnética e ativação neuronal supraespinal em modelo de dor neuropática crônica em ratos" do qual participam o(s) aluno(s)Joyce Teixeira da Silva, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 10.05.2013, com validade de 4 anos.

São Paulo, 13 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador-CEUA - ICB/USP Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE Secretária- CEUA - ICB/USP

EXPEDIÇÃO DATA REL. N.º

Dedico este trabalho aos meus pais, Luciana e Nilton, e à minha vovó Bina que me ensinaram o caminho certo e me fizeram acreditar que nada seria impossível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado condições de iniciar este trabalho e de forma muito especial seguir até o fim.

A minha família por sempre me apoiar nas minhas escolhas, em especial meus pais Luciana e Nilton, que desde criança me ensinaram a dar valor nas oportunidades e tentar fazer o meu melhor sempre. A minha vovó Bina, a qual com a sua paciência e simplicidade me passou os mais preciosos ensinamentos desta vida e dedico grande parte desta vitória a ela. Também agradeço a minha irmã caçula Nayra, a qual em horas difíceis esteve comigo e ao meu noivo Beto, o qual me apoiou no momento de maior mudança da minha vida, meu doutorado sanduíche nos EUA, e com sua família magnífica me acolheram como uma filha. Amo muito todos vocês!

Profissionalmente, em primeiro lugar quero agradecer a minha orientadora, Maru, por ter acreditado em uma menina de 17 anos e no primeiro mês da faculdade. Ser sua aluna foi muito mais do que enriquecedor cientificamente, foi uma evolução de vida, pois trabalhando com você descobri o que realmente eu amo, a ciência, e ganhei uma grande amiga: Você! Mesmo longe sempre serei a sua aluninha. Você é a melhor orientadora deste mundo, tenho certeza!

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Edson, por abrir as portas do seu laboratório aceitando a idéia audaciosa de fazer algo praticamente impossível. Além de me dar grandes ensinamentos, que me engrandeceram profissionalmente! Muito obrigada.

A pesquisadora Rosana Pagano, Rô, a qual tenho uma imensa admiração profissional e pessoal. Mesmo não sendo sua aluna me ajudou muito no início do meu Doutorado e sempre soube que eu poderia contar com você. Você é fantástica e uma incrível pesquisadora! Muito obrigada.

Ao professor Newton Canteras, o qual me recebeu no seu laboratório para diversos experimentos e nunca hesitou em discutir resultados ou até mesmo me dar idéias para a evolução deste projeto. Muito obrigada professor pelos seus ensinamentos e deixo aqui a minha grande admiração pelo sr.

Ao professor Manoel Jacobsen, o qual mesmo que indiretamente, com suas disciplinas e grandioso conhecimento, me auxiliou neste projeto e com a sua humildade me mostrou o que é ser uma grande personalidade da área médica e de dor. Muito obrigada professor!

Agradeço aos meus amigos de laboratório, nós dizemos família Neurodor, certos deles já seguiram outros rumos e outros continuam do nosso lado, mas através dos ensinamentos da nossa chefinha sempre buscamos ajudar um ao outro e mais do que isso nos tornamos grandes amigos! Bia minha grande amiga e companheira de projeto não poderia deixar de te

agradecer, fico feliz de ver a profissional que você é hoje, e juntamente com o Rafa, aluno incrível, nos tornamos uma equipe! Mizinha nunca me esquecerei das madrugadas frias que passamos fazendo experimentos no HC, você é fenomenal! E a todos que me auxiliaram diversas vezes, Mara, Alyne, Dani, Fábio, Camilla, Igor e Marina, além dos "antigos" Pri, Li e Rê!

Aos meus companheiros de trabalho de outros laboratórios e que acabaram se tornando grandes amigos. Paulo e Cibele do lab do Dr Edson, os quais me acolheram como agregada e me fizeram sentir pertencente aquele espaço. Khallil e Aurea que me ajudavam com seus conhecimentos físicos de ressonância magnética. Amanda do lab do Prof. Newton que me ajudou grandemente nos experimentos e teve muita paciência comigo. Muito obrigada!

Ao departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e o setor de ressonância magnética do Instituto de Radiologia da FMUSP, por me dar suporte para executar este projeto, bem como a FAPESP pelo auxílio financeiro durante o doutorado e a bolsa BEPE para os Estados Unidos.

Por último, mas igualmente importante, eu quero agradecer ao Dr. David Seminowicz da Universidade de Maryland por permitir que uma aluna que muito admirava seus artigos e linha de pesquisa sair do Brasil e pertencer ao seu laboratório durante 1 ano. Você me ensinou muito e foi um marco de decisão na minha carreira, sendo que hoje você me proporcionou a oportunidade de fazer meu Pós-Doc sob sua orientação e realizar o projeto que eu tanto sonhei. Li Jiang e Michael Keaser foram para mim grandes mestres dos ensinamentos de ressonância, fica a minha grande admiração por vocês! E além de companheiras de trabalho, as minhas grandes amigas Janell e Shanna, *you are awesome my friends*! *Thank you a lot for everything*!

Muito obrigada a todos vocês!

Todo mundo é capaz de dominar a dor, exceto quem a sente.

William Shakespeare

RESUMO

Silva JT. Ressonância magnética e ativação neuronal supraespinal em modelo de dor neuropática crônica em ratos. [Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O fator de crescimento neural (NGF) é uma neurotrofina que está intimamente ligada à indução e manutenção dos processos dolorosos, sendo o principal fator relacionado ao aumento de Substância P (SP), importante peptídeo mediador da nocicepção. A análise através da ressonância magnética funcional (fMRI) da chamada "pain matrix", ou seja, áreas cerebrais relacionadas à dor, vem despertando grande interesse da comunidade científica, uma vez que proporciona um grande conhecimento do sistema nervoso central de forma não invasiva. O Anti-NGF é um tratamento em pesquisa para diversas síndromes dolorosas, no entanto, a participação deste em modelo de neuropatia periférica (constrição crônica do isquiático - CCI) ainda é desconhecida. Neste projeto avaliamos, no modelo de CCI, a resposta comportamental e o possível envolvimento do NGF e da SP antes e após o tratamento com o Anti-NGF. Nossos resultados demonstraram a permanência de altos níveis do NGF a longo prazo no gânglio da coluna posterior (DRG) e na medula espinal, já a SP demonstrou-se aumentada no DRG em ambos os tempos de análise e apenas tardiamente na medula espinal. A seguir, iniciamos o tratamento com Anti-NGF 14 dias após lesão e podemos observar uma melhora no quadro nociceptivo dos animais tratados com este fármaco em comparação ao grupo sem tratamento. Uma vez que houve a melhora no quadro nociceptivo, realizamos análises proteicas para NGF e SP e imuno-histoquímica para Fos. O Anti-NGF foi capaz de reverter os altos níveis de NGF e SP no DRG e na medula espinal. Em relação ao ensaio de atividade neuronal através da quantificação da proteína Fos, observamos um aumento do número de células imunorreativas no grupo CCI e diminuição após tratamento com Anti-NGF no córtex cingulado anterior. A fim de elucidar a participação das áreas encefálicas relacionadas à dor em modelo de dor neuropática crônica nós realizamos uma análise de ressonância magnética funcional. Nossos resultados mostraram modificações da conectividade do tálamo, córtex somatossensorial primário e córtex cingulado com todo o encéfalo, nos auxiliando para a escolha de áreas a serem analisadas por outras técnicas. Em suma, nossos resultados contribuem para reforçar o potencial terapêutico do Anti-NGF como um tratamento para a dor neuropática e enfatizamos que com uma intervenção periférica foi possível intervir, mesmo que indiretamente, na atividade neuronal de um centro supraespinal, bem como mediadores nociceptivos da via dolorosa. Finalmente, esperamos que estes resultados possam ser usados para o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica que auxilie pacientes com dor neuropática crônica, dor caracterizada pelo seu difícil tratamento e efeitos adversos dos fármacos utilizados até hoje.

Palavras-chave: Dor neuropática. Fator de crescimento neural. Substância P. Anti-NGF. Ressonância magnética funcional.

ABSTRACT

Silva JT. Magnetic resonance imaging and supraspinal neuronal activation in chronic neuropathic pain model in rats. [Ph. D. thesis (Morfofuncional Science)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The nerve growth factor (NGF) is a neurotrophin which is closely linked to the induction and maintenance of pain processes, being the main factor related to the increase of substance P (SP), an important peptide mediator of nociception. The analysis by functional magnetic resonance imaging (fMRI) of the "pain matrix", ie, brain areas related to pain, is attracting great interest from the scientific community, as it provides a great knowledge of the central nervous system non-invasively. Anti-NGF treatment is under research for different pain syndromes, however its participation in this model of peripheral neuropathy (chronic constriction injury - CCI) is still unknown. In this project we evaluated the behavioral response in the CCI model and a possible involvement of NGF and SP before and after treatment with Anti-NGF. Our results demonstrated the persistence of high levels of NGF in dorsal root ganglion (DRG) and spinal cord in both times, whereas the SP is increased in DRG in both analysis time and only later in the spinal cord. Next, we began treatment with anti-NGF 14 days after injury and we can observe an improvement in nociceptive behavior of treated animals compared to the untreated group. Since there was an improvement in nociceptive behavior, we performed protein analysis for NGF and and SP immunohistochemistry for Fos. Anti-NGF was able to reverse the high levels of NGF and SP in spinal cord and DRG. For the test of neuronal activity through Fos quantification, an increase in the number of immunoreactive cells on the CCI group and decreased after treatment with Anti-NGF in the anterior cingulate cortex. In order to elucidate the involvement of brain areas related to the pain model of chronic neuropathic pain we conducted a functional magnetic resonance analysis. Our results showed changes in the connectivity of the thalamus, the primary somatosensory cortex and cingulate cortex with the whole brain, helping us to choose areas to be analyzed by other techniques. In summary, our results contribute to increasing the therapeutic potential of Anti-NGF as a treatment for neuropathic pain and we emphasized a peripheral intervention was possible to change, even indirectly, the neuronal activity of a supraspinal center and nociceptive mediators. Finally, we hope that these results can be used for the development of a therapeutic strategy that helps patients with chronic neuropathic pain, characterized by its difficult treatment and adverse effects of drugs used today.

Keywords: Neuropathic pain. Nerve growth factor. Substance P. Anti-NGF. Magnetic resonance imaging.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Processamento sensorial na coluna posterior da medula espinal.
- Figura 2 Ilustração do modelo de lesão constritiva crônica do nervo isquiático (CCI).
- Figura 3 Ilustração do modelo de injúria por lesão limitada do nervo isquiático (SNI).
- Figura 4 Linha do tempo dos três experimentos.

Figura 5 - Ilustração do teste de pressão de pata - Randall e Sellito.

Figura 6 - Ilustração do teste plantar térmico – Hargreaves.

Figura 7 - Ilustração do teste da Alodinia – Filamentos de Von Frey.

Figura 8 - Ilustração do teste da Alodinia ao frio utilizando acetona – a cor azul foi usada para facilitar a observação do local aplicado.

Figura 9 - Avaliação a longo prazo da resposta nociceptiva por estímulo mecânico de ratos com lesão do nervo isquiático.

Figura 10 - Avaliação a longo prazo da resposta nociceptiva por estímulo térmico de ratos com lesão do nervo isquiático

Figura 11 - Avaliação a longo prazo da resposta nociceptiva por estímulo tátil de ratos com lesão do nervo isquiático.

Figura 12 - Avaliação a longo prazo da resposta nociceptiva por estímulo frio de ratos com lesão do nervo isquiático.

Figura 13 - Avaliação a longo prazo do NGF no DRG (A) e medula espinal (B) após lesão do nervo isquiático.

Figura 14 - Avaliação a longo prazo da SP no DRG (A) e medula espinal (B) após lesão do nervo isquiático.

Figura 15 - Efeito do Anti-NGF na resposta nociceptiva de ratos com lesão do nervo isquiático mediante estímulo mecânico.

Figura 16 - Efeito do Anti-NGF na resposta nociceptiva de ratos com lesão do nervo isquiático mediante estímulo térmico.

Figura 17 - Efeito do Anti-NGF na resposta nociceptiva de ratos com lesão do nervo isquiático mediante estímulo frio.

Figura 18 - Avaliação de NGF no DRG (A) e medula espinal (B) após tratamento com Anti-NGF em modelo de dor neuropática crônica.

Figura 19 - Avaliação de SP no DRG (A) e medula espinal (B) após tratamento com Anti-NGF em modelo de dor neuropática crônica.

Figura 20 - Fotomicrografia e densidade de células imunorreativas para proteína Fos do córtex cingulado anterior após tratamento com Anti-NGF em modelo de dor neuropática crônica.

Figura 21 - Conectividade de áreas encefálicas com o tálamo direito de ratos com lesão limitada do nervo isquiático.

Figura 22 - Conectividade de áreas encefálicas com o córtex somatossensorial primário (S1) direito de ratos com lesão limitada do nervo isquiático.

Figura 23 - Conectividade de áreas encefálicas com o córtex cingulado direito de ratos com lesão limitada do nervo isquiático.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Córtex cingulado anterior
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
BOLD	Blood oxygenation level dependent (nível dependente de oxigenação sanguínea)
CCI	Lesão constritiva crônica
CCI 14 d	Lesão constritiva crônica quatorze dias após cirurgia
CCI 56 d	Lesão constritiva crônica cinquenta e seis dias após cirurgia
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cg 1	Córtex cingulado, área 1
CPu	Caudado/putâmen
CS	Colículo superior
DRG	Gânglio da coluna posterior ou gânglio da raiz dorsal da medula espinal
fMRI	Ressonância magnética funcional
FOP	Falso operado
GLM	General linear model (modelo linear generalizado)
IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor
MI	Medida inicial
MRI	Imagem de ressonância magnética
NGF	Nerve growth factor (fator de crescimento neural)
NK-1	Receptor neuroquinina-1
PAG	Substância cinzenta periaquedutal

ROI	Região de interesse
rsfMRI	Ressonância magnética funcional durante estado de repouso
SNI	Lesão limitada do nervo isquiático
SP	Substância P
S1	Córtex somatossensorial primário
SII	Córtex somatossensorial secundário
TE	Tempo de eco
TR	Tempo de repetição
TrkA	Receptor do tipo tirosina-quinase A
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório de subtipo 1
T1	Antes de qualquer procedimento
T2	1 mês após cirurgia
T3	5 meses após cirurgia
VPL	Núcleo ventral póstero-lateral do tálamo
VPM	Núcleo ventral póstero-medial do tálamo
VS.	Versus
14 d	Quatorze dias
28 d	Vinte e oito dias
42 d	Quarenta e dois dias
56 d	Cinquenta e seis dias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.2 NGF: MECANISMOS E TRATAMENTO	21
1.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E DOR	24
1.4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	25
2 OBJETIVOS	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 ANIMAIS	27
3.2 INDUÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA	27
3.3 PLANEJAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	29
3.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS E COMPORTAMENTO	30
3.4.1 DETERMINAÇÃO DA HIPERALGESIA MECÂNICA	31
3.4.2 DETERMINAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA	31
3.4.3 DETERMINAÇÃO DA ALODÍNIA TÁTIL	32
3.4.4 DETERMINAÇÃO DA ALODÍNIA AO FRIO	33
3.5 PROCEDIMENTO TERAPÊUTICO: ANTI-NGF	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES COMPORTAMENTAIS	34
3.7 ENSAIOS DE WESTERN BLOT	34
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS DE WESTERN BLOT	35
3.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA	35
3.10 DETECÇÃO DA PROTEÍNA FOS	36
3.11 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS FOS POSITIVAS	36
3.12 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	37
4 RESULTADOS	39

4.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO A LONGO PRAZO DO MODELO DE CCI39
4.1.1 MODALIDADES SENSITIVAS SÃO DIFERENTEMENTE AFETADAS NO PROCESSO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR CCI
4.1.2 NGF ESTÁ AUMENTADO AO LONGO DO TEMPO NO DRG E MEDULA ESPINAL APÓS MODELO DE CCI42
4.1.3 SUBSTÂNCIA P ESTÁ AUMENTADA AO LONGO DO TEMPO NO DRG, NO ENTANTO SEU AUMENTO NA MEDULA ESPINAL FOI SOMENTE 56 DIAS APÓS LESÃO
4.2 EXPERIMENTO 2 - EFEITOS DO TRATAMENTO COM ANTI-NGF NO MODELO DE CCI
4.2.1 TRATAMENTO COM ANTI-NGF É CAPAZ DE REVERTER LIMIARES NOCICEPTIVOS DE ANIMAIS APÓS MODELO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA 46
4.2.2 TRATAMENTO COM ANTI-NGF DIMINUI OS NÍVEIS DE NGF NO DRG E MEDULA ESPINAL APÓS MODELO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA
4.2.3 TRATAMENTO COM ANTI-NGF DIMINUI OS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIA P NO DRG, MAS PERMANECE INALTERADA NA MEDULA ESPINAL APÓS MODELO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA52
4.2.4 TRATAMENTO COM ANTI-NGF É CAPAZ DE DIMINUIR O NÍVEL DE ATIVIDADE NEURONAL NO CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR APÓS MODELO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA54
4.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DE ÁREAS ENCEFÁLICAS RELACIONADAS AO PROCESSO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA NO MODELO DE SNI
5 DISCUSSÃO62
6 CONCLUSÃO
REFERÊNCIAS*
ANEXO
A - BOLSA DE ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR (BEPE)

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 DOR: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde os primórdios, conforme sugerem registros gráficos, a dor não é expressa do mesmo modo em todas as culturas e seu limiar parece variar não somente de um indivíduo para outro, mas de acordo com o meio social, ou seja, independentemente de suas bases anatômicas e fisiológicas (Teixeira, Osaka, 2010). Dor e inimigos eram colocados no mesmo nível. A dor era considerada ataque à pessoa, punição para uma falta ou atuação de maus espíritos, sendo que os homens e animais reagiriam igualmente com expressões de raiva ou de medo, correspondendo as reações de luta ou de ataque. A partir destes pensamentos a medicina era exercida por sacerdotes que buscavam proporcionar a imortalidade e a cura através de remédios naturais e sacrifícios aos deuses (Tainter, 1948 apud Bonica, 1990; Teixeira, Osaka, 2010)

Na Grécia antiga, Hipócrates postulou a existência de quatro humores: sangue, flegma, bile amarela e bile negra que, quando desequilibrados resultavam em dor (Keele, 1957), já Platão e Aristóteles (Plato, 1885 apud Bonica, 1990; Weberi, 1877 apud Bonica, 1990) acreditavam que dor e prazer eram sensações opostas, residiam no coração e eram paixões da alma. Após aproximadamente quatro séculos, na Roma antiga, conhecimentos adquiridos em Alexandria através das dissecções abriram caminho para o trabalho de Galeno (século II), que estudou a fisiologia sensorial e o sistema nervoso, descrevendo a dor como um sinalizador da existência de alterações nos órgãos internos ou no ambiente externo, possuindo portanto a função de alertar e proteger os seres vivos (Galen, {1854-1856?} apud Bonica, 1990).

Séculos mais tarde, Merskey em 1994 definiu a dor como "experiência desagradável primariamente associada a dano tecidual", definição esta que passou a ser utilizada por outros autores da IASP (Associação Internacional para Estudo da Dor). O Subcomitê de Taxonomia, após modificá-la em 2008, deu a sua formatação final como "experiência sensitiva e emocional associada ao dano tecidual real ou potencial ou à descrição desses danos", relevando os aspectos emocionais, afetivos e cognitivos da dor (Neto et al., 2009; Treede et al., 2008).

A dor neuropática foi definida pelo NeuPSIG (Grupo de Interesse Especial de Dor Neuropática) em 2008 como "dor que surge como consequência direta de uma lesão ou doença afetando o sistema somatosensorial" (Treede et al., 2008) e caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodinia (dor induzida por estímulo não nocivo) e hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo nocivo) (Payne, Norfleet, 1986), sendo seus sintomas persistentes além do período de cura. O que nos leva a salientar o impacto que este tipo de dor causa na qualidade de vida do paciente, uma vez que é de difícil tratamento, aumenta a incidência de depressão, ansiedade, transtornos de sono e questões relacionadas ao trabalho (Dworkin et al., 2003).

Vale ressaltar, que as investigações animais podem permitir estudos mecanísticos que não são viáveis em seres humanos, incluindo a exploração translacional de circuitos cerebrais relevantes para o processamento doloroso, bem como a sua modulação por meio de tratamentos analgésicos e os efeitos colaterais do fármaco. No entanto, se o processamento afetivo da dor em animais poderia ser, pelo menos em parte, análogo ao da experiência complexa da dor humana ainda não é sabido. A maior complexidade cortical em espécies superiores é óbvia e as limitações dos modelos animais no estudo das dimensões da dor devem ser consideradas (Becerra et al., 2013).

Os neurônios responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva possuem na periferia terminações não mielinizadas, sendo elas responsáveis pela detecção dos estímulos nocivos de modalidades térmica, mecânica e química (nociceptores – neurônios de primeira ordem), e conversão dos mesmos em sinais elétricos (transdução), estes neurônios ativados através de fibras mielínicas (fibras A-delta – 2 a 20 m/s) e amielínicas (fibras C – 0,5 a 2 m/s) transmitem estes sinais a neurônios de segunda ordem presentes em lâminas da coluna posterior da medula espinal (Vanderah, 2007). O axônio origina-se do corpo celular dos neurônios de primeira ordem presentes no gânglio da raiz posterior ou no gânglio trigeminal e adentra o sistema nervoso central transmitindo o sinal da periferia através da liberação de neurotransmissores associados a dor, como o glutamato e a Substância P (Vanderah, 2007; Woolf, 2007). Os tratos espinotalâmico lateral e espinorreticular (anteriormente chamados de neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico, respectivamente) são formados por neurônios de segunda ordem localizados na coluna posterior da medula espinal (principalmente lâminas I e V), sendo que os neurônios pertencentes ao trato espinotalâmico lateral projetam-se principalmente para os núcleos talâmicos localizados mais lateralmente (VPL e VPM), fazem sinapse com neurônios de terceira ordem que ascendem para o córtex somatossensorial primário implicando no componente sensitivo-discriminativo da dor, já os neurônios do trato espinorreticular fazem sinapse nos núcleos da formação reticular do tronco encefálico, bem como, enviam colaterais para a substância cinzenta periaquedutal mesencefálica (PAG), o núcleo parabraquial e o hipotálamo, projetam-se também para os núcleos mais mediais do tálamo (intralaminares e mediodorsal), fazendo sinapse com neurônios que ascendem para áreas corticais como o córtex cingulado anterior (ACC), córtex somatossensorial secundário e córtex insular implicando nos aspectos emocionais, afetivos e neurovegetativos associados à dor (Bushnell et al., 2013; Neto et al., 2009).

Figura 1 - Processamento sensorial na coluna posterior da medula espinal. (a) A estimulação das fibras do tipo C, por lesão intradérmica produz dor espontânea e dor provocada por toques leves no local da lesão (hiperalgesia primária). Além disso, uma área de hiperalgesia secundária fora da área da lesão primária é produzida pela ativação dos receptores NMDA junto ao sistema nervoso central (SNC), que ocorre em consequência aos impulsos nociceptores aferentes. (b) Quando ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, os nociceptores conduzem impulsos aferentes na direção da medula espinal, através de diferentes fibras. (c) A coluna posterior da medula espinal constitui o 1º centro de retransmissão sensorial junto ao SNC. (d) Quando há ativação de áreas localizadas no tálamo e no córtex cerebral, as projeções secundárias ao nível do trato espinotalâmico, trato da coluna dorsal e outras vias nociceptivas levam à percepção consciente da dor.



Fonte: adaptado do website medicina.com

Além destes tratos mencionados podemos destacar a participação dos tratos espinomesencefálico, espinopontoamigdaliano e espinocerebelar que são formados por neurônios de projeção localizados nas lâminas I, V, VII e X da medula espinal. O trato espinomesencefálico estabelece sinapses com a PAG e o colículo superior, o trato espinopontoamigdaliano faz sinapses na região parabraquial da ponte, de onde neurônios se projetam para a amígdala, que por sua vez podem enviar projeções para os gânglios da base.

Já no cerebelo, diversos estudos mostram ativação mediante estímulos nocivos e controle motor, porém esta via é pouco esclarecida (Coombes, Misra, 2016; Saab, Willis, 2003). Estes tratos estão envolvidos principalmente com os aspectos afetivo-motivacionais, sistema de recompensa, reações neurovegetativas, medo, memória e aos sistemas inibitórios da dor (Bushnell et al., 2013; Navratilova, Porreca, 2014; Neto et al., 2009).

Estímulos nocivos provocam alterações no sistema nervoso central modificando os mecanismos desencadeados pelos estímulos aferentes, sendo a sensibilização central descrita por um aumento prolongado, mas reversível, na excitabilidade e eficácia sináptica de neurônios das vias nociceptivas, nas quais ocorrem redução do limiar ou aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios da coluna posterior da medula espinal (Woolf, 2011). Campbell et al. demonstraram que estes fatos, na vigência de lesão nervosa periférica, contribuem para o desenvolvimento da dor neuropática (Campbell et al., 1988).

A teoria da comporta, proposta em 1965 por Melzack e Wall (Melzack, Wall, 1965), destacou o papel dos mecanismos espinal e cerebral na dor aguda e crônica, e desencadeou um avanço explosivo na investigação da dor e terapia. Através de diversos experimentos Melzack também deu origem a teoria da neuromatriz da dor, propondo que a dor é uma experiência multidimensional produzida pela característica de "neuro assinatura" ou *neurosignature* de padrões de impulsos nervosos gerados por uma rede neural amplamente distribuída em todo o encéfalo. Estes padrões de *neurosignature* podem ser desencadeados por estímulos sensitivos, mas também podem ser gerados independentemente deles (Melzack, 2001).

Diversos trabalhos utilizando a ressonância magnética vem definindo as áreas do encéfalo relacionadas à dor como "*pain matrix*" ou matriz da dor, no entanto, os conceitos de matriz da dor são controversos e ainda não existe um verdadeiro consenso sobre quais áreas exatamente compõem esta matriz (Chen, 2008). Entre estas, as áreas mais comumente ativadas são o córtex somatossensorial primário e o secundário (SI e SII), córtex insular, córtex cingulado anterior, córtex pré-motor e o córtex motor primário, área motora suplementar, córtex pré-frontal, córtex parietal posterior, tálamo, gânglios da base, mesencéfalo e cerebelo (Apkarian et al., 2005; Peyron et al., 2000; Tracey, 2005). A ativação do tálamo lateral, SI e SII parece ser preferencialmente associada ao aspecto sensitivo-discriminativo da dor. A ínsula anterior e o ACC, que pertencem ao sistema límbico, parecem estar associados ao aspecto afetivo-motivacional da dor (Chen, 2008).

Modelos de dor neuropática, como lesão constritiva crônica (CCI) e lesão limitada do nervo isquiático (SNI) demonstram a presença de hiperalgesia e alodínia mediante estímulos térmicos, químicos e mecânicos, bem como o aumento de mediadores pró-nociceptivos que auxiliam tanto na indução quanto manutenção desta doença (Camara et al., 2015; Casals-Diaz et al., 2009; Hubbard et al., 2015; Hughes et al., 2007; Santos et al., 2012; Seminowicz et al., 2009; Vissers et al., 2003). No entanto, o uso do modelo SNI difere-se do CCI quanto às regiões acometidas na pata ipsilateral à lesão, uma vez que o nervo sural é mantido intacto e áreas não lesadas ao lado de áreas desnervadas são observadas, abrindo margens para o estudo de neurônios aferentes primários lesados *versus* não afetados pela lesão (Jaggi et al., 2011).

Na prática clínica tem sido extensivamente reportado que a dor neuropática é de difícil tratamento devido ao inadequado entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e manutenção deste tipo de dor (Aley, Levine, 2002; Sah et al., 2003), e também por tratar-se de uma experiência multidimensional que integra funcionalmente estruturas do sistema límbico e cortical para iniciar a percepção da dor e as respostas a esta lesão (Hunt, Mantyh, 2001).

O NeuPSIG patrocinou o desenvolvimento de diretrizes baseadas em evidências para o tratamento farmacológico da dor neuropática, uma vez que a intervenção terapêutica para o controle deste tipo de dor ainda é um desafio. Os antidepressivos inibidores dos transportadores das monoaminas (tricíclicos) e moduladores da subunidade Alfa2-Delta do canal de cálcio (por exemplo, gabapentina e pregabalina) foram recomendados como opção de primeira linha de tratamento, já a lidocaína tópica, capsaicina tópica em alta concentração e tramadol foram recomendados como tratamentos de segunda linha, sendo então os analgésicos opióides fortes e a toxina botulínica A considerados como tratamentos de terceira linha (Dworkin et al., 2010; Finnerup et al., 2015). Entretanto a resposta dos pacientes com dor neuropática para muitos destes tratamentos ainda não é satisfatória.

1.2 NGF: MECANISMOS E TRATAMENTO

Neurônios nociceptivos do gânglio da raiz posterior ou anteriormente chamado de gânglio da raiz dorsal (DRG) da medula espinal e do gânglio trigeminal são divididos em duas classes principais, a primeira inclui fibras mielinizadas de diâmetro médio (A δ) que medeiam a dor aguda, a qual é bem localizada, rápida e precisamente descrita como picada. Estes aferentes mielinizados se diferem consideravelmente das fibras A β que respondem a estimulação mecânica não nociva, apresentando diâmetro e velocidade de condução maiores (Basbaum et al., 2009; Neto et al., 2009). Já a segunda classe de nociceptor inclui as fibras

amielínicas de pequeno diâmetro (tipo C) que medeiam a dor descrita como mal localizada, lenta e em queimação, podendo ser divididas em não peptidérgicas e peptidérgicas (Snider, McMahon, 1998).

Os neurônios não peptidérgicos, negativos para neuropeptídeos, expressam c-Ret e apresentam fator neurotrófico derivado da glia, já os neurônios peptidérgicos expressam neuropeptídeos, incluindo a Substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os quais são importantes mediadores nociceptivos (Mantyh et al., 2011). O desenvolvimento dos neurônios peptidérgicos do DRG necessita do fator de crescimento neural (NGF) pertencente à família de fatores de crescimento neurotrófico, as neurotrofinas, que regulam o desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios no sistema nervoso periférico e central (Pezet, McMahon, 2006). Os membros da família das neurotrofinas medeiam ações específicas por ligação aos seus correspondentes receptores chamados tirosina quinases (Chao, 1992; Pezet, McMahon, 2006), sendo o TrkA um receptor de alta afinidade para NGF. O NGF é produzido e liberado de tecidos alvos, liga-se a receptores de fibras nervosas C e na maioria de A δ e é transportado de maneira retrógrada aos neurônios do DRG (Woolf, Mannion, 1999). Este grupo de neurônios do DRG que expressam TrkA é chave na indução da dor neuropática (Pezet, McMahon, 2006) e é inicialmente afetado em lesão de nervo periférico (Krekoski et al., 1996; Santos et al., 2012). Além do TrkA, o receptor neurotrófico de baixa afinidade (p75) também pode contribuir para nocicepção aumentando as ações do TrkA (Obata et al., 2006).

Dois dos neuropeptídeos mais estudados frente à resposta nociceptiva são a SP e o CGRP. A SP é um neuropeptídeo taquicinina que medeia a nocicepção e é utilizado como um marcador nociceptivo em modelos animais (Ma, Bisby, 1998; Pennefather et al., 2004). Sob condições normais, SP é expressa somente em neurônios do DRG TrkA-positivos de tamanhos médios e pequenos (Pennefather et al., 2004) e durante condições de dor a SP é aumentada nestes neurônios do DRG e liberada nas lâminas I e II da coluna posterior da medula espinal ativando neurônios de segunda ordem (Pennefather et al., 2004). O CGRP também é aumentado sob condições nociceptivas nos mesmos neurônios sensoriais TrkA-positivos (McMahon, 1996).

O NGF é o principal fator relacionado ao aumento da expressão de SP e CGRP (Schmidt et al., 1995) e a administração exógena de altos níveis de NGF, *in vivo* e *in vitro*, aumenta o conteúdo intracelular e a liberação destes dois mediadores (Malcangio et al., 2000a; Skoff, Adler, 2006; Vedder et al., 1993). Baseado em estudos anteriores, nossa hipótese é que o NGF medeia a dor neuropática através do aumento de SP e CGRP. Uma vez

que, em reposta ao estímulo nocivo, a SP liberada centralmente estimula neurônios de segunda ordem contribuindo para o processamento nociceptivo central (Henry et al., 1980; Hughes et al., 2007).

Além disso, estudos demonstram a coexistência de SP e glutamato em terminais aferentes primários da lâmina superficial da medula espinal (De Biasi, Rustioni, 1988) e a imunorreatividade deste neurotransmissor excitatório tem sido observada na maioria das terminações nervosas imunopositivas para SP da coluna posterior da medula espinal de ratos (Merighi et al., 1991), sendo presentes os receptores de glutamato tipo AMPA nas sinapses de aferentes primários peptidérgicos (que contém CGRP) (Lagerstrom et al., 2011; Nagy et al., 2004). Portanto, parece provável que estes neurônios utilizem pelo menos duas formas de sinalização para respostas diversificadas: uma de efeito rápido mediada pelo glutamato e uma de efeito lento mediada pelos peptídeos (Lagerstrom et al., 2011).

De acordo com os mecanismos estudados e a hipótese que o NGF produz dor em condições fisiológicas, tem sido demonstrado que o antagonismo de NGF previne o comportamento doloroso (Mantyh et al., 2011). Em modelos de dor neuropática tais como ligação de nervo espinal e lesão constritiva crônica do nervo isquiático, a injeção sistêmica de anticorpos neutralizadores de NGF previne ambas alodinia e hiperalgesia, porém seus mecanismos são pouco conhecidos (Ramer, Bisby, 1999; Ro et al., 1999; Wild et al., 2007). Vale ressaltar, que até o momento estas terapias não comprometem a função normal do nociceptor nem causam perda de inervação das fibras nervosas simpáticas ou sensoriais de pele ou osso (Mantyh et al., 2011).

Em humanos como em modelos animais o NGF subcutâneo provoca hiperalgesia mecânica duradoura (Svensson et al., 2003) e está aumentado em dor crônica, como artrite reumatóide, enxaqueca/dor de cabeça, fibromialgia ou lesão de nervo periférico (Anand et al., 1997; Iannone et al., 2002; Sarchielli et al., 2007). Estas observações sugerem que tanto em humanos quanto em modelos animais a contínua produção de NGF deve estar envolvida no desenvolvimento da dor crônica.

Um grande número de anticorpos monoclonais Anti-NGF humanizados como RN624 (tanezumabe), JNJ-42160443, REGN475, PG110, alfa-D11, AMG-403, os quais exercem seus efeitos analgésicos pelo sequestro do NGF endógeno, estão sendo investigados em testes clínicos com pacientes de vários tipos de dor crônica, no entanto seus estudos se tornam lentos pela carência de trabalhos precisos em determinados modelos animais, os quais mimetizam situações clínicas (Lane et al., 2010; Mantyh et al., 2011; Shelton et al., 1995; Ugolini et al., 2007; Watson et al., 2008).

1.3 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA E DOR

A área de neuroimagem vem demonstrando a grande capacidade do cérebro em submeter-se a plasticidade estrutural e funcional relacionada à dor crônica e que tal plasticidade pode ser revertida quando a dor é atenuada (Davis, 2011). A plasticidade cerebral relacionada à dor crônica e tratamento pode ser avaliada através da imagem de ressonância magnética (MRI) estrutural e funcional (May, 2008), incluindo imagem por tensor de difusão para medidas de integridade da substância branca, análises morfométricas para avaliar volume de substância cinzenta e espessura cortical, e ressonância magnética funcional (fMRI) para avaliar a atividade relacionada com a dor e conectividade de regiões com todo o encéfalo (Davis, Moayedi, 2013). Vários estudos relataram que a dor crônica em humanos está associada a alterações anatômicas e funcionais do cérebro, como o volume de substância cinzenta, espessura cortical e atividade neuronal de diversas regiões (Apkarian et al., 2004; Ceko et al., 2015; Davis et al., 2008; Hubbard et al., 2014; Teutsch et al., 2008). Em um modelo de lesão limitada do nervo isquiático (SNI) em rato, Seminowicz et al. relataram diminuição de volume dos córtices pré-frontal e retrosplenial começando aproximadamente ao mesmo tempo que os comportamentos de ansiedade, enquanto que a diminuição do volume cortical no córtex somatossensorial primário (região da pata posterior), ACC e córtex insular correlacionou-se com a magnitude da hiperalgesia mecânica (Seminowicz et al., 2009).

A fMRI, técnica que possibilita a inferência da atividade neuronal pela medida de variação da oxigenação sanguínea local ou efeito BOLD (*blood oxygenation level dependent*), também revelou em roedores regiões cerebrais relacionadas com o processamento nociceptivo agudo e as respostas mais observadas foram localizadas nos córtices somatossensoriais primário e secundário, córtex insular, ACC, tálamo e PAG (Chen et al., 2008; Thompson, Bushnell, 2012), no entanto a relação entre estas alterações durante fases crônicas ainda é pouco conhecida.

FMRI durante estado de repouso (rsfMRI) também tem sido amplamente usada para mapear as propriedades topológicas de redes cerebrais sem a utilização de nenhum estímulo feito ao paciente ou ao animal (Rubinov, Sporns, 2011; Seminowicz et al., 2012; Wang et al., 2015). Ao contrário da resposta evocada convencional da fMRI, rsfMRI se baseia na identificação de alterações das flutuações intrínsecas do sinal de fMRI. Baliki et al. demonstram que vinte e oito dias após modelo de dor neuropática (lesão limitada do nervo isquiático em ratos - SNI) mudanças de conectividade funcionais foram limitadas a regiões límbicas e interações entre áreas límbica-nociceptivas sem alterações observadas dentro

somente da rede sensitiva-nociceptiva, mostrando assim um circuito reorganizado pela dor crônica (Baliki et al., 2014). Além disso, a rsfMRI é capaz de a partir de uma região de interesse (ROI) escolhida pelo investigador demonstrar mapas de conectividade relacionados a esta ROI. Seminowicz et al. observou que o núcleo talâmico VPL está com uma assincronia ou conexão diminuída em relação ao córtex somatossensorial primário após 14 dias de dor neuropática em ratos (Seminowicz et al., 2012). Estudos aprofundados de modificações funcionais são necessários para a compreensão desta plasticidade, bem como para a compreensão da gênese e manutenção dos processos de dor crônica.

1.4 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A análise da chamada "*pain matrix*" utilizando a imagem de ressonância magnética ainda é pouco conhecida no que se diz respeito ao modelo de neuropatia periférica e avaliação a longo prazo. Concomitante, o NGF e a SP estão diretamente envolvidos com a indução e manutenção dos processos dolorosos, sob condições de dor neuropática. No entanto, a participação destes em modelo de CCI e após tratamento com Anti-NGF ainda é pouco conhecida.

A nossa hipótese de trabalho é que haverá modificações na ativação neuronal durante estado de repouso nas áreas que compõe a *pain matrix* (tálamo, córtex somatossensorial, córtex insular, córtex cingulado, córtex pré-motor, córtex motor primário, área motora suplementar, córtex pré-frontal, córtex parietal posterior, amígdala e mesencéfalo) nos diferentes grupos experimentais, como observado em humanos com dor neuropática crônica quando comparados com indivíduos controles (Gustin et al., 2010) e em outras síndromes dolorosas (Apkarian et al., 2009; Frokjaer et al., 2012; Lutz et al., 2008). No entanto, ainda são controversas quais as áreas exatamente compõem esta matriz e o processo de plasticidade após dor crônica.

O projeto foi realizado no Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor, que por sua vez, tem esta linha de pesquisa já consolidada, sendo o método de Imagem realizado na *University of Maryland* sob orientação do Dr. David Seminowicz (Bolsa BEPE FAPESP n⁰ 2014/20983-1) com a máquina de ressonância específica para animais de pequeno porte e juntamente com o Instituto de Radiologia do HC-FMUSP sob orientação do Dr. Edson Amaro Jr. estamos iniciando uma linha de pesquisa de imagem experimental.

2 Objetivos

Investigar áreas do sistema nervoso periférico e central relacionadas à dor neuropática crônica, bem como as alterações moleculares e comportamentais após tratamento com Anti-NGF em ratos.

Para o desenvolvimento deste projeto, as seguintes etapas foram realizadas:

- Avaliação a longo prazo da sensibilidade nociceptiva dos animais após indução da neuropatia periférica;
- ✓ Avaliação do efeito do tratamento com Anti-NGF 14 dias após a indução da neuropatia periférica;
- ✓ Análise da síntese de NGF e SP na medula espinal e gânglio da raiz posterior dos animais após tratamento com Anti-NGF;
- Análise da imunorreatividade da proteína Fos (marcador de atividade neuronal) no córtex cingulado anterior dos animais mediante estímulo nocivo e tratamento com Anti-NGF;
- ✓ Análise de exames de Ressonância Magnética Funcional em modelo de dor neuropática crônica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, pesando entre 200- 220 g (aproximadamente dois meses). Todos os animais foram adquiridos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Posteriormente, os animais foram encaminhados e mantidos com água e ração *ad libitum* em uma sala apropriada localizada no Biotério do departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo, com isolamento acústico, temperatura controlada ($22 \ ^{\circ}C \pm 1$) e ciclo claro/escuro ($12:12 \ h$). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB, protocolo 011 na folha 02/ livro 03. Para a realização dos experimentos comportamentais para hiperalgesia mecânica, térmica e alodínica foi utilizada a sala de comportamento do biotério do departamento de Anatomia, a qual possui isolamento acústico e temperatura controlada ($22 \ ^{\circ}C \pm 1$). Todos os animais foram manipulados considerando os princípios e o guia de uso de animais de laboratório envolvendo dor e nocicepção (Zimmermann, 1983).

Os experimentos de ressonância magnética foram realizados no laboratório do Dr. David Seminowicz da *University of Maryland* – Baltimore EUA, utilizando ratas fêmeas *Sprague-Dawley*, pesando entre 200- 250 g seguindo as normas do Comitê de Ética do local (*Institutional Animal Care and Use Committee IACUC protocol 0110402*).

3.2 INDUÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA

A indução da dor neuropática foi realizada através da constrição crônica do nervo isquiático (CCI), de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (Bennett, Xie, 1988). Os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida o nervo isquiático foi exposto na região mediana da coxa direita, afastando-se o músculo bíceps femoral. Próximo à trifurcação do nervo isquiático, 7 mm de distância da trifurcação, foram realizadas 4 ligaduras frouxas ao redor deste nervo (categute cromado 4-0), distantes entre si em aproximadamente 1 mm. As ligaduras foram realizadas ao longo do nervo até 4-5 mm do ponto inicial. A incisão foi suturada em camadas utilizando fio de sutura de seda número 4-0. O grupo controle foi composto por animais falso operados submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem ligação ou compressão do nervo (Bennett, Xie, 1988).



Figura 2 - Ilustração do modelo de lesão constritiva crônica do nervo isquiático (CCI).

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor – Universidade de São Paulo – Departamento de Anatomia.

Para a realização do protocolo de ressonância magnética foi induzida a dor neuropática pelo modelo de lesão limitada do nervo isquiático (SNI), descrito por Decosterd e Woolf (Decosterd, Woolf, 2000). Os animais foram anestesidos com quetamina/xilazina (80/10 mg / kg, i.m) usando uma seringa de 1 ml e uma agulha de 25 G. SNI consiste em expor o nervo isquiático e seus três ramos, os nervos sural, fibular comum e tibial, fazendo uma incisão de 2,5 a 3,5 cm na região mediana da coxa esquerda e afastando-se o músculo bíceps femoral com uma lâmina n. 10. O nervo tibial e fibular comum esquerdo foram ligados com linha 6,0 de seda e seccionados distais à ligadura, deixando o nervo sural intacto. A incisão foi suturada em camadas utilizando fio de sutura de seda número 4-0. Ao final da cirurgia lidocaína tópica/bupivacaína foi aplicada sobre a pele ao redor da ferida. O grupo controle foi composto por animais falso operados submetidos à mesma incisão que os animais operados, com a exposição do nervo isquiático, porém sem ligação ou corte do nervo.

Figura 3 - Ilustração do modelo de injúria por lesão limitada do nervo isquiático (SNI).



Fonte: Website JoVE – *The Journal of Visualized Experiments (JoVE)* modificado – http://www.jove.com/video/3092/the-spared-nerve-injury-sni-model-induced-mechanical-allodynia

3.3 PLANEJAMENTO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Utilizamos um total de 110 animais para comportamento e posterior análises, sendo 10 animais por grupo. Os animais foram alocados conforme divisão de grupos abaixo:

- Grupo 1: ratos controle (NAIVE): animais sem nenhum tipo de lesão ou tratamento;

- Grupo 2: ratos controle (FOP): ratos falso operados;

- Grupo 3: ratos controle (FOP + salina): ratos falso operados com administração de salina;

- *Grupo 4: ratos controle* (FOP + Anti-NGF 3 μ g/ 50 μ L): ratos falso operados com tratamento de Anti-NGF 3 μ g/ 50 μ L;

- Grupo 5: (CCI): ratos com dor neuropática;

- Grupo 6: (CCI + salina): ratos com dor neuropática e administração de salina;

- *Grupo* 7: (CCI + Anti-NGF 1 μg/ 50 μL): ratos com dor neuropática e tratamento de Anti-NGF 1 μg/ 50 μL;

- *Grupo 8*: (CCI + Anti-NGF 3 μg/ 50 μL): ratos com dor neuropática e tratamento de Anti-NGF 3 μg/ 50 μL;

- Grupo 9: ratos controle (NAIVE – 56 dias): animais sem nenhum tipo de lesão ou tratamento;

- Grupo 10: ratos controle (FOP – 56 dias): ratos falso operados;

- Grupo 11: (CCI – 56 dias): ratos com dor neuropática.

Além dos grupos descritos acima nós utilizamos 14 animais para o protocolo de ressonância magnética na *University of Maryland*, sendo divididos em 2 grupos: **SNI** (lesão limitada do nervo isquiático - n = 8) e **FOP** (n = 6).

Na figura 4 podemos observar uma linha de tempo para melhor demonstrar os procedimentos experimentais desenvolvidos no projeto.

No experimento 1 foi realizada a medida inicial (MI) comportamental dos animais e posterior cirurgia CCI. Os diferentes grupos experimentais foram avaliados a cada 14 d até 56 d e os ensaios de *Western Blot* foram feitos posteriormente. No experimento 2 foi realizada a MI comportamental dos animais e posterior cirurgia CCI. Após 14 d os animais receberam ou não a administração do Anti-NGF (dependendo do grupo experimental) e uma curva dose-resposta foi realizada durante 7 h e na seguinte 24° h após tratamento. Após a caracterização da dose-resposta escolhemos o tempo de 2 h de ação do fármaco para realização de *Western Blot* e Imuno-histoquímica. No experimento 3 foi realizada a MI pelo exame de ressonância magnética (MRI) dos animais e posterior cirurgia SNI. Após 1 mês e 5 meses novos exames de MRI foram feitos nos mesmos grupos de animais.



Figura 4 – Linha do tempo dos três experimentos.

3.4 Grupos experimentais e comportamento

É importante salientar que para todos os testes comportamentais foram realizadas habituações dos animais nos dois dias que antecederam ao experimento na sala de experimentação e nos equipamentos a serem utilizados. Posteriormente, os testes comportamentais foram realizados antes de qualquer procedimento cirúrgico (medida inicial – MI), 14 dias após a cirurgia, dose resposta do tratamento com Anti-NGF (1 a 7 h e 24 h) e a fim de fazer uma avaliação a longo prazo realizamos testes de MI e depois da cirurgia por um período de 56 dias, a cada duas semanas. Cabe ressaltar que foram realizados estudos "duplo cego" para o tratamento e randomizados.

3.4.1 Determinação da hiperalgesia mecânica

Para a avaliação da sensibilidade niciceptiva dos animais foi utilizado o teste de pressão da pata de ratos (Analgesy-Meter Ugo Basile®, Itália), realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (Randall, Selitto, 1957). Neste teste, uma força em gramas (g) de magnitude crescente (16 g/s) é continuamente aplicada sobre o dorso da pata posterior do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de "retirada" do membro (figura 5). Neste modelo, o limiar nociceptivo é representado como a força (g) necessária para a indução da reação.

Figura 5- Ilustração do teste de pressão de pata - Randall e Sellito.



Fonte: Site do fabricante Ugo Basile - http://ugobasile.com/

3.4.2 Determinação da hiperalgesia térmica

A avaliação da hiperalgesia térmica dos animais foi realizada com o teste plantar térmico (figura 6), descrito por Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). Este teste utiliza como estímulo o calor induzido por energia radiante do aparato IITC *Life Science*. A sensibilidade ao estímulo térmico foi definida como a latência em segundos da permanência da pata do animal por três vezes com intervalos de cinco minutos, esse feixe foi ajustado a 75% da intensidade máxima de aquecimento com *cutoff* de 20 segundos e o resultado foi representado pela média das três medidas. Vale ressaltar que o aparelho opera entre 10 e 40 graus Celsius.



Figura 6- Ilustração do teste plantar térmico - Hargreaves.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor – Universidade de São Paulo – Departamento de Anatomia.

3.4.3 Determinação da alodínia tátil

A avaliação do teste da alodinia tátil nos animais foi realizada utilizando os filamentos de Von Frey (figura 7) e o método descrito por Chaplan (Chaplan et al., 1994). Estes filamentos são de nylon e possuem diferentes diâmetros responsáveis por empregar diferentes intensidades de força. Tal teste consiste em um conjunto de nove filamentos que foram aplicados sobre a região plantar da pata posterior de cada animal.

Os filamentos utilizados foram: 0,4 g; 0,6 g; 1,4 g; 3,6 g; 8,5 g; 15,1 g; 28,8 g e o limiar de retirada da pata foi determinado pelo aumento ou diminuição sequencial da força. O teste foi iniciado sempre com o filamento 3.6 g e a contagem da de respostas foi iniciada quando a primeira resposta foi negativa e a segunda positiva. A partir desta resposta negativa/positiva foram registradas mais quatro respostas, respeitando-se sempre o princípio de que uma resposta positiva é sempre seguida por um estímulo (filamento) inferior, enquanto que uma resposta negativa é sempre seguida por um estímulo (filamento) superior. Uma resposta é considerada positiva quando o animal retira a pata ao estímulo mecânico e negativa quando o animal não possuiu reação alguma. O limiar de retirada da pata do animal foi analisado observando os padrões de respostas, onde estes padrões foram inseridos no cálculo a seguir:

 $50\% g = 10 [Xf + K.\gamma]$

Onde: Xf é o valor do último filamento em gramas que é convertido em log de base 10; K é o valor da sequência de seis respostas as quais os dados foram retirados da tabela (Chaplan et al., 1994) e δ : é a média da diferença (em log) entre os filamentos apresentados.



Figura 7– Ilustração do teste da Alodinia – Filamentos de Von Frey.

Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor – Universidade de São Paulo – Departamento de Anatomia.

3.4.4 DETERMINAÇÃO DA ALODÍNIA AO FRIO

A alodinia ao frio foi medida com a utilização da acetona como descrito por Choi et al. (1994). Com o auxílio de uma seringa, 50 uL de acetona foram aplicados sobre a parte central da superfície plantar da pata posterior (figura 8) e um vídeo de 2 minutos foi gravado. Um avaliador cego aos grupos experimentais assistiu os vídeos e reações como lamber, morder, cheirar ou bater a pata foram cronometradas e a soma foi o resultado em segundos da reação total (Choi et al., 1994).

Figura 8– Ilustração do teste da Alodinia ao frio utilizando acetona – a cor azul foi usada para facilitar a observação do local aplicado.



Fonte: Laboratório de Neuroanatomia Funcional da Dor – Universidade de São Paulo – Departamento de Anatomia.

3.5 PROCEDIMENTO TERAPÊUTICO: ANTI-NGF

Anticorpo anti fator de crescimento neural (Anti-NGF) (R & D Systems®, EUA) foi adquirido liofilizado e realizamos uma diluição com salina, sendo o volume de 50 μ L injetado por via intraplantar 14 dias após a cirurgia de CCI. As doses de 1 e 3 μ g/ 50 μ L foram usadas

para a curva dose-resposta. Os testes comportamentais foram feitos antes do tratamento, durante 7 h após administração do fármaco com intervalos de 1 h e na 24° h. O veículo de diluição (solução salina 0,9%, 50 μ L) foi usado como controle.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

Os dados foram representados como média \pm e.p.m. A análise estatística foi gerada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5 (utilizando-se *GraphPad Software* Inc., CA, USA). A comparação estatística entre os grupos e tempos foi realizada usando a análise de variância de duas vias (*Two-way* ANOVA) e no grupo CCI diferentes tempos usando a análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni. O índice de significância foi considerado de p \leq 0,05.

3.7 ENSAIOS DE WESTERN BLOT

O conteúdo proteico da medula espinal (porção lombar) e gânglios da raiz posterior (L4-L6) dos animais lesionados, tratados e controles foram isolados e dosados pelo método de Bradford (Amresco, USA) (Bradford, 1976). As amostras foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE. Os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Tris/HCl 125mM, pH 6,8, contendo 2,5% (p/v) de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol (2-ME), 4mM de EDTA e 0.05% de azul de bromofenol, e as amostras foram posteriormente fervidas em banho maria por 5 min. O material foi aplicado em um gel de poliacrilamida 12% e submetidos a eletroforese com corrente constante de 120 mA (Laemmli, 1970). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 um de diâmetro) de acordo com uma técnica já descrita (Towbin et al., 1979). Os antígenos presentes na membrana de nitrocelulose foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10 mM e NaCl 0,15 M, pH 7,5), por 2 h, as membranas foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos para NGF (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) e Substância P (1:1000; Millipore) por 18 h a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 h com o anticorpos secundários marcados com peroxidase (goat anti rat HRP para NGF ou goat anti rabbit HRP para Substância P, Chemicon), diluídos a 1:5000. O controle endógeno foi marcado com β -actina (1:10000, Sigma). As membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (Amershan Biosciences, NJ/EUA) de

quimioluminescência e analisadas quanto à densidade das bandas marcadas, utilizando o programa *Image J* (NIH, MD/EUA) e corrigidas pela densidade óptica para a β -actina, considerando as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ENSAIOS DE WESTERN BLOT

Os dados foram representados como média \pm e.p.m. A análise estatística foi gerada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5 (utilizando-se *GraphPad Software* Inc., CA, USA) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni. O índice de significância foi considerado de p \leq 0,05.

3.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A fim de detectar a proteína Fos foi realizado um estímulo nocivo (0,6 mA três vezes com intervalos de 30 segundos – A360 WPI *Stimulus Isolator*, *World Precision Instruments*, FL, USA) na pata lesada do animal (Baldi et al., 2004; Luo et al., 2009) e o mesmo foi colocado à sua caixa-habitat por uma h e meia para posterior perfusão. Este protocolo foi realizado nos grupos descritos anteriormente do experimento 1 – Anti-NGF.

Os ratos foram anestesiados com quetamina (20 mg/ 100 g de peso corporal, i.p.) e xilazina (2 mg/ 100 g de peso corporal, i.p.). Posteriormente, os animais foram perfundidos transcardiacamente com solução salina seguido de solução fixadora de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) em tampão fosfato, 1 M (PB) com pH 7,4. Foi realizada a remoção do encéfalo e o tecido será mantido em solução de sacarose 20% em tampão fosfato de potássio 0,02 M por aproximadamente 12 h. No dia seguinte, cortes axiais seriados com 40 µm de espessura foram obtidos utilizando-se um micrótomo de congelamento (Carl Zeiss ®). Os cortes foram colhidos sequencialmente e armazenados em cinco séries de forma que a distância entre os cortes num mesmo compartimento foi de 200 µm. Os cortes foram mantidos em solução anti*freeze*, contendo 15% de sacarose, tampão fosfato de sódio 0,05 M e 30% de etilenoglicol em freezer -20 °C. Uma série foi submetida à reação de imuno-histoquímica para detecção da proteína Fos e a série de cortes adjacentes foi utilizada para coloração pelo método Nissl, com
tionina 0,25% como corante e analisados em microscópio óptico com campo claro, utilizandose como referência citoarquitetônica.

3.10 DETECÇÃO DA PROTEÍNA FOS

No processamento imuno-histoquímico para detecção da proteína Fos, os cortes foram incubados inicialmente em uma solução de tampão fosfato de potássio 0,02 M contendo triton X-100 a 0,3%, soro normal de cabra a 2% e anticorpo primário anti-Fos obtido em coelho (Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA, USA) numa diluição de 1:20.000, sob agitação constante, a 4 °C, durante 72 h. Para localização do complexo antígeno-anticorpo os cortes foram incubados por 90 minutos no anticorpo secundário biotinilado feito em cabra (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories) na diluição 1:200. Em seguida, os cortes foram incubados por 90 minutos com o complexo biotina-avidina-peroxidase numa diluição de 1:200 (ABC Elite Kit, Vector Laboratories). Para ligar a glicose oxidase ao complexo antígeno-anticorpo, após lavagens sucessivas, os cortes foram incubados em uma solução contendo 50 mg de tetrahidrocloreto de 3-3'diaminabenzidina (DAB), 0,6 mg de glicose oxidase, 40 mg de cloreto de amônio e 2 ml de solução aquosa de sulfato de níquel a 10% em 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M por 5 minutos. Em seguida foi adicionado β-Dglicose e a reação enzimática foi interrompida após um período de tempo variável, em geral em torno de 15 minutos. Após a reação de imuno-histoquímica, os cortes foram montados em lâminas recobertas com gelatina e em seguida foram desidratados e recobertos com DPX (Aldrich Chemical Co.).

3.11 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS FOS POSITIVAS

As imagens geradas das regiões encefálicas escolhidas foram feitas utilizando a objetiva de 10 X de um microscópio Nikon Eclipse 80i (*Nikon Corporation, Chiyoda-Ku, Tokyo-To, Japan*) equipado com uma câmera digital Nikon DMX 1200F (*Nikon Corporation*). Para a quantificação das células do ACC (parte 1 do córtex cingulado – Cg1) inicialmente selecionamos o corte utilizando a objetiva de 4 X, delineamos a região de interesse com base na série corada pelo método de Nissl e as células imunorreativas para proteína Fos foram contadas na área delimitada da imagem de 10 X em 4 seções de cada animal, sendo 4 animais por grupo. A densidade de células marcadas foi determinada dividindo o número de células imunorreativas para proteína Fos pela área da região de interesse. Tanto a contagem de células

quanto a medição da área foram feitas através do programa *Image J* (NIH, MD/EUA) transformando as imagens obtidas com a objetiva de 10 X em 32 bits e padronizando os valores da função *Threshold* para todos os grupos. A determinação das regiões estudadas foi feita de acordo com o Atlas de Neuroanatomia "*The rat brain in stereotaxic coordinates*" (Paxinos, Watson. 5. ed., 2005).

Os dados foram representados como média \pm e.p.m. A análise estatística foi gerada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5 (utilizando-se *GraphPad Software* Inc., CA, USA) e a comparação estatística entre os grupos foi realizada usando a análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni. O índice de significância foi considerado de p \leq 0,05.

Vale mencionar, que parte destes experimentos foram realizados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Newton Sabino Canteras do departamento de Anatomia do ICB III.

3.12 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Os animais foram anestesiados com isoflurano (5% indução e 1,5% manutenção) e posicionados em um magneto 7-Tesla Bruker BioSpec 70 / 30USR Avance III (Bruker Biospin MRI GmbH, Alemanha) com gradiente BGA12S e software Bruker Paravision 5.1. Uma bobina de volume polarizada circular Bruker 40 milímetros foi utilizada para a aquisição das imagens e as taxas de respiração e batimento cardíaco foram continuamente observadas usando um sistema de monitoramento para pequenos animais (SA Instruments, Inc., Stony Brook, Nova Iorque, EUA). A temperatura corporal foi mantida a 36- 37 °C, usando um aquecedor de água circulante. Durante cada exame, 2 scans foram executados por animal (anatômico e estado de repouso). A sequência RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) foi utilizada na aquisição de imagens ponderadas por T1 e os parâmetros foram: tempo de repetição (TR) = 2000 ms, tempo de eco (TE) = 14 ms, matriz 256 x 256, resolução do plano = 100 µm, 24 cortes axiais, espessura da fatia de 1 milímetro) para referência anatômica. Scans de estado de repouso foram adquiridos utilizando uma sequência spin eco, imagem ecoplanar (TR = 1500 ms, TE = 35.0966 ms, matriz de 75 x 75, resolução do plano = 400 μ m, 24 cortes axiais; 550 volumes), resultando em um tempo de aquisição de aproximadamente 60 minutos. O pré-processamento incluiu correção de tempo-fatia, realinhamento, normalização e suavização espacial com filtro Kernel Gaussiano de 1 mm de largura à meia altura (FWHM). Um template específico de estudo foi criado por uma média das imagens ponderadas em T1 de alta resolução de todos os animais e coregistrando-as, bem

como a interpolação dos voxels para 0,5 x 0,5 x 0,5 mm³. Todos os exames para cada rato foram coregistrados e normalizados a este *template*, como descrito em uma publicação do grupo (Seminowicz et al., 2012). As regiões anatômicas foram identificadas utilizando o atlas de Paxinos e Watson (2005).

Utilizou-se a análise baseada em semente, onde desenhamos as nossas regiões de interesse (sementes) e um teste de correlação do efeito BOLD com todo o encéfalo é realizado, demonstrando as regiões (ou *clusters*) que podem estar conectadas entre si. Nós avaliamos como as conectividades do tálamo, córtex cingulado direito e córtex somatossensorial primário (S1) variam ao longo do tempo após SNI. No primeiro nível da análise foi realizada uma regressão linear (GLM – *General linear model*) entre os dados e para grupo *versus* tempo foi realizada uma análise fatorial flexível. Nós avaliamos as interações grupo x tempo entre a conectividade antes de qualquer procedimento, 1 mês e 5 meses pós-lesão comparando FOP e SNI. Todos os pré-processamento de imagem e análises estatísticas foram realizados utilizando o software SPM12.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1 - AVALIAÇÃO A LONGO PRAZO DO MODELO CCI

4.1.1 MODALIDADES SENSITIVAS SÃO DIFERENTEMENTE AFETADAS NO PROCESSO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR CCI

A lesão CCI causou uma diminuição estatisticamente significativa dos limiares nociceptivos avaliados em todos os testes comportamentais, iniciando 14 dias após lesão e permanecendo até 56 dias. As intensidades destas diminuições de limiar foram variáveis entre os testes comportamentais, pois cada um representa estímulos e modalidades sensitivas diferentes (Figuras 9-12). Os grupos FOP e naive (controles) não apresentaram mudanças dos limiares nociceptivos em nenhum dos testes analisados. Vale ressaltar, que a nocicepção foi de origem local, uma vez que medidas na pata contralateral à cirurgia não mostraram diferenças estatísticas (dados não mostrados).





O limiar de hiperalgesia mecânica, mensurado pelo teste de Randall e Sellito e expresso em gramas, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14, 28, 42 e 56 dias após lesão. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. Análise Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com *p < 0,05 e ***p < 0,001 em comparação CCI vs. *Naive* e ##p < 0,01 e ###p < 0,001 CCI vs. FOP. Não houve diferença estatística nas medidas iniciais e posteriormente entre os grupos *Naive* e FOP. Análise *One*-

way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com &&&p < 0,0001 em comparação CCI56 dias vs. CCI 14 dias. Não houve diferença estatística entre as demais medidas do grupo CCI.





O limiar de hiperalgesia térmica, mensurado pelo teste de Hargreaves e expresso em segundos, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14, 28, 42 e 56 dias após lesão. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. Análise *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com ***p < 0,001 em comparação CCI vs. *Naive* e ##p < 0,01 e ###p < 0,001 CCI vs. FOP. Não houve diferença estatística nas medidas iniciais e posteriormente entre os grupos *Naive* e FOP. Não houve diferença estatística entre as medidas do grupo CCI.

Figura 11 – Avaliação a longo prazo da resposta nociceptiva por estímulo tátil de ratos com lesão do nervo isquiático.



O limiar de alodínia tátil, mensurado pelos filamentos de Von Frey e expresso em gramas, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14, 28, 42 e 56 dias após lesão. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. Análise Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com ***p < 0,001 em comparação CCI vs. *Naive* e ###p < 0,001 CCI vs. FOP. Não houve diferença estatística nas medidas iniciais e posteriormente entre os grupos *Naive* e FOP. Análise One-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com & ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni entre os grupos Naive e FOP. Análise One-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni entre entre os grupos Naive e FOP. Análise One-way ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com & ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com ***p < 0,001 em comparação CCI 28 dias vs. CCI 14 dias. Não houve diferença estatística entre as demais medidas do grupo CCI.

Figura 12 – Avaliação a longo prazo da resposta nociceptiva por estímulo frio de ratos com lesão do nervo isquiático.



O limiar de alodínia fria, mensurado pelo teste de acetona e expresso em segundos, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14, 28, 42 e 56 dias após lesão. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. Análise *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com ***p < 0,001 em comparação CCI vs. *Naive* e ###p < 0,001 CCI vs. FOP. Não houve diferença estatística nas medidas iniciais e posteriormente entre os grupos *Naive* e FOP. Análise *One-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com 2000 em comparação CCI 42 e 56 dias vs. CCI 14 e 28 dias. Não houve diferença estatística nas comparações CCI 14 vs. 28 dias e CCI 42 vs. 56 dias.

4.1.2 NGF ESTÁ AUMENTADO AO LONGO DO TEMPO NO DRG E MEDULA ESPINAL APÓS MODELO DE CCI

Com a técnica de *Western Blot* foi possível observar um aumento da densidade óptica de NGF no DRG 14 e 56 dias após indução de dor neuropática comparado com os grupos controle (p < 0,001 e 0,0004 para naive e p < 0,05 e 0,001 para FOP, figura 13A). Também podemos destacar que a densidade óptica aumentada de NGF do grupo CCI 56 dias foi estatisticamente mais significante comparada com os grupos FOP e naive, porém não houve diferença estatística entre CCI 14 e 56 dias no DRG. Já em relação a porção lombar da medula espinal, podemos notar um aumento da densidade óptica de NGF dos grupos CCI comparados com os grupos FOP e naive, além do grupo CCI 56 dias ter demonstrado uma maior síntese de NGF quando comparado com o CCI 14 dias (p < 0,05, figura 13B).

Nenhuma diferença foi observada entre os grupos controle para NGF e entre os grupos controle e CCI para β-actina nas regiões analisadas (Figura 13).





Imunorreatividade de NGF dos grupos naive, FOP, CCI 14 dias e CCI 56 dias. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * demonstra diferença estatística comparada com o grupo naive (p < 0,001 e 0,0004 para DRG e p < 0,001 e 0,0001 para medula espinal). # demonstra diferença estatística comparada com o grupo FOP (p < 0,05 e 0,001 para DRG e p < 0,001 e 0,0001 para medula espinal). & demonstra diferença estatística comparada com o grupo FOP (p < 0,05 e 0,001 para DRG e p < 0,001 e 0,0001 para medula espinal). & demonstra diferença estatística comparada com o grupo CCI 14 dias (p < 0,05 para medula espinal). Todos os dados foram analisados usando *One-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.1.3 SUBSTÂNCIA P ESTÁ AUMENTADA AO LONGO DO TEMPO NO DRG, NO ENTANTO SEU AUMENTO NA MEDULA ESPINAL FOI SOMENTE 56 DIAS APÓS LESÃO

A análise de *Western Blot* do DRG de animais CCI mostrou que a densidade óptica de SP foi significativamente aumentada comparada com os controles (FOP e naive). Também podemos destacar que a densidade óptica aumentada de SP do grupo CCI 56 dias foi estatisticamente mais significante comparada com os grupos FOP e naive, porém não houve diferença entre CCI 14 e 56 dias (p < 0,05 para FOP e p < 0,001 para naive, figura 14A) no DRG. No que diz respeito a parte lombar da medula espinal, não observamos nenhuma diferença significativa de SP 14 dias após cirurgia em comparação com grupos controle (FOP e naive). No entanto, observou-se um aumento na densidade óptica de SP 56 dias após CCI em comparação com todos os outros grupos de animais (p < 0,05 para naive e FOP e p < 0,001 para CCI 14 dias, figura 14B).

Nenhuma diferença foi observada entre os grupos controle para SP e entre os grupos controle e CCI para β-actina nas regiões analisadas (Figura 14).





Imunorreatividade de SP dos grupos naive, FOP, CCI 14 dias e CCI 56 dias. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * demonstra diferença estatística comparada com o grupo naive (p < 0,05 e 0,001 para DRG e p < 0,05 para medula espinal). # demonstra diferença estatística comparada com o grupo FOP (p < 0,05 e 0,001 para DRG e p < 0,05 para medula espinal). & demonstra diferença estatística comparada com o grupo CCI 14 dias (p < 0,001 para medula espinal). Todos os dados foram analisados usando *One-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.2 EXPERIMENTO 2 - EFEITOS DO TRATAMENTO COM ANTI-NGF NO MODELO DE CCI

4.2.1 TRATAMENTO COM ANTI-NGF É CAPAZ DE REVERTER LIMIARES NOCICEPTIVOS DE ANIMAIS APÓS MODELO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA

O tratamento com Anti-NGF foi realizado através da administração de duas doses, 1 e $3 \mu g/50 \mu L$ de Anti-NGF diluídos em salina, sendo que a maior dose foi considerada mais eficaz devido a sua amplitude e duração da melhora comportamental nos testes analisados (figuras 15-17).

A dose de 1 μ g/ 50 μ L de Anti-NGF apresentou resultados diferentes para cada tipo de teste comportamental avaliado. Com relação ao limiar mecânico, observamos uma melhora do quadro nociceptivo apenas na quinta hora após administração (figura 15); já quando avaliamos a resposta térmica, esta melhora foi observada durante o período de 1 à 3 h após tratamento (figura 16). No entanto, o limiar nociceptivo ao estímulo de frio não foi alterado com a dose menor (figura 17). Quando utilizamos a maior dose (3 μ g/ 50 μ L) de Anti-NGF, foi possível observar o aumento do limiar nociceptivo dos animais operados com CCI uma hora após administração do tratamento e este efeito permaneceu até a quinta hora, equiparando-os aos grupos controle em todos os testes analisados.

A fim de observarmos se o veículo de diluição do fármaco, a salina, teria algum efeito sobre os limiares nociceptivos nós criamos o grupo CCI + Salina e FOP + Salina, porém em nenhum deles observamos alteração significativa quando comparados com os grupos CCI e FOP respectivamente. Além disso, realizamos a administração da dose de 3 μ g/ 50 μ L de Anti-NGF nos animais FOP e demonstramos que não houve diferença comportamental quando comparados com os grupos controle FOP, FOP + Salina e naive. Portanto, os dados dos grupos CCI, FOP, FOP + Salina e naive foram retirados do gráfico para melhor visualização dos resultados e o grupo FOP + 3 μ g/ 50 μ L Anti-NGF foi considerado o controle.

Vale ressaltar, que a nocicepção e o posterior tratamento foi de origem local, uma vez que medidas na pata contralateral à cirurgia não mostraram diferenças estatísticas (dados não mostrados).

Figura 15 – Efeito do Anti-NGF na resposta nociceptiva de ratos com lesão do nervo isquiático mediante estímulo mecânico.



O limiar de hiperalgesia mecânica, mensurado pelo teste de Randall e Sellito e expresso em gramas, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14 dias após lesão e a cada 1 h para a realização da curva dose-resposta. O período de avaliação foi de 7 h e a seguinte 24° h após tratamento com Anti-NGF. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. Análise *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 em comparação dos grupos CCI + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF vs. CCI + Salina, ###p < 0,001 em comparação dos grupos CCI vs. FOP + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF e &&&p < 0,001 em comparação dos grupos CCI + 1 µg/ 50 µL Anti-NGF vs. CCI + Salina. Não houve diferença estatística entre os grupos CCI + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF e CCI + 1 µg/ 50 µL Anti-NGF na medida de 5 h após tratamento.

Figura 16 – Efeito do Anti-NGF na resposta nociceptiva de ratos com lesão do nervo isquiático mediante estímulo térmico.



O limiar de hiperalgesia térmica, mensurado pelo teste de Hargreaves e expresso em segundos, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14 dias após lesão e a cada 1 h para a realização da curva dose-resposta. O período de avaliação foi de 7 h e a seguinte 24° h após tratamento com Anti-NGF. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. Análise T*wo-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com **p < 0,01 e ***p < 0,001 em comparação dos grupos CCI + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF vs. CCI + Salina, ###p < 0,001 em comparação dos grupos CCI vs. FOP + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF, &&p < 0,01 e &&&p < 0,001 em comparação dos grupos CCI + 1 µg/ 50 µL Anti-NGF vs. CCI + Salina e \$ s
 p < 0,01 em comparação dos grupos CCI + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF vs. CCI + Salina e \$ of 0,01 em comparação dos grupos CCI + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF vs. CCI + 1 µg/ 50 µL Anti-NGF vs. CCI + 1 µg/ 50 µL Anti-NGF.

Figura 17 – Efeito do Anti-NGF na resposta nociceptiva de ratos com lesão do nervo isquiático mediante estímulo frio.



O limiar de alodínia fria, mensurado pelo teste de acetona e expresso em segundos, foi avaliado antes (MI) de qualquer procedimento, 14 dias após lesão e a cada 1 h para a realização da curva dose-resposta. O período de avaliação foi de 7 h e a seguinte 24° h após tratamento com Anti-NGF. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 10 animais por grupo. Análise *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni com ***p < 0,001 em comparação dos grupos CCI + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF vs. CCI + Salina e CCI + 1 µg/ 50 µL Anti-NGF, e ###p < 0,001 em comparação dos grupos CCI vs. FOP + 3 µg/ 50 µL Anti-NGF. Não houve diferença estatística entre os grupos CCI + Salina e CCI + 1 µg/ 50 µL Anti-NGF.

4.2.2 TRATAMENTO COM ANTI-NGF DIMINUI OS NÍVEIS DE NGF NO DRG E MEDULA ESPINAL APÓS MODELO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA

Para a realização da técnica de *Western Blot* nós utilizamos três grupos experimentais, uma vez que a partir dos dados comportamentais nós retiramos alguns grupos controle e definimos a dose de 3 μ g/ 50 μ L de fármaco para uso, a fim de minimizar o uso de animais do nosso projeto. Portanto, os grupos analisados foram CCI (lesão do nervo isquiático), FOP + Anti-NGF (controle da cirurgia e do tratamento com Anti-NGF 3 μ g/ 50 μ L) e CCI + Anti-NGF (CCI com tratamento). A partir dos nossos achados foi possível observar um aumento da densidade óptica de NGF no DRG e na medula espinal 14 dias após indução de dor neuropática comparado com o grupo controle (p < 0,001 e 0,0022 para CCI vs. FOP + Anti-NGF no DRG e medula espinal, respectivamente - figura 18). Após o tratamento com Anti-NGF 3 μ g/ 50 μ L os níveis de NGF no DRG e medula espinal diminuíram quando comparados com o grupo sem intervenção terapêutica CCI (p < 0,0001 no DRG e p < 0,01 na medula espinal, figura 18). Vale mencionar que o grupo CCI + Anti-NGF demonstrou uma maior diminuição de NGF no DRG sendo estatisticamente diferente do grupo FOP + Anti-NGF (p < 0,01, figura 18B). Não houve diferença estatística entre os grupos FOP + Anti-NGF e CCI + Anti-NGF na medula espinal. A β-actina nos grupos e regiões analisadas não foi diferente estatisticamente.

Figura 18- Avaliação de NGF no DRG (A) e medula espinal (B) após tratamento com Anti-NGF em modelo de dor neuropática crônica.



Imunorreatividade de NGF dos grupos CCI, FOP + Anti-NGF e CCI + Anti-NGF. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * demonstra diferença estatística comparada com o grupo CCI (p < 0,001 e 0,0001 para DRG e p < 0,01 e 0,0022 para medula espinal). # demonstra diferença estatística comparada com o grupo FOP + Anti-NGF (p < 0,01 para DRG). Todos os dados foram analisados usando *One-way* ANOVA e pósteste Bonferroni.

4.2.3 TRATAMENTO COM ANTI-NGF DIMINUI OS NÍVEIS DE SUBSTÂNCIA P NO DRG, MAS PERMANECE INALTERADA NA MEDULA ESPINAL APÓS MODELO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA

Com a técnica de *Western Blot* observamos um aumento da densidade óptica de SP no DRG 14 dias após indução de dor neuropática comparado com o grupo controle (p < 0,0006para CCI vs. FOP + Anti-NGF, figura 19A). Após o tratamento com Anti-NGF 3 µg/ 50 µL foi demonstrada a diminuição de SP no DRG (p < 0,001 para CCI vs. CCI + Anti-NGF, figura 19A). Não houve diferença estatística entre os grupos FOP + Anti-NGF e CCI + Anti-NGF no DRG.

Corroborando com os dados encontrados no experimento de avaliação a longo prazo do modelo CCI, nós não observamos diferença estatística de SP na medula espinal 14 dias após lesão (figura 19B) e nos demais grupos controle e tratamento com Anti-NGF. A β -actina nos grupos e regiões analisadas não foi diferente estatisticamente.

Figura 19- Avaliação de SP no DRG (A) e medula espinal (B) após tratamento com Anti-NGF em modelo de dor neuropática crônica.



Imunorreatividade de SP dos grupos CCI, FOP + Anti-NGF e CCI + Anti-NGF. Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 5 animais por grupo. * demonstra diferença estatística comparada com o grupo CCI (p < 0,001 e 0,0006 para DRG). Níveis de SP permaneceram inalterados na medula espinal nos grupos experimentais. Todos os dados foram analisados usando *One-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni.

4.2.4 TRATAMENTO COM ANTI-NGF É CAPAZ DE DIMINUIR O NÍVEL DE ATIVIDADE NEURONAL NO CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR APÓS MODELO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA

Os grupos analisados pela técnica de imuno-histoquímica foram o CCI (lesão do nervo isquiático), FOP + Anti-NGF (controle da cirurgia e do tratamento com Anti-NGF 3 μ g/ 50 μ L) e CCI + Anti-NGF (CCI com tratamento). A região analisada do córtex cingulado anterior foi demonstrada em linhas pontilhadas e desenhada de acordo com a sua correspondente imagem no Atlas de Paxinos e Watson (figura 20A e B). A análise feita foi bilateral, pois não observamos diferença estatística entre os lados direito e esquerdo (dados não mostrados).

Na região Cg1 do córtex cingulado anterior podemos observar um aumento do número de células imunorreativas para a proteína Fos no grupo CCI (figura 20C e F) quando comparado com o grupo controle FOP + Anti-NGF (p < 0,01, figura 20D e F). Após o tratamento com Anti-NGF aplicado na pata lesada dos animais com CCI foi observada uma diminuição do nível de atividade neuronal desta região (p < 0,0027 para CCI vs. CCI + Anti-NGF, figura 20E e F). Vale ressaltar, que não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo com tratamento.

Figura 20- Fotomicrografia e densidade de células imunorreativas para proteína Fos do córtex cingulado anterior após tratamento com Anti-NGF em modelo de dor neuropática crônica.



Fotomicrografia em objetiva de 4 X mostrando o córtex cingulado anterior (ACC, parte Cg1) em linha pontilhada preta (A) de acordo com a localização na imagem do Atlas de Paxinos e Watson (B). Seções dos grupos CCI (C), FOP + Anti-NGF (D) e CCI + Anti-NGF (E) foram analisadas com aquisição em objetiva de 10 X e quantificadas usando *One-way* ANOVA e

pós-teste Bonferroni. A área pontilhada vermelha da imagem A representa as áreas analisadas (C, D e E). Os resultados apresentam média de \pm e.p.m. de 4 animais por grupo e ** demonstra diferença estatística comparada com o grupo CCI (p < 0,0011). Barra de escala de 200 µm.

4.3 EXPERIMENTO 3 - AVALIAÇÃO DE ÁREAS ENCEFÁLICAS RELACIONADAS AO PROCESSO DE DOR NEUROPÁTICA CRÔNICA NO MODELO DE SNI

O sinal BOLD pela técnica de rsfMRI foi observado antes de qualquer procedimento (T1), 1 mês (T2) e 5 meses (T3) após lesão limitada do nervo isquiático dos grupos SNI e falso operado FOP, e duas interações foram avaliadas, quando a ativação de áreas encefálicas do grupo SNI foi maior que a do grupo FOP (SNI>FOP – figuras 21,22 e 23 A) e o inverso FOP>SNI (figuras 21,22 e 23 B). A fim de tentar inferir as áreas ou *clusters* que podem possuir conexões com regiões cerebrais envolvidas no processamento nociceptivo nós analisamos a conectividade do tálamo (figura 21), córtex somatossensorial primário (figura 22) e córtex cingulado (figura 23) do lado direito.

Figura 21 – Conectividade de áreas encefálicas com o tálamo direito de ratos com lesão limitada do nervo isquiático.





Valores de sinais BOLD para SNI (colunas cheias) e FOP (colunas pontilhadas) em diferentes tempos (T1, T2 e T3). Os resultados apresentam média de \pm dpm de 8 animais no grupo SNI e 6 animais no grupo FOP, p < 0,05 e limiar de voxel = 20. A interação SNI>FOP mostrou 3 *clusters* com aumentada conectividade com o tálamo ao longo do tempo no grupo SNI, sendo eles áreas do hipocampo, hipotálamo e córtex retrosplenial/cerebelo (A). Já a interação FOP>SNI mostrou apenas o núcleo pontino como *cluster* com maior conectividade com o tálamo ao longo do tempo no grupo FOP (B).







Valores de sinais BOLD para SNI (colunas cheias) e FOP (colunas pontilhadas) em diferentes tempos (T1, T2 e T3). Os resultados apresentam média de \pm dpm de 8 animais no

grupo SNI e 6 animais no grupo FOP, p < 0,05 e limiar de voxel = 20. A interação SNI>FOP mostrou 7 *clusters* com aumentada conectividade com o S1 ao longo do tempo no grupo SNI, sendo eles áreas do hipotálamo, tálamo, hipocampo, tálamo/núcleo geniculado, núcleo mesencefálico profundo/PAG, bulbo rostroventral e cerebelo (A). Já a interação FOP>SNI mostrou 2 *clusters* com maior conectividade com o S1 ao longo do tempo no grupo FOP, sendo eles áreas do próprio S1 e hipocampo/córtex auditivo (B).



Figura 23 – Conectividade de áreas encefálicas com o córtex cingulado direito de ratos com lesão limitada do nervo isquiático.

Valores de sinais BOLD para SNI (colunas cheias) e FOP (colunas pontilhadas) em diferentes tempos (T1, T2 e T3). Os resultados apresentam média de \pm dpm de 8 animais no grupo SNI e 6 animais no grupo FOP, p < 0,05 e limiar de voxel = 20. A interação SNI>FOP mostrou 4 *clusters* com aumentada conectividade com o córtex cingulado ao longo do tempo no grupo SNI, sendo eles áreas do caudado/putâmen (CPu), hipocampo, colículo superior e PAG/bulbo rostroventral/cerebelo (A). Já a interação FOP>SNI mostrou 7 *clusters* com maior

conectividade com o córtex cingulado ao longo do tempo no grupo FOP, sendo eles áreas do CPu, CPu/S1, tálamo, S2/córtex auditivo, hipocampo/córtex visual, colículo superior/inferior e córtex visual (B).

5 DISCUSSÃO

O modelo de lesão constritiva crônica CCI mostrou-se eficiente permitindo a instalação da dor neuropática crônica, uma vez que após 14 dias de lesão já observamos a diminuição do limiar nociceptivo dos animais comparados com controles, demonstrando assim o bom funcionamento do modelo experimental descrito por Bennett e Xie (Bennett, Xie, 1988). Tendo em vista trabalhos que demonstram que a lesão do nervo periférico resulta em dor neuropática persistente ou crônica, caracterizada por dor espontânea em queimação, acompanhada de alodínia e hiperalgesia (Payne; Norfleet, 1986), decidimos avaliar estes comportamentos a longo prazo, a fim de caracterizar a cronicidade deste modelo ainda não descrita na literatura (Guillemette et al., 2012; Jarahi et al., 2014; Kukkar et al., 2013; Lin et al., 2012; Nazemi et al., 2012; Ning et al., 2013; Santos et al., 2012).

Estudos anteriores utilizando o modelo de CCI têm mostrado uma diminuição no limiar mecânico (aprox. 10 gramas) e um aumento na pontuação do teste de alodinia ao frio 5 e 15 dias pós-cirurgia (Camara et al., 2015), já Hughes et al. (2007) e Santos et al. (2012) demonstraram uma diminuição no limiar térmico (cerca de 10 segundos) 14 dias após lesão (Hughes et al., 2007; Santos et al., 2012). A avaliação mais tardia encontrada na literatura foi de 30 dias após CCI e o teste de Von Frey demonstrou um limiar tátil de 10 gramas e o teste de Randall e Sellito um limiar mecânico de 300 gramas (M'Dahoma et al., 2015). No entanto, as avaliações foram na fase inicial (ou seja, dentro das 2-4 primeiras semanas) impedindo o estudo de translação para os seres humanos que sofrem de muitos anos de dor neuropática crônica. No presente trabalho, verificou-se uma maior diminuição do limiar mecânico após 56 dias (média de 29 gramas) comparado com 14 dias (média de 57 gramas) após a cirurgia CCI utilizando o teste de Randall e Sellito e o limiar médio para medidas iniciais, antes de qualquer procedimento, foi de 90 gramas. Já o teste de alodinia tátil com os filamentos de Von Frey mostrou uma maior diferença estatística 28 dias pós-cirurgia (1,05 gramas em comparação com 3,25 gramas de 14 dias após CCI) e a redução do limiar foi contínuo até 56 dias, em comparação com a medida inicial (11 gramas). Estes resultados sugerem que os limiares mecânicos e táteis são mais prejudicados em períodos tardios (28 e 56 dias após CCI).

Por outro lado, encontramos respostas distintas para a sensibilidade térmica utilizando os testes de alodinia fria e Hargreaves. A alodinia ao frio avaliada através da aplicação de acetona foi capaz de demonstrar um aumento do tempo de reação em animais CCI de 14 dias (7 s) *versus* 1 segundo de tempo de reação dos grupos controle, além de observar um aumento três vezes maior no tempo de reação das medidas de 42 e 56 dias comparadas com 14 e 28 dias após a cirurgia, resultado que pioneiramente observou o aumento da resposta nociceptiva ao frio dependente do fator tempo em modelo de dor neuropática crônica. De forma oposta, o teste de Hargreaves mostrou o baixo limiar nociceptivo do grupo CCI (< 9 segundos) em comparação com os grupos controle (cerca de 18 s) durante todo o tempo avaliado, não variando em nenhum período.

Tendo estes resultados em vista, decidimos avaliar certos mediadores nociceptivos das regiões pertencentes as vias de dor, incluindo áreas do sistema nervoso periférico (DRG) e do sistema nervoso central (medula espinal), buscando assim entender melhor os nossos resultados comportamentais e suas correlações com alguns mediadores nociceptivos.

Consistentemente, a análise por *Western Blot* do DRG e medula espinal de ratos CCI revelou um aumento de NGF 14 e 56 dias após a cirurgia (50% e 80%, respectivamente para DRG e 56% e 92%, respectivamente para a medula espinal) quando comparado aos grupos controle. Quando comparamos 14 *versus* 56 dias observou-se que a densidade óptica do NGF foi maior 56 dias em comparação com 14 dias após CCI na medula espinal (36%, $p \le 0,05$) e não foi observada diferença estatística nos tempos avaliados no DRG após lesão. Esses dados corroboram com estudos que mostram a participação do NGF como fator importante na indução e manutenção do processo nociceptivo após diversos tipos de lesões e o seu uso promissor como alvo terapêutico (Obata et al., 2002; Zhu et al., 2012).

Ainda, de acordo com estudos anteriores que demonstraram o papel da SP na dor neuropática, nós verificamos um aumento do nível de SP constante no DRG 14 e 56 dias após a lesão que pode ser necessário para a indução e manutenção da hiperalgesia térmica observada em nossos resultados utilizando o teste de Hargreaves, já em relação ao posterior aumento de SP na medula espinal apenas no 56° dia pós-lesão podemos sugerir o envolvimento deste neuropeptídeo na modulação da alodinia ao frio, uma vez que também encontramos um aumento do tempo de reação mais tardio neste teste comportamental, 42 e 56 dias após CCI, em comparação as medidas de 14 e 48 dias após CCI , dados que corroboram com um estudo mostrando a SP inalterada na medula espinal ao longo de 28 dias no mesmo modelo (Casals-Diaz et al., 2009).

A hiperalgesia induzida por CCI, tanto mecânica quanto térmica durante todas as avaliações, pode ser devida, pelo menos em parte, a capacidade do NGF em regular mediadores álgicos, tais como a Substância P (SP) e o CGRP e indução da expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o que poderia conduzir a esta sensibilização de longa duração (Malcangio et al., 2000b; Mills et al., 2013; Schuligoi, Amann, 1998). SP regula a transmissão da dor e o processo de sensibilização, atuando sobre o receptor neuroquinina-1 (NK-1), SP é expressa nos neurônios pós-sinápticos da coluna posterior da medula espinal e em neurônios do DRG coexpressos com o TRPV1, receptor de capsaicina (receptor vanilóide de potencial transitório de subtipo 1), um receptor crítico para a geração de hiperalgesia térmica (Zhang et al., 2007).

A partir destes dados, o presente estudo mostrou que a lesão CCI no nervo isquiático tem diferentes respostas relacionadas ao tempo observadas pelos testes comportamentais e mediadores nociceptivos avaliados, sugerindo que este modelo pode ser amplamente utilizado pela comunidade científica, uma vez que ele poderia mimetizar estados de dor crônica em humanos e a partir da abordagem comportamental ele auxiliará no esclarecimento de muitas questões.

O NGF e a SP são mediadores críticos na sensibilidade à dor e manutenção dos processos de dor crônica, além de agir na sensibilização periférica e central (Garraway et al., 2003; Lewin et al., 1994; Mantyh et al., 2011), com o nosso trabalho sugerimos o envolvimento do NGF e da SP na modulação das respostas comportamentais dependentes de tempo e do local em que eles estão regulados, o que foi demonstrado pelo contínuo aumento dos níveis de NGF no DRG e na medula espinal e pelo aumento de SP constante no DRG e apenas tardiamente na medula espinal.

Tendo em mente o papel regulador do NGF na dor neuropática desde 14 dias após CCI nós decidimos avaliar o efeito do tratamento com Anti-NGF (anticorpo que neutraliza o NGF) neste modelo e pelo motivo de não haver este tratamento na literatura em CCI nós iniciamos com uma curva dose-resposta e duas doses, 1 e 3 μ g/ 50 μ L de solução de Anti-NGF em salina, como veículo de diluição. O fármaco foi administrado no décimo quarto dia após a cirurgia de CCI e avaliamos as 7 h seguintes e quando completou 24 h pós-injeção. Os testes comportamentais utilizados para verificar a hiperalgesia mecânica, térmica e alodinia ao frio demonstraram a reversão do quadro nociceptivo do grupo CCI após 1 h de tratamento e perdurando até a quinta hora, sendo que a dose maior demonstrou maior eficácia quando comparada aos efeitos da dose menor. A dose de 1 μ g/ 50 μ L causou um aumento do limiar nociceptivo mecânico do grupo CCI 5 h após administração e um aumento do limiar nociceptivo térmico durante o período de 1 à 3 h após tratamento, não revertendo o quadro de alodinia ao frio. Estes resultados são capazes de comprovar o papel relevante do NGF no processo nociceptivo, uma vez que quando neutralizado através do tratamento com Anti-NGF

os sintomas comumente observados em neuropatias, como hiperalgesia mecânica, térmica e alodínia ao frio foram revertidos retornando a níveis basais.

Corroborando com os nossos dados, outros autores demonstraram o efeito benéfico do tratamento com Anti-NGF sobre a reversão de quadros nociceptivos, no modelo animal de pancreatite crônica e síndrome complexa regional do tipo I por fratura da tíbia (Sabsovich et al., 2008; Zhu et al., 2012). Vale ressaltar que testes clínicos estão sendo realizados em humanos com o tratamento de Anti-NGF em quadros de osteoartrite do joelho e quadril (Lane et al., 2010; Schnitzer et al., 2015) e dor de tumor ósseo metastático (Sopata et al., 2015).

Ainda, após a comprovação do efeito anti-nociceptivo induzido pelo tratamento com Anti-NGF, fomos analisar a SP e o NGF neste modelo. Análises de *Western Blot* foram realizadas no DRG e medula espinal em diferentes grupos (CCI, FOP + Anti-NGF controle da cirurgia e tratamento, e CCI + Anti-NGF) a fim de verificarmos o papel do tratamento nestes mediadores nociceptivos. Foi possível observar a diminuição do NGF nos dois tecidos analisados e diminuição da SP no DRG após tratamento quando comparados com o grupo CCI sem intervenção terapêutica, sugerindo a efetividade do fármaco em reduzir a produção exacerbada do NGF após modelo de dor neuropática crônica e desta forma diminuindo a síntese aumentada de SP no DRG destes animais. Vale ressaltar, que não observamos diferença estatística da SP na medula espinal, uma vez que este mediador não está aumentado após 14 dias de lesão.

Com a melhora da sensibilidade nociceptiva e mediadores álgicos nós decidimos avaliar a atividade neuronal do córtex cingulado anterior, uma área cerebral que participa do processamento afetivo-motivacional da dor (Fuchs et al., 2014) através de conexões vindas do tálamo e do córtex insular, bem como projeções diretas e indiretas para o córtex motor, áreas do córtex pré-frontal, córtex insular, amígdala, áreas do mesencéfalo, tronco cerebral e medula espinal, além de desempenhar um importante papel na cognição e funções executivas (Bushnell et al., 2013; Zhuo, 2014).

Para a técnica de quantificação da atividade neuronal nós realizamos um estímulo nocivo e observamos a ação do tratamento Anti-NGF sobre a densidade de células imunomarcadas para Fos. O grupo com modelo de dor neuropática crônica demonstrou um aumento da atividade neuronal no ACC quando comparado com o grupo controle (p < 0,0011). Sabe-se que o ACC recebe projeções nociceptivas da via espinorreticular, estes resultados são consistentes com a proposta de que a entrada nociceptiva ao ACC aumenta a atividade na região e que esta resposta por sua vez resulta em aumento do desprazer à dor. Ainda corroborando com trabalhos que mostram que o ACC é bilateralmente ativado em lesão periférica, caracterizado pelo aumento de genes de expressão imediata como c-fos, Egr1 e CREB, e aumento de respostas eletrofisiológicas (Wei et al., 1999; Wei, Zhuo, 2001).

Após o tratamento com Anti-NGF foi possível observar uma diminuição do nível de ativação neuronal no ACC mediante estímulo nocivo no grupo CCI + Anti-NGF em comparação com o grupo CCI sem intervenção terapêutica (p < 0,0011), o que nos leva a salientar a eficácia deste tratamento não somente para a alteração da resposta comportamental e mediadores nociceptivos, mas também da atividade neuronal de uma região supraespinal comprometida pelo processo crônico da lesão. O nosso tratamento teve como alvo neutralizar o NGF, fator neurotrófico que desempenha um importante papel na sensibilização do nociceptor após lesão, agindo em estruturas do sistema nervoso periférico e medula espinal (Mantyh et al., 2011). A diminuição da atividade neuronal no ACC após tratamento em modelo de CCI já foi observado na literatura, no entanto este estudo utilizou um inibidor da recaptação de noradrenalina e serotonina (milnaciprano) utilizado para tratar depressão e dor crônica, o qual ainda há controversas quanto à sua eficácia em quadros de dor neuropática (Derry et al., 2015; Takeda et al., 2009). O ACC está envolvido em muitos aspectos do processamento da dor, modulação e componentes afetivos da dor crônica (Hubbard et al., 2016; Koga et al., 2014; Li et al., 2010; Liauw et al., 2005), além disso trabalhos mais recentes demonstram a sua participação no circuito corticolímbico, sistema associado com a recompensa que resulta de um alívio de estados aversivos, incluindo a dor (Leknes et al., 2011; Navratilova et al., 2015; Navratilova, Porreca, 2014; Navratilova et al., 2013).

Diversas áreas encefálicas participam do processo nociceptivo, também chamadas de "*pain matrix*", no entanto ainda permanece pouco esclarecida a definição desta matriz e estudos buscam através de diferentes técnicas melhor caracterizá-la (Apkarian et al., 2005; Legrain et al., 2011; Mouraux et al., 2011; Wager et al., 2013; Woo et al., 2015). Uma das técnicas que vem sendo utilizada é a ressonância magnética, uma vez que de modo não invasivo possibilita a visualização de dados morfológicos e funcionais de áreas encefálicas, bem como, estudos a longo prazo de um mesmo animal ou humano.

Com o intuito de auxiliar a definição das áreas pertencentes a *pain matrix* e entender como elas estariam conectadas nós realizamos a técnica de ressonância magnética funcional em estado de repouso (rsfMRI), em colaboração com o Laboratório de Neuroimagem da Dor da Universidade de Maryland o qual possui uma máquina de 7 teslas apropriada para este tipo de experimento. O modelo de dor neuropática escolhido pelo professor colaborador foi o SNI ou lesão limitada do nervo isquiático, o qual se assemelha com o nosso modelo de CCI por mimetizar o quadro de dor neuropática, porém um dos ramos deste nervo, o sural, permanece intacto e os nervos fibular comum e tibial são ligados e cortados distalmente. As características comportamentais destes dois modelos se diferem na área desnervada de cada tipo de lesão, uma vez que no modelo de SNI pode-se fazer distinção das regiões da pata que sofreram ou não lesão (Challa, 2015; Decosterd, Woolf, 2000).

Para a análise de rsfMRI no modelo de SNI nós selecionamos três áreas participantes das vias que transmitem a informação nociceptiva, sendo elas o tálamo, córtex somatossensorial primário (S1) e córtex cingulado. Avaliamos os mesmos animais antes de qualquer procedimento (T1), 1 mês (T2) e 5 meses (T3) após lesão, sendo que o grupo SNI apresentou alterações de conectividade funcional localizadas mais em conexões entre estruturas do sistema límbico e entre os sistemas límbico, nociceptivo e estruturas do corpo estriado, de acordo com dados da literatura (Liu, Chen, 2009). Podemos observar áreas como o hipocampo, hipotálamo e núcleos caudado/putâmen significativamente com maior conectividade com o tálamo, S1 e córtex cingulado no grupo SNI em comparação ao grupo falso operado (FOP) ao longo do tempo. Vale ressaltar, que a análise realizada neste projeto teve uma característica exploratória, a fim de observar como todo o encéfalo estaria conectado com as regiões de interesse determinadas, no entanto, notamos que os dados se tornaram de certa forma generalistas e através desta limitação confirmamos a necessidade da busca de análises mais específicas, as quais nos permitirão inferir conexões mais diretas e ao mesmo tempo excluir regiões sem relevância na participação do processamento nociceptivo.

A participação de áreas pertencentes às vias descendentes de dor nos nossos achados merece ser destacada, uma vez que estas vias modulam o estímulo doloroso e observamos um aumento da conectividade no grupo SNI de áreas relacionadas ao S1 e córtex cingulado, dentre elas a PAG, bulbo rostroventral e hipotálamo na tentativa de atenuar ou até mesmo facilitar o processo de dor crônica (Bourne et al., 2014; Ossipov et al., 2014).

Estes achados corroboram com trabalhos prévios que demonstram a alteração de conectividade em áreas dos sistemas límbico e descendente em modelo de SNI mediante estímulo frio não nocivo (Hubbard et al., 2015) 28 dias após lesão, descartando uma grande participação do sistema sensitivo-discriminativo da dor (Baliki et al., 2014).

Com os dados da rsfMRI do córtex cingulado podemos observar a conectividade, tanto positiva quanto negativa, desta região com as áreas dos gânglios da base (CPu) ou também chamadas de corpo estriado, composto pelo núcleo caudado e putâmen, estas regiões servem como principais estruturas de conexão aos gânglios da base e estão no centro de vias corticais - gânglios da base – tálamo - corticais (Alexander, Crutcher, 1990; Parent, Hazrati, 1995). Nesse contexto, a informação de várias áreas corticais, límbicas e do tálamo acessam o corpo

estriado por vias paralelas segregadas (Alexander, Crutcher, 1990). Corroborando com o nosso achado, um estudo realizado com humanos demonstrou que as regiões do putâmen ativadas durante um estímulo de dor térmica eram estruturalmente ligadas a várias áreas do cérebro envolvidas nos aspectos sensitivos e afetivos do processamento nociceptivo, incluindo o tálamo, córtex insular e córtex cingulado anterior, além disso, com as áreas associadas com memória como a amígdala e o hipocampo (Marschner et al., 2008; Murray, Mishkin, 1983; Smith et al., 2004), bem como aquelas envolvidas em atenção e processos motores (área 8 de Brodmann, giro frontal médio, córtex cingulado anterior e área motora suplementar) (Corbetta et al., 2008; Nobre, 2001; Peyron et al., 1999; Starr et al., 2011). Já os pacientes com lesões no putâmen exibiram significativamente medidas menores de dor quando comparados com indivíduos saudáveis e redução da ativação de áreas cerebrais relacionadas à dor. No entanto, as avaliações de dor e a ativação cerebral em áreas de processamento doloroso não foram completamente abolidas, sugerindo que a informação nociceptiva vinda da medula espinal ainda pode chegar a áreas cerebrais necessárias para a experiência de dor ocorrer, porém há uma relevante contribuição do putâmen e regiões associadas aos gânglios da base nas vias corticais (Starr et al., 2011).

Dentro das áreas destacadas com conectividade relacionada ao córtex cingulado devemos destacar o colículo superior (CS), o qual embora o estudo da organização e funcionamento do CS em seu aspecto sensitivo tem sido direcionado mais fortemente para a compreensão de como seus neurônios respondem a sinais visuais, auditivos e estímulos somatossensorial de baixo limiar, o CS também contém uma abundância de neurônios nociceptivos (McHaffie et al., 1989; Redgrave et al., 1996). Dados sugerem que há uma população de células nociceptivas localizadas na lâmina 5 do CS, uma fonte de neurônios que se projetam para a via eferente descendente que medeia respostas de aproximação, permitindo que o animal oriente sua cabeça em direção a uma fonte de estímulo nocivo persistente (Redgrave et al., 1996; Wang et al., 2000).

Nossos achados corroboram com resultados de imagem de cérebro humano em síndromes dolorosas e reafirma a importância das técnicas de imagem em roedores para melhor compreender as funções cerebrais (Bushnell et al., 2013; Maihofner, Handwerker, 2005; Suzuki et al., 2015; Thompson, Bushnell, 2012).

6 CONCLUSÃO

Em síntese, nós observamos que o processo de nocicepção em nosso modelo é caracterizado por uma longa duração e diferentes padrões de resposta são observados de acordo com o teste comportamental utilizado. O tratamento com Anti-NGF foi capaz de diminuir a nocicepção induzida pela lesão crônica do nervo isquiático, sendo que a intervenção terapêutica proposta promoveu a diminuição de mediadores álgicos, evidenciada por meio da técnica de *Western Blot* no DRG e medula espinal para NGF e Substância P. A administração de dose única do tratamento Anti-NGF na pata lesada do animal diminuiu o nível de ativação neuronal de uma área supraespinal envolvida no aspecto afetivo motivacional da dor, o córtex cingulado anterior. Ainda, a técnica de ressonância magnética funcional facilitou a interpretação dos nossos dados, bem como a criação de um *setup* no Brasil vem sendo desenvolvido para futuros projetos com uso de animais e testes terapêuticos.

A dor neuropática crônica é uma dor caracterizada pelo seu difícil tratamento e efeitos adversos dos fármacos utilizados até hoje, no entanto, com este trabalho apresentamos uma estratégia terapêutica que poderá futuramente auxiliar os pacientes nesta condição.

REFERÊNCIAS*

Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. Trends Neurosci. 1990;13(7):266-71.

Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. Neuroscience. 2002;111(2):389-97.

Anand P, Terenghi G, Birch R, Wellmer A, Cedarbaum JM, Lindsay RM, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV. Endogenous NGF and CNTF levels in human peripheral nerve injury. Neuroreport. 1997;8(8):1935-8.

Apkarian AV, Baliki MN, Geha PY. Towards a theory of chronic pain. Prog Neurobiol. 2009;87(2):81-97.

Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. Eur J Pain. 2005;9(4):463-84.

Apkarian AV, Sosa Y, Sonty S, Levy RM, Harden RN, Parrish TB, Gitelman DR. Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. J Neurosci. 2004;24(46):10410-5.

Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C. Footshock intensity and generalization in contextual and auditory-cued fear conditioning in the rat. Neurobiol Learn Mem. 2004;81(3):162-6.

Baliki MN, Chang PC, Baria AT, Centeno MV, Apkarian AV. Resting-sate functional reorganization of the rat limbic system following neuropathic injury. Sci Rep. 2014;4:6186.

Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell. 2009;139(2):267-84.

Becerra L, Navratilova E, Porreca F, Borsook D. Analogous responses in the nucleus accumbens and cingulate cortex to pain onset (aversion) and offset (relief) in rats and humans. J Neurophysiol.2013; 110(5):1221-6.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain. 1988;33(1):87-107.

Bonica JJ. Definitions and taxonomy of pain. The management of Pain. Philadelphia: Lea & Febiger; 1990.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm

Bourne S, Machado AG, Nagel SJ. Basic anatomy and physiology of pain pathways. Neurosurg Clin N Am. 2014;25(4):629-38.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

Bushnell MC, Ceko M, Low LA. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. Nat Rev Neurosci. 2013;14(7):502-11.

Camara CC, Araujo CV, de Sousa KK, Brito GA, Vale ML, Raposo Rda S, Mendonca FE, Mietto BS, Martinez AM, Oria RB. Gabapentin attenuates neuropathic pain and improves nerve myelination after chronic sciatic constriction in rats. Neurosci Lett. 2015;607:52-8.

Campbell JN, Raja SN, Meyer RA, Mackinnon SE. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. Pain. 1988;32(1):89-94.

Casals-Diaz L, Vivo M, Navarro X. Nociceptive responses and spinal plastic changes of afferent C-fibers in three neuropathic pain models induced by sciatic nerve injury in the rat. Exp Neurol.2009; 217(1):84-95.

Ceko M, Shir Y, Ouellet JA, Ware MA, Stone LS, Seminowicz DA. Partial recovery of abnormal insula and dorsolateral prefrontal connectivity to cognitive networks in chronic low back pain after treatment. Hum Brain Mapp. 2015;36(6):2075-92.

Challa SR. Surgical animal models of neuropathic pain: Pros and Cons. Int J Neurosci. 2015;125(3):170-4.

Chao MV. Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. Neuron. 1992;9(4):583-93.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. Journal of Neuroscience Methods. 1994;53:55-63.

Chen AC. Pain perception and its genesis in the human brain. Sheng Li Xue Bao. 2008;60(5):677-85.

Chen FY, Tao W, Li YJ. Advances in brain imaging of neuropathic pain. Chin Med J (Engl). 2008;121(7):653-7.

Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. Pain. 1994;59(3):369-76.

Coombes SA, Misra G. Pain and motor processing in the human cerebellum. Pain. 2016;157(1):117-27.

Corbetta M, Patel G, Shulman GL. The reorienting system of the human brain: from environment to theory of mind. Neuron. 2008;58(3):306-24.

Davis KD. Neuroimaging of pain: what does it tell us? Curr Opin Support Palliat Care. 2011;5(2):116-21.
Davis KD, Moayedi M. Central mechanisms of pain revealed through functional and structural MRI. J Neuroimmune Pharmacol. 2013;8(3):518-34.

Davis KD, Pope G, Chen J, Kwan CL, Crawley AP, Diamant NE. Cortical thinning in IBS: implications for homeostatic, attention, and pain processing. Neurology. 2008;70(2):153-4.

De Biasi S, Rustioni A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(20):7820-4.

Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. Pain. 2000;87(2):149-58.

Derry S, Phillips T, Moore RA, Wiffen PJ. Milnacipran for neuropathic pain in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2015;6(7).

Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. Arch Neurol. 2003;60(11):1524-34.

Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpaa ML, Kent JL, Krane EJ, Lebel AA, Levy RM, Mackey SC, Mayer J, Miaskowski C, Raja SN, Rice AS, Schmader KE, Stacey B, Stanos S, Treede RD, Turk DC, Walco GA, Wells CD. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. Mayo Clin Proc. 2010;85(3 Suppl):S3-14.

Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. Lancet Neurol. 2015;14(2):162-73.

Frokjaer JB, Bouwense SA, Olesen SS, Lundager FH, Eskildsen SF, van Goor H, Wilder-Smith OH, Drewes AM. Reduced cortical thickness of brain areas involved in pain processing in patients with chronic pancreatitis. Clin Gastroenterol Hepatol. 2012;10(4):434-8.

Fuchs PN, Peng YB, Boyette-Davis JA, Uhelski ML. The anterior cingulate cortex and pain processing. Front Integr Neurosci. 2014;8:35.

Galen. De l'utilité des parties du corps humain, in Daremberg C: Paris, Euvres Anatomiques et Physiologiques et Médicales, {1854-1856?}.

Garraway SM, Petruska JC, Mendell LM. BDNF sensitizes the response of lamina II neurons to high threshold primary afferent inputs. Eur J Neurosci. 2003;18(9):2467-76.

Guillemette A, Dansereau MA, Beaudet N, Richelson E, Sarret P. Intrathecal administration of NTS1 agonists reverses nociceptive behaviors in a rat model of neuropathic pain. Eur J Pain. 2012;16(4):473-84.

Gustin SM, Wrigley PJ, Henderson LA, Siddall PJ. Brain circuitry underlying pain in response to imagined movement in people with spinal cord injury. Pain. 2010;148(3):438-45.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. Pain. 1988;32:77-88.

Henry JL, Sessle BJ, Lucier GE, Hu JW. Effects of substance P on nociceptive and non-nociceptive trigeminal brain stem neurons. Pain. 1980;8(1):33-45.

Hubbard CS, Karpowicz JM, Furman AJ, da Silva JT, Seminowicz DA, Traub RJ. Estrogendependent visceral hypersensitivity following stress in rats: An fMRI study. Mol Pain. 2016;12:17.

Hubbard CS, Khan SA, Keaser ML, Mathur VA, Goyal M, Seminowicz DA. Altered Brain Structure and Function Correlate with Disease Severity and Pain Catastrophizing in Migraine Patients. eNeuro. 2014;1(1):14.

Hubbard CS, Khan SA, Xu S, Cha M, Masri R, Seminowicz DA. Behavioral, metabolic and functional brain changes in a rat model of chronic neuropathic pain: a longitudinal MRI study. Neuroimage. 2015;107:333-44.

Hughes DI, Scott DT, Riddell JS, Todd AJ. Upregulation of substance P in low-threshold myelinated afferents is not required for tactile allodynia in the chronic constriction injury and spinal nerve ligation models. J Neurosci. 2007;27(8):2035-44.

Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. Nat Rev Neurosci. 2001;2(2):83-91.

Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Covelli M, Patella V, Lo Bianco G, Lapadula G. Increased expression of nerve growth factor (NGF) and high affinity NGF receptor (p140 TrkA) in human osteoarthritic chondrocytes. Rheumatology (Oxford). 2002;41(12):1413-8.

Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. Fundam Clin Pharmacol. 2011;25(1):1-28.

Jarahi M, Sheibani V, Safakhah HA, Torkmandi H, Rashidy-Pour A. Effects of progesterone on neuropathic pain responses in an experimental animal model for peripheral neuropathy in the rat: a behavioral and electrophysiological study. Neuroscience. 2014;256:403-11.

Keele KD. Anatomies of Pain. Oxford: Blackwell. 1957. p.206.

Koga K, Descalzi G, Chen T, Ko HG, Lu J, Li S, Son J, Kim TH, Kwak C, Huganir RL, Zhao M, Kaang BK, Collingridge GL, Zhuo M. Coexistence of Two Forms of LTP in ACC Provides a Synaptic Mechanism for the Interactions between Anxiety and Chronic Pain Neuron. 2015 Jan 21;85(2):377-89. Epub 2014 Dec 31 doi:10.1016/j.neuron.2014.12.021.

Krekoski CA, Parhad IM, Clark AW. Attenuation and recovery of nerve growth factor receptor mRNA in dorsal root ganglion neurons following axotomy. Neuroscience 1996;43:1-11.

Kukkar A, Singh N, Jaggi AS. Neuropathic pain-attenuating potential of aliskiren in chronic constriction injury model in rats. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2013;14(2):116-23.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;15(227):680-5.

Lagerstrom MC, Rogoz K, Abrahamsen B, Lind AL, Olund C, Smith C, Mendez JA, Wallen-Mackenzie A, Wood JN, Kullander K. A sensory subpopulation depends on vesicular glutamate transporter 2 for mechanical pain, and together with substance P, inflammatory pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(14):5789-94.

Lane NE, Schnitzer TJ, Birbara CA, Mokhtarani M, Shelton DL, Smith MD, Brown MT. Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. N Engl J Med. 2010;363(16):1521-31.

Legrain V, Iannetti GD, Plaghki L, Mouraux A. The pain matrix reloaded: a salience detection system for the body. Prog Neurobiol. 2011;93(1):111-24.

Leknes S, Lee M, Berna C, Andersson J, Tracey I. Relief as a Reward: Hedonic and Neural Responses to Safety from Pain. PLoS One. 2011;6(4):e17870. doi:10.1371/journal.pone.0017870.

Lewin GR, Rueff A, Mendell LM. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. Eur J Neurosci. 1994;6(12):1903-12.

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. Alleviating neuropathic pain hypersensitivity by inhibiting PKMzeta in the anterior cingulate cortex. Science. 2010;330(6009):1400-4.

Liauw J, Wu LJ, Zhuo M. Calcium-stimulated adenylyl cyclases required for long-term potentiation in the anterior cingulate cortex. J Neurophysiol. 2005;94(1):878-82.

Lin CT, Tsai YJ, Wang HY, Chen SH, Lin TY, Lue JH. Pre-emptive treatment of lidocaine attenuates neuropathic pain and reduces pain-related biochemical markers in the rat cuneate nucleus in median nerve chronic constriction injury model. Anesthesiol Res Pract. 2012;2012:921405.

Liu MG, Chen J. Roles of the hippocampal formation in pain information processing. Neurosci Bull. 2009;25(5):237-66.

Luo Z, Yu M, Smith SD, Kritzer M, Du C, Ma Y, Volkow ND, Glass PS, Benveniste H. The effect of intravenous lidocaine on brain activation during non-noxious and acute noxious stimulation of the forepaw: a functional magnetic resonance imaging study in the rat. Anesth Analg. 2009;108(1):334-44.

Lutz J, Jager L, de Quervain D, Krauseneck T, Padberg F, Wichnalek M, Beyer A, Stahl R, Zirngibl B, Morhard D, Reiser M, Schelling G. White and gray matter abnormalities in the brain of patients with fibromyalgia: a diffusion-tensor and volumetric imaging study. Arthritis Rheum. 2008;58(12):3960-9.

M'Dahoma S, Barthelemy S, Tromilin C, Jeanson T, Viguier F, Michot B, Pezet S, Hamon M, Bourgoin S. Respective pharmacological features of neuropathic-like pain evoked by intrathecal BDNF versus sciatic nerve ligation in rats. Eur Neuropsychopharmacol. 2015;25(11):2118-30.

Ma W, Bisby MA. Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury. Eur J Neurosci. 1998;10(7):2388-99.

Maihofner C, Handwerker HO. Differential coding of hyperalgesia in the human brain: a functional MRI study. Neuroimage. 2005;28(4):996-1006.

Malcangio M, Ramer MS, Boucher TJ, McMahon SB. Intrathecally injected neurotrophins and the release of substance P from the rat isolated spinal cord. Eur J Neurosci. 2000a;12(1):139-44.

Malcangio M, Ramer MS, Jones MG, McMahon SB. Abnormal substance P release from the spinal cord following injury to primary sensory neurons. Eur J Neurosci. 2000b;12(1):397-9.

Mantyh PW, Koltzenburg M, Mendell LM, Tive L, Shelton DL. Antagonism of nerve growth factor-TrkA signaling and the relief of pain. Anesthesiology. 2011;115(1):189-204.

Marschner A, Kalisch R, Vervliet B, Vansteenwegen D, Buchel C. Dissociable roles for the hippocampus and the amygdala in human cued versus context fear conditioning. J Neurosci. 2008;28(36):9030-6.

May A. Chronic pain may change the structure of the brain. Pain. 2008;137(1):7-15.

McHaffie JG, Kao CQ, Stein BE. Nociceptive neurons in rat superior colliculus: response properties, topography, and functional implications. J Neurophysiol. 1989;62(2):510-25.

McMahon SB. NGF as a mediator of inflammatory pain. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1996;351(1338):431-40.

Melzack R. Pain and the neuromatrix in the brain. J Dent Educ. 2001;65(12):1378-82.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. Science. 1965;150(3699):971-9.

Merighi A, Polak JM, Theodosis DT. Ultrastructural visualization of glutamate and aspartate immunoreactivities in the rat dorsal horn, with special reference to the co-localization of glutamate, substance P and calcitonin-gene related peptide. Neuroscience. 1991;40(1):67-80.

Mills CD, Nguyen T, Tanga FY, Zhong C, Gauvin DM, Mikusa J, Gomez EJ, Salyers AK, Bannon AW. Characterization of nerve growth factor-induced mechanical and thermal hypersensitivity in rats. Eur J Pain. 2013;17(4):469-79.

Mouraux A, Diukova A, Lee MC, Wise RG, Iannetti GD. A multisensory investigation of the functional significance of the "pain matrix". Neuroimage. 2011;54(3):2237-49.

Murray EA, Mishkin M. Severe tactual memory deficits in monkeys after combined removal of the amygdala and hippocampus. Brain Res. 1983;270(2):340-4.

Nagy GG, Al-Ayyan M, Andrew D, Fukaya M, Watanabe M, Todd AJ. Widespread expression of the AMPA receptor GluR2 subunit at glutamatergic synapses in the rat spinal cord and phosphorylation of GluR1 in response to noxious stimulation revealed with an antigen-unmasking method. J Neurosci. 2004;24(25):5766-77.

Navratilova E, Atcherley CW, Porreca F. Brain Circuits Encoding Reward from Pain Relief. Trends Neurosci. 2015;38(11):741-50.

Navratilova E, Porreca F. Reward and motivation in pain and pain relief. Nat Neurosci. 2014;17(10):1304-12.

Navratilova E, Xie JY, King T, Porreca F. Evaluation of reward from pain relief. Ann N Y Acad Sci. 2013;1282:1-11.

Nazemi S, Manaheji H, Zaringhalam J, Sadeghi M, Haghparast A. Post-injury repeated administrations of minocycline improve the antinociceptive effect of morphine in chronic constriction injury model of neuropathic pain in rat. Pharmacol Biochem Behav. 2012;102(4):520-5.

Neto OA, Costa CMC, Teixeira MJ. Dor princípios e prática. Porto Alegre: Artmed S.A.;2009.p.1438.

Ning L, Ma LQ, Wang ZR, Wang YW. Chronic constriction injury induced long-term changes in spontaneous membrane-potential oscillations in anterior cingulate cortical neurons in vivo. Pain Physician. 2013;16(5):577-89.

Nobre AC. The attentive homunculus: now you see it, now you don't. Neurosci Biobehav Rev. 2001;25(6):477-96.

Obata K, Katsura H, Sakurai J, Kobayashi K, Yamanaka H, Dai Y, Fukuoka T, Noguchi K. Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. J Neurosci. 2006;26(46):11974-86.

Obata K, Tsujino H, Yamanaka H, Yi D, Fukuoka T, Hashimoto N, Yonenobu K, Yoshikawa H, Noguchi K. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation. Pain. 2002; 99(1-2):121-32.

Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. Curr Opin Support Palliat Care. 2014;8(2):143-51.

Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal gangliathalamo-cortical loop. Brain Res Brain Res Rev. 1995;20(1):91-127.

Payne B, Norfleet MA. Chronic pain and the family: a review. Pain. 1986;26:1-22.

Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. Life Sci. 2004;74(12):1445-63.

Peyron R, Garcia-Larrea L, Gregoire MC, Costes N, Convers P, Lavenne F, Mauguiere F, Michel D, Laurent B. Haemodynamic brain responses to acute pain in humans: sensory and attentional networks. Brain. 1999;122(Pt 9):1765-80.

Peyron R, Laurent B, Garcia-Larrea L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000). Neurophysiol Clin. 2000;30(5):263-88.

Pezet S, McMahon SB. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. Annu Rev Neurosci. 2006;29:507-38.

Plato. Phaedo. Edited with introduction and notes by W.D. Geddes, in London, Macmillan, 1885.

Ramer MS, Bisby MA. Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment. Eur J Neurosci. 1999;11(3):837-46.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesia activity on inflamed tissue. Arch. Inst. Pharmacodyn. 1957;111:209-19.

Redgrave P, McHaffie JG, Stein BE. Nociceptive neurones in rat superior colliculus. I. Antidromic activation from the contralateral predorsal bundle. Exp Brain Res. 1996;109(2):185-96.

Ro LS, Chen ST, Tang LM, Jacobs JM. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. Pain. 1999;79(2-3):265-74.

Rubinov M, Sporns O. Weight-conserving characterization of complex functional brain networks. Neuroimage. 2011;56(4):2068-79.

Saab CY, Willis WD. The cerebellum: organization, functions and its role in nociception. Brain Res Brain Res Rev. 2003;42(1):85-95.

Sabsovich I, Wei T, Guo TZ, Zhao R, Shi X, Li X, Yeomans DC, Klyukinov M, Kingery WS, Clark JD. Effect of anti-NGF antibodies in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. Pain. 2008;138(1):47-60.

Sah DW, Ossipo MH, Porreca F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. Nat Rev Drug Discov. 2003;2(6):460-72.

Santos FM, Silva JT, Giardini AC, Rocha PA, Achermann APP, Alves AS, Britto LRG, Chacur M. Neural mobilization reverses behavioral and cellular changes that characterize neuropathic pain in rats. Molecular Pain. 2012;8:57.

Sarchielli P, Mancini ML, Floridi A, Coppola F, Rossi C, Nardi K, Acciarresi M, Pini LA, Calabresi P. Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome. J Pain. 2007;8(9):737-45.

Schmidt Y, Unger JW, Bartke I, Reiter R. Effect of nerve growth factor on peptide neurons in dorsal root ganglia after taxol or cisplatin treatment and in diabetic (db/db) mice. Exp Neurol. 1995;132(1):16-23.

Schnitzer TJ, Ekman EF, Spierings EL, Greenberg HS, Smith MD, Brown MT, West CR, Verburg KM. Efficacy and safety of tanezumab monotherapy or combined with non-steroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of knee or hip osteoarthritis pain. Ann Rheum Dis. 2015;74(6):1202-11.

Schuligoi R, Amann R. Differential effects of treatment with nerve growth factor on thermal nociception and on calcitonin gene-related peptide content of primary afferent neurons in the rat. Neurosci Lett. 1998;252(2):147-9.

Seminowicz DA, Jiang L, Ji Y, Xu S, Gullapalli RP, Masri R. Thalamocortical asynchrony in conditions of spinal cord injury pain in rats. J Neurosci. 2012;32(45):15843-8.

Seminowicz DA, Laferriere AL, Millecamps M, Yu JS, Coderre TJ, Bushnell MC. MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. Neuroimage. 2009;47(3):1007-14.

Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD, Levinson AD. Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. J Neurosci. 1995;15(1 Pt 2):477-91.

Skoff AM, Adler JE. Nerve growth factor regulates substance P in adult sensory neurons through both TrkA and p75 receptors. Exp Neurol. 2006;197(2):430-6.

Smith AP, Henson RN, Dolan RJ, Rugg MD. fMRI correlates of the episodic retrieval of emotional contexts. Neuroimage. 2004;22(2):868-78.

Snider WD, McMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. Neuron. 1998;20(4):629-32.

Sopata M, Katz N, Carey W, Smith MD, Keller D, Verburg KM, West CR, Wolfram G, Brown MT. Efficacy and safety of tanezumab in the treatment of pain from bone metastases. Pain. 2015;156(9):1703-13.

Starr CJ, Sawaki L, Wittenberg GF, Burdette JH, Oshiro Y, Quevedo AS, McHaffie JG, Coghill RC. The contribution of the putamen to sensory aspects of pain: insights from structural connectivity and brain lesions. Brain. 2011;134(Pt 7):1987-2004.

Suzuki T, Dongmin K, Nagase M, Saitoh Y, Someya T, Sekino M. An MRI-compatible and quantifiable mechanical stimulator for allodynia in a rat model of neuropathic pain. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2015;2015:4298-301.

Svensson P, Cairns BE, Wang K, Arendt-Nielsen L. Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. Pain. 2003;104:241-7.

Tainter ML. Pain. Ann N Y Acad Sci. 1948;51(Art 1):3-11.

Takeda R, Watanabe Y, Ikeda T, Abe H, Ebihara K, Matsuo H, Nonaka H, Hashiguchi H, Nishimori T, Ishida Y. Analgesic effect of milnacipran is associated with c-Fos expression in the anterior cingulate cortex in the rat neuropathic pain model. Neurosci Res. 2009;64(4):380-4.

Teixeira MJ, Osaka M. História da Dor. São Paulo, Brasil: Casa Leitura Médica. 2010.p.54.

Teutsch S, Herken W, Bingel U, Schoell E, May A. Changes in brain gray matter due to repetitive painful stimulation. Neuroimage. 2008;42(2):845-9.

Thompson SJ, Bushnell MC. Rodent functional and anatomical imaging of pain. Neurosci Lett. 2012;520(2):131-9.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(9):4350-4.

Tracey I. Nociceptive processing in the human brain. Curr Opin Neurobiol. 2005;15(4):478-87.

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. Neurology. 2008;70(18):1630-5.

Ugolini G, Marinelli S, Covaceuszach S, Cattaneo A, Pavone F. The function neutralizing anti-TrkA antibody MNAC13 reduces inflammatory and neuropathic pain. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(8):2985-90.

Vanderah TW. Pathophysiology of pain. Med Clin North Am. 2007;91(1):1-12.

Vedder H, Affolter HU, Otten U. Nerve growth factor (NGF) regulates tachykinin gene expression and biosynthesis in rat sensory neurons during early postnatal development. Neuropeptides. 1993;24(6):351-7.

Vissers K, Adriaensen H, De Coster R, De Deyne C, Meert TF. A chronic-constriction injury of the sciatic nerve reduces bilaterally the responsiveness to formalin in rats: a behavioral and hormonal evaluation. Anesth Analg. 2003;97(2):520-5.

Wager TD, Atlas LY, Lindquist MA, Roy M, Woo CW, Kross E. An fMRI-based neurologic signature of physical pain. N Engl J Med. 2013;368(15):1388-97.

Wang S, Wang H, Niemi-Junkola U, Westby GWM, McHaffie JG, Stein BE, Redgrave P. Parallel analyses of nociceptive neurones in rat superior colliculus by using c-fos immunohistochemistry and electrophysiology under different conditions of anaesthesia. The Journal of Comparative Neurology. 2000;425(4):599-615.

Wang T, Chen N, Zhan W, Liu J, Zhang J, Liu Q, Huang H, He L, Gong Q. Altered effective connectivity of posterior thalamus in migraine with cutaneous allodynia: a resting-state fMRI study with granger causality analysis. J Headache Pain. 2015;17(1):016-0610.

Watson JJ, Allen SJ, Dawbarn D. Targeting nerve growth factor in pain: what is the therapeutic potential? BioDrugs. 2008;22(6):349-59.

Weberi W. Aristotelis de Anima Libri Tres. Ad interpretum Graecorum auctoritatem et codicum fidem recognov it commentariis ilustrativ Fridr. Adolph. Trendelenburg, Berolini, in 1877.

Wei F, Li P, Zhuo M. Loss of synaptic depression in mammalian anterior cingulate cortex after amputation. J Neurosci. 1999;19(21):9346-54.

Wei F, Zhuo M. Potentiation of sensory responses in the anterior cingulate cortex following digit amputation in the anaesthetised rat. J Physiol. 2001;532(Pt 3):823-33.

Wild KD, Bian D, Zhu D, Davis J, Bannon AW, Zhang TJ, Louis JC. Antibodies to nerve growth factor reverse established tactile allodynia in rodent models of neuropathic pain without tolerance. J Pharmacol Exp Ther. 2007;322(1):282-7.

Woo CW, Roy M, Buhle JT, Wager TD. Distinct brain systems mediate the effects of nociceptive input and self-regulation on pain. PLoS Biol. 2015;13(1):e1002036.

Woolf CJ. Central sensitization: uncovering the relation between pain and plasticity. Anesthesiology. 2007;106(4):864-7.

Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. Pain. 2011; 152(3 Suppl): S2-15.

Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. Lancet. 1999;353(9168):1959-64.

Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, Liang LL, Zhang YQ, Ji RR, Zhao ZQ. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. J Neurosci. 2007;27(44):12067-77.

Zhu Y, Mehta K, Li C, Xu GY, Liu L, Colak T, Shenoy M, Pasricha PJ. Systemic administration of anti-NGF increases A-type potassium currents and decreases pancreatic nociceptor excitability in a rat model of chronic pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012;302(1):28.

Zhuo M. Long-term potentiation in the anterior cingulate cortex and chronic pain. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014;369(1633):20130146.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain. 1983;16(2):109-10.

ANEXO

A - BOLSA DE ESTÁGIO DE PESQUISA NO EXTERIOR (BEPE)



Dr. David A. Seminowicz Assistant Professor Department of Neural and Pain Sciences University of Maryland School of Dentistry 650 W. Baltimore Street, 8 South, Room 8263 Baltimore, MD 21201

Período de 05/01/2015 a 15/12/2015 – Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE). Nº 2014/20983-1

Objetivo geral

Avaliar as alterações cerebrais em modelos de dor utilizando técnicas de ressonância magnética em roedores, bem como outros projetos em andamento no laboratório.

Objetivos específicos

- Análise de conectividade rsfMRI em modelo de dor neuropática crônica (SNI);
- Análise da atividade relacionada à dor fMRI no modelo de dor por stress;
- Análise de conectividade rsfMRI em diferenças sexuais e influência hormonal;
- Análise de imagem de difusão DTI no modelo de enxaqueca (estudo piloto);

• cirurgia optogenética no ACC, estimulação optogenética e fMRI simultâneos para avaliar a conectividade cerebral.



David A. Seminowicz Assistant Professor Department of Neural and Pain Sciences 650 W. Baltimore St. 8 South. Rm 8263 Baltimore, MD 21201 410 706 3476 dseminowicz@umaryland.edu www.daslab.org

December 9, 2015

It is my pleasure to provide the following evaluation for Joyce Teixeira da Silva. Joyce has completed an internship in my laboratory that started January of 2015. In less than one year, she has made a major contribution to the lab and has learned a great amount.

Joyce came to the lab with specific learning objectives, but generally to gain knowledge and skill in performing rodent neuroimaging studies. She has participated in several projects, including on models of neuropathic pain, visceral pain, migraine, sex hormone-dependent response to acute pain, and optogenetics. The imaging techniques she learning include DTI, resting state fMRI, and task fMRI. The final report that Joyce prepared clearly describes the work she has performed here. That report is her own work, aside from some help with organization and language that I assisted in. The report demonstrates Joyce's ability to develop research ideas, present findings, and integrate the findings into a broader context. While most of the projects Joyce worked on were preliminary or pilot studies, it is clear that she understands the direction future research on those topics could take and their potential overall significance.

In addition to the projects outlined in the report, Joyce worked on another study on estrogen-dependent visceral hypersensitivity (paper is in preparation and Joyce is a co-author). It is likely that she will also be part of several other papers that we are currently working on. She also contributed to a new project collaboration not mentioned in the report involving novel imaging techniques that we are planning to submit a grant proposal on.

Joyce proved to be a hard and conscientious worker, showing up consistently for her regular lab duties and also participating in department and school-wide events including our pain and neuroimaging journal clubs. She presented an article at the pain journal club, which was well received. She has also presented her own previous and ongoing work at lab meetings on multiple occasions. Finally, she presented her work at two major meetings: a pain-focused conference in Pittsburgh and the Society for Neuroscience conference in Chicago.

Joyce has gained many skills in neuroimaging study design, data acquisition, animal models, and analysis techniques. She has reached the level where I would be confident to allow her run a study on her own and make important decisions about the design and analysis plans. Joyce was also very well-liked in the laboratory and will be missed by all of us.

Overall, my impression of Joyce's performance and learning have been very positive. I believe she has the right attitude, intelligence, and perseverance to lead her to a very successful career.

Sincerely,

David A. Seminowicz, Ph.D.