

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



**AValiação Comportamental de Ratos com Carcinoma Orofacial
Submetidos a teste de Ansiedade e Hiperalgésia.**



CURITIBA

2015

EDER GAMBETA DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE RATOS COM CARCINOMA OROFACIAL
SUBMETIDOS A TESTE DE ANSIEDADE E HIPERALGESIA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do curso de Ciências Biológicas junto ao
departamento de Farmacologia da Universidade
Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção
do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Janaína Menezes Zanoveli;

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Geremias Chichorro.

CURITIBA

2015

Agradecimentos

Agradeço a minha querida mãe Sonia por todo amor, apoio e paciência durante essa importante etapa da minha vida.

Agradeço as minhas orientadoras Prof^a Dr^a Janaína Menezes Zanoveli e Prof^a Dr^a Juliana Geremias Chichorro por todo incentivo, aprendizado, dedicação, amizade e principalmente por me inspirarem.

Agradeço as minhas amadas colaboradoras e grandes amigas Caroline Machado Kopruszinski e Renata Cristiane dos Reis pela amizade, força, carinho, brincadeiras e puxões de orelha durante toda a realização deste trabalho. Sem vocês eu estaria completamente perdido.

Agradeço a Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha por todo ensinamento e carinho.

A Prof^a Dr^a Alexandra Acco e sua aluna Francislaine Lívero pela maravilhosa colaboração.

A minha colega de laboratório e aniversário Helen de Moraes, pelo carinho.

As minhas queridas amigas Taysa Bassani, Meira Machado e Jeane Vieira pelas boas risadas durante nossos intervalos.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia da UFPR,

A todos meus professores que tive durante a graduação.

Ao meu querido irmão Eric por todas as brigas e risadas.

Aos meus amados cachorros Lupi e Meg, por todo amor e carinho.

As minhas primas Cibele e Isabella pela amizade e por sempre acreditarem em mim.

Á minha lilmonster querida Maria Luiza Mainardes Vieira do Prado pela incrível amizade e pelas boas risadas durante esses anos.

E agradeço principalmente a todos os ratinhos utilizados para este estudo, pois sem eles nada disso seria possível.

"A imaginação é mais importante que o conhecimento"

Albert Einstein

RESUMO

O câncer orofacial é altamente incidente na população. Sabe-se que a dor e ansiedade representam sintomas comuns desta condição, resultando em um grave problema de saúde pública. Estudos têm mostrado que a prevalência de ansiedade em pacientes com dor de câncer tem aumentado, sendo esta condição relativamente proporcional à intensidade de dor relatada pelos pacientes. No entanto, não é claro por quais mecanismos e se o desenvolvimento desses dois sintomas estão relacionados. Assim, este estudo teve como objetivo investigar a relação entre nocicepção e ansiedade em animais com carcinoma orofacial. Para isso, células Walker-256 foram utilizadas para a indução de carcinoma orofacial em ratos. Seis dias após esta inoculação, os animais foram submetidos nos testes do labirinto em cruz elevado (LCE) e da transição claro-escuro (TCE), ambos usados para estudar os comportamentos relacionados à ansiedade. Grupos independentes de animais também foram submetidos ao teste de hiperalgesia térmica ao calor para avaliar o comportamento nociceptivo. Além disso, o efeito da lidocaína (LDC; 2%; i.l.), um anestésico local utilizado no controle da dor, e do midazolam (MDZ; 0,5 mg/kg; i.p.), um benzodiazepínico ansiolítico, foram avaliados em ratos com carcinoma orofacial submetidos a estes testes. Após os testes comportamentais, o córtex pré-frontal (CPF) e a amígdala, regiões encefálicas envolvidas na mediação dos comportamentos emotivos e ansiedade, foram dissecados para medir parâmetros de estresse oxidativo, como atividade de superóxido dismutase (SOD), glutatona reduzida (GSH) e os níveis de lipoperoxidação (LPO). Os nossos dados mostraram que os ratos com carcinoma orofacial apresentam comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado em relação aos animais controle quando avaliados no LCE e TCE, além de hiperalgesia térmica ao calor. O tratamento local com LDC apresentou efeito apenas anti-hiperalgésico, mas não foi capaz de alterar o comportamento ansiogênico dos animais com carcinoma orofacial quando avaliados no LCE e TCE. Por outro lado, o tratamento com MDZ resultou em efeito do tipo ansiolítico, mas não influenciou a hiperalgesia. As análises bioquímicas mostraram que a atividade da SOD e os níveis de LPO estavam aumentados no CPF, enquanto que os níveis de GSH estavam reduzidos em animais portadores do tumor, entretanto na amígdala não houve diferença estatística nesses animais. Interessantemente, o tratamento com MDZ reverteu todas essas alterações sem alterar esses parâmetros nos animais controle. Em conclusão, nossos dados sugerem que os mecanismos que medeiam os comportamentos relacionados à ansiedade e hiperalgesia parecem não estar associados. Além disso, os níveis aumentados de estresse oxidativo no CPF dos animais com carcinoma poderiam contribuir para o comportamento do tipo ansiogênico. Estudos adicionais são necessários para o melhor entendimento da associação de ansiedade e dor associada ao carcinoma orofacial.

Palavras-chave: ansiedade; hiperalgesia, carcinoma orofacial; lidocaína; midazolam; ratos.

ABSTRACT

The orofacial cancer is highly incident in the population. It is known that pain and anxiety represent common symptoms of this condition, resulting in a major problem in public health. Studies have shown that the prevalence of anxiety in patients with cancer pain has increased, being this condition relatively proportional to the intensity of pain reported by patients. However, it is unclear whether the mechanisms of development of both symptoms are related. Thus, this study aimed to investigate the relation between pain and anxiety in animals with orofacial carcinoma. For this, Walker-256 tumor cells were used for the induction of orofacial carcinoma in rats. Six days after this induction, animals were evaluated in the elevated plus maze (EPM) and light-dark transition (LDT) tests, both used to study anxiety-related behaviors. Independent groups of animals were also submitted to the heat hyperalgesia test to evaluate nociceptive-like behavior. Furthermore, the effects of lidocaine (LDC; 2%; i.l.), an anesthetic that alleviate pain, or midazolam (MDZ; 0.5 mg/kg; i.p.), a benzodiazepine anxiolytic, were evaluated in rats with orofacial carcinoma submitted to these tests. After behavioral tests, the prefrontal cortex (PFC) and amigdala, brain areas involved in the mediation of emotional and anxiety-like behavior, was dissected for measurement of oxidative stress parameters, such as superoxide dismutase (SOD) activity, and reduced glutathione (GSH) and lipid hydroperoxides (LOOH) levels. Our data showed that rats with orofacial carcinoma showed an anxiogenic-like behavior when evaluated in the EPM and LDT in addition the development of heat hyperalgesia. The local treatment with LDC induced only antihyperalgesic effect, i.e. it was not able to change the anxiogenic-like behavior of the animals with orofacial cancer when evaluated on EPM and LDT. Differently, animals treated with MDZ showed an anxiolytic-like effect, but not an antihyperalgesic effect. The biochemical analysis showed that SOD activity and LOOH levels were increased in the PFC, while GSH levels were reduced in tumor-bearing rats, but there's no difference in the amygdala. Interestingly, the MDZ treatment reverted all these changes without alters these parameters in control animals. Taken together, our data suggest that the mechanisms that mediate anxiety and nociceptive-like behaviors related to the orofacial carcinoma seem to be not associated. Furthermore, the increased level of oxidative stress in the PFC could trigger these animals with orofacial carcinoma to present anxiogenic-like behavior. Therefore, further studies are needed to better understand the possible mechanisms that could be involved in the association of anxiety with orofacial cancer pain.

Keywords: anxiety; hyperalgesia; orofacial cancer; lidocaine; midazolam; rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Avaliação comportamental de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.....	30
Figura 2 Avaliação comportamental de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste de transição claro-escuro..	31
Figura 3 Avaliação da hiperalgesia térmica ao calor em modelo de carcinoma orofacial.	32
Figura 4 Efeito do tratamento local com lidocaína em animais com carcinoma orofacial na hiperalgesia térmica ao calor.....	33
Figura 5 Efeito do tratamento local com lidocaína sobre as respostas comportamentais de ansiedade de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.....	35
Figura 6 Efeito do tratamento local com lidocaína sobre as respostas comportamentais de ansiedade de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste de transição claro-escuro.....	35
Figura 7 Avaliação farmacológica do efeito do tipo ansiolítico do midazolam em ratos naïve submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.....	37
Figura 8 Avaliação farmacológica do efeito do tipo ansiolítico do midazolam em ratos naïve submetidos ao teste de transição claro-escuro..	37
Figura 9 Efeito do tratamento sistêmico com midazolam sobre as respostas comportamentais de ansiedade de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.....	39
Figura 10 Efeito do tratamento sistêmico com midazolam sobre as respostas comportamentais de ansiedade de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste de transição claro-escuro.	39
Figura 11 Efeito do tratamento sistêmico com midazolam em animais com carcinoma orofacial na hiperalgesia térmica ao calor.	40
Tabela 1 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em modelo de carcinoma orofacial.....	41

Tabela 2 Influência dos diferentes tratamentos na hiperalgesia térmica ao calor e ansiedade em modelo de carcinoma orofacial.	49
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMG	Amígdala
APA	<i>American Psychiatric Association</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado
CEL	Células Walker-256
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
COX	Ciclooxigenase
CPF	Córtex pré-frontal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais
e.p.m.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutathiona reduzida
i.l.	Intralabial
i.p.	Intraperitoneal
IASP	<i>International Association for the Study of Pains</i>
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCE	Labirinto em cruz elevado
LDC	Lidocaína
LPO	Lipoperoxidação
MDZ	Midazolam
NGF	Fator de crescimento do nervo
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salina
PG	Prostaglandina

Ptn	Proteína
SOD	Superóxido dismutase
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
Tcd	Tecido
TCE	Transição claro-escuro
TNF α	Fator de necrose tumoral – alfa
TP	Transtorno do pânico
VEI	Veículo
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CÂNCER OROFACIAL.....	12
1.2 DOR ASSOCIADA AO CÂNCER OROFACIAL.....	14
1.3 ANSIEDADE RELACIONADA AO CÂNCER OROFACIAL	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 ANIMAIS.....	21
3.2 DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS	21
3.3 INDUÇÃO DO CARCINOMA OROFACIAL	22
3.4 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	23
3.5 TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO	23
3.6 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR	24
3.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
3.7.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	25
3.7.2 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	26
3.7.3 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)	26
3.7.4 PROTEÍNA.....	26
3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	27
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
4 RESULTADOS	30
4.1 COMPORTAMENTO DE RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256 NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	30
4.2 COMPORTAMENTO DE RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256 NO TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO.....	31

4.3	DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR APÓS A INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS WALKER-256.....	32
4.4	EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256.....	33
4.5	EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM LIDOCAÍNA NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO EM RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256.....	34
4.6	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DA DROGA MIDAZOLAM EM RATOS NAÏVE.....	36
4.7	EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM MIDAZOLAM NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO EM RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256.....	38
4.8	EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM MIDAZOLAM NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256.....	40
4.10	NÍVEL DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E AMÍGDALA DOS ANIMAIS TRATADOS SISTEMICAMENTE COM MIDAZOLAM.	41
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER OROFACIAL

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA) “câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo”. Como essas células se dividem rapidamente, e tendem a ser agressivas e incontroláveis, determina a formação de tumores ou neoplasias malignas. Entretanto, quando essas células se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, é denominado tumor benigno (INCA, 2012). Existem diferentes tipos de câncer, e isso se deve ao fato aos vários tipos de células do corpo. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais (pele e mucosas) ele é denominado carcinoma. Caso sua origem seja de tecido conjuntivo (ossos, músculos ou cartilagem) é denominado sarcoma (INCA, 2012).

As neoplasias de cabeça e pescoço são o quinto tipo de câncer mais comum mundialmente, com incidência anual de aproximadamente 780 mil casos. As principais regiões acometidas incluem a região da orofaringe, cavidade oral, glândulas salivares, cavidade nasal, e os seios paranasais (COLOMBO e RAHAL, 2009; CAMPANA e GOIATO, 2013). No Brasil, o INCA estimou a ocorrência de 11.280 novos casos de câncer em homens e 4.010 em mulheres, no ano de 2014, sendo que estas estimativas referiam-se apenas ao câncer da cavidade oral (INCA, 2014).

A etiologia dessa patologia possui causas variadas, podendo incluir fatores externos ou internos ao organismo, estando ambos inter-relacionados. Os fatores externos estão relacionados principalmente ao estilo de vida do indivíduo e ao meio ambiente tais como, tabagismo, exposição à radiação UVA solar, entre outros. Já os fatores internos são na maioria das vezes relacionados com a pré-disposição genética, sendo que esse fator pode aumentar a probabilidade de transformações malignas nas células saudáveis. Como o número de casos diagnosticados de câncer oral tem

aumentado, o interesse em pesquisa para seu controle e tratamento tem crescido (SHAH e SINGH, 2006; para revisão ver SCULLY e BAGAN, 2007).

O exame clínico é o principal método para o diagnóstico do carcinoma orofacial, o qual inclui palpação local e identificação de lesões, apresentadas em forma de lesões ligeiramente rugosas, avermelhadas e bem delimitadas em estágios iniciais. Já em estágios avançados, são observadas diversas lesões mal delimitadas, com células microscopicamente diferentes do tecido de origem, podendo disseminar e invadir outros tecidos. A realização de biópsias e exames histopatológicos são empregados na confirmação do diagnóstico (OLIVER *et al.*, 1996; HAYA-FERNANDÉZ *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2007; BRANDIZZI *et al.*, 2008; para revisão ver BAGAN *et al.*, 2010). Como nos estágios iniciais é comum ocorrer um diagnóstico errado, principalmente pelo fato das lesões serem semelhantes a outros tipos de lesões, como aftas e lesões herpéticas, além de outras lesões benignas (BAGAN *et al.*, 2010; LAM e SCHIMIDT, 2011), alguns sintomas podem contribuir para um diagnóstico mais precoce e preciso, como por exemplo, a dor no local da lesão.

1.2 DOR ASSOCIADA AO CÂNCER OROFACIAL

As informações sensoriais da região craniofacial são transmitidas através da ativação de aferentes trigeminais que compõe as três divisões do nervo trigêmeo, oftálmica, maxilar e mandibular. As fibras que integram o nervo trigêmeo são classificadas em nociceptores (fibras A- δ e fibras C) e fibras A- β , que transmitem informações proprioceptivas. Os corpos celulares destas fibras estão presentes no gânglio do nervo trigêmeo, e as mesmas estabelecem sinapses com neurônios de segunda ordem nos núcleos do complexo sensorial trigeminal, localizados no tronco cerebral. Três subnúcleos integram este complexo: *oralis*, *interpolaris* e *caudalis*, sendo que esse último recebe a maior parte das projeções dos aferentes nociceptivos. Os neurônios que partem destes subnúcleos (i.e. neurônios de segunda ordem) formam vias de condução do estímulo até o tálamo, onde são estabelecidas sinapses com neurônios de terceira ordem que conduzem as informações até o córtex somatosensorial (para revisão ver SESSLE *et al.*, 2000).

Um dos sintomas mais relatados pelos pacientes acometidos pelo câncer oral é a dor no decurso da doença (CARACENI e PORTENOY, 1999), sendo que este é um dos primeiros sintomas a serem reportados, de tal modo a contribuir para um diagnóstico precoce dessa patologia. De acordo com a IASP (*International Association for the Study of Pain*), pelo menos 90% dos pacientes apresentam dor no decurso da doença, enquanto que a dor é o primeiro sintoma a ser reportado em cerca de 35% dos casos (GORSKY *et al.*, 2004; BRIGATTE *et al.*, 2007; LAM e SCHIMIDT, 2011; para revisão ver DIOS e LESTÓN, 2010). Quanto à intensidade da dor, em cerca de 30 a 50% dos casos ela é considerada de intensidade moderada a severa, podendo ocorrer de forma espontânea ou estar associada à hiperalgesia e alodinia (PORTENOY *et al.*, 1999; PORTENOY e LESAGE, 1999; REGAN e PENG, 2000; BRIGATTE *et al.*, 2007).

Um dos principais mecanismos que pode contribuir e/ou exacerbar a dor em carcinomas orofaciais são os movimentos funcionais da boca, como a mastigação e deglutição, pelo fato de estimularem os terminais nervosos da região oral. Além disso, pode ocorrer a compressão dos aferentes sensoriais do nervo trigêmeo, bem como

estar relacionada a processos de ulceração tecidual (DATTA e PAI, 2006). O sistema imune parece ter papel importante na dor relacionada ao câncer, pois produz e libera diversos mediadores que podem ativar e/ou sensibilizar as fibras nociceptivas por diversos mecanismos (LIST *et al.*, 2000; HAMAMOTO *et al.*, 2008). As células tumorais também podem produzir e secretar diversos mediadores, os quais podem ativar e sensibilizar as fibras nociceptivas periféricas, dentre esses podemos citar os prótons H^+ , o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), o fator de crescimento do nervo (NGF), interleucinas (IL-1 e IL-6), prostaglandinas (PGs), endotelinas, entre outros (BENOLIEL *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2010).

Um dos modelos que tem sido utilizado para o estudo dos mecanismos que contribuem para a dor em carcinomas orofaciais é o tumor induzido por células Walker-256 (ONO *et al.*, 2009). A linhagem celular do tumor Walker-256 é de origem de glândulas mamárias de rata gestante, e foi descoberta por George Walker em 1928 (EARLE, 1935). Esse tumor é identificado como sólido, entretanto no estudo de Agostino e Clifton (1965) foi descrita a passagem do tumor sólido para ascítico. Isso permitiu que as células tumorais fossem injetadas intraperitonealmente em outros ratos, podendo também ser injetadas em outros tecidos, de tal modo a desenvolver um tumor sólido. Conforme padronizado por ONO e colaboradores (2009), a inoculação das células Walker-256 unilateralmente na região das vibrissas leva ao desenvolvimento de um tumor facial. Com o uso desse modelo é possível avaliar respostas relacionadas ao comportamento de dor, como a hiperalgesia térmica, alodinia e dor espontânea (ONO *et al.*, 2009). Além disso, as células Walker-256 podem ser utilizadas para avaliar o estresse oxidativo e outras modificações orgânicas (por exemplo, alterações enzimáticas, inflamatórias e imunológicas), considerando que o crescimento tumoral é acompanhado pela oxidação dos tecidos adjacentes (ACCO *et al.*, 2012).

A utilização de opióides fracos junto com adjuvantes é a principal recomendação da Organização Mundial de Saúde para o tratamento da dor moderada associada ao câncer. Já nos casos em que a dor é persistente e severa, é recomendada a utilização de opióides fortes. Sabe-se que o uso prolongado dessa classe de fármacos está associado a vários efeitos adversos, bem como esse

tratamento farmacológico é pouco efetivo no controle da dor em caso de câncer orofacial avançado (WHO, 1990; para revisão ver DIOS e LESTÓN, 2010).

Atualmente, diferentes classes de fármacos com outras indicações terapêuticas são indicados para a utilização em associação com analgésicos para o controle da dor, os quais são chamados de adjuvantes. Muitas formas de controle da dor baseiam-se principalmente na utilização desses fármacos. As principais classes de adjuvantes para o controle da dor são os antidepressivos, os anticonvulsivantes e os anestésicos locais.

A lidocaína é uma aminoetilamida e o protótipo dos anestésicos locais do tipo amida. Os anestésicos locais atuam em canais de sódio dependentes de voltagem e impedem a geração e condução dos impulsos nervosos. Eles bloqueiam a condução, reduzindo ou impedindo o aumento transitório da permeabilidade das membranas excitáveis ao Na^+ , que normalmente é produzido pela despolarização da membrana (para revisão ver BECKER e REED, 2012). Os anestésicos locais são utilizados tanto para a indução da anestesia, por impedir a geração e propagação do potencial de ação nas fibras sensoriais, mas também no tratamento de algumas formas de dor crônica, através do bloqueio de troncos nervosos, inativação de pontos-gatilho miofasciais, e até mesmo através da administração sistêmica (NAGARO *et al.*, 1995; LAVELLE *et al.*, 2007; VLASSAKOV *et al.*, 2011).

1.3 ANSIEDADE RELACIONADA AO CÂNCER OROFACIAL

Ansiedade e medo são estados emocionais que possuem um papel adaptativo importante para o desempenho de diversas atividades. Apesar de ansiedade e medo serem emoções correlatas, elas apresentam diferenças entre si. A ansiedade é caracterizada como uma expressão de emoção relacionada com perigos potenciais, como por exemplo, a antecipação de uma ameaça futura, modulando respostas comportamentais mais elaboradas como a resposta de esquiva. Já o medo é caracterizado como uma resposta frente a uma ameaça real ou iminente (APA/DSM-V, 2013) e nesta situação as respostas emocionais não são tão elaboradas podendo apresentar respostas mais explosivas, como resposta de fuga. Entretanto, quando há a presença dessas emoções de forma duradoura e persistente e se tornando mal adaptativa, estas emoções podem ser consideradas condições patológicas relacionadas com os Transtornos de Ansiedade.

Há vários tipos de Transtornos de ansiedade com base em diferentes sinais e sintomas. Dentre estes há o Transtorno de ansiedade generalizada (TAG), Transtorno do pânico (TP) com ou sem Agorafobia, Transtorno de ansiedade social, dentre outros. O TAG está entre os transtornos psiquiátricos mais frequentemente diagnosticados, sendo este uma doença que está associada com altos custos para o sistema de saúde e também está relacionada com alto índice de morbidade (TYRER e BALDWIN, 2006).

Transtornos psiquiátricos, como os transtornos de ansiedade e humor, apresentam uma alta incidência em pacientes com câncer orofacial. Não se conhece a fisiopatologia da ansiedade associada ao câncer orofacial, mas esses transtornos de ansiedade podem estar relacionados com aspectos emocionais após o prognóstico da doença, bem como com outros sintomas relacionados à doença, como a dor (SELLNICK e CROOKS, 1999; HUMPHRIS *et al.*, 2003; SPIEGEL e GIESE-DAVIS, 2003; HEGEL *et al.*, 2006). Existem evidências de que pacientes diagnosticados com câncer apresentam alta incidência de TAG (DEROGATIS *et al.*, 1983; NORDIN *et al.*, 2001). A prevalência de TAG pode chegar até 49% em pacientes com câncer, sendo que aqueles que já tiveram histórico de ansiedade antes do diagnóstico de câncer

possuem maior risco de reincidência. (BREITBART, 1995; SPIJKER *et al.*, 1997; NIKBAKHSI *et al.*, 2014). É válido ressaltar que a ansiedade pode estar presente em todas as fases de evolução do câncer. O nível de ansiedade pode diminuir quando o paciente faz reavaliação do caso, resultando em um prognóstico favorável. Por outro lado, em pacientes que são reavaliados e o prognóstico é ruim, os níveis de ansiedade aumentam na maioria dos casos (LAMPIC *et al.*, 2001).

Como já mencionado, a etiologia da ansiedade associada ao câncer ainda é desconhecida. Porém, várias hipóteses tentam explicar seu desenvolvimento, dentre elas a secreção tumoral de diferentes hormônios e estados metabólicos anormais (como o aumento do estresse oxidativo em regiões encefálicas relacionadas à ansiedade) (HOLLAND e ROWLAND, 1989; HASSAN *et al.*, 2014; KROLOW *et al.*, 2014). Estudos em humanos e em modelos animais têm demonstrado uma forte correlação entre ansiedade e o estresse oxidativo (KROLOW *et al.*, 2014). Um importante marcador de dano oxidativo são os níveis de malonaldeído (MDA), que são encontrados elevados em pacientes com Transtornos de ansiedade. Diversos estudos sugerem uma relação entre ansiedade e estresse oxidativo em diferentes modelos animais (HOVATTA *et al.*, 2010). Entretanto, há poucos estudos avaliando a consequência do estresse oxidativo no comportamento tipo ansioso em ratos (KROLOW *et al.*, 2014). Enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase, ou antioxidantes não enzimáticos, incluindo glutathione, vitaminas C e E, melatonina, dentre outros compostos, constituem o mecanismo de defesa contra as ERO, bem como as de nitrogênio (ERN) (HASSAN *et al.*, 2014).

Em adição, alguns estudos têm relacionado a dor com estados de ansiedade, ou seja, quanto maior a intensidade da dor associada ao câncer, maior o nível de ansiedade verificado, isto também se deve ao fato do componente afetivo tanto da dor quanto da ansiedade. Dessa maneira, sugere-se que um controle insatisfatório da dor pode intensificar o estado de ansiedade do paciente (HOLLAND e ROWLAND, 1989). Sendo assim, de alguma maneira esses dois sintomas relatados e observados em pacientes com câncer podem estar associados, entretanto ainda não se sabe por qual, ou quais mecanismos (NORDIN *et al.*, 2001).

Atualmente há uma grande variedade de fármacos que possuem efeito ansiolítico, tais como os benzodiazepínicos, mais comumente utilizados, os antidepressivos, anticonvulsivantes, anti-histamínicos, entre outros (ANDREATINI *et al.*, 2001). O midazolam é um ansiolítico da classe dos benzodiazepínicos, sendo um depressor do sistema nervoso central. Seu efeito é através da ligação no local benzodiazepínico do receptor do aminoácido ácido gama amino-butírico (GABA) do tipo A (GABA_A). A ligação do midazolam no sítio alostérico do receptor causa uma alteração conformacional que resulta no aumento da afinidade do GABA pelo seu sítio e conseqüentemente uma maior frequência de abertura do canal iônico de Cl⁻, deixando assim o neurônio hiperpolarizado.

Como muitos estudos têm demonstrado que existe uma relação clínica entre a dor relatada pelos pacientes junto com os Transtornos de ansiedade, acreditamos que em modelo de carcinoma orofacial, o comportamento nociceptivo e o comportamento do tipo ansioso podem estar relacionados. Sendo assim, uma possível inibição de um desses comportamentos poderia inibir ou reduzir o outro comportamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O câncer que acomete a região orofacial é altamente incidente na população e a dor e ansiedade representam sintomas comuns dessa condição. Dessa maneira o objetivo geral do presente estudo foi investigar a presença de comportamento do tipo ansioso e comportamento nociceptivo em animais submetidos ao modelo de carcinoma orofacial, bem como avaliar uma possível relação entres estes comportamentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos inoculados com células Walker-256:

- O comportamento no teste do labirinto em cruz elevado;
- O comportamento no teste de transição claro-escuro;
- O desenvolvimento da hiperalgesia térmica ao calor;
- O efeito do tratamento local com lidocaína na avaliação comportamental na hiperalgesia térmica ao calor, no teste do labirinto em cruz elevado e de transição claro-escuro;
- O efeito do tratamento sistêmico com midazolam na avaliação comportamental no teste do labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro, e na hiperalgesia térmica ao calor;
- Parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal e amígdala dos animais tratados sistemicamente com midazolam.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados ratos da variedade Wistar machos, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Curitiba, com peso entre 180-200 gramas no início dos experimentos. Os animais tiveram livre acesso à água e ração e foram mantidos sob um ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (7:00 às 19:00 horas) e temperatura controlada em $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Todos os experimentos foram realizados em salas silenciosas, com a temperatura controlada e sempre durante a fase clara do ciclo. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA/BIO, #848).

3.2 DROGAS E REAGENTES UTILIZADOS

Foram utilizadas nesse estudo as seguintes drogas e reagentes:

- Acido etilenodiaminotetracético (EDTA, Amresco®, Solon, Ohio, EUA), pH 8,0;
- Azul de Tripán 1% (Alphatec, Macaé, RJ, Brasil);
- Cloridrato de Cetamina (Rhobifarma Ind. Farmacêutica, Hortolândia, SP, Brasil);
- Cloridrato de Lidocaína 99% de pureza (Sigma-Aldrich – Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brasil);
- Cloridrato de Lidocaína sem vasoconstritor 2% (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil);

- Cloridrato de Midazolam 15 mg/3 mL (Hipolabor Farmacêutica Ltda., Sabará, MG, Brasil);
- DTNB (Sigma, St. Louis, USA);
- Glutationa Reduzida (Sigma, St. Louis, USA);
- Hidroxitolueno butilado (BHT, VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Pirogalol (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Sulfato Ferroso de Amônio (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil);
- Tampão Fosfato de Potássio, pH 6,5;
- Tampão Fosfato-Salina (PBS), pH 7,4;
- Xilazina (Laboratórios König S.A., Avellaneda, Argentina).
- Xilenol Laranja (Sigma, St. Louis, USA);

Para o preparo da solução de lidocaína a 4% foi utilizada solução salina estéril 0,9%. O midazolam foi dissolvido em solução salina estéril 0,9%.

3.3 INDUÇÃO DO CARCINOMA OROFACIAL

Nesse estudo foram utilizadas células de tumor de Walker-256, doadas pela Dr^a Sandra Coccuzzo Sampaio do Instituto Butantã (São Paulo, Brazil), as quais foram mantidas em freezer -80° . Quando descongeladas, as células foram inoculadas intraperitonealmente na concentração de 1×10^7 céls/mL em ratos para manter a linhagem e dar início aos repiques. A manutenção das células foi realizada através dos repiques semanais, os quais tiveram início após o quinto dia de inoculação. A coleta do líquido ascítico foi realizada após a eutanásia, decapitação, dos animais, em que os animais foram submetidos à laparotomia. Ao fluido coletado foi acrescentado ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; 1:1; pH 8,0). Após a coleta do líquido ascítico, a viabilidade celular foi confirmada pelo teste de exclusão com Azul de Tripán 1% em câmara de Neubauer (BRIGATTE *et al.*, 2007). Quando contadas na câmara de Neubauer, foram contabilizadas apenas as células viáveis. Essas células foram

suspensas em PBS, numa diluição para a concentração de 1×10^7 por 1 mL de células tumorais que foram repicadas intraperitonealmente em outros ratos, com o intuito de manter a linhagem. Após o terceiro repique as células foram inoculadas subcutaneamente (2×10^6 células em 100 μ L) na região direita da face, na região de inserção das vibrissas, estabelecendo propriamente o modelo padronizado de carcinoma orofacial (ONO *et al.*, 2009). Para realizar a inoculação das células os animais foram anestesiados com mistura de cetamina e xilazina (60 e 7,5 mg/kg, respectivamente, i.p.).

3.4 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Para avaliação do comportamento de ansiedade os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado conforme descrito por Pellow *et al.* (1995). O aparato é de madeira com acabamento em preto, elevado a 50 cm do chão, o qual apresenta 4 braços, sendo 2 abertos e 2 fechados. No cruzamento entre os braços há uma área central de 10cm^2 . Os ratos foram colocados individualmente no centro do aparato e foi gravado durante 5 minutos. Foi avaliado o tempo que cada animal permaneceu nos braços abertos e fechados, bem como o número de entradas em cada braço. Foi considerada entrada quando o animal ultrapassou com as 4 patas as delimitações de cada braço. O comportamento do tipo ansioso foi avaliado pelo tempo que cada animal permaneceu nos braços abertos, e também pelo número de entrada nos braços abertos, além disso, com o número de entradas nos braços fechados foi possível avaliar a atividade locomotora.

3.5 TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO

O teste de transição claro-escuro desenvolvido por Crawley e Goodwin em 1980 avalia também o comportamento de ansiedade. O aparato consiste em uma caixa de madeira com dimensões totais de 30x48x24 cm, dividida igualmente em dois compartimentos com dimensões de 30x24x24 cm cada, sendo um compartimento escuro, pintado de preto, não iluminado, e outro compartimento pintado de branco e iluminado com uma fonte luminosa de 50 lux. Ainda, esse aparato possuiu uma abertura no centro com dimensão de 10x10 cm, o que permite o livre acesso aos dois compartimentos. O teste é baseado na aversão inata dos animais por lugares com alta claridade, existindo um conflito do animal na exploração dos compartimentos ou esquivando do compartimento claro. Os animais foram colocados individualmente no aparato com livre acesso aos dois compartimentos durante uma sessão de 5 minutos, e foi contabilizado o tempo em que cada animal permaneceu no compartimento claro e escuro, bem como o número de transições entre cada compartimento. O comportamento do tipo ansioso foi avaliado pelo tempo que o animal permaneceu dentro do compartimento claro, além disso, foi possível avaliar a atividade locomotora pela quantidade de transições.

3.6 AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR

Neste teste os animais foram contidos pelo experimentador e uma fonte de calor (~50°C) foi posicionada aproximadamente a 1 cm de distância da área de inserção das vibrissas do lado direito (CHICHORRO *et al.*, 2009). Foi avaliada a latência para a resposta antes da inoculação das células tumorais, em que os animais movimentavam rapidamente as vibrissas ou retiravam a cabeça, os animais que tiveram resposta abaixo de 8 segundos foram excluídos. Após 6 dias da inoculação das células tumorais, foi avaliada novamente resposta basal para avaliar se os animais desenvolveram

hiperalgesia térmica ao calor. Em seguida, os animais que desenvolveram hiperalgesia antes dos tratamentos farmacológicos foram avaliados nos tempos de intervalo até 2 horas após o tratamento. O tempo de corte foi de 15 segundos, para que não houvesse nenhuma lesão no tecido.

3.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Para determinar a influência do carcinoma orofacial, bem como o tratamento com midazolam no estresse oxidativo do córtex pré-frontal e da amígdala, os seguintes parâmetros foram analisados:

3.7.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Amostras de CPF foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e centrifugadas a 9700 rpm, por 20 minutos, a 4°C em uma diluição 1:10. A atividade da SOD foi mensurada de acordo com a habilidade da SOD presente no tecido em inibir a auto-oxidação do reagente pirogalol (GAO *et al.*, 1998). Para esta finalidade, 60 µl de cada sobrenadante foram adicionados a 1327,5 µl de Tris-EDTA (0.4 M, pH 8.9) e 75 µl de uma solução contendo pirogalol (15mM). Após incubação das amostras durante 30 minutos no escuro, a reação foi parada com 37,5 µl de HCl 1N. A leitura da atividade enzimática foi realizada em um leitor de microplacas, a 440 nm. A quantidade de enzima que inibiu a reação em 50% (IC₅₀) foi definida como uma unidade de SOD e a atividade enzimática foi expressa como U SOD.mg de proteína⁻¹.

3.7.2 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Os níveis de GSH foram mensurados de acordo com o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Amostras de CPF foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 6,5), em uma diluição 1:10. Em seguida, 100 µl do homogenato foi adicionado a 80 µl de ácido tricloroacético, agitadas em vórtex e então centrifugadas a 6000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Em uma placa de 96 poços, 20 µl de sobrenadante foram somado a 280 µl de Tris HCl e 5 µl de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB, diluído em metanol). A absorbância da reação foi mensurada a 415 nm em um leitor de microplacas e os resultados foram expressos como µg GSH.g de tecido⁻¹.

3.7.3 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

A taxa de lipoperoxidação foi mensurada de acordo com o método FOX2, descrito por Jiang *et al.* (1991), com pequenas modificações. Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a lipoperoxidação. Amostras de CPF e amígdala foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e centrifugadas a 9700 rpm, por 20 minutos, a 4°C em uma diluição 1:10. O sobrenadante foi ressuspenso em metanol (1:1) e novamente centrifugado a 5000 g, durante 5 minutos, a 4°C. Em seguida, 100 µl do sobrenadante foram adicionados a 900 µl de solução reação (metanol, xilenol laranja, H₂SO₄ e BHT). As amostras foram incubadas no escuro durante 30 minutos e analisadas espectrofotometricamente a 560 nm. Os resultados foram expressos como mmol de hidroperóxidos.mg de proteína⁻¹.

3.7.4 PROTEÍNA

A atividade da SOD e os níveis de LPO foram expressos pela quantidade de proteína presente no tecido. Para tanto, amostras de CPF e amígdala foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (pH 6,5) e centrifugadas a 9700 rpm, por 20 minutos, a 4°C em uma diluição 1:10. A quantificação de proteína no tecido foi realizada de acordo com o proposto por Bradford (1976). A leitura foi feita em microplacas de 96 poços. Em cada uma delas foram adicionados 10 µl de amostra a 250 µl de uma solução de Bradford (diluição 1:4). A leitura foi feita a 595 nm.

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Foram utilizados grupos dependentes (Experimento 1) e independentes (demais experimentos) para os experimentos de avaliação do comportamento de ansiedade ou da hiperalgesia térmica ao calor. As células Walker-256 (CEL) foram diluídas em tampão fosfato (VEI) na concentração de 2×10^6 cels/100 µL para serem inoculadas (100 µL) na região direita da face dos ratos. O veículo (VEI) da lidocaína (LDC) 2% e 4% foi solução salina estéril 0,9%, sendo administrados 100 µL no lábio superior direito dos animais (i.l.). O midazolam (MDZ) foi dissolvido em solução salina estéril 0,9% (VEI), para ser administrado na dose de 0,5 e 1,0 mg/kg (1 mL/kg via intraperitoneal; i.p.).

Experimento 1: No dia 0 foi realizada uma medida basal para a avaliação da hiperalgesia térmica ao calor, seguida pela inoculação de VEI ou CEL. Após seis dias os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado e ao teste da transição claro-escuro, para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade. Logo após estes testes, foi realizada mais uma medida basal da hiperalgesia térmica ao calor (Figura 1).

Experimento 2: No dia 0 foi realizada uma medida basal para a avaliação da hiperalgesia térmica ao calor, seguida pela inoculação de VEI ou CEL. Após seis dias foi avaliada uma medida basal da hiperalgesia térmica ao calor, seguido pela separação dos grupos para o tratamento farmacológico. Os animais foram tratados com LDC 2 ou 4%, e latência para a resposta foi avaliada nos tempos de 30, 60 e 120 minutos (Figura 4).

Experimento 3: No dia 0 foi feita a inoculação de VEI ou CEL. Os animais foram tratados com LDC 2%, e após 30 minutos os animais foram submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro (Figura 5).

Experimento 4: Animais naïve foram tratados com MDZ nas doses de 0,5 e 1,0 mg/kg, e após 15 minutos foram submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro (Figura 7).

Experimento 5: No dia 0 foi feita a inoculação de VEI ou CEL. Os animais foram tratados com MDZ 0,5 mg/kg, e após 15 minutos os animais foram submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro (Figura 9).

Experimento 6: No dia 0 foi realizada uma medida basal para a avaliação da hiperalgesia térmica ao calor, seguida pela inoculação de VEI ou CEL. Após seis dias foi avaliada uma medida basal da hiperalgesia térmica ao calor, seguido pela separação dos grupos para o tratamento farmacológico. Os animais foram tratados com MDZ 0,5 mg/kg, e a latência para a resposta foi avaliada nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos (Figura 11).

Experimento 7: Os animais que foram tratados com MDZ 0,5 mg/kg, após serem submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro, foram eutanasiados e foi realizada a coleta do córtex pré-frontal e amígdala para as seguintes análises bioquímicas: proteína, lipoperoxidação (LPO), nível de glutathiona reduzida (GSH) e superóxido desmutase (SOD) (Tabela 1).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Teste *t* de *Student* foi empregado para análises dos dados obtidos nos experimentos do labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro. ANOVA de uma ou duas vias foi empregada para as análises dos dados obtidos nos experimentos com os tratamentos no labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro, sendo a condição (não carcinoma ou carcinoma) os fatores dependentes e o tratamento os fatores independentes. Caso haja diferença significativa nos fatores independentes, foi aplicado o teste de *post-hoc* de *Bonferroni*. ANOVA de duas vias com medidas repetidas foi empregada para as análises dos dados obtidos nos experimentos de hiperalgesia térmica ao calor, sendo o tratamento o fator independente e os tempos de comportamentos nociceptivos avaliados como medidas repetidas. Em caso de diferença significativa, foi aplicado o teste de *post-hoc* de *Bonferroni*. Em todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 COMPORTAMENTO DE RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256 NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.

Quando avaliado no LCE, os animais que foram inoculados com células Walker-256 apresentaram um menor tempo de permanência nos braços aberto, e um maior tempo de permanência nos braços fechados apresentando assim um comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado em relação aos animais do grupo controle (Figura 1A). Além disso, não foi observada diferença significativa no número de entradas nos braços fechados, sugerindo que os animais com células Walker-256 não apresentam nenhum problema locomotor em relação ao grupo controle (Figura 1C).

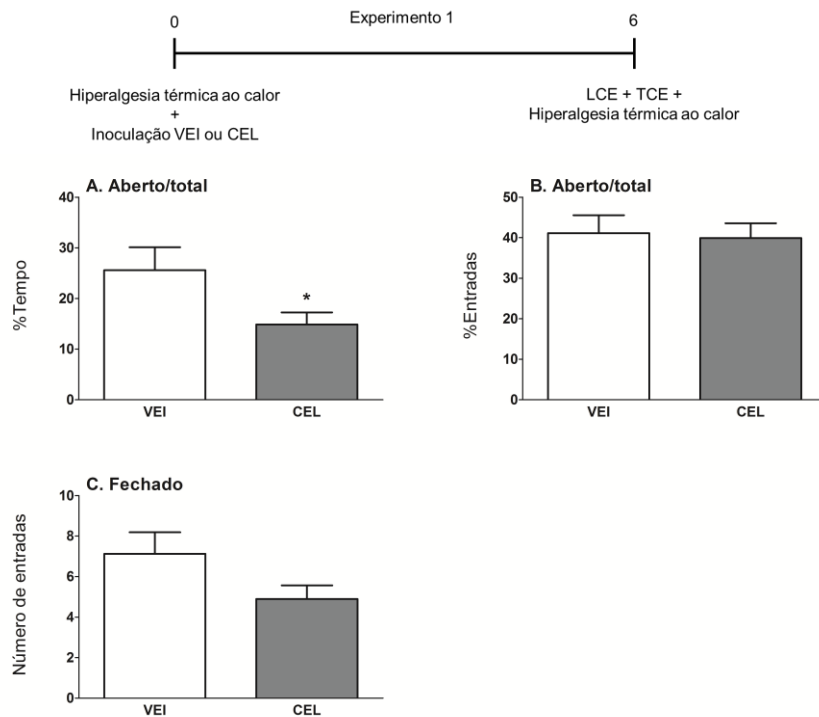


Figura 1 Avaliação comportamental de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. (A) Porcentagem de tempo dentro dos braços abertos pelo tempo total; **(B) Porcentagem do** número de entradas nos braços abertos; **(C)** Número de entradas nos braços fechados. Os valores representam a média \pm e.p.m. $n=8-10$ por grupo, $*p<0,05$ comparado ao grupo VEI (Teste *t* de Student); labirinto em cruz elevado (LCE); transição claro-escuro (TCE); veículo (VEI); células Walker-256 (CEL).

4.2 COMPORTAMENTO DE RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256 NO TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO.

Quando avaliado o comportamento na TCE, os animais inoculados com células Walker-256 apresentaram uma menor porcentagem no tempo de permanência no compartimento claro, apresentando assim um comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado em relação ao grupo controle (Figura 2A). O número de transições também foi avaliado a fim de identificar se haveria algum problema locomotor, entretanto quando avaliado nesse teste houve uma diferença significativa entre os grupos (Figura 2B).

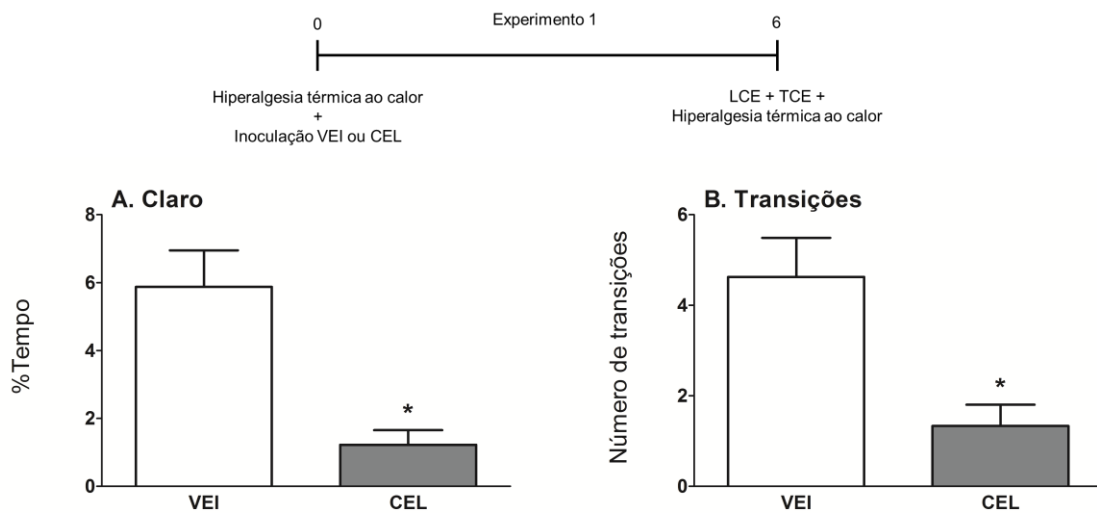


Figura 2 Avaliação comportamental de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste de transição claro-escuro. (A) Porcentagem de tempo de permanência dentro do compartimento claro; **(B)** Número de transições entre os dois compartimentos. Os valores representam a média da porcentagem de tempo \pm e.p.m. $n=8-10$ por grupo, $*p<0,05$ quando comparado ao grupo VEI (Teste *t* de Student); labirinto em cruz elevado (LCE); transição claro-escuro (TCE); veículo (VEI); células Walker-256 (CEL).

4.3 DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR APÓS A INOCULAÇÃO DAS CÉLULAS WALKER-256.

Na medida basal antes da inoculação das células (Pré) não foi observada diferença estatística entre os grupos VEI e CEL. O tempo de latência para a resposta no grupo controle não apresentou diferença estatística no 6° dia após receber veículo. No grupo com células Walker-256 a latência para a resposta foi menor em relação ao grupo veículo, demonstrando assim que os animais com tumor desenvolveram hiperalgesia térmica ao calor (Figura 3).

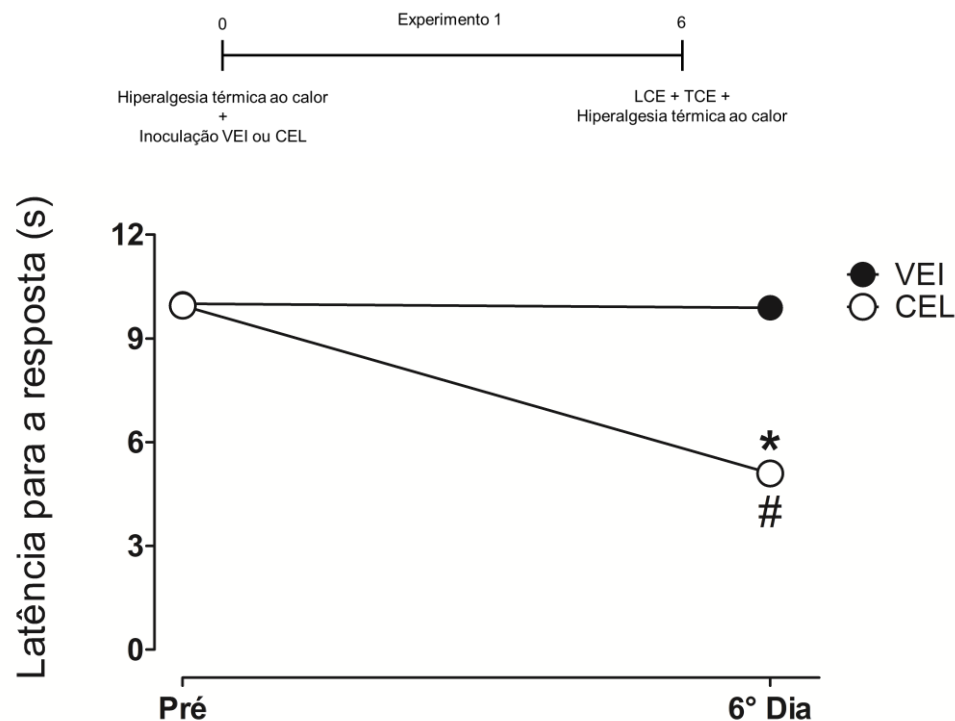


Figura 3 Avaliação da hiperalgesia térmica ao calor em modelo de carcinoma orofacial. As respostas dos animais à estimulação térmica foram avaliadas antes (Pré) e seis dias após a inoculação das células Walker-256 (6º Dia). Os valores representam a média \pm e.p.m. $n=8-10$ por grupo, $*p<0,001$ quando comparado ao grupo VEI na medida 6º Dia, $\#p<0,001$ quando comparado ao grupo CEL na medida Pré (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo *post-hoc* de *Bonferroni*); labirinto em cruz elevado (LCE); transição claro-escuro (TCE); veículo (VEI); células Walker-256 (CEL).

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM LIDOCAÍNA NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256.

Na medida basal antes da inoculação das células (Pré) não foi observada diferença estatística entre nenhum dos grupos (VEI-VEI; VEI-LDC 2%; CEL-VEI; CEL-LDC 2%; CEL-LDC 4%). Seis dias após a inoculação do tampão fosfato (VEI) os animais não apresentaram diferença estatística em relação à medida basal. Quando observada a latência para a resposta dos animais inoculados com células Walker-256 (CEL), apresentou diferença estatística em relação ao grupo VEI. Tanto a dose de 2% quando a de 4% resultou em efeito anti-hiperalgésico 30 minutos após a administração quando comparado ao grupo veículo, sendo que esse efeito foi abolido após 1 hora em ambas as doses. O efeito da menor dose não modificou a latência para a resposta nos animais controle em nenhuma das medidas (Figura 4).

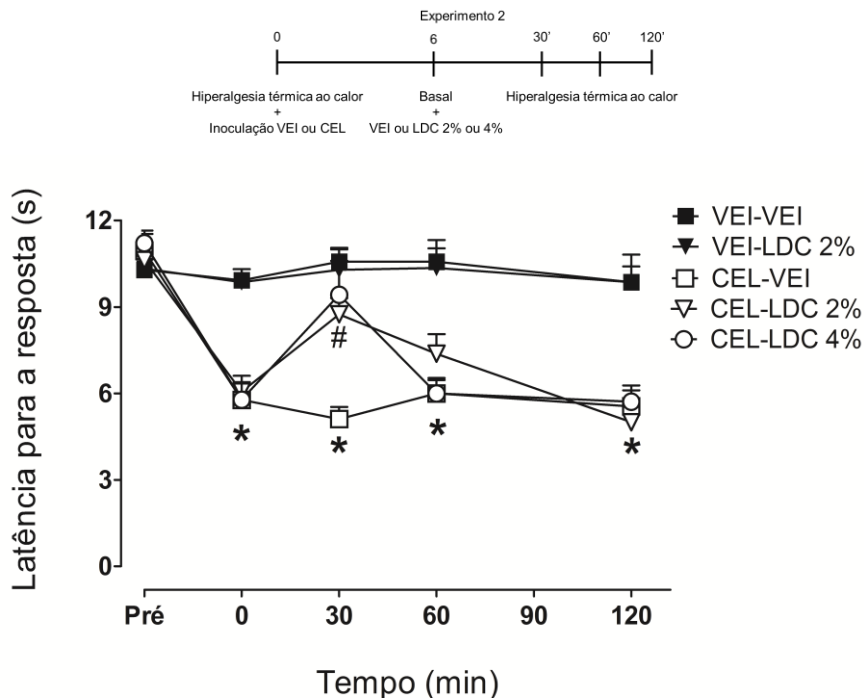


Figura 4 Efeito do tratamento local com lidocaína em animais com carcinoma orofacial na hiperalgesia térmica ao calor. As respostas dos animais à estimulação térmica foram avaliadas antes (Pré) e após seis dias a inoculação das células Walker-256 (0). Os ratos foram tratados no sexto dia com VEI (i.l.) ou LDC 2% ou 4% (i.l.), e a resposta foi avaliada durante duas horas. Os valores representam a média \pm e.p.m. $n=7-9$ animais, $*p<0,001$ em relação ao grupo VEI-VEI, $\#p<0,001$ em relação ao grupo CEL-VEI (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo *post-hoc* de *Bonferroni*); veículo (VEI); células Walker-256 (CEL); lidocaína (LDC).

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL COM LIDOCAÍNA NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO EM RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256.

Quando avaliado no LCE foi observado que os animais com células Walker-256 tratados com veículos apresentaram um comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado em relação ao controle. Isso se deve ao fato que os animais com câncer permaneceram menos tempo nos braços abertos em relação ao grupo controle (Figura 5A). O tratamento com lidocaína 2% (LDC 2%) não foi eficaz em reduzir esse comportamento, nem em animais controle nem em animais com células Walker-256. Quando avaliado o número de entradas nos braços abertos, os grupos com câncer não apresentaram diferença estatística entre os grupos controle (Figura 5B). Mais ainda, não houve nenhuma diferença no número de entradas nos braços fechados, de tal modo a não apresentar nenhum problema locomotor, e que a droga não interferiu nesse parâmetro (Figura 5C).

Quando avaliado o comportamento na TCE, foi visto que os animais com carcinoma facial permaneciam menos tempo dentro do compartimento claro em relação ao grupo controle, indicando um comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado (Figura 6A). O tratamento com LDC 2% não alterou nenhum desses parâmetros, de tal modo que esse resultado vai de acordo com o obtido no LCE, demonstrando que a LDC não apresenta efeito do tipo ansiolítico (Figura 5A). Quando avaliado o número de transições foi visto que não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos, sugerindo que a condição não interfere na atividade locomotora dos animais, e que o tratamento não alterou esse parâmetro (Figura 6B).

4.6 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO DA DROGA MIDAZOLAM EM RATOS NAÏVE.

Como os roedores são muito sensíveis aos benzodiazepínicos, além de ter ação rápida, é muito utilizado como pré-anestésico, sabendo disso, foi de interesse investigar uma dose que não promovesse sedação nos animais. Os animais foram tratados intraperitonealmente com duas doses de midazolam (MDZ 0,5 e 1,0 mg/kg), e após 15 minutos os animais foram colocados no labirinto em cruz elevado (LCE). Quando avaliado o tempo de permanência dentro dos braços abertos, os animais tratados com MDZ apresentaram comportamento do tipo ansiolítico (Figura 7A). Entretanto, quando avaliado o número de entradas nos braços fechados, a dose de 1,0 mg/kg apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle, demonstrando um possível efeito sedativo (Figura 7C). Logo após o LCE os animais foram colocados na transição claro-escuro (TCE), e foi visto que a dose de 1,0 mg/kg não apresentou efeito do tipo ansiolítico, diferente do que foi observado no LCE (Figura 7A). Entretanto, a dose de 0,5 mg/kg teve efeito do tipo ansiolítico, quando avaliada a porcentagem de tempo de permanência dentro do compartimento claro (Figura 8A). Como a dose de 1,0 mg/kg apresentou um possível efeito sedativo no LCE (Figura 7C) e como não apresentou efeito do tipo ansiolítico na TCE (Figura 8A), os experimentos subsequentes foram realizados com a dose de 0,5 mg/kg de MDZ.

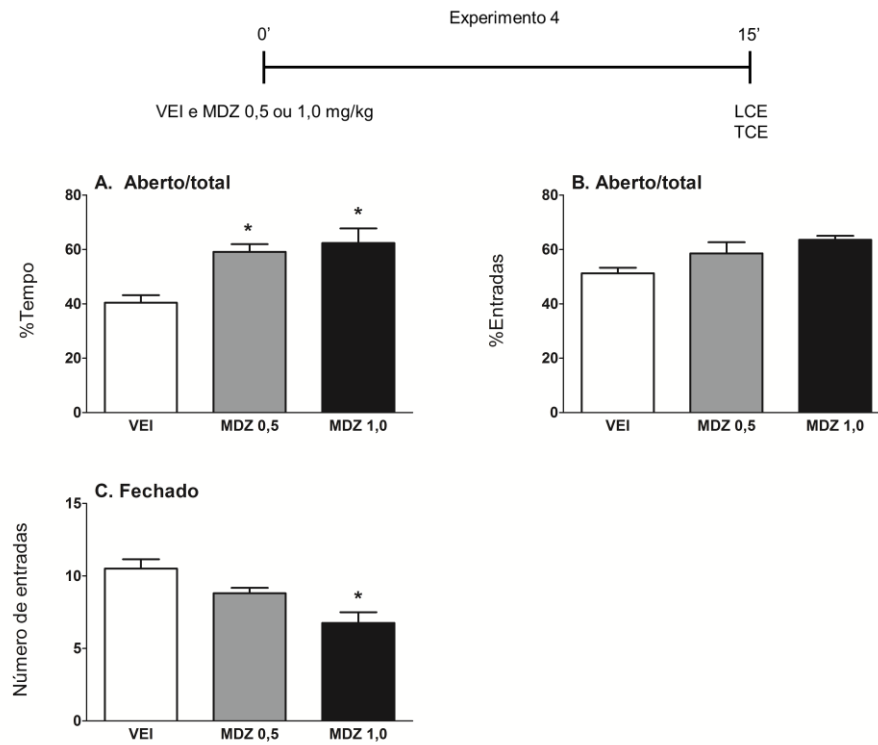


Figura 7 Avaliação farmacológica do efeito do tipo ansiolítico do midazolam em ratos naïve submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. **(A)** Porcentagem de tempo de permanência dentro dos braços abertos; **(B)** Porcentagem no número de entradas nos braços abertos; **(C)** Número de entradas nos braços fechados. Os valores representam a média \pm e.p.m. $n=8-10$ por grupo, $*p<0,05$ comparado ao grupo VEI (ANOVA de uma via, seguida pelo *post-hoc* de *Newman-Keuls*); labirinto em cruz elevado (LCE); veículo (VEI); midazolam (MDZ).

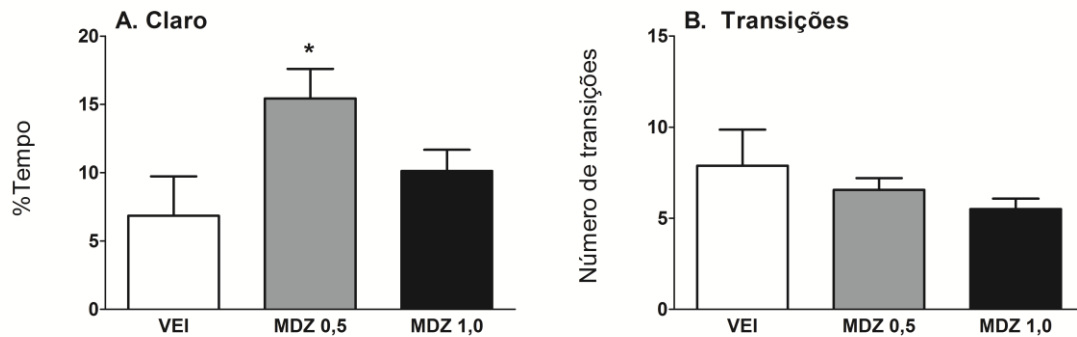


Figura 8 Avaliação farmacológica do efeito do tipo ansiolítico do midazolam em ratos naïve submetidos ao teste de transição claro-escuro. **(A)** Porcentagem de tempo de permanência dentro do compartimento claro; **(B)** Número de transições entre os dois compartimentos. Os valores representam a média \pm e.p.m. $n=8-10$ por grupo, $*p<0,05$ comparado ao grupo VEI (ANOVA de uma via, seguida pelo *post-hoc* de *Newman-Kuels*); transição claro-escuro (TCE); veículo (VEI); midazolam (MDZ).

4.7 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM MIDAZOLAM NO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO EM RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256.

Os animais com câncer apresentaram comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado em relação aos controles, pois permaneceram menos tempo nos braços abertos. Interessante que, os animais tratados, tanto controle quanto com câncer, apresentaram comportamento do tipo ansiolítico, pois permaneceram mais tempo nos braços abertos (Figura 9A). Mais ainda, tanto a condição, quanto o tratamento, não interferiram na atividade locomotora, isso porque não houve diferença estatística no número de entradas nos braços fechados (Figura 9C). Imediatamente após o LCE, os animais foram expostos a TCE, e os dados foram reproduzidos em relação ao LCE. Isto é, os animais com câncer apresentaram comportamento do tipo ansiogênico em relação aos controles, isto porque eles permaneceram menos tempo no compartimento claro. O tratamento com MDZ teve efeito do tipo ansiolítico, pois tanto os animais controle quanto àqueles que receberam células Walker-256 permaneceram mais tempo dentro do compartimento claro, este sendo aversivo aos animais (Figura 10A). Quando analisado o número de transições entre os compartimentos, foi visto que tanto a condição quanto o tratamento não interferiram na atividade locomotora (Figura 10B).

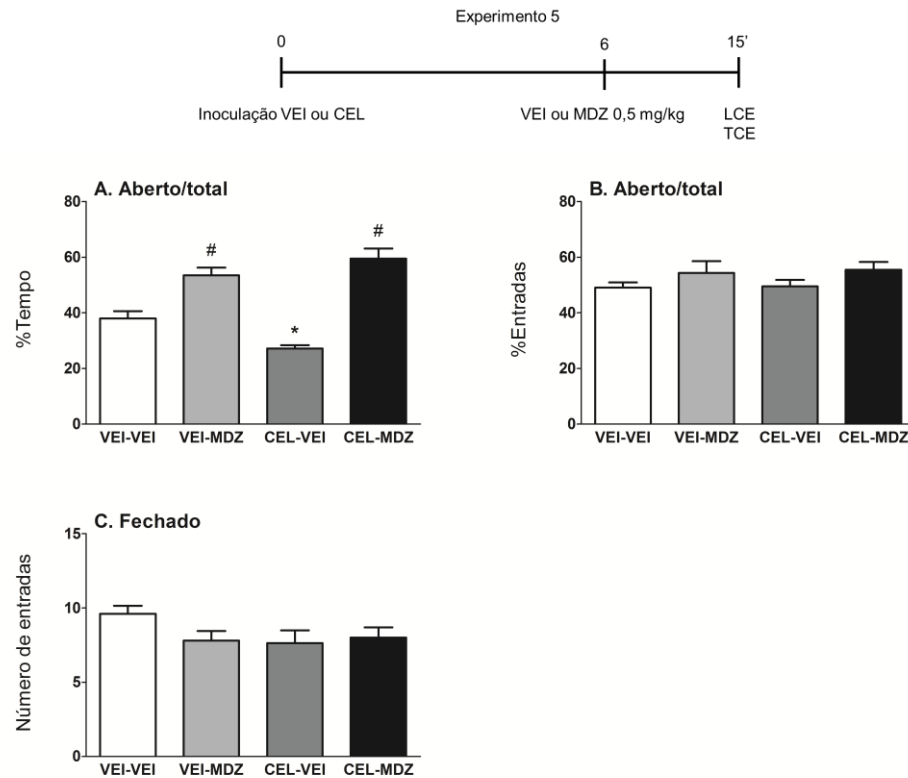


Figura 9 Efeito do tratamento sistêmico com midazolam sobre as respostas comportamentais de ansiedade de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado. **(A)** Porcentagem de tempo de permanência dentro dos braços abertos; **(B)** Porcentagem no número de entradas nos braços abertos; **(C)** Número de entradas nos braços fechados. Os valores representam a média \pm e.p.m. $n=8-10$ por grupo, $*p<0,05$ comparado ao grupo VEI $\#p<0,05$ quando comparado ao seu grupo controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo *post-hoc* de *Bonferroni*); labirinto em cruz elevado (LCE); veículo (VEI); midazolam (MDZ).

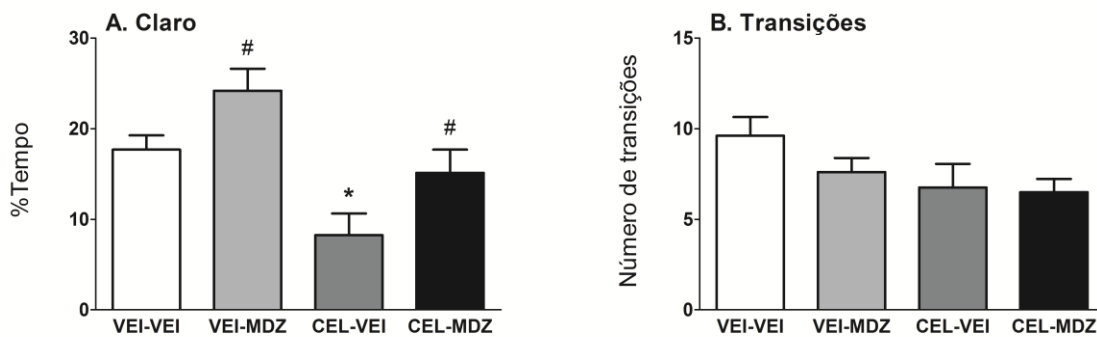


Figura 10 Efeito do tratamento sistêmico com midazolam sobre as respostas comportamentais de ansiedade de animais com carcinoma orofacial submetidos ao teste de transição claro-escuro. **(A)** Porcentagem de tempo de permanência dentro do compartimento claro; **(B)** Número de transições entre os dois compartimentos. Os valores representam a média \pm e.p.m. $n=8-10$ por grupo, $*p<0,05$ comparado ao grupo VEI $\#p<0,05$ quando comparado ao seu grupo controle (ANOVA de duas vias, seguida pelo *post-hoc* de *Bonferroni*); labirinto em cruz elevado (LCE); veículo (VEI); midazolam (MDZ).

4.8 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM MIDAZOLAM NA HIPERALGESIA TÉRMICA AO CALOR EM RATOS INOCULADOS COM CÉLULAS WALKER-256.

A latência para a resposta dos animais com câncer foi estatisticamente diferente entre o grupo controle, demonstrando que esses animais com câncer apresentam hiperalgesia térmica ao calor. O tratamento com MDZ não apresentou nenhum efeito do tipo antihiperálgico, isto porque não alterou a latência para a resposta, tanto dos animais controle quanto dos animais com células Walker-256 (Figura 11).

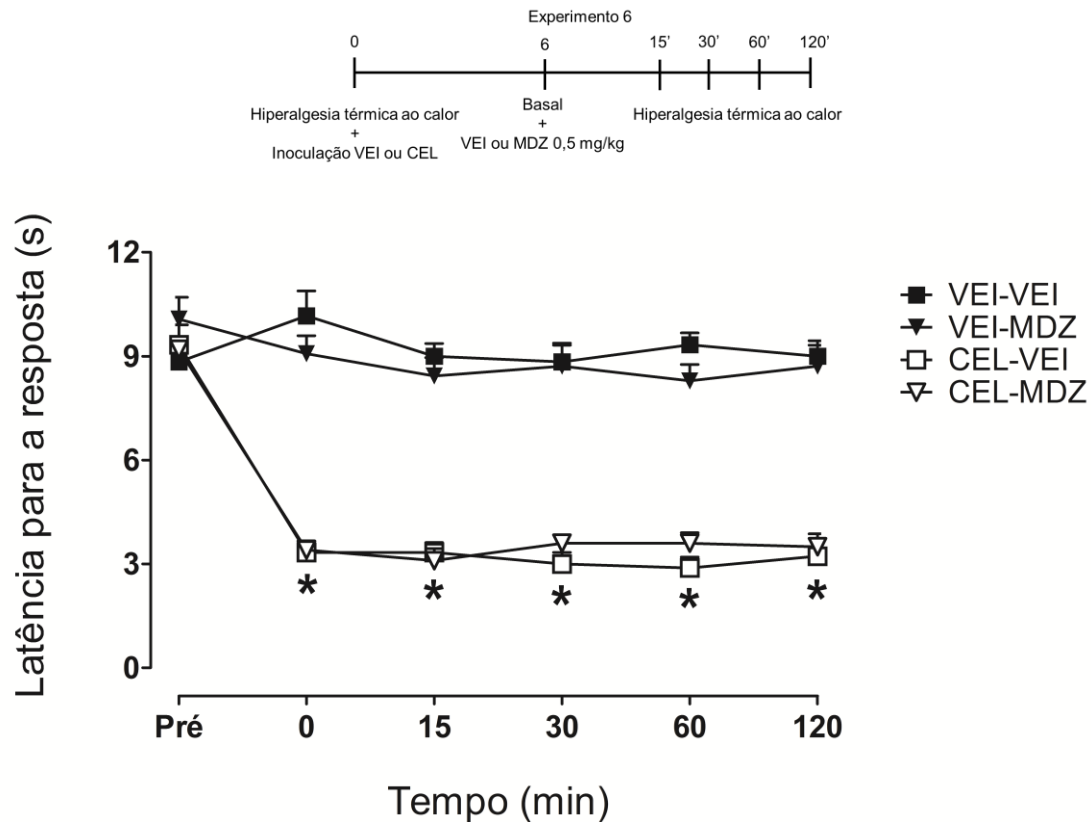


Figura 11 Efeito do tratamento sistêmico com midazolam em animais com carcinoma orofacial na hiperalgesia térmica ao calor. As respostas dos animais à estimulação térmica foram avaliadas antes (Pré) e após seis dias da inoculação das células Walker-256 (0). Os ratos foram tratados no sexto dia com VEI (i.p.) ou MDZ 0,5 mg/kg (i.p.), e a resposta foi avaliada durante duas horas. Os valores representam a média \pm e.p.m. $n=7-9$ animais, $*p<0,001$ em relação ao grupo VEI-VEI (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo *post-hoc* de *Bonferroni*); veículo (VEI); midazolam (MDZ).

4.10 NÍVEL DE ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E AMÍGDALA DOS ANIMAIS TRATADOS SISTEMICAMENTE COM MIDAZOLAM.

A taxa de lipoperoxidação (LPO), os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e a atividade da superóxido dismutase (SOD) entre os grupos VEI-VEI e VEI-MDZ não apresentaram diferença estatística (Tabela 1), tanto para as amostras do córtex pré-frontal (CPF), quanto para da amígdala (AMG). Houve diferença estatística quando comparado os parâmetros avaliados entre os grupos VEI-VEI e CEL-VEI, apenas para as amostras do CPF (Tabela 1). Mais ainda, houve somente diferença estatística nos parâmetros avaliados no CPF entre os grupos CEL-VEI e CEL-MDZ (Tabela 1).

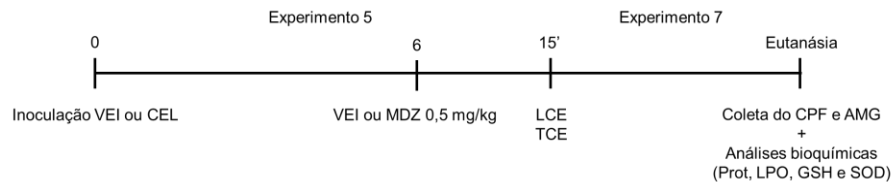


Tabela 1 Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em modelo de carcinoma orofacial.

Parâmetro	VEI-VEI	VEI-MDZ	CEL-VEI	CEL-MDZ	Unidade
CPF					
LPO	145,1 ± 10,9	141,6 ± 13,9	212,6 ± 21,7*	139,7 ± 7,9 [#]	µmol/mg ptn
GSH	10,9 ± 0,8	8,9 ± 1,1	6,6 ± 0,6*	13,0 ± 1,3 [#]	µg GSH/g tcd
SOD	55,8 ± 3,9	50,9 ± 3,2	73,3 ± 6,6*	40,3 ± 3,4 [#]	U SOD/mg ptn
AMG					
LPO	72,3 ± 12,0	74,7 ± 12,7	67,6 ± 4,6	62,5 ± 6,3	µmol/mg ptn

Os valores representam a média ± e.p.m. n=4-9 animais, *p<0,05 em relação ao grupo VEI-VEI, #p<0,05 em relação ao grupo CEL-VEI (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de *post-hoc* de *Bonferroni*); veículo (VEI); células Walker-256 (CEL); midazolam (MDZ); labirinto em cruz elevado (LCE); transição claro-escuro (TCE); córtex pré-frontal (CPF); amígdala (AMG); lipoperoxidação (LPO); glutathiona reduzida (GSH); superóxido dismutase (SOD); proteína (ptn); tecido (tcd).

5 DISCUSSÃO

Estudos clínicos têm demonstrado que pacientes que são portadores de algum tipo de câncer apresentam alta incidência de transtorno de ansiedade generalizada (DEROGATIS *et al.*, 1983; NORDIN *et al.*, 2001), sendo esta relação bastante observada em pacientes que sofrem de câncer orofacial (HUMPHRIS *et al.*, 2003). Entretanto, não há estudos sobre essa relação na pesquisa pré-clínica até o momento. Sabendo que pacientes com câncer orofacial sofrem devido aos Transtornos de Ansiedade, e que muitas vezes não há o diagnóstico dessa comorbidade, o modelo de carcinoma orofacial foi utilizado para detectar o comportamento do tipo ansioso em ratos. Um dos testes mais utilizados para avaliar esse comportamento é o labirinto em cruz elevado (LCE).

Com o desenvolvimento do tumor na região orofacial, isto é, seis dias após a inoculação das células Walker-256, os animais apresentaram comportamento do tipo ansiogênico em relação ao grupo controle (Figura 1). Isso ressalta que, não somente na clínica, os pacientes com câncer sofrem de ansiedade (CARACENI e PORTENOY, 1999; PORTENOY *et al.*, 1999; HUMPHRIS *et al.*, 2003;), mas na pesquisa pré-clínica o comportamento do tipo ansioso é evidente em ratos com carcinoma na região orofacial. Como não há estudos na pesquisa pré-clínica relacionando câncer com ansiedade, foi utilizado o teste da transição claro-escuro (TCE) para confirmar o que foi observado no LCE. Os dados avaliados na TCE corroboram os dados obtidos no LCE, isto é, animais com carcinoma orofacial apresentam comportamento do tipo ansiogênico em relação aos animais controle (Figura 2). A diferença analisada no número de transições entre os compartimentos na TCE (Figura 2B) foi um resultado pontual, já que nos demais experimentos não houve essa diferença entre os grupos. Cabe ressaltar que o número de entradas nos braços fechados do LCE é uma medida de atividade locomotora, quando avaliada entre os grupos, não foi observado diferença estatística (Figura 1C), e que no próprio TCE o dado não se reproduziu (Figuras 6B e 10B). Outro fator que poderia interferir na atividade locomotora é o desenvolvimento de caquexia nos

animais, bem caracterizada no modelo de tumor de Walker-256. Entretanto, no nosso estudo os animais não ficaram caquéticos, provavelmente devido à sua utilização por um período curto de tempo (i.e máximo 6 dias) após a inoculação das células Walker-256. Assim, nossos dados podem ser devido ao fato dos animais com carcinoma apresentarem aversão mais acentuada ao compartimento claro do TCE ou do espaço aberto e elevado do LCE. Com esses resultados fica demonstrado pela primeira vez o comportamento do tipo ansiogênico em um modelo animal de carcinoma orofacial.

Além da ansiedade que os pacientes com carcinoma orofacial apresentam, outro sintoma comum e aparente é a dor, considerada moderada a severa, sendo que pode ser caracterizada pela presença de hiperalgesia ou alodinia (PORTENOY *et al.*, 1999; PORTENOY e LESAGE, 1999). No estudo de Ono *et al.* (2009) foi visto que no 4° e 7° dia após a inoculação facial das células Walker-256 os animais apresentavam hiperalgesia térmica ao calor. Esses dados foram corroborados em um estudo prévio do nosso grupo (HUMMIG *et al.* 2014), no qual foi demonstrado o pico da hiperalgesia no 6° dia após a inoculação das células tumorais. Quando avaliada a hiperalgesia térmica ao calor (Figura 3) a latência para a resposta dos animais com carcinoma era menor em relação ao grupo controle seis dias após a inoculação das células tumorais. Com isso, fica evidente novamente a hiperalgesia térmica ao calor na região orofacial devido ao tumor. É interessante que os resultados que mostram que os animais com carcinoma apresentam tanto comportamento do tipo ansiogênico, bem como hiperalgesia térmica ao calor vão de acordo com o que se observa na clínica. Assim, pacientes que apresentam algum tipo de dor crônica normalmente tem maior incidência de transtornos de ansiedade, sendo que a dor pode ser um fator condicionante para o desenvolvimento da ansiedade (MCWILLIAMS *et al.* 2003; TURK *et al.*, 2010; GERHARDT *et al.*, 2011). Todavia, nosso interesse foi investigar, em termos biológicos, se ocorreria de fato esta associação entre os comportamentos de hiperalgesia e ansiedade.

Assim, no presente estudo foi de nosso interesse investigar se drogas com perfil anti-hiperalgésico aliviarão a hiperalgesia relacionada ao carcinoma facial e também o comportamento do tipo ansioso. Em adição, investigar se uma droga capaz de aliviar a ansiedade também aliviará a hiperalgesia associada ao carcinoma facial.

Para isto, foram utilizados a lidocaína, um anestésico local, empregado inclusive no tratamento de algumas dores crônicas, e o midazolam, um benzodiazepínico, classe comumente empregado no tratamento da ansiedade.

Em modelos animais o efeito anti-hiperalgésico da lidocaína tem sido amplamente demonstrado, inclusive em modelos de dor neuropática envolvendo o nervo trigêmeo (CHICHORRO, 2006). Neste estudo foi observado que animais que foram submetidos à constrição do nervo infraorbital desenvolveram hiperalgesia térmica ao calor, e que o tratamento com lidocaína foi capaz de aumentar o tempo de reação desses animais após 60 minutos da administração da droga, persistindo até 120 minutos após a administração. Cabe ressaltar que no estudo de Chichorro (2006) a lidocaína foi administrada sistemicamente na dose de 10 mg/kg. No presente estudo, a lidocaína foi utilizada por via subcutânea (i.e. injetada no lábio superior) e também foi observado um efeito anti-hiperalgésico que persistiu somente 30 minutos (Figura 4). Essa diferença pode ser principalmente ao fato de ter sido uma administração local e não sistêmica. Corroborando nossos dados, em outro modelo de dor aguda, o teste de formalina orofacial, a lidocaína também apresentou efeito antinociceptivo (DALLEL *et al.*, 1995), quando utilizada na mesma dose de lidocaína que em nosso estudo. Com isso, fica claro que a administração local de lidocaína é um possível tratamento para o controle da dor, tendo um efeito razoavelmente rápido, entretanto não sendo duradouro.

Contudo, no presente estudo observamos que o efeito anti-hiperalgésico da lidocaína nos animais com carcinoma facial não foi capaz de reduzir o comportamento do tipo ansioso quando avaliados tanto no LCE quanto na TCE (Figuras 5 e 6). Assim, nossos dados indicam que esses comportamentos não estão necessariamente associados. Cabe ressaltar que alguns autores utilizam o número de entradas nos braços abertos como parâmetro de ansiedade, e o número de entradas nos braços fechados como parâmetro de atividade locomotora (ROESKA *et al.*, 2008; SAITO e BRANDÃO *et al.*, 2015). Os resultados com o tratamento local com lidocaína 2% é importante, já que mesmo reduzindo a dor localmente, isto é, sem ter nenhuma interferência no sistema nervoso central, reduziu apenas a hiperalgesia térmica ao calor, não reduzindo o comportamento do tipo ansiogênico nesses animais.

Interessante que outra droga que possui efeito analgésico, a morfina, foi capaz de induzir além do efeito anti-hiperalgésico, um efeito do tipo ansiolítico em ratos. Assim, foi observado em modelo de constrição do nervo infraorbital que os animais desenvolveram hiperalgesia térmica ao calor e que o tratamento com morfina apresentou efeito antinociceptivo (CHICHORRO, 2006). Em adição, estudos mostram que a administração sistêmica de morfina apresenta efeito ansiolítico quando avaliado no labirinto em cruz elevado (REZAYOF *et al.*, 2009; MOTEVASSELI *et al.*, 2010). Esses comportamentos de ansiedade e dor podem ser processados por algumas estruturas encefálicas em comum, dentre elas a amígdala. Especula-se que o possível efeito ansiolítico e analgésico da morfina pode ser devido ao fato de ela estar atuando na amígdala, principalmente em neurônios GABAérgicos, que possuem receptores opioidérgicos nos terminais de interneurônios GABAérgicos (SASAKI *et al.*, 2002; REZAYOF *et al.*, 2009; RASHVAND *et al.*, 2014). Assim, os estudos sugerem que o sistema opioidérgico participa da mediação ou modulação da ansiedade e da hiperalgesia. Entretanto, nenhum estudo investigou esse sistema no modelo de carcinoma orofacial associado à dor e ansiedade.

Ainda no presente estudo, a fim de investigar se uma droga com efeito ansiolítico clínico alteraria também respostas comportamentais nociceptivas, utilizamos o midazolam, que é uma droga que atua no sistema GABAérgico, mais precisamente no sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Vários estudos têm demonstrado o efeito do tipo ansiolítico do midazolam em diversos testes. Por exemplo, no estudo de Roeska (2008) foi visto que o midazolam na dose de 0,5 mg/kg apresentava efeito do tipo ansiolítico 45 minutos após a administração da droga quando avaliado no LCE. Já no estudo de Motta e Brandão (1993) a administração intraperitoneal de midazolam apresentou efeito do tipo ansiolítico apenas na dose 3,0 mg/kg, 15 minutos após a administração. Outros estudos têm demonstrado esse efeito do midazolam no labirinto em cruz elevado com outras doses, como por exemplo, no estudo de Salonen *et al.* (1992) em que as doses de 0,5 e 1,0 mg/kg apresentavam efeito do tipo ansiolítico 5 minutos após a administração da droga.

Tendo em vista que os efeitos ansiolíticos foram observados em diferentes doses e que o midazolam é uma droga de ação rápida devido à alta lipossolubilidade, foi

realizado um teste piloto para definir as doses. Foram utilizadas duas doses (0,5 e 1,0 mg/kg) para avaliar o efeito, 15 minutos após a administração da droga (Figuras 7 e 8). Foi visto que estas doses mostraram resultados que corroboram os dados de alguns estudos já citados. Cabe mencionar que o MDZ foi utilizado como um controle positivo para o efeito do tipo ansiolítico em ratos naïve. Assim, foi observado que as duas doses apresentaram efeito do tipo ansiolítico, pois aumentou o tempo de permanência nos braços abertos (Figura 7A). Porém, apenas a menor dose (0,5 mg/kg) induziu um efeito do tipo ansiolítico específico pois não causou alteração locomotora quando avaliado o número de entrada nos braços fechados (Figura 7C). O mesmo efeito do tipo ansiolítico do MDZ foi observado na TCE (Figura 8) quando a menor dose foi utilizada. Por isso, a dose de 0,5 mg/kg foi escolhida para os próximos estudos a fim de avaliar o efeito induzido pelo midazolam em animais com carcinoma orofacial. Os resultados obtidos no LCE e na TCE foram reproduzidos, isto é, os animais com carcinoma facial apresentaram comportamento do tipo ansiogênico mais pronunciado em relação ao controle. Mais ainda, os animais tratados com midazolam apresentaram comportamento do tipo ansiolítico (Figuras 9 e 10).

Como muitos estudos relacionam o aumento de ansiedade com o aumento da dor, então esperávamos que com a administração de um ansiolítico fosse possível reduzir a dor. Entretanto, quando avaliada a hiperalgesia térmica ao calor, os animais com carcinoma facial ou controle tratados com midazolam não tiveram seu limiar de resposta alterado (Figura 11). Interessante que no estudo de Roeska *et al.* (2008) o midazolam não apresentou efeito antinociceptivo em animais que foram submetidos à constrição do nervo ciático, porém nesse estudo o midazolam foi administrado por via sistêmica. Contudo, quando administrado por via intratecal, o midazolam apresentou efeito antinociceptivo avaliado pelo teste de *tail-flick*, também sem apresentar efeito quando administrado intraperitonealmente (NISHIYAMA, 2006). Interessante que a administração crônica de midazolam (2,0 mg/kg) em ratos submetidos a constrição do nervo ciático apresentou efeito antinociceptivo quando avaliada a hiperalgesia térmica ao calor (SHIH *et al.*, 2008). Já no estudo de Zambotti *et al.* (1991) o midazolam não apresentou efeito antinociceptivo quando avaliado no *tail-flick*; mas quando outro benzodiazepínico, o diazepam, foi administrado, este induziu o efeito antinociceptivo.

Assim, parece que dependendo da dose, da via utilizada e também do benzodiazepínico, estes podem induzir efeitos distintos sobre a analgesia e a sedação. Concluindo, o presente estudo mostrou que a utilização de midazolam em uma única administração sistêmica apresenta efeito do tipo ansiolítico, podendo ser um possível tratamento para o controle da ansiedade em pacientes com câncer facial.

Cabe ressaltar que o efeito ansiolítico pode ser alcançado por outros mecanismos. Uma droga que possuiu um mecanismo de ação distinto dos benzodiazepínicos e que também apresenta efeito ansiolítico é a pregabalina (BOTH *et al.*, 2014; DARBA *et al.*, 2014; HERSHENBERG *et al.*, 2014), além de antidepressivos (DAHL *et al.*, 2005; ALLGULANDER, 2012) e analgésicos (MOTEVASSELI *et al.*, 2010; REZAYOF *et al.*, 2013). A pregabalina é uma droga anticonvulsivante que se liga na subunidade $\alpha_2\text{-}\delta$ dos canais de cálcio voltagem dependente, os quais estão amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central e periférico. Com isso há o impedimento o potencial de ação, de tal modo que reduzirá a liberação de diversos neurotransmissores, como glutamato, noradrenalina, serotonina e dopamina (BOTH *et al.*, 2014). Esse efeito inibitório neutraliza o estado de hiperexcitabilidade neuronal, que normalmente ocorre em varias condições neuropsiquiátrica, (HADLEY *et al.*, 2012), sendo assim o possível efeito do tipo ansiolítico da pregabalina. É importante ressaltar, que em um estudo prévio do nosso grupo a pregabalina foi capaz de reduzir a hiperalgesia em no modelo de carcinoma oral (Hummig *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo tem sido sugerido como um fator etiológico que contribui para o desenvolvimento de Transtornos de ansiedade (HOVATTA *et al.*, 2010). Esse aumento de estresse oxidativo aumenta o dano em macromoléculas, como por exemplo, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos. O córtex pré-frontal (CPF) e a amígdala (AMG) são regiões encefálicas que possuem importante relação nos comportamentos de ansiedade. Cabe ressaltar que o encéfalo é vulnerável ao estresse oxidativo, principalmente pela demanda e consumo de oxigênio, sendo este potencialmente nocivo (FREITAS *et al.*, 2001). Freitas *et al.* (2011) demonstrou que a utilização das células Walker-256 altera parâmetros oxidativos em diversas regiões encefálicas, como hipotálamo, hipocampo e cerebelo. Nossos dados mostraram que os animais portadores do tumor Walker-256 apresentaram um aumento nos parâmetros

oxidativos apenas no córtex pré-frontal, não apresentando, entretanto, diferença significativa na amígdala (Tabela 1). Esse aumento de estresse oxidativo no CPF pode estar relacionado no desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso nesses ratos portadores do tumor Walker-256. Tem sido demonstrado que drogas ansiolíticas apresentam efeitos distintos no *status* oxidativo (KROLOW *et al.*, 2014). Interessante que uma única dose de Diazepam foi capaz de diminuir os níveis de TBARS em regiões encefálicas em animais que sofreram previamente estresse (MUSAVI e KAKKAR, 1998). Nossos dados mostram que o tratamento com o MDZ diminuiu os parâmetros de estresse oxidativo no CPF observados apenas nos animais com carcinoma orofacial (Tabela 1), sugerindo que a alteração destes parâmetros de estresse oxidativo no CPF está influenciando comportamentos relacionados com a ansiedade.

Portanto, podemos sugerir que a ansiedade pode ser controlada através da interferência em mecanismos distintos daqueles envolvidos na dor associada ao câncer facial. Com isso, nossos dados sugerem que a hiperalgesia e a ansiedade nos animais com carcinoma facial parecem apresentar mecanismos distintos, e controle de um (i.e. dor ou ansiedade) não interfere no outro.

6 CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que animais com carcinoma orofacial induzido por inoculação de células Walker-256 apresentam tanto comportamento nociceptivo quanto comportamento do tipo ansioso. Mais ainda, os mecanismos de nocicepção e ansiedade no modelo de carcinoma orofacial parecem não ser relacionados diretamente, pois o controle da dor com lidocaína, não interferiu com o comportamento tipo ansioso, enquanto que midazolam causou efeito do tipo ansiolítico, mas não interferiu na hiperalgesia. Adicionalmente, observou-se que os animais com tumor Walker-256 apresentaram aumento de parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal, e o midazolam foi capaz de reduzir esses parâmetros apenas nos animais portadores do tumor, o que pode contribuir para o seu efeito ansiolítico.

Os resultados obtidos nesse estudo estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 Influência dos diferentes tratamentos na hiperalgesia térmica ao calor e ansiedade em modelo de carcinoma orofacial.

Tratamento	Hiperalgesia Térmica ao Calor	Ansiedade	Estresse Oxidativo
Tumor Walker-256	↑	↑	↑
Lidocaína	↓	↔	-
Midazolam	↔	↓	↓(LPO e SOD)* ↑(GSH)*

Os símbolos ↑, ↓, ↔ e - significam aumento, redução, não alterou o comportamento e não avaliado, respectivamente. *apenas nos animais com carcinoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCO, A.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; DREIFUSS, A. A. Characteristics and Applications of the Walker-256 Rat Tumour. Em: Pouliquen, D. (Ed.). **The rat in cancer research: a crucial tool for all aspects of translational studies**. Kerala, India: Trivandrum: Research Signpost/ Transworld Research Network, 2012, p.131-156.

AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E. E. Trauma as a cause of localization of blood-borne metastases: preventive effect of heparin and fibrinolysin. **Ann Surg.** v. 161, p. 97-102, 1965.

ALLGULANDER C. Generalized anxiety disorder: a review of recent findings. **Journal of Experimental and Clinical Medicine.** v. 4, n. 2, p. 88-91, 2012.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, 5. Ed. Arlington, va, American Psychiatric Association, 2013.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; FILHO D. Z. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr** v. 23, n. 4, p. 233-42, 2001.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncol.** v. 46, n. 6, p. 414-417, 2010.

BECKER, D.E.; REED K.L. LOCAL Anesthetics: review of pharmacological considerations. **Anesth Prog.** v. 59, p. 90–102, 2012.

BENOLIEL, R.; EPSTEIN, J.; ELIAV, E.; JUREVIC, R.; ELAD S. Orofacial pain in cancer: part i--mechanisms. **J Dent Res.** v. 6, n. 86, p. 491-505, 2007.

BOTH, C.; KOJDA, G.; LANGE-ASSCHENFELDT C. Pharmacotherapy of generalized anxiety disorder: focus and update on pregabalin. **Expert Rev Neurother.** v. 14, n. 1, p. 29-38, 2014.

BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 27, p. 248-254, 1976.

BRANDIZZI, D.; GANDOLFO, M.; VELAZCO, M.L.; CABRINI, R.L.; LANFRANCHI, H.E. Clinical features and evolution of oral cancer: a study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v. 13, p. 544–548, 2008.

BREITBART W. Identifying patients at risk for, and treatment of major psychiatric complications of cancer. **Support Care Cancer** v 3, n 1, p 45-60. 1995.

BRIGATTE, P.; SAMPAIO, S.C.; GUTIERREZ, V.P.; GUERRA, J.L; SINHORINI, I.L.; CURI, R.; CURY, T. Walker-256 Tumor-Bearing Rats as a Model to Study Cancer Pain. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 5, p. 412-421, 2007.

CAMPANA, I.G.; GOIATO M.C. Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, Fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v.34, n.1, p. 20-26, 2013

CARACENI A.; PORTENOY R.K. An international survey of cancer pain characteristics and syndromes. **Pain**, v. 82, p. 263–74, 1999.

CHICHORRO, G. **Neuralgia do Trigêmeo: estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental.** 193 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CHICHORRO, J.G., ZAMPRONIO, A.R., CABRINI, D.A., FRANCO, C.R., RAE G.A. Mechanisms operated by endothelin eta and etb receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**. v43, p. 133-142, 2009.

COLOMBO, J.; RAHAL P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, n. 2, p. 165-174, 2009.

CRAWLEY, J.N.; GOODWIN F.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. v.13, p. 167-170, 1980

DAHL, A.A.; RAVINDRAN, A.; ALLGULANDER, C.; KUTCHER, S.P.; AUSTIN, C.; BURT T. Sertraline in generalized anxiety disorder: efficacy in treating the psychic and somatic anxiety factors. **Acta Psychiatr Scand**. v. 111, n. 6, p. 429-35, 2005.

DALLEL, R.; RABOISSON, P.; CLAVELOU, P.; SAADE, M.; WODA A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**. v. 61, p. 11-16, 1995.

DARBÀ, J.; KASKENS, L.; PÉREZ, C.; ÁLVAREZ, E.; NAVARRO-ARTIEDA, R.; SICRAS-MAINAR A. Pharmacoeconomic outcomes for pregabalin: a systematic review in neuropathic pain, generalized anxiety disorder, and epilepsy from a Spanish perspective. **Adv Ther**. v. 31, n. 1, p. 1-29, 2014.

DATTA, S.; PAI U.T. Interventional approaches to management of pain of oral cancer. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**. v. 18, n. 4, p. 627-641, 2006.

DEROGATIS, L.R.; MORROW, G.R.; FETTING, J.; PENMAN, D.; PIASETSKY, S.; SCHMALE, A.M.; HENRICHS, M.; CARNICKE C.L. JR. The prevalence of psychiatric disorders among cancer patients. **JAMA**. v 249; n 6, p 751-7. 1983

DIOS, D.P.; LESTÓN J.S. Oral Cancer Pain. **Oral Oncology**, v. 46, p. 448-451, 2010.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256: in vivo and in vitro. American. **Journal of Cancer**, v. 24, p. 556-612, 1935.

FREITAS, J.J.S.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; CURI R. Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. **Journal of Neurochemistry**. v. 77, p. 655-663, 2001.

GAO, R.; YUAN, Z.; ZHAO, Z.; GAO X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics** v. 45, n. 1, p. 41-45, 1998.

GERHARDT, A.; HARTMANN, M.; SCHULLER-ROMA, B.; BLUMENSTIEL, K.; BIEBER, C.; EICH, W.; STEFFEN S. The prevalence and type of Axis-I and Axis-II mental disorders in subjects with non-specific chronic back pain: results from a population-based study. **Pain Med**. v. 12, n. 8, p. 1231-40, 2011.

GORSKY, M.; EPSTEIN, J. B.; OAKLEY, C.; LE, N. D.; HAY, J.; STEVENSON-MOORE, P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 98, n. 5, p. 546–52, 2004.

HADLEY, S.J.; MANDEL, F.S.; SCHWEIZER E. Switching from long-term benzodiazepine therapy to pregabalin in patients with generalized anxiety disorder: a double-blind, placebo-controlled trial. **J Psychopharmacol**. v. 26, n. 4, p. 461-70, 2012.

HAMAMOTO, D.T.; KHASABOV, S.G.; CAIN, D.M.; SIMONE, D.A. Tumor-evoked sensitization of C nociceptors: a role for endothelin. **J Neurophysiol**. v. 100, p. 2300-2311, 2008.

HASSAN, W.; SILVA, C.E.B.; MOHAMMADZAIB, I.U.; ROCHA, J.B.T.; LANDEIRA-FERNANDEZA J. Association of Oxidative Stress to the Genesis of Anxiety: Implications for Possible Therapeutic Interventions. **Current Neuropharmacology**. v. 12, p. 120-139, 2014.

HAYA-FERNÁNDEZ, M.C.; BAGÁN, J.V.; MURILLO-CORTÉS, J.; POVEDA-RODA, R.; CALABUIG C. The prevalence of oral leukoplakia in 138 patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Dis**. v. 10, n. 6, p. 346–348, 2004.

HEGEL, M.T., MOORE, C.P.; COLLINS, E.D.; KEARING, S.; GILLOCK, K.L.; RIGGS, R.L.; CLAY, K.F.; AHLES T.A. Distress, psychiatric syndromes, and impairment of function in women with newly diagnosed breast cancer. **Cancer** v 107, p 2924–2931, 2006

HERSHENBERG, R.; GROS, D.F.; BRAWMAN-MINTZER O. Role of atypical antipsychotics in the treatment of generalized anxiety disorder. **CNS Drugs**. v. 28, n. 6, p. 519-33, 2014.

HOLLAND, J.C.; ROWLAND J.H. **Handbook of psychooncology: psychological care of the patient with cancer**. Nova York: Oxford University Press p.300-9. 1989

HOVATTA, I.; JUHILA, J.; DONNER J. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neurosci Res**. v.68, p.261-75, 2010.

HUMMIG, W.; MACHADO KOPRUSZINSKI, C.; CHICHORRO J.G. Pregabalin reduces acute inflammatory and persistent pain associated with nerve injury and cancer in rat models of orofacial pain. **J Oral Facial Pain Headache**. v. 28, n. 4, .p. 350-9, 2014.

HUMPHRIS, G.M.; ROGERS, S.; MCNALLY, D.; LEE-JONES, C.; BROWN, J.; VAUGHAN D. Fear of recurrence and possible cases of anxiety and depression in orofacial cancer patients. *Int. J. Oral Maxillofacial Surg.* v 32, p. 486-491, 2003

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – **Estimativa 2014**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=1>> Acesso em: 21/02/2015.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2012, p. 17 Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/abc_do_cancer_2ed.pdf> Acesso em: 21/04/2015.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.; WOLFF S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* v. 26, p. 853-856, 1991.

KROLOW, R.; ARCEGO, D. M.; NOSCHANG, C.; WEIS, S. N.; DALMAZ C. Oxidative Imbalance and Anxiety Disorders. *Current Neuropharmacology*. v. 12, p. 193-204, 2014.

LAM, D.K.; SCHMIDT B.L. Orofacial pain onset predicts transition to head and neck câncer. *Pain*. v. 152, p.1206-1209, 2011.

LAMPIC, C.; THURFJELL, E.; BERGH, J.; SJÖDÉN P.O. Short- and long-term anxiety and depression in women recalled after breast cancer screening. *Eur J Cancer*. v 37, p 463-9, 2001.

LAVELLE, E.D.; LAVELLE, W.; SMITH H.S. Myofascial trigger points. *Anesthesiol Clin.* v. 25, n. 4, p. 841-51, 2007.

LIST, M.A.; STRACKS, J.; COLANGELO, L.; BUTLER, P.; GANZENKO, N.; LUNDY, D.; SULLIVAN, P.; HARAF, D.; KIES, M.; GOODWIN, W.; VOKES, E.E. How Do head and neck cancer patients prioritize treatment outcomes before initiating treatment? **J Clin Oncol.** v. 18, n. 4, p. 877-884, 2000.

MCWILLIAMS, L.A.; COX, B.J.; ENNS M.W. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. **Pain.** v. 106, p. 127-33, 2003

MOTEVASSELI, T.; REZAYOF, A.; ZARRINDAST, M.R.; NAYER-NOURI T. Role of ventral hippocampal NMDA receptors in anxiolytic-like effect of morphine. **Physiol Behav.** v. 101, n. 5, p. 608-13, 2010.

MOTTA, V.; BRANDÃO, M.L.; Aversive and anti-aversive effects of morphine in the periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacol, Biochem Behav.** v44, p. 119-125, 1993.

MUSAVI, S.; KAKKAR P. Diazepam induced early oxidative changes at the subcellular level in rat brain. **Molecular and Cellular Biochemistry.** v. 178, p. 41-46, 1998.

NAGARO, T.; SHIMIZU, C.; INOUE, H.; FUJITANI, T.; ADACHI, N.; AMAKAWA, K.; KIMURA, S.; ARIA, T.; WATANABE, T.; OKA S. The efficacy of intravenous lidocaine on various types of neuropathic pain. **Masui.** v. 44, n. 6, p. 862–7, 1995.

NIKBAKHSH, N.; MOUDI, S.; ABBASIAN, S.; KHAFRI S. Prevalence of depression and anxiety among cancer patients. **Caspian J Intern Med.** v. 5, n. 3, p. 167-70, 2014.

NISHIYAMA T. Analgesic effects of systemic midazolam: comparison with intrathecal administration. **Can J Anaesth.** v. 53, n. 10, p. 1004-9, 2006.

NORDIN, K.; BERGLUND, G.; GLIMELIUS, B.; SJODEN, P. Predicting anxiety and depression among cancer patients: a clinical model. **Enr J Cancer** v 37, p 376-384, 2001.

OLIVER, A.J.; HELFRICK, J.F.; GARD, D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. **J Oral Maxillofac Surg.** v. 54, n. 8, p. 949–954, 1996.

ONO, K.; HARANO, N.; NAGAHATA, S.; SETA, Y.; TSUJISAWA, T.; INENAGA, K.; NAKANISHI O. Behavioral characteristics and c-Fos expression in the medullary dorsal horn in a rat model for orofacial cancer pain. **European Journal of Pain** v.13 p. 373–379, 2009.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neurosciences Methods**, v.14, p. 149-167, 1985.

PEREIRA, M.C.; OLIVEIRA, D.T.; LANDMAN, G.; KOWALSKI, L.P. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. **J Can Dent Assoc.** v. 73, n. 4, p. 339-344, 2007.

PORTENOY, R.K.; LESAGE P. Management of cancer pain. **Lancet.** v. 15, n. 353, p. 1695-1700, 1999.

PORTENOY, R.K.; PAYNE, D.; JACOBSEN P. Breakthrough pain: characteristics and impact in patients with cancer pain. **Pain.** v. 81, n.1-2, p. 129-134, 1999.

RASHVAND, M.; KHAJAVAI, A.; PARVIZ, M.; HASANEIN, P.; KESHAVARZ M. GABAA receptors are involved in the analgesic effects of morphine microinjected into the central nucleus of the amygdala. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 41, n. 5, p. 338-44, 2014.

REGAN, J.M.; PENG P. Neurophysiology of cancer pain. **Cancer Control**. v. 7, n. 2, p. 111-119, 2000.

REZAYOF, A.; HOSSEINI, S.S.; ZARRINDAST M.R. Effects of morphine on rat behaviour in the elevated plus maze: the role of central amygdala dopamine receptors. **Behav Brain Res**. v. 202, n. 2, p. 171-8, 2009.

REZAYOF, A.; ASSADPOUR, S.; ALIJANPOUR S. Morphine-induced anxiolytic-like effect in morphine-sensitized mice: involvement of ventral hippocampal nicotinic acetylcholine receptors. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 103, n. 3, p. 460-6, 2013.

ROESKA, K.; DOODS, H.; ARNDT, K.; TREEDE, R.D.; CECI A. Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. **PAIN** v. 139, p. 349–57, 2008.

SAITO, V.M.; BRANDÃO M.L. The benzodiazepine midazolam acts on the expression of the defensive behavior, but not on the processing of aversive information, produced by exposure to the elevated plus maze and electrical stimulations applied to the inferior colliculus of rats. **Neuropharmacology**. v. 88, p. 180-6, 2015.

SALONEN, M.; ONAIVI, E.S.; MAZE M. Dexmedetomidine synergism with midazolam in the elevated plus-maze test in rats. **Psychopharmacology (Berl)**. v. 108, n. 1-2, p. 229-34, 1992.

SASAKI. K., FAN L.W., TIEN L.T., MA T., LOH. HH., HO. IK. The interaction of morphine and gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behavior: using mu-opioid receptor knockout mice. **Brain Res Bull**. v. 57, n. 5, p. 689-94, 2002.

SCHMIDT, B.L.; HAMAMOTO, D.L.; SIMONE, D.A.; WILCOX, G.L. Mechanism of cancer pain. **Mol Interv**. v. 10, n. 3, p. 164-178, 2010.

SCULLY, C.; BAGAN, J.V. Recent advances in Oral Oncology. **Oral Oncol.** v. 43, n. 2, p.107-115, 2007.

SEDLAK, J.; LINDSAY R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry** v. 25, p. 192-205, 1968.

SELLNICK, S.; CROOKS D. Depression and cancer: an appraisal of the literature for prevalence, detection, and practice guideline development for psychological interventions. **Psychooncol** v 8, p 315-333, 1999.

SESSLE B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, 11(1):57-91, 2000.

SHAH, J.P.; SINGH B. Keynote comment: why the lack of progress for oral cancer? **Lancet Oncol.** v. 7, n. 5 ,p. 356-357, 2006.

SHIH, A.; MILETIC, V.; MILETIC, G.; SMITH L.J. Midazolam administration reverses thermal hyperalgesia and prevents gamma-aminobutyric acid transporter loss in a rodent model of neuropathic pain. **Anesth Analg.** v. 106, n. 4, p. 1296-302, 2008

SPIEGEL, D.; GIESE-DAVIS J. Depression and cancer: Mechanism and disease progression. **Biological Psychiatry** v 54, p 269–282, 2003.

SPIJKER, A.V.T.; TRIJSBURG, R.W.; DUIVENVOORDEN H.J. Psychological sequelae of cancer diagnosis: a meta analytical review of 58 studies after 1980. **Psychosom Med** v 59, p 280-293, 1997.

TURK, D.C.; AUDETTE, J.; LEVY, R.M.; MACKEY, S.C.; STANOS S. Assessment and treatment of psychosocial comorbidities in patients with neuropathic pain. **Mayo Clin Proc** v. 85, p. 42–50, 2010.

TYRER, P.; BALDWIN D. Generalised anxiety disorder. **Lancet**. v. 368, n. 9553, p. 2156-66, 2006.

VLASSAKOV, K.V.; NARANG, S.; KISSIN I. Local anesthetic blockade of peripheral nerves for treatment of neuralgias: systematic analysis. **Anesth Analg**. v. 112, n. 6, p. 1487-93, 2011.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer pain relief and palliative care**. Report of a WHO expert committee [World Health Organization Technical Report Series, 804]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; p. 1–75, 1990.

ZAMBOTTI, F.; ZONTA, N.; TAMMISO, R.; CONCI, F.; HAFNER, B.; ZECCA, L.; FERRARIO, P.; MANTEGAZZA P. Effects of diazepam on nociception in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v. 344, n. 1, p. 84-9, 1991.