

Mestrado de Bioquímica em Saúde

## **Dissertação de Mestrado**

# Caracterização de comportamentos de nocicepção, ansiedade e depressão em dois modelos de dor neuropática em ratinho

Autora: Marta Sofia Ferreira Gonçalves

2º Ano do Mestrado de Bioquímica em Saúde

Nº 10130541

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, no ramo de Bioquímica clínica e metabólica realizada sob a orientação científica da Doutora Fani Lourença Moreira Neto (Professora auxiliar da FMUP) e coorientação da Doutora Maria Isabel Torres Martins (Professora auxiliar da FMUP) e coorientação institucional da Doutora Cristina Prudêncio.

Dezembro, 2015



## **Agradecimentos**

Começo por agradecer à Doutora Carla Morgado pelos conhecimentos transmitidos na elaboração deste trabalho, assim como pela paciência, dedicação demonstradas ao longo do último ano. Obrigada pelo carinho maternal com que me tratou sempre!

Os mais sinceros agradecimentos a todo o departamento de Biologia experimental da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Em particular ao Professor Doutor Castro Lopes e à professora Doutora Isaura Tavares por me acolherem no laboratório.

Aos meus colegas do laboratório, Marta Louçano, José Tiago Pereira, Ana Rita Costa, Carla Abreu e Daniel Martins, que me acolheram quando tudo era novo para mim, obrigada pelos bons momentos!

À Elisa Nova e ao Fernando Martins a amabilidade demonstrada em todos os momentos.

À minha coorientadora institucional Professora Doutora Cristina Prudêncio pela partilha de conhecimentos, pela palavra de carinho sempre presente e acima de tudo por me fazer apaixonar pelas neurociências e pela dor.

Às Professoras Doutora Fani Neto e Doutora Isabel Martins obrigada pelos conhecimentos transmitidos, paciência, palavras de incentivo e motivação transmitidas ao longo da escrita deste trabalho. Sem vocês não teria sido possível!

À Doutora Gisela Borges por tudo que me ensinou sobre comportamento animal, pela paciência e humildade que possui, pela motivação e palavras de incentivo. O meu sincero obrigado!

Aos meus amigos Anita Campos, Sofia Cabral, Joana Correia, Melissa Couto, Salomé Monteiro e Nuno Durães que me acompanharam ao longo do mestrado, obrigada por todos os momentos inesquecíveis.

E por último, mas não menos importante, tenho de agradecer aos meus pais e ao meu primo, porque sem eles nada disto seria possível. Obrigada por acreditarem em mim, pelo apoio, amor, pelas palavras duras nos momentos certos e pela força nos momentos difíceis. Simplesmente amo-vos!

Ao meu namorado por ser tão “tudo”, por estar todos os dias ao meu lado, por partilhar todos os momentos desta etapa comigo, pela paciência demonstrada, por acreditar sempre em mim, pelo amor e carinho demonstrados, mesmo quando eu passava horas infundáveis a falar de ratinhos e comportamento animal. Poderia dizer muito mais por tudo que representas para mim...



## Resumo

A dor neuropática resulta de uma lesão nos sistemas nervoso central ou periférico. É uma condição crônica de elevada prevalência, que pode promover estados patológicos como depressão e ansiedade. Reciprocamente, perturbações do humor podem também intensificar a experiência dolorosa. A fisiopatologia da dor neuropática é de natureza complexa, multifatorial e não está completamente elucidada.

Este projeto teve três objetivos principais: 1) A implementação, validação e caracterização de dois modelos de dor neuropática em ratinho; 2) A otimização de protocolos experimentais que permitam realizar os testes de ansiedade ou depressão no biotério da Instituição de forma a futuramente transpor este tipo de estudo a animais transgênicos; 3) A avaliação de comportamentos indicativos de ansiedade e/ou depressão nos dois modelos de dor.

Foram induzidos dois modelos de dor neuropática em ratinhos C57BL/6, nomeadamente o modelo de neuropatia diabética por injeção de estreptozotocina (modelo STZ) e um modelo de lesão traumática de nervos periféricos (SNI ou *spared nerve injury*). O desenvolvimento da patologia e a hipersensibilidade a estímulos inócuos e nócicos foi avaliado pelos testes de *von Frey* em ambos os modelos. Ambos os modelos apresentaram alodínia mecânica. Posteriormente, foram avaliados comportamentos indicativos de estados de ansiedade e/ou depressão em ambos os modelos, não tendo sido observadas diferenças significativas. Avaliou-se se a execução prévia de testes nociceptivos poderia influenciar os resultados da avaliação da ansiedade e/ou da depressão. Observaram-se diferenças significativas entre o grupo experimental submetido a avaliação nociceptiva previamente e o grupo somente avaliado para ansiedade e depressão, em todos os testes à exceção do teste *marble burying*. No modelo SNI também foi avaliada, por imunohistoquímica, a ativação de proteínas cinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares (ERK 1/2). Verificou-se forte ativação de áreas encefálicas envolvidas no processamento afetivo da dor, nomeadamente no córtex cingulado anterior e na amígdala.

Este projeto permitiu a implementação, caracterização e otimização de protocolos para os dois modelos de dor em ratinho, assim como o desenvolvimento de condições no biotério necessárias à realização dos testes comportamentais para avaliar a ansiedade e/ou a depressão nesses animais.

**Palavras-Chave:** nocicepção, ansiedade, depressão, dor neuropática



## **Abstract**

Neuropathic pain results from injury of the central (CNS) or peripheral nervous systems (PNS). It is a chronic condition with high prevalence which might lead to other pathologic states such as depression and anxiety. Reciprocally, these mood disorders can intensify the painful experience. The physiopathology of neuropathic pain is complex and multifactorial, and is still not completely elucidated.

This project had three main objectives: 1) The implementation, validation and characterization of two neuropathic pain models in mice; 2) The optimization of experimental protocols which allowed to perform the anxiety or depression tests in the animal house of the institution with the future aim of applying these studies to transgenic mice; 3) The evaluation of anxiety- and/or depression-like behaviours in the two distinct pain models.

Two distinct models of neuropathic pain were induced in C57BL/6 mice, namely the diabetic neuropathy by injection of streptozotocin (STZ model) and one model of traumatic injury of peripheral nerves (the spared nerve injury or SNI). The development of the pathologies and of hypersensitivity to innocuous and noxious stimuli were assessed by the *von Frey* test in both models. Both models presented mechanical allodynia. Additionally, the anxiety- and depression-like behaviours were evaluated in both pain models, with no evidence of significant differences. The effect of previously performing nociceptive tests on the data obtained in the anxiety and depression evaluation was also assessed. We found evidence of statistically significant differences between the experimental group previously subjected to nociceptive evaluation and the group which has just been evaluated for anxiety and/or depression in all tests with exception to the marble burying. In the SNI model, the activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (ERK 1/2) was also evaluated by immunohistochemistry. A strong activation in encephalic areas related to the affective/emotional processing of pain, such as the anterior cingulate cortex and amygdala, was detected.

This project allowed the implementation, characterization and optimization of experimental protocols for both pain models in mice, as well as the establishment in the animal house of the necessary conditions to perform the behavioural tests for evaluation of anxiety and/or depression in these animals.

**Keywords:** nociception, anxiety, depression, neuropathic pain



**Índice:**

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>II</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>XII</b>
<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>XIV</b>
<b>I. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Dor.....</b>	<b>1</b>
i. Definição da dor.....	1
ii. Vias de transmissão e modulação da dor .....	1
iii. Tipos de dor .....	5
<b>2. Dor neuropática .....</b>	<b>7</b>
i. Fisiopatologia.....	7
ii. Tratamento da dor neuropática .....	9
<b>3. Modelos animais de dor neuropática .....</b>	<b>10</b>
i. Modelos animais de neuropatia metabólica .....	10
a) Mecanismo de acção da STZ.....	12
ii. Modelos de neuropatia tramática .....	13
<b>4. Distúrbios afetivos e dor.....</b>	<b>14</b>
i. Componente afetivo-motivacional da dor .....	15
ii. Distúrbios afetivos e dor neuropática.....	17
<b>II. Objetivos .....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivos e considerações metodológicas .....</b>	<b>23</b>

<b>III. Materiais e métodos .....</b>	<b>27</b>
<b>1. Animais .....</b>	<b>27</b>
<b>2. Modelos de dor neuropática.....</b>	<b>28</b>
i. Neuropatia metabólica: indução do modelo STZ.....	28
ii. Modelo de neuropatia traumática: cirurgia <i>spared nerve injury</i> (SNI) .....	30
<b>3. Avaliação comportamental: testes nociceptivos.....</b>	<b>32</b>
i. Teste de <i>von Frey</i> .....	32
ii. Teste de <i>hot plate</i> .....	33
<b>4. Avaliação comportamental: testes de ansiedade e/ou depressão.....</b>	<b>34</b>
i. Teste de <i>open field</i> .....	35
ii. Teste de <i>elevated plus maze</i> .....	36
iii. Teste de <i>marble burying</i> .....	36
iv. Teste de <i>forced swimming</i> .....	37
<b>5. Sacrifícios dos animais.....</b>	<b>39</b>
<b>6. Imunodeteção das formas fosforiladas das ERKs (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinases</i>) .....</b>	<b>39</b>
<b>7. Análise estatística .....</b>	<b>41</b>
<b>IV. Resultados .....</b>	<b>43</b>
<b>1. Modelo de neuropatia metabólica STZ.....</b>	<b>43</b>
i. Monitorização dos pesos e glicemias .....	43
<b>2. Avaliação nociceptiva .....</b>	<b>44</b>
i. Test de <i>von Frey</i> .....	44
ii. Teste de <i>hot plate</i> .....	44
<b>3. Avaliação de ansiedade e/ou depressão.....</b>	<b>46</b>
i. Teste de <i>open field</i> .....	46

ii.	Teste de <i>elevated plus maze</i> .....	46
iii.	Teste de <i>marble burying</i> .....	47
iv.	Teste de <i>forced swimming</i> .....	47
<b>4.</b>	<b>Modelo de neuropatia traumática: spared nerve injury (SNI).....</b>	<b>48</b>
i.	Monitorização dos pesos.....	48
i.	Teste de <i>von Frey</i> .....	48
a)	Limiar de resposta .....	48
b)	Frequência de resposta.....	49
<b>5.</b>	<b>Avaliação de ansiedade e/ou depressão.....</b>	<b>51</b>
i.	Teste de <i>open field</i> .....	51
ii.	Teste de <i>elevated plus maze</i> .....	51
iii.	Teste de <i>marble burying</i> .....	52
iv.	Teste de <i>forced swimming</i> .....	52
v.	pERKs.....	53
<b>6.</b>	<b>Efeito dos testes de nocicepção nos testes de ansiedade e/ou depressão .....</b>	<b>54</b>
i.	Teste de <i>open field</i> .....	54
ii.	Teste de <i>elevated plus maze</i> .....	54
iii.	Teste de <i>marble burying</i> .....	55
iv.	Teste de <i>forced swimming</i> .....	55
<b>V.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>57</b>
<b>VI.</b>	<b>Conclusão e perspectivas futuras.....</b>	<b>71</b>
<b>VII.</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>73</b>
<b>Apêndice:</b>	<b>composição das soluções .....</b>	<b>83</b>



## Abreviaturas

**ACC:** Córtex cingulado anterior (do inglês, *anterior cortex cingulate*)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AMYG:** Amígdala (do inglês *amygdala*)

**ATP:** Adenosina tri-fosfato

**CCI:** Modelo de constrição crónica (do inglês *chronic constriction injury*)

**CGRP:** Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (do inglês *calcitonin gene related peptide*)

**CMS:** Modelo de *stress* crónico (do inglês *chronic model stress*)

**CTR:** Controlo

**DRt :** núcleo reticular dorsal (do inglês *dorsal reticular nucleus*)

**DM:** Diabetes *mellitus*

**ERKs:** sinais extracelulares regulados pelas cinases 1/ 2 (do inglês *extracellular signal-regulated kinases*)

**EPM:** Teste da plataforma elevada (do inglês *elevated plus maze*)

**FST:** Teste da natação forçada (do inglês *forced swimming test*)

**GABA:** ácido  $\gamma$ -aminobutírico (do inglês  *$\gamma$ -aminobutyric acid*)

**IASP:** Associação internacional para o estudo da dor (do inglês *International Association for the study of the pain*)

**IC:** Córtex insular ( do inglês *insular cortex*)

**STZ:** Streptozotocina

**LC:** *Locus coeruleus*

**NA:** Noradrenalina

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina

**NGF:** Factor de crescimento nervoso (do inglês *nerve growth factor*)

**NMDA:** N-metil-D-aspartato

**PAG:** Substância cinzenta periaqueductal (do inglês *grey periaqueductal substance*)

**PFC:** Córtex pré-frontal (do inglês pre-frontal córtex)

**SI :** Córtex somatossensitivo primário

**SII:** Córtex somatossensitivo secundário

**SNC:** Sistema nervoso central

**SNI:** do inglês *spared nerve injury*

**SNP:** Sistema nervoso periférico

**SP:** Substância P (do inglês *substance p*)

**RVM:** Medula rostroventromedial (do inglês rostral ventromedial medulla)



## Lista de Figuras

FIGURA I- REPRESENTAÇÃO DO PROCESSAMENTO FISIOLÓGICO DA DOR. ....	3
FIGURA II- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS DE MODULAÇÃO DA DOR. ....	4
FIGURA III- ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DOS MECANISMOS DO STZ. ....	12
FIGURA IV- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA A) NERVO SAFENO E RAMOS TIBIAL, PERONEAL COMUM E SURAL DO NERVO CIÁTICO .....	14
FIGURA V- DIAGRAMA REPRESENTATIVO DE ALGUNS ASPETOS NEGATIVOS QUE PERPETUAM O CICLO DA DOR	15
FIGURA VI- FATORES QUE INTERVÊM NA EXPERIÊNCIA DOLOROSA DE ACORDO COM AS VÁRIAS COMPONENTES DA DOR .....	16
FIGURA VII- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CASCATA DE ATIVAÇÃO DAS ERKs 1/ 2. ....	19
FIGURA VIII- ILUSTRAÇÃO DE 5 ESTADOS COMPORTAMENTAIS DIFERENTES EM RATINHO. ....	28
FIGURA IX- MECANISMO DE AÇÃO DA ESTREPTOZOTOCINA (STZ) NO PROTOCOLO DE INDUÇÃO DO MODELO EM RATINHO .....	29
FIGURA X- ESQUEMATIZAÇÃO DA CRONOLOGIA DE TESTES COMPORTAMENTAIS NO MODELO STZ.....	30
FIGURA XI- REPRESENTAÇÃO EXEMPLIFICATIVA DO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DA CIRURGIA SPARED NERVE INJURY .....	31
FIGURA XII- CRONOLOGIA DOS TESTES COMPORTAMENTAIS REALIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO E COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E/OU DEPRESSÃO NO MODELO SNI. ....	32
FIGURA XIII- FOTOGRAFIAS ILUSTRATIVAS DOS TESTES DE NOCICEPÇÃO <i>VON FREY</i> E <i>HOT PLATE</i> . ....	34
FIGURA XIV- ESQUEMATIZAÇÃO DA CRONOLOGIA DE TESTES COMPORTAMENTAIS REALIZADOS NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS CTR (N=4) E NAÏVE-SEM NOC. (N=7). ....	35
FIGURA XV- FOTOGRAFIAS ILUSTRATIVAS DA EXECUÇÃO DOS TESTES DE ANSIEDADE. ....	37
FIGURA XVI- FOTOGRAFIA REPRESENTATIVA DO TESTE <i>FORCED SWIMMING</i> . ....	38
FIGURA XVII- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CORTES REPRESENTATIVOS DO ACC E AMYG .....	41
FIGURA XVIII- EVOLUÇÃO DOS PESOS E GLICEMIAS DOS ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL USADO PARA CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DO MODELO STZ EM RATINHO .....	43
FIGURA XIX- EVOLUÇÃO DA ALODÍNIA MECÂNICA E HIPERALGESIA A ESTÍMULOS TÉRMICOS QUENTES AO LONGO DO TEMPO .....	45

FIGURA XX- DISTÂNCIA PERCORRIDA NO TESTE DE <i>OPEN FIELD</i> PELOS ANIMAIS DO SEGUNDO GRUPO EXPERIMENTAL USADO PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DA NOCICEÇÃO E COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO .....	46
FIGURA XXI- PERCENTAGEM DE TEMPO DE PERMANÊNCIA NAS DIFERENTES ÁREAS DA PLATAFORMA NO TESTE <i>ELEVATED PLUS MAZE</i> . DOS ANIMAIS DO SEGUNDO GRUPO EXPERIMENTAL USADO PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DA NOCICEÇÃO E COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO .....	46
FIGURA XXII- NÚMERO DE BERLINDES ESCONDIDOS NO TESTE DE <i>MARBLE BURYING BURYING</i> PELOS ANIMAIS DO SEGUNDO GRUPO EXPERIMENTAL USADO PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DA NOCICEÇÃO E COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO .....	47
FIGURA XXIII- TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE <i>FORCED SWIMMING</i> DOS ANIMAIS DO SEGUNDO GRUPO EXPERIMENTAL USADO PARA AVALIAÇÃO SIMULTÂNEA DA NOCICEÇÃO E COMPORTAMENTOS DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO .....	47
FIGURA XXIV EVOLUÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS SNI AO LONGO DO PERÍODO EXPERIMENTAL .....	48
FIGURA XXV- LIMIAR DE RESPOSTA A ESTÍMULOS MECÂNICOS AVALIADO PELO TESTE DE VON FREY NO GRUPO SNI .....	49
FIGURA XXVI- FREQUÊNCIA DE RESPOSTA À APLICAÇÃO DOS FILAMENTOS DE <i>VON FREY</i> NO GRUPO SNI .....	50
FIGURA XXVII- DISTÂNCIA PERCORRIDA AVALIADA PELO TESTE DE <i>OPEN FIELD</i> .....	51
FIGURA XXVIII- PERCENTAGEM DE TEMPO DE PERMANÊNCIA NAS DIFERENTES ÁREAS DA PLATAFORMA USADA NO TESTE <i>ELEVATED PLUS MAZE</i> .....	51
FIGURA XXIX- NÚMERO DE BERLINDES ESCONDIDOS TESTE <i>MARBLE BURYING</i> .....	52
FIGURA XXX- TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE <i>FORCED SWIMMING</i> .....	52
FIGURA XXXI- NÚMERO DE CÉLULAS IMUNORREATIVAS PARA PERK1/2 NO ACC E NAAMYG DE ANIMAIS <i>SHAM</i> OU SNI.....	53
FIGURA XXII- DISTÂNCIA PERCORRIDA PELOS ANIMAIS NO TESTE DE <i>OPEN FIELD</i> .....	54
FIGURA XXIII- PERCENTAGEM DE TEMPO DE PERMANÊNCIA NAS DIFERENTES ÁREAS DA PLATAFORMA USADA NO TESTE <i>ELEVATED PLUS MAZE</i> .....	54
FIGURA XXXIV- NÚMERO DE BERLINDES ESCONDIDOS NO TESTE <i>MARBLE BURYING</i> .....	55
FIGURA XXXV- TEMPO DE IMOBILIDADE NO TESTE DE <i>FORCED SWIMMING</i> .....	55

## **I. Introdução**

### **1. Dor**

#### **i. Definição da dor**

Em 1986, a Associação Internacional para o Estudo da Dor ou IASP (do inglês *International Association for the Study of the Pain*) definiu a dor como sendo “uma experiência multidimensional desagradável, envolvendo não só uma componente sensorial, mas também uma componente emocional e que se associa uma lesão tecidual concreta ou potencial sendo descrita em função dessa lesão” (Merskey, 1994). Esta definição indica que a dor é um fenómeno multifacetado, cujo processamento pode ser dissociado em várias dimensões, nomeadamente emocional e sensorial. A dimensão emocional relaciona-se com o facto de a dor ser uma experiência subjetiva, individual, interpretada de acordo com motivações e experiências pessoais, sendo inegável o sofrimento, quer físico quer emocional, inerente à mesma (R. Melzack, 2001). Na sua dimensão sensorial, os sistemas sensitivos de perceção e modulação da dor têm como principal função evitar ou minimizar lesões (Le Bars, Gozariu, & Cadden, 2001). Contudo, nem toda a sensação dolorosa apresenta uma função protetora, podendo por vezes ser incapacitante (Woolf & Mannion, 1999). Em alguns casos, a dor está também associada a processos de plasticidade neuronal que levam a mudanças responsáveis pelo desenvolvimento de dor crónica, a qual por si só é uma doença (Fornasari, 2012).

A definição da IASP foi reformulada de forma a poder ser aplicada a animais, como sendo “uma experiência sensorial aversiva derivada de uma lesão concreta ou potencial que provoca reações motoras e vegetativas progressivas, resultando em comportamentos de evasão e podendo modificar o comportamento específico das espécies, incluindo o comportamento “social” (Zimmermann 1986).

#### **ii. Vias de transmissão e modulação da dor**

De uma forma sintética, o processamento da dor depende de vias de transmissão sinalizadoras e moduladoras ativadas perante estímulos nócicos, e da conexão através dessas vias entre os sistemas nervosos periférico e central (Ossipov, Dussor, & Porreca, 2010).

No sistema nervoso periférico, as fibras A $\beta$ , A $\delta$  e C dos neurónios aferentes primários, cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios raquidianos (ou DRGs, do inglês *dorsal root ganglia*; (Figura I,b) e trigeminais, são responsáveis pela inervação de tecidos cutâneos, osso, músculo, tecido conjuntivo, vasos e vísceras (Lawson, 2002; Ossipov et al., 2010). Estas fibras podem ser classificadas segundo os seus alvos periféricos, velocidade de condução, propriedades de resposta e fenótipo neuroquímico (Todd, 2010). As fibras A $\beta$  são muito mielinizadas e em situações normais conduzem unicamente estímulos mecânicos não nódicos (Figura I a,b) (Ossipov et al., 2010). As fibras A $\delta$  são finamente mielinizadas, transmitindo conseqüentemente estímulos a maior velocidade, e têm como principal neurotransmissor o glutamato (Figura I a,b). As fibras C não são mielinizadas, conduzindo estímulos lentamente, e libertam substância P (SP, do inglês *substance P*) e peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP, do inglês *calcitonin gene related peptide*) entre outros neurotransmissores (Basbaum, Bautista, Scherrer, & Julius, 2009) (Figura I a,b). As fibras A $\delta$  e C são responsáveis pela deteção e transmissão de estímulos nódicos mecânicos, químicos e térmicos a neurónios do corno dorsal da medula espinhal (Figura I, b).

No sistema nervoso central, os neurónios do corno dorsal da medula espinhal também denominados neurónios de segunda ordem (Figura I, b), que recebem informação nociceptiva das fibras A $\delta$  e C, transmitem por sua vez esta informação nociceptiva para núcleos do tálamo lateral (*i.e.* núcleos ventral posterolateral e ventral posteromedial) através da via ascendente espinho-talâmica lateral, para núcleos do tálamo medial, através da via espinho-talâmica medial, e para núcleos do tronco cerebral (*i.e.* núcleos da ponte, formação reticular e substância cinzenta periaqueductal ou PAG (do inglês, *periaqueductal grey area*) através das vias espinho-mesencefálica e espinho-reticular. Do tálamo lateral o impulso nervoso converge para o córtex sensitivo primário onde é percebida a informação relativa à localização, qualidade, duração e intensidade da dor. O tálamo medial e alguns núcleos do tronco cerebral estabelecem conexões com áreas límbicas e corticais, incluindo o córtex pré-frontal (PFC, do inglês *prefrontal cortex*), córtex cingulado anterior (ACC, do inglês *anterior cingulate cortex*), córtex insular (IC, do inglês, *insular cortex*), córtices somatossensitivo primário (SI) e secundário (SII) e a amígdala (AMYG, do inglês *amygdala*) (Fornasari, 2012; Yalcin et al., 2011)(figura I c). Estas áreas encefálicas mais rostrais são responsáveis pela codificação e integração multidimensional da dor (Grace et al., 2014).

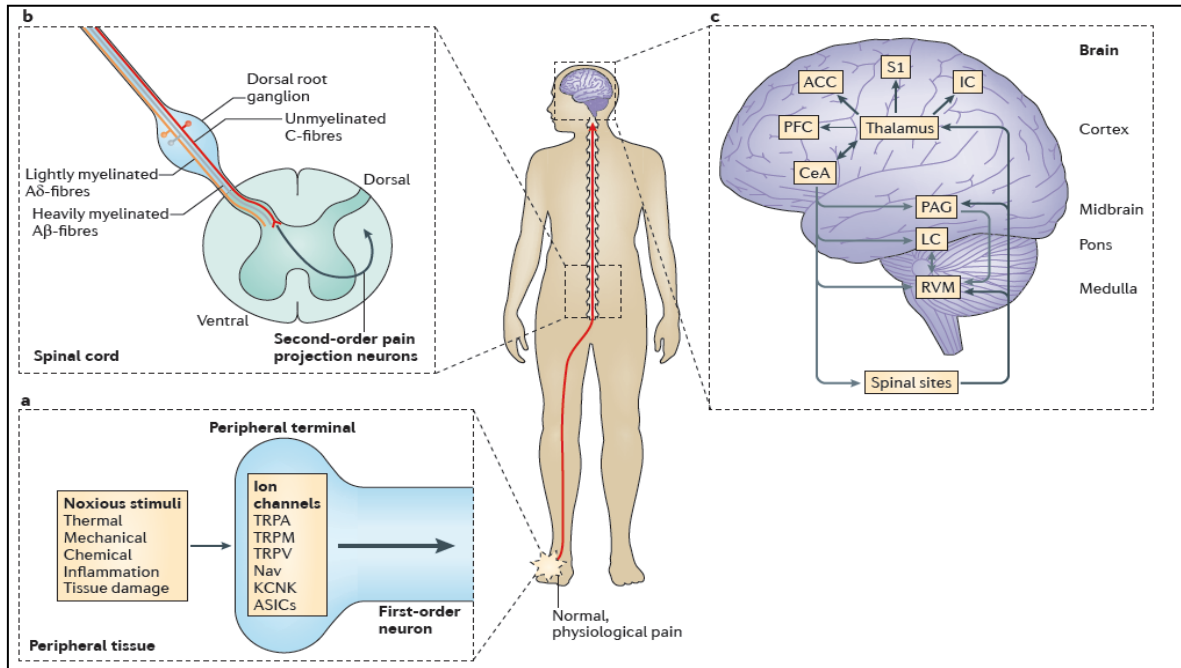


Figura I- Representação do processamento fisiológico da dor. a) Os estímulos nódicos são transmitidos a partir da periferia por neurónios aferentes de 1ª ordem associados a canais iónicos. A ativação desses canais conduz à despolarização da membrana e assim o estímulo externo, que pode ser mecânico, térmico ou químico, é transduzido em potenciais de ação. b) Os potenciais de ação são transmitidos para o corno dorsal da medula espinal através de fibras Aδ e fibras C. A informação é transmitida para o tronco cerebral e núcleos talâmicos via neurónios de 2ª ordem. c). A dor resulta da ativação de várias estruturas supraespinhais. A informação dos neurónios de 2ª ordem é transmitida a regiões corticais e subcorticais (setas pretas) nomeadamente ao córtex somatossensitivo 1 (S1), córtex cingulado anterior (Porro et al.), amígdala (CeA), córtex insular (IC) e córtex pré-frontal (PFC). Diversas áreas encefálicas contribuem para a modulação descendente da dor (setas cinzentas), tais como a substância cinzenta periaquedutal (Porro et al.), *locus coeruleus* (LC) e a medula rostroventromedial (RVM) (ver também figura II) TRPA, TRPM, TRPV – são canais iónicos designados de TRP (*do inglês transient receptor potential*; TRPA- recetor de potencial transitório de anquinina; TRPM-recetor de potencial transitório da melatatina; TRPV- recetor de potencial transitório vaniloide; Nav-canais de sódio acoplados a voltagem (*do inglês voltage-gated sodium channels*); KCNK – subtipos de canais de potássio acoplados a voltagem; ASICs – canais iónicos sensíveis a ácido (*do inglês acid-sensing ion channels*). Adaptado de Grace, Hutchinson, Maier & Watkins, 2014.

A chegada da informação ao córtex despoleta a ativação de outras áreas supraespinhais que projetam para o corno dorsal da medula espinal através de vias descendentes específicas. No corno dorsal, os terminais dos neurónios provenientes dessas áreas supraespinhais modulam a transmissão da informação nociceptiva dos aferentes primários para os neurónios de 2ª ordem. Este tipo de ação é especificamente designada de modulação descendente (Ossipov et al., 2010). As áreas envolvidas na modulação descendente

incluem a PAG (Porro et al.) e vários núcleos do tronco cerebral nomeadamente a medula rostroventromedial (RVM, do inglês *rostromedial medulla*), *locus coeruleus* e neurónios noradrenérgicos dos grupos A<sub>5</sub> e A<sub>7</sub> (Figura I c e Figura II). O envolvimento da PAG na modulação descendente é mediado via projeções desta para os núcleos do tronco cerebral, que a PAG usa como estações de retransmissão, nomeadamente o RVM, uma vez que não projeta diretamente para a medula. A ativação destas regiões do tronco induz a libertação de variadas substâncias neuromoduladoras (*i.e.* noradrenalina, serotonina, opióides e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, do inglês *gamma-aminobutyric acid*), no corno dorsal da medula espinal resultando na inibição ou facilitação da transmissão nociceptiva (Grace et al., 2014).

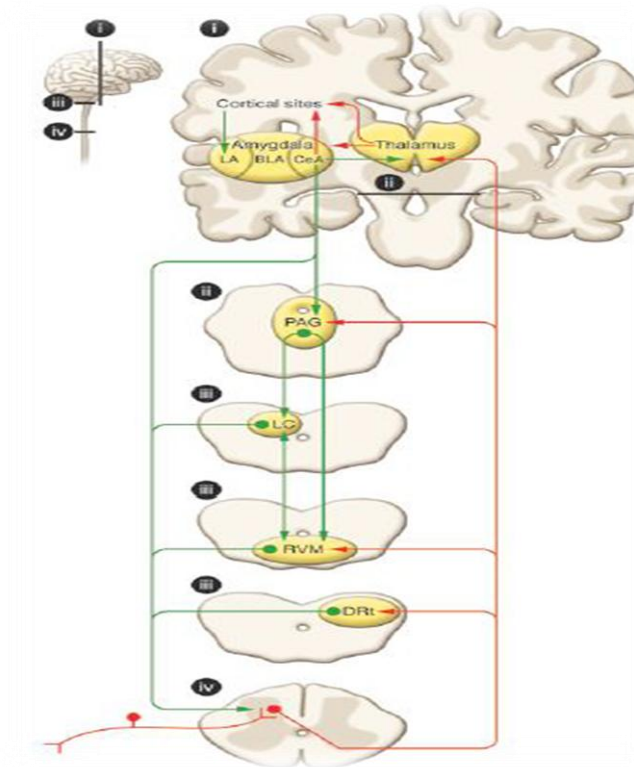


Figura II-Representação esquemática das vias de modulação da dor. A informação nociceptiva da periferia é transmitida por neurónios aferentes primários até à medula espinal. A informação ascende até ao tálamo e via projeções colaterais chega até ao DRt, RVM e PAG (linhas vermelhas). A conexão entre o tálamo, áreas corticais e a amígdala funcionam como um gatilho para o início da modulação descendente da dor. As vias da modulação descendente projetam para a PAG, que comunica com o RVM e o LC e ambas geram a transmissão da dor para a medula espinal. BLA-amígdala basolateral; CeA-núcleo central da amígdala; DRt-núcleo reticular dorsal; LA- amígdala lateral; LC-locus *coeruleus*; PAG-substância cinzenta periaqueductal; RVM-medula rostroventromedial. Adaptado de Ossipov, Dussor & Porreca, 2010.

### iii. Tipos de dor

A dor pode ser classificada mediante vários critérios, de acordo com a sua localização, etiologia e duração, entre outros aspetos. No que respeita à sua etiologia, a dor pode ser classificada em **nociceptiva** (aguda ou inflamatória) ou **neuropática**.

A **dor nociceptiva** é definida como uma dor resultante da ativação dos nociceptores em tecido não neuronal (Merskey, 1994). Resulta da ativação transitória de nociceptores com limiar elevado presentes na pele, vísceras ou outros tecidos, por estímulos nódicos de elevada intensidade (*e.g.* exposição a calor e frio excessivos, picada forte, corte profundo, queimadura) (Woolf, 2010). Designa-se esta ativação por nocicepção, a qual induz uma resposta motora que tem como objetivo prevenir ou interromper a exposição ao estímulo lesivo de forma que esta não dure mais do que alguns segundos (Mark J. Millan, 1999). Assim, a dor nociceptiva funciona como um sistema de alerta e por isso apresenta um papel fisiológico de extrema importância para a integridade do organismo. Normalmente ocorre por um curto período de tempo, sendo nesse caso classificada quanto a sua duração como uma **dor aguda**. No entanto quando não é possível evitar o dano tecidual, existem mecanismos celulares e moleculares, inicialmente ativados pelo sistema imunitário, que promovem uma sensação dolorosa no local afectado, de maneira a dissuadir o contacto com o estímulo e a permitir a regeneração e recuperação do tecido afetado (Woolf, 2010). Neste caso, estamos na presença de uma **dor inflamatória**, que pode permanecer por horas a dias, cessando após recuperação do tecido. A dor inflamatória resulta da ativação do sistema imune após trauma, cirurgia ou no decorrer de doenças inflamatórias sendo desta forma incluída pela IASP na definição de dor nociceptiva. Na dor inflamatória verifica-se um aumento da percepção a estímulos nódicos na área afectada ou na região adjacente (hiperalgesia primária ou secundária, respetivamente), assim como o surgimento de dor provocada por estímulos inócuos (alodínia) e dor espontânea (M. J. Millan, 1999). Se a causa que lhe deu origem cessar e houver total recuperação do dano tecidual (*e.g.* na cicatrização de uma laceração cutânea) esta dor tem uma evidente componente aguda (dor inflamatória aguda). No entanto, se for muito prolongada, pode levar a alterações plásticas no sistema nervoso periférico e central que vão contribuir para perpetuar a condição dolorosa. Neste caso, é classificada quanto à sua duração como **dor crónica** (dor crónica inflamatória), pois é uma experiência fisiológica de longa duração, tónica, persistente e patológica.

A **dor neuropática** é definida pela IASP como sendo causada por lesão ou disfunção do sistema somatossensitivo nervoso periférico ou central (Merskey, 1994) e é caracterizada por hipersensibilidade a estímulos nódicos (hiperalgesia) e inócuos (alodínia) e por dor espontânea associadas a mudanças patológicas no sistema nervoso central (SNC) ou no sistema nervoso periférico (SNP) (Woolf, 2010). Contrariamente à dor com origem inflamatória, que pode ser aguda ou crónica, a dor de etiologia neuropática é sempre uma experiência de longa duração e por isso crónica. Tal como já mencionado, a dor aguda resulta da capacidade inata de perceção da dor, conduzindo o corpo a um estado de alerta eminente que permite ao indivíduo reagir e minimizar as lesões existentes. Porém, quando a dor é crónica torna-se prejudicial, não conferindo desta forma nenhuma vantagem biológica (Woolf & Mannion, 1999) e é por isso patológica. A dor crónica é um dos maiores problemas de saúde no mundo, representando elevados custos sócio-económicos e na qualidade de vida dos doentes e dos seus familiares. Estima-se que afete aproximadamente 20% da população europeia, particularmente mulheres e idosos (Breivik, Collett, Ventafridda, Cohen, & Gallacher, 2006), e em Portugal é estimado que afete cerca de 37% da população (Azevedo, Costa-Pereira, Mendonca, Dias, & Castro-Lopes, 2012).

Considera-se ainda como um diferente tipo de dor a dor disfuncional, habitualmente caracterizada por ter etiologia desconhecida e por também ser patológica. A dor disfuncional resulta de um processo amplificador autónomo do sinal nociceptivo, intrínseco ao organismo, onde a dor ocorre na ausência de processos inflamatórios ou lesões do sistema nervoso diagnosticados (*i.e.* que sejam conhecidos), resultando numa dor que não confere qualquer valor biológico de proteção, reparação ou cicatrização: são exemplos a fibromialgia, síndrome do cólon irritável e o síndrome da fadiga crónica. Estas síndromes dolorosas apesar de não terem uma etiologia conhecida, nem estarem completamente esclarecidos os mecanismos envolvidos, sabe-se que resultam da disfunção do sistema somatossensitivo (Tavel, 2015).

## 1. Dor neuropática

### i. Fisiopatologia

A dor neuropática está associada a lesões de natureza traumática (*i.e.* amputação, compressão (Buonocore, 2015)) metabólica (*i.e.* diabetes *mellitus*), imunológica (*i.e.* esclerose múltipla), infecciosa (*i.e.* herpes *zoster*), oncológica ou até mesmo farmacológica (*i.e.* quimioterapia (Cohen & Mao, 2014; Woolf & Mannion, 1999)). Nestas patologias, os eventos descritos como sendo responsáveis pelo desenvolvimento de dor neuropática resultam de disfunções do sistema nervoso periférico e/ou central (Woolf & Mannion, 1999).

No sistema nervoso periférico estão descritas várias alterações associadas a lesões dos nervos periféricos que resultam principalmente num aumento da condução nervosa (Mark J. Millan, 1999). Uma dessas alterações consiste, por exemplo, na libertação, por macrófagos ativados, mastócitos, neutrófilos e pelas células de *Schwann*, de moléculas durante processos de reparação do tecido nervoso. Incluem-se nestas moléculas mediadores inflamatórios, citocinas (*i.e.* interleucinas, factor de necrose tumoral  $\alpha$ , interferão  $\gamma$ , factor de transformação  $\beta$ ) e fatores de crescimento para a regeneração nervosa tal como o factor de crescimento nervoso ou NGF (do inglês, *nerve growth factor*). O NGF aumenta a síntese e libertação de neuropeptídeos, como a SP e o CGRP, nas terminações nervosas centrais e periféricas dos aferentes primários (Moalem & Tracey, 2006; Thacker, Clark, Marchand, & McMahon, 2007). Este microambiente inflamatório desencadeia um estado de hiperexcitabilidade nos nociceptores aferentes primários denominado de sensibilização periférica (Dworkin et al., 2003). Esta sensibilização periférica é responsável pelo facto dos recetores nociceptivos das fibras C passarem a responder a estímulos mecânicos e térmicos, normalmente inócuos, e apresentarem atividade espontânea. Esta mudança pode também ocorrer ao nível das fibras A $\beta$  e A $\delta$  (Galluzzi, 2005; Gilron, Watson, Cahill, & Moulin, 2006). A atividade espontânea/ectópica das fibras C parece estar relacionada também com a modificação da permeabilidade das membranas neuronais, assim como com o aumento do número e atividade dos canais de Na<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, na zona de regeneração e nos gânglios sensitivos (Galluzzi, 2005).

Outra alteração que ocorre após lesão de nervos periféricos é a proliferação de fibras nervosas que ocorre de forma pouco organizada na porção proximal (que fica em contacto com o corpo celular) à secção traumática do nervo, dando origem a uma massa a se dá o

nome de neuroma. Mudanças ao nível da mielinização pelas células de Schwann em fibras degeneradas e nos neuromas recém-formados vão ser também responsáveis pela indução cruzada de despolarizações nas células vizinhas induzindo excitação de fibras C, A $\beta$  e A $\delta$  intactas, que passam a responder a estímulos de menor intensidade (Galluzzi, 2005).

A nível central, os neurónios do corno dorsal da medula espinhal inervados pelos nociceptores afetados sofrem também alterações funcionais importantes designadas genericamente como sensibilização central (Dworkin et al., 2003). Foram descritos vários mecanismos associados à sensibilização central. Um desses mecanismos envolve o aumento da expressão de canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem (nomeadamente da subunidade  $\alpha$ -2- $\delta$ ) nos nociceptores afetados, o que acarreta a entrada de cálcio nesses nervos provocando a libertação de SP e glutamato, e leva ao aumento a nível sináptico da transmissão do estímulo nociceptivo aos neurónios de 2<sup>a</sup> ordem no corno dorsal. Outros mecanismos incluem desorganização sináptica, ampliação da distribuição espacial das terminações aferentes intatas nos locais da lesão (através do desenvolvimento de novas terminações, principalmente de tipo A $\beta$ ), das quais resulta um aumento dos campos receptivos e condução de estímulos inócuos. A desregulação da expressão de recetores de vários neurotransmissores nos neurónios de 2<sup>a</sup> ordem, como por exemplo recetores de opióides, GABA, SP, CGRP e glutamato, essenciais para regular a excitabilidade desses neurónios, é também responsável pelo fenómeno de sensibilização central (Gilron et al., 2006).

A nível supraespinhal, as alterações observadas estão relacionadas com hiperatividade neuronal segmentar e modificação do padrão de chegada dos estímulos sensitivos ao tálamo. Foram sugeridas alterações na região ventral posterior do tálamo, com aumento da atividade neuronal, envolvendo ações excitatórias mediadas pelo aspartato e glutamato nos recetores N-metil-D-aspartato (NMDA). Fisiopatologicamente, esta região é a estrutura com disfunções mais importantes mesmo em lesões extratalâmicas (Vissers, 2006). Supõe-se também que haja uma hipoativação das vias descendentes inibitórias, desimpedindo a transmissão do estímulo nociceptivo, o que terá grande influência na génese da dor neuropática periférica e central (Dworkin et al., 2003). Estas vias descendentes de modulação da atividade neuronal na medula espinhal dependem em grande parte dos sistemas opioidérgico, noradrenérgico e serotoninérgico.

Os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico têm como neurotransmissores a noradrenalina (NA) e a serotonina (5-HT), respetivamente, que se sabe terem um papel crucial no

processamento da dor. De facto, alguns estudos demonstraram que as projeções serotoninérgicas do núcleo da rafe para a medula espinhal interferem na plasticidade neuronal em resposta à dor neuropática (Porreca, Ossipov, & Gebhart, 2002). Estes neurotransmissores apresentam um papel bidirecional, podendo exercer quer efeitos inibitórios da transmissão da dor, quer excitatórios ao facilitarem a sua propagação para as regiões supraespinhais, dependendo dos recetores em que atuam na medula espinhal (Dogrul, Ossipov, & Porreca, 2009; Ossipov et al., 2010). Com efeito, vários estudos demonstraram efeitos inibidores da serotonina por ligação a recetores 5-HT 1 e 5-HT 7 (Dogrul et al., 2009; Vanegas & Schaible, 2004) enquanto a ligação ao receptor 5-HT 3 provoca a excitação neuronal (Dogrul et al., 2009). Também o sistema noradrenérgico tem sido alvo de vários estudos, nomeadamente ao nível do envolvimento dos recetores adrenérgicos- $\alpha_2$  e do seu papel na inibição da dor (Ossipov et al., 2010; Pertovaara, 2006).

## **ii. Tratamento da dor neuropática**

As abordagens farmacológicas atualmente utilizadas, embora promovam o alívio da sintomatologia dolorosa numa grande parte dos indivíduos, não são eficazes, uma vez que em cerca de 50% dos indivíduos a analgesia obtida é parcial (Dworkin et al., 2010). Outro problema associado são os efeitos adversos causados pelos fármacos (Dworkin et al., 2010) devidos às dosagens elevadas necessárias para obtenção de alívio da dor (O'Connor & Dworkin, 2009).

O grupo de estudo para a dor neuropática NeuPSIG (do inglês, *Neuropathic Pain Special Interest Group*) da IASP aponta como terapêutica farmacológica de primeira linha vários fármacos. Estes fármacos incluem antidepressivos, anticonvulsivantes e lidocaína. Em episódios de dor neuropática exacerbada e na dor neuropática associada a doença oncológica (O'Connor & Dworkin, 2009) são também administrados em primeira linha agonistas opiáceos tais como a morfina e oxicodona. As aminas secundárias dos antidepressivos tricíclicos (*i.e.* nortriptilina e desipramina), assim como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina (*i.e.* duloxetina, venlafaxina, milnacipran) atuam aumentando a ação das vias descendentes inibitórias no corno dorsal da medula espinhal diminuindo assim a sensibilização periférica e central (Dworkin et al., 2007; Stillman, 2006). Os anticonvulsivantes (*i.e.* gabapentina e pregabalina e carbamazepina) atuam ao nível da hiperexcitabilidade neuronal nomeadamente através do aumento dos efeitos inibitórios do GABA e diminuição da transmissão excitatória

glutaminérgica (Namaka et al., 2004; Stillman, 2006). A lidocaína tópica é usada como anestésico local atuando ao nível dos neurónios periféricos, bloqueando os impulsos ectópicos (de Leon-Casasola, 2011).

Como abordagem terapêutica de segunda linha as normas da NeuPSIG recomendam o tramadol que é um agonista fraco dos receptores opióides  $\mu$  que inibe também a recaptação da serotonina e da noradrenalina. São recomendados também outros agonistas opiáceos.

Alguns estudos apoiam os benefícios de incluir também na abordagem terapêutica outro tipo de intervenções como a prática regular de atividade física e fisioterapia, estimulação nervosa elétrica transcutânea e terapia comportamental cognitiva ou psicoterapia de suporte (Closs, Staples, Reid, Bennett, & Briggs, 2007; Gilron et al., 2006; Leo & Latif, 2007).

## **2. Modelos animais de dor neuropática**

O estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dor neuropática faz-se recorrendo a modelos experimentais animais, maioritariamente em roedores (Barrot, 2012). Os modelos experimentais usados atualmente recorrem a tratamento com fármacos para indução de neuropatia metabólica ou relacionada com quimioterapia, e lesões de nervos periféricos para indução de neuropatias traumáticas (Colleoni & Sacerdote, 2010). Os modelos animais mais usados são os de neuropatia metabólica e traumática (Bridges, Thompson, & Rice, 2001; Niederberger, Kuhlein, & Geisslinger, 2008).

### **i. Modelos animais de neuropatia metabólica**

A neuropatia metabólica mais comum e frequentemente associada à dor crónica é a neuropatia diabética. Esta tem sido mimetizada com recurso a modelos experimentais animais que consistem na indução da diabetes *mellitus* tipo 1 (DM), condição em que não é produzida insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas, ou tipo 2, associada à síndrome metabólica no Humano. Na literatura encontram-se descritos diferentes modelos, que podem resultar de alterações genéticas ou manipulações cirúrgicas, dietéticas ou químicas. Há muitas estirpes de roedores com alterações genéticas conducentes à DM tipo 1, que podem ser espontâneas, como é o caso das estirpes mutantes de ratinhos diabéticos não-obesos (NOD) e ratos BB (do inglês *biobreding rats*), ou provocadas (estirpes de animais transgênicos, *knock out* ou outros) (Gao & Zheng, 2014; Tesch & Allen, 2007).

Quanto aos modelos dietéticos são baseados principalmente em dietas específicas hiper-calóricas com altos teores de sacarose e de gorduras, induzindo um aumento percentual da gordura corporal (aumento do colesterol plasmático), diminuição da tolerância à glucose, resistência à insulina e à leptina e hiperinsulinémia (Gao & Zheng, 2014). Estes modelos mimetizam a DM tipo 2 associada à síndrome metabólica no Humano e requerem tempos de experiência prolongados devido à dieta específica, pelo que em alguns casos se desenvolveram modelos que associam a dieta hiper-calórica à administração de químicos como a estreptozotocina (STZ) para acelerar o processo de indução da diabetes (Gao & Zheng, 2014).

Relativamente aos modelos induzidos quimicamente são muitas vezes escolhidos por apresentarem uma boa relação utilização/custo. Apresentam como vantagem adicional, o facto de serem aplicáveis à maioria das espécies animais de laboratório sendo fácil comparar aos controlos respetivos. Atualmente o Aloxano e a STZ são os produtos químicos diabetogénicos mais utilizados para induzir a DM, sendo injetados por via intraperitoneal (i.p). São análogos citotóxicos da glucose que atuam nas células  $\beta$ -pancreáticas produtoras de insulina causando a sua destruição seletiva e induzindo desta forma DM tipo 1, mas a sua toxicidade é conseguida através de vias diferentes. A ação diabetogénica da STZ é causada pela necrose das células  $\beta$  do pâncreas. Esta nitrosoamida é também frequentemente utilizada como agente quimioterápico no tratamento de neoplasias/metástases do pâncreas (R. A. Bennett & Pegg, 1981). Existem variações deste modelo dependendo do objetivo do estudo e espécie animal a manipular, nomeadamente relativamente à dosagem e ao número de administrações de STZ (Gao & Zheng, 2014; King, 2012). Este modelo reproduz dor crónica associada à neuropatia diabética e apresenta como sintomatologia associada hiperalgesia térmica e mecânica e alodínia térmica e mecânica.

**a) Mecanismo de ação da STZ**

A STZ é uma glucosamina-nitrosourea produzida pelo *Streptomyces achromogenes* que possui no carbono 2 um grupo nitrosourea. Sendo um análogo da glucose é transportada para o interior das células  $\beta$ -pancreáticas através de transportadores de glucose do tipo 2 (GLUT2) (Lenzen, 2008). Como consequência, outros órgãos que expressam GLUT2 (como o fígado e os rins) vão estar suscetíveis à toxicidade indesejável do STZ (Weiss, 1982).

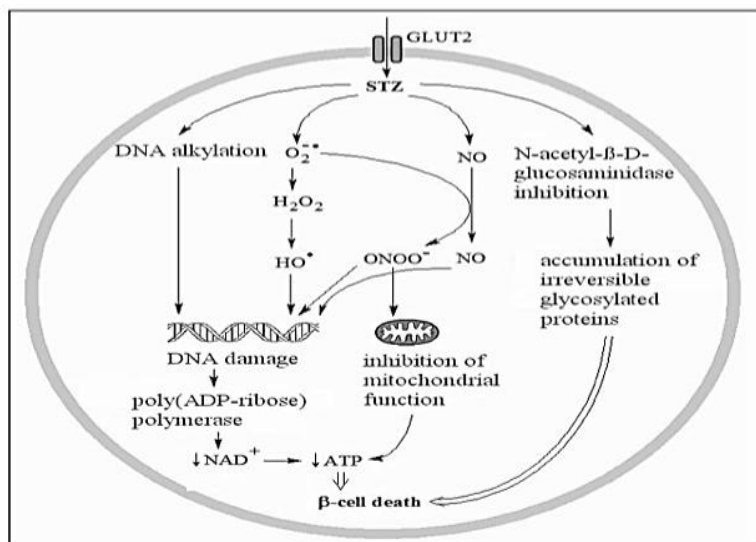


Figura III- Ilustração representativa dos mecanismos do STZ. Ilustração representativa dos mecanismos de ação da STZ. No meio intracelular (figura III) a STZ desencadeia cinco mecanismos de toxicidade diferentes. 1) Libertação do monóxido de azoto (NO), pois é uma substância dadora desse composto; 2) Produção de espécies reativas de oxigênio (como aniões superóxido); 3) Alquilação do ADN (ácido desoxirribonucleico) (Lenzen, 2008) ; 4) Esgotamento do ATP das células  $\beta$ -pancreáticas; 5) Inibição da enzima N-acetilglucosamina, N-acetil-B-D-glucosamina e glicosilação irreversível da proteína (Lenzen, 2008). Todos os mecanismos conduzem à necrose das células  $\beta$ -pancreáticas, resultando numa deficiência da produção de secreção de insulina (R. A. Bennett & Pegg, 1981). Adaptado de Soltesova D., 2011.

## ii. Modelos de neuropatia traumática

Os modelos de lesão traumática são obtidos via lesão de nervo e podem ser classificados em dois grupos principais, de acordo com a localização da lesão (*i.e.* raíz ventral ou dorsal, nervo espinhal, gânglio raquidiano ou nervos periféricos) e o tipo de lesão (*i.e.* seccionamento, ligação apertada ou solta, compressão) (Colleoni & Sacerdote, 2010).

Os modelos em que é realizada a secção total do nervo ciático são usados no estudo de doenças em que a axotomia é parte da causa, e simulam por exemplo a neuropatia do membro fantasma, traumatismo de nervo ou lesão iatrogénica (Costigan, Scholz, & Woolf, 2009; Klusakova & Dubovy, 2009). A sintomatologia característica é alodínia mecânica e autotomia do membro desnervado (sinal de dor espontânea ou desnervação) (Klusakova & Dubovy, 2009).

Os modelos obtidos via lesão parcial do nervo simulam várias neuropatias periféricas. Os mais usados são o modelo CCI (do inglês *chronic constriction injury*) (G. J. Bennett & Xie, 1988) e o modelo SNI (do inglês *spared nerve injury*) (Decosterd & Woolf, 2000). O modelo CCI é obtido via colocação de fios de sutura em torno do nervo ciático sem o estrangular, o que provoca uma reação inflamatória local. Este modelo simula a compressão crónica do nervo (*e.g.* o síndrome do túnel cárpico, hérnia discal lombar e doenças metabólicas). A sintomatologia característica neste modelo é alodínia mecânica, hiperalgesia mecânica bilateral, térmica e química que persiste por vários meses (Costigan et al., 2009).

O modelo SNI consiste no ligamento seguido de axotomia dos ramos tibial e peroneal comum do nervo ciático, com formação de um neuroma e consequente sensibilização das regiões plantar e dorsal da pata do animal, inervadas pelo ramo sural do nervo ciático e pelo nervo safeno que se mantêm ambos intactos (Decosterd & Woolf, 2000)(Figura IV). Os animais apresentam uma curvatura característica da pata lesada de forma a protegê-la (Li, Yang, Meyerson, & Linderorth, 2006). Este modelo simula várias neuropatias periféricas (Costigan et al., 2009) e os animais desenvolvem hiperalgesia mecânica e alodínia ao frio que persiste por pelo menos 6 meses (Costigan et al., 2009; Niederberger et al., 2008).

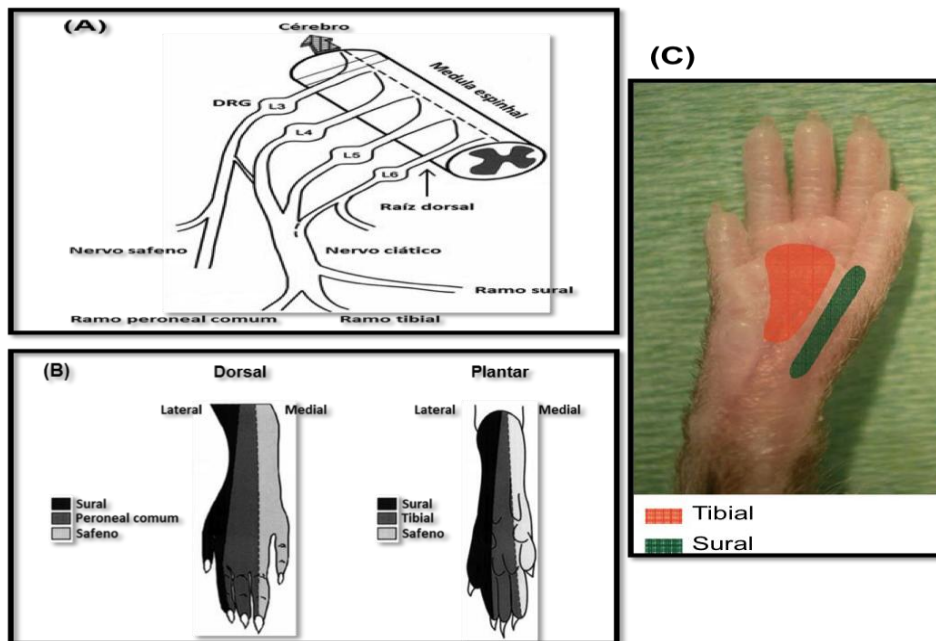


Figura IV- Representação esquemática do modelo SNI. A) nervo safeno e ramos tibial, peroneal comum e sural do nervo ciático. B) Regiões da pata posterior de rato inervadas pelos ramos tibial e sural. C) Visão plantar da pata de ratinho com representação colorida das zonas enervadas pelo ramo sural (verde) e tibial (laranja). Adaptado de Bourquin et al., 2006 e Decosterd & Woolf, 2000.

### 3. Distúrbios afetivos e dor

Na literatura encontram-se descritos vários estudos que sugerem uma forte relação entre a dor crónica e perturbações ansio-depressivas (Doan, Manders, & Wang, 2015; Yalcin & Barrot, 2014) tanto em modelos animais como em Humanos. Com efeito, estudos epidemiológicos descrevem que cerca de 13% dos indivíduos com dor crónica apresentam também diagnóstico de depressão, e que grande parte destes alega que a dor interfere com a sua prestação ao nível laboral, tendo como consequência muitas vezes a perda de emprego e a reforma antecipada (Agaliotis, Mackey, Jan, & Fransen, 2014; Azevedo et al., 2012; Azevedo, Costa-Pereira, Mendonca, Dias, & Castro-Lopes, 2014) . Esta condição desagradável acarreta para o indivíduo problemas no que respeita ao desempenho das suas tarefas diárias normais, afetando a sua vida a vários níveis, tanto pessoal como emocional, ou socialmente, tendo como consequência não apenas sintomas depressivos mas também transtornos de ansiedade e *stress* (Gorczyca, Filip, & Walczak, 2013; Reid et al., 2011).



Figura V- Diagrama representativo de alguns aspetos negativos que perpetuam o ciclo da dor. A dor conduz estados de humor negativos. Com efeito, a longo prazo conduz a estados de mobilidade reduzida tendo como consequência a fraqueza muscular e consequentemente um pior desempenho do indivíduo na execução das tarefas diárias. Consequentemente este quadro pode conduzir a ansiedade e/ou depressão, agravando a sintomatologia dolorosa.

### **i. Componente afetivo-motivacional da dor**

O conceito de dor estabelecido atualmente resulta de três componentes: sensitivo-discriminativo (*i.e.* sensação física), cognitivo-avaliativo (*i.e.* pensamento, experiências passadas, personalidade, expectativas) e afetivo-motivacional (*i.e.* emoções, ansiedade, depressão) (R. a. J. K. Melzack, 2013) (Figura V). Assim, embora o limiar de percepção à dor (definido como a maior intensidade a que o estímulo é percebido como doloroso, sendo percebido como desconfortável) seja semelhante entre os indivíduos, a tolerância à dor varia muito, sendo dependente de fatores sensoriais (*i.e.* extensão e localização da lesão tecidual), fatores genéticos (*i.e.* relativos ao sistema nociceptivo e de modulação da dor), emocionais (*e.g.* medo, raiva, ansiedade, depressão) culturais (*i.e.* aprendizagem, experiências anteriores de dor e significado simbólico da dor) e ainda sociais (*i.e.* passíveis ganhos de ordem social e afetiva, motivações prévias de cada indivíduo). Desta forma a experiência dolorosa varia entre os indivíduos (Auvray, Myin, & Spence, 2010; Dubin & Patapoutian, 2010; R. a. J. K. Melzack, 2013).

A componente afetivo-motivacional da dor deve-se à integração da informação nociceptiva com as emoções ao nível de estruturas encefálicas que são responsáveis pelo processamento da dor e das emoções, tal como o tálamo medial, PFC, IC, ACC e a AMYG (Eisenberger, 2012). Outra área importante na percepção dolorosa é o córtex pré-frontal ventral direito que aparenta estar também envolvido na regulação da angústia associada à dor e de estados emocionais negativos (Eisenberger, Lieberman, & Williams, 2003).

A forma como os estados emocionais influenciam a dor tem sido estudada em estudos imagiológicos que recorrem à ressonância magnética funcional. Nestes estudos tem sido demonstrado que estados ansiosos antecipatórios exacerbam a dor e demonstrou-se nomeadamente a ativação de várias regiões cerebrais, incluindo a AMYG e o PFC, como tendo um papel preponderante na amplificação da dor nesses estados de ansiedade (Tracey, 2008). Para além disso, os estudos de neuroimagem também revelaram que as estruturas neurais envolvidas no componente afetivo da dor são cruciais para o processo de empatia para com as dores dos outros, assim como o sistema motor (Auvray et al., 2010).

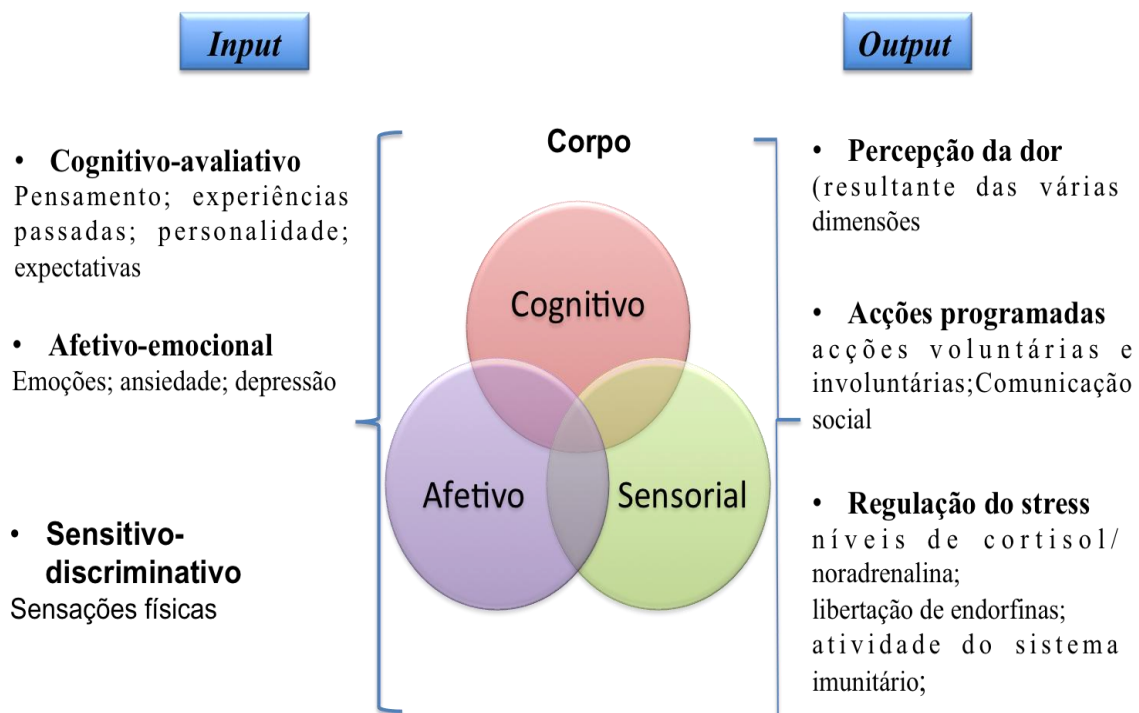


Figura VI- Fatores que intervêm na experiência dolorosa de acordo com as várias componentes da dor (cognitiva-avaliativa; sensorial-discriminativa; motivacional-afetiva) que resultam na forma como o indivíduo percebe a dor e as sensações inerentes à dor. Adaptado de R. a. J. K., Melzack, 2013.

## ii. Distúrbios afetivos e dor neuropática

Na literatura encontram-se descritos inúmeros estudos comprovam que a dor neuropática afeta a qualidade de vida dos pacientes em vários aspetos, nomeadamente ao nível do humor, sono e processos cognitivos. Os transtornos de humor mais frequentes na dor neuropática são a depressão e ansiedade (Doan et al., 2015; Yalcin, Barthas, & Barrot, 2014) De facto, os estudos epidemiológicos apontam para prevalência de depressão em cerca de 30% dos pacientes que sofrem desta condição (Yalcin et al., 2014). É comum em estudos clínicos observar-se que a ansiedade pode exacerbar a dor em situações normais (desde a infância somos expostos a estímulos que provocam dor (*e.g.* picada de agulha, cortes, queimaduras), porém num indivíduo com dor crónica como existe uma disfunção do sistema nervoso devida à dor, a ameaça do estímulo pode provocar ansiedade levando conseqüentemente à exacerbação da dor, comportamentos de evicção, medo e ansiedade (Song et al., 2006). Nos indivíduos que padecem desta condição é comum observar-se sentimentos catastróficos, infelicidade e pessimismo (Edwards, Bingham, Bathon, & Haythornthwaite, 2006).

Alguns autores sugerem que condições de dor crónica e os seus mecanismos patofisiológicos, nomeadamente no caso da dor neuropática, podem promover estados patológicos de depressão e ansiedade, bem como as perturbações de humor podem contribuir para uma maior intensificação da dor (Yalcin & Barrot, 2014). De facto, em variados estudos clínicos que recorrem a imagiologia por ressonância magnética funcional é comum observar-se que estados ansiosos antecipatórios podem exacerbar a dor (Tracey, 2008). Nestes mesmos estudos verificou-se que várias das regiões cerebrais associadas à componente afetiva de percepção dolorosa, que incluem a AMYG, IC e PFC não se encontram comumente ativadas em estudos de dor (Tracey, 2008). No entanto, em estudos feitos em indivíduos que sofrem de patologias crónicas que geram dor crónica, como é o caso da artrite reumatoide (Schweinhardt et al., 2008), estas regiões cerebrais aparentam ter forte ativação, sugerindo que estas têm um papel importante na intensificação da dor. Em alguns estudos observou-se que perante a “ameaça” de um estímulo doloroso, estas regiões encefálicas se encontravam ativadas antes da experiência dolorosa ser vivenciada, sugerindo que a ansiedade tenha um papel crítico relativamente à intensificação da experiência dolorosa (Fairhurst, Wiech, Dunckley, & Tracey, 2007).

Nas últimas décadas a comunidade científica tem realizado estudos no sentido de compreender de que forma a dor neuropática pode estar relacionada com distúrbios afetivos e melhor compreender quais as áreas encefálicas comuns envolvidas no processamento sensorial e afetivo da dor, bem como a relação com os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico. Assim, a investigação básica tem recorrido ao uso de modelos experimentais de dor que mimetizam as patologias homólogas em Humanos. Nestes modelos constatou-se que, tal como os estudos em Humanos sugeriam, os estados de depressão e/ou ansiedade podem alterar a percepção da experiência dolorosa (Bravo et al., 2012). De facto, num estudo em que combinaram um modelo experimental de dor neuropática realizado em rato com recurso ao modelo CCI com um modelo que consiste em induzir um estado de *stress* crónico (CMS), e que é frequentemente usado para induzir estados de depressão, Bravo et. al. (2012) observaram que os ratos CMS apresentavam respostas semelhantes nos testes nociceptivos quando comparados com os ratos CCI, sugerindo que estados depressivos aumentam a percepção de estímulos nóxicos. Para além da componente sensorial e emocional, os autores também avaliaram a fosforilação (ativação) das cinases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares (ERKs 1/2, do inglês *extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*) no ACC, assim como a densidade neuronal nessa zona encefálica, visto ser uma região com um papel preponderante na percepção afetiva da dor. No grupo experimental CCI-CMS observaram existir uma densidade neuronal menor no ACC quando comparado com os animais controlos, que foi acoplada a um aumento da ativação de ERKs 1/2. A ativação das ERKs 1/2, quantificada pela expressão da molécula quando fosforilada (pERKs 1/2, do inglês *phosphoERKs 1/2*) tem sido utilizada como um biomarcador de atividade, particularmente em estruturas encefálicas implicadas tanto na dor como em distúrbios de humor associados à dor.

Alguns estudos sugerem mesmo que as ERKs 1/2 estejam envolvidas na modulação da dor mediada por antidepressivos (Gisela Borges, Esther Berrocoso, Juan Antonio Mico, & Fani Neto, 2015). Estes dados apoiam a relação entre a dor neuropática, ansiedade e depressão e ainda o papel preponderante do ACC nestes eventos (Bravo et al., 2012).

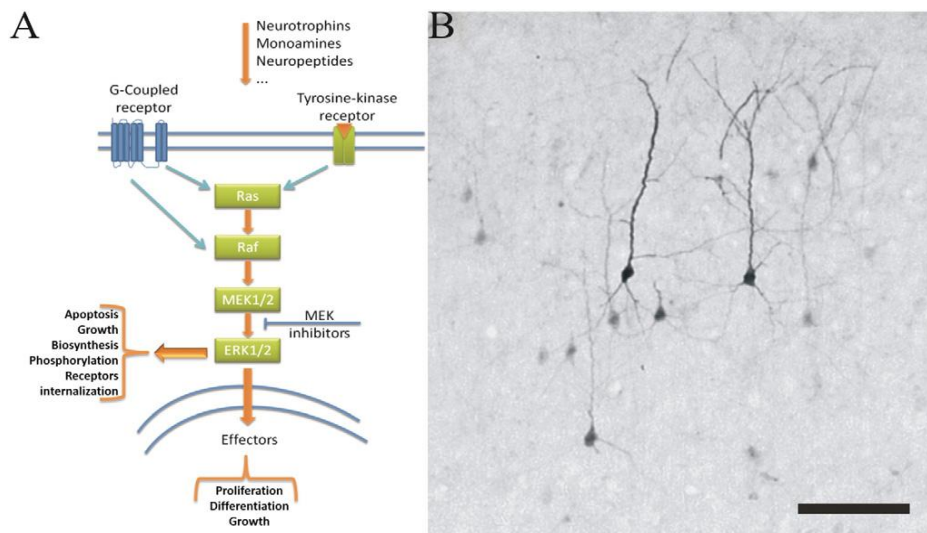


Figura VII- Representação esquemática da cascata de ativação das ERKs 1/ 2. A) As ERKs 1/ 2 são translocadas para o núcleo de forma a regular a transcrição de vários genes, incluindo os indicados na proliferação celular, diferenciação e crescimento. No citoplasma as ERKs 1/ 2 ativadas funcionam como mediadoras de outros mecanismos, nomeadamente ao nível da fosforilação de outras proteínas e receptores de internalização. B) microfotografia detalhada de uma secção de cérebro de rato de um rato *naïve* é possível observar-se a marcação neuronal no córtex pré-frontal. Adaptado de G. Borges, E. Berrocoso, J. A. Mico & F. Neto, 2015.

Os estudos em modelos animais têm também sugerido que o desenvolvimento e a persistência de dor debilitante para além de um determinado período de tempo podem desencadear o aparecimento de transtornos do foro emocional-afetivo. Assim, no modelo neuropático CCI realizado em ratinhos, Yalcin et. al. (2011) demonstraram a existência de um padrão temporal específico com o aparecimento do fenótipo ansio-depressivo a partir das 4 semanas após a indução do modelo. Estes dados apontam para uma possível relação entre a duração da patologia e o aparecimento ou manifestação de transtornos ansio-depressivos. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que estas alterações comportamentais foram acompanhadas por uma diminuição no giro dentado da forma fosforilada da proteína CREB (do inglês *cAMP-response element binding protein*), que se sabe estar envolvida na ativação de numerosas vias intracelulares. Este foi um estudo pioneiro a implicar vias de sinalização intracelular na relação entre a dor e o desenvolvimento de transtornos afetivos (Yalcin et al., 2011).

A relação entre a existência de dor crónica neuropática, e a co-morbilidade com estados de ansiedade e depressão foi mais tarde também corroborada por outros estudos. Usando o mesmo modelo de CCI para induzir dor neuropática, mas em rato, Alba-Delgado et. al.

(2013) observaram que tempos prolongados de neuropatia (4 semanas) são acompanhados pela manifestação de comportamentos indicativos de ansiedade e depressão nos mesmos animais (Bravo et al., 2013). Estudos mecanísticos demonstraram haver um aumento na expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH), a enzima limitante na síntese de noradrenalina e que é usada como indicador da necessidade de produção deste neurotransmissor, em condições de dor crónica neuropática em que se detetaram também comportamentos indicativos de ansiedade e depressão. Estes resultados levaram os autores a proporem que tais alterações comportamentais se devam a uma desregulação no sistema noradrenérgico, em particular no núcleo LC, a principal fonte de noradrenalina no sistema nervoso central (Bravo et al., 2013).

Com efeito, a noradrenalina é uma monoamina que, juntamente com a serotonina, representa uma das mais importantes moléculas nas vias de modulação descendente da dor (Millan, 2002), tal como anteriormente referido. No entanto, estas monoaminas também desempenham um papel crucial nos mecanismos da depressão e da ansiedade, sendo que já foi demonstrado que o défice na neurotransmissão destas monoaminas é preponderante no aparecimento e diagnóstico de patologias ansio-depressivas. Por outro lado, e corroborando a hipótese de que as vias serotoninérgicas e noradrenérgicas são comuns à modulação da dor e da ansiedade e depressão, é bastante reconhecida a eficácia analgésica das terapêuticas com antidepressivos que inibem a recaptação da serotonina e da noradrenalina no terminal sináptico e, como tal, produzem um incremento da disponibilidade de serotonina e/ou noradrenalina na fenda sináptica (Isaura Tavares, 2014). De facto, alguns antidepressivos são usados na prática clínica para atenuar a dor neuropática. Assim, devido à importância do sistema noradrenérgico e serotoninérgico tanto na modulação da dor, como em estados ansio-depressivos, têm-se realizado diversos estudos no sentido de compreender a implicação destes neurotransmissores e dos seus recetores e transportadores em condições de dor neuropática prolongadas que levam ao aparecimento de transtornos afetivos.

Estudos recentes corroboram a implicação de áreas encefálicas que se sabe estarem envolvidas no processamento afetivo da dor, nomeadamente o ACC, já anteriormente referido, o IC, hipocampo e AMYG na relação entre a dor crónica e transtornos ansio-depressivos (Denk, McMahon, & Tracey, 2014; Doan et al., 2015). O ACC interage com o tálamo e a AMYG, estando implicado no processamento tanto da dor como da depressão.

Recentemente estudos demonstraram haver a diminuição de volume e hipermetabolismo do ACC tanto em pacientes deprimidos como no modelo CCI de dor neuropática (Doan et al., 2015; Ning, Ma, Wang, & Wang, 2013). Em estudos imagiológicos tem sido possível observar que o recrutamento do ACC está implicado em múltiplos eventos do processamento da dor, estando nomeadamente associado à comorbilidade da depressão com a dor, e aos estados antecipatórios associados à experiência aversiva à dor (Porro et al., 2002). Para além do ACC, outras áreas encefálicas têm sido investigadas, nomeadamente o IC, PFC e a AMYG pelo seu papel no comportamento depressivo induzido pela dor crónica (Doan et al., 2015). A AMYG tem sido descrita por alguns autores como tendo um papel importante pela sua implicação nos transtornos de humor (Boyle, 2013). Curiosamente, alguns estudos têm demonstrado que a amígdala é crucial na manutenção de comportamentos ansio-depressivos em condições de dor neuropática persistente (Doan et al., 2015; Neugebauer, Galhardo, Maione, & Mackey, 2009)



## II. Objetivos

- **Objetivos e considerações metodológicas**

Os estudos apresentados inserem-se no âmbito de um projeto multidisciplinar que tem como objetivo principal avaliar o papel dos sistemas serotoninérgico e noradrenérgico na indução e desenvolvimento de patologias dolorosas crónicas e no concomitante aparecimento de comportamentos ansio-depressivos. Para tal irá fazer uso de ratinhos *knock-out* condicionais para vários componentes (neurotransmissores, recetores e/ou transportadores) desses dois sistemas monoaminérgicos. No entanto, antes de iniciar esses estudos nos animais transgénicos foi necessário proceder-se à otimização dos protocolos de indução dos modelos de dor a usar, bem como dos protocolos de avaliação de comportamentos nociceptivos e de ansiedade e depressão em murganhos, visto que estes se encontram bem estabelecidos no nosso departamento mas no Rato. A melhoria dos protocolos de avaliação comportamental em ratinho é essencial para se poderem validar os modelos como sendo efetivamente modelos de dor crónica e para avaliar futuramente as implicações que as manipulações nos sistemas monoaminérgicos terão nos comportamentos nociceptivo e ansio-depressivo.

Assim, tendo em conta estas premissas este estudo teve como principais objetivos:

- 1. Estabelecer/otimizar o modelo de neuropatia diabética em ratinho no departamento.**

Nos estudos apresentados nesta tese de Mestrado usámos o modelo STZ, um dos mais frequentemente usados para induzir dor neuropática de origem metabólica como é o caso da neuropatia diabética. Está descrito que este modelo quando aplicado a Ratinho é sustentável por 4 a 8 meses (Colleoni & Sacerdote, 2010). O protocolo de indução de neuropatia diabética em Ratinho varia ligeiramente do usado em Rato, com várias injeções de STZ a serem feitas em dias consecutivos ao invés de uma única injeção intraperitoneal (i.p) como é feito em Rato (Wu & Huan, 2001). De forma a validar o modelo induzido em ratinho foram usados diferentes testes para avaliar o comportamento nociceptivo, de acordo com a bibliografia e com a experiência prévia existente no departamento relativamente ao modelo em Rato. De forma a validar o desenvolvimento de hiperalgesia térmica procedeu-se à avaliação pelo teste de *hot plate*, que consiste em colocar o animal numa placa previamente aquecida a uma temperatura entre os 52°C e os 55°C, quantificando-se o tempo de latência até à observação de uma resposta (Le Bars et

al., 2001). A alodínia mecânica foi avaliada pelo teste de *von Frey* que consiste em colocar o animal numa grelha metálica e aplicar a força de filamentos em ordem ascendente sobre a pata traseira, sendo que a resposta do animal é usada como medida do limiar de dor (Chaplan, Bach, Pogrel, Chung, & Yaksh, 1994).

## **2. Estabelecer/otimizar o modelo de neuropatia traumática em ratinho no departamento.**

Nos estudos apresentados nesta tese de Mestrado usámos o modelo SNI já mencionado adaptado a Ratinho, tal como já foi descrito por outros autores (Bourquin et al., 2006). De forma a validar o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica foi implementada uma versão modificada do teste de *von Frey* que consiste na estimulação da área plantar lateral da pata esquerda posterior (lesada), correspondente à zona inervada pelo nervo sural. Determinou-se o limiar de resposta e ainda a frequência de resposta a cada filamento (Bourquin et al., 2006).

## **3. Estabelecer/otimizar os testes para avaliar comportamentos de ansiedade e/ou depressão em ratinho no departamento.**

De forma a avaliar parâmetros relativos à ansiedade foram desenvolvidos dois testes. O teste de *elevated plus maze* que consiste em expor o animal a uma plataforma em forma de cruz, elevada a cerca de 30 cm do chão, na qual dois braços da plataforma são abertos e outros dois são fechados. O parâmetro de avaliação estabelecido é a percentagem do tempo de permanência em cada um dos braços da plataforma (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985). Uma vez que no animal se gera um conflito comportamental entre a sua curiosidade de exploração dos espaço abertos e uma predileção pelos espaços fechados, mais seguros, um maior tempo de permanência na zona dos braços fechados é indicativa de maior ansiedade. O teste de *marble burying* consiste em colocar aproximadamente vinte berlines dispostos em colunas, simetricamente, numa caixa com uma cama de carolo e colocar o animal na caixa durante cerca de trinta minutos e expô-los a luz de forte intensidade. O parâmetro quantificado é o número de berlines escondidos pelo animal uma vez que os animais mais ansiosos têm tendência a enterrar os berlines por este ser um objeto estranho (Kedia & Chattarji, 2014).

De forma a avaliar a depressão foi desenvolvido o teste de *forced swimming* que é um teste concentrado na resistência do roedor à ameaça do afogamento e que mede a susceptibilidade de parâmetros depressivos. Nomeadamente, é quantificado o tempo de

imobilidade face ao tempo de reação, aqui medido como tempo a nadar, quando o animal é colocado numa tina com uma determinada altura de água sem qualquer plataforma onde se possa apoiar (Porsolt, Bertin, & Jalfre, 1977).

#### **4. Avaliar de que forma a realização de testes nociceptivos pode afetar os resultados obtidos nos testes de ansiedade e depressão**

Nos estudos a realizar em animais transgénicos será importante estabelecer previamente que o animal desenvolveu uma patologia dolorosa crónica, com sintomas de hiperalgesia e alodínia característicos de cada modelo. Para além disso, pretende-se também futuramente estabelecer uma relação entre a existência de hipersensibilidade e a manifestação de comportamentos ansiosos e/ou depressivos nos animais com dor crónica. Assim, é necessário estabelecer qual a influência que a realização de um tipo de testes comportamentais tem sobre os resultados obtidos em testes comportamentais realizados subsequentemente em termos temporais. Assim, neste estudo usámos um grupo de animais saudáveis previamente submetidos a testes de nociceção e posteriormente testados para ansiedade e depressão (tendo sido definida uma cronologia temporal para a execução dos testes) e comparámos com um grupo de animais *naïve* submetidos apenas aos testes de ansiedade e depressão.

#### **5. Avaliar a ativação de áreas encefálicas implicadas no componente afetivo-motivacional da dor.**

De forma a avaliar a ativação neuronal de áreas encefálicas envolvidas no processamento da dor, ansiedade e depressão foi desenvolvido um estudo molecular em que foi analisada a ativação de ERKs 1/2, através da quantificação do número de células imunorreativas, as ERK1/2 fosforiladas (pERKs 1/2) no ACC e na AMYG nos animais SNI comparativamente aos respetivos animais controlo. A escolha destas regiões encefálicas foi feita pelo reconhecido papel que desempenham no controlo afetivo da dor, tal como antes referido. Assim alterações na ativação de ERKs1/2 nos animais com dor neuropática poderão ser indicativas de uma maior atividade neuronal nessas regiões que poderão estar relacionadas e variar consoante o estado afetivo (G. Borges, E. Berrocoso, J. A. Mico, & F. Neto, 2015).



### III. Materiais e métodos

#### 1. Animais

Neste estudo foram utilizados 48 ratinhos C57BL/6 obtidos (por cruzamentos entre animais C57BL/6) e mantidos nas instalações do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22\pm 2$  °C) e humidade ( $55\% \pm 5\%$ ) e com um ciclo de luz/escurecimento de 12 horas (luzes ligadas às 8h da manhã). No início das experiências, os ratinhos tinham pesos compreendidos entre os 20-25 g e após indução de cada modelo experimental de dor neuropática foram alojados em grupos de 4 ou 5 por gaiola onde tinham livre acesso a comida e água. O período de aclimatização às condições de temperatura, humidade, luz e sonoridade da sala de manutenção no biotério foi de 5 dias, durante o qual apenas as tratadoras entraram em contacto com os animais. Posteriormente, deu-se início ao processo de habituação à manipulação e às condições experimentais para avaliação nociceptiva. Para o efeito, nos 4-5 dias que antecederam o primeiro dia de testes e imediatamente antes da execução dos mesmos, os animais foram mantidos por uma hora na sala de comportamento, dentro da gaiola, sendo depois transferidos para a câmara de testes onde permaneceram durante 30 minutos sem qualquer estímulo nódico, de forma a se aclimatizar às condições da sala e reduzir o *stress* e os comportamentos exploratórios.

A mesma habituação foi realizada uma vez antes de cada dia de teste, de maneira a evitar uma associação entre a câmara de teste e a dor. Os testes comportamentais foram realizados sempre durante o mesmo período do dia (período de luz) para cada grupo experimental de forma a eliminar qualquer alteração provocada pelo ciclo circadiano.

Foi tido em consideração o *stress* provocado pela limpeza das gaiolas, pelo que nos dias de habituação/testes, a mesma foi realizada apenas no final dos procedimentos experimentais. O estado dos animais foi regularmente avaliado, tendo em particular atenção o aparecimento de sinais de *stress*, doença ou má condição física, como perda excessiva de peso, desidratação, excesso de secreções oculares (porfirina), pêlo sujo ou eriçado, comportamento social agressivo, baixa mobilidade, má cicatrização ou infeção das suturas e abertura de pontos.

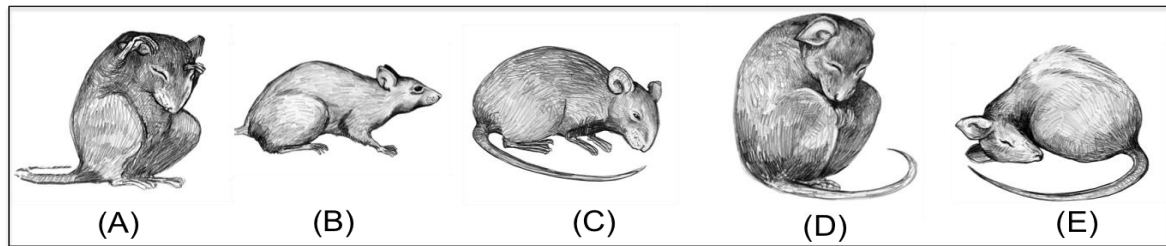


Figura VIII- Ilustração de 5 estados comportamentais diferentes em ratinho. A observação dos comportamentos dos animais é um parâmetro muito importante para uma boa execução dos testes de avaliação comportamental. A) *Grooming*; B) Alerta; C) Tranquilo; D) Sono leve; E) Sono profundo. Adaptado de Callahan, Gil, Levesque & Mogil, 2008.

Os procedimentos experimentais foram realizados segundo as normas éticas para o estudo de dor experimental em animais conscientes (Zimmermann, 1983), a diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu do Conselho (Estrasburgo, 22 de Setembro de 2010) e as normas dos regulamentos das autoridades locais (decreto lei 129/92, Portaria 1005/92) relativas ao uso de animais para fins científicos.

## 2. Modelos de dor neuropática

### i. Neuropatia metabólica: indução do modelo STZ

Como modelo de neuropatia metabólica utilizou-se o ratinho injetado com STZ, uma toxina produzida por *Streptomyces achromogenes* que destrói seletivamente as células  $\beta$ -pancreáticas produtoras de insulina (R. A. Bennett & Pegg, 1981), mimetizando assim a condição de DM tipo 1. Para tal, a diabetes foi induzida nos Ratinhos por injeção intraperitoneal (i.p) de STZ (50 mg/kg de peso corporal) dissolvida em 0,1M de tampão citrato (pH 4,5) durante 5 dias consecutivos e sempre à mesma hora (Wu & Huan, 2001) (Figura IX). Os animais do grupo controlo (CTR) receberam iguais volumes de solução veículo. As glicemias e os pesos dos animais foram monitorizados a cada duas semanas após as injeções de STZ ou veículo. Para efetuar as medições da concentração sanguínea de glucose, procedeu-se á colheita de uma amostra de sangue venoso na veia da cauda, utilizando-se o aparelho Breeze® 2 (Bayer, Portugal), como medidor de glicemia. Os

animais injetados com STZ foram considerados diabéticos quando a concentração de glucose no sangue foi superior a 270 mg/dL, sendo incluídos no grupo experimental STZ.

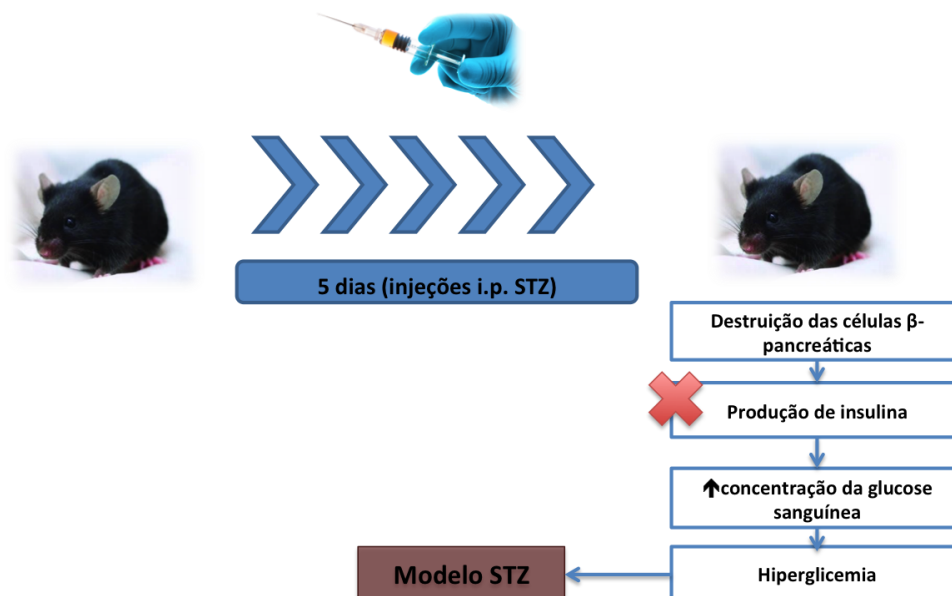


Figura IX- Mecanismo de ação da estreptozotocina (STZ) no protocolo de indução do modelo em ratinho.

Induzimos o modelo STZ em dois grupos experimentais diferentes. No primeiro grupo experimental usamos animais injetados com (STZ; n=8) ou veículo (CTR; n=6) de forma a validar o desenvolvimento da patologia dolorosa e caracterizar o fenótipo nociceptivo. Para isso neste grupo efetuaram-se testes comportamentais para avaliar nociceção antes da indução da diabetes e a cada duas semanas até às oito semanas após as injeções de STZ ou veículo (Figura X). No segundo grupo experimental usamos animais injetados com (STZ; n=4) ou veículo (CTR; n=4). Neste segundo grupo efetuaram-se testes comportamentais para avaliar nociceção e comportamentos de ansiedade e/ou depressão. Os testes comportamentais para avaliação da nociceção foram realizados antes da indução do modelo e às quatro semanas após indução do modelo. Os testes para avaliação dos comportamentos de ansiedade e depressão foram realizados oito semanas após indução (Figura X).

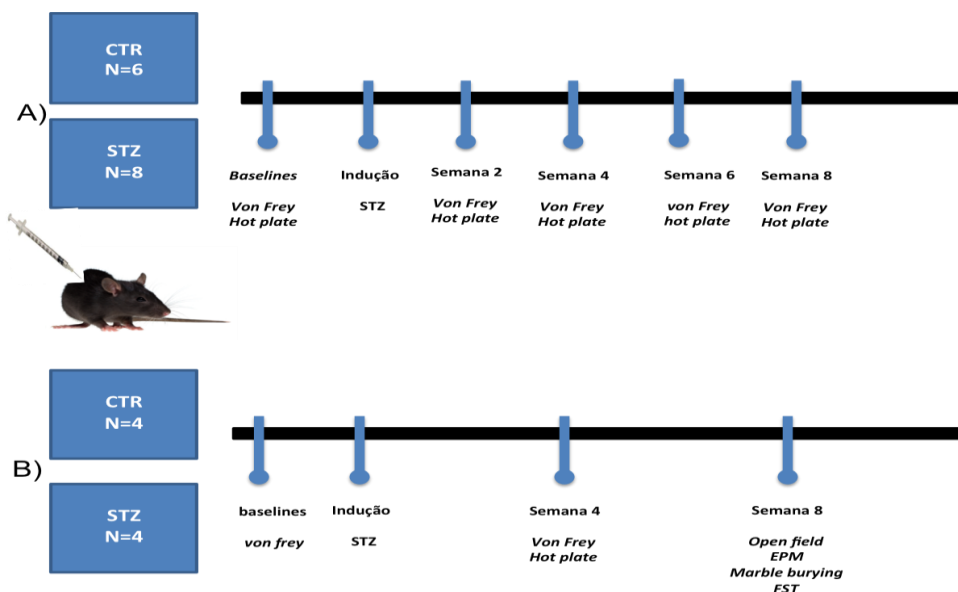


Figura X- Esquematização da cronologia de testes comportamentais no modelo STZ. A) 1º grupo experimental para caracterização do fénótipo doloroso; B) 2º grupo caracterização de comportamentos de ansiedade e/ou depressão.

## ii. Modelo de neuropatia traumática: cirurgia *spared nerve injury* (SNI)

O modelo de dor neuropática traumática *spared nerve injury* (SNI) foi induzido tal como descrito anteriormente (Decosterd & Woolf, 2000). Para tal, os animais foram anestesiados com o anestésico volátil isoflurano<sup>®</sup> e a coxa esquerda dos animais foi tricotomizada e desinfetada com Betadine<sup>®</sup> (iodopovidina) (figura XI, A). De seguida, efetuou-se uma incisão vertical de 3,5 cm ao longo da pele, destacando-a posteriormente da camada de tecido conjuntivo subjacente (Figura XI, B). Com uma tesoura de pontas rombas, afastaram-se as fibras do músculo bíceps femoral. Com recurso a uma pequena pinça curva, foi possível isolar os ramos peroneal comum e tibial do nervo ciático (Figura XI, C), ligá-los individualmente com linha de seda não absorvível 5-0 e remover uma secção de 2-4 mm de cada um (Figura XI E,F). Durante o procedimento, houve o cuidado de não tocar nem lesionar o ramo sural do nervo ciático, que se encontra junto à região posterior da coxa. No final da axotomia, o músculo foi suturado com linha de seda não absorvível 5-0 e a pele foi suturada com agrafos. Os animais controlo ou *sham* foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico para exposição dos ramos tibial e peroneal comum mas não se procedeu a qualquer lesão. No final do procedimento cirúrgico, a área intervencionada foi

de novo desinfectada com Betadine®. Nos primeiros dias após a cirurgia foi colocada comida no interior das gaiolas de modo a facilitar o seu acesso.

Os ratinhos (SNI; n=8) e (*sham*; n=7) foram submetidos a avaliação comportamental da nocicepção aos dias 3, 7, 14 e 21 após indução do modelo e a avaliação comportamental de ansiedade e/ou depressão aos 28 dias (Figura XII) O peso dos ratinhos foi avaliado antes da indução do modelo e aos dias 3, 7, 14 e 21 após cirurgia.

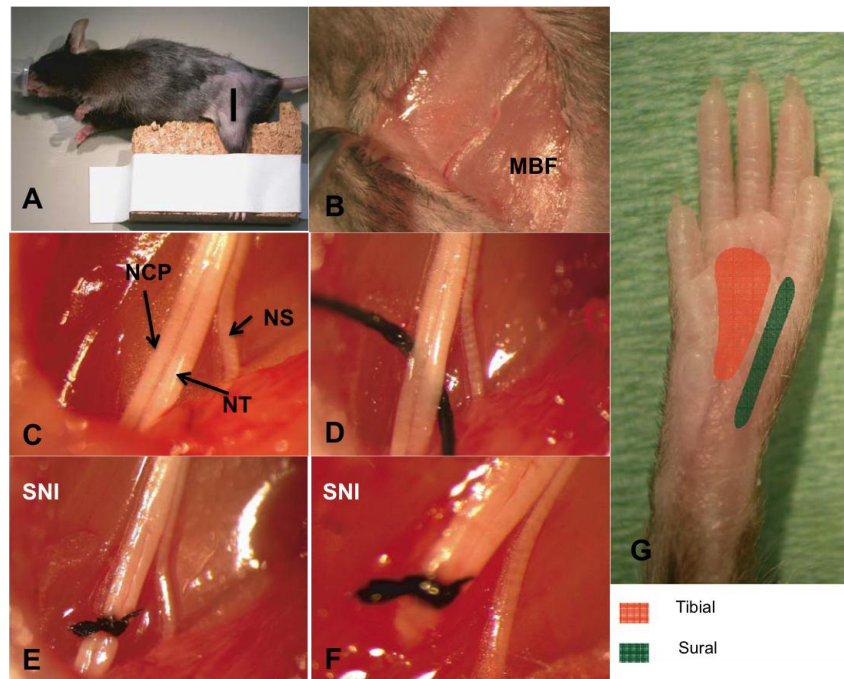


Figura XI- Representação exemplificativa do procedimento cirúrgico da cirurgia *spared nerve injury* (SNI). A) ratinho anestesiado em decúbito lateral direito com imobilização do membro inferior esquerdo; B) Exposição do músculo bíceps femoral; C) Exposição dos terminais do nervo ciático, NCP- nervo comum peroneal; NT- nervo tibial, NS- nervo sural; D) Dissecção e isolamento dos ramos do nervo ciático; E) Ligação dos nervos comum peroneal e tibial; F) Os nervos ligados são seccionados distalmente e é removida uma secção de 2mm; G) Perspetiva plantar da pata esquerda. A área colorida da fotografia corresponde à área cutânea enervada pelo nervo sural/tibial que é estimulada através de monofilamentos no teste de *von Frey*. Imagem adaptada de Bourquin et al., 2006.

Utilizamos adicionalmente um pequeno grupo experimental no qual se induziu SNI (n=2) e procedeu-se apenas à avaliação comportamental de ansiedade e/ou depressão aos 3 meses após indução do modelo (SNI-3 meses) (Figura XII). Este pequeno grupo experimental

teve como objetivo avaliar se existem diferenças para tempos mais longos de patologia SNI.

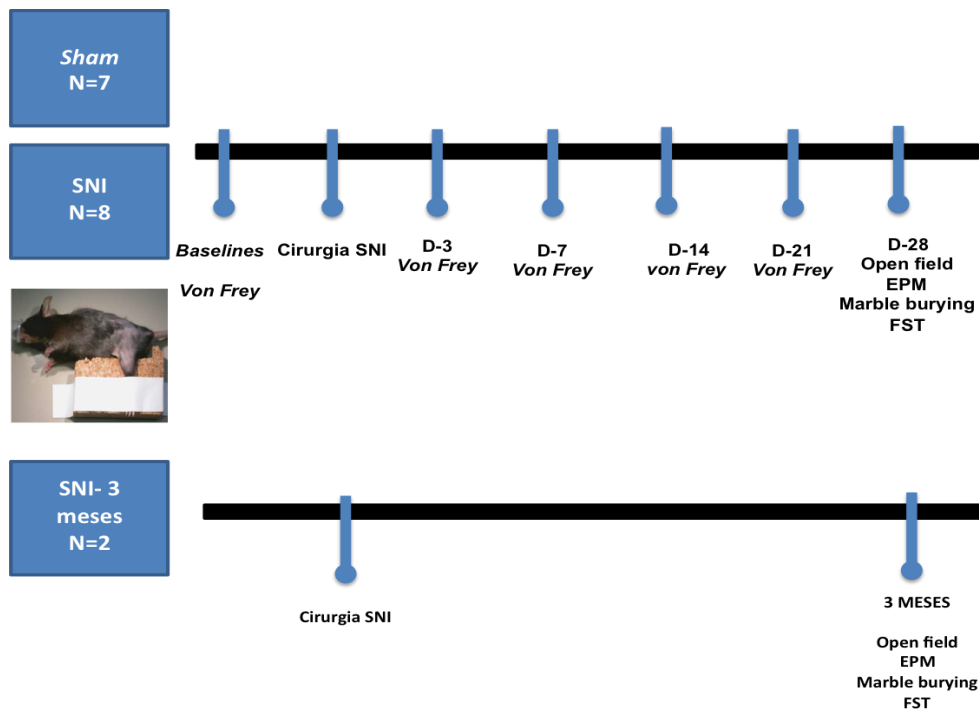


Figura XII- Cronologia dos testes comportamentais realizados para avaliação da nocicepção e comportamentos de ansiedade e/ou depressão no modelo SNI.

### 3. Avaliação comportamental: testes nociceptivos

#### i. Teste de *von Frey*

No modelo STZ utilizou-se o teste de *von Frey* (Chaplan et al., 1994). O teste consistiu na estimulação da área plantar da pata esquerda traseira com a extremidade de cada filamento (0,008g; 0,02g; 0,04g; 0,07g ; 0,16g; 0,4g; 0,6 g; 1,0g; *Touch test sensory evaluator kit, Stoelting, IL*) por ordem de força ascendente (figura XIII). Considerou-se como limiar de dor o filamento ao qual os animais apresentaram uma resposta positiva de evasão em 5 estimulações (Chaplan et al., 1994). No caso de a resposta não ter sido clara, dois minutos depois realizaram-se 5 novos ensaios para o mesmo filamento.

No modelo SNI de neuropatia foi implementada uma versão modificada do teste de *von Frey* (Bourquin et al., 2006) que consistiu na estimulação da área plantar lateral da pata esquerda posterior (lesada), correspondente à zona inervada pelo nervo sural. O teste foi

executado através da aplicação de 11 filamentos (0,008g; 0,02g; 0,04g; 0,07g; 0,16g; 0,4g; 0,6g; 1,0g; 1,4g; 2,0g; *Touch test sensory evaluator kit, Stoelting, IL*) por ordem de força ascendente. Cada filamento foi aplicado 10 vezes. Cada estimulação durou cerca de dois segundos e foi espaçada das outras estimulações em trinta segundos. O filamento de força ascendente seguinte foi aplicado dois minutos após a última estimulação. Considerou-se como resposta positiva provocada pela dor quando os animais levantaram, abanaram e/ou agitaram bruscamente a pata lesada, excluindo-se os movimentos derivados da locomoção (Bourquin et al., 2006).

Determinou-se o limiar de resposta e a frequência de resposta a cada filamento. Para determinar o limiar de resposta considerou-se o filamento de menor força que induziu pelo menos duas respostas positivas em dez estimulações. Para calcular a frequência de resposta a cada filamento determinou-se a percentagem de respostas a cada dez estimulações. A força exercida por cada filamento foi graficamente mostrada usando-se o logaritmo do valor de cada filamento em gramas.

No dia do teste e nos quatro ou cinco dias precedentes, todos os grupos experimentais foram aclimatizados a uma câmara transparente assente sobre uma base metálica elevada em forma de grelha (figura XIII), utilizada para a realização dos testes de *von Frey*.

## ii. Teste de *hot plate*

O teste de *hot plate* (Woolfe G. , 1944) foi realizado apenas no modelo experimental STZ. Para o teste do *hot plate* os animais foram colocados numa placa metálica, previamente aquecida a 52 °C, cercada por uma câmara retangular de acrílico de forma a limitar os movimentos do animal à zona da placa (Bioseb, França) (Figura XIII).

O tempo de latência até se verificar uma resposta de dor foi cronometrado pelo aparelho, tendo-se iniciado a contagem no momento em que o animal tocou na placa até que este levantasse, agitasse, batesse e/ou lambesse a pata esquerda posterior. Foi contabilizado como resposta o tempo de latência até que algum desses comportamentos se verificasse e foi estabelecido um *cut off* de trinta segundos de modo a evitar a sensibilização das patas (Le Bars et al., 2001; Woolfe G. , 1944).

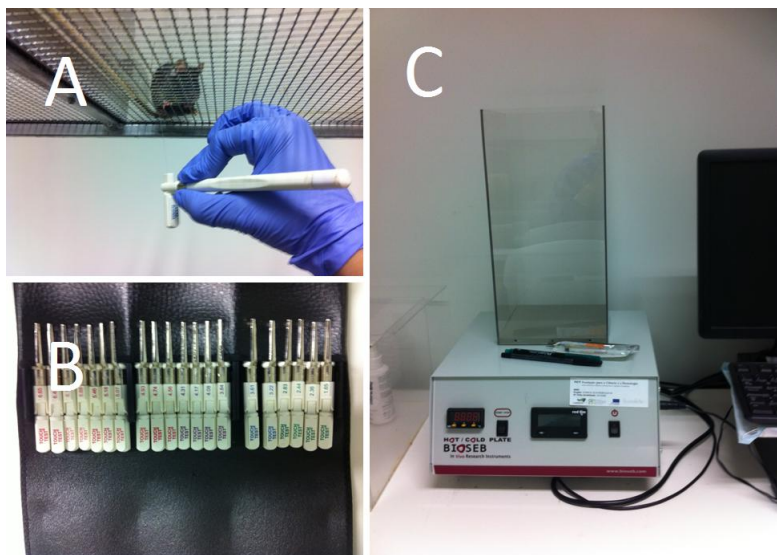


Figura XIII- Fotografias ilustrativas dos testes de nociceção *von Frey* e *hot plate*. A) Grelha de *von Frey*; B) Estojo de filamentos de *von Frey*; C) Placa de realização do teste *hot plate*.

#### 4. Avaliação comportamental: testes de ansiedade e/ou depressão

Para a realização dos testes os animais foram habituados à sala da avaliação comportamental nos dois ou três dias que precederam a realização dos testes, de forma a aclimatizá-los às condições da sala e evitar comportamentos exploratórios e de *stress* no dia do teste. Para tal, no dia de testes os animais foram colocados na sala cerca de duas horas antes do seu início. Os animais foram testados individualmente, sempre pela mesma ordem e os animais que ainda não tinham sido testados foram isolados de forma a não conseguirem visualizar, nem ouvir os testes que decorriam. Os testes foram feitos em dias diferentes mas consecutivos, pela seguinte ordem: 1) Teste de *open field*; 2) Teste de *marble burying*; 3) Teste de *elevated plus maze* ; 4) Teste de *forced swimming*.

De forma a proporcionar as condições ótimas à execução dos testes (tais como a luz, etc.), recorreu-se a um grupo de animais *naïve* (n=5) de forma a otimizar as condições e posteriormente podermos proceder à realização dos testes nos grupos experimentais de interesse. Posteriormente simultaneamente à execução de todos os testes e de forma a validar as condições excluindo possíveis interferências ao teste, usou-se sempre um animal de cada grupo experimental, ao qual se injetou 30 min antes da execução do teste o antidepressivo venlafaxina<sup>®</sup> via i.p (20mg/kg de peso corporal diluído em NaCl 0,9% 10 mL/kg) tal como descrito anteriormente (Berrocoso & Mico, 2009).

Os testes *open field*, *marble burying*, *elevated plus maze* e *forced swimming* foram executados oito semanas após indução do modelo de STZ (Figura XIV) e vinte e oito dias (Figura XII) ou três meses após indução do modelo SNI em grupos de animais previamente submetidos a testes comportamentais para avaliação da nociceção .

De forma a avaliar o efeito da execução de testes comportamentais de avaliação nociceptiva nos testes *open field*, *marble burying*, *elevated plus maze* e *forced swimming* usámos um grupo suplementar de animais *naïve* (NAÏVE- sem noc.; n= 7) que apenas foi submetido a testes de ansiedade e/ou depressão e comparamos com o grupo (CTR; n=4) previamente sujeito a avaliação nociceptiva (Figura XIV). É importante salientar que os animais de todos os grupos experimentais tinham idades semelhantes.

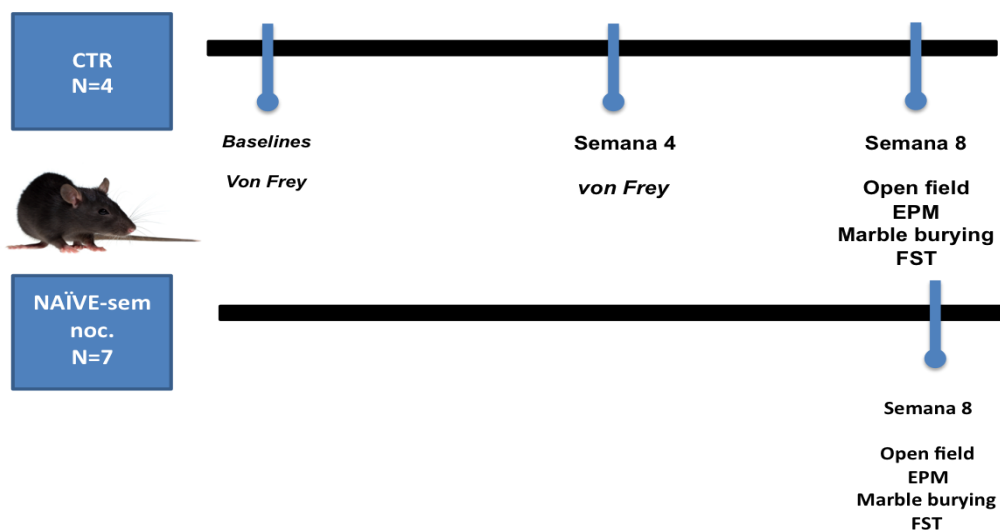


Figura IIV- Esquemática da cronologia de testes comportamentais realizados nos grupos experimentais CTR (n=4) e NAÏVE-sem noc. (n=7).

### ***i. Teste de open field***

O teste do *open field* foi realizado para avaliar eventuais problemas locomotores dos animais que pudessem influir nos resultados dos testes de ansiedade e depressão (Denenberg, 1969). O teste consistiu em colocar cada animal numa caixa de plástico cercada por uma câmara retangular de acrílico de forma a limitar o espaço do animal. O animal foi colocado na caixa e procedeu-se à filmagem do comportamento seu comportamento durante dez minutos. Posteriormente o vídeo foi analisado recorrendo ao *software SMART® v3.0.03* (Panlab, Harvard apparatus) de modo a avaliar os movimentos

locomotores básicos do animal, e quantificar a distância percorrida nos dez minutos do teste (Sharma, Elased, Garrett, & Lucot, 2010). A caixa foi limpa com um pano embebido em água destilada entre a realização dos testes aos diferentes animais.

## **ii. Teste de *elevated plus maze***

O teste *elevated plus maze* é usado para avaliar os níveis de ansiedade nos animais, e consiste na análise do comportamento dos animais quando estes são colocados em espaços elevados e têm a possibilidade de escolher entre espaços abertos ou fechados (Pellow et al., 1985). Para tal, foi utilizado um labirinto em formato de cruz colocado a 30 cm do chão e constituído por quatro braços: dois abertos e dois fechados (figura XV, C). A luminosidade da sala foi ajustada de forma a criar uma luminosidade branca, indireta e incandescente. O animal foi colocado no centro do labirinto com a face voltada para um braço aberto e retirado após cinco minutos. O comportamento do animal foi filmado e posteriormente analisado com recurso ao *software SMART<sup>®</sup> v3.0.03* (Panlab, Harvard apparatus). Os parâmetros tidos em conta na análise foram o tempo de permanência do animal nos espaços abertos, fechados ou no centro. O labirinto foi limpo com um pano embebido em água destilada entre a realização do teste aos diferentes animais (Walf & Frye, 2007).

## **iii. Teste de *marble burying***

O teste de *marble burying* permite avaliar os níveis de ansiedade expondo o animal a berlindes que quando iluminados refletem a luz, um estímulo que naturalmente é aversivo para roedores, criando desta forma uma situação de ansiedade causada pelo elemento estranho (De Boer & Koolhaas, 2003). A reação do animal passa normalmente por enterrar os berlindes na cama da gaiola, sendo quantificado o número de berlindes enterrados (Figura XV, A). O teste consistiu em colocar cada animal individualmente numa caixa com as medidas de uma gaiola limpa, que contém uma “cama” de cerca de 5 cm de carolo de milho onde se encontram dispostos vinte berlindes em colunas, cuidadosamente alinhadas, com a mesma distância, exposta a uma luminosidade direta de 100 W de potência. O animal foi colocado dentro da caixa durante trinta minutos e no final foram contabilizados

o número de berlindes escondidos, tendo-se considerado como escondidos os berlindes que estavam maioritariamente (pelo menos 2/3) ou totalmente encobertos. O número de berlindes escondidos foi considerado como indicador de ansiedade (Kedia & Chattarji, 2014; Yalcin et al., 2011). Os berlindes foram limpos em água destilada entre a realização dos testes aos diferentes animais.

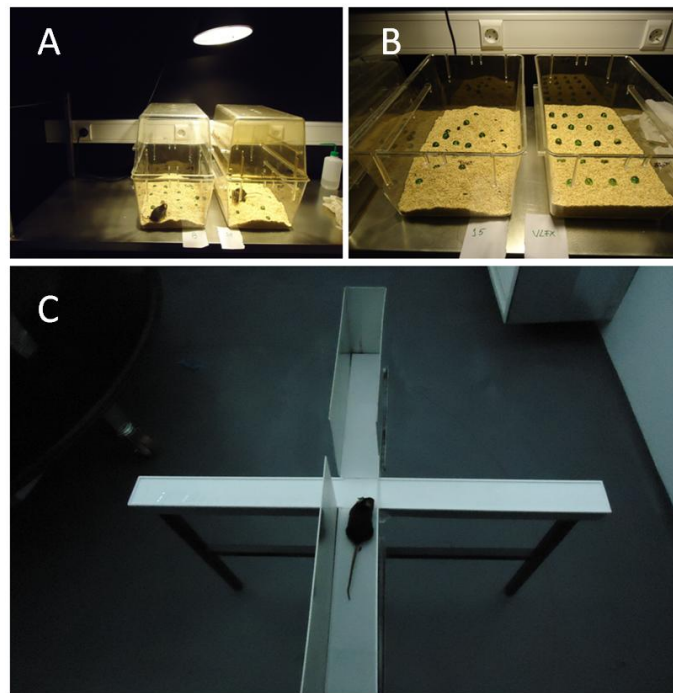


Figura XV- Fotografias ilustrativas da execução dos testes de ansiedade. A) Teste de *marble burying* (fotografia captada durante o tempo de teste); B) Teste de *marble burying* (fotografia captada após o teste); C) Teste *elevated plus maze*.

#### iv. Teste de *forced swimming*

O teste de *forced swimming* foi otimizado para avaliar estados depressivos em roedores. É um teste centrado na resposta de um roedor perante a ameaça de afogamento, sendo avaliados os tempos em que o animal se movimenta (luta pela sobrevivência) ou se apresenta imóvel (resignação), no caso de murganhos. É comumente utilizado para medir a eficácia de antidepressivos (Porsolt et al., 1977).

O teste foi realizado com a luz ambiente da sala, e cada animal foi colocado numa tina de vidro transparente (goblés de vidro de 2L com 30 cm de altura e 22,5 cm de diâmetro),

cheia com água a uma temperatura entre os 23-25°C. Os animais foram testados individualmente, colocados com cuidado na água e retirados após seis minutos (Figura XVI). Entre a realização do teste a cada animal diferente a água foi mudada e a sua temperatura foi verificada. O comportamento de cada animal foi filmado e analisado pelo investigador, tendo sido contabilizados os tempos passados pelo animal em cada um de dois movimentos, imobilidade e mobilidade. Considerou-se imobilidade sempre que o animal esteve imóvel ou boiou para se manter a flutuar e foram considerados comportamentos de mobilidade sempre que o animal agitou/mexeu as patas ou nadou. A análise dos vídeos foi feita com recurso ao software Redmice<sup>®</sup> (programa desenvolvido por Joaquín Berrocoso, não disponível comercialmente), calculando-se assim o tempo de imobilidade.

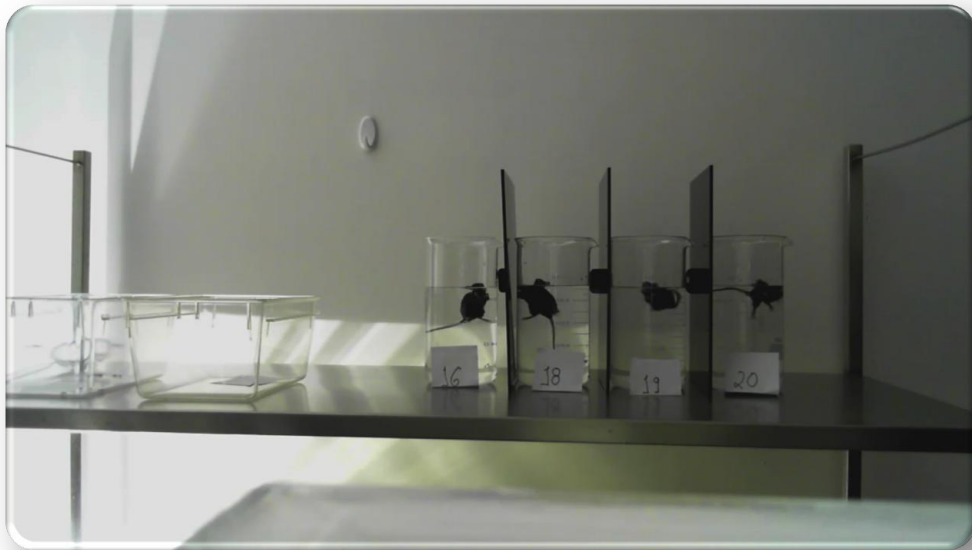


Figura XVI- Fotografia representativa do teste *forced swimming*.

## 5. Sacrifícios dos animais

Todos os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca. Os ratinhos STZ e respectivos CTR foram sacrificados nove semanas após as injeções de STZ ou veículo. Os ratinhos SNI e *sham* foram sacrificados cinco semanas após o procedimento cirúrgico, à exceção de dois animais SNI que foram sacrificado apenas aos 3 meses após a cirurgia (SNI-3 meses).

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com Eutasil<sup>®</sup> (pentobarbital sódico 100 mg/kg diluído em solução salina 0,9%) e perfundidos. Para o efeito, as cavidades abdominal e torácica foram abertas, expondo-se o coração, e injetaram-se 0,1 mL de heparina no ventrículo esquerdo. Seguidamente foi introduzida uma cânula na aorta através de uma incisão no mesmo ventrículo, tendo sido também seccionada a aurícula direita. Isto permitiu a circulação e saída de 200 mL de solução de lavagem de Tyrode's pH 7,4 e, posteriormente de 400 mL de solução de fixação composta por 4% de paraformaldeído diluído em tampão fosfato (PB, do inglês *phosphate buffer*), pH=7,5 (Duby, Campbell, Setter, White, & Rasmussen). Após perfusão, o encéfalo e a medula espinhal foram removidos e imersos no mesmo fixador durante duas a quatro horas. Foram posteriormente transferidos para uma solução de sacarose a 30% com azida (0,1 % (Merck, Darmstadt) e armazenados a 4°C.

## 6. Imunodeteção das formas fosforiladas das ERKs (do inglês *extracellular signal-regulated kinases*)

Foram obtidos cortes transversais, com 30 µm de espessura, dos encéfalos de Ratinhos (SNI; n=5) e (*sham*; n=5) utilizando-se um micrótomo de congelação (Leitz, Alemanha). Os cortes foram depois armazenados a -20°C numa solução crioprotetora. Um em cada quatro cortes foi processado para reação de imunohistoquímica para deteção das formas fosforiladas de ERKs 1 e 2 (pERKs 1/2), nos resíduos treonina 202/tirosina 204 e treonina 185/tirosina 187, respetivamente (G. Borges et al., 2015).

A reação de imunohistoquímica foi realizada pelo método *free-floating*. Os cortes foram transferidos para placas de cultura celular e lavados três vezes (3x10 minutos) com tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered solution*) 0,4M pH=7,2. Por forma a bloquear a

atividade das peroxidases endógenas, o tecido foi incubado com uma solução de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a 1% em PBS por vinte minutos. Após três lavagens (10 minutos cada) com PBS suplementado com triton-X 100 (PBST, do inglês *phosphate-buffered saline with triton-x 100*). os cortes foram incubados por duas horas à temperatura ambiente com uma solução de bloqueio de locais antigénicos inespecíficos, contendo 7,5 mg/mL de glicina e 10% de NSS (do inglês *normal swine serum*) em PBST. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário monoclonal anti-pERKS 1/2 produzido em coelho (1:500; clone 4370, Cell Signaling, E.U.A), diluído em PBST contendo 2% de NSS, durante duas noites, à temperatura de 4°C. Após essa incubação, procedeu-se à lavagem dos cortes três vezes (3x10 minutos) com uma solução de 2% NSS em PBST, seguida de incubação à temperatura ambiente com um anticorpo secundário biotilado anti-coelho produzido em suíno (1:200; clone 0353, DAKO, Glostrup, E.U.A) , diluído em PBST com 2% NSS durante uma hora. No final realizaram-se duas lavagens (2x10 minutos) com PBST. Ao longo dos 60 minutos seguintes os cortes foram incubados com o complexo avidina biotina peroxidase (ABC, do inglês *Avidin-biotin-peroxidase complex*; Vectastatin, Peterborough, Reino Unido), protegidos da luz e à temperatura ambiente, o que permitiu a amplificação do sinal, uma vez que cada avidina se encontra ligada a quatro biotinas. Realizaram-se de seguida três lavagens (3x10 minutos) com PBST e uma lavagem com PBS (1x10 minutos). Posteriormente procedeu-se à lavagem dos cortes em Tris-HCl 0,05M pH 7,6, e a ligação à peroxidase foi revelada usando diaminobenzidina (DAB; 10 mg em 20 mL de Tris-HCl 0,05M, pH 7,6 com 5  $\mu$ L a 30% de  $H_2O_2$ ). A reação foi terminada aos dezoito minutos, uma vez que a marcação já era visível. Os cortes foram montados em lâminas de vidro revestidas com gelatina, foram diafinizados com xilol (prolabo, Carnaxide) e depois protegidos com lamela, usando-se na montagem Eukitt<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.U.A). Todos os cortes foram visualizados ao microscópio de luz (Zeiss Axioskop 40) acoplado a uma câmara digital (Leica, EC3) e a um programa informático de captação de imagem (LAS 4.6- Leica Application Suite). A marcação pelas pERKs 1/2 foi quantificada no ACC e na AMYG (Figura XVII) por contagem do número de células imunorreativas em todos os cortes que apresentavam estas áreas encefálicas (uma média seis a dez cortes por região na AMYG e de quatro a seis cortes por região no ACC, dependendo dos animais). A ativação de ERKs 1/2 está expressa como a média do número de células imunorreativas a pERKs 1/2 por corte e por animal, seguida do erro padrão da média (SEM, do inglês *standard error of the mean*).

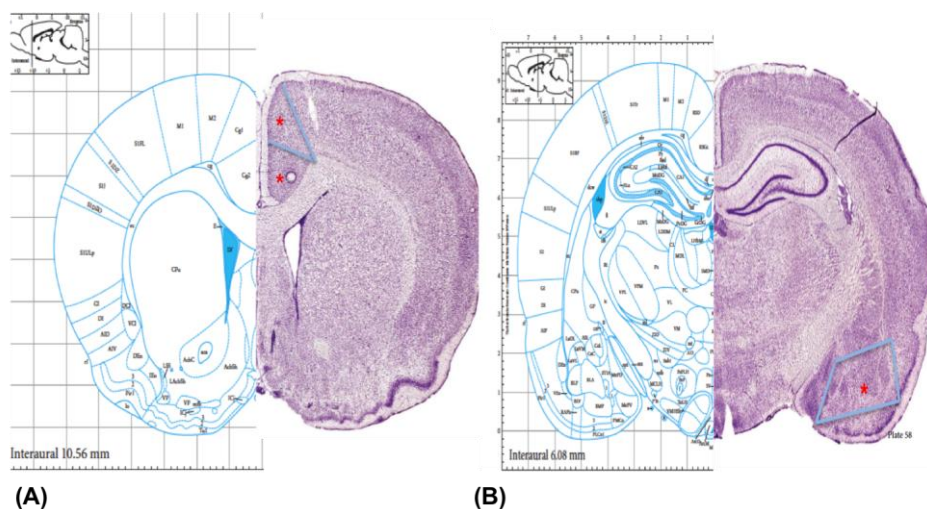


Figura XVII- Representação esquemática de cortes representativos do ACC e AMYG e localização das estruturas encefálicas no atlas Paxinos & Watson. (A) Assinalado com o asterisco a vermelho a área do ACC; (B) Assinalado com o asterisco a vermelho a área da AMYG. Em ambas as áreas (A e B) foram contadas células imunorreativas para pERKs 1/2. Adaptado de Paxinos & Watson.

## 7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Prism (versão 6, GraphPad, Califórnia). Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média para cada grupo experimental. A análise da normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, sempre que algum dos grupos experimentais não apresentasse a esperada curva gaussiana, foram efetuados testes não paramétricos.

Os resultados das glicemias, pesos, limiar de dor nos testes de *von Frey* e *hot plate* relativos aos grupos experimentais CTR e STZ foram comparados por análise de variância de duas vias com análise de medições repetidas (*Repeated Measures Two-way ANOVA*, do inglês *Two Way Analysis of Variance with repeated measures*, utilizando-se o teste *post hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas.

No modelo experimental STZ foi usado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para detetar diferenças entre os resultados dos grupos experimentais CTR. e STZ. O mesmo teste serviu para efetuar a comparação entre os grupos CTR e NAÏVE-sem noc. para os testes de *open field*, *marble burying*, *elevated plus maze* e *forced swimming*, ao passo que

no modelo SNI para os mesmos testes procedeu-se à comparação dos grupos SNI e *sham* pelo teste t não emparelhado.

O teste t não emparelhado foi utilizado na análise estatística dos resultados da quantificação de pERK1/2 na AMYG e no ACC. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## IV. Resultados

### 1. Modelo de neuropatia metabólica STZ

#### i. Monitorização dos pesos e glicemias

Como medida de bem estar o peso dos animais foi monitorizado no decorrer do estudo experimental. No grupo STZ não se verificou ganho ponderal a partir das quatro semanas (CTR:  $27,00 \pm 0,77$  g; STZ:  $22,25 \pm 0,70$  g,  $p=0,0001$ ) que se manteve até às oito semanas após a indução (CTR:  $28,33 \pm 0,71$  g; STZ:  $22,75 \pm 0,73$  g,  $p<0,0001$ ), comparativamente ao grupo CTR em que houve ganho ponderal ao longo das semanas (figura XVIII.A).

No grupo de animais que foram injetados com STZ observou-se um aumento estatisticamente significativo dos níveis de glucose no sangue às quatro semanas (CTR:  $142,83 \pm 8,15$  mg/dL<sup>-1</sup>; STZ:  $437,50 \pm 53,43$  mg/dL<sup>-1</sup>,  $p<0,0001$ ) e às oito semanas (CTR:  $125,50 \pm 5,36$  mg/dL<sup>-1</sup>; STZ:  $453,37 \pm 53,85$  mg/dL<sup>-1</sup>,  $p<0,0001$ ) após a indução do modelo, quando comparados com o grupo experimental controlo (figura XVIII.B).

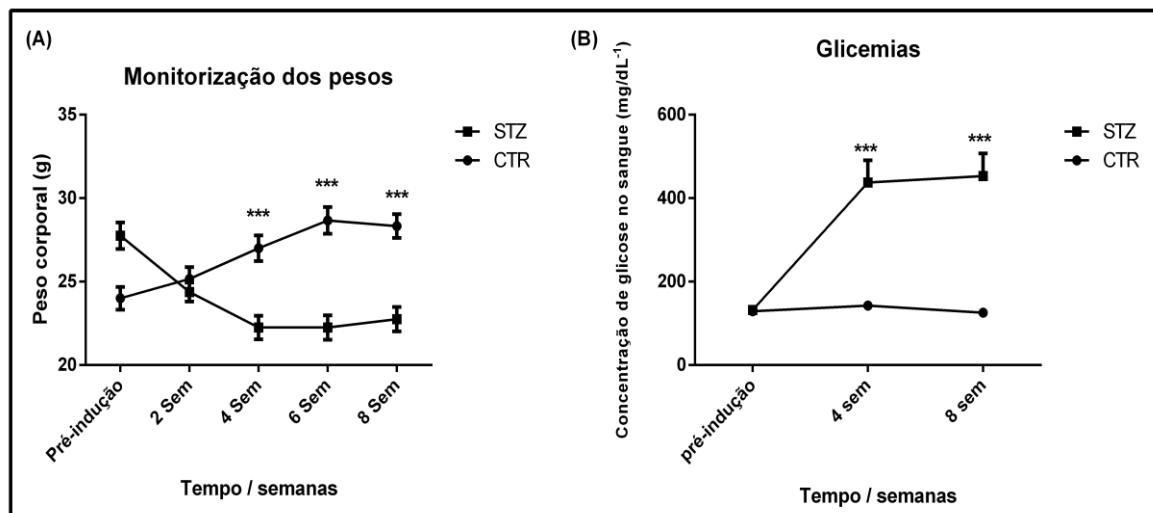


Figura XVIII- Evolução dos pesos e glicemias dos animais do grupo experimental usado para caracterização do fenótipo do modelo STZ em ratinho. Monitorização dos pesos (A) e das glicemias (B) nos animais dos grupos controlo (CTR) e injetados com STZ, desde a pré-indução do modelo até às oito semanas de evolução. Os valores estão representados como média $\pm$ SEM. Teste 2-way ANOVA para cada tempo experimental e comparação dos grupos (CTR; n=6) e (STZ; n=8), \*\*\*  $p<0,001$ .

## 2. Avaliação nociceptiva

### i. Teste de *von Frey*

No primeiro grupo experimental, usado para caracterização do fenótipo nociceptivo do modelo STZ em Ratinho, os animais injetados com STZ apresentaram no teste de *von Frey* um decréscimo acentuado do calibre do filamento aplicado suportado pelos animais, que foi estatisticamente significativo às duas (CTR:  $0,40 \pm 0,00$  g; STZ:  $0,11 \pm 0,02$  g;  $p < 0,0001$ ), 4 (CTR:  $0,40 \pm 0,00$  g; STZ:  $0,22 \pm 0,04$  g,  $p < 0,001$ ), seis (CTR:  $0,40 \pm 0,00$  g; STZ:  $0,21 \pm 0,05$ g,  $p < 0,0001$ ) e oito semanas (CTR:  $0,40 \pm 0,00$ g; STZ:  $0,08 \pm 0,01$ g,  $p < 0,0001$ ) após as injeções, quando comparado com os animais controlo (CTR), confirmando o desenvolvimento de alodínia mecânica típica de dor neuropática. Os valores obtidos antes da indução do modelo mostram que não havia diferenças significativas entre os animais antes das injeções de STZ (STZ-pré-indução:  $0,42 \pm 0,02$  g; CTR:  $0,40 \pm 0,00$  g,  $p > 0,999$ ) (figura XIX.A).

No segundo grupo experimental, usado para avaliação simultânea da nociceção e comportamentos de ansiedade e depressão, os limiares de resposta avaliados às 4 semanas eram semelhantes aos do primeiro grupo experimental.

### ii. Teste de *hot plate*

No primeiro grupo experimental, usado para caracterização do fenótipo nociceptivo do modelo STZ em ratinho, no teste de *hot plate* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no tempo de latência entre os animais injetados com STZ e controlo (CTR) ao longo do período experimental. No entanto, observou-se uma diminuição, estatisticamente não significativa, dos tempos de latência no grupo STZ às quatro e oito semanas relativamente ao grupo CTR (CTR-4 semanas:  $22,38 \pm 2,60$ ; STZ:  $16,55 \pm 3,16$ ; CTR-8 semanas:  $23,58 \pm 2,26$ s; STZ-8 semanas:  $19,40 \pm 2,24$ s) indicativa de alguma hipossensibilidade ao estímulo térmico. Verificou-se ainda um aumento estatisticamente significativo do tempo de latência em ambos os grupos relativamente aos

valores de pré-indução (CTR-pré-indução:  $12,71 \pm 0,86s$ ; STZ-pré-indução:  $11,95 \pm 0,77s$ ; CTR-8 semanas:  $23,58 \pm 2,26s$ ; STZ-8 semanas:  $19,40 \pm 2,24s$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura XIX.B).

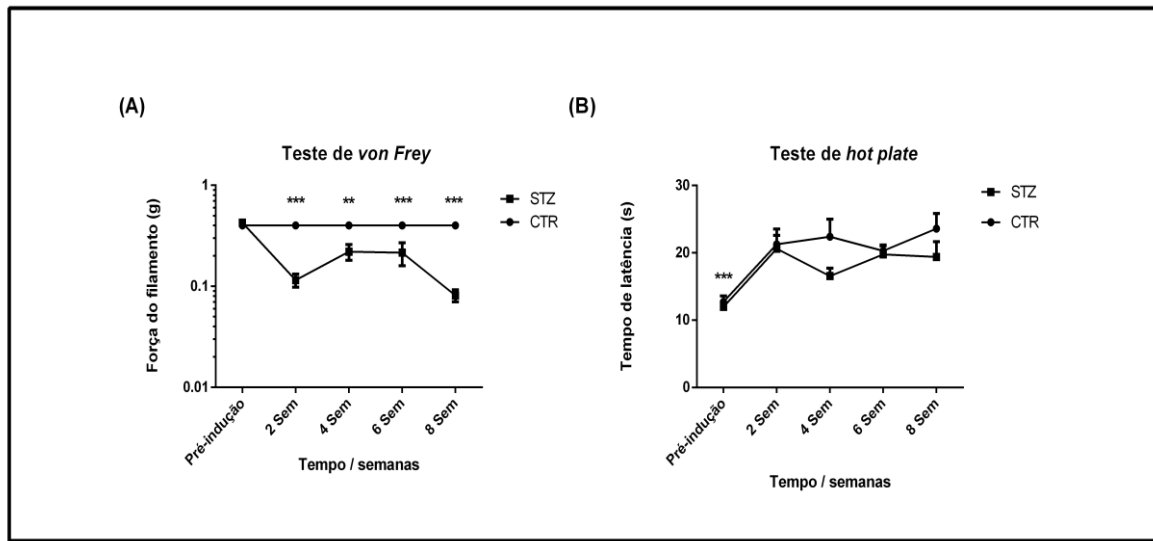


Figura XIX- Evolução da alodínia mecânica e hiperalgesia a estímulos térmicos quentes ao longo do tempo (pré-indução, *i.e.* antes das injeções de STZ ou veículo e 2, 4, 6 e 8 semanas após injeção) no grupo experimental usado para caracterização do fenótipo nociceptivo do modelo STZ. A) Avaliação da força do filamento (em gramas) que desencadeia uma resposta de retirada da pata pelos animais dos grupos controle (CTR) e injetados com STZ nos testes de *von Frey*.; B) Avaliação do tempo que os animais demoram a retirar a pata em resposta ao estímulo térmico no teste de *hot plate* (tempo de latência, em segundos). Os valores estão representados como média $\pm$ SEM. Teste 2-way ANOVA para cada tempo experimental para comparação dos grupos (CTR; n=6) e (STZ; n=8); \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3. Avaliação de ansiedade e/ou depressão

#### i. Teste de *open field*

Neste teste não foram observadas diferenças significativas entre os animais injetados com STZ e CTR (CTR.: 1509,0±139,7; STZ: 1391,0±267,5;  $p>0,9999$ )( Figura XX).

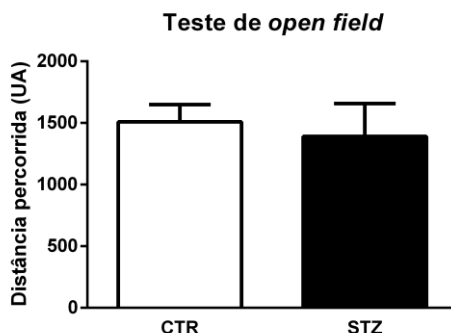


Figura XX- Distância percorrida no teste de *open field* pelos animais do segundo grupo experimental usado para avaliação simultânea da nocicepção e comportamentos de ansiedade e depressão. Os valores estão representados como média±SEM. Teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos; (CTR; n= 4), (STZ; n=4).

#### ii. Teste de *elevated plus maze*

No teste de *elevated plus maze* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas relativamente ao tempo de permanência nos braços abertos (CTR: 2,73±1,46%; STZ: 4,70±1,15%;  $p=0,3429$ ), no centro (CTR: 6,29±4,34%; STZ: 14,77±5,22%;  $p=0,2286$ ), e nos braços fechados (CTR.: 90,89±6,28%; STZ: 78,96±4,15%;  $p=0,2000$ ), no centro nem nos braços abertos.(Figura XXI)

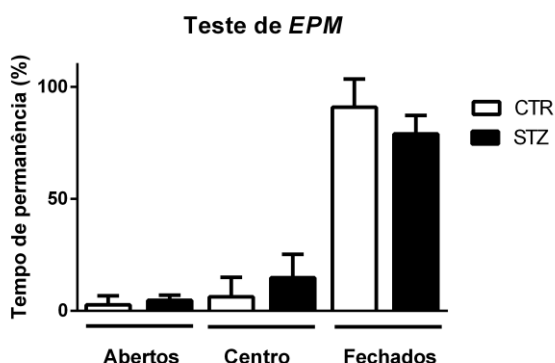


Figura XXI-Percentagem de tempo de permanência nas diferentes áreas da plataforma no teste *elevated plus maze*. dos animais do segundo grupo experimental usado para avaliação simultânea da nocicepção e comportamentos de ansiedade e depressão Os valores estão representados como média±SEM. Teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos; (CTR; n= 4), (STZ; n=4).

### iii. Teste de *marble burying*

No teste de *marble burying* não foram observadas diferenças significativas entre os animais injetados com STZ e CTR. (CTR:  $7,0 \pm 1,8$  berlindes; STZ:  $4,0 \pm 0,7$  berlindes;  $p=0,2857$ ; (figura XXII).

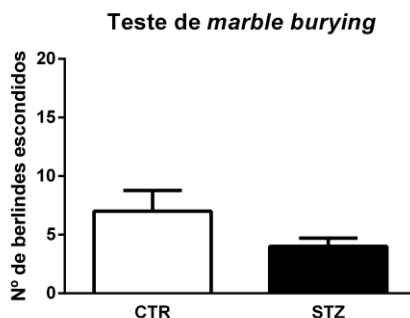


Figura XXII- Número de berlindes escondidos no teste de *marble burying burying* pelos animais do segundo grupo experimental usado para avaliação simultânea da nociceção e comportamentos de ansiedade e depressão. Os valores estão representados como média ± SEM. Teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos; (CTR; n= 4), (STZ; n=4) .

### iv. Teste de forced swimming

No teste de *forced swimming* não foram observadas diferenças significativas entre os animais injetados com STZ e CTR (CTR:  $200,0 \pm 10,2s$ ; STZ:  $142,5 \pm 32,3s$ ;  $p=0,1429$ ; (Figura XXIII).

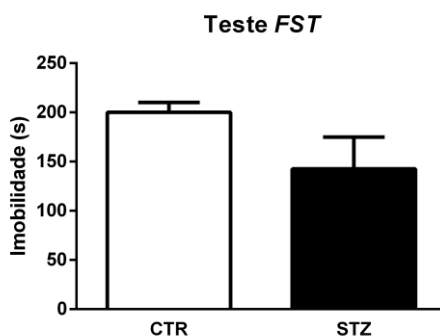


Figura XXIII- Tempo de imobilidade no teste *forced swimming* dos animais do segundo grupo experimental usado para avaliação simultânea da nociceção e comportamentos de ansiedade e depressão.. Os valores estão representados como média ± SEM. Teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos; (CTR; n=4), (STZ; n=4) .

#### 4. Modelo de neuropatia traumática: *spared nerve injury* (SNI)

##### i. Monitorização dos pesos

Como medida de bem estar o peso dos animais foi monitorizado no decorrer do estudo experimental. No grupo SNI verificou-se uma perda ponderal significativa ao longo dos dias, contrariamente ao grupo *sham*, no qual foi observado ganho ponderal. Foram observadas diferenças significativas a partir do dia 7 (*sham*: 28,1± 1,0 g; SNI: 24,5±0,9 g,  $p<0,01$ ), sendo mais acentuadas ao dia 14 (*sham*: 29,0± 1,0 g; SNI: 23,8±0,8 g,  $p<0,001$ ) e ao dia 21 (*sham*: 31,7±1,4 g ; SNI: 22,9±0,9 g,  $p<0,0001$ ) (Figura XXIV).

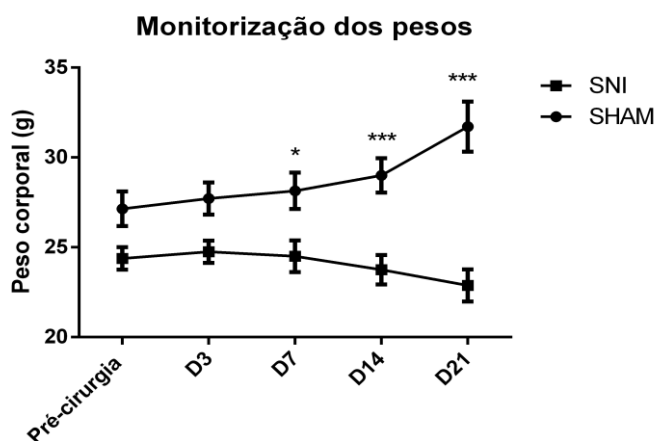


Figura XXIV- Evolução do peso dos animais ao longo do período experimental O peso foi monitorizado antes da cirurgia (pré cirurgia) e aos 3, 7, 14 e 21 dias após a cirurgia. Valores apresentados como média±SEM. Teste 2-way ANOVA para cada tempo experimental para comparação dos grupos (*Sham*, n=7) e (SNI; n=8); \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ .

##### i. Teste de *von Frey*

###### a) Limiar de resposta

No teste de *von Frey* foi observado um decréscimo ao longo do tempo (dias 3, 7, 14 e 21) da força do filamento que foi necessário aplicar aos animais do grupo SNI comparativamente ao grupo *SHAM*, para evocar uma resposta de retirada da pata. As diferenças observadas foram estatisticamente significativas (*SHAM*-dia 3: 0,041±0,006 g; SNI: 0,011±0,002 g;  $p<0,0001$ ; *SHAM*-dia 7: 0,041±0,006 g; SNI-dia 7: 0,008±0,000 g,

$p < 0,0001$ ; SHAM dia 14:  $0,041 \pm 0,006$  g; SNI-dia 14:  $0,008 \pm 0,000$  g,  $p < 0,0001$ ; SHAM-dia 21:  $0,041 \pm 0,006$  g; SNI-dia 21:  $0,008 \pm 0,000$  g,  $p < 0,0001$ ). Observou-se ainda uma diferença significativa entre os valores do grupo SNI pré-cirurgia relativamente ao dia 21,  $p < 0,0001$ , indicativo do desenvolvimento progressivo de alodínia mecânica (Figura XXV).

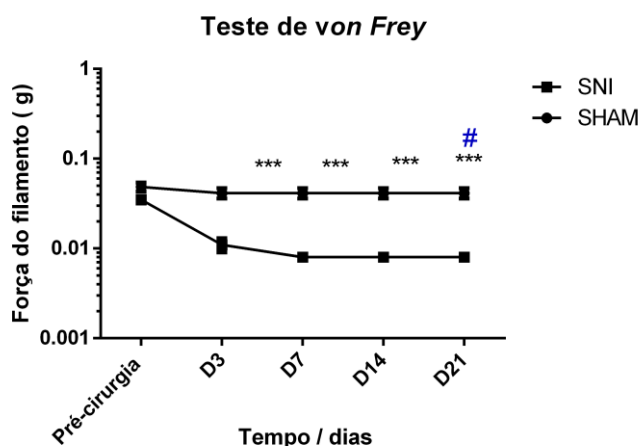


Figura XXV- Limiar de resposta a estímulos mecânicos avaliado pelo teste de *von Frey* ao longo do período experimental. O teste foi realizado antes da cirurgia (pré-cirurgia) e aos 3, 7, 14 e 21 dias após cirurgia. Valores apresentados como média±SEM. Teste 2-way ANOVA para cada tempo experimental para comparação dos grupos (*Sham*; n=7) e (SNI; n=8); \*\*\*  $p < 0.001$ .

### b) Frequência de resposta

A frequência de resposta à aplicação de cada filamento antes da indução do SNI (Dia 0) era idêntica nos dois grupos experimentais (Figura XXVI-A). Observou-se que a frequência de resposta nos animais de ambos os grupos experimentais aumentava proporcionalmente à força aplicada por cada filamento; ao filamento de menor calibre (i.e. filamento 0.008g ou -2,1 valor do logaritmo) a frequência de resposta era inferior a 4% (*sham*:  $1,4 \pm 1,4$ ; SNI:  $3,75 \pm 1,8$ ) enquanto ao filamento de maior calibre (i.e. filamento 4g ou 0,6 valor do logaritmo) a frequência de resposta era próxima dos 100% (*sham*:  $97,1 \pm 1,8$ ; SNI:  $98,7 \pm 1,25$ ). Após indução do SNI, ao dia 3, tal como no Dia 0, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura XXVI.B), embora seja importante salientar que se verificou em ambos os grupos um pequeno aumento da frequência de resposta aos filamentos de menor calibre comparativamente ao

Dia 0 (*i.e.* filamento 0.008g ou -2,1 valor do logaritmo no Dia 0- *sham*: 1,4±1,4; SNI: 3,75±1,8; no Dia 3- *sham*: 7,1±1,8; SNI: 16,25±2,6).

A partir do dia 7 após indução do SNI e até ao dia 21, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos experimentais. No grupo SNI a frequência de resposta aos filamentos de menor calibre foi aumentando progressivamente ao longo do tempo sendo superior á frequência de resposta obtida para o grupo *sham* (*i.e.* filamento 0.008g ou -2,1 valor do logaritmo no dia 7- *Sham*: 4,28±2,0; SNI: 23,7±2,6; dia 14-*Sham*: 1,4±1,4; SNI: 38,75±2,9; dia 21- *Sham*: 4,28±2,97; SNI: 53,7±2,6).

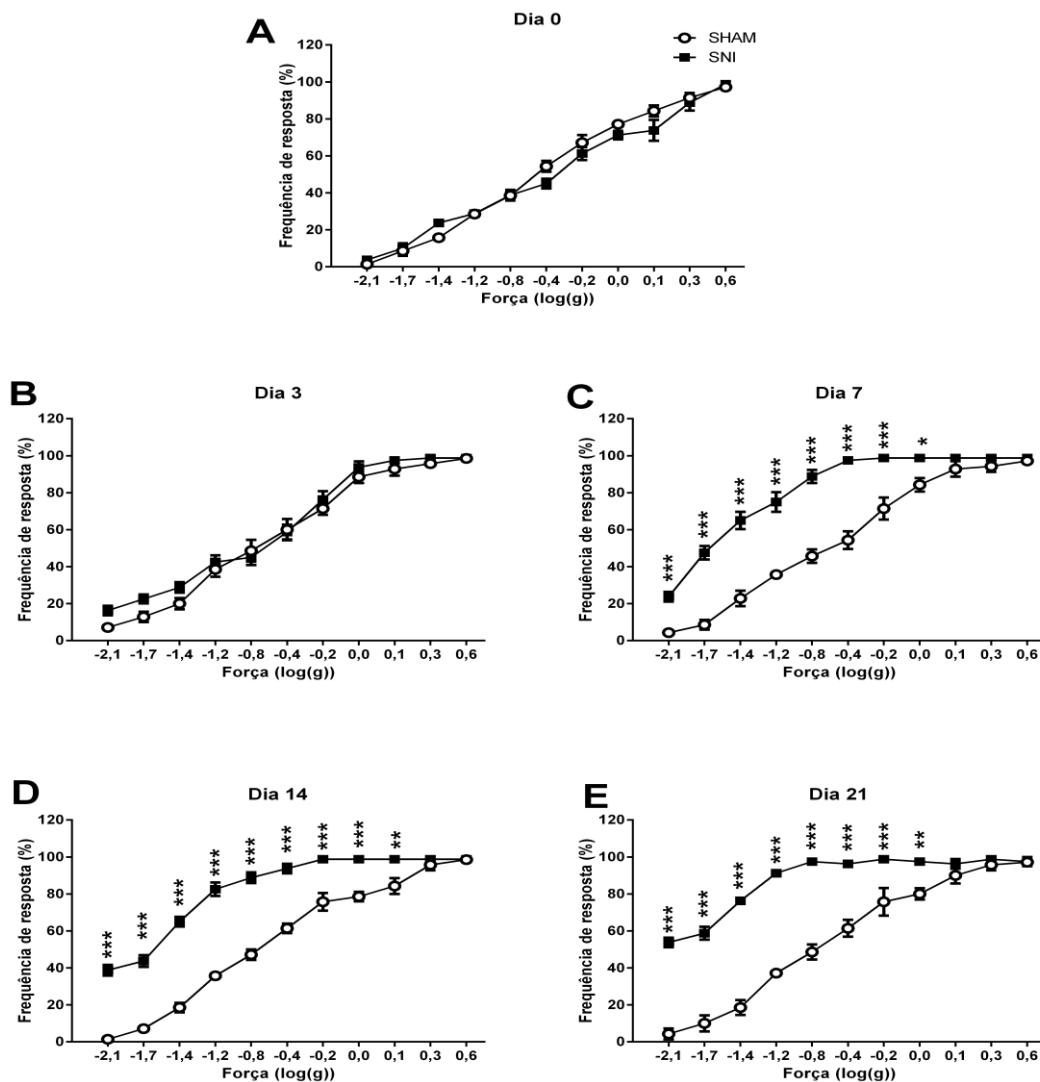


Figura XXVI Frequência de resposta à aplicação dos filamentos de *von Frey* antes da indução do modelo SNI (A; Dia 0) e aos 3 (B; Dia 3), 7 (C; Dia 7), 14 (D; Dia 14) e 21 (E; Dia 21) dias após indução do modelo SNI. Valores apresentados como média ±SEM. Teste 2-way ANOVA para cada tempo experimental para comparação dos grupos (*Sham*; n=7) e (SNI; n=8); \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 5. Avaliação de ansiedade e/ou depressão

### i. Teste de *open field*

No teste de *open field* não foram observadas diferenças significativas entre os grupos *Sham* e SNI (*Sham*: 743,3±70,0; SNI: 680,0±78,0,  $p = 0,6158$ ), indicando que não existem diferenças na atividade locomotora entre os dois grupos (figura XXVII).

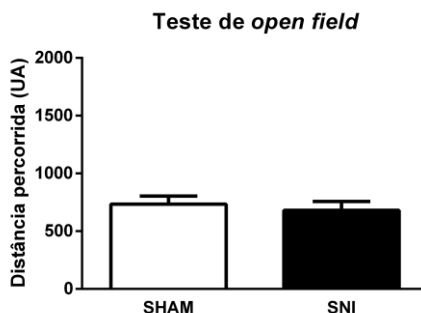


Figura XXVII- Distância percorrida avaliada pelo teste de *open field*. Valores apresentados como média±SEM. Teste t não emparelhado para comparação entre os grupos (*Sham*; n=7) e (SNI; n=8). Não foram encontradas diferenças significativas.

### ii. Teste de *elevated plus maze*

No teste de *elevated plus maze* não foram observadas diferenças significativas entre os grupos *Sham* e SNI relativamente ao tempo de permanência nos braços fechados (*Sham*: 72,86±5,95%; SNI: 82,28±3,58%,  $p = 0,1857$ ), no centro (*Sham*: 15,23±3,34%; SNI: 10,32±15,65%,  $p=0,1762$ ), nem nos braços abertos (*Sham*: 12,02±3,17%; SNI: 7,37±2,54%,  $p = 0,2686$ ). (Figura XXVIII)

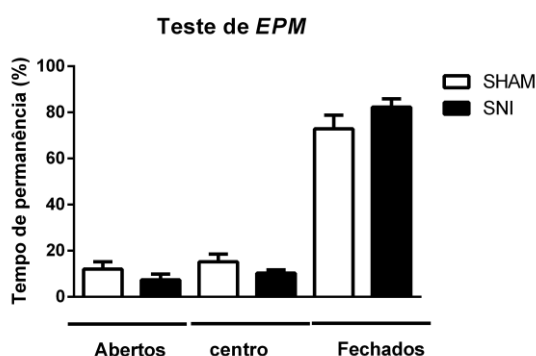


Figura XXVIII- Percentagem de tempo de permanência nas diferentes áreas da plataforma usada no teste *elevated plus maze*. Valores apresentados como média±SEM. Teste t não emparelhado para comparação entre os grupos (*Sham*; n=7) e (SNI; n=8). Não foram encontradas diferenças significativas

### iii. Teste de *marble burying*

O teste de *marble burying* serviu como medida de avaliação de ansiedade mediante a quantificação do número de berlindes escondidos. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo SNI e o grupo *sham* (*sham*: 14,71±0,92 berlindes; SNI: 11,63±1,46 berlindes,  $p = 0,1078$ ).

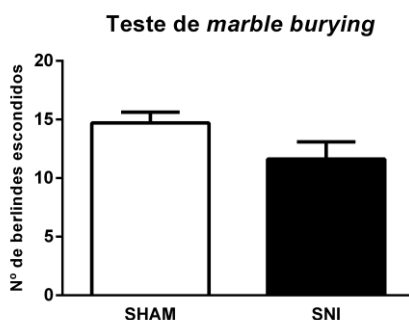


Figura XXIX- Número de berlindes escondidos teste *marble burying*. Valores apresentados como média±SEM. Teste t não emparelhado para comparação entre os grupos SHAM (N=7) e SNI (N=8). Não foram encontradas diferenças significativas.

### iv. Teste de *forced swimming*

No teste de *forced swimming* usou-se como medida de avaliação o tempo de imobilidade, não tendo sido observadas diferenças significativas entre os grupos SHAM e SNI (SHAM: 122,9±16,4 s; SNI: 150,0±8,3 s,  $p = 0,1477$ ). (Figura XXX)

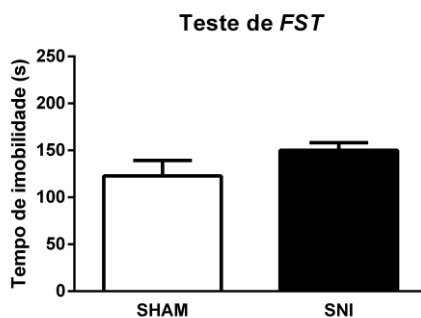


Figura XXX- Tempo de imobilidade no teste de *forced swimming*. Valores apresentados como média±SEM. Teste t não emparelhado para comparação entre os grupos (*sham*; n=7) e (SNI; n=8). Não foram encontradas diferenças significativas.

### v. pERKs

No CCA dos animais SNI verificou-se um aumento estatisticamente significativo do número de células imunorreativas (IR) às pERK1/2 comparativamente ao observado nos animais *Sham* (*Sham*:  $25,3 \pm 5,5$  células IR; SNI:  $69,5 \pm 16,5$  células IR,  $p = 0,0345$ ). Na região da AMYG, também foi observado um maior número estatisticamente significativo de células marcadas para pERK1/2 no grupo SNI comparativamente ao *Sham* (*Sham*:  $60,8 \pm 36,4$  células IR; SNI:  $153,9 \pm 36,4$  células IR,  $p = 0,0389$ ). (Figura XXXI).

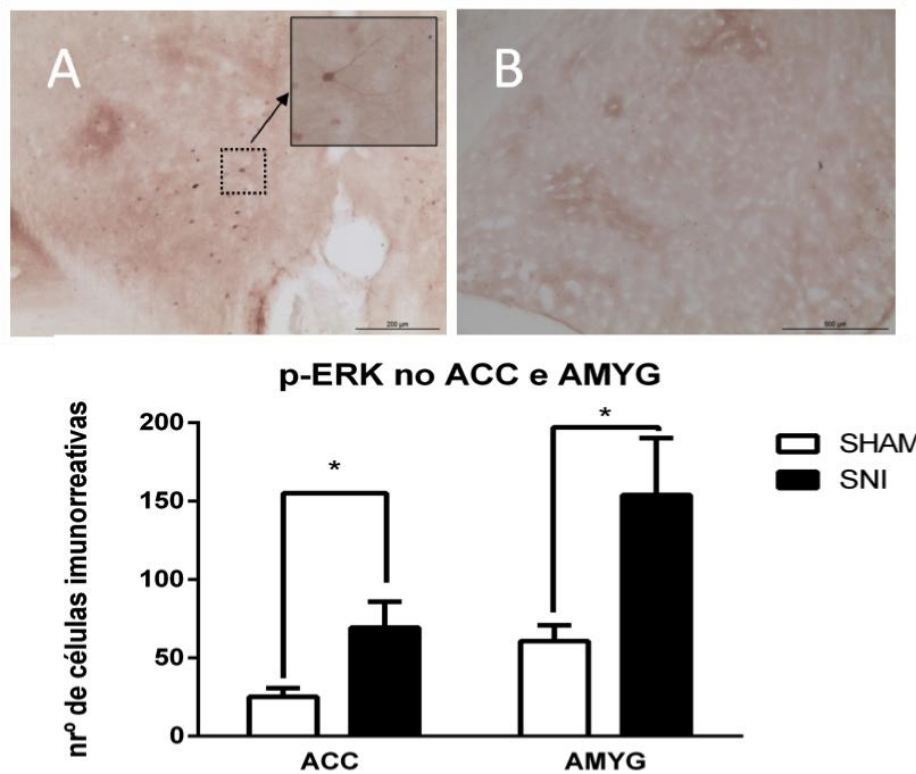


Figura XXXI- Número de células imunorreativas para pERK1/2 no ACC e na AMYG de animais *Sham* ou SNI. Os valores estão apresentados como média±SEM e representam o número de células contadas para cada um dos núcleos nos dois hemisférios encefálicos (avaliação bilateral).

## 6. Efeito dos testes de nocicepção nos testes de ansiedade e/ou depressão

### i. Teste de *open field*

No teste de *Open field* o grupo CTR percorreu uma distância superior ao grupo NAÏVE-sem nocicepção (CTR: 1509,0±139,7; NAÏVE-sem noc.: 876,7±88,7;  $p = 0,0081$ ). (Figura XXXII)

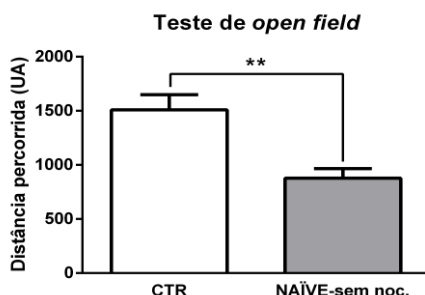


Figura XXXII- Distância percorrida pelos animais no teste de *Open field*. Valores apresentados como média±SEM. Teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos; (CTR;=4) e (NAÏVE-sem noc.; n=7); \*\*  $p<0.01$ .

### ii. Teste de *elevated plus maze*

No teste de *Elevated plus maze* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CTR e NAÏVE-sem nocicepção relativamente à percentagem de tempo de permanência nos braços fechados (CTR.: 90,89±6,28%; NAÏVE-sem noc.: 79,87±2,70%;  $p = 0,22303$ ) e no centro (CTR: 6,29±4,34%; NAÏVE-sem noc.: 11,27±1,64%;  $p = 0,2970$ ). O tempo de permanência nos braços abertos foi superior no grupo NAÏVE-sem noc. (CTR.: 2,73±1,99%; NAÏVE-sem noc.: 8,83±1,46%;  $p = 0,0242$ ) (Figura XXXIII).

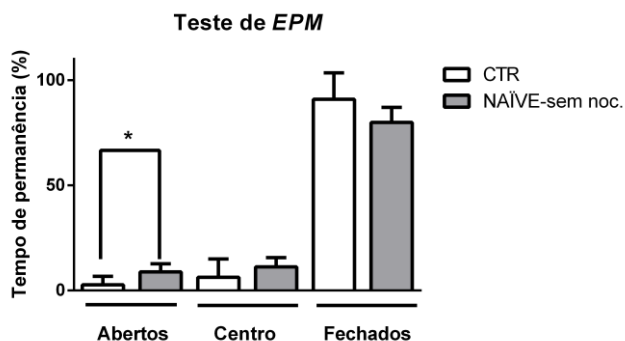


Figura XXXIII- Percentagem de tempo de permanência nas diferentes áreas da plataforma usada no teste *Elevated plus maze*. Valores apresentados como média±SEM. Teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos; (CTR; n=4) e (Naive-sem noc.; n=7), \*  $p<0.05$ .

### iii. Teste de *marble burying*

No teste de *Marble burying* não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos (CTR:  $7,0 \pm 1,8$  berlindes; NAÏVE-sem noc.:  $8,0 \pm 0,5$  berlindes;  $p = 0,9364$ )(Figura XXXIV).

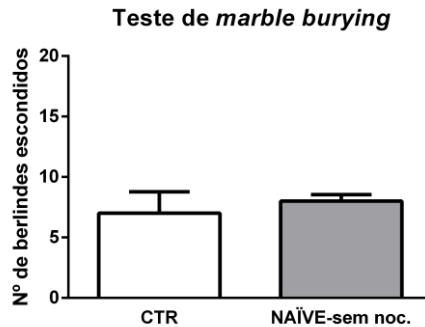


Figura XXXIV- Número de berlindes escondidos no teste *marble burying*. Os valores estão representados como média ± SEM. Teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos; (CTR; n=4) e (Naive-sem noc.; n=8), Não foram encontradas diferenças significativas.

### iv. Teste de *forced swimming*

No teste de *forced swimming* o grupo CTR passou mais tempo imóvel (CTR.:  $200,0 \pm 10,2$ s; NAÏVE-sem noc.:  $122,9 \pm 18,5$ s;  $p = 0,0182$ ). (Figura XXXV).

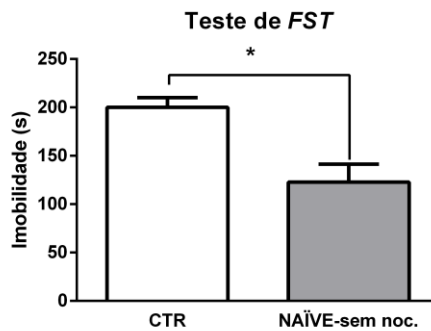


Figura XXXV- Tempo de imobilidade no teste de *forced swimming*. Os valores estão representados como média ± SEM. Teste *Mann-Whitney* para comparação entre os grupos; (CTR; n=4) e (Naive-sem noc. ;n=8), \*  $p < 0.05$ .



## V. Discussão

Este trabalho teve como principais objetivos estabelecer/validar o fenótipo nociceptivo dos modelos STZ e SNI em Ratinho, assim como otimizar protocolos de avaliação comportamental relativos a testes de ansiedade e/ou depressão de forma a futuramente estes poderem ser utilizados em estudos com animais transgênicos.

Os resultados obtidos neste trabalho relativamente ao fenótipo nociceptivo estão de acordo com o que está descrito na literatura para estes modelos. Os resultados são sugestivos de que a validação dos dois modelos de dor decorreu com sucesso.

Numa segunda etapa deste trabalho que consistiu na realização da avaliação comportamental relativa a parâmetros ansioso-depressivos, os nossos resultados sugerem que em ambos os modelos de dor não parecem existir comportamentos de ansiedade e/ou depressão nos tempos de patologia em que foi efetuada a respetiva avaliação. No entanto nos resultados obtidos através de imunohistoquímica efetuados para o modelo SNI observou-se um aumento estatisticamente significativo do número de células imunorreativas para pERKs 1/2 nas regiões encefálicas ACC e AMYG.

Num terceiro estudo efetuado com o intuito de avaliar o efeito que a avaliação nociceptiva prévia poderia ter nos testes de ansiedade e depressão, os nossos resultados sugerem que parece haver interferência na realização prévia de testes nociceptivos, uma vez que se observaram diferenças significativas em todos os testes efetuados à exceção do teste *marble burying*.

- **Indução dos modelos experimentais e nociceção**

Numa primeira etapa do nosso estudo pretendeu-se implementar dois modelos de dor neuropática em Ratinho. Pelas razões apontadas anteriormente no que refere à escolha dos respetivos modelos, para o efeito foram usados dois modelos animais de dor neuropática: o modelo STZ que mimetiza a condição de DM tipo 1 (Colleoni & Sacerdote, 2010; Gao & Zheng, 2014; King, 2012; Szkudelski, 2012) no Humano e o modelo de neuropatia traumática (SNI) (Decosterd & Woolf, 2000; Klusakova & Dubovy, 2009). Neste estudo a taxa de sobrevivência dos animais após indução dos modelos foi de 100%. Neste trabalho optou-se por avaliar parâmetros referentes ao bem-estar animal, nomeadamente efetuaram-

se pesagens frequentes para ambos os modelos, assim como a monitorização regular das glicemias no grupo STZ.

Apesar de não terem sido avaliados o consumo de comida e água, sabe-se de experiências prévias que nos animais STZ existe um aumento do consumo de água comparativamente aos animais CTR (Tesch & Allen, 2007). Esta situação implicou a implementação de cuidados acrescidos de manejo para garantir o bem-estar dos animais, incluindo a mudança mais frequente das camas e o aumento do número de folhas de papel absorvente (enriquecimento ambiental) sobre a cama, para atenuar o impacto da poliúria e das fezes de menor consistência nos animais.

No modelo STZ observou-se que os animais pertencentes ao grupo experimental sujeito ao protocolo de injeções i.p com STZ desenvolveram hiperglicemia após a indução do modelo e os níveis da concentração de glicose no sangue mantiveram-se elevados até ao final do estudo (oitava semana), tal como descrito na literatura (Gao & Zheng, 2014; Lenzen, 2008) comprovando a condição de DM tipo 1. Tal como referido anteriormente o peso dos animais foi monitorizado no decorrer da experiência e observou-se que nos animais STZ houve perda ponderal acentuada desde a indução até às quatro semanas, estabilizando posteriormente até ao final da experiência (oitava semana), comparativamente aos animais CTR em que se observou ganho ponderal no decorrer da experiência. Tem sido descrito por outros autores perda ponderal associada à indução do modelo STZ (Szkudelski, 2012); (Gao & Zheng, 2014).

No modelo SNI também foi observada perda ponderal nos animais SNI comparativamente ao grupo *Sham*. No que refere a este modelo foi tida especial atenção para comportamentos de autotomia uma vez que está descrito na literatura a frequência da observação desse comportamento em modelos de lesão traumática (Wall et al., 1979), no entanto no nosso estudo não foram observados estes comportamentos.

Em ambos os modelos usados neste trabalho observou-se a existência de sinais de alodínia mecânica através do teste de *von Frey*. No modelo experimental STZ observaram-se diferenças significativas entre os grupos experimentais CTR e STZ desde a segunda semana mantendo-se, ainda que com flutuações, até à oitava semana após a indução. Os resultados obtidos estão de acordo com o que está descrito para este modelo experimental (Attal et al., 2008; Barrot, 2012; Colleoni & Sacerdote, 2010; Morgado & Tavares, 2007).

No modelo experimental SNI optou-se por avaliar dois parâmetros distintos no teste de *von Frey*, nomeadamente o limiar de resposta ao longo do tempo (dia 0 a dia 21 após a cirurgia) e a frequência relativa da resposta obtida para cada filamento (Bourquin et al., 2006). Os resultados obtidos estão de acordo com o descrito na literatura (Bourquin et al., 2006; Colleoni & Sacerdote, 2010; Sandkuhler, 2009; Sorkin & Yaksh, 2009). O limiar de resposta permitiu detetar a existência de alodínia desde os três dias após a indução do modelo, contudo a avaliação da frequência da resposta obtida para cada filamento ao longo do tempo permitiu determinar com mais precisão a instalação e a evolução da alodínia mecânica. A avaliação da frequência de resposta aos filamentos será útil para analisar de forma mais precisa a instalação e a progressão da alodínia mecânica nos animais *knock out*.

No modelo STZ, foram descritas alterações da sensibilidade térmica ao calor, nomeadamente hiperalgesia térmica em tempos mais curtos (2 a 8 semanas) e hipoalgesia térmica em tempos mais prolongados do modelo STZ (Barrot, 2012; Colleoni & Sacerdote, 2010; Gao & Zheng, 2014). De forma a avaliar alterações na sensibilidade ao calor no modelo STZ utilizamos o teste de *hot plate*. Não observamos diferenças significativas entre os grupos CTR e STZ, contudo verificamos que ambos os grupos apresentavam um aumento significativo do tempo de latência à resposta aos diferentes tempos após indução do modelo comparado com a pré-indução. Estes resultados traduzem o desenvolvimento de hipoalgesia nos animais de ambos os grupos. Este resultado pode ser devido a vários fatores, um deles é o fenómeno de aprendizagem por parte dos roedores, que uma vez expostos a um estímulo aversivo, podem demonstrar alterações do tempo de latência em exposições posteriores ao mesmo teste, não sendo desta forma aconselhável a repetição do teste como foi realizado neste estudo (Le Bars et al., 2001). No entanto, não é a causa mais provável uma vez que o teste de *hot plate* foi realizado apenas de duas em duas semanas. Por outro lado o fato de expor o animal várias vezes ao estímulo aversivo pode por si só induzir *stress*, que tal como descrito por alguns autores, pode induzir analgesia. (Butler & Finn, 2009; Vachon-Presseau et al., 2013; Yilmaz et al., 2010). É importante salientar que apesar de não ter sido quantificado o número de bolos fecais e micções, foi observado um número aumentado de bolos fecais durante a realização dos testes o que pode ser indicativo de *stress* (Hall, 1934).

O teste de *hot plate* convencional é realizado a uma temperatura fixa e procede-se à quantificação do tempo de latência após a exposição ao estímulo térmico aversivo até à obtenção da resposta, no entanto esta técnica tem as suas desvantagens nomeadamente

porque não permite distinguir alodínia de hiperalgisia e tem sido observado por alguns autores que animais sujeitos a baterias de testes maiores, o tempo de latência pode estar diminuído para este teste (McIlwain, Merriweather, Yuva-Paylor, & Paylor, 2001). Uma boa alternativa seria futuramente executar o teste *dynamic hot plate*, no qual existe variação de temperatura permitindo desta forma anotar os diferentes comportamentos de resposta às diferentes temperaturas e assim distinguir alodínia de hiperalgisia. Permitiria ainda possivelmente estabelecer uma cronologia de execução dos testes mais adequada de acordo com o decurso da patologia (Yalcin, Charlet, Freund-Mercier, Barrot, & Poisbeau, 2009).

Embora esteja descrito na literatura que no modelo experimental SNI se verifica alodínia ao frio (Decosterd and Woolf, 2000) não foi feita essa avaliação neste modelo para não submetermos os mesmos grupos experimentais a uma bateria de testes exagerada que poderia causar *stress* e desta forma influenciar os resultados (McIlwain et al., 2001).

- **Ansiedade e depressão**

Na literatura encontra-se descrito por alguns autores a associação entre dor neuropática, *stress* e ansiedade, assim como uma tendência para o desenvolvimento de transtornos ansioso-depressivos nos modelos experimentais de dor neuropática (Doan et al., 2015; Yalcin et al., 2014). Com base nesses achados, no presente estudo foram efetuados testes para avaliar comportamentos indicativos de ansiedade e depressão nos modelos STZ e SNI. Os testes utilizados na avaliação de parâmetros relacionados com ansiedade e depressão são extremamente sensíveis às condições ambientais e exigem portanto otimização das condições do biotério. É importante salientar que estes testes foram realizados pela primeira vez no departamento como já foi referido, tendo este trabalho como principal objetivo otimizar as condições de execução dos testes de forma a posteriormente transpor este estudo a animais transgênicos.

- **Avaliação dos comportamentos de ansiedade e depressão nos modelos de dor neuropática STZ e SNI**

O teste *open field* comumente usado na avaliação da função locomotora foi utilizado neste estudo de forma a avaliar se os animais apresentam alterações na locomoção derivadas da

patologia, ou de comportamentos ansiosos associados, ou não, à patologia (Denenberg, 1969). O parâmetro de avaliação utilizado é a distância percorrida pelos animais durante o tempo de teste. Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos experimentais em ambos os modelos de dor, o que poderá ser indicativo de que os animais não apresentam problemas locomotores. Contudo é de salientar que os valores obtidos para a locomoção no modelo SNI foram inferiores aos obtidos no modelo STZ. Alguns autores defendem que em modelos sujeitos a lesões traumáticas os animais tendem a percorrer uma menor distância devido à dor sentida ao caminhar sob o membro afetado pela cirurgia (Mogil et al., 2010). Contudo, para além de medir a locomoção este teste é também usado para avaliar comportamentos de ansiedade. Nesse sentido os resultados aqui obtidos nos animais SNI face aos animais *Sham* podem ter sido influenciados pelo estado de ansiedade dos animais, uma vez que os animais *Sham* deveriam apresentar valores superiores aos dos animais SNI, o que também não se verificou.

De forma a avaliar a ansiedade foram utilizados os testes *elevated plus maze* e *marble burying*. No teste *elevated plus maze* o parâmetro de avaliação usado é o tempo de permanência nos diferentes braços da plataforma (*i.e.* braços abertos, centro e fechados), com o intuito de expor o animal a estímulos que lhe são naturalmente aversivos como a altura e os espaços abertos. O facto do animal preferir o espaço fechado e explorar menos o espaço aberto pode ser indicador de ansiedade (Shepherd, Grewal, Fletcher, Bill, & Dourish, 1994), enquanto que o tempo de permanência no centro pode indicar uma certa indecisão e incapacidade na toma de decisões.

Os tempos de permanência nos braços abertos, fechados e centro não foram significativamente diferentes entre os dois grupos experimentais em ambos os modelos de dor. No entanto é importante referir que em ambos os modelos de dor os animais apresentaram uma percentagem de tempo de permanência nos braços abertos inferior a 20%. Outro facto que é importante referir é que o nosso controlo interno de validação das condições de teste (o animal injetado com venlafaxina<sup>®</sup>, que serve de referência uma vez que são excluídos comportamentos ansiosos ou depressivos com este fármaco (Berrocoso, 2009) também não explorou os braços abertos como seria expectável. Estes valores não vão de encontro ao que se encontra descrito na literatura (Paterson, Iwunze, Davis, Malekiani, & Hanania, 2010), o que sugere que as condições do teste não estão completamente otimizadas sendo necessário corrigir algumas condições, como por exemplo as condições de luz, uma vez que a luz é um fator que condiciona a exploração de

uma determinada área. Uma alternativa interessante ao *elevated plus maze* a utilizar em futuros estudos seria teste *elevated zero maze*. Este é um teste análogo ao *elevated plus maze*, mas com a vantagem da forma *zero* que remove qualquer ambiguidade na interpretação do tempo de permanência no centro como acontece no teste *elevated plus maze*.

No teste *marble burying* a avaliação dos níveis de ansiedade realizou-se através da quantificação do número de berlindes escondidos pelos animais. Esta medida permite avaliar os níveis de ansiedade, uma vez, que quando iluminados os berlindes refletem a luz, um estímulo que naturalmente é aversivo para roedores, criando desta forma uma situação de ansiedade causada pelo elemento estranho. A reação do animal passa normalmente pelo enterro dos berlindes na cama da gaiola como uma medida defensiva perante um estímulo aversivo. No contexto do teste comportamental os animais escondem o maior número possível de berlindes de acordo com os seus níveis de ansiedade (De Boer & Koolhaas, 2003). No entanto, alguns autores argumentam que o comportamento de “enterramento” reflete um comportamento repetitivo (obsessivo-compulsivo) (Thomas et al., 2009).

O número de berlindes escondidos pelos animais não foi significativamente diferente entre os dois grupos experimentais em ambos os modelos de dor. No entanto verificou-se que no modelo SNI os animais (*Sham* e SNI) escondem um número mais elevado de berlindes comparativamente aos animais do modelo STZ e a animais CTR de outros estudos, o que sugere que os animais (*Sham* e SNI) no modelo SNI possam estar ansiosos (Yalcin et al., 2011). Estes resultados podem ser explicados pelo facto de animais pertencentes a cada um dos grupos *Sham* ou SNI terem sido alojados conjuntamente nas mesmas caixas após as cirurgias onde se mantiveram até ao fim da experiência. Nos últimos anos foram publicados estudos que demonstram que os roedores, tal como os humanos sentem empatia quando confrontados com a dor de outros (Mogil, 2012). Os animais emitem vocalizações e libertam odores que são percebidos pelos outros animais como sinais de *stress* e que poderão modular a sensibilidade ao *stress* e ansiedade dos animais que os percebem (Martin, Tuttle, & Mogil, 2014; Mogil, 2012). De futuro seria necessário alojar os animais *Sham* e SNI separadamente de forma a evitar um possível efeito de empatia entre os animais.

Relativamente aos resultados esperados quanto ao desenvolvimento de ansiedade nos dois modelos de dor, no modelo de dor STZ, alguns estudos publicados sugerem que os animais

diabéticos desenvolvem alterações comportamentais associadas à ansiedade e depressão em fases precoces de patologia após a indução do modelo. Curiosamente Ho et. Al. (2012), num estudo realizado em ratinhos STZ observaram que o comportamento dos animais em testes de ansiedade e depressão realizados às duas semanas após a indução do modelo foram indicadores da existência de depressão, uma vez que os animais STZ no teste de *tail suspension* (teste usado na avaliação de depressão) apresentavam maior tempo de imobilidade comparativamente aos animais controlo. No entanto nos testes de avaliação de ansiedade pelo teste de *zero maze* não foram observadas diferenças significativas, sugerindo que embora os animais pudessem estar deprimidos não estariam ansiosos. Estes autores descrevem no mesmo estudo, que uma semana após a administração de insulina nos animais STZ estes comportamentos foram revertidos (Ho, Balu, Hilario, Blendy, & Lucki, 2012).

Em estudos realizados por outros autores no modelo STZ em rato observaram sinais de ansiedade às duas semanas após a indução do modelo no teste de *elevated plus maze* (Aksu et al., 2012). Estes autores descrevem associado aos resultados comportamentais demonstrativos de ansiedade a diminuição da densidade neuronal no PFC, assim como diminuição dos níveis sanguíneos e tecidulares de IGF-1 (do inglês *insulin growth factor*). A atividade da enzima superóxido dismutase observou-se estar aumentada. Estes dados sugerem que o *stress* oxidativo pode afetar negativamente os níveis sanguíneos e tecidulares de IGF-1 no PFC e contribuir para o aparecimento de comportamentos de ansiedade (Aksu et al., 2012). Apesar de alguns autores verem em tempos de patologia precoces comportamentos de ansiedade é importante referir que não existem ainda muitos estudos realizados com a estirpe de ratinhos usada neste estudo (C57/BL6), e os resultados desses estudos são ainda controversos relativamente ao tempo de desenvolvimento de ansiedade. É de salientar que embora nestes estudos referidos anteriormente usem o modelo STZ, o protocolo de indução foi ligeiramente diferente, consistindo numa única injeção, enquanto que no nosso trabalho utilizamos um protocolo de indução “*low dose*”, que consiste em administrar o STZ em doses menores durante cinco dias consecutivos, sendo por isso menos agressivo. Não existem estudos na literatura que refiram se os protocolos de indução de STZ afetam o comportamento dos animais, no entanto seria pertinente investigar estes aspetos.

No modelo de dor SNI resultados obtidos no rato no teste *open field*, que também pode ser usado para avaliar ansiedade, mostraram que os animais apresentavam sinais de ansiedade

desde as três semanas após indução do modelo (Iriana Galan-Arrieroa, 2015). Em contraste, dois estudos relataram ansiedade no teste *elevated plus maze* apenas às quatro semanas após indução do modelo (Matsuzawa-Yanagida et al., 2008; Narita et al., 2006). Num outro estudo no mesmo modelo, mas realizado em rato, os autores descrevem a observação de comportamentos de ansiedade no teste de *open field* a partir das cinco semanas após indução no modelo. Os mesmos autores referem que no teste de *elevated plus maze* só foram observados comportamentos sugestivos de ansiedade vinte semanas após a indução. A apoiar estes dados verificou-se uma diminuição do volume do PFC e da Ínsula, o que sugere que a dor neuropática a longo prazo tem efeitos generalizados na anatomia do cérebro relacionado com a duração e magnitude da dor. (Seminowicz et al., 2009).

Num estudo de Leite-Almeida et. Al. (2009) realizado com o objetivo de correlacionar a idade no impacto da dor crónica, estes autores realizaram uma bateria de testes muito semelhante à realizada no nosso trabalho com o intuito de avaliar parâmetros ansioso-depressivos em grupos experimentais de animais com idades compreendidas entre os três, dez e vinte e dois meses, sendo que todos os grupos foram testados um mês após a cirurgia SNI. No nosso estudo utilizamos animais com cerca de quatro meses, ou seja, animais jovens. Comparando os nossos resultados com os resultados que estes autores descrevem, vemos muitas semelhanças. Tal como no nosso trabalho em animais jovens os autores não observaram diferenças significativas entre os grupos experimentais nos testes de *open field*, contudo foram observadas diferenças significativas num grupo de animais mais velhos (Leite-Almeida et al., 2009). Em experiências preliminares que realizamos num pequeno grupo experimental (n=2) executamos a cirurgia SNI em animais mais velhos e só os testamos três meses após a cirurgia. Observamos que esses animais percorriam uma distância inferior aos animais mais jovens, no entanto não é possível tirarmos conclusões, devido ao facto de serem apenas dois animais. Contudo e interpretando de acordo com os resultados obtidos por estes autores para animais mais velhos, isto pode ser indicador de que a idade pode interferir ao nível da intensificação dos problemas locomotores, mas também que tempos de patologia superiores podem ter interferência ao nível de manifestações de comportamentos ansiosos. Estes autores observaram diferenças significativas no teste de *elevated plus maze* no grupo de animais jovens (Leite-Almeida et al., 2009), ao passo que no nosso trabalho não observamos diferenças, no entanto é importante referir que pelos motivos referidos anteriormente as condições do teste *elevated plus maze* não parecem estar ainda otimizadas.

Na avaliação de comportamentos indicativos de depressão utilizamos o teste *forced swimming*. O teste é centrado essencialmente na avaliação do tempo que o animal se mantém imóvel, uma vez que perante a ameaça do afogamento, o animal tem duas hipóteses ou movimenta-se e luta pela sobrevivência ou se mantém imóvel, sendo isso considerado como um comportamento de resignação, estando associado a fenótipos depressivos (Cryan, Valentino, & Lucki, 2005; Porsolt et al., 1977).

No modelo SNI é importante salientar que foi observada nos animais SNI uma leve tendência para permanecer mais tempo imóveis comparativamente aos animais *Sham*, o que sugere que os animais com dor neuropática devida à lesão periférica traumática possam estar mais deprimidos, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Os grupos experimentais deste modelo foram submetidos ao teste *forced swimming* à quarta semana após a sua indução, contudo noutros modelos de lesão traumática o desenvolvimento de sintomas depressivos pode ocorrer em tempos mais tardios, nomeadamente a partir da oitava semana (Yalcin et al., 2011). Outros autores em tempos de patologia semelhantes aos nossos também não observaram diferenças significativas (Leite-Almeida et al., 2009). No nosso estudo observamos que o grupo experimental de apenas dois animais testado três meses após a cirurgia SNI apresentaram um tempo de imobilidade superior, o que pode ser sugestivo do que está descrito por outros autores, do aparecimento de sintomas depressivos em tempos mais tardios de patologia.

Os estudos comportamentais apresentados nesta tese não permitem aferir o desenvolvimento de comportamentos indicativos de ansiedade e depressão nos modelos de dor, provavelmente, porque é necessário continuar a otimizar as condições de realização dos testes. Contudo, no modelo SNI é muito provável que desde as quatro semanas após indução se desenvolvam esses comportamentos tal como é sugerido por alguns estudos (Iriana Galan-Arrieroa, 2015; Matsuzawa-Yanagida et al., 2008; Narita et al., 2006) e pela contagem de células imunorreativas para o marcador de ativação celular pERK1/2 (G. Borges et al., 2015) nas regiões do ACC e da AMYG. De facto, nestas regiões, foi observado um aumento significativo do número de células imunorreativas para pERK1/2 nos animais SNI comparativamente aos animais *Sham*, o que sugere uma forte ativação de áreas encefálicas envolvidas no processamento da componente emocional/afetiva da dor às quatro semanas após indução do modelo. Estes dados estão de acordo com numerosos estudos que mostram haver ativação das ERKs 1/2 nestes e noutros núcleos encefálicos envolvidos na componente afetivo-emocional e nos mecanismos subjacentes às condições

ansioso-depressivas, e que esta ativação se encontra muitas vezes correlacionada com comportamentos observados nos animais indicativos de ansiedade e/ou depressão (G. Borges et al., 2015). Sabe-se que as ERKs 1 / 2 são um biomarcador promissor e que a sua ativação tem sido observada em áreas encefálicas implicadas tanto na modulação da dor como em áreas relacionadas com o processamento afetivo da dor, nomeadamente a amígdala o ACC, IC entre outras (G. Borges et al., 2015).

- **Efeito da avaliação nociceptiva nos testes comportamentais para avaliação de ansiedade e/ou depressão**

Vários estudos sugerem que animais sujeitos a grandes baterias de testes apresentam índices de *stress* mais elevados (Barrot, 2012; Le Bars et al., 2001) o que pode interferir com a realização dos testes comportamentais para avaliação da ansiedade e/ou depressão. No entanto um estudo sobre o efeito das baterias de testes no comportamento animal em que se comparou animais *naïve* com animais sujeitos a uma bateria de testes, observou que os animais *naïve* apresentavam uma tendência a serem mais ativos quando testados, porém não sendo significativa a diferença (McIlwain et al., 2001). Num outro estudo acerca da importância do intervalo de tempo entre testes, os autores demonstraram que não haviam diferenças significativas entre espaçar mais os testes ou espaçar apenas em um a dois dias (Paylor, Spencer, Yuva-Paylor, & Pieke-Dahl, 2006).

No presente trabalho os testes para avaliar comportamentos indicativos de ansiedade e depressão foram realizados em animais previamente testados ao longo do tempo para avaliação do comportamento nociceptivo (testes de *von Frey* e *hot plate*), uma vez que para validação da indução dos modelos de dor isso se revelava crucial. Assim, tendo em conta a possível interferência dos testes nociceptivos na realização dos testes de ansiedade e depressão efetuamos num grupo adicional de animais *naïve* a bateria de testes de ansiedade e/ou depressão e comparamos com um grupo de animais saudáveis previamente submetidos a avaliação nociceptiva e subsequentemente avaliação de ansiedade e/ou depressão. Este estudo teve como intuito estudar a influência da realização dos testes nociceptivos a precederem em alguns dias os testes para avaliação comportamental da ansiedade e da depressão.

No teste de *open field* observou-se que os animais não submetidos previamente a testes nociceptivos percorreram uma distância inferior. Os animais sujeitos a testes de nocicepção apresentam valores mais aceitáveis de acordo com o que está descrito na literatura para este teste. Uma hipótese que pode apoiar os resultados obtidos e para o facto de os animais não sujeitos a testes de nocicepção previamente não apresentarem valores de acordo com o descrito para animais *naïve*, pode ser, porque os animais não estão habituados à manipulação, enquanto que os animais previamente sujeitos a testes de nocicepção foram mais manipulados e estavam portanto mais habituados ao *stress* dos testes e ao experimentador (Mogil et al., 2010). Embora no presente estudo o número de bolos fecais não tenha sido contabilizado, futuramente esta poderá ser uma medida útil, na medida em que é uma medida indicadora dos níveis de *stress* (Hall, 1934).

No teste *elevated plus maze* detetaram-se diferenças estaticamente significativas entre os dois grupos experimentais relativamente ao tempo de permanência nos braços abertos da plataforma. O grupo sujeito previamente a testes nociceptivos apresentou uma percentagem de tempo de permanência inferior nos braços abertos, o que sugere que estes animais estariam mais ansiosos quando comparados com os animais do grupo não sujeito a nocicepção.

No teste *marble burying* que também avalia ansiedade, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais, sugerindo que para este teste não parece haver interferência na realização de avaliação nociceptiva previamente.

No teste *forced swimming* observaram-se diferenças significativas entre os dois grupos experimentais, sendo que o grupo sujeito previamente a testes de nocicepção apresentou maior tempo de imobilidade. Estes resultados vão de encontro ao que Voikar et. al. (2004) demonstraram num estudo em que os animais sujeitos a baterias de testes maiores, apresentam maior tempo de imobilidade (Voikar, Vasar, & Rauvala, 2004). Estes resultados sugerem que os animais deste grupo estariam mais depressivos. É de salientar que o grupo experimental que não foi sujeito a nocicepção apresentou valores aceitáveis de acordo com o descrito por Yalcin et. Al. (2011) para animais controlo e que o animal injetado com venlafaxina<sup>®</sup> também apresentou valores semelhantes, o que nos faz ter relativa confiança quanto às condições de realização do teste e a sua validação.

Estas experiências demonstram que na generalidade os testes de avaliação de ansiedade e depressão usados neste trabalho, com exceção do teste de *marble burying*, são sensíveis à

execução prévia e repetida de testes nociceptivos como descrito por alguns autores (McIlwain et al., 2001; Voikar et al., 2004).

Uma vez que estamos a trabalhar com modelos experimentais de dor e por isso mesmo o comportamento nociceptivo terá necessariamente que ser avaliado nestes animais, é necessário ainda otimizar os protocolos experimentais, nomeadamente nas questões relacionadas com a distância temporal entre testes e as repetições dos mesmos, para se tentar conjugar, minimizando interferências, a avaliação comportamental nociceptiva e de ansiedade e/ou depressão nos mesmos grupos experimentais. Alternativamente os testes nociceptivos e os testes de ansiedade e depressão poderão ser feitos em grupos experimentais independentes, mas a desvantagem é que ficará mais complicado estabelecer relação causal entre a dor e essas comorbilidades do foro afetivo-emocional.

- **Considerações gerais à execução de estudos de ansiedade e/ou depressão em modelos de dor**

Outros fatores que são cruciais para a avaliação de comportamentos de ansiedade e depressão é o ambiente do biotério onde são realizados os testes como descrito por alguns autores (Chesler, Wilson, Lariviere, Rodriguez-Zas, & Mogil, 2002). Alguns dos fatores mais importantes verificados neste trabalho e que podem influir os resultados obtidos são a experiência do investigador, revelando-se essencial ser o mesmo experimentador a iniciar e finalizar os testes comportamentais; o desenho experimental ser executado de acordo com a espécie em questão; a acomodação dos animais nas caixas (*i.e* espécies mais sociais podem ficar em *stress* se colocados isolados em caixas); ter especial atenção na verificação da existência de lesões de agressão nos animais (normalmente indicadoras de *stress*); a importância da existência de salas insonorizadas para melhor execução dos testes comportamentais, uma vez que ruídos de fundo podem induzir *stress* nos animais; a existência de luz regulável de modo a efetuar os testes sempre com a mesma luz; coordenar a limpeza das caixas de forma a evitar mudanças em dia de testes; se possível ser sempre o mesmo tratador do início ao fim da experiência; ter em atenção o horário de realização dos testes devido às variações no ritmo circadiano e ainda ter o cuidado de efetuar os testes idealmente no mesmo horário; definir a ordem dos testes mediante o objetivo do estudo tendo sempre em atenção se poderá haver conflito entre os testes. Estes factos são

premissas essenciais á realização de um bom estudo comportamental ao nível da nocicepção, ansiedade e depressão.



## VI. Conclusão e perspectivas futuras

Neste trabalho estabelecemos no departamento dois modelos de dor neuropática em ratinho, nomeadamente o modelo SNI resultante da lesão de nervos periféricos e o modelo de neuropatia diabética induzida através de um protocolo de injeções de STZ para futuro uso em animais transgênicos. Embora ambos os modelos já estivessem estabelecidos no departamento há vários anos em rato, o mesmo não acontecia em Ratinho, tendo sido necessário fazer adaptações nos protocolos de indução dos modelos, particularmente no caso da neuropatia diabética, em função da espécie animal. Foram também feitas adaptações nos protocolos de avaliação do comportamento nociceptivo em ratinho, comparativamente aos normalmente usados em rato, necessários para a validação dos modelos como efetivamente modelos de dor neuropática. Em ambos os modelos, conseguiu-se verificar o desenvolvimento de alodínia e hiperalgesia ao longo do tempo de evolução de cada uma das patologias, de acordo com a literatura. Pretendemos também com este trabalho estabelecer protocolos de avaliação comportamental de ansiedade e depressão validados de acordo com o observado por outros investigadores. Deparámo-nos com vários desafios uma vez que estes protocolos experimentais nunca tinham sido instituídos no departamento até ao momento, nem sequer em rato. Concluimos neste trabalho que as condições de execução dos testes de ansiedade e de depressão, principalmente no que diz respeito aos testes *open field* e *elevated plus maze*, têm ainda de ser otimizadas. Nomeadamente as condições de luz, seria importante estabelecer um sistema de luz regulável de modo a ajustar a luz de forma apropriada às condições de realização de cada teste, outro fator importante seria insonorizar as salas de modo a minimizar o possível conflito entre ruídos de fundo e a execução dos testes. Um outro fator que demonstrou ter alguma importância nomeadamente na realização do teste de *elevated plus maze* foi o fato de um dos braços abertos da plataforma ficar em frente a uma parede branca, sendo que está descrito na literatura que os ratos têm aversão a branco, esse seria mais um fator a melhorar no biotério.

Relativamente aos testes de nocicepção seria importante re-definir os tempos de avaliação para a sensibilidade térmica, de modo a evitar repetir o teste. Como conclusão deste trabalho mostrou-se essencial re-definir os protocolos de avaliação de nocicepção e de ansiedade e depressão. Tendo em conta os resultados obtidos no estudo que executamos com a finalidade de avaliar se a execução prévia de testes de nocicepção influi na realização de testes de ansiedade e depressão será importante futuramente pensar numa

forma de minimizar estes efeitos. De forma a transpor este estudo aos animais transgênicos nos quais será necessário comprovar em cada grupo de animais o fenótipo nociceptivo, isto é, ver se os animais desenvolvem alodínia e hiperalgesia de forma consistente e de acordo com o que tem sido descrito nestes modelos de dor neuropática antes de executarmos testes nociceptivos ou de ansiedade e/ou depressão em grupos experimentais distintos. Para dizermos que a ansiedade e/ou depressão estão associadas ao desenvolvimento e manutenção da dor crónica terão de ser otimizados os tempos de testes e possivelmente realizar os testes de ansiedade e depressão previamente aos testes nociceptivos, sendo essencial espaçar mais no tempo os testes.

## VII. Referências bibliográficas

- Agaliotis, M., Mackey, M. G., Jan, S., & Fransen, M. (2014). Burden of reduced work productivity among people with chronic knee pain: a systematic review. *Occup Environ Med*, *71*(9), 651-659. doi: 10.1136/oemed-2013-101997
- Aksu, I., Ates, M., Baykara, B., Kiray, M., Sisman, A. R., Buyuk, E., . . . Uysal, N. (2012). Anxiety correlates to decreased blood and prefrontal cortex IGF-1 levels in streptozotocin induced diabetes. *Neurosci Lett*, *531*(2), 176-181. doi: 10.1016/j.neulet.2012.10.045
- Attal, N., Fermanian, C., Fermanian, J., Lanteri-Minet, M., Alchaar, H., & Bouhassira, D. (2008). Neuropathic pain: are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion? *Pain*, *138*(2), 343-353. doi: 10.1016/j.pain.2008.01.006
- Auvray, M., Myin, E., & Spence, C. (2010). The sensory-discriminative and affective-motivational aspects of pain. *Neurosci Biobehav Rev*, *34*(2), 214-223. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.07.008
- Azevedo, L. F., Costa-Pereira, A., Mendonca, L., Dias, C. C., & Castro-Lopes, J. M. (2012). Epidemiology of chronic pain: a population-based nationwide study on its prevalence, characteristics and associated disability in Portugal. *J Pain*, *13*(8), 773-783. doi: 10.1016/j.jpain.2012.05.012
- Azevedo, L. F., Costa-Pereira, A., Mendonca, L., Dias, C. C., & Castro-Lopes, J. M. (2014). The economic impact of chronic pain: a nationwide population-based cost-of-illness study in Portugal. *Eur J Health Econ*. doi: 10.1007/s10198-014-0659-4
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, *211*, 39-50. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, *139*(2), 267-284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028
- Bennett, G. J., & Xie, Y. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, *33*(1), 87-107.
- Bennett, R. A., & Pegg, A. E. (1981). Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res*, *41*(7), 2786-2790.
- Berrocioso, E., & Mico, J. A. (2009). Role of serotonin 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect and the antinociceptive effect of venlafaxine in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, *12*(1), 61-71. doi: 10.1017/s1461145708008766
- Borges, G., Berrocioso, E., Mico, J. A., & Neto, F. (2015). ERK1/2: Function, signaling and implication in pain and pain-related anxio-depressive disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *60*(0), 77-92.

- Borges, G., Berrocoso, E., Mico, J. A., & Neto, F. (2015). ERK1/2: Function, signaling and implication in pain and pain-related anxio-depressive disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *60*, 77-92. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.02.010
- Bourquin, A. F., Suveges, M., Pertin, M., Gilliard, N., Sardy, S., Davison, A. C., . . . Decosterd, I. (2006). Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain*, *122*(1-2), 14.e11-14. doi: 10.1016/j.pain.2005.10.036
- Boyle, L. M. (2013). A neuroplasticity hypothesis of chronic stress in the basolateral amygdala. *Yale J Biol Med*, *86*(2), 117-125.
- Bravo, L., Alba-Delgado, C., Torres-Sanchez, S., Mico, J. A., Neto, F. L., & Berrocoso, E. (2013). Social stress exacerbates the aversion to painful experiences in rats exposed to chronic pain: the role of the locus coeruleus. *Pain*, *154*(10), 2014-2023. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.021
- Bravo, L., Mico, J. A., Rey-Brea, R., Perez-Nievas, B., Leza, J. C., & Berrocoso, E. (2012). Depressive-like states heighten the aversion to painful stimuli in a rat model of comorbid chronic pain and depression. *Anesthesiology*, *117*(3), 613-625. doi: 10.1097/ALN.0b013e3182657b3e
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., & Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*, *10*(4), 287-333. doi: S1090-3801(05)00086-8 [pii]  
10.1016/j.ejpain.2005.06.009
- Bridges, D., Thompson, S. W., & Rice, A. S. (2001). Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth*, *87*(1), 12-26.
- Buonocore, M. (2015). Where is hidden the ghost in phantom sensations? *World J Clin Cases*, *3*(7), 542-544. doi: 10.12998/wjcc.v3.i7.542
- Butler, R. K., & Finn, D. P. (2009). Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol*, *88*(3), 184-202. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.04.003
- Callahan, B. L., Gil, A. S., Levesque, A., & Mogil, J. S. (2008). Modulation of mechanical and thermal nociceptive sensitivity in the laboratory mouse by behavioral state. *J Pain*, *9*(2), 174-184. doi: 10.1016/j.jpain.2007.10.011
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, *53*(1), 55-63.
- Chesler, E. J., Wilson, S. G., Lariviere, W. R., Rodriguez-Zas, S. L., & Mogil, J. S. (2002). Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci*, *5*(11), 1101-1102. doi: 10.1038/nn1102-1101
- Closs, S. J., Staples, V., Reid, I., Bennett, M. I., & Briggs, M. (2007). Managing the symptoms of neuropathic pain: an exploration of patients' experiences. *J Pain Symptom Manage*, *34*(4), 422-433. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2006.12.004

- Cohen, S. P., & Mao, J. (2014). Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *Bmj*, *348*, f7656. doi: 10.1136/bmj.f7656
- Colleoni, M., & Sacerdote, P. (2010). Murine models of human neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta*, *1802*(10), 924-933. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.012
- Costigan, M., Scholz, J., & Woolf, C. J. (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*, *32*, 1-32. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*, *29*(4-5), 547-569. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.008
- De Boer, S. F., & Koolhaas, J. M. (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol*, *463*(1-3), 145-161.
- de Leon-Casasola, O. (2011). New developments in the treatment algorithm for peripheral neuropathic pain. *Pain Med*, *12 Suppl 3*, S100-108. doi: 10.1111/j.1526-4637.2011.01160.x
- Decosterd, I., & Woolf, C. J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, *87*(2), 149-158.
- Denenberg, V. H. (1969). Open-field behavior in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci*, *159*(3), 852-859.
- Denk, F., McMahon, S. B., & Tracey, I. (2014). Pain vulnerability: a neurobiological perspective. *Nat Neurosci*, *17*(2), 192-200. doi: 10.1038/nn.3628
- Doan, L., Manders, T., & Wang, J. (2015). Neuroplasticity underlying the comorbidity of pain and depression. *Neural Plast*, *2015*, 504691. doi: 10.1155/2015/504691
- Dogrul, A., Ossipov, M. H., & Porreca, F. (2009). Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res*, *1280*, 52-59. doi: 10.1016/j.brainres.2009.05.001
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, *120*(11), 3760-3772. doi: 10.1172/jci42843
- Duby, J. J., Campbell, R. K., Setter, S. M., White, J. R., & Rasmussen, K. A. (2004). Diabetic neuropathy: an intensive review. *American Journal Of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal Of The American Society Of Health-System Pharmacists*, *61*(2), 160-173.
- Dworkin, R. H., Backonja, M., Rowbotham, M. C., Allen, R. R., Argoff, C. R., Bennett, G. J., . . . Weinstein, S. M. (2003). Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*, *60*(11), 1524-1534. doi: 10.1001/archneur.60.11.1524

- Dworkin, R. H., O'Connor, A. B., Audette, J., Baron, R., Gourlay, G. K., Haanpaa, M. L., . . . Wells, C. D. (2010). Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc*, *85*(3 Suppl), S3-14. doi: 10.4065/mcp.2009.0649
- Dworkin, R. H., O'Connor, A. B., Backonja, M., Farrar, J. T., Finnerup, N. B., Jensen, T. S., . . . Wallace, M. S. (2007). Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*, *132*(3), 237-251. doi: 10.1016/j.pain.2007.08.033
- Edwards, R. R., Bingham, C. O., 3rd, Bathon, J., & Haythornthwaite, J. A. (2006). Catastrophizing and pain in arthritis, fibromyalgia, and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, *55*(2), 325-332. doi: 10.1002/art.21865
- Eisenberger, N. I. (2012). The neural bases of social pain: evidence for shared representations with physical pain. *Psychosom Med*, *74*(2), 126-135. doi: 10.1097/PSY.0b013e3182464dd1
- Eisenberger, N. I., Lieberman, M. D., & Williams, K. D. (2003). Does rejection hurt? An fMRI study of social exclusion. *Science*, *302*(5643), 290-292. doi: 10.1126/science.1089134
- Fairhurst, M., Wiech, K., Dunckley, P., & Tracey, I. (2007). Anticipatory brainstem activity predicts neural processing of pain in humans. *Pain*, *128*(1-2), 101-110. doi: 10.1016/j.pain.2006.09.001
- Fornasari, D. (2012). Pain mechanisms in patients with chronic pain. *Clin Drug Investig*, *32 Suppl 1*, 45-52. doi: 10.2165/11630070-000000000-00000
- Galluzzi, K. E. (2005). Management of neuropathic pain. *J Am Osteopath Assoc*, *105*(9 Suppl 4), S12-19.
- Gao, F., & Zheng, Z. M. (2014). Animal models of diabetic neuropathic pain. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, *122*(2), 100-106. doi: 10.1055/s-0033-1363234
- Gilron, I., Watson, C. P., Cahill, C. M., & Moulin, D. E. (2006). Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *Cmaj*, *175*(3), 265-275. doi: 10.1503/cmaj.060146
- Gorczyca, R., Filip, R., & Walczak, E. (2013). Psychological aspects of pain. *Ann Agric Environ Med, Spec no. 1*, 23-27.
- Grace, P. M., Hutchinson, M. R., Maier, S. F., & Watkins, L. R. (2014). Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol*, *14*(4), 217-231. doi: 10.1038/nri3621
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, *18*(3), 385-403. doi: 10.1037/h0071444
- Ho, N., Balu, D. T., Hilario, M. R., Blendy, J. A., & Lucki, I. (2012). Depressive phenotypes evoked by experimental diabetes are reversed by insulin. *Physiol Behav*, *105*(3), 702-708. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.09.003

- Iriana Galan-Arriero, G. A.-M., Agueda Ferrer-Donato, Julio Gomez-Soriano, Stefano Piazzaa, Julian Taylor. (2015). Early treatment with UR13870, a novel inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase, prevents hyperreflexia and anxiety behaviors, in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neurosci Lett*, 609, 69-74.
- Isaura Tavares, D. L. e. A. A. (2014). Neurobiologia da dor: Mecanismos de transmissão e Modulação da informação nociceptiva. *Dor*.
- Kedia, S., & Chattarji, S. (2014). Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. *J Neurosci Methods*, 233, 150-154. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.06.012
- King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*, 166(3), 877-894. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Klusakova, I., & Dubovy, P. (2009). Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. *Ann Anat*, 191(3), 248-259. doi: 10.1016/j.aanat.2009.02.007
- Lawson, S. N. (2002). Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Adelta- or Aalpha/beta-fibres. *Exp Physiol*, 87(2), 239-244.
- Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, 53(4), 597-652.
- Leite-Almeida, H., Almeida-Torres, L., Mesquita, A. R., Pertovaara, A., Sousa, N., Cerqueira, J. J., & Almeida, A. (2009). The impact of age on emotional and cognitive behaviours triggered by experimental neuropathy in rats. *Pain*, 144(1-2), 57-65. doi: 10.1016/j.pain.2009.02.024
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7
- Leo, R. J., & Latif, T. (2007). Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in experimentally induced and chronic neuropathic pain: a review. *J Pain*, 8(6), 453-459. doi: 10.1016/j.jpain.2007.01.009
- Li, D., Yang, H., Meyerson, B. A., & Linderth, B. (2006). Response to spinal cord stimulation in variants of the spared nerve injury pain model. *Neurosci Lett*, 400(1-2), 115-120. doi: 10.1016/j.neulet.2006.02.028
- Martin, L. J., Tuttle, A. H., & Mogil, J. S. (2014). The interaction between pain and social behavior in humans and rodents. *Curr Top Behav Neurosci*, 20, 233-250. doi: 10.1007/7854\_2014\_287
- Matsuzawa-Yanagida, K., Narita, M., Nakajima, M., Kuzumaki, N., Niikura, K., Nozaki, H., . . . Suzuki, T. (2008). Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacology*, 33(8), 1952-1965. doi: 10.1038/sj.npp.1301590

- McIlwain, K. L., Merriweather, M. Y., Yuva-Paylor, L. A., & Paylor, R. (2001). The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav*, *73*(5), 705-717.
- Melzack, R. (2001). Pain and the neuromatrix in the brain. *J Dent Educ*, *65*(12), 1378-1382.
- Melzack, R. a. J. K. (2013). Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science. *Pain*, *4*, 1-15.
- Merskey, H. a. N. B. (1994). Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms *IASP Press*.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, *57*(1), 1-164.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, *57*(1), 1-164.
- Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, *66*(6), 355-474.
- Moalem, G., & Tracey, D. J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev*, *51*(2), 240-264.
- Mogil, J. S. (2012). The surprising empathic abilities of rodents. *Trends Cogn Sci*, *16*(3), 143-144. doi: 10.1016/j.tics.2011.12.012
- Mogil, J. S., Graham, A. C., Ritchie, J., Hughes, S. F., Austin, J. S., Schorscher-Petcu, A., . . . Bennett, G. J. (2010). Hypolocomotion, asymmetrically directed behaviors (licking, lifting, flinching, and shaking) and dynamic weight bearing (gait) changes are not measures of neuropathic pain in mice. *Mol Pain*, *6*, 34. doi: 10.1186/1744-8069-6-34
- Morgado, C., & Tavares, I. (2007). C-fos expression at the spinal dorsal horn of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*, *23*(8), 644-652. doi: 10.1002/dmrr.751
- Namaka, M., Gramlich, C. R., Ruhlen, D., Melanson, M., Sutton, I., & Major, J. (2004). A treatment algorithm for neuropathic pain. *Clin Ther*, *26*(7), 951-979.
- Narita, M., Kuzumaki, N., Narita, M., Kaneko, C., Hareyama, N., Miyatake, M., . . . Suzuki, T. (2006). Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical delta-opioid receptor dysfunction. *J Neurochem*, *97*(5), 1369-1378. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03824.x
- Neugebauer, V., Galhardo, V., Maione, S., & Mackey, S. C. (2009). Forebrain pain mechanisms. *Brain Res Rev*, *60*(1), 226-242. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.014
- Niederberger, E., Kuhlein, H., & Geisslinger, G. (2008). Update on the pathobiology of neuropathic pain. *Expert Rev Proteomics*, *5*(6), 799-818. doi: 10.1586/14789450.5.6.799

- Ning, L., Ma, L. Q., Wang, Z. R., & Wang, Y. W. (2013). Chronic constriction injury induced long-term changes in spontaneous membrane-potential oscillations in anterior cingulate cortical neurons in vivo. *Pain Physician, 16*(5), E577-589.
- O'Connor, A. B., & Dworkin, R. H. (2009). Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am J Med, 122*(10 Suppl), S22-32. doi: 10.1016/j.amjmed.2009.04.007
- Ossipov, M. H., Dussor, G. O., & Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. *J Clin Invest, 120*(11), 3779-3787. doi: 10.1172/jci43766
- Paterson, N. E., Iwunze, M., Davis, S. F., Malekiani, S. A., & Hanania, T. (2010). Comparison of the predictive validity of the mirror chamber and elevated plus maze tests in mice. *J Neurosci Methods, 188*(1), 62-70. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.02.005
- Paylor, R., Spencer, C. M., Yuva-Paylor, L. A., & Pieke-Dahl, S. (2006). The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiol Behav, 87*(1), 95-102. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.09.002
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods, 14*(3), 149-167.
- Pertovaara, A. (2006). Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol, 80*(2), 53-83. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.08.001
- Porreca, F., Ossipov, M. H., & Gebhart, G. F. (2002). Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci, 25*(6), 319-325.
- Porro, C. A., Baraldi, P., Pagnoni, G., Serafini, M., Facchin, P., Maieron, M., & Nichelli, P. (2002). Does anticipation of pain affect cortical nociceptive systems? *J Neurosci, 22*(8), 3206-3214. doi: 20026310
- Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther, 229*(2), 327-336.
- Reid, K. J., Harker, J., Bala, M. M., Truylers, C., Kellen, E., Bekkering, G. E., & Kleijnen, J. (2011). Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact. *Curr Med Res Opin, 27*(2), 449-462. doi: 10.1185/03007995.2010.545813
- Sandkuhler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev, 89*(2), 707-758. doi: 10.1152/physrev.00025.2008
- Schweinhardt, P., Kalk, N., Wartolowska, K., Chessell, I., Wordsworth, P., & Tracey, I. (2008). Investigation into the neural correlates of emotional augmentation of clinical pain. *Neuroimage, 40*(2), 759-766. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.12.016

- Seminowicz, D. A., Laferriere, A. L., Millecamps, M., Yu, J. S.,Coderre, T. J., & Bushnell, M. C. (2009). MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. *Neuroimage*, 47(3), 1007-1014. doi: 10.1016/j.neuroimage.2009.05.068
- Sharma, A. N., Elased, K. M., Garrett, T. L., & Lucot, J. B. (2010). Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiol Behav*, 101(3), 381-388. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.07.002
- Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., & Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 116(1), 56-64.
- Song, G. H., Venkatraman, V., Ho, K. Y., Chee, M. W., Yeoh, K. G., & Wilder-Smith, C. H. (2006). Cortical effects of anticipation and endogenous modulation of visceral pain assessed by functional brain MRI in irritable bowel syndrome patients and healthy controls. *Pain*, 126(1-3), 79-90. doi: 10.1016/j.pain.2006.06.017
- Sorkin, L. S., & Yaksh, T. L. (2009). Behavioral models of pain states evoked by physical injury to the peripheral nerve. *Neurotherapeutics*, 6(4), 609-619. doi: 10.1016/j.nurt.2009.07.007
- Stillman, M. (2006). Clinical approach to patients with neuropathic pain. *Cleve Clin J Med*, 73(8), 726-728, 729-730, 733-726 passim.
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood)*, 237(5), 481-490. doi: 10.1258/ebm.2012.011372
- Tavel, M. E. (2015). Somatic Symptom Disorders Without Known Physical Causes: One Disease with Many Names? *Am J Med*. doi: 10.1016/j.amjmed.2015.04.041
- Tesch, G. H., & Allen, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 12(3), 261-266. doi: 10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x
- Thacker, M. A., Clark, A. K., Marchand, F., & McMahon, S. B. (2007). Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg*, 105(3), 838-847. doi: 10.1213/01.ane.0000275190.42912.37
- Thomas, A., Burant, A., Bui, N., Graham, D., Yuva-Paylor, L. A., & Paylor, R. (2009). Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*, 204(2), 361-373. doi: 10.1007/s00213-009-1466-y
- Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*, 11(12), 823-836. doi: 10.1038/nrn2947
- Tracey, I. (2008). Imaging pain. *Br J Anaesth*, 101(1), 32-39. doi: 10.1093/bja/aen102

- Vachon-Preseu, E., Martel, M. O., Roy, M., Caron, E., Albouy, G., Marin, M. F., . . . Rainville, P. (2013). Acute stress contributes to individual differences in pain and pain-related brain activity in healthy and chronic pain patients. *J Neurosci*, *33*(16), 6826-6833. doi: 10.1523/jneurosci.4584-12.2013
- Vanegas, H., & Schaible, H. G. (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Brain Res Rev*, *46*(3), 295-309. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.004
- Vissers, K. C. (2006). The clinical challenge of chronic neuropathic pain. *Disabil Rehabil*, *28*(6), 343-349. doi: 10.1080/09638280500287270
- Voikar, V., Vasar, E., & Rauvala, H. (2004). Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/Sv mice: implications for phenotyping screens. *Genes Brain Behav*, *3*(1), 27-38.
- Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, *2*(2), 322-328. doi: 10.1038/nprot.2007.44
- Wall, P. D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J. W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., & Tomkiewicz, M. M. (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*, *7*(2), 103-111.
- Weiss, R. B. (1982). Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Treat Rep*, *66*(3), 427-438.
- Woolf, C. J. (2010). What is this thing called pain? *J Clin Invest*, *120*(11), 3742-3744. doi: 10.1172/jci45178
- Woolf, C. J., & Mannion, R. J. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, *353*(9168), 1959-1964. doi: 10.1016/s0140-6736(99)01307-0
- Woolfe G. , M. A. L. (1944). The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *Pharmacol Exp Ther.*, *80*, 300-307.
- Wu, K. K., & Huan, Y. (2001). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats *Current Protocols in Pharmacology*: John Wiley & Sons, Inc.
- Yalcin, I., & Barrot, M. (2014). The anxiodepressive comorbidity in chronic pain. *Curr Opin Anaesthesiol*, *27*(5), 520-527. doi: 10.1097/aco.0000000000000116
- Yalcin, I., Barthas, F., & Barrot, M. (2014). Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*, *47*, 154-164. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.08.002
- Yalcin, I., Bohren, Y., Waltisperger, E., Sage-Ciocca, D., Yin, J. C., Freund-Mercier, M. J., & Barrot, M. (2011). A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol Psychiatry*, *70*(10), 946-953. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.07.017

Yalcin, I., Charlet, A., Freund-Mercier, M. J., Barrot, M., & Poisbeau, P. (2009). Differentiating thermal allodynia and hyperalgesia using dynamic hot and cold plate in rodents. *J Pain, 10*(7), 767-773. doi: 10.1016/j.jpain.2009.01.325

Yilmaz, P., Diers, M., Diener, S., Rance, M., Wessa, M., & Flor, H. (2010). Brain correlates of stress-induced analgesia. *Pain, 151*(2), 522-529. doi: 10.1016/j.pain.2010.08.016

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain, 16*(2), 109-110.

Zimmermann, M. (1986). Physiological mechanisms of pain and its treatment. . *Klinische Anaesthesiol Intensivether, 32*, 1-19.

## **Apendíce: composição das soluções**

### 1. Tampão fosfato salino (PBS) (1L)

tampão fosfato 0,1M pH=7,2:

Na<sub>2</sub> H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O – 15,60g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 17,4g

H<sub>2</sub>O para 1L

### PBS:

PB 250 ml

H<sub>2</sub>O para 1L

NaCl - 9g

### 2. Tampão fosfato salino com Triton-X (PBS-T)

PBS - 996ml

*Triton X-100* - 4ml

### 3. Solução Tyrode's (1L)

NaCl – 6,8 g

KCl – 0,40g

MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O – 0,32 g

MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O – 0,1 g

NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O – 0,17 g

Glucose 1 g

NaHCO<sub>3</sub> – 2,2 g

H<sub>2</sub>O para 1L

### 4. Solução crioprotectora (1L)

PB 0,1M pH=7,2 - 125 ml

H<sub>2</sub>O - 375 ml

Sacarose - 300g

Etilenoglicol- 300ml

PB 0,1M pH=7,2 para 1L