LOUISE FAGGIONATO KIMURA VIEIRA

Efeitos do enriquecimento ambiental na neuropatia periférica induzida em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

São Paulo

2018

LOUISE FAGGIONATO KIMURA VIEIRA

Efeitos do enriquecimento ambiental na neuropatia periférica induzida em ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Gisele Picolo

Versão Corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o programa de Pós-graduação

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Louise Faggionato Kimura Vieira

Título da tese: Efeitos do enriquecimento ambiental na neuropatia periférica induzida em ratos

Orientador(a): Dra. Gisele Picolo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de doutoradp, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Influência do enriquecimento ambiental na sensibilidade dolorosa de animais e no seu controle: Possível interferência na expressão e ativação de receptores opioides", **protocolo nº 1050/13**, sob a responsabilidade de Gisele Picolo e Louise Faggionato Kimura Vieira – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/04/2013.

Vigência do Projeto: 04/2013 - 07/2017	**N° de animais/espécie**
Laboratório Especial de Dor e Sinalização	52 camundongos Balb/c 5sem - 18-20g (M); 52 ratos Wistar 9sem - 180-200g (M)

São Paulo, 15 de abril de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **58** nas fls. **06** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Gisele Picolo** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Influência do enriquecimento ambiental na sensibilidade dolorosa de animais e no seu controle: Possível interferência na expressão e ativação de receptores opinoides*" do qual participam o(s) aluno(s) **Louise Faggionato Kimura Vieira, Franciele Corrêa Machado e a pesquisadora Vânia Gomes de Moura Mattaraia,** 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 **05.07.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 31 de julho de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 07/08/2013
REL. Nº 2808

Dedico esse trabalho aos meus pais, Mário e Carminha, que com muito esforço, sempre me colocaram nas melhores escolas e possibilitaram meu desenvolvimento pessoal e intelectual. Meus heróis!

Dedico também ao meu marido, Pedro Henrique Giandon Vieira, que sempre me apoia e acredita em mim, inclusive quando falo que vou ganhar o prêmio Nobel. Meu maior apoio!

Além disso, dedico esse trabalho a todos que acreditam na ciência de qualidade e que juntos podemos fazer a diferença. Minha esperança!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Dra. Gisele Picolo, a Gi, por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto incrível, por sempre parar tudo pra discutir os resultados comigo e por me ajudar a criar asas para voar longe, virando uma grande amiga!

Agradeço à minha colaboradora Dra. Vanessa Zambelli, a Van, por todos os brainstormings depois das 5 da tarde, pelas ideias e sugestões ao longo do projeto e por me dar chacoalhões, sempre bem vindos para meu crescimento pessoal e profissional, reforçando nossa amizade!

Agradeço às minhas colaboradoras e super amigas, Aline (Li) e Morena (Mô), por me ajudarem durante meu projeto, principalmente nos experimentos longos e de tirar tecido, que duravam horas e deixavam bolhas nos dedos. Além disso, a Mô me ajudou muito nos experimentos de Blotting, pipetando todos os reagentes tóxicos quando eu estava grávida. Valeu meninas!

Agradeço aos funcionários do LEDS, Claudemir (Clau), Juliana (Ju), Martha (Maaartha), Priscila (Pri) e David por me ajudarem a cuidar dos meus animais, trocando os brinquedos sempre na ordem exata, lavando as caixas mega pesadas dos bichinhos e por todo apoio no desenvolvimento do projeto. Valeu galera!

Agradeço à minha colaboradora do biotério Central do Butantan, a Dra. Vânia Mattaraia, e seus funcionários, principalmente a Virgínia, por serem essenciais na parte do enriquecimento ambiental dos animais desde o nascimento, monitorando ganho de peso e tirando fotos das ninhadas. Valeu mesmo pessoal!

Agradeço imensamente às minhas irmãs, Adeline e Denise, que moram aqui em São Paulo e mesmo sem entender muito da pesquisa, sempre me apoiaram. Agradeço em especial a tia Adeline, por ter ficado com o meu filho vááááárias vezes para que eu pudesse concluir meus trabalhos. Suuuper obrigada!

Agradeço à Dra. Rosana Camarini, que no meu ingresso na pós-graduação em Farmacologia, fez sugestões muito válidas no projeto e me ajudou sempre que eu precisei. Obrigada Rosana!

Agradeço à minha colaboradora, a Dra. Rosana Pagano, a Rô, e sua aluna de mestrado, a Amanda, por me ensinarem a fazer imunohistoquímica, e a todos do Laboratório de Neuromodulação e Dor Experimental do Hospital Sírio Libanês por me receberam tão bem. Valeu pessoal!

Agradeço às minhas colaboradoras da Biologia Celular do Butantan, Dra. Marta Antoniazzi e em especial à Ms. Simone, por me ajudarem nos cortes histológicos, ao Perereca por me ajudar com vários detalhes sobre histologia, e a todos da Bio Cel por me receberem tão bem! Super obrigada gente!

Agradeço ao Dr. Pedro Ismael do Butantan pela ajuda com o liofilizador do LETA. Obrigada Pedro!

Agradeço à Mariana da Veterinária e ao Leonardo da Farmacologia por tirar minhas dúvidas sobre o labirinto em cruz elevado. Valeu pessoal!

Agradeço ao Dr. Marco Martina e à Dra. Gabriella da Faculdade de Medicina da NorthWestern University de Chicago nos EUA, por me receberem tão bem no laboratório, por me ensinar a fazer imunofluorescência, mesmo que não tenha gerado resultados satisfatórios. Foi um prazer visitar vocês!

Agradeço à Dra. Yara Cury, pelos ótimos eventos realizados pelo LEDS, proporcionando a internacionalização do nosso lab, e pelo apoio e ótimas sugestões no meu projeto de pós doc. Obrigada Yara!

Agradeço às meninas do lab e minhas parceiras, Flavia (Flá) e Michelle (Mi), por todas as risadas e ajuda nos experimentos. Isso vale também para todos do laboratório, Bia, Babih, Bill, Nath, Fla, Thiago, Vanessa, Karina, Gui, Tereza, Thaís.

E agradeço também àqueles que já deixaram o LEDS, Aninha, César, Caru, Will, Lê e Nathália, por toda ajuda quando entrei no lab. Brigadão gente!

Agradeço imensamente às agências que fomentaram meu doutorado, o CNPq (processo 141161/2013/2), CAPES e, principalmente, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo FAPESP 2013/20795-8).

Em especial, agradeço ao meu marido, Pedro Henrique (Peter, meu mi, meu li) por me aguentar falar sobre ciência sempre, por me dar todo o apoio que eu preciso para continuar nessa carreira de cientista, mesmo não sendo financeiramente rentável a curto e médio prazo. Obrigada meu li, por fazer parte desse sonho!

E por último, mas não menos importante, agradeço aos meus pais, por sempre me apoiarem, me inspirarem, me ajudarem com tudo! Em especial, minha mãe por ter me ajudado muuuito logo que o Joaquim nasceu e sempre me ajudou nesse papel de vovó. Valeu mamiiii!!! E agradeço também ao meu filho lindo, que me ensinou o mais sublime de todos os sentimentos. Te amo filho!

Além das pessoas, agradeço a toda energia positiva e a Deus!

“All our dreams can come true if we have the courage to pursue them”

Walt Disney

“O impossível é o limite”

Louise Faggionato Kimura Vieira

RESUMO

KIMURA, L. F. **Efeitos do enriquecimento ambiental na neuropatia periférica induzida em ratos**. 2018. 99 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O enriquecimento ambiental (EA) é capaz de alterar a percepção a estímulos nociceptivos, bem como de aumentar a resposta analgésica induzida por opioides. Considerando que a dor neuropática é um grave problema de saúde pública e o tratamento para esta condição ainda é insatisfatório e acarreta efeitos adversos severos, os objetivos deste trabalho foram avaliar a interferência do bem-estar animal na sensibilidade dolorosa de ratos frente a diferentes estímulos nociceptivos e investigar possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Os animais foram submetidos à avaliação da ansiedade e da sensibilidade dolorosa, em modelo de neuropática, frente a estímulos nociceptivos mecânicos e térmicos. Foi verificado que um protocolo de EA elaborado e iniciado desde o nascimento foi capaz de reverter totalmente a dor neuropática de animais submetidos à constrição crônica do nervo isquiático (CCI). Este efeito foi completamente abolido quando os animais enriquecidos foram tratados com naloxona, um antagonista opioide não seletivo. Análises de Western Blot não mostraram diferenças na expressão de receptores opioides em regiões relacionadas ao processamento e controle da dor, porém os níveis circulantes de beta-endorfina e met-encefalina aumentaram na presença de dor crônica nos animais enriquecidos. Os níveis séricos de corticosterona também se apresentaram aumentados nos animais com EA, independentemente da neuropatia, mas o tratamento com mifepristona, um antagonista de receptores de glicocorticoides, não alterou a analgesia dos animais operados. Ainda, o EA também reduziu a imunorreatividade para serotonina na medula espinal de animais com CCI. Além do efeito analgésico, o EA também reduziu o marcador de lesão neuronal ATF-3 no gânglio da raiz dorsal e, no local da constrição, reduziu a degeneração neuronal característica do modelo, induzindo ainda, a presença predominantemente de macrófagos do tipo M2. Este trabalho reforça a importância do bem-estar na prevenção do desenvolvimento da dor neuropática e mostra uma abordagem não farmacológica que pode aumentar a resiliência de animais contra estímulos nocivos.
Palavras-chave: Enriquecimento ambiental. Dor neuropática. Analgesia. Opioides endógenos. Macrófagos.

ABSTRACT

KIMURA, L. F. **Effects of environmental enrichment on peripheral neuropathy induced in rats**. 2018. 99 f. PhD thesis (Department of Pharmaclogy) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Environmental enrichment (EE) is capable of altering the perception of nociceptive stimuli, as well as increasing the analgesic response induced by opioids. Considering that neuropathic pain is a serious public health problem and the treatment for this condition is still unsatisfactory and induces severe side effects, the aims of this study were to evaluate the interference of animal welfare in the sensitivity to different nociceptive stimuli and to investigate possible mechanisms involved in this effect. Animals were submitted to the evaluation of anxiety and pain sensitivity in a model of neuropathic pain, against mechanical and thermal nociceptive stimuli. It was seen that an elaborated EE starting from birth was able to totally reverse the neuropathic pain of animals submitted to chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI). This effect was completely abolished when enriched animals were treated with naloxone, a nonselective opioid antagonist. Western blot analysis did not show differences in opioid receptor expression in regions related to pain processing and control, however, circulating levels of beta-endorphin and met-enkephalin were increased in the presence of chronic pain in enriched animals. Serum corticosterone levels were also increased in animals with EE regardless of neuropathy, but treatment with mifepristone, a nonselective glucocorticoid receptor antagonist, did not alter the analgesia of operated animals. Moreover, EE reduced serotonin immunoreactivity in the spinal cord of CCI animals. In addition to analgesic effect, EE also reduced the neuronal injury marker ATF-3 at the dorsal root ganglia and, at the site of constriction, decreased the neuronal degeneration characteristic of the model, inducing the presence of M2 macrophages subtype predominantly. This work reinforces the importance of well-being in preventing the development of neuropathic pain and shows a non-pharmacological approach that may increase animal resilience against noxious stimuli.

Keywords: Environmental enrichment. Neuropathic pain. Analgesia. Endogenous opioids. Macrophages.

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adenocorticotrófico

Arg-1 – Arginase tipo 1

ASICs – Canais iônicos sensíveis a ácido

ATF-3 – Fator ativador de transcrição 3

ATP – Adenosina trifosfato

cAMP – Adenosina monofosfato cíclica

CCI – Constrição crônica do nervo isquiático

CD11b – Cluster de diferenciação 11b

CDME – Corno dorsal da medula espinal

CRH – Hormônio liberador de corticotrofina

DAB – Diaminobenzidina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DOR – Receptor *delta*-opioide

DRG – Gânglio da raiz dorsal

DWB – Teste dinâmico de peso

EA – Enriquecimento ambiental

e.p.m. – Erro padrão da média

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GPCR – Receptor acoplado à proteína G

GRs – Receptores de glicocorticoides

HPA – Hipotálamo – Hipófise – Adrenal

Iba-1 – *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

JNK – c-Jun N-terminal quinase

KOR – Receptor *kappa*-opioide

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógenos

MOR – Receptor *mu*-opioide

NMR – Núcleo magno da rafe

PAG – Substância cinzenta periaquedutal

PFA – Paraformaldeído

POMC – Pró-opiomelanocortina

RVM – Bulbo rostral ventromedial

SNC – Sistema nervoso central

TNF – Fator de necrose tumoral

TRPs – Receptores de potencial transiente

TRPV1 – Receptor de potencial transiente tipo V1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DE LITERATURA 18

2.1 Dor – Considerações gerais 18

2.2. Enriquecimento ambiental 24

3 OBJETIVOS 28

4 ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS 29

4.1 Animais 29

4.2 Enriquecimento ambiental 29

4.3 Testes para avaliação da sensibilidade dolorosa 31

4.3.1 Modelo de pressão da pata de ratos 32

4.3.2. Teste para avaliar alodinia tátil usando os filamentos de von Frey 32

4.3.3. Teste de Hargreaves para avaliar hiperalgesia térmica 34

4.4 Indução de dor crônica 35

4.5 Teste de incapacitância motora 36

4.6 Avaliação da influência do EA na ansiedade dos animais 37

4.7. Tratamentos farmacológicos 38

4.8. Quantificação dos níveis circulantes de opioides e glicocorticoides endógenos 38

4.9 Marcação de serotonina por imunohistoquímica 39

4.10 Western Blotting 40

4.11 Análise histológica do nervo isquiático 41

4.12 Análise estatística 42

5 RESULTADOS 43

5.1 O EA não altera o peso corpóreo e encefálico dos animais enriquecidos 43

5.2 O EA abole a hiperalgesia mecânica e alodinia tátil induzidas pela CCI 45

5.3 O EA abole a hiperalgesia térmica induzida pela CCI 47

5.4 O EA melhora a incapacidade motora induzida pela CCI 48

5.5 O EA não interfere com a ansiedade dos animais 14 dias após a CCI 51

5.6 Avaliação da participação da via opioidérgica e dos glicocorticoides na analgesia induzida pelo EA.....53

5.7 O EA não interfere com a expressão proteica de receptores opioides e de glicocorticoides na PAG, medula espinal e DRG após a CCI 55

5.8 O EA induz aumento nos níveis circulantes de opioides endógenos após a CCI e ativa o eixo HPA independentemente da neuropatia 59

5.9 O EA não altera a via serotoninérgica descendente a partir do bulbo, mas reduz os níveis de serotonina liberada na medula espinal após a CCI 61

5.10 O EA reduz a expressão de micróglia na medula espinal induzida pela CCI após 28 dias da lesão. 64

5.11 O EA não altera o perfil de macrófagos no DRG, mas reduz marcador de lesão neuronal induzida pela CCI. 67

5.12 O EA induz a prevalência de macrófagos do tipo M2 no local da lesão induzida pela CCI 69

5.13 O EA reduz a degeneração Walleriana na parte proximal do nervo isquiático após a CCI.....71

6 DISCUSSÃO 74

7 CONCLUSÕES 85

REFERÊNCIAS.....86

ANEXO.....95

1 INTRODUÇÃO

A dor crônica é um grave problema de saúde pública, onde é estimado que 30 % da população mundial sofra dessa condição (Martin e Reid, 2017), que até os dias atuais não apresenta tratamento eficaz na grande maioria das vezes. Já estão descritos alguns fatores de risco, além de fatores genéticos e epigenéticos, para o desenvolvimento de dor crônica em humanos, como influências ambientais e eventos adversos (estresse, lesão ou doenças em estágios críticos do desenvolvimento), e a interação do ambiente psicossocial com o perfil psicológico do paciente, que acabam por aumentar a vulnerabilidade para o aparecimento e manutenção da dor persistente (Denk *et al.*, 2014). Além disso, maus tratos na infância como abuso físico e sexual, e depressão também estão associados ao desenvolvimento de dor crônica na vida adulta (Lampe *et al.*, 2003). Desta maneira, fica evidente que fatores ambientais interferem com a susceptibilidade para o desenvolvimento da dor crônica.

Por outro lado, a interação com o ambiente pode favorecer também o contrário, no sentido de aumentar a resiliência do indivíduo contra estímulos nocivos e situações aversivas, como é o caso da interação social em ambiente enriquecido (Dudley *et al.*, 2011; Lambert *et al.*, 2016). Alguns estudos com animais já comprovaram ação analgésica e melhor resposta a fármacos opioides nos animais expostos ao enriquecimento ambiental (EA, uma forma de promover bem-estar aos animais) (Smith *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005; Gabriel, A. F. *et al.*, 2010; Vachon *et al.*, 2013), o que indica haver comunicação entre o sistema analgésico opioidérgico e o bem-estar. Além disso, o EA também é capaz de modular o sistema dos glicocorticoides e de induzir resiliência contra agentes estressores. Esta resiliência pode ser decorrente da vivência em ambientes complexos, considerada um estresse de leve intensidade (Crofton *et al.*, 2015). Assim, a exposição constante à novidade induzida pela variedade de objetos pode atuar como um agente antiestresse em longo prazo. Desta maneira, estudos voltados para farmacologia endógena de vias analgésicas tornam-se extremamente válidos para a busca de novos alvos para o desenvolvimento de medicamentos e terapias que auxiliem no tratamento de doenças de difícil controle, como é o caso da dor crônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dor – Considerações gerais

A dor é um fenômeno desagradável, que acomete várias, senão todas as pessoas em alguma fase da vida. Este fenômeno frequentemente é resultante de lesões (mecânicos, térmicos e/ou químicos), e que muitas vezes pode estar associado também a componentes emocionais. Esta condição é comumente dividida em dor aguda e crônica. A dor aguda é decorrente principalmente de processos inflamatórios resultantes de lesão tecidual e, na maioria das vezes, é de fácil tratamento e rápida resolução. Por outro lado, a dor crônica tem sido considerada um grave problema de saúde pública, uma vez que muitos tipos de dores crônicas são, ainda hoje, intratáveis. Essa condição é descrita como uma das maiores causas de procura por assistência médica em todo o mundo, e podem ser responsáveis pela redução da qualidade de vida, perda de emprego ou diminuição de tarefas no trabalho e aumento nos índices de depressão, entre outros (Lynch *et al.*, 2007; Sessle, 2011; Staud, 2011).

Em relação à dor neuropática, os mecanismos envolvidos com o aparecimento dessa condição estão normalmente relacionados com lesões em fibras nervosas, ou ainda podem ser decorrentes da resolução não adequada de processos de dor aguda, que também acarretam alterações nas fibras nervosas. A lesão nervosa altera tanto as propriedades elétricas quanto a natureza química dos neurônios periféricos (Colvin e Power, 2007). Normalmente, estímulos nocivos periféricos são captados por diversos, porém específicos, tipos de receptores presentes nas terminações nervosas livres de nociceptores (neurônios pseudounipolares) como, por exemplo, receptores ASICs (do inglês *Acid-sensing ion channels*), alguns TRPs (do inglês *Transiente Receptor Potential*) e receptores purinérgicos (Marchand *et al.*, 2005). Esta informação nociva é transduzida e transmitida na forma de impulsos elétricos por fibras nervosas aferentes do tipo C e A *delta*, sendo que as fibras do tipo C, por não serem mielinizadas, transmitem o impulso de modo mais lento (0,4 - 1,4 m/s) que as do tipo A *delta*, mielinizadas (5 - 30 m/s) (Dubin e Patapoutian, 2010). As fibras nociceptivas têm sido classificadas com base na velocidade de condução e sensibilidade a estímulos nocivos mecânicos e a quentes e frios extremos. Predominantemente, as fibras C são

polimodais, respondendo a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, enquanto que as fibras do tipo A são termo e mecano-sensitivas (Dubin e Patapoutian, 2010). A informação transmitida por estas fibras passam pelo gânglio da raiz dorsal e atinge o corno dorsal da medula espinal, fazendo sinapse nas lâminas I, II e V de Rexed com neurônios de transmissão e também interneurônios. A informação segue para os centros supra espinais, passando pelo tálamo e/ou pela formação reticular no tronco encefálico, chegando ao córtex somatossensorial, onde é processada e entendida como dor. No momento em que o estímulo nocivo cessa, não ocorrem mais potenciais de ação nas fibras nervosas, fazendo com que o estímulo doloroso não se propague mais (Costigan e Woolf, 2000; Rosenow e Henderson, 2003; Rang *et al.*, 2012).

Após uma lesão nervosa persistente, alterações tanto na liberação de neurotransmissores quanto nas propriedades de transdução de sinal dos neurônios são observados e decorrentes da sensibilização periférica e central. O processo de sensibilização envolve vários eventos. Muitas substâncias algogênicas liberadas por nociceptores ativados ou por células não neuronais residentes ou que infiltraram no local, invadem o tecido ao redor da lesão e acabam por aumentar a excitabilidade não só da fibra nervosa lesionada como também de fibras adjuntas à lesão. Como exemplos dessas substâncias podemos citar citocinas, neuropeptídios, mediadores lipídicos, fatores de crescimento, histamina, serotonina, compostos oriundos do sangue (e.g. bradicinina), entre outros, que juntos são coletivamente chamados de “sopa inflamatória”. Além disso, os potenciais de ação tornam-se ectópicos, podendo até surgir espontaneamente, sem qualquer estímulo nocivo. Isso faz com que a estimulação não nociva de áreas adjuntas à lesão é capaz de elicitar uma sensação dolorosa, enquanto que fibras adjuntas à lesão também podem ser ativadas (Basbaum *et al.*, 2009; Jensen e Finnerup, 2014).

Estes disparos contínuos da fibra promovem aumento na entrada de impulsos elétricos na medula espinal e consequente aumento na liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, substância P, adenosina trifosfato (ATP) e o peptídeo geneticamente relacionado à calcitonina (CGRP do inglês *calcitonin gene-related peptide*) que, por sua vez, induzem outras modificações como a ativação de receptores quiescentes e aumento de cálcio intracelular nos neurônios de segunda ordem, perda da inibição feita por interneurônios inibitórios gabaérgicos e glicinérgicos, e ativação microglial levando à

sensibilização de neurônios na lâmina I, que pode criar ou aumentar a informação dolorosa frente a estímulos não nocivos e nocivos, respectivamente (Rosenow e Henderson, 2003; Colvin e Power, 2007). Além disso, os neurônios sensoriais, em condições normais, secretam várias substâncias, como as neurotrofinas, que participam ativamente da hemostasia neuronal. Sendo assim, outro fato que sucede a lesão nervosa é a degeneração de terminações centrais, decorrente da diminuição no transporte de neurotrofinas provenientes de neurônios periféricos (Colvin e Power, 2007). Diante de toda essa plasticidade anatômica e funcional que ocorre com a sensibilização periférica e central, fenômenos com a alodinia (dor em resposta a estímulos não nocivos) e a hiperalgesia (dor exacerbada em reposta a estímulos nocivos) são muito comuns na dor crônica, além da dor espontânea resultante da geração de potenciais de ação espontâneos, como já mencionado no parágrafo anterior (Costigan e Woolf, 2000; Basbaum *et al.*, 2009; Jensen e Finnerup, 2014).

O controle regulatório endógeno da dor, de um modo geral, além de envolver interneurônios inibitórios do corno dorsal da medula espinal, conta com áreas descendentes cortico-límbicas e do tronco encefálico, que são ativadas após a chegada da informação dolorosa nos centros supra espinais. Uma das principais regiões que medeia este processo é a substância cinzenta periaquedutal (PAG, do inglês *periaqueductal grey*), localizada no mesencéfalo. Quando ativada, a PAG ativa outras regiões, como o núcleo magno da rafe (NMR) no bulbo rostral ventromedial (RVM do inglês *rostral ventromedial medulla*) e o *locus coeruleus* na ponte, que enviam projeções descendentes para o corno dorsal da medula espinal, onde liberam substâncias com ação inibitória, como a serotonina e a noradrenalina respectivamente, que acabam por agir pré e/ou pós sinapticamente em receptores específicos que reduzem a excitabilidade neuronal (Millan, 2002; Rosenow e Henderson, 2003). A serotonina liberada ali se liga em receptores do tipo 5-HT_{1A} no neurônio aferente de segunda ordem, que são acoplados a proteína G inibitória, e em receptores do tipo 5-HT_3 excitatórios localizados em interneurônios inibitórios, que liberam GABA e encefalinas na fenda sináptica, reduzindo desta maneira, a excitabilidade neuronal e a ascensão da informação de dor (Millan, 2002; Fukushima *et al.*, 2009). Entretanto, além de inibitória, a via descendente pode ser também facilitatória, e a modulação final da resposta dolorosa é resultante do balanço entre essas duas vias (Millan, 2002).

As substâncias inibitórias liberadas são representadas principalmente pelos peptídeos opioides endógenos, além da serotonina (5-hidroxitriptamina) e da noradrenalina (norepinefrina) já mencionadas acima, e de outros mediadores não menos importantes como a dopamina, endocanabinoides e adenosina, além de GABA (ácido gama-amino butírico) e glicina liberados por interneurônios inibitórios na medula espinal (Millan, 2002). Os peptídeos opioides (e.g. encefalinas, endorfinas e dinorfinas), classificados assim por possuírem efeitos farmacológicos semelhantes aos opiáceos, tem seus receptores distribuídos amplamente por todo o sistema nervoso central (SNC), e também em regiões da periferia, como queratinócitos, sistema gastrointestinal e ao longo de fibras sensitivas. No SNC, estão presentes em diversas regiões encefálicas e em grande quantidade na via descendente longa desde o mesencéfalo até o corno dorsal da medula espinal, onde promovem a inibição de interneurônios inibitórios na PAG e no NMR, ativando assim as vias inibitórias descendentes, e também inibindo a excitabilidade neuronal na medula espinal (Millan, 2002; Mendell, 2011; Rang *et al.*, 2012).

No corno posterior da medula espinal, bem como nas terminações periféricas dos neurônios aferentes nociceptivos, os opioides possuem ações analgésicas por se ligarem a receptores acoplados à proteína G (GPCR, do inglês *G-protein coupled receptor*) do tipo inibitória, que inibe a formação de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*) intracelular e, deste maneira, reduzem o metabolismo celular. Além disso, quando esses receptores são ativados, uma subunidade da proteína G (Gα) interage diretamente com canais de potássio retificadores de entrada do tipo Kir3, e a outra subunidade (Gβγ) liga-se a canais de cálcio da membrana celular, reduzindo a excitabilidade da célula por hiperpolarização e inibindo a abertura de canais de cálcio, respectivamente, reduzindo assim a liberação de neutrotransmissores (Al-Hasani e Bruchas, 2011; Rang *et al.*, 2012). Assim como outros GPCRs, após a fosforilação, os receptores opioides são, na maioria das vezes, dessensibilizados e internalizados. Esses processos podem desencadear uma cascata de sinalização intracelular, envolvendo componentes da família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*), como a ERK 1 e 2, JKN e p38, cuja ações culminam em diversas respostas celulares como proliferação celular, diferenciação, apoptose, regulação de fatores de transcrição e fosforilação de canais (Al-Hasani e Bruchas, 2011). Portanto, além de exercerem

potentes efeitos em canais, os receptores opioides também apresentam efeitos mais lentos, porém robustos, em outras vias de transdução de sinal.

Os principais receptores opioides foram originalmente classificados na década de 1970 de acordo com sua especificidade farmacológica: *mu*, sendo os receptores mediados pela ação da morfina; *kappa*, respondendo ao opioide exógeno cetociclazocina; e *delta*, pela afinidade de opioides no canal deferente de camundongos. Na mesma época, estudos com opioides endógenos revelaram a afinidade de *β*-endorfinas pelo receptor *mu*, de dinorfinas pelo receptor *kappa* e encefalinas pelo receptor *delta*. Posteriormente, foi verificado também que todas as três famílias de receptores são inibidas pela naloxona (Abbadie e Pasternak, 2002; Dietis *et al.*, 2011).

Por estarem amplamente envolvidos com o fenômeno de analgesia, os opioides e seus receptores tem sido muito estudados na tentativa de identificar possíveis mecanismos para alívio da dor, especialmente da dor crônica, tanto em nível central quanto na periferia. Um dos compostos pioneiros neste estudo é a morfina, a qual após administrada é metabolizada no fígado em morfina-6-glucuronídeo (composto ativo capaz de atravessar a barreira hematoencefálica) e exerce seus efeitos ligando-se preferencialmente a receptores opioides do tipo *mu*. Porém, a administração de morfina, assim como de outros fármacos opioides, pode provocar inúmeros efeitos colaterais e indesejáveis (depressão, sonolência, euforia, dependência, tolerância, náusea e vômito), pela presença de receptores em diversas áreas centrais, e também pode interferir com fenômenos periféricos, como constipação, retenção urinária, prurido e rubor na face, pescoço e tórax (Lesniak e Lipkowski, 2011; De Gregori *et al.*, 2012; Rang *et al.*, 2012). Além disso, o uso prolongado de opioides também pode desencadear o aparecimento da hiperalgesia tardia, caracterizada pelo aumento ou agravamento do quadro doloroso já existente. Os mecanismos pelos quais este fenômeno ocorre ainda não estão totalmente esclarecidos. Ainda não está esclarecida a real participação dos receptores opioides neste efeito, porém há indícios da ativação de receptores para glutamato do tipo NMDA nesse fenômeno (Tompkins e Campbell, 2011).

Os glicocorticoides também são amplamente utilizados para o tratamento de condições inflamatórias e dolorosas. Primariamente, esses hormônios são produzidos pelo córtex da glândula adrenal, mais precisamente pela zona fasciculata, sobre estimulação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês

adrenocorticotropic hormone) produzido e liberado pela hipófise que, por sua vez, foi estimulada pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês *corticotropin releasing hormone*) vindo do hipotálamo em condições de estresse ou sob demanda fisiológica (Ramamoorthy e Cidlowski, 2016). Esses esteroides exercem suas funções através da ligação aos receptores de glicocorticoides (GRs, do inglês *glucocorticoid receptors*), intracelulares, onde atuam na regulação da expressão gênica ou ainda iniciam seus eventos de maneira não genômica, através de interações proteína-proteína com fatores de transcrição (Smith e Vale, 2006; Kadmiel e Cidlowski, 2013).

O efeito anti-inflamatório dos glicocorticoides, bastante conhecido, ocorre pela interferência na transcrição de genes com atividade pró-inflamatória e também por inibirem fosfolipases capazes de produzir substâncias inflamatórias e hiperalgésicas. Por isso, os corticoides sintéticos são muito utilizados no tratamento de desordens periféricas com quadros dolorosos, como psoríase, inflamações oculares e artrite reumatoide (Kadmiel e Cidlowski, 2013). Entretanto, apesar de sua ampla utilização, alguns estudos com modelos animais mostram que, em nível central, os efeitos mediados pelos GRs podem contribuir para o comportamento doloroso. Foi verificado experimentalmente que o aparecimento e o aumento da dor neuropática em ratos são concomitantes ao aumento da expressão de GRs no corno dorsal da medula espinal, e esta hiperalgesia é atenuada com o tratamento intratecal de antagonista para GRs (Wang *et al.*, 2004). Além disso, aumento na expressão do gene para GRs na medula espinal de camundongos após a ligadura do nervo espinal e inibição da alodinia mecânica e da hiperalgesia térmica em condição neuropática pelo tratamento com antagonistas para GRs (Takasaki *et al.*, 2005) também estão descritos. Ainda, foi verificado aumento na expressão de RNAm e proteínas para GRs em regiões da PAG de ratos com dor neuropática (Mor e Keay, 2013). Em humanos, sabe-se que a administração contínua de corticoides também pode causar efeitos adversos periféricos como síndromes metabólicas (e.g. Cushing, Addison), aumento de massa corpórea e doenças cardiovasculares (Kadmiel e Cidlowski, 2013). Todavia, na clínica, os glicocorticoides são administrados via epidural em pacientes que sofrem de dor espinal crônica, sendo o procedimento ambulatorial mais comum realizado para o tratamento desta moléstia em todo o mundo (Collighan e Gupta, 2010; Schilling e Markman, 2016). Esses dados indicam

um duplo papel dos glicocorticoides, ora no benefício ora no malefício de diversas condições.

Além dos efeitos adversos dos medicamentos opioides e corticoides, durante o processo de dor crônica, as inúmeras alterações periféricas e centrais mencionadas anteriormente (que podem ocorrer na expressão de canais iônicos e receptores, na regulação da liberação de neurotransmissores e até mesmo com a participação de outros tipos celulares, como as células da glia), juntamente com as variáveis individuais (idade, genética, trauma, estresse) e influências ambientais, fazem com que o tratamento da dor crônica seja de difícil controle. Por este motivo, buscando a melhoria de condições patológicas envolvidas com o SNC, muitas pesquisas tem se dedicado ao estudo de terapias alternativas, que podem ser associadas ou não às terapias farmacológicas convencionais. Nesse sentido, o número de estudos envolvendo terapias não farmacológicas tem sido cada vez maior.

2.2 Enriquecimento ambiental

Vários estudos em diversas áreas da ciência tem apontado a capacidade de animais vertebrados, além dos seres humanos, em apresentar percepções conscientes de tudo o que os cercam, ou seja, em possuírem senciência. Apesar desta ideia já ter sido explorada anteriormente, desde obras seculares renascentistas e até por Charles Darwin, somente nas últimas décadas esse assunto ganhou força e importância internacional (Dawkins, 2006; Duncan, 2006).

O bem-estar animal é um termo amplo que engloba tanto o conforto físico quanto mental dos animais (Duncan, 2006). A relação existente entre bem-estar animal e saúde física e psicológica, inicialmente proposta em 1988 (Hughes e Duncan, 1988), tem sido comprovada de forma crescente por vários trabalhos publicados nas últimas décadas, inclusive com humanos. Uma das maneiras mais amplamente utilizadas para garantir o bem-estar animal, principalmente dos animais de laboratório, é o enriquecimento ambiental.

O enriquecimento ambiental (EA), definido como uma combinação entre estímulos inanimados e interação social (Rosenzweig *et al.*, 1978), consiste em manter animais agrupados em determinados ambientes com diferentes objetos que podem ser utilizados para manipulação, exercício físico, esconderijo ou nidificação

(Sztainberg e Chen, 2010; Toth *et al.*, 2011). A finalidade do EA é melhorar a qualidade de vida dos animais por fornecer estímulos sensoriais e motores, aumentar a atividade física e as interações sociais e preveni-los de comportamentos indesejáveis ou anormais (Baroncelli *et al.*, 2010; Toth *et al.*, 2011). Esta melhora acaba por promover diversas alterações no SNC, as quais têm sido constantemente comprovadas em animais laboratoriais e na clínica. Estas alterações envolvem, por exemplo, plasticidade cerebral, diminuição da ansiedade, efeitos terapêuticos após lesão traumática no cérebro e melhora no aprendizado e memória (Passineau *et al.*, 2001; Belz, E. E. *et al.*, 2003; Maya-Vetencourt e Origlia, 2012; Patel, 2012; Monaco *et al.*, 2013).

Um dos estudos pioneiros que demonstrou a influência do EA no SNC foi realizado por Hebb em 1947, onde foi verificado que ratos mantidos como animais de estimação em ambientes com uma diversidade de objetos apresentaram melhoria na aprendizagem e memória em comparação àqueles mantidos no laboratório (Van Praag *et al.*, 2000; Würbel e Garner, 2007). Outros trabalhos tem mostrado que animais enriquecidos apresentam neuroplasticidade, através do aumento da massa e volume do córtex, neurogênese no hipocampo e modificações na morfologia dos neurônios (e.g. aumento da arborização dendrítica e da densidade sináptica). Além disso, alterações em nível celular, como a expressão aumentada de genes relacionados com estrutura e excitabilidade neuronal, e transmissão sináptica, e também aumento da síntese e secreção de neurotrofinas, já foram observados (Baroncelli *et al.*, 2010; Simpson e Kelly, 2011).

Outra abordagem para o uso do EA é sua utilização terapêutica na prevenção ou atenuação do estresse e da ansiedade. Apesar dos estudos indicarem que o EA pode alterar o nível hormonal de glicocorticoides dos animais enriquecidos de diferentes maneiras dependendo da história individual, existem fortes evidências de que o EA exerce efeitos ansiolíticos comportamentais e fisiológicos contra agentes estressores psicogênicos e neurogênicos, e prepara o animal para uma subsequente situação de estresse (Fox *et al.*, 2006). Diante de todos os efeitos benéficos acima mencionados, diferentes protocolos de EA tem sido amplamente utilizados em modelos experimentais não só de desordens neuronais humanas desenvolvidos em roedores, entre eles epilepsia, síndrome de Down, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (Nithianantharajah e Hannan, 2006) como também

em modelos de câncer de cólon, melanoma e inflamação (Cao *et al.*, 2010; Gabriel, A. F. *et al.*, 2010; Bice *et al.*, 2017) .

A grande plasticidade neuronal que o EA é capaz de promover levou cientistas a ampliarem os estudos com o intuito de pesquisar outros mecanismos modulados pelo bem-estar, visando sua utilização terapêutica. Como as vias nociceptivas e analgésicas estão intimamente relacionadas e dispersas em diversas regiões do SNC, alguns trabalhos sobre a influência do EA começaram a ser publicados sobre esse assunto nos últimos anos. Foram descritos vários benefícios em decorrência do EA, tais como: alteração da sensibilidade térmica tanto ao frio quanto ao calor (Rossi e Neubert, 2008), melhoria da resposta inflamatória aguda e crônica (Shum *et al.*, 2007), diminuição da hiperalgesia induzida por inflamação (Tall, 2009) e redução na dor crônica induzida por neuropatia periférica (Vachon *et al.*, 2013).

No que diz respeito às vias analgésicas, foi descrito que, utilizando-se animais machos, o EA é capaz de promover o aumento da sensibilidade de receptores opioides do tipo *kappa* (Smith *et al.*, 2003) e que a modulação dos receptores *mu* também acontece mediante o uso de diferentes agonistas (Smith *et al.*, 2005). Porém, quando fêmeas foram tratadas com agonistas opioides, não foram verificadas diferenças na sensibilidade aos agonistas entre fêmeas enriquecidas e não enriquecidas, o que indica que o gênero pode influenciar na maneira como o animal responde ao EA (Smith *et al.*, 2008). Em relação aos receptores opioides do tipo *delta*, até o momento, não existem estudos realizados sobre a influência do EA nesta via analgésica.

Além do tratamento com fármacos opioides para avaliar a interferência do EA nas vias analgésicas, alguns trabalhos já mostraram que, dependendo do modelo de EA, os níveis circulantes de corticosterona podem estar aumentados ou diminuídos em animais enriquecidos (Belz, Emily E *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2006; Fairhurst *et al.*, 2011). Isto porque os diversos protocolos de EA podem estimular diferentemente o eixo HPA (Hipotálamo – Hipófise – Adrenal), que é responsável pela liberação de glicocorticoides na circulação. Além desses hormônios, quando ativado, o eixo HPA também pode promover a liberação de β-endorfina do hipotálamo e da hipófise (Smith e Vale, 2006) que, por sua vez, pode auxiliar no controle da dor, quando presente. Entretanto, o mecanismo pelo qual o EA pode

facilitar a comunicação entre o eixo HPA e a via opioidérgica na presença de dor não está esclarecido.

Desta maneira, o presente projeto teve como objetivo estudar os efeitos do EA na dor neuropática de ratos, e avaliar os mecanismos responsáveis por esses efeitos. Os resultados desse projeto podem indicar algumas das relações existentes entre o bem-estar e analgesia, e assim proporcionar novas estratégias para o tratamento da dor crônica.

3 OBJETIVOS

Baseado na ausência de dados a respeito de como o EA pode interferir no sistema endógeno modulador da dor, o objetivo inicial do presente projeto foi:

a) estabelecer um protocolo de EA capaz de melhorar a sensibilidade dolorosa crônica dos animais, avaliada através de testes térmicos e mecânicos.

Uma vez estabelecido o protocolo de EA, os objetivos seguintes foram avaliar os mecanismos responsáveis pela analgesia induzida pelo EA no modelo de dor neuropática em relação à:

a) participação de receptores opioides (*mu*, *kappa* e *delta*) e de GRs em regiões relacionadas ao processamento e controle da dor;

b) alterações nos níveis séricos de opioides endógenos (β-endorfina, dinorfina A e met-encefalina) e glicocorticoides (corticosterona);

c) participação da via descendente serotoninérgica;

d) alteração de marcadores que contribuem para o comportamento doloroso;

e) interferência na lesão neuronal induzida pela neuropatia.

4 ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais nasceram e mantiveram-se no Biotério Central até aos 35 dias de vida em condições controladas de temperatura (22 ± 2 ° C), umidade (50% ± 10% de HR), ruído e iluminação artificial (ciclo de 12 h / 12 h de escuridão), com acesso livre a água e ração (Nuvilab CR1-Nuvital® Brasil). Após 35 dias, os animais foram transferidos para o Laboratório Especial de Dor e Sinalização e mantidos em gaiolas com maravalha autoclavada como forragem, e com água e comida *ad libitum* na sala apropriada, à prova de som, temperatura controlada (22 ± 2 ° C) e ciclo luz-escuro (12:12 h). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto Butantan (CEUAIB - protocolo 1050/13) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA 58/2013) de acordo com as diretrizes do guia ARRIVE. Os testes comportamentais foram realizados no período entre 7 e 13 h. O peso dos animais foi monitorado semanalmente a partir da primeira semana de vida. Após o término dos experimentos, os animais foram eutanasiados com isoflurano 5 % quando houve coleta de material, ou em câmara de CO_2 ao final dos demais ensaios.

4.2 Enriquecimento ambiental

O enriquecimento começou no nascimento dos animais e consistiu na adição de cilindros de plástico, toucas cirúrgicas descartáveis ou tubos de papel cartão, nesta ordem, na gaiola dos animais. Cada tipo de objeto foi alterado semanalmente. Após 5 semanas de vida, os animais foram colocados em gaiolas maiores (60 x 50 x 22 cm) em relação às gaiolas de tamanho padrão (49 x 34 x 16 cm), com três tipos diferentes de objetos ao mesmo tempo, dentre cinco tipos no total, sendo um deles alterado semanalmente, novamente para manter a novidade. Além das toucas cirúrgicas descartáveis, foram utilizados objetos diferentes como bolas de pingue pongue, tubos em acrílico (15 cm comprimento x 7 cm diâmetro x 0,3 cm de espessura), cabana em acrílico (15 cm comprimento x 8 cm de altura x 15 cm de largura) e abrigo retangular (9 cm largura x 9 cm altura x 15 cm comprimento)

(Acrilim Acrílicos, São Paulo, Brasil). Os animais não enriquecidos (NE) foram manipulados como o grupo enriquecido desde o nascimento, porém sem a inserção dos objetos em suas caixas e foram alocados em gaiolas de tamanho padrão após cinco semanas de vida. Os ensaios comportamentais foram realizados após a sétima semana de vida dos animais (~ 250 g) e o enriquecimento foi mantido até o final dos testes. Em todos os grupos, os animais foram distribuídos em número de 5 animais por gaiola após o desmame, e apenas um par de irmãos foi permitido por gaiola para evitar interferências genéticas. A troca dos objetos aconteceram sempre às segundas-feiras e os experimentos comportamentais realizados às quartas e quintas-feiras.

Ilustração 1: Esquema do modelo de EA. * os animais são alojados em gaiolas maiores.

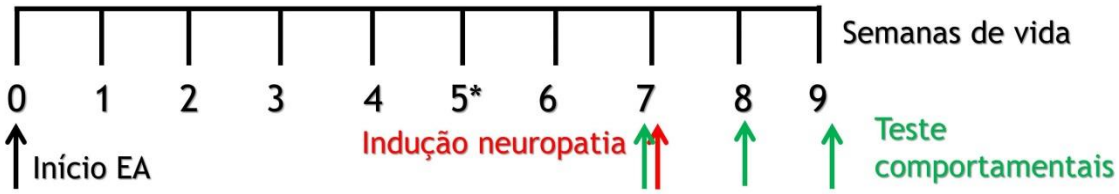


Ilustração 2: Esquema fotográfico de como foi feito o EA dos animais

Fonte: Arquivo pessoal

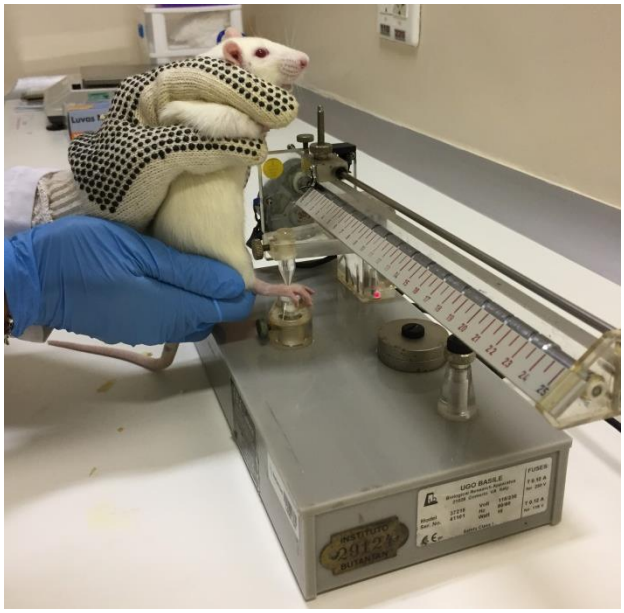
4.3 Testes para avaliação da sensibilidade dolorosa

A avaliação da influência do EA na sensibilidade dolorosa foi avaliada inicialmente frente a diferentes estímulos nociceptivos (térmico ou mecânico), em condições normais ou na presença de dor neuropática. Para tanto, os seguintes ensaios foram realizados:

4.3.1 Modelo de pressão da pata de ratos

Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de retirada da pata. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (g) necessária para a indução da reação. Este teste foi aplicado antes (medida inicial) e diversos tempos após a indução de neuropatia. Os resultados foram analisados por meio da comparação das médias das medidas iniciais e finais ou, quando determinado, através da comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Ilustração 3: Teste de pressão de patas.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.2 Teste para avaliar alodinia tátil usando os filamentos de von Frey

Neste teste, os ratos foram colocados individualmente em gaiolas plásticas, com fundo de arame, para permitir acesso às patas destes animais. Os ratos foram habituados na sala do teste durante os dias que antecederam os experimentos. No dia do ensaio, os animais foram colocados na gaiola, 10 min antes do início de cada medida. Para este ensaio de alodinia, foi empregada uma série logarítmica de 10 filamentos de *von Frey* (Aesthesiometer Semmer-Weinstein, Stoelting Co., E.U.A). A

calibração dos filamentos é definida como log_{10} (gramas x 10^4), tendo os seguintes valores (o valor em gramas está entre parênteses): 3,61 (0,407 g); 3,84 (0,692 g); 4,08 (1,202 g); 4,17 (1,479 g); 4,31 (2,041 g); 4,56 (3,630 g); 4,74 (5,495 g); 4,93 (8,511 g); 5,07 (11,749 g) e 5,18 (15,136 g). Cabe ressaltar que os filamentos com peso superior a 15,136 g não foram empregados nos estudos de alodinia. Os filamentos foram aplicados, um a um, perpendicularmente, sob a área plantar das patas ipsi posteriores e mantidos por um período de 8 segundos. Os ensaios foram iniciados com o filamento de 2,041 g. Na ocorrência da retirada da pata a este filamento, o que indica a ocorrência de alodinia, para a próxima estimulação foi utilizado o filamento de 0,407 g. Na ausência de resposta com o filamento de 0,407 g, o filamento seguinte (0,692 g) foi aplicado. Por outro lado, na presença de resposta, o mesmo filamento de 0,407 g foi aplicado novamente, 30-60 seg depois. O filamento capaz de elicitar a retirada da pata, duas vezes consecutivas, foi considerado como a força em gramas necessária para elicitar a resposta (100 % de resposta). Na ausência de resposta ao filamento inicial (2,041 g), a apresentação dos filamentos foi realizada de forma ascendente, até a observação de duas respostas consecutivas para um mesmo filamento. Na ausência de resposta ao maior estímulo (15,135 g), este filamento foi considerado como valor de corte. Esta forma de apresentação dos filamentos minimiza o risco de habituação do animal à resposta (Milligan *et al.*, 2000). As medidas foram realizadas antes (inicial) e em 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico.

Ilustração 4: Teste de alodinia mecânica (esquerda) usando filamentos de von Frey (direita).

Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.3 Teste de Hargreaves para avaliar hiperalgesia térmica

Neste teste, os ratos foram colocados no aparato (Plantar test – Hargreaves Apparatus, Ugo Basile IT) individualmente, em gaiolas plásticas com fundo falso, para aclimatação durante 10 min. Este aparato consiste em uma superfície plana transparente de modo que permite a passagem de luz através dela. Uma fonte de luz foi então aplicada à pata traseira ipsilateral por baixo do aparato, e o tempo até o animal retirar a pata da fonte de luz (latência) foi avaliado. Foi utilizado tempo de 30 seg de exposição como tempo de corte para limitar danos térmicos à região de pata, com intensidade de fonte de luz ajustada em estudos preliminares para causar uma resposta de latência de 15 seg, em média, em ratos naive. As medidas foram realizadas antes (inicial) e em 7 e 14 dias após a CCI. Em cada período, foram realizadas 2 medidas em cada animal com intervalo de 10 min entre elas, sendo a média dessas 2 medidas o valor final avaliado (Hargreaves *et al.*, 1988).

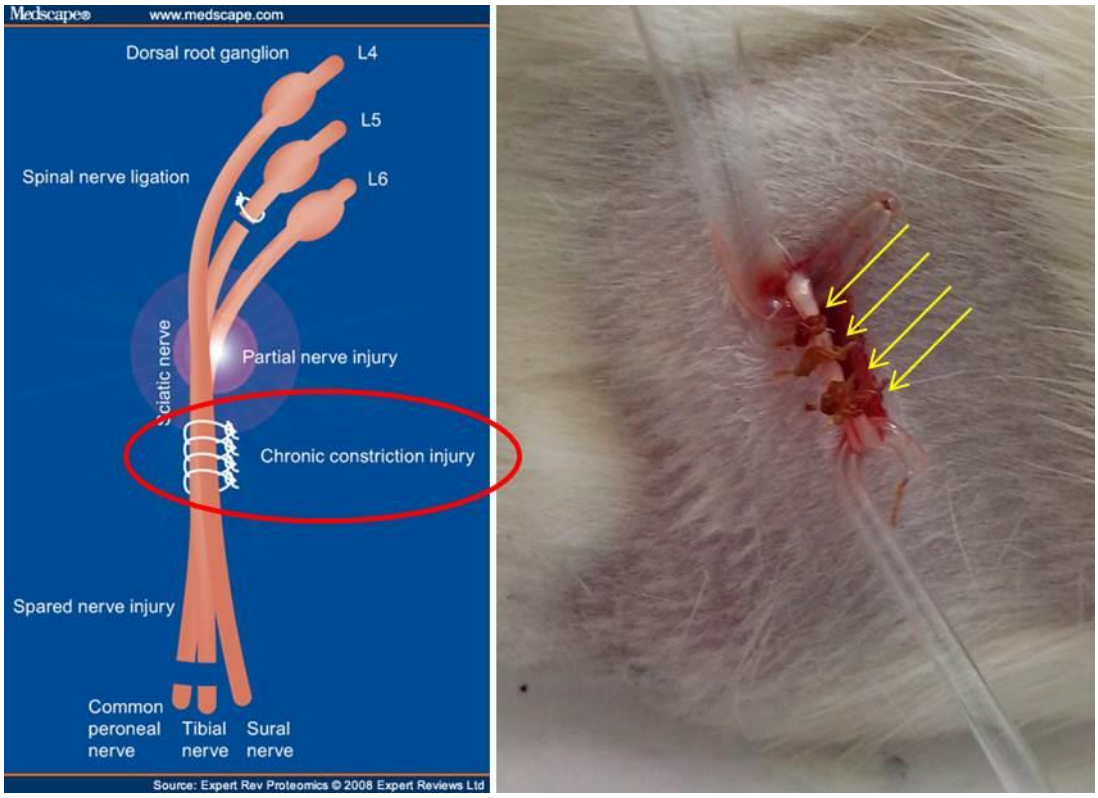
Ilustração 5: Teste de hiperalgesia térmica usando método de Hargreaves.

Fonte: www.ugobasile.com.

4.4 Indução de dor crônica

Para verificar possíveis diferenças na resposta analgésica à dor neuropática, os animais enriquecidos ou não foram submetidos à constrição crônica do nervo isquiático (Bennett e Xie, 1988). Após anestesia por inalação de isoflurano 3 %, o nervo isquiático direito dos animais foi exposto na região medial da coxa. O nervo desprendido do tecido recebeu quatro ligaduras ao seu redor, utilizando-se linha reabsorvível (catgut cromada 4-0), amarradas frouxamente com cerca de 1 mm de espaçamento, e a incisão foi fechada. Os animais controle (grupo Sham) também receberam a cirurgia, mas o nervo foi manipulado sem amarraduras e em seguida foram suturados. O limiar nociceptivo dos animais foi verificado antes (medida inicial), e em determinados períodos após a cirurgia. Para minimizar a dor aguda em todos os animais decorrente do procedimento cirúrgico (grupo Sham ou CCI), foi administrada dipirona (dipirona moniidratada, EMS, Brasil) (80 mg/kg, i.p., diluída em salina q.s.p. 500 µL) de 12 em 12 h por um período de 3 dias, sendo a primeira dose aplicada imediatamente antes da cirurgia. Dados do nosso grupo já mostraram que este tratamento não interfere com a instalação da neuropatia (Kimura *et al.*, 2017).

Ilustração 6: Região do nervo isquiático onde é feita a CCI (esquerda) e foto mostrando o nervo já com as quatro ligaduras (direita).



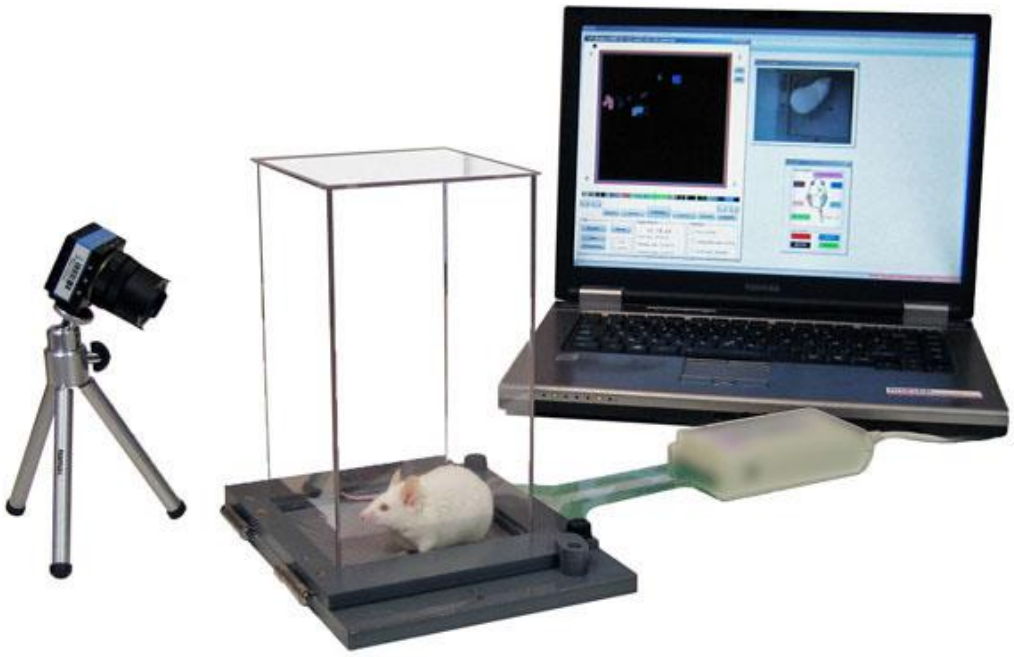
Fonte: medscape.com (esquerda) e arquivo pessoal (direita).

4.5 Teste de incapacitância motora

A incapacitância motora dos animais submetidos à CCI, em relação ao grupo naive, foi avaliada utilizando-se o teste de dinâmica de peso (DWB, do inglês *dynamic weight bearing test*), após 14 dias da cirurgia. Neste teste, os animais são colocados em uma câmara fechada lateralmente com acrílico transparente, que permite sua filmagem por 5 min, onde o animal é capaz de se mover livremente. O piso é composto por um tapete sensorial que contêm transdutores de pressão. O sistema usa um software que grava, em gramas, o peso médio que cada membro exerce no chão, sem interferência do analisador (equipamento DWB, Bioseb, France). Um observador valida os resultados através da filmagem, indicando para o programa o que é cada um dos pesos capturados pelos sensores (pata dianteira direita, pata traseira direita, e assim por diante, e outras regiões como a cauda e os testículos). O software DWB determina os parâmetros de peso automaticamente e fornece dados sobre o peso (em gramas) ou a área (em mm^2) da pata, que tocam o

chão. Os testículos e a cauda foram excluídos da análise. Os resultados foram expressos como a relação de peso entre as patas ipsilateral posterior (direita) e da pata contralateral (esquerda).

Ilustração 7: Teste de dinâmica do peso.



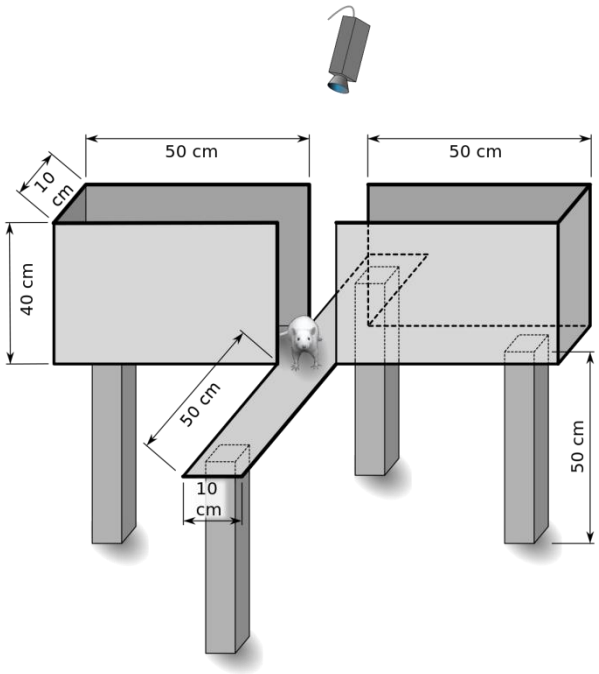
Fonte: www.bioseb.com

4.6 Avaliação da influência do EA na ansiedade dos animais

Uma vez que está descrito na literatura que o EA diminui a ansiedade de animais (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Pena *et al.*, 2006), este parâmetro comportamental foi avaliado nos animais na presença e ausência de estímulo nocivo. Para tanto, um aparato de madeira em formato de cruz, com dois dos braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados sem teto (50 x 10 x 40 cm), onde cada tipo se opõe ao outro, ficou elevado 50 cm do chão. Um animal por vez foi colocado neste aparato e, no decorrer de 5 min, o animal foi filmado por uma câmera posicionada acima do aparato, de modo que o deslocamento do animal fosse captado por completo em sala com intensidade luminosa reduzida. Através da análise das filmagens, foram registradas quantas vezes o animal entrou na parte aberta e na parte fechada do anteparo, e quanto tempo o animal ficou em cada uma

delas (Pellow *et al.*, 1985). Os resultados foram analisados através de comparação das médias obtidas nos diferentes grupos experimentais.

Ilustração 8: Labirinto em cruz elevado.



Fonte: en.wikipedia.org

4.7 Tratamentos farmacológicos

A fim de se verificar a participação dos sistemas opioide e dos glicocorticoides no beneficio do EA, os animais foram tratados com naloxona (antagonista não-seletivo de receptores opioides, 1 mg/kg, s.c., diluída em salina - 100 µL/animal, Henrifarma, BR), mifepristona (antagonista de GRs, 50 mg/kg, i.p. diluída em DMSO - 100 µL/animal, Sigma Aldrich, USA), ou com seus respectivos veículos (salina ou DMSO). Os tratamentos foram realizados 1 h antes da medida final.

4.8 Quantificação dos níveis circulantes de opioides e glicocorticoides endógenos

Para avaliar diferenças na liberação sistêmica de opioides e glicocorticoides, os animais provenientes do modelo experimental selecionado foram anestesiados com isofluorano 5 % e o sangue coletado por punção cardíaca. O sangue obtido foi centrifugado a 2500 g por 15 min a 4 °C para obtenção do soro, o qual foi utilizado

para a dosagem de β-endorfina, dinorfina A e met-encefalina (Pensinsula Laboratories International, Inc, EUA) ou corticosterona (Enzo Life Sciences, EUA) através de kit imunoenzimático comercial, segundo instruções do fabricante. Para a dosagem dos opioides, os peptídeos presentes no soro foram previamente extraídos em colunas SepPak C18, de acordo com as instruções do kit. O limite de detecção da curva foi de 0,01 ng/mL para β-endorfina, 0,001 ng/mL para dinorfina A, 0,49 ng/mL para met-encefalina e 32 pg/mL para corticosterona.

4.9 Marcação de serotonina por imunohistoquímica

Para a realização deste experimento, um novo grupo experimental foi utilizado. Após 14 dias da cirurgia, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) e foram perfundidos com paraformaldeído (PFA) 4 %. Foram removidos, a partir destes animais, o encéfalo e a medula espinal. Os tecidos foram pós-fixados na mesma solução de PFA por 6 h. Após o período de pós-fixação, os tecidos foram mantidos em solução de sacarose 30 % contendo 0.008 % de azida por no mínimo 48 h em geladeira (2 – 8 °C). Posteriormente, cortes relativos à região do RVM e da medula espinal correspondente à região L4-L6 foram realizados (30 µm) em micrótomo e coletados em solução anti-freezing (500 mL de PB 0,05 M, 150 g sacarose, 300 mL etilenoglicol) e estocados a -20 °C até o momento do uso. O material foi incubado *free-floating* por 4 dias com anticorpo específico para serotonina (Protos Biotech Corp, EUA) em PB (1:1000) contendo 0,3 % de Triton X-100 e 5 % de soro normal de cabra. Após este período, os cortes foram lavados 3 vezes em PB, incubados com o anticorpo secundário (1:200 em PB contendo 0,3 % de Triton X-100) por 2 h, lavados novamente como mencionado acima e incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite, Vector). Após a lavagem, os tecidos foram colocados pra reagir em solução de diaminobenzidina (DAB, 0,05 %) e peróxido de hidrogênio (0,01 %) em PB e, para intensificação da reação, foi feita impregnação por tetróxido de ósmio 0,05 % em água. Após esse procedimento, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, que passaram pelos processos de desidratação, limpeza e cobertura com lamínula. A análise de quantificação da reação foi realizada utilizando o software ImageJ.

4.10 Western Blotting

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados em isoflurano (5 %), eutanasiados e tiveram a PAG, o segmento ispilateral lombar da medula espinal, os gânglios da raiz dorsal (DRG, do inglês *dorsal root ganglia*) (*pool* respectivo aos seguimentos L4-L6) e o nervo isquiático removidos, todos ipsilaterais à lesão ou falsa cirurgia. As amostras foram homogeneizadas em tampão (volumes de 50 µL para PAG, DRGs e nervo, e 150 µL para medula) contendo Hepes-NaOH (1 M, PH 7,9), NaCl (0,9 %), EGTA (100 mM), DTPA (10 mM), Triton-X 100 (1 %) e inibidor de protease e fosfatase (1:300). As amostras foram centrifugadas a 15.000 g, por 10 min, a 4 ºC. Depois da centrifugação, a concentração de proteína foi determinada no sobrenadante pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Alíquotas contendo quantidades de proteína padronizadas para cada anticorpo nos respectivos tecidos foram fervidas em tampão Laemmli e posteriormente, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8, 10 ou 12 %, dependendo de cada proteína a ser detectada), em aparelho para minigel (Mini-Protean, Biorad, Brasil). Após a separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). A membrana foi bloqueada em TBST (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, e 0,1 % Tween 20) contendo 5 % de BSA por 1 h, depois lavadas em TBST, seguido pela incubação com anticorpos anti-*mu* (1:1000, Ab177898), anti-*kappa* (1:500, Ab 183825), anti-*delta* (1:1000, Ab176324), anti-GR (1:1000, Ab109022), anti-CD11b (1:500, Ab133357, bloqueio em TBST contendo 5 % de leite desnatado), anti-phosphoJNK, anti-phosphop38, anti-phosphoERK (1:1000, Cell Signaling), anti-Iba1 (1:1000, Ab178847 bloqueio em TBST contendo 5 % de leite desnatado), anti-iNOS (Ab49999), (1:1000, Abcam, EUA), anti-liver Arginase (Ab91279, 1 µg/mL, Abcam, EUA), Anti-ATF3 (1:500, SC-188, Santa Cruz Biotechnology, EUA), overnight, a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com TBST e então incubada por 2 h com anti-IgG do animal produtor do respectivo anticorpo primário conjugado à peroxidase (1:5000, Abcam, EUA). As bandas foram visualizadas utilizando solução ECL (Pierce) em fotodocumentador com sistema de captura digital de imagem (UVITEC Cambridge). A densidade óptica das bandas foi determinada pelo programa UVITEC Cambridge. A quantidade de proteína de membrana foi

normalizada pela incubação da membrana com anticorpo para GAPDH (1:5000, Ab8245, Abcam, EUA) ou beta-actina (1:5000, Sigma Aldrich, EUA).

4.11 Análise histológica do nervo isquiático

Para a realização deste experimento, um novo grupo experimental foi utilizado. Após eutanásia em isoflurano 5%, o nervo isquiático ispilateral dos animais após 14 dias da cirurgia foi exposto e pré-fixado *in situ* por 20 min com a solução de Karnovsky (aldeído glutárico 2,5 %, paraformaldeído 2 %, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2). Após esse período, o nervo foi cuidadosamente removido e seções de 1-2 mm de espessura foram cortadas, com o auxílio de lâminas, nas regiões próximas, mediais à CCI, e distais, em relação ao DRG, e colocadas em tubos contendo a solução de Karnovsky, e permaneceram em agitação suave por 3 dias à 4 °C. Após este período, os tecidos foram lavados 3 vezes (15 min cada) em agitador orbital com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e, ao final das lavagens, foram incubados com solução de tetróxido de ósmio 1 % em cacodilato de sódio 0,1 M. Após 1 h, foram lavados novamente (3 vezes de 15 min cada) e foi iniciada a bateria de desidratação: 2 incubações em álcool etílico 70 % (10 min cada), 2 incubações em álcool etílico 95 % (15 min cada) e 3 incubações em álcool etílico absoluto (20 min cada). Após essa etapa, os tecidos foram incubados com óxido de propileno + álcool etílico absoluto (1:1) por 15 min, depois com óxido de propileno por 15 min (duas vezes), e por último com óxido de propileno + resina para inclusão em microscopia eletrônica de transmissão (EMbed-812, EMS, EUA) *overnight* a temperatura ambiente. Após esse período, os tecidos foram incubados em resina pura *overnight* a temperatura ambiente. Todas as etapas foram feitas em agitação suave. Após essa incubação, o material foi passado para formas contendo a resina pura, onde foram posicionados para cortes transversais, e permaneceram em estufa a 60 °C por 3 dias. Após esse período, o material foi cortado em ultramicrótomo (0,75 µm) e corado com azul de toluidina e fucsina, e posteriormente montado com lamínula para análise em microscopia de luz. Os cortes histológicos foram fotografados em microscópio Zeiss Axioskop 2 plus, em aumento de 20 ou 100 x, equipado com câmera digital (Axiocam) e com o software Axiovision (Zeiss).

4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância One Way ANOVA ou teste T-Student, no caso de uma variável e de análise aos pares, ou Two Way ANOVA simples ou para medidas repetidas, para duas variáveis, seguidos do teste de Tukey ou Sidak. As análises foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism 6. Foram considerados valores estatisticamente significativos com no mínimo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A etapa inicial do projeto consistiu basicamente na padronização dos modelos a serem utilizados. Após ter sido estipulada a espécie rato e o teste de pressão de patas como modelo de verificação de hiperalgesia, foram testados dois modelos de EA, sendo um mais simplista que o outro. Apesar de os animais enriquecidos apresentarem a ansiedade diminuída com os dois modelos testados, foi observado que o EA mais simplista falhou em promover analgesia frente à indução de dor aguda ou crônica. Por outro lado, o modelo de EA mais elaborado, mesmo sem contar com rodas de atividade física, reduziu a dor aguda e aboliu completamente o comportamento neuropático dos animais. Esta primeira etapa gerou o primeiro manuscrito deste trabalho (ANEXO A). Os próximos passos do projeto foram investigar os efeitos do modelo de EA mais elaborado nos ratos na presença de dor neuropática e os mecanismos responsáveis por esse efeito.

5.1 O EA não altera o peso corpóreo e encefálico dos animais enriquecidos

A fim de avaliar se o EA desde o nascimento interfere com o ganho de peso, este parâmetro foi avaliado nos animais com e sem EA. Foi observado que os quatro grupos avaliados ganharam peso de maneira similar a partir do nascimento e até 49 dias de vida, onde foi realizada a cirurgia (Fig. 1A). Nos 14 dias decorrentes, uma pequena alteração de peso foi observada entre os grupos enriquecidos e não enriquecidos. Quando os grupos pós-cirurgia foram avaliados separadamente, foi verificada que a diferença de peso estava presente entre os grupos Sham EA, no qual os animais estavam mais pesados do que os do grupo CCI NE (Fig. 1B), não tendo relação com a condição de enriquecimento. Ainda, após os experimentos e eutanásia dos animais, os cérebros foram pesados. Entretanto, não foram verificadas alterações de peso entre os cérebros dos animais aqui estudados (Fig. 1C).

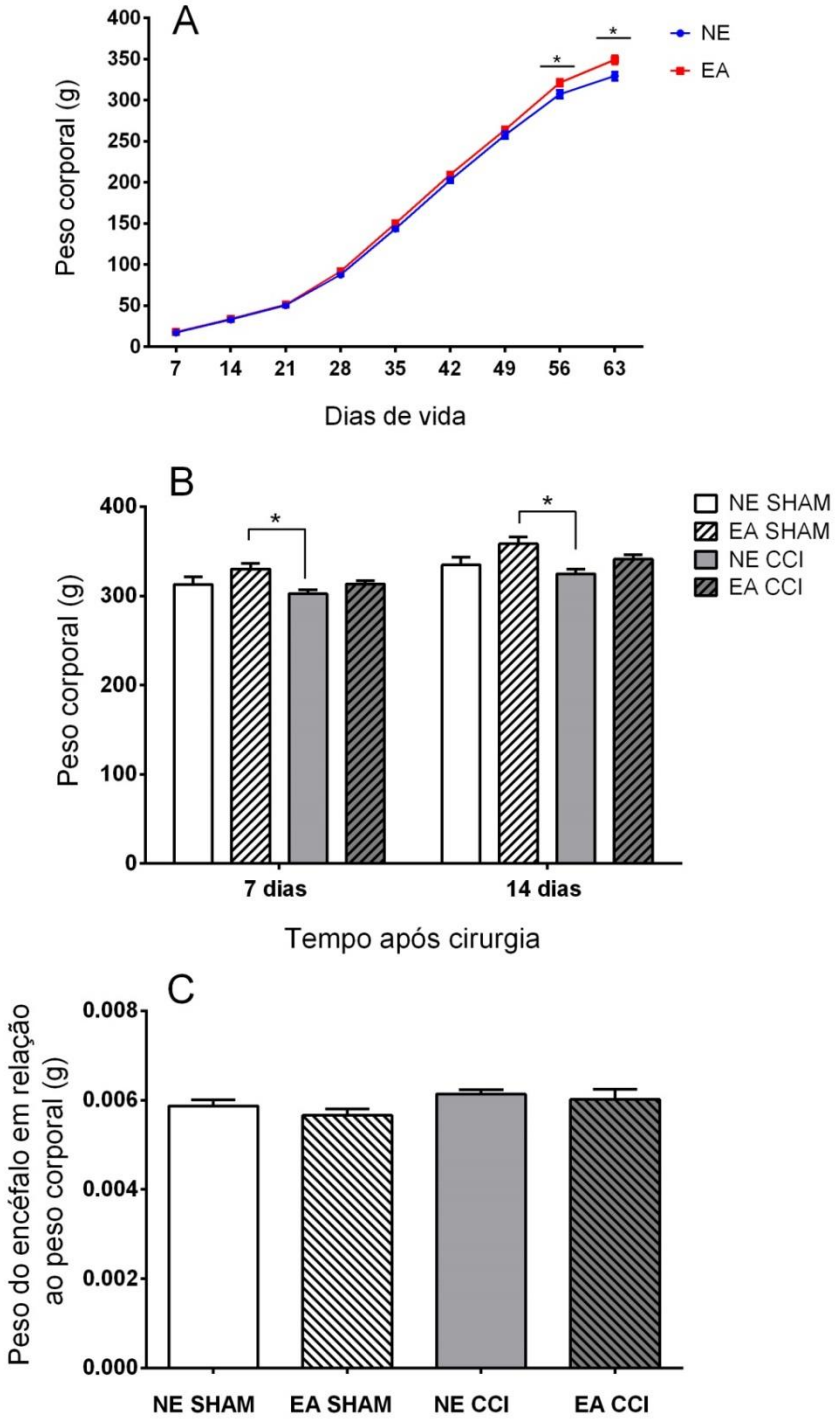


Figura 1: Ganho de peso dos animais com e sem EA. Os animais dos grupos experimentais foram pesados a cada semana a partir do nascimento (A). Pesagem dos animais em 7 e 14 dias após cirurgia para indução de dor crônica (CCI) ou falsa cirurgia (SHAM) (B). Relação entre o peso do cérebro dos animais em relação ao peso corpóreo 14 dias após a cirurgia (C). Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 15), *p< 0,05 em relação ao dia 0, utilizando ANOVA, seguido do teste de Tukey.

5.2 O EA abole a hiperalgesia mecânica e alodinia tátil induzidas pela CCI

Em relação à hiperalgesia mecânica, foi observado que não houve diferença nos limiares iniciais entre todos os grupos estudados (Fig. 2A). No 7º dia após a cirurgia, os animais com EA submetidos à CCI e os animais não enriquecidos com CCI apresentaram hiperalgesia, porém no primeiro grupo a queda do limiar nociceptivo em relação à medida basal foi menor (20 %) que a queda observada no segundo grupo (por volta de 43 %). Já no 14º dia, o limiar do grupo enriquecido com CCI retornou ao nível basal, enquanto que os animais do grupo não enriquecido com CCI apresentavam hiperalgesia (Fig. 2A). No que diz respeito à alodinia tátil, foi verificado novamente que os animais com e sem EA não apresentaram diferenças na medida basal (Fig. 2B). Porém, a partir de 7 dias da cirurgia, somente os animais não enriquecidos com CCI apresentaram queda no limiar nociceptivo, em relação à medida inicial, enquanto que os enriquecidos com CCI não apresentaram qualquer sinal de alodinia, que perdurou por até 28 dias após a cirurgia (Fig. 2B). Não foram observadas diferenças nos limiares dos grupos falso operados (SHAM) com e sem EA tanto no decorrer do tempo quanto entre os grupos (Fig. 2A, B).

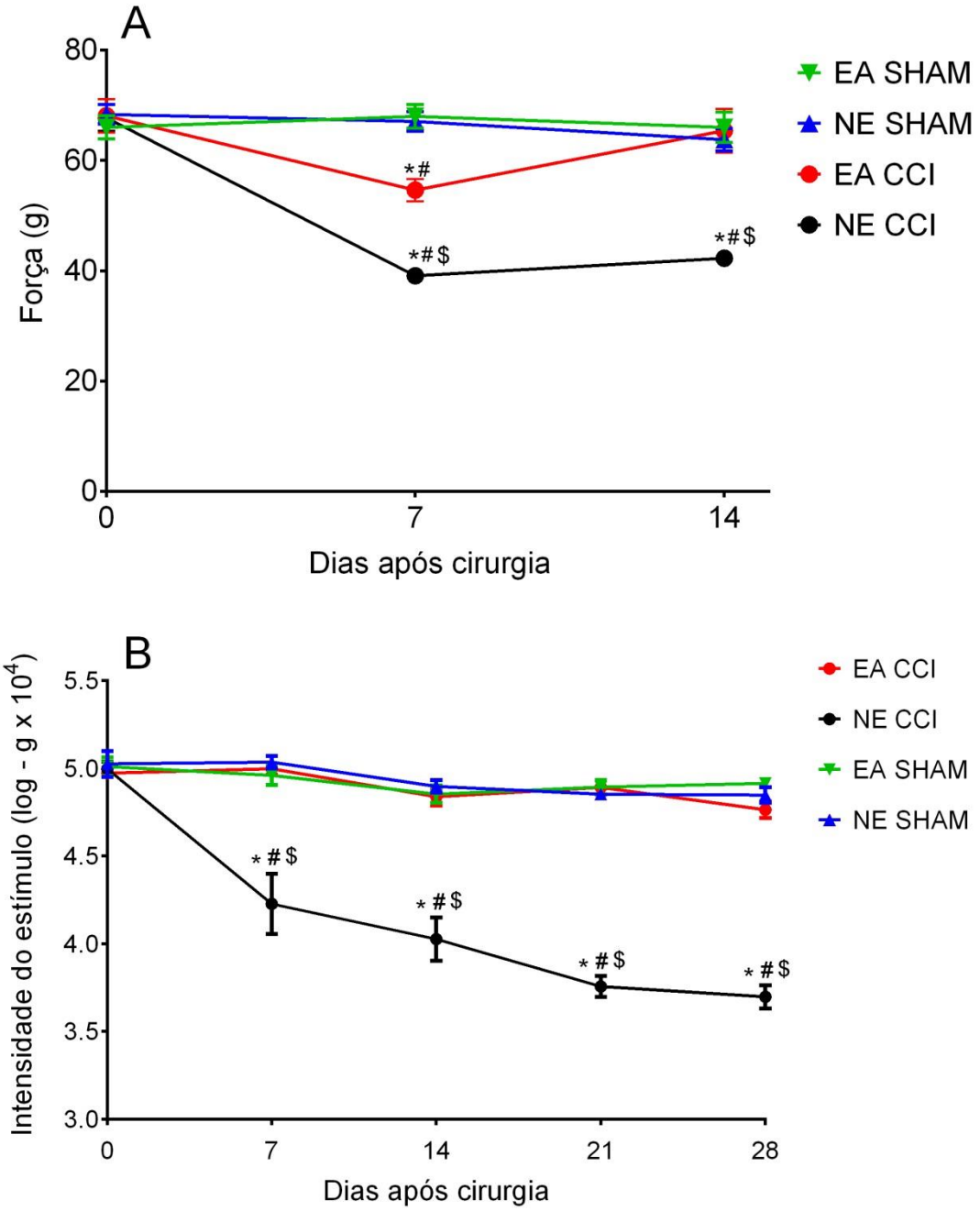


Figura 2: Efeito do EA sobre a hiperalgesia mecânica e alodinia tátil induzidas pela CCI. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) tiveram seu limiar basal mensurado (dia 0), depois foram submetidos ao procedimento cirúrgico (falso-operados SHAM e operados CCI), e após 7, 14 (A), 21 e 28 dias (B) foram realizadas novas medidas utilizando o teste de pressão de patas (A) e os filamentos de *von Frey* (B). Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (A: n= 10 -13; B: n= 6-8). *p< 0,05 em relação à medida inicial; # p< 0,05 em relação ao respectivo controle SHAM; $ p<0,05 em relação ao grupo NE. ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey.

5.3 O EA abole a hiperalgesia térmica induzida pela CCI

Novamente, não foram verificadas diferenças na sensibilidade térmica basal entre os animais dos grupos avaliados (Fig. 3A). Por outro lado, foi comprovado o efeito analgésico do EA na sensibilidade térmica nos animais tanto em 7 dias após a CCI, onde o limiar dos animais enriquecidos com CCI estava semelhante ao do grupo enriquecido naive (Fig. 3B), quanto na vigência de dor neuropática (14 dias após a CCI) (Fig. 3C). Em relação aos animais não enriquecidos, o grupo com CCI mostrou queda no limiar nociceptivo térmico tanto com 7 quanto com 14 dias após a CCI (Fig. 3B e 3C).

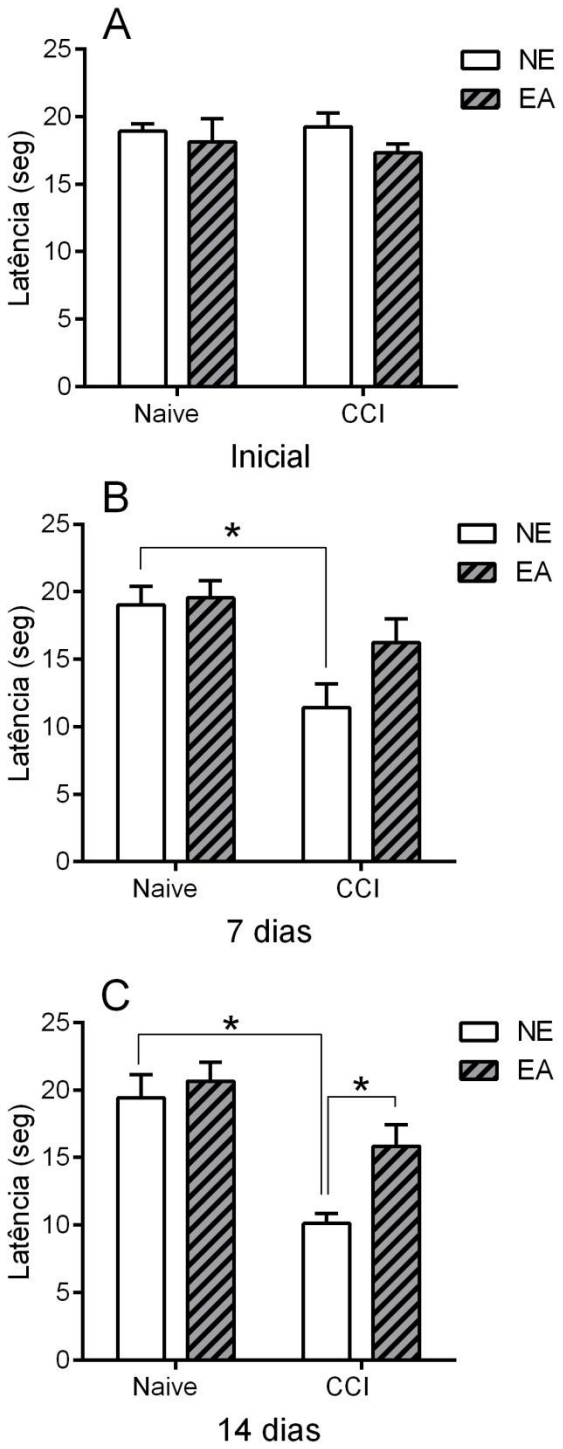


Figura 3: Efeito do EA sobre a hiperalgesia térmica induzida em ratos e verificada utilizando o modelo descrito por Hargreaves e colaboradores. Neste modelo, os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) tiveram seu limiar basal mensurado (inicial) (A), depois foram submetidos ao procedimento cirúrgico de constrição crônica do nervo isquiático (CCI), e após 7 (B) e 14 (C) dias foram realizadas novas medidas. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 5-8). ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

5.4 O EA melhora a incapacidade motora induzida pela CCI

Comprovado o efeito analgésico do EA, avaliamos se este efeito poderia modular também a incapacidade motora decorrente da neuropatia induzida pela CCI no nervo isquiático direito (lado ipsilateral) dos animais. Para isso, no décimo quarto dia após a cirurgia, os animais passaram pelo teste DWB. Foi verificado que a analgesia induzida pelo EA acarreta melhora na incapacidade motora dos animais enriquecidos com CCI em relação ao grupo não enriquecido, uma vez que os animais enriquecidos colocaram menos peso na pata esquerda (contralateral) em relação à direita (ipsilateral) (Fig. 4A) e pouparam menos a pata ipsilateral em relação à contralateral (Fig. 4B) em relação aos animais sem enriquecimento.

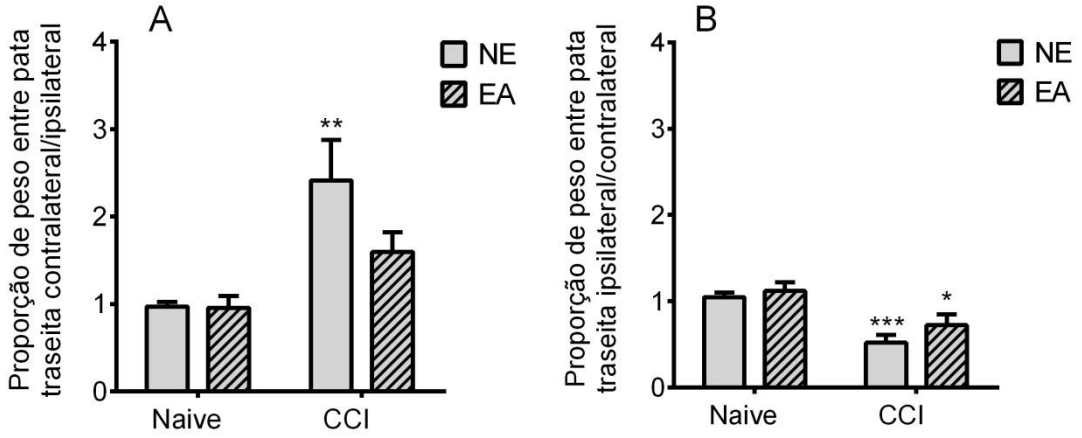


Figura 4: Efeito do EA na incapacidade motora de animais com dor neuropática. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) foram submetidos ao teste do DWB após 14 dias da CCI, onde foi verificada a relação do peso corporal apoiado na pata contralateral/ipsilateral (A) e ipsilateral/contralateral (B). Como controle, foram utilizados animais com e sem EA sem qualquer manipulação (Naive). Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 6-8). *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001 em relação ao respectivo grupo Naive. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Sidak.

5.5 O EA não interfere com a ansiedade dos animais 14 dias após a CCI

Nosso próximo passo foi avaliar o papel do EA na ansiedade dos animais com dor crônica, 14 dias após a CCI, uma vez que está descrito na literatura que a dor neuropática aumenta a ansiedade em ratos (Roeska *et al.*, 2008) e o protocolo utilizado de EA neste projeto reduz a ansiedade dos ratos em condições normais (Kimura *et al.*, 2017). Foi observado que os animais falso-operados (grupo sham) enriquecidos apresentavam ansiedade diminuída em relação ao grupo sham não enriquecido, visto que os animais do grupo sham com EA entraram mais vezes nos braços abertos do aparato (Fig. 5A) e permaneceram mais tempo sobre eles (Fig. 5B) do que os animais sham não enriquecidos. Porém, a indução da dor neuropática não alterou a ansiedade tanto dos animais com EA quanto dos animais sem EA (Fig. 5A, B) em 14 dias após a cirurgia.

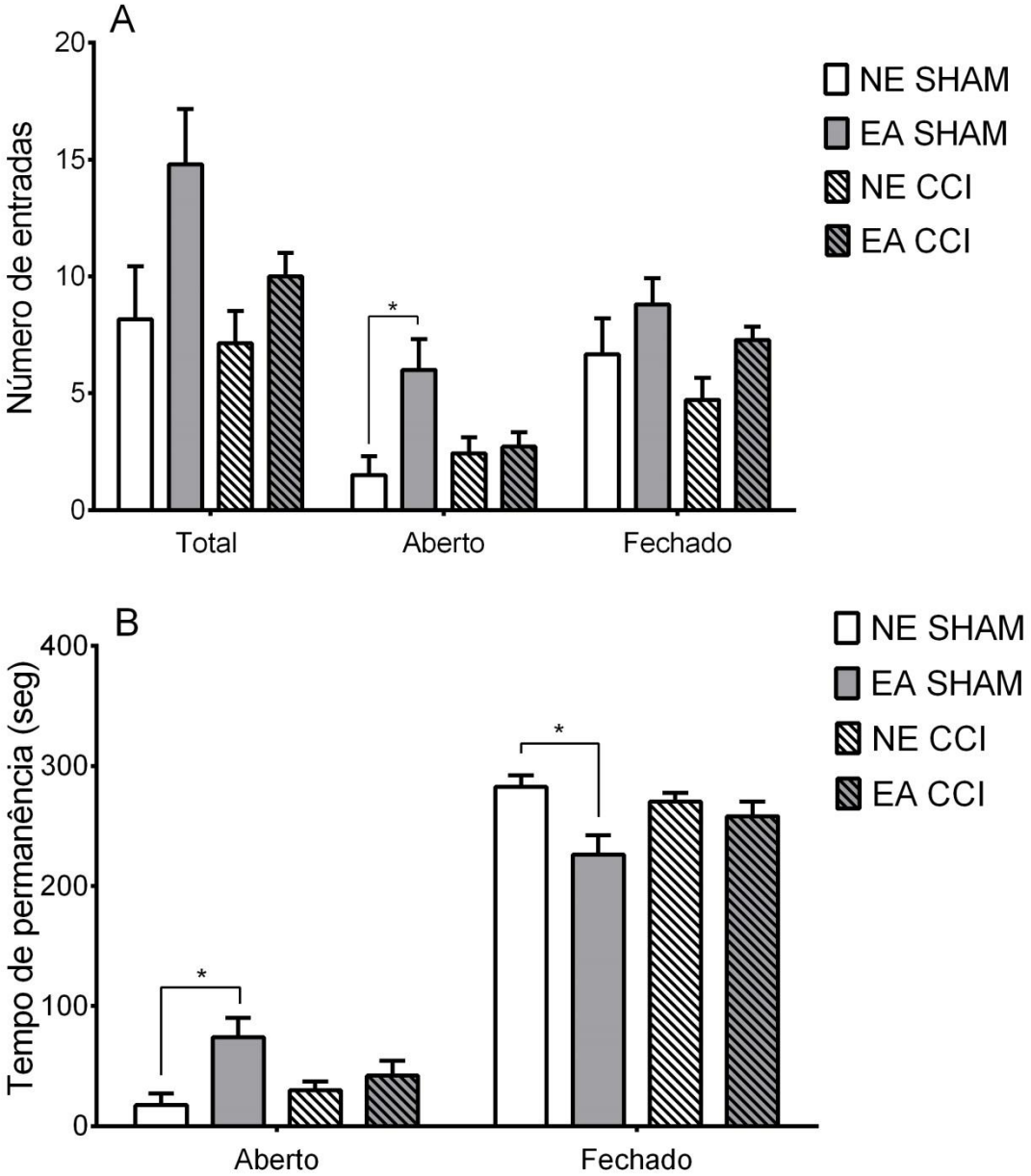


Figura 5: Efeito do EA sobre a ansiedade de animais com e sem CCI avaliado pelo teste do labirinto em cruz elevado. A análise do número de entradas nos braços aberto ou fechado (A) e o tempo de permanência nos mesmos (B) demonstram menor ansiedade nos animais enriquecidos falso-operados (EA SHAM) em comparação aos não enriquecidos falso-operados (NE SHAM) após 14 dias do procedimento cirúrgico. Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos enriquecidos operados (EA CCI) e não enriquecidos operados (NE CCI). Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 5-7). ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. *p< 0,05.

5.6 Avaliação da participação da via opioidérgica e dos glicocorticoides na analgesia induzida pelo EA

Para avaliar a participação da via opioidérgica e dos glicocorticoides na analgesia induzida pelo EA, foram utilizados os tratamentos com naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opioides, ou mifepristona, antagonista não seletivo de receptores para glicocorticoides, no décimo quarto dia após a cirurgia em grupos diferentes. Uma hora após os tratamentos, a medida pós-tratamento foi realizada. Estes ensaios foram executados através do teste de pressão de pata.

Foi observada diferença significativa no limiar nociceptivo entre os grupos com e sem EA antes dos tratamentos (Fig. 6A, B), corroborando com os resultados já mostrados. Quando os animais foram tratados com naloxona, foi verificada queda significativa no limiar nociceptivo dos animais enriquecidos (Fig. 6A). A naloxona ou a salina, administradas nessas condições, não causaram efeito nos animais não enriquecidos (Fig. 6A). Entretanto, o tratamento com mifepristona fez efeito apenas nos animais não enriquecidos, onde o limiar nociceptivo dos mesmos voltou ao basal após o tratamento, não sendo significativamente diferente do seu limiar inicial, mas sendo estatisticamente diferente do grupo controle tratado com DMSO (Fig. 6B). Não foi observado efeito algum nos animais enriquecidos tratados com mifepristona ou DMSO nessas condições (Fig. 6B).

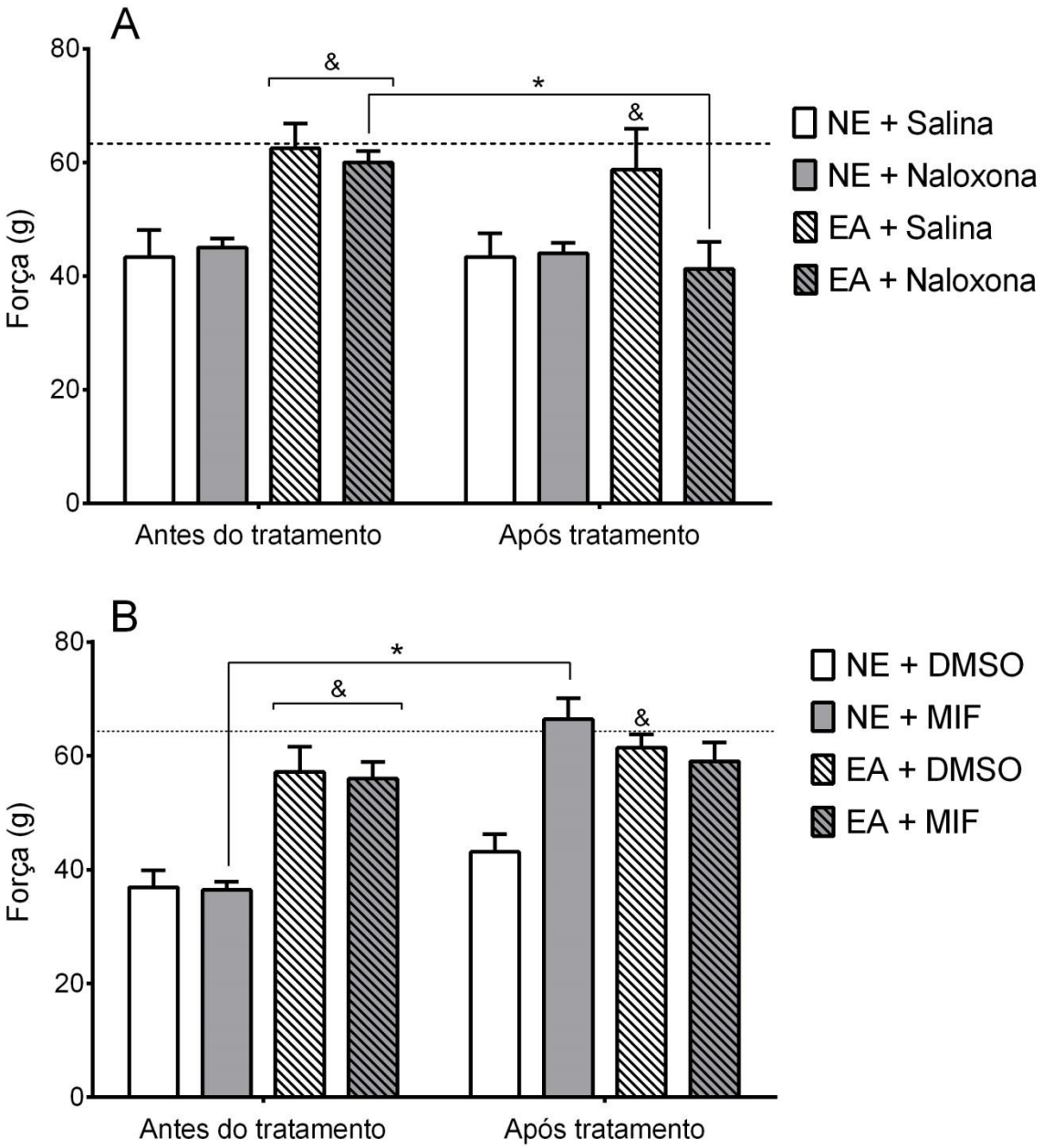


Figura 6: Efeito do tratamento com naloxona ou mifepristona sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela CCI em ratos e verificada utilizando o teste de pressão de patas. Neste modelo, os animais enriquecidos e não enriquecidos tiveram seu limiar mensurado após 14 dias da CCI, sendo realizadas medidas antes do tratamento e após os tratamentos farmacológicos (1 h) com naloxona (1 mg/kg, s.c.) ou salina (controle) (A), ou com mifepristona (MIF - 50 mg/kg, i.p.) ou DMSO (controle) (B). A linha tracejada representa o limiar nociceptivo basal dos grupos. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 5-6). *p< 0,05 em relação à medida antes do tratamento; & p< 0,05 em relação ao grupo NE. ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey.

5.7 O EA não interfere com a expressão proteica de receptores opioides e de glicocorticoides na PAG, medula espinal e DRG após a CCI

A expressão proteica dos receptores *mu* (MOR), *kappa* (KOR) e *delta* (DOR) opioides, e também a expressão dos receptores de glicocorticoides (GR) na PAG, medula espinal (ipsilateral) e DRG (ipsilateral) foi avaliada entre os animais com e sem EA, após 14 dias da CCI, ou falsa-cirurgia (SHAM), por *Western Blotting*. Como controle, foram utilizados tecidos provenientes de animais com e sem EA falso-operados (Sham). Não foram observadas diferenças na expressão dos três receptores opioides avaliados tanto na PAG (Fig. 7A, B e C), quanto na medula espinal (Fig. 8A, B e C) e no DRG (Fig. 9A, B e C) entre os grupos avaliados. Também não houve alteração na expressão de receptores para glicocorticoides nessas regiões (Figuras 7D, 8D e 9 D).

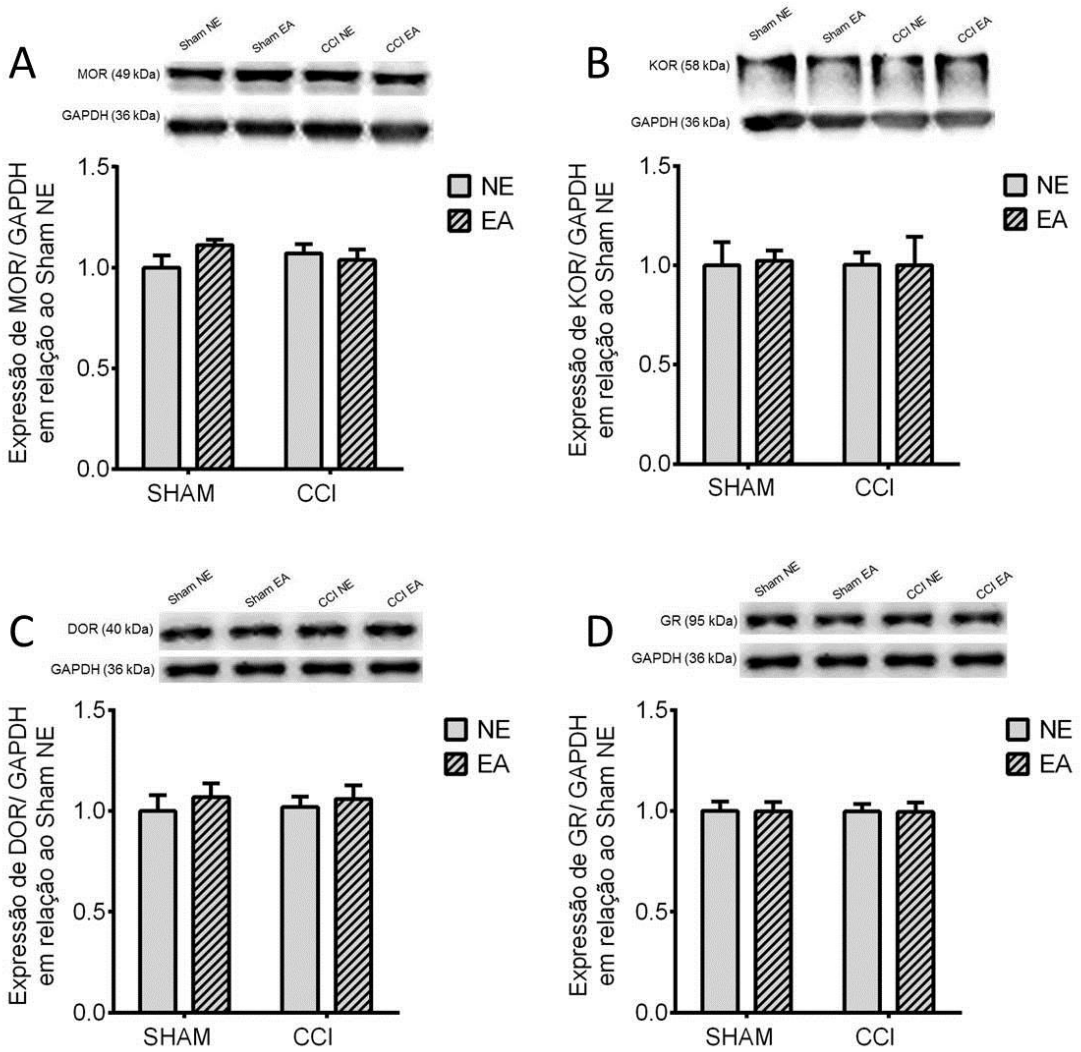


Figura 7: Avaliação da expressão proteica de receptores opioides na PAG. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) falso-operados (sham) e operados (CCI) (n= 7-8) foram eutanasiados, e a PAG foi coletada e processada para análise da expressão total de receptores opioides *mu* (MOR) (A), *kappa* (KOR) (B) e *delta* (DOR) (C), e receptores de glicocorticoides (D) por *Western Blotting*. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 7-8). Os resultados foram normalizados pela expressão da proteína GAPDH e comparados em relação ao grupo sham NE. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

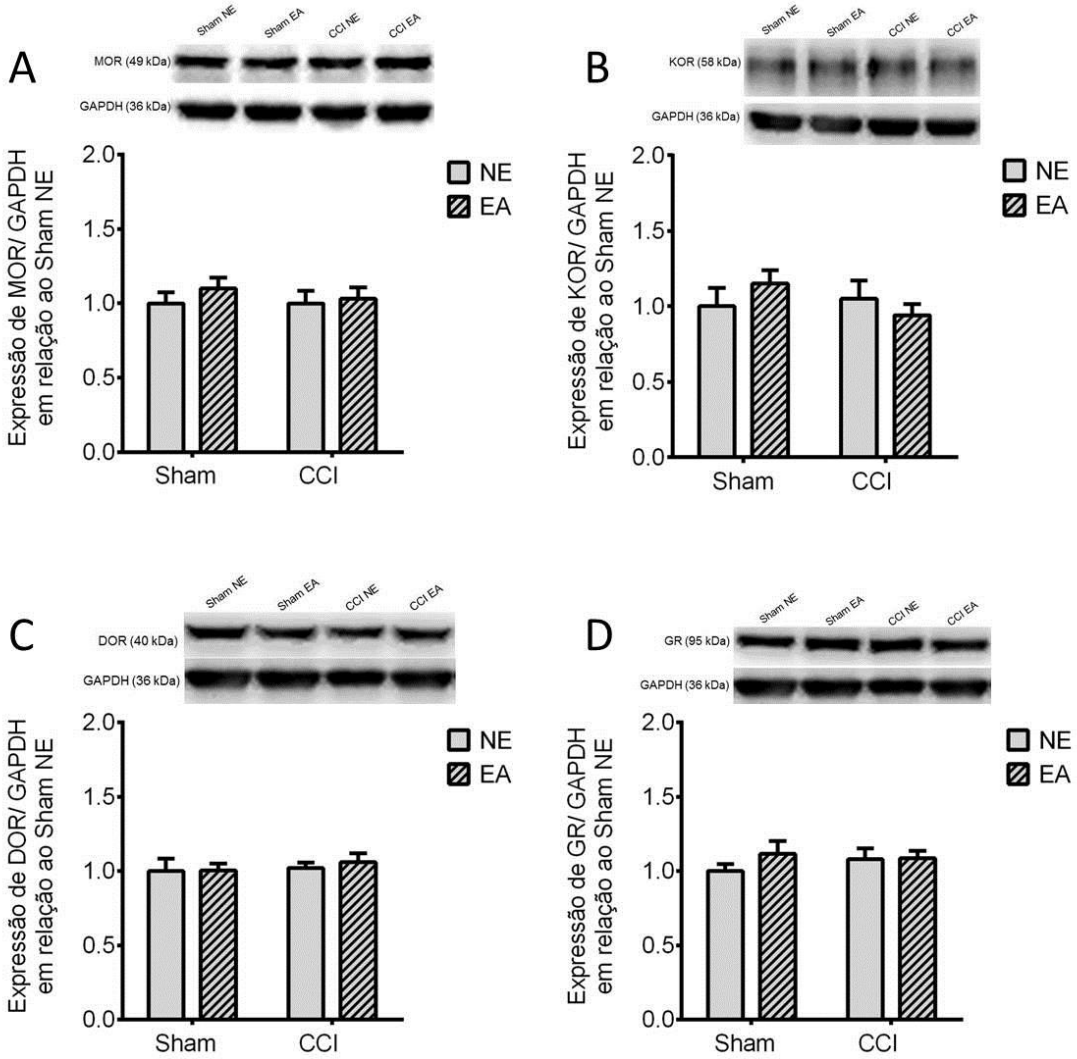


Figura 8: Avaliação da expressão proteica de receptores opioides na medula espinal. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) falso-operados (sham) e operados (CCI) (n= 7-8) foram eutanasiados, e a medula espinal (ipsilateral) foi coletada e processada para análise da expressão total de receptores opioides *mu* (MOR) (A), *kappa* (KOR) (B) e *delta* (DOR) (C), e receptores de glicocorticoides (D) por *Western Blotting*. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 7-8). Os resultados foram normalizados pela expressão da proteína GAPDH e comparados em relação ao grupo sham NE. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

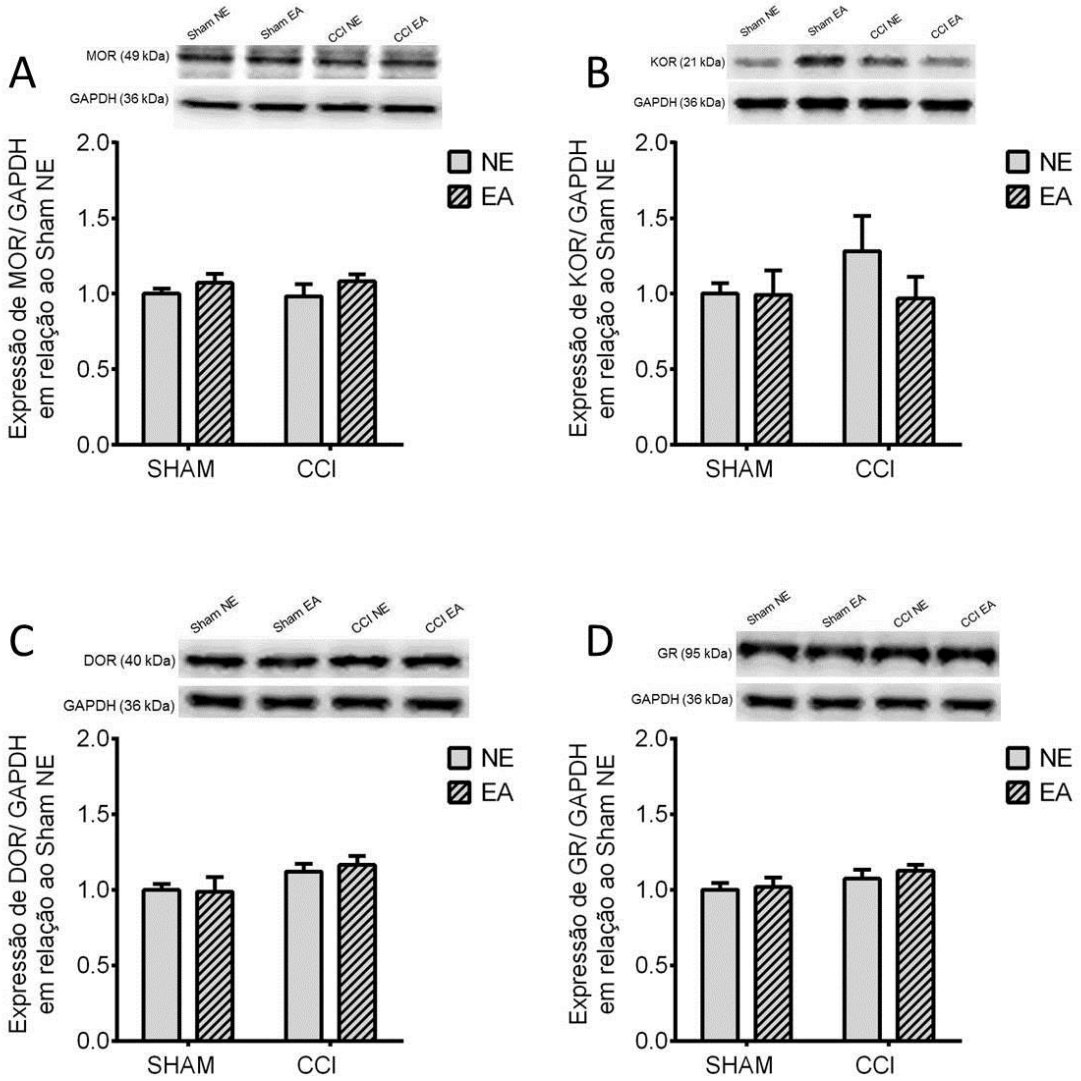


Figura 9: Avaliação da expressão proteica de receptores opioides no DRG. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) falso-operados (sham) e operados (CCI) (n= 7-8) foram eutanasiados, e o DRG (ipsilateral) foi coletado e processado para análise da expressão total de receptores opioides *mu* (MOR) (A), *kappa* (KOR) (B) e *delta* (DOR) (C) e receptores de glicocorticoides (D) por *Western Blotting*. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 7-8). Os resultados foram normalizados pela expressão da proteína GAPDH e comparados em relação ao grupo sham NE. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

5.8 O EA induz aumento nos níveis circulantes de opioides endógenos após a CCI e ativa o eixo HPA independentemente da neuropatia

Através da quantificação de opioides endógenos circulantes nos animais 14 dias após a CCI, foi verificado que os níveis circulantes de β-endorfina estavam significativamente aumentados nos grupos dos animais enriquecidos com CCI, em relação aos animais não enriquecidos com CCI (Fig. 10A). No que diz respeito à met-encefalina, foi verificado aumento dos seus níveis nos animais enriquecidos com CCI tanto em relação ao grupo NE com CCI quanto ao grupo naive com EA (Fig. 10B). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de dinorfina A nos grupos estudados (Fig. 10C). Já em relação ao nível sérico de corticosterona, foi observado que este glicocorticoide estava significativamente aumentado nos grupos dos animais enriquecidos, tanto naive quanto CCI de maneira similar, em relação ao nível encontrado no soro dos animais não enriquecidos (naive e CCI). Entre os animais NE, também não foram observadas diferenças nos níveis entre os grupos naive e CCI (Fig. 10D).

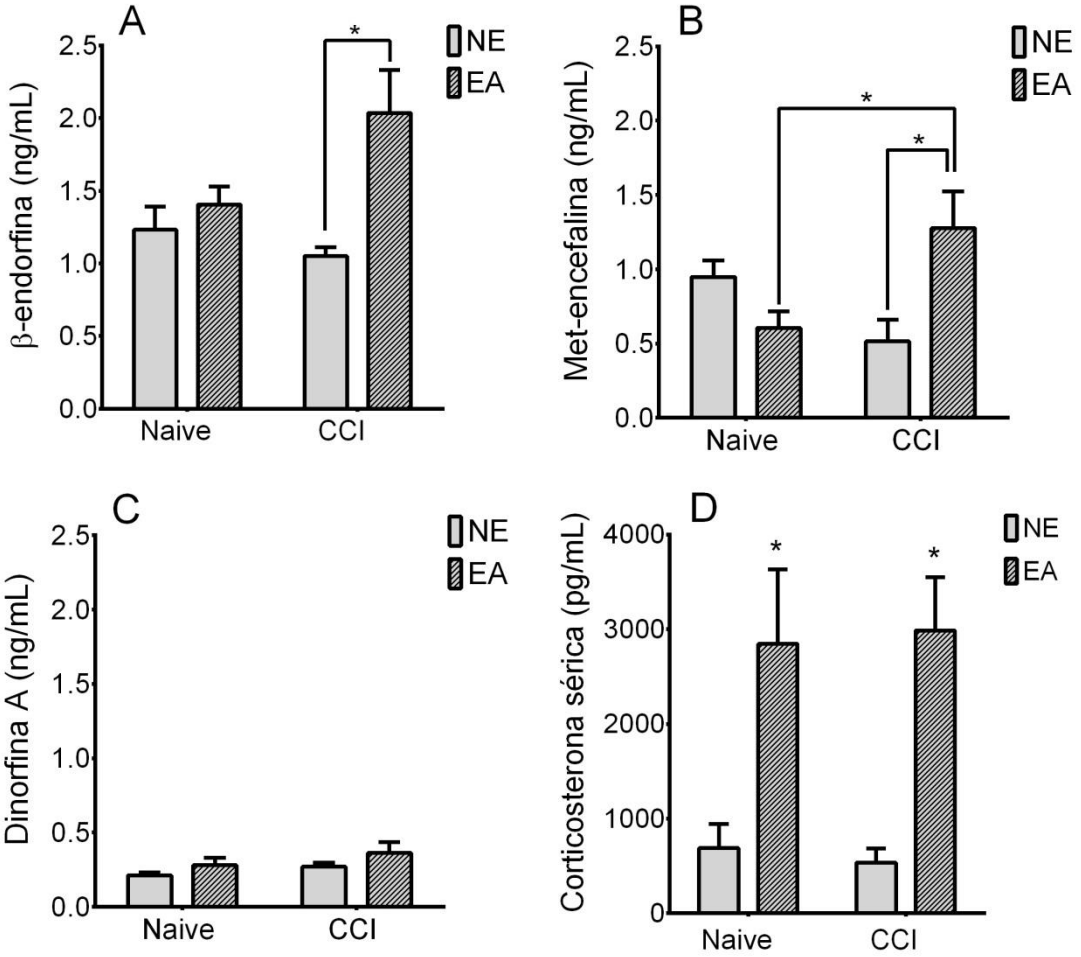


Figura 10: Quantificação de opioides endógenos e corticosterona presentes no soro de ratos. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) sem qualquer manipulação (naive) e operados (CCI) foram anestesiados para obtenção do sangue e depois eutanasiados. Do sangue foi obtido o soro utilizado no ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de β-endorfina (A), met-encefalina (B), dinorfina A (C) e corticosterona (D) de acordo com instruções do fabricante. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 4-6). *p< 0,05 utilizando ANOVA, seguido do teste de Tukey.

5.9 O EA não altera a via serotoninérgica descendente a partir do bulbo, mas reduz os níveis de serotonina liberada na medula espinal após a CCI

Através de ensaios de imunohistoquímica, foi estudado o papel do EA na serotonina presente na via analgésica descendente com enfoque nas células produtoras desse neurotransmissor no bulbo rostral ventromedial (RVM) e sua liberação no corno dorsal da medula espinal (CDME). Foi possível observar redução de serotonina em animais com CCI no bulbo rostral ventomedial, tanto em animais não enriquecidos quanto em enriquecidos, em relação aos respectivos grupos naive. Entretanto, essa redução foi maior no grupo NE em relação ao grupo EA (Fig. 11).

No que diz respeito à marcação para esse neurotransmissor na medula espinal na área do corno dorsal (ipsilateral à cirurgia), mais precisamente nas lâminas I e II de Rexed, não foram observadas diferenças entre os grupos NE e EA em condições basais (naive). Porém, na presença de neuropatia induzida pela CCI, foi verificada maior reatividade somente no grupo NE em relação ao grupo EA (Fig. 12).

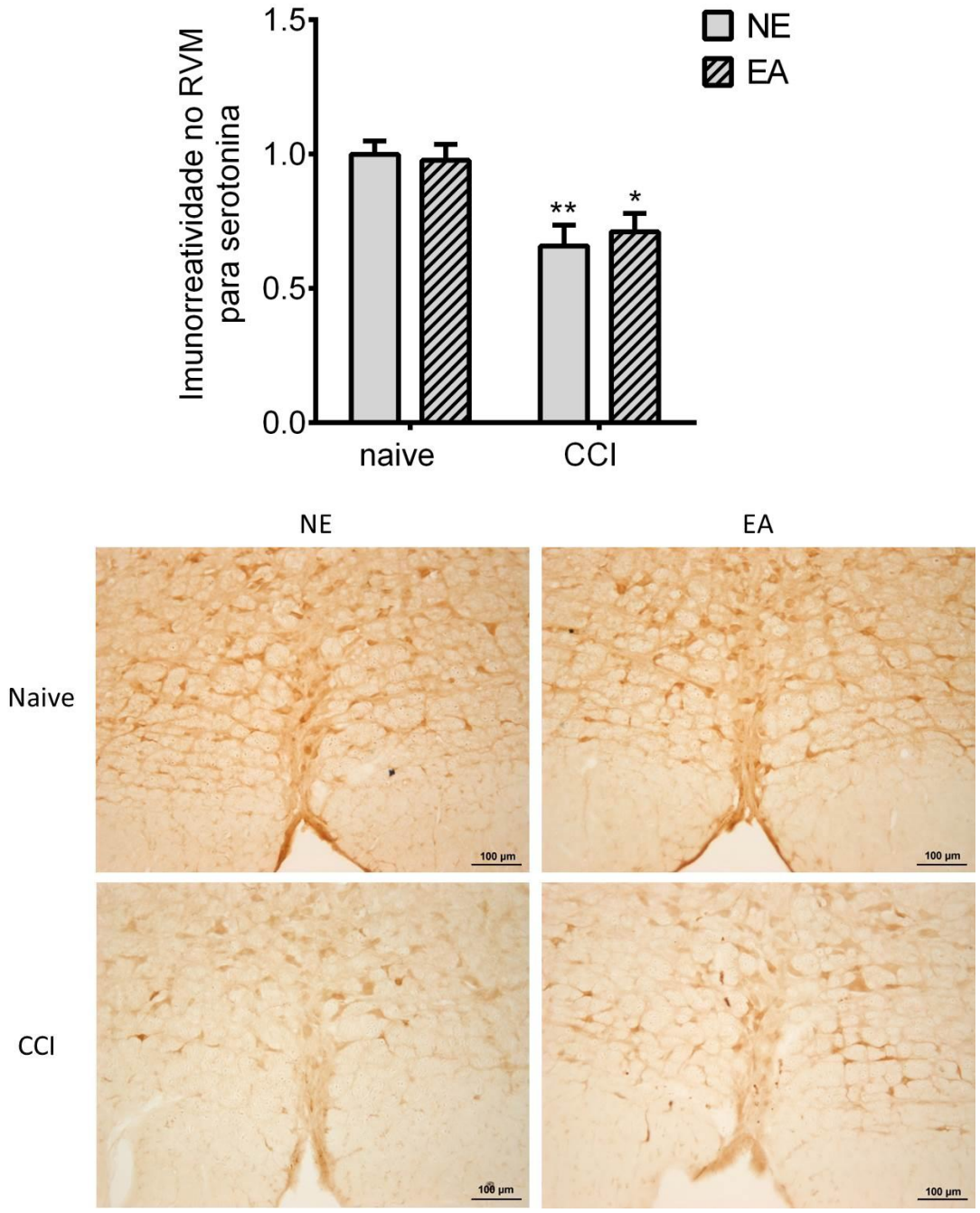


Figura 11: Efeito do enriquecimento ambiental na imunorreatividade para serotonina no bulbo rostral ventromedial (RVM). Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) sem qualquer manipulação (naive) e operados (CCI) (n= 3-4) foram perfundidos com PFA 4 % para obtenção do encéfalo após 14 dias da cirurgia. Cortes de 30 µm foram feitos em micrótomo e as seções foram submetidas ao teste de imunohistoquímica para serotonina com revelação por DAB. As fotos foram tiradas em microscópio de luz e quantificadas no Software ImageJ. *p< 0,05, **p< 0,01 em relação ao respectivo grupo Naive. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

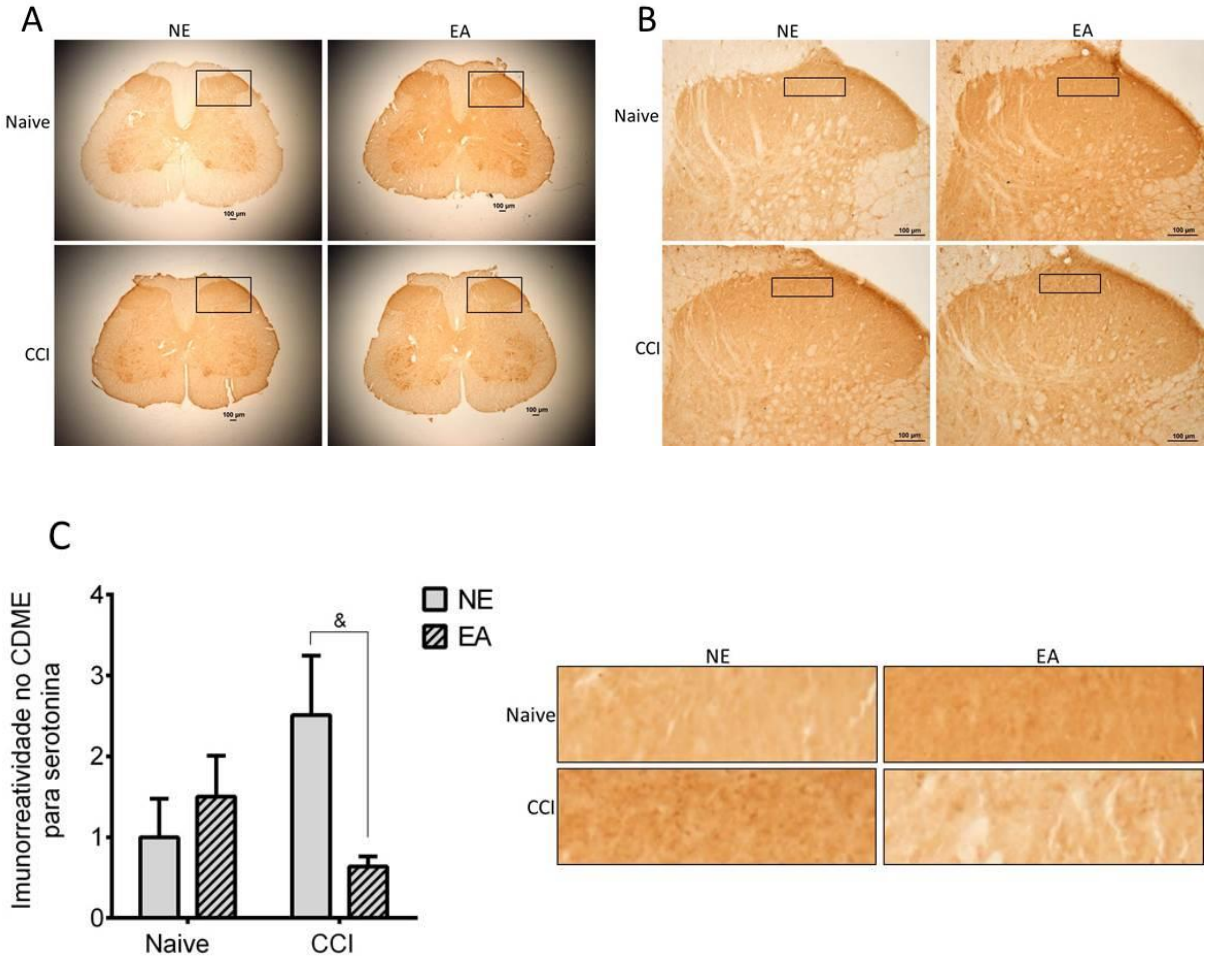


Figura 12: Efeito do enriquecimento ambiental na imunorreatividade para serotonina no corno dorsal da medula espinal. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) sem qualquer manipulação (naive) e operados (CCI) (n= 3-4) foram perfundidos com PFA 4 % para obtenção da medula espinal após 14 dias da cirurgia. Cortes de 30 µm foram feitos em micrótomo e as seções foram submetidas ao teste de imunohistoquímica para serotonina com revelação por DAB. As fotos foram tiradas em microscópio de luz. As regiões do corno dorsal da medula espinal (A) e das lâminas I e II de Rexed (B) estão evidenciadas pelos quadrantes. A imunorreatividade para serotonina respectiva às lâminas I e II (ispilaterais) (C) foram quantificados no Software ImageJ. &p< 0,05 em relação ao grupo NE. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

5.10 O EA reduz a expressão de micróglia na medula espinal induzida pela CCI após 28 dias da lesão.

Como é descrito aumento de micróglia na medula espinal de animais com lesão nervosa periférica crônica, foi verificado se o EA poderia alterar esse fenótipo nos animais com CCI. Para tanto, foi quantificada a expressão de micróglia na medula espinal (ipsilateral) dos animais no décimo quarto dia após a CCI, em relação ao grupo Sham (falso-operados), utilizando-se marcador inespecífico para micróglia (CD11b), e marcadores para macrófagos do tipo M1 (iNOS – óxido nítrico sintase induzível) ativados classicamente, e do tipo M2 (Agr-1 – arginase tipo 1) ativados alternativamente. Foi verificado, de fato, aumento do marcador de micróglia CD11b nos animais com CCI em relação ao grupo Sham, mas esse aumento foi similar entre os grupos com e sem EA (Fig. 13A) e não houveram diferenças entre o perfil M1 (Fig. 13B) e M2 (Fig. 13C) nessas amostras. Por outro lado, utilizando amostras de animais após 28 dias da cirurgia, foi verificada uma diminuição na expressão de micróglia na medula de animais enriquecidos, enquanto que essa expressão ainda estava aumentada no grupo não enriquecido (Fig. 13D). Para testar se havia diferenças na ativação da micróglia entre animais enriquecidos e não enriquecidos após 14 dias da CCI, foi verificada a expressão de MAP quinases associadas à ativação microglial. Entretanto, não foram observadas diferenças na expressão das quinases fosforiladas JNK (Fig. 14A), ERK (Fig. 14B) e p38 (Fig. 14C) entre todos os grupos estudados.

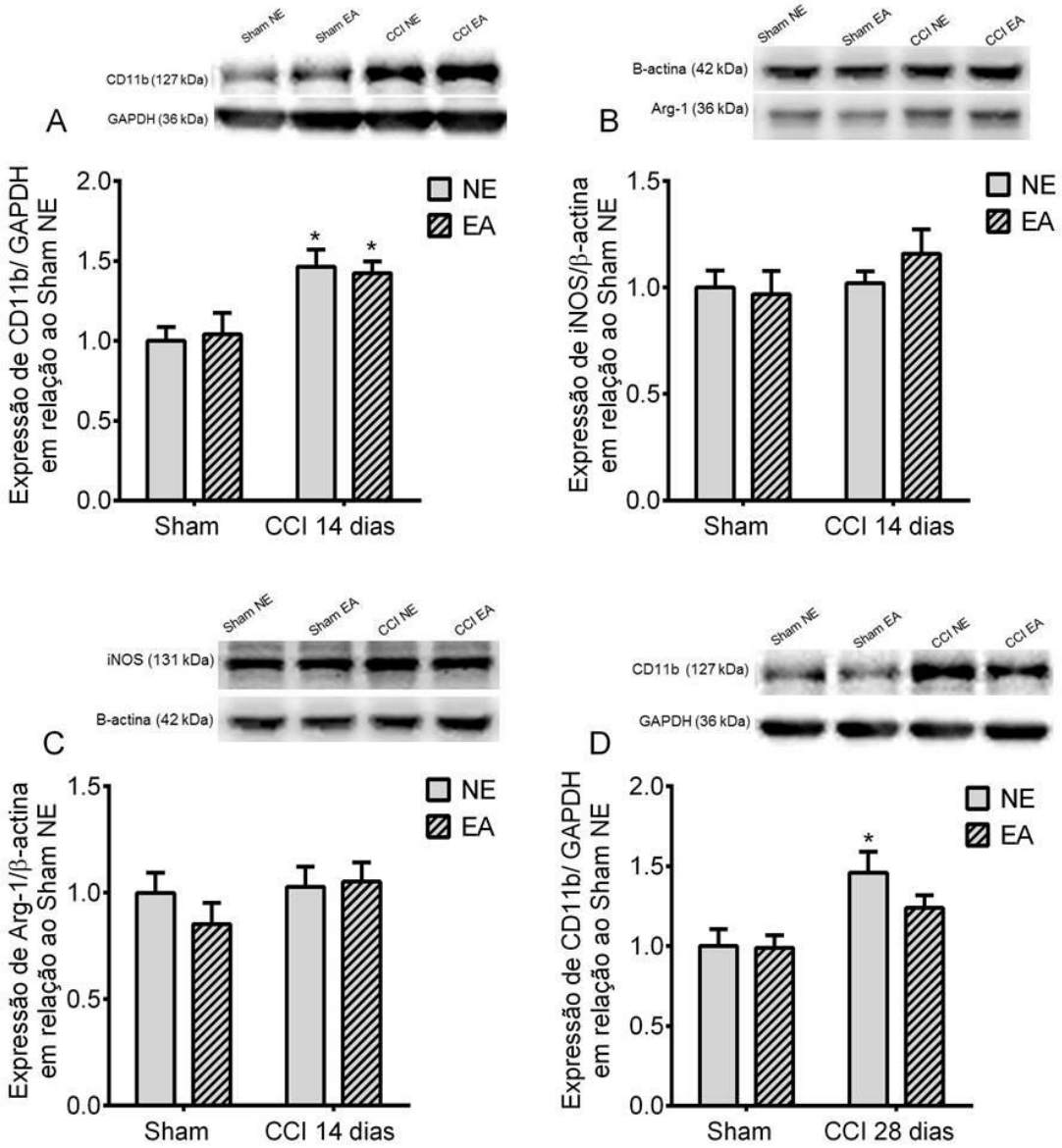


Figura 13: Avaliação da expressão de micróglia e dos perfis M1 e M2 na medula espinal (ispi lateral). Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) falso-operados (sham) e operados (CCI) (n= 7-8) foram eutanasiados, e a medula espinal (ipsilateral) foi coletado e processada para análise da expressão de CD11b (A, D), iNOS (B) e Arg-1 (C) por *Western Blotting*, 14 (A, B, C) e 28 dias (D) após o procedimento cirúrgico. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 7-8). Os resultados foram normalizados pela expressão da proteína GAPDH ou β-actina e comparados em relação ao grupo Sham NE. *p< 0,05 em relação ao respectivo grupo Sham. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

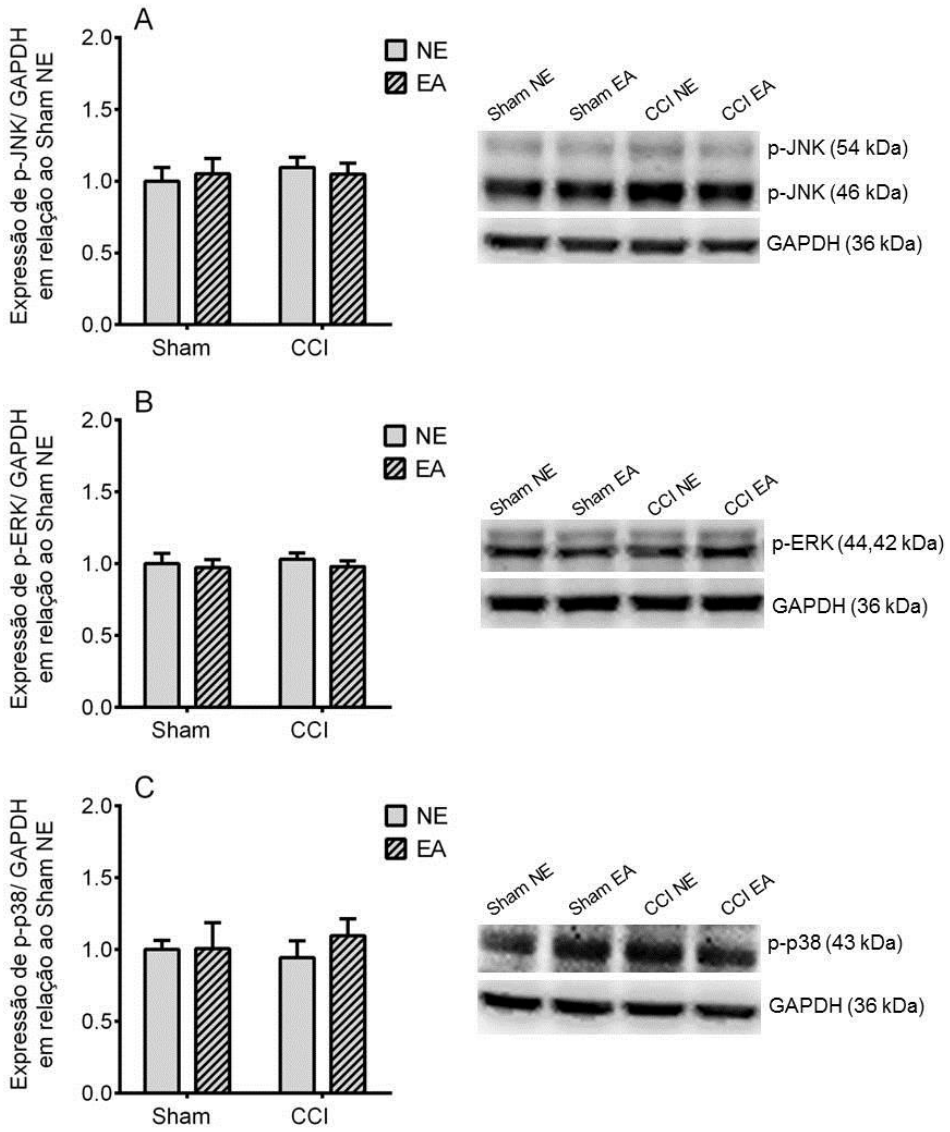


Figura 14: Avaliação da expressão proteica de MAP quinases na medula espinal dos animais. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) falso-operados (sham) e operados (CCI) (n= 7-8) foram eutanasiados, e a medula espinal (ipsilateral) foi coletada e processada para análise da expressão de p-JNK (A), p-ERK (B) e p-p38 (C) por *Western Blotting*, 14 após o procedimento cirúrgico. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 7-8). Os resultados foram normalizados pela expressão da proteína GAPDH e comparados em relação ao grupo Sham NE. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

5.11 O EA não altera o perfil de macrófagos no DRG, mas reduz marcador de lesão neuronal induzida pela CCI.

No gânglio da raiz dorsal (DRG), também foram estudadas possíveis diferenças induzidas pelo EA na expressão de macrófagos após a CCI, utilizando-se marcador inespecífico para macrófagos (Iba-1), e marcadores para macrófagos do tipo M1 e do tipo M2. Foi verificado aumento na expressão de Iba-1 nos animais com neuropatia, independentemente da condição de enriquecimento, em relação ao grupo Sham (Fig. 15A). Esses macrófagos não expressaram iNOS (Fig. 15B) mas sim Arg-1 de maneira similar entre os grupos com e sem EA na presença de CCI (Fig. 15C). Como o ATF-3 é amplamente e classicamente expresso no DRG na presença de lesão de nervo, este marcador também foi estudado. Foi verificado um aumento significativo da expressão de ATF-3 nas amostras de DRG (ipsilateral) provenientes de animais não enriquecidos 14 dias após a CCI. Por outro lado, o EA foi capaz de reduzir esta expressão no grupo enriquecido, sendo esta similar a do grupo sham (controle) e significativamente diferente do grupo CCI sem enriquecimento (Fig. 15D).

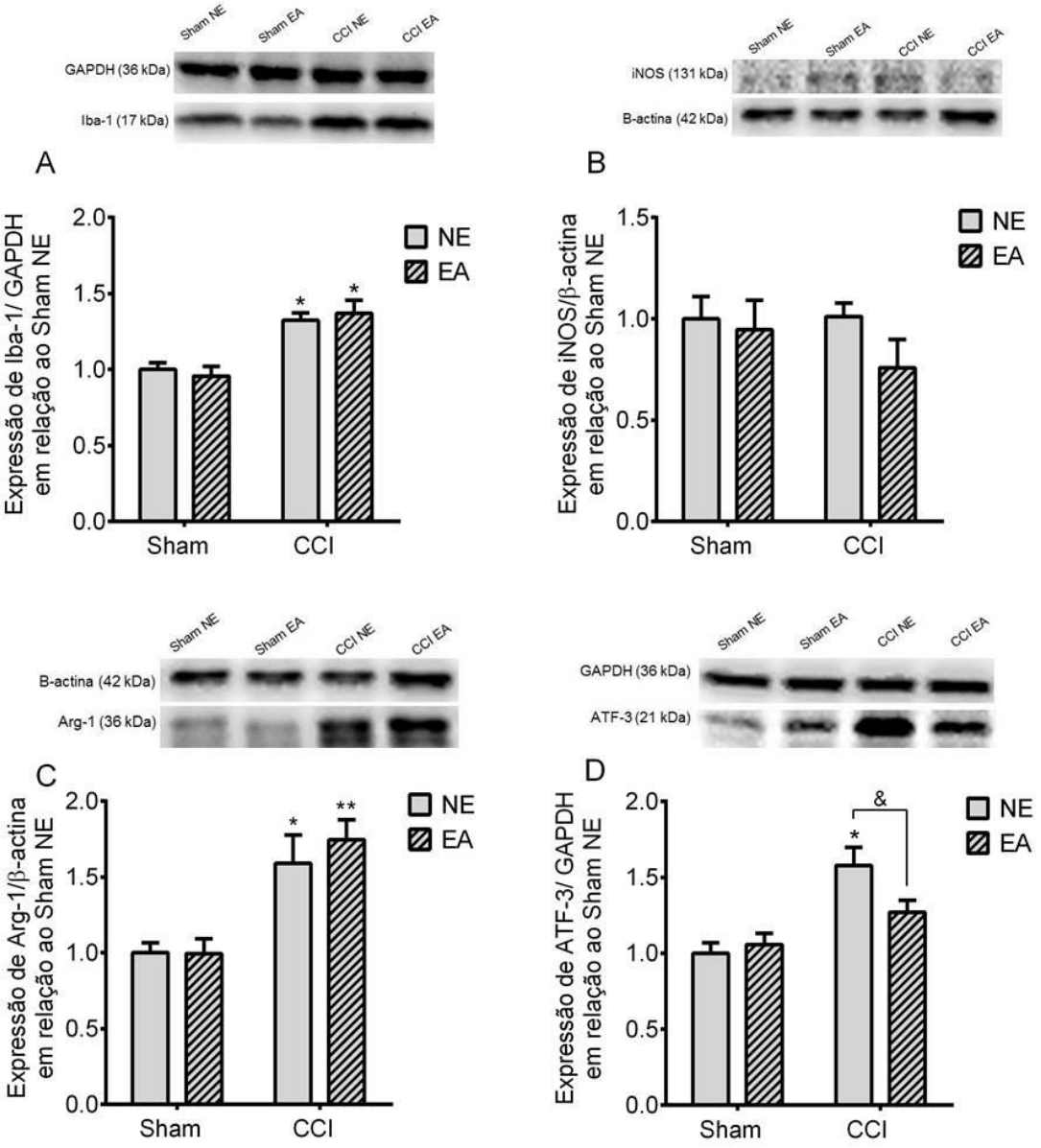


Figura 15: Avaliação da expressão proteica de Iba-1, iNOS, Arg-1 e ATF-3 no DRG dos animais. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) falso-operados (Sham) e operados (CCI) (n= 7-8) foram eutanasiados, e o DRG (ipsilateral) foi coletado e processado para análise da expressão de Iba-1 (A), iNOS (B), Arg-1 (C) e ATF-3 (D) por *Western Blotting*, 14 após o procedimento cirúrgico. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 7-8). Os resultados foram normalizados pela expressão da proteína GAPDH ou β-actina e comparados em relação ao grupo sham NE. *p< 0,05 em relação ao respectivo grupo Sham, &p< 0,05 em relação ao grupo NE. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

5.12 O EA induz a prevalência de macrófagos do tipo M2 no local da lesão induzida pela CCI

Diante do resultado descrito no item anterior, o passo seguinte foi avaliar se a redução na lesão do nervo nos animais com EA estaria relacionada a uma possível ativação diferenciada de macrófagos nesse tecido. Para tanto, foi avaliada a expressão de macrófagos totais e para macrófagos do tipo M1 e M2 nas amostras proteicas obtidas a partir do nervo isquiático dos animais 14 dias após a CCI. Foi verificado que a lesão causada pela CCI aumenta de maneira similar a quantidade de macrófagos no nervo isquiático tanto de animais com EA quanto no grupo sem EA (Fig. 15A). Entretanto, o EA, de fato, modula o perfil de ativação de macrófagos, visto que a expressão de iNOS só estava aumentada nos animais não enriquecidos em relação aos enriquecidos (Fig. 16B), enquanto que a expressão de Arg-1 estava elevada em ambos os grupos com e sem EA na presença de CCI, embora maiores níveis foram detectados nos animais NE em relação ao seu controle Sham (Fig. 16C).

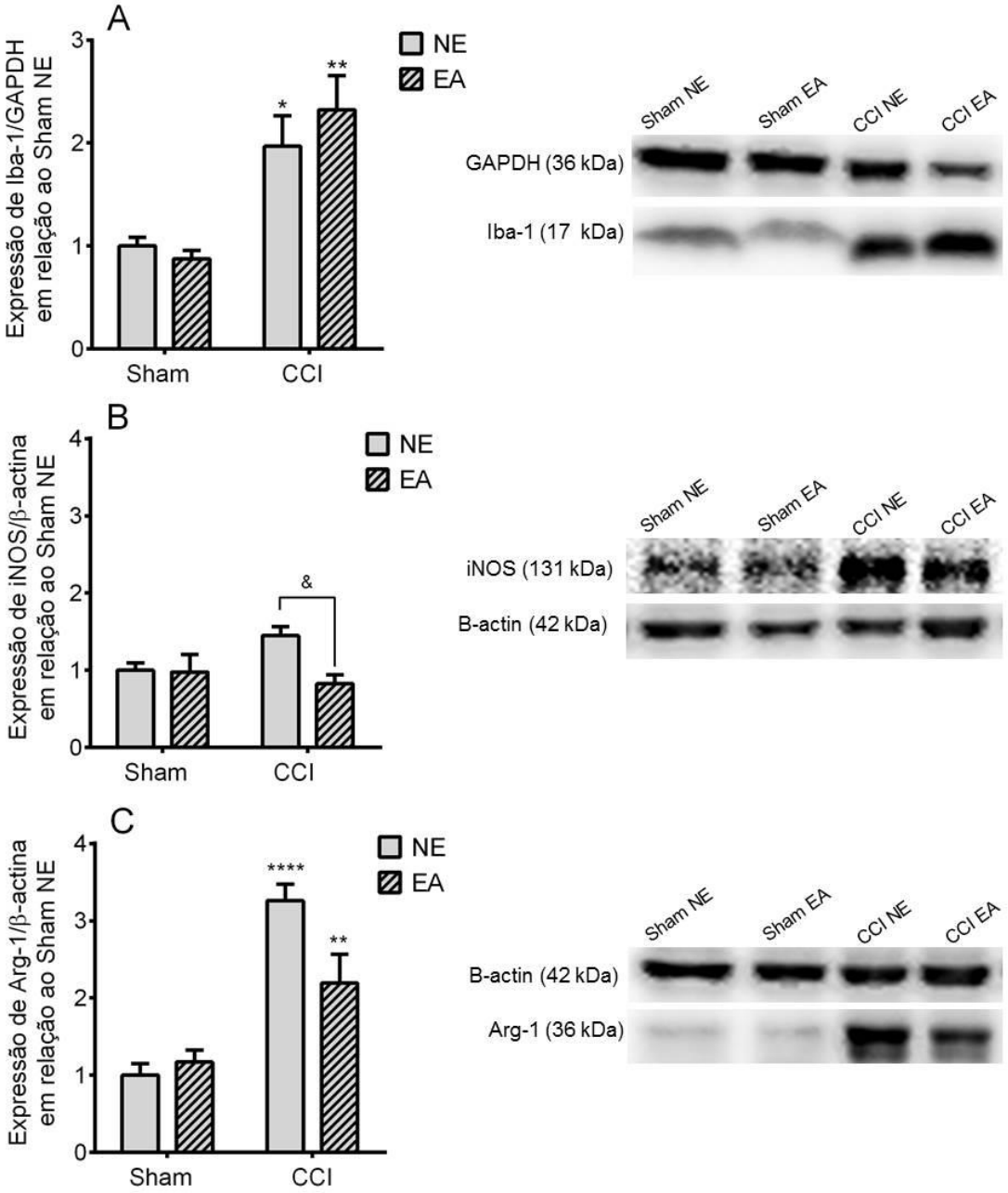


Figura 16: Avaliação da expressão proteica de Iba-1, iNOS e ARG-1 no nervo isquiático dos animais. Os animais enriquecidos (EA) e não enriquecidos (NE) falso-operados (Sham) e operados (CCI) (n= 7-8) foram eutanasiados, e o nervo isquiático (ipsilateral) foi coletado e processado para análise da expressão de Iba-1 (A), iNOS (B) e Arg-1 (C) por *Western Blotting*, 14 após o procedimento cirúrgico. Os resultados representam a média do grupo ± e.p.m. (n= 7-8). Os resultados foram normalizados pela expressão da proteína GAPDH ou β-actina e comparados em relação ao grupo sham NE. *p< 0,05, **p< 0,01, ****p< 0,0001 em relação ao respectivo grupo Sham, &p< 0,05 em relação ao grupo NE. ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey.

5.13 O EA reduz a degeneração Walleriana na parte proximal do nervo isquiático após a CCI

Como foi verificada prevalência de macrófagos do tipo M2 no nervo e que o marcador de lesão neuronal ATF-3 estava reduzido no DRG dos animais enriquecidos com CCI, avaliamos a integridade das fibras nervosas no nervo isquiático 14 dias após a cirurgia através de análise histológica, utilizando como controle animais Sham. Nesse experimento, foram analisadas as porções proximais, mediais (entre as 4 constrições) e distais nos nervos submetidos à CCI, que foram fotografadas em aumento de 20 x (Fig. 17) e 100 x (Fig. 18). Foi observado padrão histológico do nervo semelhante entre os animais Sham não enriquecidos e enriquecidos (Fig. 17, 18). Quando avaliada a parte proximal dos nervos submetidos à constrição, foi possível notar uma grande perda de axônios no nervo dos animais (degeneração Walleriana) do grupo não enriquecido em relação ao grupo Sham. Por outro lado, os animais com EA apresentaram preservação notável de fibras nervosas mielínicas nessa região (Fig. 17, 18). Não foram notadas diferenças em relação à presença de fibras nervosas nas porções mediais e distais do nervo entre os grupos sem EA e com EA (Fig. 17, 18), onde as regiões avaliadas apresentaram grande perda de fibras e a presença de inúmeros fagossomos, melhor visualizados em maior aumento (Fig. 18).

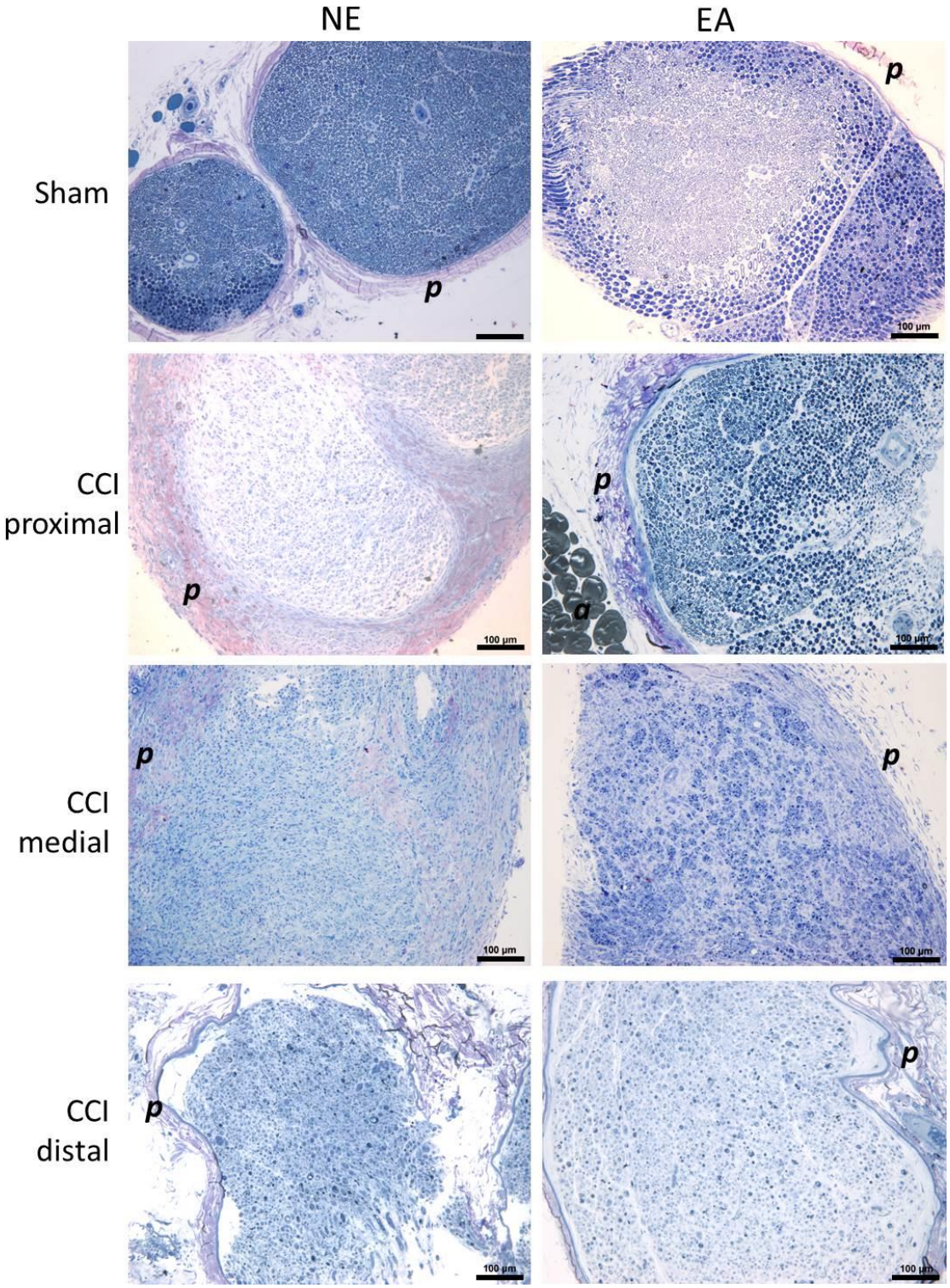


Figura 17: Análise histológica do nervo isquiático de animais com e sem EA na presença ou ausência de CCI. Após 14 dias do procedimento cirúrgico, os animais sem EA e com EA do grupo Sham ou CCI (n= 3-4) tiveram o nervo isquiático ispi lateral exposto, pré-fixado *in situ* e posteriormente preparado, cortado (0,75 µm) e corado com azul de toluidina e fucsina para análise em microscópio de luz (aumento 20x). *p* – perineuro, *a* – adipócitos.

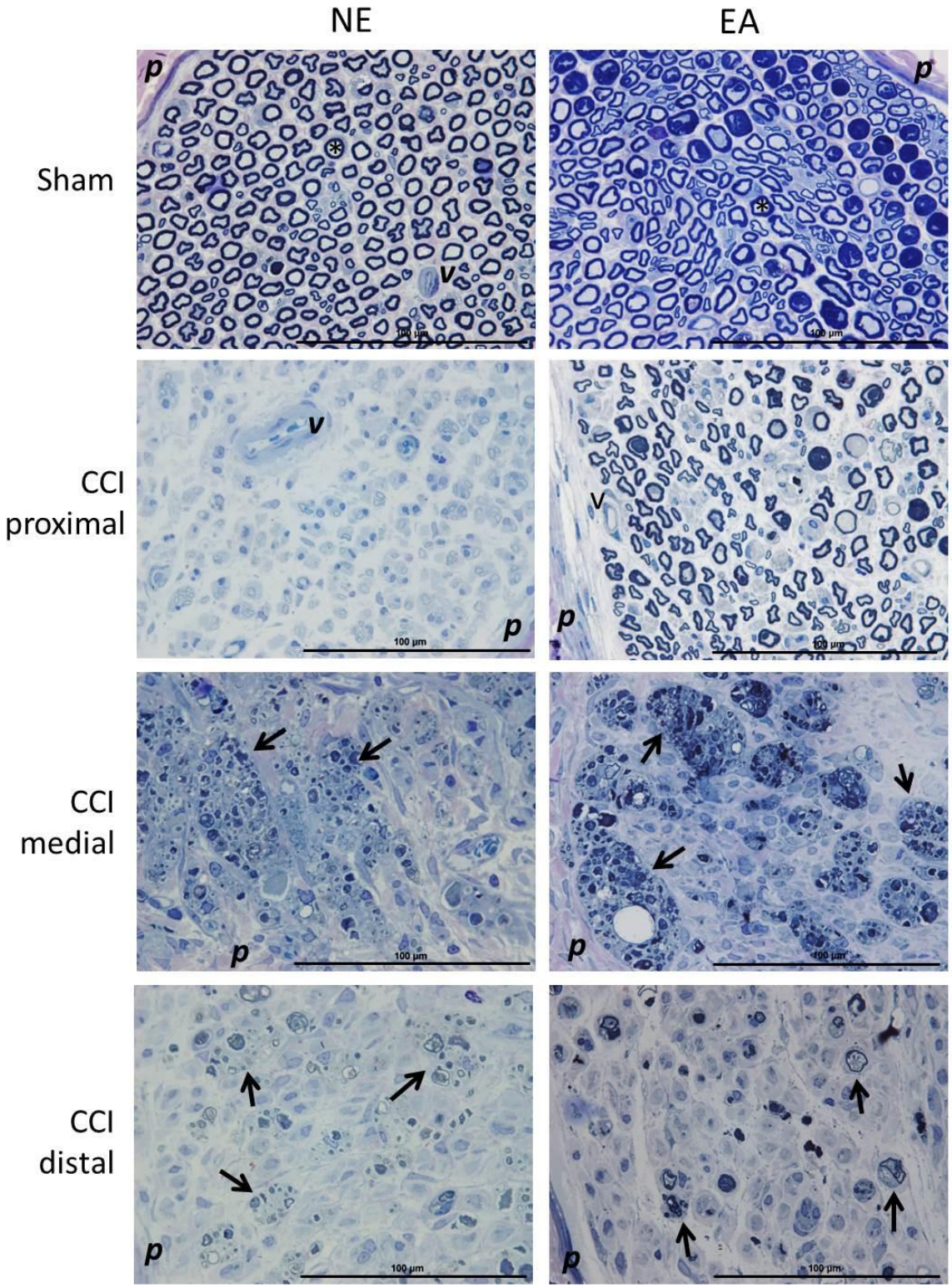


Figura 18: Análise histológica do nervo isquiático de animais com e sem EA na presença ou ausência de CCI. Após 14 dias do procedimento cirúrgico, os animais sem EA e com EA do grupo Sham ou CCI (n= 3-4) tiveram o nervo isquiático ispi lateral exposto, pré-fixado *in situ* e posteriormente preparado, cortado (0,75 µm) e corado com azul de toluidina e fucsina para análise em microscópio de luz (aumento 100x). *p* – perineuro, seta –fagossomos, *v* – vaso sanguíneo, * - fibra nervosa.

6 DISCUSSÃO

Alguns trabalhos publicados já demonstraram o benefício do EA na sensibilidade dolorosa de animais de laboratório, tanto na presença de dor neuropática (Berrocal *et al.*, 2007; Vachon *et al.*, 2013) quanto na vigência de dor inflamatória (Tall, 2009; Gabriel, Anne F *et al.*, 2010). Outros trabalhos mostraram ainda que tratamento com agonistas opioides aumenta a sensibilidade térmica dos animais enriquecidos em relação aos animais não enriquecidos (Smith *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005). Porém, o mecanismo pelo qual esse benefício ocorre não está totalmente elucidado. Além disso, outra abordagem para o uso do EA é sua utilização terapêutica na prevenção ou atenuação do estresse e da ansiedade. Sabe-se que o EA diminui níveis de hormônios relacionados ao estresse (glicocorticoides) em curto prazo (Belz, Emily E *et al.*, 2003) e o uso de antagonistas de receptores de glicocorticoides (GRs) diminui a dor crônica em modelo experimental (Wang *et al.*, 2004). Diante disso, os objetivos do presente projeto visaram esclarecer por quais mecanismos o EA é capaz de modular a via analgésica opioide e a sua interferência com a via dos glicocorticoides bem como sua possível interferência na via serotoninérgica descendente. Além disso, foi investigado também se o EA, além de analgesia, poderia reduzir marcadores da inflamação neurogênica e prevenir a lesão das fibras nervosas.

Primeiramente, foram necessárias as padronizações do modelo experimental, visto que há uma grande variedade de modelos de EA. Segundo a revisão publicada por Simpson e Kelly (Simpson e Kelly, 2011), as variáveis mais importantes dos protocolos de EA adotados para ratos são: (1) o tamanho das gaiolas e o número de animais por gaiola, (2) o tipo de objetos introduzidos, (3) a idade dos animais na introdução do EA, (4) a duração de cada formação do EA, (5) os controles utilizados, (6) a linhagem de ratos utilizada e (7) o sexo da linhagem utilizada. Avaliando inúmeros trabalhos, os autores concluíram que, apesar de não existir um protocolo padrão de EA para ratos, a grande maioria dos estudos utiliza EA por um período entre 4 a 8 semanas, sendo este introduzido após o desmame, para a realização de ensaios experimentais. Como o presente projeto avaliaria parâmetros envolvidos com a plasticidade molecular e funcional nos animais enriquecidos que culminaria em um efeito biológico significativo, os parâmetros de espaço físico da gaiola, tempo de vida dos animais para a introdução do EA, bem

como os tipos e a quantidade de objetos introduzidos, foram definitivos para a validação da hipótese a ser testada. Em outras palavras, o modelo mais elaborado de EA testado neste projeto fez com que os animais enriquecidos, no décimo quarto dia após a CCI, apresentassem sensibilidade mecânica similar àquela prévia ao procedimento cirúrgico (analgesia) em relação ao modelo mais simplificado testado (Kimura *et al.*, 2017).

Vale lembrar também que os dois modelos de EA, tanto o empregado no início do projeto, mais simplista, quanto aquele adotado após as modificações, foram responsáveis por diminuir a ansiedade nos animais (Kimura *et al.*, 2017). Diante disso, podemos especular que a ansiedade e a sensibilidade dolorosa dos animais experimentais não necessariamente são afetadas da mesma maneira pelo EA empregado e que, supostamente, a ansiedade seja um parâmetro mais facilmente modulado pelo EA do que a sensibilidade dolorosa na presença de estímulo nocivo crônico. Além disso, foi comprovado que é possível fornecer o bem estar, de uma maneira bastante simplificada, para os animais experimentais sem alterar o parâmetro a ser estudado no campo de estudo de dor (Kimura *et al.*, 2017). Desta maneira, comportamentos indesejáveis dos animais, que poderiam interferir com os resultados obtidos, podem ser reduzidos utilizando-se um enriquecimento ambiental simplificado.

Como a dor neuropática é uma condição de difícil controle, estudos experimentais voltados para a busca de novos tratamentos e novos alvos moleculares são extremamente válidos. Até o momento, o tratamento farmacológico para a dor neuropática tem sido à base de anestésicos locais, opioides, antiinflamatórios, anti-depressivos e anti-epiléticos, e da associação entre eles (Colloca *et al.*, 2017). Porém, esse tratamento na maioria das vezes não é completamente eficaz e envolve fatores como vias de administração, eficácia, segurança, custo-efetividade, limitações, benefícios e efeitos colaterais, e principalmente o desenvolvimento de tolerância. Por outro lado, também é preconizado pela Organização Mundial da Saúde a terapia não farmacológica para adultos que sofrem de dor crônica, que pode ser realizada através de exercício físico, fisioterapia, terapia de estimulação periférica (e.g. estimulação eletrônica transcutânea do nervo –TENS), acupuntura, bloqueio nervoso, terapia psicológica (terapia cognitivo-comportamental) e terapia de suporte (terapia ocupacional, emprego, etc) (Gilron *et al.*, 2006).

Na tentativa de se estudar os efeitos não farmacológicos do EA na dor neuropática, foi utilizado como modelo a indução de neuropatia periférica através da CCI, que reproduz nos animais muitos dos sintomas e alterações comportamentais e moleculares observados em pacientes que sofrem de dor neuropática (Bennett e Xie, 1988; Wang e Wang, 2003). De acordo com os resultados obtidos, foi verificado que o EA empregado desde o nascimento aboliu completamente a hiperalgesia mecânica e térmica, e alodinia tátil induzida pela CCI, e este efeito se estendeu por até 28 dias após a cirurgia. Além disso, o EA também foi capaz de reduzir a incapacitância motora dos animais, característica da neuropatia periférica induzida. Estes resultados foram inéditos, uma vez que não há até o momento algum protocolo de EA descrito que consiga reverter e/ou prevenir completamente a hiperalgesia induzida por modelo de dor neuropática em animais experimentais. O que se tem descrito até o presente momento é a interferência positiva do EA na alodinia táctil e hiperalgesia térmica induzidas por ligação parcial do nervo (Berrocal *et al.*, 2007), na alodinia decorrente de inflamação articular (Gabriel, Anne F *et al.*, 2010), na hiperalgesia térmica induzida por inflamação crônica (Tall, 2009), e na sensibilidade mecânica e ao frio quando usado modelo de dor neuropática (Vachon *et al.*, 2013). Porém o grande diferencial é que na maioria destes trabalhos (Berrocal *et al.*, 2007; Gabriel, Anne F *et al.*, 2010; Vachon *et al.*, 2013) um dos objetos que compunham o EA era a roda de atividade, o que não permite discriminar exatamente se o efeito benéfico é apenas do enriquecimento ambiental ou da atividade física.

Já está descrito que o exercício físico *per se* prévio à CCI é capaz de atenuar a dor neuropática de ratos, com diminuição de parâmetros neuroimunes (Grace *et al.*, 2016). Além disso, como já foi mostrado em outros trabalhos que animais enriquecidos, quando tratados com fármacos agonistas opioides, tem sua sensibilidade basal aumentada (Smith *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005), tivemos o cuidado de não colocar objetos para exercício físico na gaiola dos animais enriquecidos. Isto porque o exercício físico desencadeia a liberação de β-endorfinas da hipófise, que podem alcançar a circulação sistêmica, e do hipotálamo com suas projeções para diversas áreas do SNC incluindo a PAG, que por sua vez produzem efeitos analgésicos por ativação de receptores *mu*-opióides na periferia e no SNC (Nijs *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que a atividade física diminui a sensibilidade térmica e a alodinia mecânica resultantes da lesão por ligação do nervo espinal em ratos (outro modelo de indução de dor neuropática), a partir da terceira semana de

treinamento, e que aumenta as concentrações de opioides endógenos (β-endorfina e met-encefalina) em regiões cerebrais como PAG e RVM, o que favorece a analgesia (Stagg *et al.*, 2010). Sendo assim, efeitos analgésicos em modelos de EA que contém objetos para exercício físico, como rodas de atividade, são teoricamente esperados. Ainda, é observado na clínica que a dor dificulta e modifica a execução de exercícios físicos em muitos pacientes (Hodges e Smeets, 2015). Assim, como o modelo de EA do presente projeto não utiliza tais objetos, podemos dizer que a interação dos animais com o ambiente enriquecido *per se* promove alterações benéficas significativas independentemente daquelas induzidas pelo exercício físico.

Sabe-se que a alodinia pode ser decorrente de um processo de plasticidade frente à lesão nervosa, onde as fibras táteis do tipo A-*beta* passam a enviar projeções para a lâmina II do corno dorsal da medula espinal, a qual geralmente recebe apenas estímulos nociceptivos. Assim, juntamente com modificações funcionais produzidas pela sensibilização central no caso de lesão, estímulos conduzidos pelas fibras A *beta* que chegam ao corno dorsal são interpretados como nocivos (Costigan e Woolf, 2000; Jensen e Finnerup, 2014). Já a hiperalgesia térmica, a qual é transmitida via fibras do tipo C e *A-delta*, envolve aumento na expressão de receptores TRPV1 (receptor de potencial transiente tipo V1). Estes receptores são importantes na transdução da informação dolorosa ao estímulo quente. Estudos anteriores mostraram que, após lesão de nervo periférico, as fibras nervosas não lesionadas e também fibras A-*beta* e A-*delta* apresentam níveis elevados deste receptor. Esses processos, juntamente com a sensibilização central, podem contribuir para o aparecimento e manutenção da hiperalgesia térmica na dor crônica (Jensen e Finnerup, 2014).

Diante dessas informações, os dados do presente projeto mostraram que o EA utilizado foi capaz de interferir com o resultado dessas diversas modificações, que culminou com reversão total do comportamento doloroso no modelo de CCI. Entretanto, essa resposta analgésica dependeu de vários fatores, como a espécie animal a ser utilizada, o tempo de exposição ao EA, espaço físico para a interação dos animais com esse ambiente enriquecido e os tipos de objetos utilizados no EA, variáveis já relatadas anteriormente (Simpson e Kelly, 2011). Em relação à CCI, já foi descrito que quando outro protocolo de EA foi utilizado em ratos e iniciado um mês após o procedimento cirúrgico, não foi observado efeito analgésico térmico e mecânico (alodinia tátil) nos animais enriquecidos em 30 dias após o início do EA

(Vachon, 2014). Este resultado pode indicar que as alterações induzidas pelo EA que resultariam em analgesia mecânica e térmica, como verificado no presente trabalho, são tempo-dependentes, onde os animais necessitam de um longo período de exposição ao EA, especialmente na fase inicial de vida, para que haja plasticidade funcional e anatômica suficiente para a ocorrência do fenômeno de analgesia.

O controle endógeno analgésico que atua sobre a via nociceptiva envolve algumas regiões supraespinais com a participação de neurônios serotoninérgicos e adrenérgicos que, de um modo geral, culmina com a liberação de opioides endógenos, entre outros mediadores, no corno dorsal da medula espinal, reduzindo os disparos dos neurônios aferentes e a transmissão da dor (Kuner, 2010). O tratamento dos animais enriquecidos com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides), no décimo quarto dia após a CCI, reverteu completamente a analgesia promovida pelo EA, indicando a robusta participação de opioides endógenos nesse efeito. Este resultado corrobora com dados da literatura que descrevem a regulação positiva global de genes relacionados à via opioidérgica, como o PDYN, que codifica um precursor para alguns opioides endógenos, no cérebro de camundongos enriquecidos por 2 meses após a 6ª semana de vida (Lee *et al.*, 2013). Nesse trabalho, entretanto, rodas de atividade estavam presentes no ambiente enriquecido utilizado, podendo esta regulação positiva ser resultante também de uma associação entre o bem-estar e o exercício físico.

Analisando a expressão dos receptores opioides *mu*, *kappa* e *delta*, nos animais enriquecidos e não enriquecidos em regiões do sistema nervoso central (PAG e medula espinal) e periférico (DRG) na presença de dor crônica, não foram verificadas alterações significativas em relação à expressão dos mesmos. Por outro lado, os níveis de opioides endógenos β-endorfina e met-encefalina no soro nos animais enriquecidos com dor crônica estavam aumentados. Este resultado explica o porquê o tratamento com naloxona reverteu o efeito analgésico do EA. A fim de verificar ainda se o espaço maior das gaiolas dos animais enriquecidos estaria favorecendo, de alguma maneira, o exercício físico, o ganho de peso dos animais com e sem EA na presença de dor crônica foi avaliado, uma vez que está descrito na literatura que o exercício físico é capaz de diminuir o ganho de peso dos animais com CCI (Kim *et al.*, 2015). Visto que o ganho de peso foi bastante similar entre os grupos estudados, o resultado obtido no presente trabalho mostrou que a via

opioidérgica em animais enriquecidos está positivamente regulada, independentemente de uma possível atividade física. Estes resultados são bastante inovadores, uma vez que não há até o momento algum trabalho realizado que mostrou a regulação positiva de opioides endógenos em animais enriquecidos na ausência de rodas de atividade.

Além de opioides endógenos, a condição de bem estar promovida pelo EA foi capaz de aumentar os níveis de corticosterona circulantes em relação ao grupo não enriquecido, independentemente da presença de dor neuropática, e não foi capaz de alterar a expressão de GRs nas 3 regiões avaliadas. Além disso, o tratamento com mifepristona não alterou a analgesia dos animais enriquecidos, mostrando que a corticosterona liberada não participa do efeito analgésico do EA. Por outro lado, este tratamento reverteu o comportamento doloroso dos animais não enriquecidos com lesão no nervo, corroborando com dados de outros grupos, que mostram a participação de GRs na manutenção da dor neuropática (Wang *et al.*, 2004; Takasaki *et al.*, 2005; Alexander *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram a ativação do eixo HPA (hipotálamo – pituitária – adrenal) frente ao EA, que resultou na secreção de corticosterona pela glândula adrenal, mas este hormônio não contribuiu para a analgesia induzida pelo EA. Sabe-se que a ativação desse eixo também induz a liberação do polipeptídeo POMC (pró-opiomelanocortina) pela pituitária (hipófise) sobre a ação do hormônio liberador de corticotrofina secretado pelo hipotálamo. Este polipeptídeo é precursor de vários peptídeos biologicamente ativos, incluindo a β-endorfina (Smith e Vale, 2006). Este fato poderia explicar, em partes, a presença de β-endorfina circulante nos animais enriquecidos com CCI, visto que o EA ativou o eixo HPA. Entretanto, num primeiro momento, a ativação do eixo HPA pelo EA poderia ser interpretada como nociva, visto que este eixo é ativado em condição de estresse (Smith e Vale, 2006). Entretanto, de acordo com uma teoria proposta por Sapolsky (Sapolsky, 2015), os níveis de corticosterona em relação aos efeitos neurobiológicos se comportam como uma curva em U invertido. Ou seja, pouco ou nenhum estresse de um lado, e estresse severo ou em longo prazo do outro lado possuem efeitos neurobiológicos deletérios, enquanto que o estresse leve a moderado acarretam efeitos benéficos e estimulatórios. Essa proposta está de acordo com a ideia de que o EA atua como um inoculador de estresse leve, o que pode favorecer o desenvolvimento de resiliência nos animais (Crofton *et al.*, 2015).

Como a via descendente serotoninérgica também pode contribuir para o controle da dor, a participação da serotonina no efeito analgésico do EA também foi estudada. Foi verificado que em ambos os grupos com e sem EA submetidos à CCI houve diminuição de células contendo serotonina no bulbo rostral ventromedial (RVM) em relação aos grupos controle sem neuropatia. Resultado semelhante já foi mostrado para outro modelo de neuropatia periférica em ratos, onde foi verificada redução de aproximadamente 35 % de neurônios serotoninérgicos no RVM dos ratos neuropáticos (Leong *et al.*, 2011). Estima-se que, em ratos, 40 % das células do RVM sejam serotoninérgicas (células neutras) e 60 % não contenham esse neurotransmissor (células ON, OFF e neutras) (Potrebic *et al.*, 1994). Estudos de eletrofisiologia já mostraram que as células ON, OFF e neutras, respectivamente, aumentam, diminuem ou não alteram seu potencial de ação associado à resposta nociceptiva, ou seja, células ON ativam, as células OFF deprimem e as células neutras não alteram a via nociceptiva. Além disso, foi mostrado que agonistas *mu*-opioides deprimem diretamente o disparo de células ON e ativam as células OFF, mostrando o papel antinociceptivo dos opioides nessa região central (Heinricher *et al.*, 1994). Desta maneira, a analgesia induzida pelo EA aqui estudada pode ser decorrente também da ativação de células OFF no RVM, visto o aumento de β-endorfina sistêmico (ligante para o receptor *mu*-opioide) nos animais com EA com CCI.

Porém, a presença de serotonina no corno dorsal da medula espinal foi somente detectada nos animais sem enriquecimento com CCI em relação aos enriquecidos e ao grupo falso operado. Esses resultados contradizem àqueles achados no trabalho de Leong e colaboradores (Leong *et al.*, 2011), que além da redução de células no RVM, observaram também diminuição de 15 % de serotonina no corno dorsal da medula espinal dos ratos submetidos à neuropatia. Entretanto, sabe-se que após a lesão de nervo, ocorre plasticidade na medula espinal, com aumento da expressão de receptores para serotonina do tipo $5HT_{2A}$ e $5HT_3$, que ao invés de promoverem analgesia, estão relacionados com a manutenção da dor crônica via facilitação descendente da informação dolorosa (Dogrul *et al.*, 2009; Aira *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014). Diante desses fatos, podemos especular o duplo papel da serotonina em condições de dor, que pode também facilitar o impulso doloroso no caso de plasticidade neuroanatômica, como na dor neuropática. Nesse

caso, o EA pode ter acarretado analgesia na presença de CCI também por reduzir os níveis de serotonina liberados na medula espinal dos animais enriquecidos.

Como o EA, além de analgésico, poderia interferir com a inflamação neuroimune induzida pela CCI, visto seu papel imunoprotetor recentemente descrito (Brod *et al.*, 2017), foi avaliada a presença e a ativação de micróglia na medula espinal dos animais aqui estudados. No décimo quarto dia após a CCI, foi observado aumento na expressão do marcador CD11b na medula tanto dos animais com EA quanto sem EA na presença de neuropatia, sem diferenças na expressão dos subtipos M1 e M2 microgliais. Somente foi observada redução de micróglia na medula espinal dos animais enriquecidos 28 dias após a CCI em relação aos ratos sem EA, o que pode estar relacionado à manutenção da analgesia do EA por até 28 dias. Avaliando possíveis diferenças na ativação dessas células espinais 14 dias após a CCI, foram estudadas MAP quinases fosforiladas (formas ativadas) intimamente relacionadas a este fenômeno, como p-ERK e p-p38 (Scholz e Woolf, 2007), e também outra quinase relacionada à ativação de astrócitos, a p-JNK (Ji *et al.*, 2009). Entretanto, não foram verificadas diferenças na ativação de células da glia entre todos os grupos estudados. Este fato pode ser decorrente do tempo após a indução de neuropatia na obtenção das amostras dos grupos aqui estudados. Sabe-se que a ativação das quinases acima mencionadas ocorre rapidamente após a lesão e apresenta pico de ativação já na primeira semana após a CCI (Kim *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005; Scholz e Woolf, 2007; Mannelli *et al.*, 2010). Além disso, em alguns desses estudos, foram analisadas amostras provenientes do corno dorsal da medula espinal. Entretanto, todo o lado ipsilateral foi processado para obtenção das amostras no presente trabalho. Esse também pode ser um dos motivos pelo qual não foram encontradas diferenças na ativação das MAP quinases entre animais com e sem neuropatia aqui estudados.

Além da medula espinal, outro local que sofre alterações na ativação de recrutamento de macrófagos após lesão de nervo periférico é o DRG. Sabe-se que os macrófagos desempenham papel importante no aparecimento e manutenção da dor crônica também neste local (Hu e Mclachlan, 2002; Scholz e Woolf, 2007; Patro *et al.*, 2010). Por esse motivo, foi avaliada diferenças na expressão e no perfil de macrófagos nessa estrutura entre os grupos aqui estudados. De fato, foi verificado aumento do marcador Iba-1 nos animais com neuropatia, independentemente da condição de enriquecimento, no DRG ipsilateral à lesão após 14 dias da CCI, e

esses macrófagos estavam polarizados para o tipo M2. Esse subtipo de macrófago M2, ativado alternativamente, é ativado por citocinas liberadas por células do tipo Th2, como a interleucina (IL)-4 e IL-13, diferentemente do subtipo M1, ativados por citocinas como interferon-gamma, TNF, IL-12 e IL-18 liberadas por células Th1 e por células apresentadoras de antígenos (Gordon, 2003; Mosser e Edwards, 2008). Os macrófagos M2 são programados para promover reparo tecidual. A IL-4 estimula a atividade da arginase nesses macrófagos, que hidrolisa arginina em ornitina, a qual é precursora de poliaminas e colágeno, contribuindo para a produção de matiz extracelular. Já os macrófagos M1 estão relacionados à atividade microbicida, liberando inúmeros componentes pró-inflamatórios importantes para a resposta imune celular, mas que podem causar sérios danos no indivíduo quando essa regulação não é fortemente controlada (Mosser e Edwards, 2008). Desta maneira, era esperado que a maior população de macrófagos no DRG dos animais com CCI fosse, de fato, polarizadas para M2, visto o dano tecidual causado pela neuropatia.

Ainda no DRG, o próximo passo foi avaliar a expressão de ATF-3 (do inglês *Activating Transcription Fator-3*), marcador classicamente presente no DRG de animais submetidos à lesão de nervo periférico (Tsujino *et al.*, 2000; Obata *et al.*, 2003). Foi observada redução marcante da sua expressão nos animais enriquecidos em relação aos não enriquecidos no décimo quarto dia da cirurgia, o que indicou que o EA seria capaz de reduzir a lesão induzida pela CCI. No que diz respeito a abordagens não farmacológicas, já foi mostrado que o exercício físico implementado 6 semanas antes da cirurgia, também foi responsável por diminuir a expressão de ATF-3 em ratos submetidos à CCI (Grace *et al.*, 2016). Porém, novamente, como o protocolo de EA utilizado neste trabalho não contou com rodas de atividade, está sendo mostrado de maneira inédita que o bem estar *per se* é capaz de ser imunomodulador frente à lesão nervosa.

Como já foi demonstrado experimentalmente que a CCI induz aumento na expressão de iNOS (marcador para macrófagos M1) no nervo isquiático após a CCI em ratos (Levy *et al.*, 1999) e que macrófagos M2, quando transferidos para o local de lesão, melhoraram a hipersensibilidade mecânica de animais com CCI (Pannell *et al.*, 2016), a expressão de macrófagos totais e dos subtipos M1 e M2 no nervo isquiático dos animais enriquecidos submetidos à CCI também foi estudada. Foi observado aumento na expressão de macrófagos no isquiático em ambos os grupos submetidos à CCI em relação ao grupo Sham. Porém, o enriquecimento foi capaz de

polarizar somente para macrófagos M2 no local da lesão, enquanto que animais sem EA apresentaram os dois subtipos M1 e M2. Já foi mostrado que, além de produzirem mediadores pró-inflamatórios, os macrófagos M1 em cultura reduzem a quantidade produzida e liberada de opioides endógenos, enquanto que os macrófagos M2 aumentam essa produção e liberação em relação aos macrófagos indiferenciados (Pannell *et al.*, 2016). Dessa maneira, podemos especular que os possíveis efeitos analgésicos dos macrófagos M2 via opioides endógenos seriam mascarados nos animais sem enriquecimento com CCI pela presença de macrófagos M1. Por outro lado, outra possibilidade para a fonte de opioides endógenos nos animais enriquecidos, além da ativação do eixo HPA, poderia ser a presença de macrófagos M2 no local da constrição, podendo estas células estar contribuindo para o efeito analgésico do EA, além de reparo tecidual. Não podemos deixar de mencionar aqui um terceiro subtipo de macrófagos, os macrófagos regulatórios, que apresentam atividade anti-inflamatória por secretarem mediadores imunossupressores como a IL-10. Esse subtipo é ativado por alguns sinais extracelulares, como glicocorticoides e células apoptóticas, dentre outros (Mosser e Edwards, 2008). Por esse motivo, é provável que além de macrófagos M2, os animais com enriquecimento apresentem também macrófagos regulatórios no nervo isquiático submetido à CCI, pela presença de níveis elevados de corticosterona sistêmica e de células apoptóticas neste local.

Diante da redução de ATF-3 no DRG e presença de macrófagos M2 no local da lesão, foi levantada a hipótese do EA ser capaz de reduzir a degeneração Walleriana do nervo isquiático nos animais enriquecidos com CCI. Através de análise histológica, foi observada nítida preservação de fibras mielínicas na parte proximal do nervo dos animais com EA, em relação ao grupo não enriquecido mostrando, também pela primeira vez, que o EA é capaz de reduzir a degeneração Walleriana induzida classicamente pela CCI (Tricaud e Park, 2017), pelo menos na parte proximal do nervo. Nas porções medial e distal do nervo, não foram observadas diferenças na perda de fibras nervosas entre os grupos com e sem EA, mas foram verificados inúmeros macrófagos ativados fagocitando as fibras mielínicas em processo de descompactação e degeneração em ambos os grupos. Analisando cuidadosamente esses cortes histológicos, foi possível observar padrão diferenciado dos fagossomos entre animais com e sem EA, onde essas estruturas pareciam estar mais organizadas nos animais enriquecidos do que nos não

enriquecidos. Este fato pode estar relacionado à prevalência de macrófagos M2 no nervo dos animais enriquecidos, e a presença de macrófagos M1 e M2 nos animais sem EA.

Diante de todos os resultados deste projeto, podemos dizer que um protocolo de EA mais elaborado e implantado desde o nascimento, além de diminuir a ansiedade, também é capaz de abolir completamente o comportamento doloroso induzido por neuropatia periférica. Neste modelo experimental para a dor neuropática, cujo tratamento desafia a medicina tradicional ainda nos dias de hoje, foi observado que o EA é capaz de induzir liberação de opioides endógenos, diminuir a neuroinflamação e prevenir a degeneração de fibras nervosas em animais com neuropatia periférica. Ainda, foi verificado que o eixo HPA estava ativado nos animais enriquecidos, independentemente de lesão nervosa, o que corrobora com a hipótese de que o enriquecimento ambiental atua como um inoculador de estresse leve e, desta maneira, pode aumentar a resiliência dos animais. Este trabalho mostra, pela primeira vez, alguns mecanismos pelos quais o bem estar pode reduzir a dor crônica, melhorando a resposta a estímulos nocivos persistentes.

7 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste projeto, podemos concluir que:

- Variáveis como o tempo de exposição, o tamanho da gaiola e os tipos de objetos que compõem o EA influenciam diretamente na resposta dos animais a estímulos nociceptivos;
- O protocolo de EA utilizado não alterou o peso corpóreo e encefálico dos animais;
- O EA aboliu o comportamento doloroso e melhorou a incapacidade motora de animais com neuropatia periférica induzida;
- O EA induziu a liberação de opioides endógenos na presença de CCI, sem alterar a expressão de receptores opioides em regiões relacionadas ao processamento e controle da dor;
- O EA ativou o eixo HPA, mas a corticosterona liberada não participou do efeito analgésico;
- O EA reduziu a liberação de serotonina no corno dorsal da medula espinal após a CCI;
- Após 28 dias da CCI, o EA reduziu a expressão de micróglia na medula espinal ipsilateral à lesão;
- O EA diminuiu a expressão de ATF-3 no DRG dos animais após a CCI;
- O EA induziu a prevalência de macrófagos do tipo M2 no local da lesão induzida pela CCI;
- O EA preservou as fibras nervosas do nervo isquiático próximas ao gânglio da raiz dorsal após a CCI.

REFERÊNCIAS

ABBADIE, C.; PASTERNAK, G. W. Chapter I Opioid receptors. **Handbook of Chemical Neuroanatomy,** v. 20, p. 1-29, 2002. ISSN 0924-8196.

AIRA, Z. et al. Time-dependent cross talk between spinal serotonin 5-HT2A receptor and mGluR1 subserves spinal hyperexcitability and neuropathic pain after nerve injury. **Journal of Neuroscience,** v. 32, n. 39, p. 13568-13581, 2012. ISSN 0270-6474.

AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. **Anesthesiology**, 2011. ISSN 0003-3022.

ALEXANDER, J. K. et al. Stress exacerbates neuropathic pain via glucocorticoid and NMDA receptor activation. **Brain, behavior, and immunity,** v. 23, n. 6, p. 851-860, 2009. ISSN 0889-1591.

BARONCELLI, L. et al. Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. **Cell Death Differ,** v. 17, n. 7, p. 1092-103, Jul 2010. ISSN 1476-5403 (Electronic) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20019745 >.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell,** v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009. ISSN 0092-8674.

BELZ, E. E. et al. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior,** v. 76, n. 3, p. 481-486, 2003. ISSN 0091-3057.

BELZ, E. E. et al. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. **Pharmacol Biochememistry and Behavior,** v. 76, n. 3-4, p. 481-6, Dec 2003. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643847 >.

BENAROYA-MILSHTEIN, N. et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **European Journal of Neuroscience,** v. 20, n. 5, p. 1341-1347, 2004. ISSN 1460-9568.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A Peripheral Mononeuropathy in Rat That Produces Disorders of Pain Sensation Like Those Seen in Man. **Pain,** v. 33, n. 1, p. 87-107, Apr 1988. ISSN 0304-3959. Disponível em: < <Go to ISI>://A1988N057400014 >.

BERROCAL, Y. et al. Social and environmental enrichment improves sensory and motor recovery after severe contusive spinal cord injury in the rat. **Journal of neurotrauma,** v. 24, n. 11, p. 1761-1772, 2007. ISSN 0897-7151.

BICE, B. D. et al. Environmental Enrichment Induces Pericyte and IgA-Dependent Wound Repair and Lifespan Extension in a Colon Tumor Model. **Cell Reports,** v. 19, n. 4, p. 760-773, Apr 25 2017. ISSN 2211-1247 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28445727 >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry,** v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BROD, S. et al. The impact of environmental enrichment on the murine inflammatory immune response. **JCI insight,** v. 2, n. 7, 2017.

CAO, L. et al. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. **Cell,** v. 142, n. 1, p. 52-64, Jul 9 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603014 >.

COLLIGHAN, N.; GUPTA, S. Epidural steroids. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain,** v. 10, n. 1, p. 1-5, 2010. ISSN 1743-1816.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers,** v. 3, p. 17002, 2017. ISSN 2056-676X.

COLVIN, L. A.; POWER, I. Understanding chronic pain states. **The Foundation Years,** v. 3, n. 3, p. 117-120, 2007. ISSN 1744-1889. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744188907000709 >.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Pain: Molecular mechanisms. **Journal of Pain,** v. 1, n. 3, p. 35-44, Fal 2000. ISSN 1526-5900. Disponível em: < <Go to ISI>://000089538000007 >.

CROFTON, E. J.; ZHANG, Y.; GREEN, T. A. Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews,** v. 49, p. 19-31, 2015. ISSN 0149-7634.

DAWKINS, M. S. Through animal eyes: What behaviour tells us. **Applied Animal Behaviour Science,** v. 100, n. 1-2, p. 4-10, Oct 2006. ISSN 0168-1591. Disponível em: < <Go to ISI>://000240699700002 >.

DE GREGORI, S. et al. Morphine metabolism, transport and brain disposition. **Metabolic Brain Disease,** v. 27, n. 1, p. 1-5, Mar 2012. ISSN 1573-7365 (Electronic) 0885-7490 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22193538 >.

DENK, F.; MCMAHON, S. B.; TRACEY, I. Pain vulnerability: a neurobiological perspective. **Nature Neuroscience,** v. 17, n. 2, p. 192-200, Feb 2014. ISSN 1546-1726 (Electronic) 1097-6256 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24473267 >.

DIETIS, N.; ROWBOTHAM, D. J.; LAMBERT, D. G. Opioid receptor subtypes: fact or artifact? **British Journal of Anaesthesia,** v. 107, n. 1, p. 8-18, Jul 2011. ISSN 1471-6771 (Electronic) 0007-0912 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613279 >.

DOGRUL, A.; OSSIPOV, M. H.; PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. **Brain research,** v. 1280, p. 52-59, 2009. ISSN 0006-8993.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of clinical investigation,** v. 120, n. 11, p. 3760, 2010.

DUDLEY, K. J. et al. Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** v. 35, n. 7, p. 1544-51, Jun 2011. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21251925 >.

DUNCAN, I. J. H. The changing concept of animal sentience. **Applied Animal Behaviour Science,** v. 100, n. 1-2, p. 11-19, Oct 2006. ISSN 0168-1591. Disponível em: < <Go to ISI>://000240699700003 >.

FAIRHURST, G. D. et al. Does environmental enrichment reduce stress? An integrated measure of corticosterone from feathers provides a novel perspective. **PLoS One,** v. 6, n. 3, p. e17663, 2011. ISSN 1932-6203.

FOX, C.; MERALI, Z.; HARRISON, C. Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. **Behavioural Brain Research,** v. 175, n. 1, p. 1-8, Nov 25 2006. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <Go to ISI>://000242308200001 >.

FUKUSHIMA, T. et al. Facilitatory actions of serotonin type 3 receptors on GABAergic inhibitory synaptic transmission in the spinal superficial dorsal horn. **Journal of neurophysiology,** v. 102, n. 3, p. 1459-1471, 2009. ISSN 0022-3077.

GABRIEL, A. F. et al. Enriched environment and the recovery from inflammatory pain: Social versus physical aspects and their interaction. **Behavioural Brain Research,** v. 208, n. 1, p. 90-5, Mar 17 2010. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19914294 >.

GABRIEL, A. F. et al. Enriched environment and the recovery from inflammatory pain: Social versus physical aspects and their interaction. **Behavioural brain research,** v. 208, n. 1, p. 90-95, 2010. ISSN 0166-4328.

GILRON, I. et al. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. **Canadian Medical Association Journal,** v. 175, n. 3, p. 265-275, 2006. ISSN 0820-3946.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews immunology,** v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003. ISSN 1474-1733.

GRACE, P. M. et al. Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain. **Pain,** v. 157, n. 9, p. 2012-2023, 2016. ISSN 0304-3959.

GUO, W. et al. Spinal 5-HT 3 receptors mediate descending facilitation and contribute to behavioral hypersensitivity via a reciprocal neuron-glial signaling cascade. **Molecular pain,** v. 10, n. 1, p. 35, 2014. ISSN 1744-8069.

HARGREAVES, K. et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain,** v. 32, n. 1, p. 77-88, 1988. ISSN 0304-3959.

HEINRICHER, M. et al. Disinhibition of off-cells and antinociception produced by an opioid action within the rostral ventromedial medulla. **Neuroscience,** v. 63, n. 1, p. 279-288, 1994. ISSN 0306-4522.

HODGES, P. W.; SMEETS, R. J. Interaction between pain, movement, and physical activity: short-term benefits, long-term consequences, and targets for treatment. **The Clinical journal of pain,** v. 31, n. 2, p. 97-107, 2015. ISSN 0749-8047.

HU, P.; MCLACHLAN, E. Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. **Neuroscience,** v. 112, n. 1, p. 23-38, 2002. ISSN 0306-4522.

HUGHES, B. O.; DUNCAN, I. J. H. The Notion of Ethological Need, Models of Motivation and Animal-Welfare. **Animal Behaviour,** v. 36, p. 1696-1707, Nov-Dec 1988. ISSN 0003-3472. Disponível em: < <Go to ISI>://A1988R244400012 >.

JENSEN, T. S.; FINNERUP, N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **The Lancet Neurology,** v. 13, n. 9, p. 924-935, 2014. ISSN 1474-4422.

JI, R.-R. et al. MAP kinase and pain. **Brain research reviews,** v. 60, n. 1, p. 135-148, 2009. ISSN 0165-0173.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in pharmacological sciences,** v. 34, n. 9, p. 518-530, 2013. ISSN 0165-6147.

KIM, S.-Y. et al. Activation of p38 MAP kinase in the rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation and nerve injury. **Neuroreport,** v. 13, n. 18, p. 2483-2486, 2002. ISSN 0959-4965.

KIM, Y.-J.; BYUN, J.-H.; CHOI, I.-S. Effect of Exercise on μ-Opioid Receptor Expression in the Rostral Ventromedial Medulla in Neuropathic Pain Rat Model. **Annals of rehabilitation medicine,** v. 39, n. 3, p. 331-339, 2015. ISSN 2234-0645.

KIMURA, L. F.; MATTARAIA, V. G. D. M.; PICOLO, G. Distinct environmental enrichment protocols reduce anxiety but differentially modulate pain sensitivity in rats. **Behavioural Brain Research**, 2017/11/11/ 2017. ISSN 0166-4328. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432817315826 >.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature medicine,** v. 16, n. 11, p. 1258-1266, 2010. ISSN 1078-8956.

LAMBERT, K. et al. Natural-enriched environments lead to enhanced environmental engagement and altered neurobiological resilience. **Neuroscience,** v. 330, p. 386-94, Aug 25 2016. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27238894 >.

LAMPE, A. et al. Chronic pain syndromes and their relation to childhood abuse and stressful life events. **Journal of Psychosomatic Research,** v. 54, n. 4, p. 361-367, 2003. ISSN 00223999.

LEE, M.-Y. et al. Alteration of Synaptic Activity–Regulating Genes Underlying Functional Improvement by Long-term Exposure to an Enriched Environment in the Adult Brain. **Neurorehabilitation and neural repair,** v. 27, n. 6, p. 561-574, 2013. ISSN 1545-9683.

LEONG, M. L. et al. Neuronal loss in the rostral ventromedial medulla in a rat model of neuropathic pain. **Journal of Neuroscience,** v. 31, n. 47, p. 17028-17039, 2011. ISSN 0270-6474.

LESNIAK, A.; LIPKOWSKI, A. W. Opioid peptides in peripheral pain control. **Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars),** v. 71, n. 1, p. 129-38, 2011. ISSN 1689-0035 (Electronic) 0065-1400 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21499333 >.

LEVY, D.; HÖKE, A.; ZOCHODNE, D. W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. **Neuroscience letters,** v. 260, n. 3, p. 207-209, 1999. ISSN 0304-3940.

LYNCH, M. E. et al. Waiting for treatment for chronic pain - a survey of existing benchmarks: toward establishing evidence-based benchmarks for medically acceptable waiting times. **Pain Research Management,** v. 12, n. 4, p. 245-248, 2007. ISSN 1203-6765 (Print) 1203-6765 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18080042 >.

MANNELLI, L. D. C. et al. The neuropathy-protective agent acetyl-l-carnitine activates protein kinase C-γ and MAPKs in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience,** v. 165, n. 4, p. 1345-1352, 2010. ISSN 0306-4522.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience,** v. 6, n. 7, p. 521-532, 2005. ISSN 1471-003X.

MARTIN, K. R.; REID, D. M. Is there role for vitamin D in the treatment of chronic pain? **Therapeutic Advences Musculoskeletal Disease,** v. 9, n. 6, p. 131-135, Jun 2017. ISSN 1759-720X (Print) 1759-720X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28620421 >.

MAYA-VETENCOURT, J. F.; ORIGLIA, N. Visual cortex plasticity: a complex interplay of genetic and environmental influences. **Neural Plasticity,** v. 2012, p. 631965, 2012. ISSN 1687-5443 (Electronic). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22852098 >.

MENDELL, L. M. Computational functions of neurons and circuits signaling injury: Relationship to pain behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 108, n. Supplement 3, p. 15596-15601, 2011. ISSN 0027-8424.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in neurobiology,** v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002. ISSN 0301-0082.

MILLIGAN, E. D. et al. Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. **Brain research,** v. 861, n. 1, p. 105-116, 2000. ISSN 0006-8993.

MONACO, C. M. et al. Environmental enrichment promotes robust functional and histological benefits in female rats after controlled cortical impact injury. **Experimental Neurology**, Jan 16 2013. ISSN 1090-2430 (Electronic) 0014-4886 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23333563 >.

MOR, D.; KEAY, K. A. Differential Regulation of Glucocorticoid Receptor Expression in Distinct Columns of Periaqueductal Grey in Rats with Behavioural Disability Following Nerve Injury. **Cellular and molecular neurobiology,** v. 33, n. 7, p. 953-963, 2013. ISSN 0272-4340.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature reviews immunology,** v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008. ISSN 1474-1733.

NIJS, J. et al. Dysfunctional endogenous analgesia during exercise in patients with chronic pain: to exercise or not to exercise? **Pain Physician,** v. 15, n. 3S, p. ES205-ES213, 2012. ISSN 1533-3159.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience,** v. 7, n. 9, p. 697-709, Sep 2006. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924259 >.

OBATA, K. et al. Contribution of injured and uninjured dorsal root ganglion neurons to pain behavior and the changes in gene expression following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. **Pain,** v. 101, n. 1, p. 65-77, 2003. ISSN 0304-3959.

PANNELL, M. et al. Adoptive transfer of M2 macrophages reduces neuropathic pain via opioid peptides. **Journal of neuroinflammation,** v. 13, n. 1, p. 262, 2016. ISSN 1742-2094.

PASSINEAU, M. J.; GREEN, E. J.; DIETRICH, W. D. Therapeutic effects of environmental enrichment on cognitive function and tissue integrity following severe traumatic brain injury in rats. **Experimental Neurology,** v. 168, n. 2, p. 373-84, Apr 2001. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259125 >.

PATEL, T. R. Environmental enrichment: aging and memory. **Yale Journal of Biology and Medicine,** v. 85, n. 4, p. 491-500, Dec 2012. ISSN 1551-4056 (Electronic) 0044-0086 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239950 >.

PATRO, N.; NAGAYACH, A.; PATRO, I. K. Iba1 expressing microglia in the dorsal root ganglia become activated following peripheral nerve injury in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 48, n. 2, p. 110-116, Feb 2010.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods,** v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985. ISSN 0165-0270.

PENA, Y. et al. Environmental enrichment effects in social investigation in rats are gender dependent. **Behavioural brain research,** v. 174, n. 1, p. 181-187, 2006. ISSN 0166-4328.

POTREBIC, S.; FIELDS, H.; MASON, P. Serotonin immunoreactivity is contained in one physiological cell class in the rat rostral ventromedial medulla. **Journal of Neuroscience,** v. 14, n. 3, p. 1655-1665, 1994. ISSN 0270-6474.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Corticosteroids. **Rheumatic Disease Clinics,** v. 42, n. 1, p. 15-31, 2016. ISSN 0889-857X.

RANG, H. et al. Pharmacology (7th edn). **Churchill Livingstone: New York**, p. 265-284, 2012.

ROESKA, K. et al. Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. **Pain,** v. 139, n. 2, p. 349-357, 2008. ISSN 0304-3959.

ROSENOW, J. M.; HENDERSON, J. M. Anatomy and physiology of chronic pain. **Neurosurgery Clinics of North America,** v. 14, n. 3, p. 445-462, 2003. ISSN 1042-3680.

ROSENZWEIG, M. R. et al. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. **Brain Research,** v. 153, n. 3, p. 563-76, Sep 29 1978. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/698794 >.

ROSSI, H. L.; NEUBERT, J. K. Effects of environmental enrichment on thermal sensitivity in an operant orofacial pain assay. **Behavioural Brain Research,** v. 187, n. 2, p. 478-82, Mar 5 2008. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17976833 >.

SAPOLSKY, R. M. Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. **Nature neuroscience,** v. 18, n. 10, p. 1344-1346, 2015. ISSN 1097-6256.

SCHILLING, L. S.; MARKMAN, J. D. Corticosteroids for Pain of Spinal Origin: Epidural and Intraarticular Administration. **Rheumatic Disease Clinics of North America,** v. 42, n. 1, p. 137-155, 2016. ISSN 0889-857X.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nature neuroscience,** v. 10, n. 11, p. 1361-1368, 2007. ISSN 1097-6256.

SESSLE, B. **Unrelieved pain: a crisis**. Pain Res Manag. 16**:** 416-420 p. 2011.

SHUM, F. W. et al. Alteration of cingulate long-term plasticity and behavioral sensitization to inflammation by environmental enrichment. **Learning and Memory,** v. 14, n. 4, p. 304-12, Apr 2007. ISSN 1549-5485 (Electronic) 1072-0502 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522019 >.

SIMPSON, J.; KELLY, J. P. The impact of environmental enrichment in laboratory rats—behavioural and neurochemical aspects. **Behavioural brain research,** v. 222, n. 1, p. 246-264, 2011. ISSN 0166-4328.

SMITH, M. A.; BRYANT, P. A.; MCCLEAN, J. M. Social and environmental enrichment enhances sensitivity to the effects of kappa opioids: studies on antinociception, diuresis and conditioned place preference. **Pharmacology Biochemestry and Behavior,** v. 76, n. 1, p. 93-101, Aug 2003. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679221 >.

SMITH, M. A. et al. Social and environmental influences on opioid sensitivity in rats: importance of an opioid's relative efficacy at the mu-receptor.

Psychopharmacology, v. 181, n. 1, p. 27-37, Aug 2005. ISSN 0033-3158. Disponível em: < <Go to ISI>://000231804800005 >.

SMITH, M. A. et al. Effects of environmental enrichment on sensitivity to mu, kappa, and mixed-action opioids in female rats. **Physiology & Behavior,** v. 94, n. 4, p. 563-8, Jul 5 2008. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18456292 >.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues in clinical neuroscience,** v. 8, n. 4, p. 383, 2006. ISSN 1294-8322.

SONG, X.-S. et al. Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats. **Acta Pharmacologica Sinica,** v. 26, n. 7, p. 789-798, 2005. ISSN 1671-4083.

STAGG, N. J. et al. Regular exercise reverses sensory hypersensitivity in a rat neuropathic pain model. **American Society of Anesthesiologists Annual Meeting**, 2010.

STAUD, R. Peripheral pain mechanisms in chronic widespread pain. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology,** v. 25, n. 2, p. 155-164, Apr 2011. ISSN 1532-1770 (Electronic) 1521-6942 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094192 >.

SZTAINBERG, Y.; CHEN, A. An environmental enrichment model for mice. **Nature Protocols,** v. 5, n. 9, p. 1535-9, Sep 2010. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20725068 >.

TAKASAKI, I. et al. Effects of glucocorticoid receptor antagonists on allodynia and hyperalgesia in mouse model of neuropathic pain. **European journal of pharmacology,** v. 524, n. 1, p. 80-83, 2005. ISSN 0014-2999.

TALL, J. M. Housing supplementation decreases the magnitude of inflammation-induced nociception in rats. **Behavioural Brain Research,** v. 197, n. 1, p. 230-3, Jan 30 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18773924 >.

TOMPKINS, D. A.; CAMPBELL, C. M. Opioid-induced hyperalgesia: clinically relevant or extraneous research phenomenon? **Current pain and headache reports,** v. 15, n. 2, p. 129-136, 2011. ISSN 1531-3433.

TOTH, L. A. et al. Environmental Enrichment of Laboratory Rodents: The Answer Depends on the Question. **Comparative Medicine,** v. 61, n. 4, p. 314-321, Aug 2011. ISSN 1532-0820. Disponível em: < <Go to ISI>://000302043200003 >.

TRICAUD, N.; PARK, H. T. Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-9, 2017. ISSN 1420-682X.

TSUJINO, H. et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury. **Molecular and Cellular Neuroscience,** v. 15, n. 2, p. 170-182, 2000. ISSN 1044-7431.

VACHON, P. Double Decker Enrichment cages have no effect on long term nociception in neuropathic rats but increase exploration while decreasing anxiety-like behaviors. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences,** v. 40, p. 1-6, 2014. ISSN 2002-0112.

VACHON, P. et al. Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. **Behavior Brain Function,** v. 9, p. 22, 2013.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience,** v. 1, n. 3, p. 191-8, Dec 2000. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257907 >.

WANG, L. X.; WANG, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. **Advanced drug delivery reviews,** v. 55, n. 8, p. 949-965, 2003. ISSN 0169-409X.

WANG, S. et al. Expression of central glucocorticoid receptors after peripheral nerve injury contributes to neuropathic pain behaviors in rats. **The Journal of neuroscience,** v. 24, n. 39, p. 8595-8605, 2004. ISSN 0270-6474.

WÜRBEL, H.; GARNER, J. P. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. **National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research**, 2007.

ARTICLE IN PRESS

Behavioural Brain Research xxx (xxxx) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Short communication

Distinct environmental enrichment protocols reduce anxiety but differentially modulate pain sensitivity in rats

Louise Faggionato Kimura[a,c], Vânia Gomes de Moura Mattaraia[b], Gisele Picolo[a,*]

[a] Laboratório Especial de Dor e Sinalização, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil
[b] Biotério Central, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil
[c] Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas I, Universidade de São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Welfare
Environmental enrichment
Anxiety
Acute pain
Chronic pain

ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) can alter anxiety as well as perception of nociceptive stimuli, suggesting a relationship between well-being and analgesia. Considering that, we aimed to evaluate the influence of different EE types on anxiety and peripheral pain sensitivity of male Wistar rats. Animals were submitted to two different types of EE: On the first one, animals were housed in standard size cages after weaning and received three different objects, one type per week, on a regular basis (simple EE – sEE). On the second one, animals were born in an already enriched environment and, after five weeks, were housed in larger cages and received five different objects, three of each type per week, on a regular basis (improved EE – iEE). Control group remained in standard cages and did not receive objects. Within 7 weeks of life, anxiety and thermal sensibility were evaluated using elevated plus maze and tail flick tests, respectively. Mechanical hyperalgesia was analyzed in the presence of acute and chronic noxious stimuli by paw pressure test. Both EE protocols tested were effective in diminish anxiety but they did not alter thermal sensibility. On the other hand, sEE protocol did not alter acute and chronic induced mechanical hypersensitivity, whereas iEE completely abolished such pain behavior, even without exercise wheel as part of the enrichment. Our results show that specific parameters (anxiety and pain sensitivity) can be differentially modulated depending on EE protocol used, making possible the implementation of welfare to experimental animals in pain research.

The relationship between welfare and physical and psychological health, first proposed in 1988 [1], has been increasingly proven by several works published recently [2–4]. Environmental enrichment (EE) is one of the most widely used ways to ensure animal welfare. EE consists in a combination of inanimate stimuli (e.g. objects) and social interaction [5], keeping animals housed with different objects used for manipulation, physical exercise, hiding or nesting [6,7], providing sensory, cognitive and motor stimuli, and preventing animals from undesirable or abnormal behaviors [7,8].

A large number of diseases cannot be studied using alternative methods, unfortunately. For this reason, ensuring animal welfare as far as possible is necessary. Routine manipulations of laboratory animals can be a stressor factor [9], in addition to stress of subordination, that also may occur with captive animals [10]. These stressful conditions, thus, may be controlled by EE. However, the beneficial effects of EE can go much further. The amelioration of symptoms to certain conditions using animal models of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's disease, epilepsy, stroke and traumatic brain injury, induced by EE, has already been described [11]. Moreover, enriched housing can reduced inflammation-induced hyperalgesia [12] and decreased neuropathic pain in mice [13,14]. Considering that, the idea of provide welfare to experimental animals in general can be challenging since the enrichment may influence directly the development and phenotype of the condition to be studied. Thus, in most studies, EE is used only as a treatment or moderator for the condition to be investigated rather than in an attempt to provide well-being for the experimental animals.

Since EE protocols vary widely [15], our aim was to investigate whether different protocols of EE would differentially influence classical models of acute and chronic pain studies. Evaluating anxiety and nociceptive behaviors of rats from the same strain, age, and gender, we had 2 main purposes: investigate a strategy to provide a better living situation to experimental animals, with no interferences with acute and chronic pain models; and second to investigate if an elaborated EE protocol as a non-pharmacological approach could modulate acute and chronic pain behaviors.

Male Wistar rats were used (n = 150), provided by Instituto Butantan Animal House. Animals from all groups studied were born and kept in the Animal House until 35 days of age under controlled

* Corresponding author at: Laboratório Especial de Dor e Sinalização, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: gisele.picolo@butantan.gov.br (G. Picolo).

https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.012
Received 20 September 2017; Received in revised form 9 November 2017; Accepted 10 November 2017
0166-4328/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: Kimura, L.F., Behavioural Brain Research (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.012

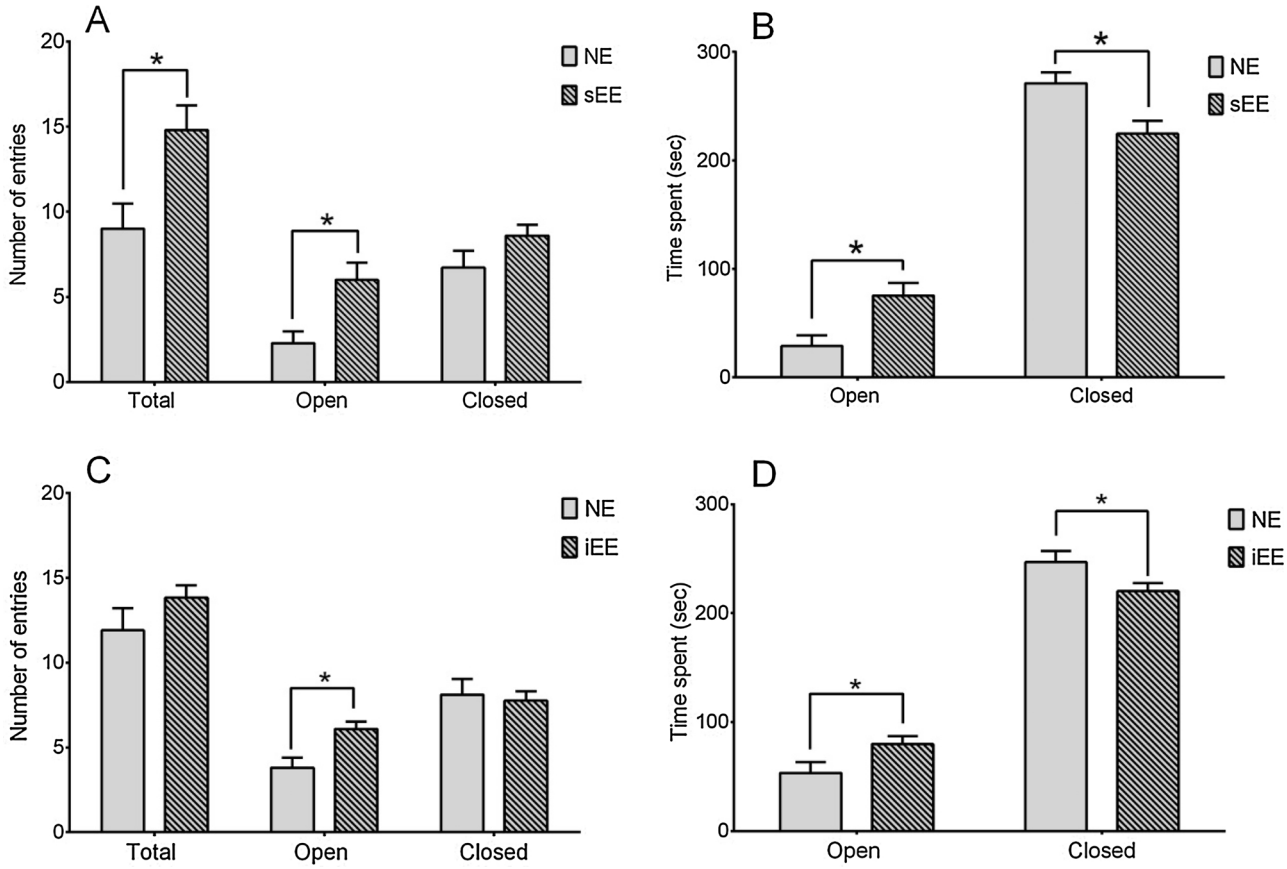


Fig. 1. Effects of simple and improved environmental enrichment protocols on rat's anxiety behavior as measured by elevated plus maze test. The number of entries in open or closed arms (A, C) and total time spent in each arm (B, D) of animals from both simple (sEE) (A, B) and improved environmental enrichment (iEE) (C, D) models of enrichment were recorded for 5 min (n = 7–10). The results represent the group mean ± s.e.m. *$p < 0.05$.

conditions of temperature (22 ± 2 °C), humidity (50% ± 10% RH), noise and artificial lighting (12 h light cycle/12 h darkness), with free access to water and food (Nuvilab CR1-Nuvital® Brazil). After 35 days, animals were transferred to the Special Laboratory of Pain and Signaling and kept in cages with autoclaved shavings for bedding with water and food *ad libitum* in appropriate room, soundproof, temperature controlled (22 ± 2 °C) and light-dark cycle (12:12 h). All the procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of Instituto Butantan (CEUAIB – protocol 1050/13) and of Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brazil (CEUA 58/2013) according to ARRIVE guidelines. Behavioral tests were performed between 7 am and 1 pm.

The first model of EE tested (simple EE – sEE) was introduced after weaning (21 days) where animals were placed in regular size cages (49 × 34 × 16 cm) with one (quantity and type) among three different objects (cardboard tubes, plastic cylinders, or disposable caps) introduced in the cage (Supplementary file) and weekly changed by the other object in alternation, in order to maintain novelty. Control group (non-enriched group – NE) did not receive EE throughout this period but it was equally manipulated. For the second EE protocol tested (improved EE – iEE), enrichment started at birth, and consisted of the addition of plastic cylinders, or surgical caps, or cardboard tubes, in this order, in animals' cage. Each object type was changed weekly. After 5 weeks, animals were placed in bigger cages (60 × 50 × 22 cm) compared to standard ones, with three of five different types of objects at once (Supplementary file), which one of them was changed weekly. Besides disposable caps, different objects such ping-pong balls, acrylic tubes, acrylic cabin, and acrylic rectangular housing (Acrilim Acrílicos, São Paulo, Brazil) were used. Non-enriched animals (NE) were manipulated as iEE group since birth, and were allocated in standard size cages after five weeks of life. Both sEE and iEE assays were performed after the seventh week of life (~250 g) and EE was maintained for the duration of the tests. In all groups, animals were distributed in number of 5 animals per cage after weaning, and only one pair of siblings was allowed per cage to avoid genetic interferences. Rats were randomly distributed among all experimental groups.

Animals anxiety was evaluated by elevated plus maze (EPM) test. In this test, a dark timber apparatus in a cross shape with two open arms (50 × 10 cm) and two enclosed arms (50 × 10 × 40 cm), being each type opposed to each other, was elevated 50 cm from the ground. A single animal was placed in the middle of the apparatus in low light room and, over 5 min, animal traffic was filmed by a camera positioned above the apparatus. By analyzing the film (blinded analysis) using AMCAP software, it was recorded how many times the animal entered into open and closed arms and how long the animal remained in each of them [16]. Animals that fell off from the apparatus were excluded of the group. The results were analyzed by comparing the values obtained in the different experimental groups (mean ± s.e.m.).

Thermal sensitivity was evaluated using tail flick test [17]. Animals used before in EPM test, without any induction of pain, were placed and gently restrained with the tail resting on a screen which presents an orifice that allows the passage of light, which focused on the lower third of the tail. Measured parameter was the latency (in seconds) for the tail withdrawal, which corresponds to spinal reflex response in the presence of thermal noxious stimulus. The light intensity was adjusted to obtain an initial measurement of 2–4 s. Two measurements were performed with 30 min interval and the average was considered as the final result. The cutoff time was stipulated as 8 s. The results were analyzed by comparing the values obtained in the different experimental groups (mean ± s.e.m).

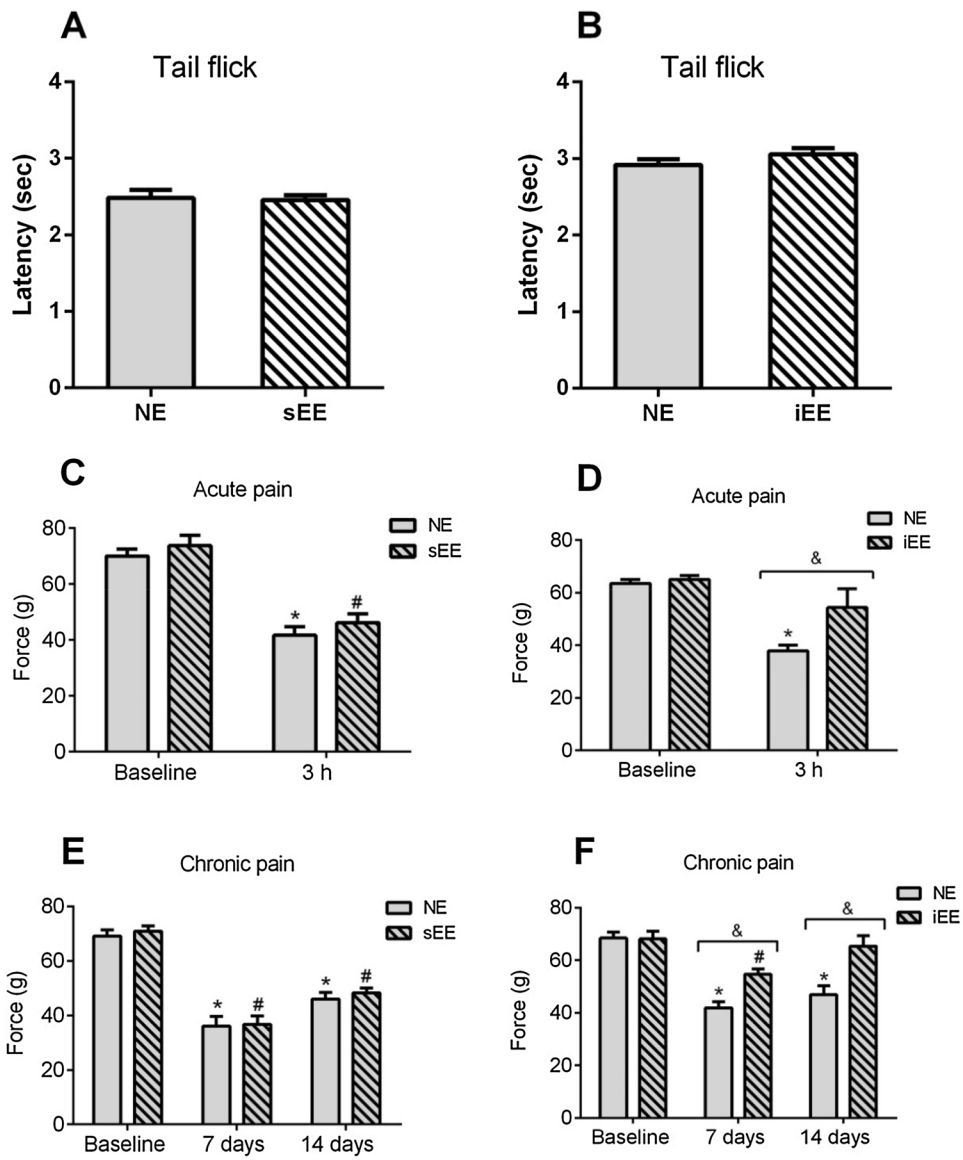


Fig. 2. Thermal and mechanical sensitivity of animals submitted to simple (sEE) or improved (iEE) enrichment protocols in normal conditions or in the presence of acute or chronic noxious stimuli, compared to non-enriched group (NE). Thermal sensitivity (A, B) was evaluated using tail flick method in normal conditions (A: NE n = 9, sEE n = 10; B: NE n = 15, iEE n = 15). Mechanical threshold was assessed by paw pressure test before (baseline) and 3 h after carrageenan injection (200 µg/paw) (C: NE n = 6, sEE n = 4; D: NE n = 7, iEE n = 8), or before (baseline) and 7 and 14 after sciatic chronic constriction (E, F) (E: NE n = 5, sEE n = 6; F: NE n = 13; iEE n = 13). *$p < 0.05$ in relation to respective NE baseline, #$p < 0.05$ in relation to respective EE baseline, &$p < 0.05$ of NE x iEE.

Mechanical sensitivity was evaluated using paw pressure test [18]. In this test, a force in grams (g) of increasing magnitude (16 g/s) is continuously applied on the posterior dorsum of the rat's hind paw and stopped when the animal interpreted pressure as a noxious stimulus (withdrawal member reaction). Nociceptive threshold is represented as the force (g) required for inducing the withdrawal reaction. This test was applied before (baseline) and after certain periods of time, depending on the experimental design (acute or chronic pain behavior assessment).

The induction of acute nociception consisted on the injection of 200 µg of carrageenan (Sigma Aldrich, USA) diluted in sterile saline (50 µL) (sterile saline alone – control group) in rat hind paw. Paw pressure test was applied before and 3 h after injection (peak of carrageenan-induced hyperalgesia). Chronic pain was induced by chronic constriction of sciatic nerve (CCI), according to Bennett and Xie [19]. Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (3%). The sciatic nerve was exposed at the level of the middle of the thigh. Proximal to the sciatic trifurcation (about 7 mm of distance), 4 ligatures (4.0 chromic gut), with 1 mm spacing of each other, were loosely tied around the nerve. The incision was closed in layers. In sham-operated rats, sciatic nerve was exposed but no ligatures were made. Animals from sham or CCI group received dipyrone (80 mg/kg, intraperitoneally, diluted in sterile saline q.s. 500 µL) (EMS, São Paulo, Brazil) every 12 h, for 3 days, to alleviate local incision pain. The treatment with dipyrone did not alter neuropathic pain development (Supplementary file). The development of hyperalgesia was evaluated on days 7 and 14 after surgery by paw pressure test. Results from both designs (acute and chronic tests) were analyzed by comparing initial and final measures of the group mean and comparing the values obtained in enriched and non-enriched groups (mean ± s.e.m.). All animals from both experiments (saline x carrageenan; sham x CCI) were randomized inside the cages. After all experiments, animals were euthanized under deep terminal isoflurane anesthesia (5%).

For non-parametric and parametric data, Mann Whitney's unpaired and Student's *t*-tests were used, respectively, to analyze anxiety test. T-student test was employed to analyze tail flick test data. Simple Two Way ANOVA (acute pain test) or for repeated measures (chronic pain test), for two variables, followed by Sidak's or Tukey's test were used. Analyses were performed using the GraphPad Prisma 6 program. Statistically significant values were considered at $p < 0.05$.

Both EE protocols used (sEE and iEE) diminished rats anxiety, since enriched animals entered more times on open arms (sEE $p = 0.0206$; iEE $p = 0.0048$) and spent more time on them (sEE $p = 0.0097$; iEE $p = 0.0427$) when compared to respective non-enriched (NE) animals

group (Fig. 1). Anxiety is an indicative of stress-like behavior, and it was already demonstrated that others enrichment housing protocols induce anxiolytic effect [20,21]. Here, results show that even a simple object introduced after weaning (sEE) as much as an elaborated enriched environment (iEE) provide adequate stimuli capable of diminishing anxiety of animals.

In relation to sensibility, spinal reflex upon thermal stimuli (Fig. 2A, B) and the basal mechanical threshold (Fig. 2C, F) were not different in enriched groups when compared to the respective NE groups. Concerning acute pain induced by carrageenan injection, sEE condition did not interfere with acute nociception, being similar to NE group (Fig. 2C) (time x enriched condition: $F(1, 8) = 0.04324$, $p = 0.8405$; time: $F(1, 8) = 194.1$, $p < 0.0001$; enriched condition: $F(1, 8) = 1.081$, $p = 0.3289$). However, iEE group threshold was different from NE group in the peak of carrageenan-induced nociception (Fig. 2D) (time x enriched condition: $F(3, 23) = 5.328$, $p = 0.0062$; time: $F(1, 23) = 16.16$, $p = 0.0005$; enriched condition: $F(3, 23) = 3.050$, $p = 0.0489$); (NE 3 h x iEE 3 h: $p = 0.0222$), which indicates the iEE condition decreased acute pain behavior. Concerning neuropathic pain, sEE had no effect on chronic pain behavior (Fig. 2E). In contrast, rats from iEE presented a smaller decrease in pain threshold 7 days after CCI, when compared to NE group ($p = 0.0078$), and surprisingly, no pain behavior was observed at 14 days after surgery in the iEE group (time x enriched condition: $F(2, 48) = 10.29$, $p = 0.0002$; time: $F(2, 48) = 44.81$, $p < 0.0001$; enriched condition: $F(1, 24) = 10.01$, $p = 0.0042$). At this period, iEE group nociceptive threshold was back to baseline and was totally different from NE group ($p < 0.0001$) (Fig. 2F). Control groups from acute (saline-injected) and chronic pain (sham-operated) experiments presented no alterations in mechanical thresholds in all time periods evaluated in sEE, iEE and respective NE conditions (Supplementary file).

With these results we could observed that sEE and iEE did not interfere with either spinal reflex or peripheral sensitivity at normal state. In general, pain works as a warning phenomenon at physiological conditions [22] and it was demonstrated here that independently of EE protocols tested, enriched animals do preserve their natural protection response, such as reflex arc, against noxious stimuli. However, in the presence of acute or chronic noxious stimuli, pain behavior was decreased only by iEE condition, whereas sEE animals still developed nociception. Thus, we can suggest that simple enrichment condition can be applied to experimental animals to control anxiety without interference in the analysis of pain behavior. On the other hand, the improvement of enriched housing and the implementation at birth can affect nociceptive transduction, transmission, perception and/or modulation and produce significantly changes in sensory, cognitive and/or limbic areas capable to modulate acute and, more surprisingly, abolish neuropathic pain behaviors. It was already reported that enriched conditions can indeed modulate, not abolish, pain behavior in animals [12,14,23]. Nevertheless, most of enrichment protocols count on exercise wheel, and exercise *per se* is known to reduce tactile allodynia induced by CCI in rats [24]. The lifetime of enrichment implementation, besides the interaction with more objects in larger cages, could be one of the possible reasons for the total control of neuropathic pain behavior in the present work (iEE started at birth). Previous work has shown that the implementation of EE, without exercise wheel, one month after CCI surgery, decreased anxiety and increased exploration, but had no effects on mechanical sensitivity in rats [25]. Therefore, we can speculate that the prevention of neuropathic pain without physical exercise can be achieved, in part, due to welfare when implemented in early stages of life.

Taking together, our results demonstrated that is possible to provide a better living condition to experimental animals using a simple method, which does not lead to changes in the phenomenon to be studied. Moreover, the improvement of enriched housing and implementation at the birth can produce such great changes that totally control neuropathic pain behavior.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (141161/2013-2), by São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2013/20795-8, 2011/17974-2), and by INCTTox (2008/57898-0). We also thank the technical assistance of Westerson da Silva Araújo from Butantan Institute Animal House and of Priscila de Souza Romano from Special Laboratory of Pain and Signaling.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.012.

References

[1] B.O. Hughes, I.J.H. Duncan, The notion of ethological need, models of motivation and animal welfare, Anim. Behav. 36 (1988) 1696–1707, http://dx.doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80110-6.
[2] A. Sale, N. Berardi, L. Maffei, Environment and brain plasticity towards an endogenous pharmacotherapy, Physiol. Rev. 94 (2014) 189–234, http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00036.2012.
[3] M.E. Sakalem, T. Seidenbecher, M. Zhang, R. Saffari, M. Kravchenko, S. Wördemann, K. Diederich, J.C. Schwamborn, W. Zhang, O. Ambrée, Environmental enrichment and physical exercise revert behavioral and electrophysiological impairments caused by reduced adult neurogenesis, Hippocampus 27 (2017) 36–51, http://dx.doi.org/10.1002/hipo.22669.
[4] M. Hüttenrauch, G. Salinas, O. Wirths, Effects of long-term environmental enrichment on anxiety, memory, hippocampal plasticity and overall brain gene expression in C57BL6 mice, Front. Mol. Neurosci. 9 (2016) 1–11, http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2016.00062.
[5] M.R. Rosenzweig, E.L. Bennett, M. Hebert, H. Morimoto, Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments, Brain Res. 153 (1978) 563–576, http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(78)90340-2.
[6] Y. Sztainberg, A. Chen, An environmental enrichment model for mice, Nat. Protoc. 5 (2010) 1535–1539, http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.114.
[7] L.A. Toth, K. Kregel, L. Leon, T.I. Musch, Environmental enrichment of laboratory rodents: the answer depends on the question, Comp. Med. 61 (2011) 314–321 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330246.
[8] L. Baroncelli, C. Braschi, M. Spolidoro, T. Begenisic, A. Sale, L. Maffei, Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment, Cell Death Differ. 17 (2009) 1092–1103, http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.193.
[9] J.P. Balcombe, N.D. Barnard, C. Sandusky, Laboratory routines cause animal stress, Contemp. Top. Lab. Anim. Sci. 43 (2004) 42–51 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15669134.
[10] S. Creel, Social dominance and stress hormones, Trends Ecol. Evol. 16 (2001) 491–497, http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02227-3.
[11] J. Nithianantharajah, A.J. Hannan, Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system, Nat. Rev. Neurosci. 7 (2006) 697–709, http://dx.doi.org/10.1038/nrn1970.
[12] J.M. Tall, Housing supplementation decreases the magnitude of inflammation-induced nociception in rats, Behav. Brain Res. 197 (2009) 230–233, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.010.
[13] M. Tajerian, S. Alvarado, M. Millecamps, P. Vachon, C. Crosby, M.C. Bushnell, M. Szyf, L.S. Stone, Peripheral nerve injury is associated with chronic, reversible changes in global DNA methylation in the mouse prefrontal cortex, PLoS One 8 (2013) 1–7, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055259.
[14] P. Vachon, M. Millecamps, L. Low, S.J. Thompsosn, F. Pailleux, F. Beaudry, C.M. Bushnell, L.S. Stone, Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain, Behav. Brain Funct. 9 (2013) 22, http://dx.doi.org/10.1186/1744-9081-9-22.
[15] J. Simpson, J.P. Kelly, The impact of environmental enrichment in laboratory rats-behavioural and neurochemical aspects, Behav. Brain Res. 222 (2011) 246–264, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.002.
[16] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, J. Neurosci. Methods 14 (1985) 149–167, http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7.
[17] F.E. D'Amour, D.L. Smith, A method for determining loss of pain sensation, J. Pharmacol. Exp. Ther. 72 (1941) 74–79.
[18] L.O. Randall, J.J. Selitto, A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 111 (1957) 409–419 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13471093.
[19] G.J. Bennett, Y.K. Xie, A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man, Pain 33 (1988) 87–107, http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6.
[20] N. Benaroya-Milshtein, N. Hollander, A. Apter, T. Kukulansky, N. Raz, A. Wilf,

I. Yaniv, C.G. Pick, Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity, Eur. J. Neurosci. 20 (2004) 1341–1347, http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x.

[21] C. Fox, Z. Merali, C. Harrison, Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress, Behav. Brain Res. 175 (2006) 1–8, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.016.

[22] M.J. Millan, The induction of pain: an integrative review, Prog. Neurobiol. 57 (1999) 1–164 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987804.

[23] Y. Berrocal, D.D. Pearse, A. Singh, C.M. Andrade, J.S. McBroom, R. Puentes, M.J. Eaton, Social and environmental enrichment improves sensory and motor recovery after severe contusive spinal cord injury in the rat, J. Neurotrauma 24 (2007) 1761–1772, http://dx.doi.org/10.1089/neu.2007.0327.

[24] P.M. Grace, T.J. Fabisiak, S.M. Green-Fulgham, N.D. Anderson, K.A. Strand, A.J. Kwilasz, E.L. Galer, F.R. Walker, B.N. Greenwood, S.F. Maier, M. Fleshner, L.R. Watkins, Prior voluntary wheel running attenuates neuropathic pain, Pain 157 (2016) 2012–2023, http://dx.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000607.

[25] P. Vachon, Double Decker Enrichment cages have no effect on long term nociception in neuropathic rats but increase exploration while decreasing anxiety-like behaviors, Scand. J. Lab. Anim. Sci. 40 (2014) 1–6.