

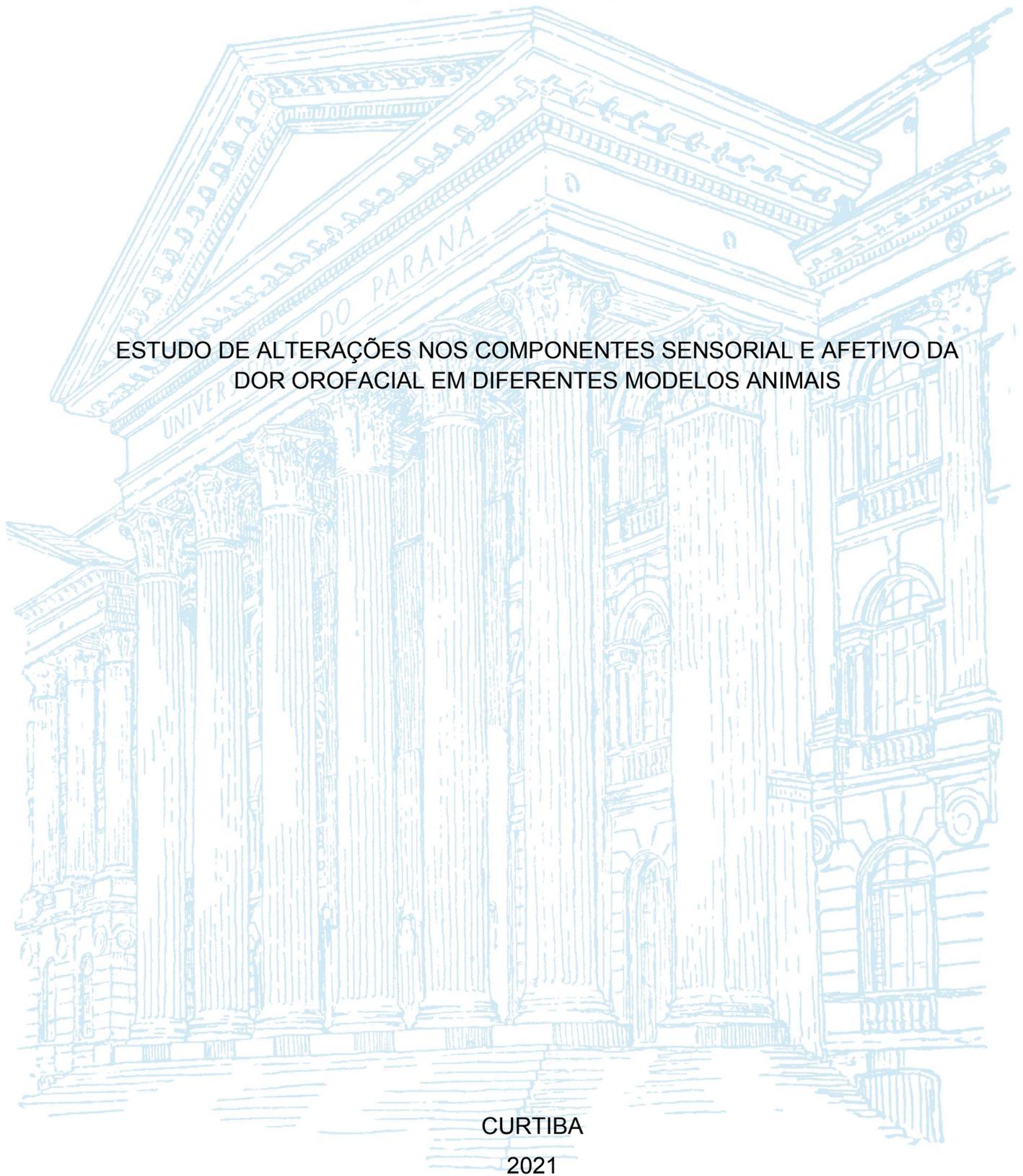
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ERIKA IVANNA ARAYA

ESTUDO DE ALTERAÇÕES NOS COMPONENTES SENSORIAL E AFETIVO DA
DOR OROFACIAL EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS

CURTIBA

2021



ERIKA IVANNA ARAYA

ESTUDO DE ALTERAÇÕES NOS COMPONENTES SENSORIAL E AFETIVO DA
DOR OROFACIAL EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Juliana Geremias Chichorro

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Araya, Erika Ivanna

Estudo de alterações nos componentes sensorial e afetivo da dor orofacial em diferentes modelos animais. / Erika Ivanna Araya. – Curitiba, 2021.

122 p.: il.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Dor orofacial. 2. Neuralgia do trigêmeo. 3. Vocalização animal. 4. Ansiedade. 5. Medição da dor. 6. Dor pós-operatória. I. Título. II. Chichorro, Juliana Geremias, 1975-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.849



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SETOR DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA
- 40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de ERIKA IVANNA ARAYA intitulada: **ESTUDO DE ALTERAÇÕES NOS COMPONENTES SENSORIAL E AFETIVO DA DOR OROFACIAL EM DIFERENTES MODELOS ANIMAIS**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA GEREMIAS CHICHORRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Maio de 2021.

Assinatura Eletrônica

28/05/2021 12:38:52.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/05/2021 13:57:13.0

GILES ALEXANDER RAE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

28/05/2021 22:09:39.0

ELIZABETH SOARES FERNANDES
Avaliador Externo (INSTITUTO PELE PEQUENO PRINCIPE)

Assinatura Eletrônica

28/05/2021 11:04:33.0

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 94189

Para autenticar este documento/assinatura, acesse

<https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 94189

Aos meus pais, María Rosa e Gerardo, por serem os principais promotores dos meus sonhos, pelo incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, a Professora Juliana Geremias Chichorro, quem carinhosamente se tornou a Prof Ju. Eu gostaria de agradecer sinceramente por confiar em mim desde o primeiro momento e me guiar como profissional no mundo acadêmico e científico. Agradeço a sua motivação e o trato afetuoso, o que me incentivou a trabalhar com entusiasmo; e a compreensão, paciência, e confiança naqueles momentos em que não pude dedicar todo o tempo que gostaria a esta Tese. Junto com você, cresci como cientista e este trabalho não poderia ter sido realizado sem sua excelente orientação e conselhos.

Ao Professor Gerald W. Zamponi e sua equipe, em especial ao Eder Gambeta, por me receberem em seu laboratório, me auxiliarem com os experimentos e compartilhar momentos alegres durante minha estadia na Universidade de Calgary, Alberta, Canadá.

Ao Professor Roberto Andreatini e à Camila Pasquini de Souza, pelo auxílio e colaboração com os experimentos de vocalização ultrassônica.

Aos professores e colegas do Departamento de Farmacologia da UFPR, que contribuíram com minha formação ao longo desses anos e porque direta ou indiretamente sempre me auxiliaram a superar cada um dos obstáculos.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, por todos os bons momentos compartilhados, em especial a Eduardo Carvalho, Amanda Barroso, Joelle Turnes, Darciane Baggio, Laura Koren, Vanessa Lejeune, Wagner Hummig, Raphael Lopes e Carlos Jesus por toda ajuda, paciência e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro e pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche na Universidade de Calgary (Canadá), o que contribuiu enormemente para meu aprendizado e ampliou meus horizontes.

Aos animais que deram a vida a favor da ciência.

À família, pelo incentivo e especialmente aos meus pais, pela educação, pela tenacidade com que me apoiaram sempre, pelos valiosos ensinamentos e por serem o melhor exemplo de coragem, fortaleza e amor.

Ao meu amado esposo e melhor amigo, Adriano, por permanecer incansável ao meu lado durante esta longa caminhada, pela paciência nos dias difíceis, por acreditar no meu potencial, por encorajar-me sempre e por todo amor e carinho.

Ao meu filho Thomas, quem todos os dias me ilumina com o seu sorriso, me ensina o verdadeiro sentido da vida e de amor incondicional, me fortalece e me enche de alegria e esperanças em um mundo de pandemia.

Esse é o problema da dor. Ela precisa ser sentida.

John Green

RESUMO

A dor crônica está associada a redução na qualidade de vida dos pacientes. Em particular, a dor orofacial persistente promove transtornos emocionais, tal como a ansiedade, prejudica as atividades essenciais do dia-a-dia, como, por exemplo comer e beber, e resulta em diminuição nas interações sociais. Nesse estudo investigamos, em modelos de dor orofacial que incluem a formalina, a dor pós-operatória por incisão da mucosa oral e a dor neuropática trigeminal por constrição do nervo infraorbital (CION), a presença de alterações sensoriais, dor tônica, comportamento do tipo ansioso e mudanças na emissão de vocalizações ultrassônicas (USV) com o intuito de fornecer ferramentas adicionais para o estudo do componente afetivo da dor. No modelo de formalina orofacial, os animais desenvolveram hiperalgesia ao calor por 3 dias, em comparação com animais do grupo controle. Em adição, a formalina induziu um aumento imediato das emissões de USV aversivas (i.e. 22 kHz), no entanto no terceiro dia após a administração houve redução das USV apetitivas (i.e. 50 kHz, do subtipo *flat*). Além disso, no terceiro dia após a injeção foi detectado comportamento do tipo ansioso através da redução do número de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). No modelo de dor pós-operatória, os animais operados desenvolveram hiperalgesia mecânica por 5 dias e térmica por 3 dias. Em adição, no dia 3 após incisão da mucosa, foi detectado aumento do *grooming* facial espontâneo, bem como preferência condicionada ao lugar induzida pelo tratamento sistêmico com morfina em ratos operados em comparação com o grupo falso-operado. Neste mesmo período houve redução das USV de 50 kHz *flat* e os animais apresentaram comportamento do tipo ansioso. No modelo de dor neuropática trigeminal foi observado a presença de hiperalgesia mecânica, comportamento do tipo ansioso e redução das USV de 50 kHz *flat* no décimo quinto dia após a CION. Adicionalmente, em ambos os modelos cirúrgicos, a análise de RT-PCR, Western blot e imunohistoquímica mostrou uma redução na expressão da tirosina hidroxilase no núcleo accumbens (NAc) dos animais operados, em relação aos respectivos controles, o que pode indicar uma diminuição na atividade dopaminérgica mesolímbica. Finalmente, houve uma maior expressão de c-Fos em áreas cerebrais implicadas no processamento de dor (i.e. córtex pré-frontal, amígdala, NAc, substância cinzenta periaqueductal e subnúcleo caudal do trigêmeo), evidenciando alterações plásticas resultantes da dor pós-operatória e da dor neuropática trigeminal. Em conjunto, os resultados corroboram evidências recentes de que a análise de USV pode ser usada como uma medida adicional do componente afetivo da dor, e sugere que as alterações sensoriais e afetivas estão relacionadas à redução da atividade dopaminérgica mesolímbica. Também demonstram que a dor orofacial persistente pode causar plasticidade neuronal, a qual está relacionada com a expressão comportamental e afetiva da dor.

Palavras-chave: Dor trigeminal. Vocalização ultrassônica. Ansiedade. Formalina orofacial. Dor tônica. Dor pós-operatória.

ABSTRACT

Chronic pain is associated with a reduction in patients' quality of life. In particular, persistent orofacial pain promotes emotional disorders, such as anxiety, impairs essential daily activities, such as eating and drinking, and results in decreased social interactions. In this study, we investigated, in models of orofacial pain that include formalin, postoperative pain due to incision of the oral mucosa and trigeminal neuropathic pain due to constriction of the infraorbital nerve (CION), the presence of sensory changes, tonic pain, anxiety-like behavior and changes in the emission of ultrasonic vocalization (USV) in order to provide additional methods for the study of the affective component of pain. In the orofacial formalin model, animals developed heat hyperalgesia for 3 days compared to the control group. In addition, formalin induced an immediate increase in the emissions of aversive calls (i.e. 22 kHz), however on the third day after administration, there was a reduction in the emission of appetitive calls (i.e. 50 kHz, flat subtype). Moreover, on day 3 after injection anxiety-like behavior was observed by the reduction in the number of entries and by the time animals spent in the open arms of the elevated plus maze (EPM). In the postoperative pain model, the operated animals developed mechanical hyperalgesia for 5 days and thermal hyperalgesia for 3 days. In addition, on day 3 after incision of the intraoral mucosa, there was a significant increase in spontaneous facial grooming and induction of conditioned preference to the place to systemic treatment with morphine in operated, but not sham rats. At this timepoint, anxiety-like behavior was observed, as well as a reduction in 50 kHz flat USV emissions. In the model of trigeminal neuropathic pain, the presence of mechanical hyperalgesia, anxiety-like behavior and a reduction of 50 kHz flat calls were detected on day 15 after CION. Additionally, in both surgical models, analysis of RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry showed a reduction in the expression of tyrosine hydroxylase in the nucleus accumbens (NAc) of the operated animals in relation to their respective controls, which may indicate a decrease in mesolimbic dopaminergic activity. Finally, there was a greater expression of c-Fos in brain areas involved in pain processing (i.e. prefrontal cortex, amygdala, NAc, gray periaqueductal area and caudal trigeminal subnucleus), showing plastic changes as a consequence of postoperative pain and trigeminal neuropathic pain. Taken together, the results corroborate recent evidence that USV analysis can be used as an additional measure of the affective component of pain and suggests that sensory and affective changes are related to the reduction of mesolimbic dopaminergic activity. They also demonstrate that persistent orofacial pain can cause neuronal plasticity, which is related to the expression of behavioral and affective components of pain.

Keywords: Trigeminal pain. Ultrasonic vocalization. Anxiety. Orofacial formalin. Tonic pain. Postoperative pain.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO IMEDIATO INDUZIDO POR FORMALINA OROFACIAL.....	51
FIGURA 2 - DECURSO TEMPORAL DA HIPERALGESIA AO CALOR APÓS FORMALINA OROFACIAL.....	52
FIGURA 3 - CARACTERIZAÇÃO DA EMISSÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS FORMALINA OROFACIAL.....	53
FIGURA 4 - COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS A FORMALINA OROFACIAL.	54
FIGURA 5 - DECURSO TEMPORAL DE ALTERAÇÕES SENSORIAIS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.	57
FIGURA 6 - CARACTERIZAÇÃO DA EMISSÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	58
FIGURA 7 - COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	59
FIGURA 8 - EFEITO DA MORFINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL	62
FIGURA 9 - TESTE DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	63
FIGURA 10 - EFEITO DA MORFINA NO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	64
FIGURA 11 - EFEITO DA MORFINA NAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS INCISÃO DE MUCOSA ORAL	65
FIGURA 12 - EFEITO DA ANFETAMINA NAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS INCISÃO DE MUCOSA ORAL.....	67
FIGURA 13 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR) PARA TIROSINA HIDROXILASE APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL	68
FIGURA 14 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	69
FIGURA 15 - EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE EM FIBRAS DOPAMINÉRGICAS NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	70
FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE c-Fos EM ÁREAS CEREBRAIS IMPLICADAS NO PROCESSAMENTO DE DOR APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	72

FIGURA 17 - IMAGEM ILUSTRATIVA DA EXPRESSÃO DE c-Fos IPSILATERAL NO TERCEIRO DIA APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL	73
FIGURA 18 - EXPRESSÃO DE c-Fos E TIROSINA HIDROXILASE NO NUCLEO ACCUMBENS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL	74
FIGURA 19 - HIPERALGESIA MECÂNICA APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	76
FIGURA 20 - COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	77
FIGURA 21 - VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	78
FIGURA 22 - EFEITO DA ANFETAMINA NAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	80
FIGURA 23 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR) PARA TIROSINA HIDROXILASE APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	81
FIGURA 24 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAOTBIRAL.....	82
FIGURA 25 - EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE EM FIBRAS DOPAMINÉRGICAS NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS A CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL	83
FIGURA 26 - EXPRESSÃO E c-Fos APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL....	85
FIGURA 27 - IMAGEM ILUSTRATIVA DA EXPRESSÃO DE c-Fos IPSILATERAL APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	86
FIGURA 28 - EXPRESSÃO DE c-Fos E TIROSINA HIDROXILASE NO NUCLEO ACCUMBENS APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL.....	87

LISTA DE ESQUEMAS E TABELA

ESQUEMA 1 - SISTEMA TRIGEMINAL.....	21
ESQUEMA 2 - MECANISMOS DO SISTEMA DE RECOMPENSA.	26
ESQUEMA 3 - IMAGEM REPRESENTATIVA DE UMA VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA DE 22 kHz	32
ESQUEMA 4 - IMAGEM REPRESENTATIVA DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 50 kHz	33
ESQUEMA 5 - PROTOCOLOS PARA INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR FORMALINA OROFACIAL.....	44
ESQUEMA 6 - PROTOCOLOS PARA INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA.....	45
ESQUEMA 7 - PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA MORFINA NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR PÓS- OPERATÓRIA.....	46
ESQUEMA 8 - PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL	46
ESQUEMA 9 - PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA DOPAMINA EM MODELOS DE DOR OROFACIAL	47
ESQUEMA 10 - PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL EM MODELOS DE DOR OROFACIAL.....	47
TABELA 1 - PRINCIPAIS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS ASSOCIADAS À DOR OROFACIAL PERSISTENTE	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5 hidroxitriptamina
ABL	Amígdala basolateral
ACe	Amígdala central
AL	Amígdala lateral
ATV	Área tegmental ventral
CCA	Córtex cingulado anterior
cDNA	<i>Complementary desoxiribonucleic acid</i> – Ácido desoxirribonucleico complementar
CION	Constricção do nervo infraorbital
CPA	<i>Conditioned place aversion</i> - Aversão condicionada ao lugar
CPF	Córtex pré-frontal
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CPP	<i>Conditioned place preference</i> - Preferência condicionada ao lugar
Ct	Ciclo de limiar
DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
DOR	<i>Delta opioid receptor</i> – Receptor delta opioide
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> – Ácido ° etilenodioaminotetracético
FM	Frequência modulada
GABA	Ácido gammaminobutírico
GT	Gânglio do trigêmeo
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> – Peroxidase de raiz forte
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i> - Associação internacional para o estudo da dor
IHQ	Imunohistoquímica
KOR	<i>Kappa opioid receptor</i> – Receptor kappa opioide
MOR	<i>Mu opioid receptor</i> – Receptor mu opioide
NAc	Núcleo accumbens
NS	Nociceptivo específico

NT	Neuralgia do trigêmeo
PAG	<i>Periaqueductal gray area</i> - Substância cinzenta periaqueductal
PAGvl	<i>Ventrolateral periaqueductal gray area</i> - Substância cinzenta periaqueductal ventrolateral
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> – Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RVM	<i>Rostral ventromedial medulla</i> – Bulbo rostroventromedial
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TBST	<i>Tris-buffered saline with tween</i> – Solução salina tamponada com tris e tween
TH	Tirosina hidroxilase
TRPA1	<i>Transient receptor potential ankyrin 1</i> – Receptor de potencial transitório anquirina 1
TRPV1	<i>Transient receptor potential vanilloid 1</i> – Receptor de potencial transitório vanilóide 1
USV	<i>Ultrasonic vocalization</i> - Vocalização ultrassônica
V1	Ramo oftálmico do nervo trigêmeo
V2	Ramo maxilar do nervo trigêmeo
V3	Ramo mandibular do nervo trigêmeo
Vc	Subnúcleo caudal do trigêmeo
Vi	Subnúcleo interpolar do trigêmeo
Vo	Subnúcleo oral do trigêmeo
WB	<i>Western Blot</i>
WDR	<i>Wide dynamic range</i> - Espectro dinâmico e amplo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	PROCESSAMENTO DA DOR OROFACIAL	18
1.2	DORES OROFACIAIS AGUDAS	22
1.3	DORES OROFACIAS CRÔNICAS	23
1.4	ASPECTO AFETIVO DA DOR OROFACIAL	24
1.5	SISTEMA DOPAMINÉRGICO E DOR	25
1.6	MODELOS ANIMAIS	26
1.6.1	Formalina orofacial	27
1.6.2	Modelo de dor pós-operatória	28
1.6.3	Modelo de dor neuropática trigeminal	28
1.7	AValiação DA DOR OROFACIAL EM ROEDORES	29
1.7.1	Avaliação da nocicepção evocada	29
1.7.2	Determinação da nocicepção não evocada	30
1.7.3	Quantificação de vocalizações ultrassônicas	31
2	OBJETIVOS	34
2.1	OBJETIVO GERAL	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	MATERIAL	36
3.1.1	Animais	36
3.1.2	Drogas, doses e reagentes	36
3.2	MÉTODOS	37
3.2.1	Teste da formalina orofacial	37
3.2.2	Incisão da mucosa oral	37
3.2.3	Constricção do nervo infraorbital	38
3.2.4	Avaliação da hiperalgesia ao calor	38
3.2.5	Quantificação de <i>grooming</i> espontâneo	39
3.2.6	Avaliação da hiperalgesia mecânica	39
3.2.7	Teste de preferência condicionada ao lugar	39
3.2.8	Avaliação do comportamento do tipo ansioso	40
3.2.9	Quantificação da emissão de vocalizações ultrassônicas	41
3.2.10	Quantificação da expressão de tirosina hidroxilase por PCR quantitativo em tempo real	41
3.2.11	Quantificação da expressão de tirosina hidroxilase por Western blot	42
3.2.12	Quantificação da expressão de c-Fos e tirosina hidroxilase por imunohistoquímica	43
3.2.13	Protocolos experimentais	44

3.2.14	Análise estatística e apresentação de resultados	48
4	RESULTADOS	49
4.1	AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES SENSORIAL E AFETIVO DA DOR APÓS INJEÇÃO DE FORMALINA OROFACIAL	49
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR INCISIONAL PÓS OPERATÓRIA	55
4.3	EFEITO DA MORFINA NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA.....	60
4.4	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOPAMINÉRGICA MESOLÍMBICA NO MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA	66
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL EM ÁREAS CEREBRAIS IMPLICADAS NO PROCESSAMENTO DE DOR ASSOCIADA À INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	71
4.6	CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL.....	75
4.7	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOPAMINÉRGICA MESOLÍMBICA NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL.....	79
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL EM ÁREAS CEREBRAIS IMPLICADAS NO PROCESSAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL	84
5	DISCUSSÃO	88
5.1	DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA PERSISTENTE E CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS AFETIVOS NO TESTE DA FORMALINA OROFACIAL	88
5.2	DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL.....	90
5.3	EFEITO DA MORFINA NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA.....	91
5.4	ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL.....	94
5.5	PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOLÍMBICO NA DOR OROFACIAL PERSISTENTE	94
5.6	ATIVAÇÃO NEURONAL EM ÁREAS CEREBRAIS RELACIONADAS A DOR EM MODELOS DE DOR OROFACIAL PERSISTENTE	96
5.7	COMPARAÇÃO ENTRE OS PRINCIPAIS ACHADOS RELACIONADOS AO COMPONENTE AFETIVO NOS DIFERENTES MODELOS DE DOR OROFACIAL.....	101
6	CONCLUSÃO	104
7	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO – Publicações relacionadas.....	121

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa básica em dor tem como objetivo produzir informação abundante sobre os mecanismos fisiopatológicos a fim de melhorar o seu entendimento e o tratamento das diferentes condições dolorosas. Em grande parte, esses avanços ocorrem como consequência do uso de modelos animais de dor. A esse respeito, a dor é descrita no ser humano como uma sensação complexa, que envolve os componentes sensorial, afetivo e motivacional, e apresenta um importante papel na aprendizagem de comportamentos. Por exemplo, uma criança aprende a não tocar no fogo ao sentir dor quando queimada, servindo assim como uma proteção do organismo. Diante disso, a atual definição da dor concedida pela Associação Internacional para o Estudo da dor (*International Association for the Study of Pain - IASP*) preconiza a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante à associada a um dano tecidual real ou potencial” (RAJA; CARR; COHEN; FINNERUP *et al.*, 2020). Neste sentido, algumas pessoas reportam sentir dor em ausência de dano tecidual ou causa fisiopatológica conhecida e não tem como distingui-la da dor relacionada a um dano tecidual, apresentando os mesmos sintomas gerados por uma lesão tecidual real. Portanto, o conceito de dor diferencia-se daquele de nocicepção, que pode ser inferido apenas a partir da atividade em neurônios sensoriais. Contrariamente, a dor integra a nocicepção com a emoção e a consciência. Assim, embora a dor geralmente tenha um papel adaptativo, ela pode ter efeitos contraproducentes na função e no bem-estar social e psicológico, uma vez que, pelo seu caráter desagradável, as pessoas que enfrentam situações dolorosas podem apresentar sintomas relacionados com emoções negativas tais como isolamento social, alterações de humor e do sono (KARAMAN; KARAMAN; DOGRU; ONDER *et al.*, 2014; YANG; CHANG, 2019). Em adição, a incapacidade de se comunicar verbalmente não anula a possibilidade de que um indivíduo esteja experimentando dor, que é sempre subjetiva, e permite que incapacitados manifestem a dor, incluindo bebês e animais (RAJA; CARR; COHEN; FINNERUP *et al.*, 2020).

Atualmente não podemos conhecer completamente as sensações dolorosas de um animal, pois obviamente a comunicação entre espécies é diferente. Assim, as pesquisas em dor nos animais têm tradicionalmente estudado as reações a estímulos nocivos de diversas naturezas. É por isso que a definição de dor foi adaptada para que pudesse ser aplicada a animais. Assim, a dor em animais seria uma experiência

sensorial aversiva causada por uma lesão real ou potencial que produz reações motoras e vegetativas progressivas, desencadeia o comportamento de esquiva aprendido e pode modificar comportamentos específicos da espécie, incluindo os comportamentos sociais (MOLONY; KENT, 1997). A partir dessas considerações, os modelos animais de dor têm sido entendidos como um meio essencial para o estudo da dor. Nesse sentido, um modelo de dor é um procedimento pelo qual se avalia a reação de um animal a um estímulo nocivo ou situação patológica induzida, podendo ser utilizado em circunstâncias fisiológicas ou patológicas. Apesar disso, no animal tem sido valorizada fundamentalmente a dimensão somática da resposta nociceptiva a um estímulo nocivo, enquanto que a avaliação da dimensão afetiva e motivacional inerente à dor tem sido negligenciada nos testes de avaliação do efeito analgésico de drogas. Portanto, neste estudo foram caracterizadas as respostas sensoriais e comportamentos associados ao aspecto afetivo em diferentes modelos de dor orofacial a fim de fornecer ferramentas adicionais para o estudo experimental destas condições.

1.1 PROCESSAMENTO DA DOR OROFACIAL

A dor orofacial é processada majoritariamente pelo sistema trigeminal, constituído pelo nervo trigêmeo ou par craniano V, o qual é composto por três ramificações: oftálmica, maxilar e mandibular, que inervam a região craniofacial (SESSLE, 1987). Os aferentes trigeminais do ramo oftálmico ou primeira divisão do nervo trigêmeo (V1), inervam a pele supraorbital, abrangendo o couro cabeludo, meninges e córnea. O ramo maxilar ou segunda divisão (V2) inerva a pele infraorbital, lábio superior, mucosa maxilar e dentes maxilares. Por último, o ramo mandibular ou terceira divisão (V3) é o único que apresenta, além da função sensorial, função motora e inerva a pele da mandíbula inferior, lábio inferior, mucosa mandibular e dentes mandibulares (ESQUEMA 1). Os neurônios aferentes primários trigeminais apresentam morfologia pseudounipolar, e tem seus corpos celulares contidos no gânglio do trigêmeo (GT), a partir do qual emergem as projeções periférica e central. Os terminais periféricos das fibras aferentes primárias do nervo trigêmeo podem ser ativados por estímulos táteis ou proprioceptivos, visto que são compostos por mecanorreceptores de baixo limiar, os quais se associam principalmente a fibras mielinizadas de calibre amplo (fibras A β). Em outros casos, os aferentes primários

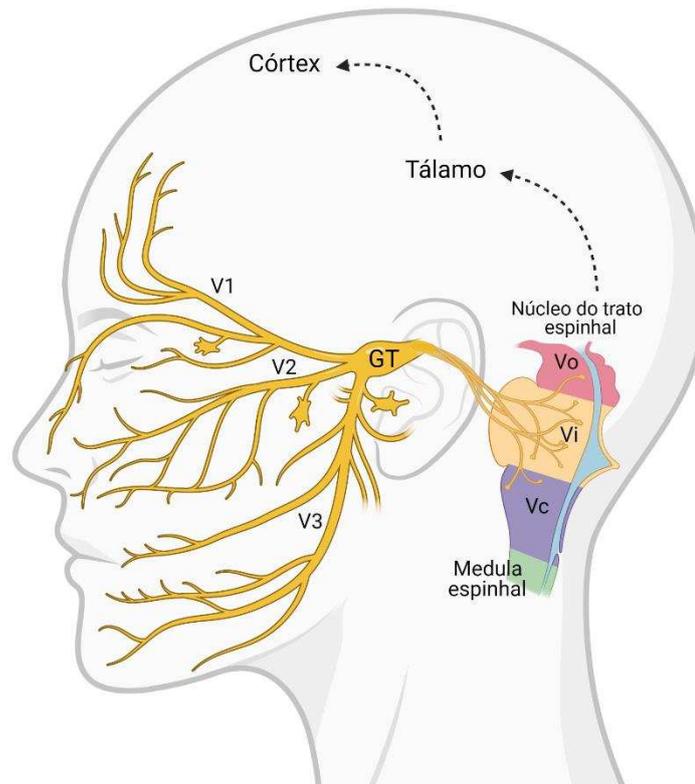
possuem terminações nervosas livres que podem ser ativadas por estímulos nocivos, atuando como nociceptores, os quais correspondem a fibras mielinizadas do tipo A δ e fibras de pequeno diâmetro não mielinizadas (fibras C) de condução mais lenta (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017; SESSLE, 2011).

Os estímulos nocivos ativam as fibras C e A δ , as quais conduzem as informações sensoriais ao sistema nervoso central (SNC). Em determinadas ocasiões, os nociceptores podem desenvolver um aumento prolongado da excitabilidade neuronal após uma lesão tecidual ou inflamação, provocando disparos contínuos (espontâneos) e tornando-se mais responsivos a estímulos nocivos, ou podem até mesmo responder a estímulos normalmente inócuos. Esse processo de sensibilização periférica implica a participação de mediadores pró-inflamatórios como histamina, prostaglandinas, íons hidrogênio, entre outros, e contribui para o aumento da sensibilidade do tecido lesionado ou inflamado (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017; IWATA; IMAMURA; HONDA; SHINODA, 2011; SESSLE, 2011). A sensibilização periférica é observada clinicamente como hiperalgesia inflamatória e é uma característica das dores inflamatórias, observada por exemplo, após procedimentos cirúrgicos.

Os neurônios aferentes primários projetam-se desde a periferia, passando pelo gânglio do trigêmeo, para o complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo, os quais podem ser divididos em núcleo sensorial principal, núcleo mesencefálico e núcleo do trato espinhal. O núcleo sensorial principal está localizado no tegmento pontino dorsolateral, o qual medeia a percepção de estímulos por toque leve e pressão. O núcleo mesencefálico é encontrado na junção da ponte com o mesencéfalo, o qual recebe entrada predominantemente proprioceptiva de V3. O núcleo do trato espinhal se estende desde a junção pontomedular até a medula cervical superior, medeia a transmissão da informação nociceptiva e térmica, e é formado pelos subnúcleos oral, interpolar e caudal (BATHLA; HEGDE, 2013; CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017; SESSLE, 2000; 2011). O subnúcleo caudal (Vc) é responsável pela maior parte da transmissão nociceptiva procedente da região orofacial, se estende desde o bulbo até as vértebras cervicais C1-C2 e, semelhante à medula espinhal, apresenta divisão laminar, de forma que as projeções da maioria das fibras A δ e C alcançam principalmente as lâminas I, II, V e VI (SESSLE, 2000; 2006), motivo pelo qual também é conhecido como corno dorsal bulbar. É majoritariamente nesta porção do núcleo do

trato espinhal que os terminais centrais dos aferentes primários fazem sinapse com neurônios secundários e ocorrem os fenômenos mais importantes de modulação da dor, tanto facilitação quanto inibição, a partir das informações ascendentes e descendentes de estruturas intermediárias e superiores do SNC (i.e. formação reticular, tálamo, córtex) e substâncias químicas como substância P e glutamato (SESSLE; YAO; NISHIURA; YOSHINO *et al.*, 2005). Em alguns casos, especialmente quando os estímulos nociceptivos provêm de tecidos profundos da região orofacial, tal como o músculo masseter, a informação nociceptiva é processada na zona de transição entre o subnúcleo interpolar e o subnúcleo caudal (WANG; WEI; DUBNER; REN, 2006). No entanto, primordialmente a informação nociceptiva cruza para o lado oposto do subnúcleo caudal e ascende pelos tratos oriundos da medula que terminam no bulbo ou passam por ele em direção ao tálamo (i.e. trato trigemino-talâmico ventral) (SESSLE, 2006).

Os estímulos propioceptivos ou táteis ativam os aferentes primários, os quais fazem sinapse com neurônios secundários mecanossensoriais de limiar baixo (LTM). Já os aferentes ativados por estímulos nocivos fazem sinapse com neurônios de segunda ordem do tipo nociceptivos específicos (NS) no subnúcleo caudal principalmente. Por outro lado, os neurônios de segunda ordem de espectro dinâmico e amplo (WDR) são ativados por estímulos de intensidade variada, desde inócuos até nocivos (SESSLE; YAO; NISHIURA; YOSHINO *et al.*, 2005). Em situações fisiopatológicas como na inflamação ou lesão tecidual, os neurônios NS e WDR sofrem alterações plásticas de maneira que são mais facilmente excitáveis pelos estímulos nociceptivos, fenômeno denominado sensibilização central (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Essas alterações plásticas incluem um aumento do campo receptivo e das respostas a estímulos nocivos, bem como uma diminuição do limiar de ativação. Os neurônios WDR e NS fazem sinapse majoritariamente com neurônios terciários específicos em áreas talâmicas para posteriormente conduzir a informação nociceptiva ao córtex somatossensorial (SESSLE; YAO; NISHIURA; YOSHINO *et al.*, 2005). A modulação das entradas nociceptivas ocorrem ao nível do tronco cerebral, tálamo e córtex, como resultado do contexto, experiência, estresse, ansiedade, estado emocional e atenção entre outros, o que contribui para as diferenças interindividuais na sensação dolorosa relatada após um estímulo nocivo (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017).



ESQUEMA 1: SISTEMA TRIGEMINAL. O nervo trigêmeo está constituído por três ramificações que inervam a face e cabeça: o ramo oftálmico (V1), o ramo maxilar (V2) e o ramo mandibular (V3). Os corpos neuronais se encontram no gânglio do trigêmeo (GT), do qual emergem as projeções centrais que conectam com o complexo de núcleos sensoriais do trigêmeo, composto pelo núcleo sensorial principal, núcleo mesencefálico e núcleo do trato espinhal. Dentre eles, o último é composto pelos subnúcleos: oral (Vo), interpolar (Vi) e caudal (Vc). Os aferentes ativados por estímulos nocivos terminam em neurônios predominantemente localizados no subnúcleo caudal, o qual transmite a informação nociceptiva para diversas áreas centrais implicadas nas funções de percepção e modulação de dor. Produzido com *biorender.com*.

Diversas estruturas centrais que fazem parte da rede neuronal do processamento da dor (*pain matrix*), como por exemplo o córtex pré-frontal (CPF), amígdala, núcleo accumbens (NAc) e substância cinzenta periaqueductal (PAG), estão implicadas na dor afetiva e motivacional. A este respeito, o CPF cobre a porção anterior do lobo frontal. Situa-se rostralmente à área 6 de Brodmann, incluindo aquela na superfície orbital, e é particularmente bem desenvolvida em primatas, especialmente no homem (ONGÜR; PRICE, 2000). Adicionalmente, é a estrutura responsável pelas funções executivas, como planejamento, solução de problemas e controle social, e tem a capacidade de representar informações que não estão atualmente no ambiente, e esse conhecimento baseado em experiências é usado para guiar de forma inteligente pensamentos e condutas, ações e emoções, incluindo a inibição de pensamentos, distrações, ações e sentimentos inadequados (BUSHNELL; CEKO; LOW, 2013; GOLDMAN-RAKIC, 1996; PORRO; BARALDI; PAGNONI;

SERAFINI *et al.*, 2002; QU; KING; OKUN; LAI *et al.*, 2011). Além disso, o CPF pode ser dividido em medial (CPFm), orbitofrontal, ventrolateral, dorsolateral e caudal. Outra importante estrutura envolvida no processamento de dor afetiva é a amígdala, uma estrutura em forma de amêndoa situada no lobo temporal medial que faz parte do sistema límbico e é composta por vários núcleos anatômica e funcionalmente distintos: o núcleo lateral (AL), o núcleo basolateral (ABL), núcleo acessório basal, núcleo medial e núcleo central (ACe). Desempenha um papel fundamental na avaliação emocional dos estímulos sensoriais, na aprendizagem emocional e na memória, bem como nos distúrbios afetivos, incluindo ansiedade e depressão (DAVIS, 1998; LEDOUX, 2000; ZALD, 2003). Por outro lado, o NAc, considerado uma extensão ventral do corpo estriado, é mais demarcado em humanos do que em roedores ou primatas, e integra as informações relacionadas ao processamento cognitivo, sensorial e emocional (BECERRA; BORSOOK, 2008; CHANG; POLLEMA-MAYS; CENTENO; PROCISSI *et al.*, 2014). Diferentemente, a PAG, que corresponde a uma estrutura chave na propagação e modulação da dor, participa do aspecto afetivo de dor, da atenção em relação à dor e da expectativa de dor, tanto nas respostas simpáticas como também no aprendizado e execução de comportamentos defensivos e aversivos (BASBAUM; FIELDS, 1978; BEHBEHANI, 1995; BENARROCH, 2012; MILLAN, 2002). Essas estruturas centrais participam do processamento da dor aguda e são fatíveis de modificações plásticas na dor crônica.

1.2 DORES OROFACIAIS AGUDAS

A dor aguda ocorre após uma lesão que se caracteriza por ser bem localizada, cessando normalmente após recuperação do tecido. Ela possui função protetora, sendo um sinal de alarme para o organismo e é de natureza nociceptiva, originada após estimulação dos neurônios sensoriais de forma química, mecânica ou térmica (LOESER; MELZACK, 1999). Na evolução dos quadros algícos agudos, de modo geral, há redução gradual da intensidade da dor relacionada à resolução do processo inflamatório e cicatrização da área lesada (CHAPMAN; VIERCK, 2017).

Um exemplo de dor aguda é a dor pós-operatória, a qual persiste até a recuperação do órgão e/ou tecido. Diversas cirurgias afetam o sistema trigeminal, por exemplo a remoção de terceiros molares, cirurgias ortognáticas e cirurgias ósseas para inserção de implantes dentários entre outras, as quais geralmente são tratadas farmacologicamente com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e analgésicos

opioides (PERGOLIZZI; MAGNUSSON; LEQUANG; GHARIBO *et al.*, 2020). Um dos riscos associados à realização de procedimentos cirúrgicos é a cronificação da dor. Embora seja mais prevalente em grandes cirurgias, também ocorre em cirurgias odontológicas, sendo a prevalência nestes casos de 5 a 13% (SCHUG; LAVAND'HOMME; BARKE; KORWISI *et al.*, 2019). Outros fatores que aumentam o risco de cronificação de dor após um procedimento cirúrgico incluem o tempo de cirurgia acima de 3 horas, dano intraoperatório do nervo, uso de anestésicos inalatórios, uso de altas doses de opioides, adultos jovens, mulheres, fatores genéticos (i.e. polimorfismos de canais Na^+ ou Ca^{2+} dependentes de voltagem), medo e ansiedade pela cirurgia, presença de outras condições dolorosas, dor intensa antes do procedimento e controle insatisfatório da dor após a cirurgia (PAK; YONG; KAYE; URMAN, 2018). Portanto, o controle da dor aguda é importante não só para proporcionar o bem-estar do paciente durante a recuperação, mas também para reduzir o risco de cronificação da dor.

1.3 DORES OROFACIAS CRÔNICAS

Considera-se que um paciente apresenta dor crônica quando o mesmo apresenta dor persistente ou recorrente por mais de 3 meses, ou além do período de recuperação tecidual (DAHLHAMER; LUCAS; ZELAYA; NAHIN *et al.*, 2018). O controle da dor crônica é desafiador e exige esforços multidisciplinares. Além disso, impacta na vida do paciente, visto que frequentemente o paciente desenvolve distúrbios emocionais e é exposto a maior risco de dependência a drogas (YANG; CHANG, 2019). Uma forma de dor crônica é a dor neuropática, que resulta da lesão ou disfunção de estruturas centrais ou periféricas do sistema nervoso e está caracterizada por promover dor em queimação, choque ou pontada, que pode se manifestar espontaneamente, ser provocada por estímulos normalmente inócuos ou ainda estar associada a uma sensibilidade exacerbada a estímulos nocivos (FINNERUP; SINDRUP; JENSEN, 2007; WANG; LIANG; ZHOU; XU *et al.*, 2012).

No que concerne as dores de origem neuropática craniofacial, a neuralgia do trigêmeo (NT) é a mais prevalente, com faixa de incidência global de 0,03% a 0,3% (DE TOLEDO; REUS; FERNANDES; PORPORATTI *et al.*, 2016) e em 90% dos casos ocorre em pessoas acima de 40 anos (EL-TALLAWY; FARGHALY; RAGEH; SHEHATA *et al.*, 2013), afetando três mulheres para cada homem (EL-TALLAWY; FARGHALY; RAGEH; SHEHATA *et al.*, 2013; MAARBJERG; GOZALOV; OLESEN;

BENDTSEN, 2014). A NT é definida como “dor súbita, geralmente unilateral, severa, de curta duração que acomete um ou mais ramos do nervo trigêmeo” (ZAKRZEWSKA; LINSKEY, 2014) e caracteriza-se por dores severas, agudas e lancinantes, do tipo choque elétrico, seguidas por um período refratário (BENOLIEL; ELIAV; IADAROLA, 2001; VAN KLEEF; VAN GENDEREN; NAROUZE; NURMIKKO *et al.*, 2009). Os episódios de dor normalmente são desencadeados por estimulação de áreas específicas, chamadas zonas de gatilho, localizadas na área inervada pelo nervo trigêmeo (LIU; DAI; E; WANG *et al.*, 2010). Na maioria dos casos há o envolvimento de apenas um ramo, principalmente o maxilar, em cerca de 30% dos casos os ramos maxilar e mandibular estão envolvidos e raramente observa-se o envolvimento do ramo oftálmico ou casos de NT bilateral (VAN KLEEF; VAN GENDEREN; NAROUZE; NURMIKKO *et al.*, 2009). Contudo, a etiologia e os mecanismos subjacentes a NT não estão totalmente esclarecidos. Todavia, a forma clássica da NT ocorre pela compressão neurovascular na entrada das raízes do nervo trigêmeo devido a uma anormalidade anatômica, produzindo conseqüentemente a desmielinização das fibras nervosas que resultam em disparos ectópicos (DEVOR; AMIR; RAPPAPORT, 2002; JANNETTA, 1967; ZAKRZEWSKA; MCMILLAN, 2011). Os estímulos desencadeadores dos ataques de dor incluem o ato de falar, escovar os dentes, barbear, comer, beber, o leve toque na face, entre outros (EL-TALLAWY; FARGHALY; RAGEH; SHEHATA *et al.*, 2013; THOMAS; VILENSKY, 2014). Atualmente, o tratamento farmacológico baseia-se no uso de anticonvulsivantes (MONTANO; CONFORTI; DI BONAVENTURA; MEGLIO *et al.*, 2015; ROZEN, 2004), sendo a carbamazepina o fármaco de primeira escolha (CAMPBELL; GRAHAM; ZILKHA, 1966). No entanto, o emprego destes fármacos é limitado pelos efeitos adversos relacionados ao uso prolongado ou ao controle insatisfatório da dor.

1.4 ASPECTO AFETIVO DA DOR OROFACIAL

A sensação dolorosa é desagradável e aversiva, facilitando o aprendizado e a tomada de decisões, tornando-se assim, uma experiência emocional. Por outro lado, essas características acarretam em muitos casos transtornos emocionais, especialmente quando a dor é persistente. Particularmente, a dor orofacial afeta importantes órgãos sensoriais (i.e. olhos, nariz, ouvidos e boca), além da pele facial e o couro cabeludo, interferindo em funções vitais e atividades sociais que proporcionam

bem-estar tais como conversar com amigos ou participar de uma refeição familiar (RENTON; YILMAZ, 2011). Desta forma, a dor orofacial implica adversidades específicas, visto que a face possui abundante inervação e extensa representação somatossensorial no SNC. Isto produz um importante impacto psicológico porque interfere na expressão facial de emoções, como por exemplo alegria ou admiração (HONDA; HANDA; FUKUDA; KOUKITA *et al.*, 2018; LAVIGNE; SESSLE, 2016; SHUEB; NIXDORF; JOHN; ALONSO *et al.*, 2015). Neste sentido, há evidências crescentes de que a dor orofacial está associada a maior incidência de ansiedade, depressão e distúrbios do sono, os quais afetam significativamente o bem-estar dos pacientes (HARTMANN; WELTE-JZYK; AL-NAWAS; DAUBLÄNDER, 2019; LAVIGNE; SESSLE, 2016; RODRIGUEZ; SAKURAI; XU; CHEN *et al.*, 2017; WU; HU; LU; CHEN *et al.*, 2015). Adicionalmente, pacientes que sofrem de NT apresentam marcante redução na qualidade de vida, uma vez que passam a evitar qualquer tarefa cotidiana que possa gerar uma crise de dor (VAN KLEEF; VAN GENDEREN; NAROUZE; NURMIKKO *et al.*, 2009).

1.5 SISTEMA DOPAMINÉRGICO E DOR

A dopamina é um neurotransmissor do SNC com propriedades excitatórias típicas da família das catecolaminas. Sua biossíntese é produzida pela descarboxilação enzimática da L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) pela descarboxilase do aminoácido aromático e limitada pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH) (DAUBNER; LE; WANG, 2011). O sistema dopaminérgico é responsável por muitas funções cerebrais, incluindo motivação, punição e recompensa (AUGUSTIN; LOEWINGER; O'NEAL; KRAVITZ *et al.*, 2020; CHEN; BARONIO; SEMENOVA; ABDURAKHMANOVA *et al.*, 2020; DEGROOT; ZHAO-SHEA; CHUNG; KLENOWSKI *et al.*, 2020), bem como participa do controle da dor crônica (LI; LIU; LU; TAO, 2019), inclusive de origem trigeminal (ABDALLAH; MONCONDUIT; ARTOLA; LUCCARINI *et al.*, 2015).

Na via mesolímbica, as entradas dopaminérgicas provêm das regiões cerebrais inervadas pela área tegmental ventral (ATV) e estão envolvidas nas funções executivas, afetivas e motivacionais, e projetam para áreas centrais que incluem o NAc, CPF, córtex cingulado anterior (CCA) e amígdala (IKEMOTO, 2010). Dentre as estruturas mesolímbicas, o NAc desempenha um papel fundamental na motivação e recompensa (IKEDA; FUNAYAMA; TATENO; FUKAYAMA *et al.*, 2019).

Adicionalmente, evidências demonstram que a dor crônica está associada a uma mudança na sinalização entre o NAc e outras estruturas mesolímbicas (APKARIAN; BUSHNELL; TREEDE; ZUBIETA, 2005; BUSHNELL; CEKO; LOW, 2013; KUCYI; DAVIS, 2015). Além disso, o sistema mesolímbico desempenha um papel importante na percepção e modulação dos sintomas da dor crônica. Neste sentido o uso de drogas dopaminérgicas para compensar a depleção de dopamina no SNC de pacientes com dor crônica tem sido estudado e tem mostrado resultados promissores (HADDAD; PUD; TREISTER; SUZAN *et al.*, 2018; HOLMAN; MYERS, 2005; SERAFINI; PRYCE; ZACHARIOU, 2020; STUGINSKI-BARBOSA; RODRIGUES; BIGAL; SPECIALI, 2008). Dessa maneira sugere-se que o alívio da dor pode ser sinalizado como uma recompensa por meio dos neurônios dopaminérgicos da ATV (Esquema 2), o que é considerado um potencial alvo terapêutico.



ESQUEMA 2: MECANISMOS DO SISTEMA DE RECOMPENSA. Estímulos que ativam a área tegmental ventral (ATV), incluindo drogas analgésicos que aliviam a dor, ativam os neurônios mesolímbicos com consequente liberação de dopamina (DA) no núcleo accumbens e produzem uma experiência prazerosa (recompensa) que causa um reforço positivo ou negativo (supressão da dor) para repetir essa experiência. Produzido com *biorender.com*.

1.6 MODELOS ANIMAIS

Os roedores possuem um sistema trigeminal semelhante aos seres humanos, permitindo através deles o estudo dos mecanismos fisiopatológicos da dor orofacial, bem como seu tratamento. Embora as inúmeras limitações de modelos animais para mimetizar a experiência complexa da dor humana sejam bastante reconhecidas, a dor é fundamentalmente aversiva em animais e em seres humanos (BECERRA;

BREITER; WISE; GONZALEZ *et al.*, 2001; NAVRATILOVA; XIE; OKUN; QU *et al.*, 2012). Os modelos animais foram desenvolvidos para elucidar os mecanismos subjacentes à dor aguda e crônica, bem como para permitir a avaliação pré-clínica de drogas com potencial analgésico.

1.6.1 Formalina orofacial

A formalina é um irritante químico composto por formaldeído diluído em solução de cloreto de sódio 0.9% e cuja administração causa lesão tecidual (CLAVELOU; PAJOT; DALLEL; RABOISSON, 1989), inflamação (ROSLAND; TJØLSEN; MÆHLE; HOLE, 1990; WHEELER-ACETO; PORRECA; COWAN, 1990) e dor (OKAMOTO; IMBE; TASHIRO; KUMABE *et al.*, 2004). A injeção subcutânea de formalina é frequentemente utilizada como estímulo nocivo na face de animais de experimentação (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004; CLAVELOU; PAJOT; DALLEL; RABOISSON, 1989), visto que mimetiza algumas características da dor inflamatória orofacial em seres humanos (CLAVELOU; DALLEL; ORLIAGUET; WODA *et al.*, 1995). A formalina administrada no lábio superior dos animais promove uma resposta de *grooming* facial (i.e. os movimentos de limpeza facial bilateral com as patas dianteiras) (DALLEL; RABOISSON; CLAVELOU; SAADE *et al.*, 1995), e se caracteriza por apresentar um período de atividade motora imediata e outro tardio, separados por um período quiescente (CLAVELOU; PAJOT; DALLEL; RABOISSON, 1989; DUBUISSON; DENNIS, 1977). A resposta imediata, denominada primeira fase, é de curta duração (3 minutos) e depende da ativação direta dos nociceptores mielinizados e não mielinizados pela ação da formalina (DUBUISSON; DENNIS, 1977). Posteriormente segue um período de baixa atividade motora que corresponde à fase quiescente, a qual dura em torno de 12 minutos (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004) e se deve possivelmente a uma inibição da transmissão nociceptiva promovida pelo neurotransmissor ácido gammaminobutírico (GABA) mediante ativação dos receptores GABA_A (KANEKO; HAMMOND, 1997). Finalmente, a fase tônica tardia, denominada segunda fase, é marcada por uma resposta motora prolongada (15-20 minutos) que depende da sensibilização central causada pela atividade contínua das fibras aferentes (TJØLSEN; BERGE; HUNSKAAR; ROSLAND *et al.*, 1992). Diversos estudos têm demonstrado que a resposta comportamental é sensível a fármacos com propriedades analgésicas de diversas classes, incluindo opioides e anestésicos locais, em ambas as fases, e anti-inflamatórios esteroidais e

AINEs na segunda fase (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; CLAVELOU; PAJOT; DALLEL; RABOISSON, 1989; DE OLIVEIRA; ARAYA; GAMBETA; FERREIRA *et al.*, 2019; RABOISSON; DALLEL, 2004). Contudo, pouco tem sido investigado sobre as alterações sensoriais e afetivas não imediatas que persistem após a administração de formalina.

1.6.2 Modelo de dor pós-operatória

O ato cirúrgico gera um trauma que resulta em alterações fisiológicas e emocionais que, se não adequadamente controladas, predisõem os pacientes a complicações que podem prolongar a internação, sendo a dor um dos fatores mais impactantes na recuperação do indivíduo. Por esse motivo, a dor pós-operatória tem sido considerada um importante marcador vital do paciente no período imediato que segue à cirurgia (MORONE; WEINER, 2013). Assim, modelos de dor pós-operatória têm se desenvolvido com o propósito de estudar a fisiopatologia e possíveis terapias para o tratamento da dor pós-cirúrgica. O modelo de dor pós-operatória na região orofacial consiste na realização da incisão na mucosa oral, o que induz hiperalgesia térmica e mecânica na face após 24 horas e perdura por 72 a 120 horas após o procedimento cirúrgico (URATA; SHINODA; HONDA; LEE *et al.*, 2015). No entanto, não há relatos da presença de dor espontânea, tônica ou estudos que avaliem o componente afetivo da dor neste modelo.

1.6.3 Modelo de dor neuropática trigeminal

O nervo infraorbital em roedores alcança um tamanho importante em relação ao restante dos nervos periféricos do animal, pois é responsável por transmitir as informações das vibrissas, da pele que as circunda, parte do nariz, arcada dentária superior e parte posterior da cavidade oral (FINK; KISH; BYERS, 1975). De fato, constitui quase toda a divisão maxilar do nervo trigêmeo e consiste em 18-25 fascículos que contêm cerca de 20.000 fibras mielínicas e cerca de 13.000 fibras amielínicas distribuídas ao longo do nervo e que em conjunto, apresenta um grande tamanho (JACQUIN; HESS; YANG; ADAMO *et al.*, 1984). Este fato permite a manipulação cirúrgica de maneira fácil e reprodutível, razão pela qual, por meio da constrição foi desenvolvido um modelo de dor neuropática em roedores para o estudo da NT em humanos (VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994). Esse modelo reproduz vários aspectos da NT, inclusive hipersensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos

(CHICHORRO; ZAMPRONIO; CABRINI; FRANCO *et al.*, 2009; CHICHORRO; ZAMPRONIO; RAE, 2006; CHICHORRO; ZAMPRONIO; SOUZA; RAE, 2006; IMAMURA; KAWAMOTO; NAKANISHI, 1997; VOS; MACIEWICZ, 1991). Após a constrição do nervo infraorbital (CION), os ratos exibem mudanças nas respostas evocadas e no comportamento espontâneo. Essas alterações comportamentais ocorrem em duas fases. No estágio inicial (primeiros 10-12 dias após a cirurgia), os ratos apresentam aumento da resposta de *grooming* facial (VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994) e diminuição do tempo de resposta após estimulação da região inervada pelo nervo infraorbital com temperaturas de frio e calor nocivas, respectivamente (CHICHORRO; ZAMPRONIO; CABRINI; FRANCO *et al.*, 2009; CHICHORRO; ZAMPRONIO; SOUZA; RAE, 2006). Posteriormente (a partir do dia 10 após a cirurgia) o *grooming* facial é progressivamente reduzido, embora persista aumentado em relação ao lado controle (VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994). A hiporresponsividade ao estímulo mecânico inicial é substituída abruptamente (por volta do dia 15) pela hiperresponsividade ipsilateral e contralateral que perdura por até 120 dias (CHICHORRO; ZAMPRONIO; RAE, 2006). Contudo, poucos estudos têm avaliado a dor não evocada (ou seja, espontânea) e o aspecto afetivo da dor em modelos de dor neuropática trigeminal.

1.7 AVALIAÇÃO DA DOR OROFACIAL EM ROEDORES

Os roedores são comumente usados para estudar os mecanismos fisiopatológicos da dor, no entanto a dor não pode ser medida diretamente em animais, motivo pelo qual foram desenvolvidos métodos que quantificam comportamentos "semelhantes à dor" ou nocicepção (MOGIL, 2009). Esses métodos comportamentais podem ser divididos em nocicepção evocada e nocicepção não evocada por estímulo (espontânea ou tônica), com base no uso de um estímulo externo aplicado que tem o potencial de causar dano ao tecido (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

1.7.1 Avaliação da nocicepção evocada

A determinação do limiar nociceptivo baseia-se na avaliação da resposta comportamental dos animais à aplicação de um estímulo nocivo que pode ser de natureza química, térmica ou mecânica. Existem diversas substâncias químicas que podem induzir respostas nociceptivas agudas, sendo que neste estudo foi utilizada a

formalina (descrita no item 1.6.1). Por outro lado, a hiperalgesia a estímulos térmicos pode ser avaliada em nociceptores previamente sensibilizados. No caso da estimulação orofacial por calor em roedores, a temperatura aplicada é em torno de 50°C a uma distância de 1 cm da face do rato, e a resposta nociceptiva é avaliada pelo tempo que o animal leva para retirar a cabeça, atacar a fonte de calor ou fazer um movimento rápido das vibrissas (CHICHORRO; ZAMPRONIO; CABRINI; FRANCO *et al.*, 2009). Finalmente, o estímulo mecânico pode ser subdividido em dinâmico, o qual é gerado por escovação (com um cotonete, pincel ou bola de algodão), puntiforme (estimulação pelo toque) e estático, o que é promovido por pressão constante e contínua, ou de intensidade crescente (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). A este respeito, utilizamos um estímulo puntiforme ao aplicar filamentos de von Frey de forças variadas na área de inserção das vibrissas para avaliação da hiperalgesia mecânica na região orofacial (ver descrição detalhada dos métodos utilizados no item 3.2).

1.7.2 Determinação da nocicepção não evocada

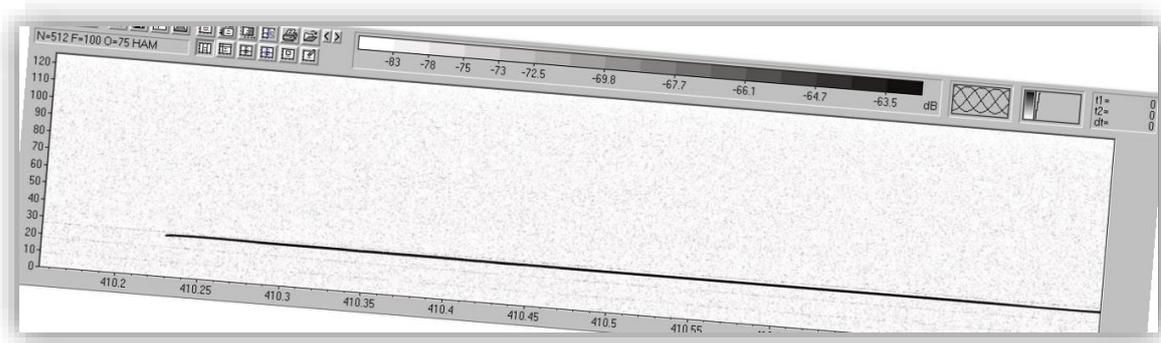
A determinação da dor espontânea (i.e. não evocada) em roedores é difícil de quantificar. No entanto, alguns métodos têm sido utilizados, incluindo a escala de *Grimace*, ensaios de escavação, análise de marcha, distribuição de peso (TAPPE-THODOR; KUNER, 2014), entre outros. A dor espontânea é um sintoma frequente de várias condições dolorosas em humanos, portanto sua avaliação em modelos animais de dor contribui para aumentar o aspecto translacional da pesquisa em dor (MOGIL, 2009). Neste sentido, nos últimos anos tem sido utilizado o teste de preferência/aversão condicionada ao lugar (CPP/CPA) com o intuito de detectar a presença de dor tônica nos animais em diferentes modelos (KING; VERA-PORTOCARRERO; GUTIERREZ; VANDERAH *et al.*, 2009; NAVRATILOVA; XIE; KING; PORRECA, 2013). O teste de CPP permite avaliar os aspectos motivacionais da dor, de forma que a busca do alívio da dor é uma forte motivação. Assim, o alívio de um estado tônico aversivo é recompensador, servindo como um reforço negativo que pode ser usado para condicionar o comportamento (KING; VERA-PORTOCARRERO; GUTIERREZ; VANDERAH *et al.*, 2009; OKUN; DEFELICE; EYDE; REN *et al.*, 2011; OKUN; LIU; DAVIS; REN *et al.*, 2012; QU; KING; OKUN; LAI *et al.*, 2011). Diversos estudos tem empregado de forma consistente o teste do CPP para detectar a presença de dor tônica em diferentes modelos, tais como a dor pós-

incisional intraplantar (NAVRATILOVA; XIE; OKUN; QU *et al.*, 2012), a dor tônica cefálica induzida pela administração de mediadores inflamatórios na duramáter (DEFELICE; EYDE; DODICK; DUSSOR *et al.*, 2013) bem como a presença de dor tônica em ratos após toracotomia e cirurgia de retirada da costela (HUNG; WANG; STRICHARTZ, 2015) e em ratos com dor neuropática após 6 dias da lesão do nervo tibial (PAN; YU; FISCHER; KRAMER *et al.*, 2016) ou no décimo quinto dia após CION (NONES; CLAUDINO; FERREIRA; DOS REIS *et al.*, 2017). Desta forma, o teste de CPP utiliza o aspecto aversivo da dor como uma forte motivação para a busca por seu alívio, e assim, revelar a presença de dor tônica presente em condições dolorosas, indiretamente através do pareamento com drogas analgésicas.

1.7.3 Quantificação de vocalizações ultrassônicas

Adicionalmente, tem sido proposto que a identificação das vocalizações ultrassônicas (USV) espontâneas em resposta a uma situação dolorosa é uma nova abordagem que poderia corresponder à expressão de um componente afetivo da dor (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; HANEY; MICZEK, 1994).

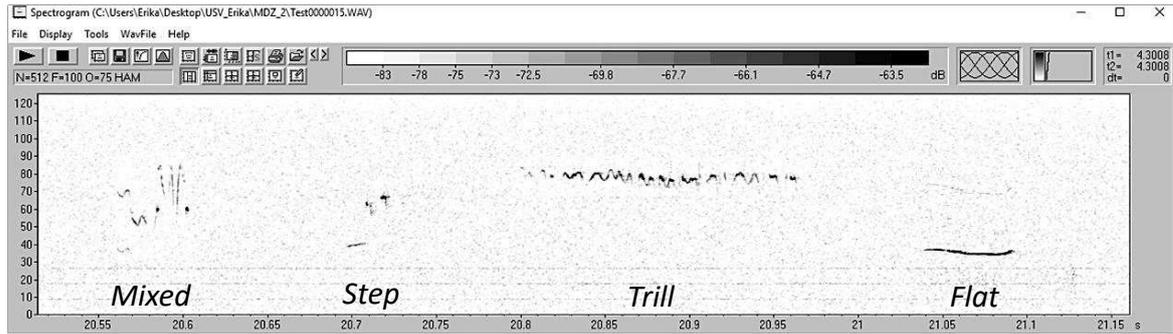
A vocalização em roedores consiste em um padrão de vogal extenso das emissões nas faixas de frequências audíveis e ultrassônicas. As frequências audíveis para o ser humano representa uma comunicação heteroespecífica que é utilizada na confrontação direta com o predador para sinalizar perigo ou ameaça (LITVIN; BLANCHARD; BLANCHARD, 2007). Contrariamente, as USV são emitidas na comunicação intraespecífica (BLANCHARD; BLANCHARD; AGULLANA; WEISS, 1991) e podem ser classificadas em 40 kHz; 22 kHz e 50 kHz. As USV de 40 kHz são realizadas unicamente por filhotes na ansiedade e/ou angústia por separação da mãe e da ninhada (SIMOLA, 2015). Em adultos, vocalizações entre 22-28 kHz (Esquema 3), denominadas USV de 22 kHz ou aversivas, estão associadas a comportamentos frequentemente relacionados a situações de estresse ou perigo imediato (DINH; LARKIN; GATLIN; PIEPMEIER, 1999; JOURDAN; ARDID; CHAPUY; ESCHALIER *et al.*, 1995), como durante uma briga de machos (LORE; FLANNELLY; FARINA, 1976; SALES, 1972), durante a abstinência da morfina (VIVIAN; MICZEK, 1993), ou na expectativa de um estímulo aversivo inevitável ou após a aplicação deste estímulo (GHISELLI; LARIVIERE, 1977; KALTWASSER, 1990; VIVIAN; MICZEK, 1991).



ESQUEMA 3: IMAGEM REPRESENTATIVA DE UMA VOCALIZAÇÃO ULTRASSÔNICA DE 22 kHz. Espectrograma gerado pelo programa Avisoft Bioacoustics.

Por outro lado, as emissões de USV na faixa dos 50 kHz, com frequência variável de 35 a 70 kHz (Esquema 4), ocorrem em vários contextos comportamentais positivos como as emissões produzidas por ratos jovens ao brincar (KNUTSON; BURGDORF; PANKSEPP, 1998), assim como por adultos machos e fêmeas durante o acasalamento (THOMAS; BARFIELD, 1985) e após a ejaculação de ratos machos adultos (BARFIELD; GEYER, 1972). Essas USV, também nomeadas apetitivas, são subdivididas em tipos: as *flat* e as de frequência modulada (FM). As *flat* possuem frequência de som constante, tem sido identificadas como as USV emitidas mais frequentemente, e podem indicar uma chamada de contato para interação social (WÖHR; HOUX; SCHWARTING; SPRUIJT, 2008). As USV de FM podem se manifestar na expectativa de uma recompensa ou por motivação e incluem as dos tipos *step* (em degraus), *mixed* (mistas) ainda as *tril* (emissões geralmente indicativas de alto grau de motivação) (BRUDZYNSKI, 2015; KUCHNIAK; WYSZOGRODZKA; CHRAPUSTA; CZARNA *et al.*, 2019).

Alguns estudos mostraram que os roedores emitem USV em resposta a um estímulo doloroso. Um destes estudos demonstrou que ratos com incisão intraplantar apresentaram um aumento da emissão de USV de 22 kHz 6 e 24 horas após a incisão, as quais foram diminuídas após o tratamento com naproxeno (LIM; KIM; HAN; KIM, 2014). Também foi demonstrado que a administração de bradicinina induz a emissão de USV de 22 kHz em modelo de migrânea, as quais foram reduzidas com sumatriptano (BOBADE; BODHANKAR; ASWAR; MOHAN *et al.*, 2015). No entanto, não existem dados sobre a emissão de USV em diferentes modelos de dor orofacial, bem como de sua caracterização em situações de dor aguda e crônica.



ESQUEMA 4: IMAGEM REPRESENTATIVA DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS DE 50 kHz. Emissões de frequência modulada, as quais incluem os subtipos *mixed*, *step* e *trill*, e as emissões sociais do subtipo *flat*, obtidas com o programa Avisoft Bioacoustics.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A experiência de dor humana engloba múltiplas modalidades de estímulo, distintos mecanismos moleculares e componentes sensoriais, motores, emocionais e motivacionais. Contudo, a pesquisa em dor nos animais geralmente se limita à avaliação da nocicepção, negligenciando os componentes afetivo e motivacional. Diante disso, o estudo tem a finalidade de caracterizar as respostas sensoriais e os comportamentos associados ao aspecto afetivo da dor em diferentes modelos, com o intuito de fornecer ferramentas adicionais para a pesquisa experimental da dor orofacial. Adicionalmente, pretendemos investigar o envolvimento do sistema mesolímbico e as áreas cerebrais implicadas na dor orofacial persistente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar no teste da formalina orofacial:

- ✓ A resposta nociceptiva imediata;
- ✓ O decurso temporal da hiperalgesia térmica;
- ✓ As variações temporais na emissão das USV;
- ✓ O desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso em diferentes períodos.

Avaliar no modelo de dor pós-operatória:

- ✓ O decurso temporal da hiperalgesia mecânica e térmica;
- ✓ O decurso temporal do comportamento de *grooming* facial espontâneo;
- ✓ As variações temporais na emissão das USV;
- ✓ A presença de comportamento do tipo ansioso após a incisão da mucosa oral;
- ✓ O efeito da morfina na hiperalgesia térmica e mecânica, no CPP, no comportamento do tipo ansioso e na emissão das USV;
- ✓ A participação do sistema dopaminérgico mesolímbico;
- ✓ A ativação neuronal de áreas cerebrais implicadas no processamento doloroso.

Avaliar modelo de dor neuropática trigeminal:

- ✓ A presença de hiperalgesia mecânica;
- ✓ O desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso;
- ✓ A emissão de USV;
- ✓ A participação do sistema dopaminérgico mesolímbico;
- ✓ A ativação neuronal de áreas cerebrais implicadas no processamento doloroso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar machos pesando 250 a 300 g (60 dias de idade) e fornecidos pela colônia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), para procedimentos experimentais realizados entre 7:00 e 19:00 horas, respeitando pelo menos 48 horas de aclimação ao ambiente antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em grupos de 3 a 4 por caixa, a temperatura controlada (22 ± 1 °C) em um ciclo claro/escuro de 12 horas com ração e água à vontade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes da UFPR e da Universidade de Calgary, bem como foram seguidas as regulamentações brasileiras e canadenses sobre bem-estar animal, tendo sendo previamente aprovados pelos comitês de Ética (CEUA / BIO-UFPR; # 1057; AC18-0003, respectivamente). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e reduzir seu estresse e sofrimento.

3.1.2 Drogas, doses e reagentes

Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma solução de cetamina (90 mg/kg; Vetica Laboratórios de Produtos Veterinários, São Paulo, Brasil) e xilazina (10 mg/kg; Rhobifarma Ind. Farmacêutica, São Paulo, Brasil), ou via inalatória com ifofluorano 5% (Abbott laboratories, USA). Formalina (2,5%/50 µL; s.c. lábio superior; Alphatec, Brasil), sulfato de morfina (2,5 mg/Kg; s.c.; Merck S.A, São Paulo, Brasil) e 4-difenilacetoxi-n-metilpiperidina metiodida (Anfetamina, 1 mg/Kg; s.c.; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) foram diluídas em solução salina estéril. Para a quantificação da expressão de c-Fos e TH, por imunohistoquímica (IHQ), foram utilizados os anticorpos monoclonais primários anti-Fos de coelho (Abcam, AB190289) e anti-TH de camundongo (Sigma-Aldrich, T1299), e anticorpos secundários de cabra anticoelho, Alexa Fluor 488 e anticamundongo Alexa Fluor 546 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, A21206 e A11030). Para a quantificação de expressão de TH por Western blot (WB), foram utilizados anticorpo monoclonal primário anti-TH de camundongo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, T1299) e anticorpo secundário (conjugado anti-IgG HRP de camundongo; Jackson ImmunoResearch,

West Grove, PA). O controle de carregamento utilizado foi α -tubulina (Abcam, Cambridge, MA, 1: 5000). As doses foram baseadas em estudos anteriores e experimentos piloto em nosso laboratório (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004; WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2012).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Teste da formalina orofacial

O teste de formalina orofacial foi realizado segundo Chichorro e colaboradores (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004), com pequenas modificações. Os animais foram colocados individualmente em uma caixa acrílica de observação (30 cm x 20 cm x 20 cm) por 10 minutos para ambientação e então receberam uma injeção subcutânea de solução salina (0,9%, 50 μ L) ou formalina (2,5%, 50 μ L) no lábio superior direito usando uma agulha hipodérmica (12,7 mm \times 0,33 mm). Imediatamente após a injeção foram devolvidos à caixa de observação para quantificação, com um cronômetro, do tempo que cada animal passou realizando o comportamento de *grooming* facial bilateral com as patas dianteiras. O tempo dispendido neste comportamento foi quantificado a cada período de 3 minutos, totalizando um tempo de avaliação de 30 minutos.

3.2.2 Incisão da mucosa oral

Os animais foram anestesiados previamente com cloridrato de cetamina e de xilazina por via intraperitoneal. Após o estabelecimento da anestesia, com ajuda de instrumentos cirúrgicos, a boca do animal foi mantida aberta e em seguida foi realizada uma incisão (aproximadamente 10 mm de comprimento por 2 mm de profundidade) na mucosa oral direita utilizando um bisturi com lâmina 15 (URATA; SHINODA; HONDA; LEE *et al.*, 2015). Posteriormente foi realizado um ponto de sutura no meio da incisão com fio de seda agulhado 4.0. Os animais do grupo falso-operado foram igualmente anestesiados mantidos durante um minuto com a boca aberta na mesma posição sem executar a incisão. Ao término da cirurgia os animais foram acondicionados em sala aquecida até a completa recuperação da anestesia (ARAYA;

BARROSO; TURNES; RADULSKI *et al.*, 2020), e então foram transferidos ao biotério do laboratório.

3.2.3 Constricção do nervo infraorbital

A indução da dor neuropática facial foi realizada mediante uma cirurgia de CION conforme o método proposto inicialmente por VOS e colaboradores (VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994) e modificado posteriormente por Chichorro e colaboradores (CHICHORRO; ZAMPRONIO; SOUZA; RAE, 2006). Os animais previamente anestesiados com cloridrato de cetamina e de xilazina por via intraperitoneal, foram submetidos a tricotomia do local e a assepsia com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, foi realizada uma incisão na pele abaixo do olho direito, cerca de 3 mm posterior à inserção das vibrissas. Os músculos elevador do lábio superior e masseter superficial anterior foram afastados para que a porção rostral do nervo infraorbital fosse exposta próxima à fissura infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes, e em seguida foram realizadas duas amarras frouxas, separadas em aproximadamente 2 mm, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio agulhado usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, entretanto o feixe nervoso não foi submetido à constricção. Ao término da cirurgia os animais foram mantidos em sala aquecida até a completa recuperação da anestesia.

3.2.4 Avaliação da hiperalgesia ao calor

Os ratos foram levados à sala de experimentação pelo menos uma hora antes do início dos experimentos. Para avaliação da hiperalgesia ao calor, cada animal foi contido com uma mão do experimentador e com a mão livre foi aproximada uma fonte de calor radiante (50 °C), posicionada a 1 cm da área de inserção das vibrissas do lado direito da face, ipsilateral à cirurgia. Em seguida, foi quantificado o tempo de reação para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas (CHICHORRO; ZAMPRONIO; CABRINI; FRANCO *et al.*, 2009). Foram incluídos nos experimentos apenas os animais que apresentaram respostas entre 9 e 20 segundos. O tempo de corte de 20 segundos para esse teste foi estipulado para evitar danos teciduais.

3.2.5 Quantificação de *grooming* espontâneo

Os animais foram colocados em caixas de observação de acrílico medindo 30 cm³ durante 10 minutos para ambientação. Em seguida foi registrado o tempo despendido na realização de *grooming* facial bilateral com as patas dianteiras durante 10 minutos (KOPRUSZINSKI; DOS REIS; RAE; CHICHORRO, 2019). Todas as avaliações foram realizadas no período da manhã entre 9:00 e 11:00 horas.

3.2.6 Avaliação da hiperalgesia mecânica

Os animais foram habituados individualmente nas caixas de observação durante 2 horas previamente ao início do experimento. Em seguida, foram aplicados de maneira crescente 8 filamentos de von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA, 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 g) na região de inserção das vibrissas no lado direito da face, ipsilateral à cirurgia. Cada filamento foi aplicado por 3 vezes consecutivas, com um intervalo de aproximadamente 3 segundos entre cada aplicação. O limiar de resposta à estimulação mecânica correspondeu ao filamento que evocou por duas vezes comportamentos de retirada rápida da cabeça ou reações de ataque/escape (CHICHORRO; ZAMPRONIO; RAE, 2006). Foram incluídos nos experimentos apenas os ratos que não apresentaram, na etapa de pré-seleção, comportamentos nociceptivos com a aplicação de todos os filamentos, de forma que o limiar mecânico foi igual ou superior a 8,0 g.

3.2.7 Teste de preferência condicionada ao lugar

O protocolo foi realizado de acordo com o descrito por KING e colaboradores (KING; VERA-PORTOCARRERO; GUTIERREZ; VANDERAH *et al.*, 2009) e conduzido em sala sem iluminação. O equipamento utilizado consistiu de uma caixa de madeira com 3 compartimentos ou câmaras diferentes separados por 2 divisórias móveis com e sem aberturas (10 x 7 cm) que permitiram ou não, o livre acesso dos animais entre os compartimentos, respectivamente. Os dois compartimentos de condicionamento (36,5 x 31 x 25 cm) apresentaram diferentes pistas visuais e táteis. Um deles, de cor preta com piso em madeira lisa e paredes laterais com listras brancas horizontais, e outro, de cor preta com piso em vidro transparente texturizado e paredes laterais com listras brancas verticais. O compartimento central “neutro” (31 x 10 x 25 cm) de cor preta, separou as duas câmaras de condicionamento e

permaneceu iluminado (luz branca acoplada, 13 watts) durante a execução de todos os testes. Os experimentos foram realizados em 3 fases: pré-condicionamento, condicionamento e teste. No primeiro dia (pré-condicionamento), os animais foram colocados individualmente no compartimento neutro e permaneceram com livre acesso entre os compartimentos de condicionamento durante 15 minutos. Ao final de cada sessão, os animais retornaram para as caixas e as câmaras foram higienizadas com papel toalha embebido em água. Os 15 minutos de pré-condicionamento foram gravados com auxílio de uma câmera de vídeo posicionada acima das câmaras e acoplada a um computador para posterior análise do tempo que cada animal permaneceu em cada uma das câmaras, e assim, se verificou a inexistência de preferência inicial. Os ratos que permaneceram mais do que 720 ou menos do que 180 segundos em uma única câmara foram eliminados do teste. Na sequência, os dados foram contrabalanceados para garantir que a média dos tempos de permanência entre as câmaras não tivessem diferença entre os grupos e os animais foram designados às respectivas câmaras para pareamento com morfina, respeitando os grupos experimentais. No segundo dia (condicionamento), os animais receberam salina e após 30 minutos foram colocados na câmara designada durante 30 minutos (sem livre acesso entre os compartimentos). Quatro horas mais tarde, os mesmos animais receberam morfina e após 30 minutos foram colocados na câmara oposta durante 30 minutos. No terceiro dia (teste) os animais foram novamente colocados na câmara neutra com livre acesso entre os compartimentos durante 15 minutos que também foram gravados para posterior quantificação. Um aumento no tempo de permanência no dia teste na câmara pareada com morfina comparado ao tempo de permanência nesta mesma câmara no pré-condicionamento foi indicativo de CPP.

3.2.8 Avaliação do comportamento do tipo ansioso

Para avaliação do comportamento do tipo ansioso os animais foram submetidos ao teste do LCE conforme descrito por PELLOW e colaboradores (PELLOW; CHOPIN; FILE; BRILEY, 1985) com iluminação da sala a 40 lux, utilizando um aparato de madeira elevado a 50 cm do chão, o qual apresenta 4 braços, sendo 2 abertos e 2 fechados com um cruzamento entre os braços uma área central de 10 cm². Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato e observados durante 5 minutos que foram registrados para avaliação dos deslocamentos. Foi contabilizado o tempo em que cada animal permaneceu nos braços abertos e fechados, bem como o

número de entradas em cada braço, sendo considerada entrada quando o animal ultrapassou com as 4 patas as delimitações de cada braço. Uma redução significativa na porcentagem do tempo despendido ou do número de entradas nos braços abertos, em relação ao grupo de comparação, indicou a ocorrência de comportamento do tipo ansioso. O número total de entradas nos braços fechados foi quantificado para avaliação da atividade locomotora. Os animais passaram apenas uma vez pelo LCE, sendo necessário grupos independentes de animais para repetir o procedimento em períodos de tempo diferentes.

3.2.9 Quantificação da emissão de vocalizações ultrassônicas

As emissões de USV de 22 kHz e 50 kHz foram quantificadas de acordo com o descrito por LIM e colaboradores (LIM; KIM; HAN; KIM, 2014) com algumas modificações. O experimento foi realizado em sala acústica com iluminação a 40 lux. Cada animal foi colocado individualmente em uma caixa de acrílico (30 cm³) com maravalha e um microfone ultrasônico (CM16 Avisoft Bioacoustics, Berlin, Alemanha), sensível a frequências entre 15-180 kHz, foi colocado a uma distância de 45 cm do chão da caixa de movimentação permitindo a captação das USV. O programa Avisoft Recorder (versão 2.95; Avisoft Bioacoustics), permitiu a gravação e posterior análise do espectrograma (Avisoft SAS Lab Pro versão 4.34 Avisoft Bioacoustics), de frequência de 488 kHz e com resolução 0,512 ms, das USV emitidas pelo animal. A análise foi realizada de forma manual (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; PEREIRA; ANDREATINI; SCHWARTING; BRENES, 2014; SCHWARTING; JEGAN; WOHR, 2007).

3.2.10 Quantificação da expressão de tirosina hidroxilase por PCR quantitativo em tempo real

Os ratos foram decapitados sob anestesia inalatória com isoflurano seguido da coleta a -4 °C do tecido cerebral contendo os NAc, o qual foi imediatamente armazenado a -80 °C. O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído com o kit de extração NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, EUA) e quantificado usando um NanoDrop. A síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) de primeira fita (a partir de 0,2 µg de RNA total por 12 µL de mistura de reação) foi realizada usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (QuantiTec Reverse transcription kit - Applied Biosystems, Life Technologies, EUA). A amplificação por

PCR, em triplicado para cada amostra, foi realizada usando os *primers* de Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems) para o gene alvo TH e β -actina (Rn00562500_m1 e Rn00667869_m1, respectivamente) com o TaqMan® Universal PCR Master Mix no aparato *QuantStudio 3* (Applied Biosystems) e software *QuantStudio Design and analysis software v1.4.3*. A etapa de ativação da polimerase a 95 °C por 10 minutos foi seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 60 segundos a 60 °C. Os níveis específicos de mRNA foram calculados após a normalização do mRNA de β -actina em cada amostra usando o método do ciclo de limiar ou Ct (i.e. o Δ Ct para cada amostra foi obtido do Ct de TH e subtraído do Ct de β -actina) e comparados entre os grupos experimentais e de controle (JAGODIC; PATHIRATHNA; NELSON; MANCUSO *et al.*, 2007).

3.2.11 Quantificação da expressão de tirosina hidroxilase por Western blot

Os ratos foram sacrificados por decapitação sob anestesia profunda com inalação de isoflurano no dia 3 ou 15 após o procedimento de incisão intraoral ou CION, juntamente com os respectivos grupos controle falso-operados. Os cérebros foram excisados em gelo seco e armazenados a -80 °C de acordo com um estudo anterior (FAN; GANDINI; ZHANG; CHEN *et al.*, 2017). O NAc foi dissecado, bilateralmente, com uma biópsia de punção padrão, com uma extensão de tecido de 0,15 cm de diâmetro de ambos os lados. As amostras de tecido contendo o NAc foram lisadas em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) modificado: *Tris* 50 mM, NaCl 100 mM, *Triton X-100* 0,2% (vol / vol), NP-40 0,2% (vol / vol), ácido dietilenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM mais um coquetel inibidor de protease (Thermo Scientific™A32965), pH 7,5. Os lisados foram preparados agitando as amostras por 30 minutos a 4 °C, e por centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos também a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e a quantificação da proteína seguiu o método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Em seguida, as amostras (60 mg) foram fervidas em tampão de amostra Laemmli por 10 minutos e separadas em eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 10% e transferidas para membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,45 mm (Merck-Millipore, Darmstadt, Alemanha). Para prevenir a ligação não específica, o bloqueio das membranas foi realizado com 0,1% de solução salina tamponada com *tris* e *tween* 20 (TBST, pH 7,6) contendo 5% de leite desnatado durante 30 minutos. Após lavagem 4 vezes por 10 minutos com 10 mL de TBST, as membranas foram incubadas com

um anticorpo monoclonal anti-TH de camundongo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, T1299) em uma diluição de 1: 2500 durante a noite a 4 °C. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase de raiz forte (HRP- *Horseradish peroxidase*) anti-IgG de camundongo (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) foi diluído em leite desnatado a 5% em solução TBST (1: 5000) e incubado por 1 hora sob agitação. O controle de carregamento utilizado foi α -tubulina (Abcam, Cambridge, MA, 1: 5000). A reação foi registrada com scanner LI-COR (98-14229, Biosciences, Canada), e a análise de densitometria foi realizada usando o programa ImageJ (National Institutes of Health).

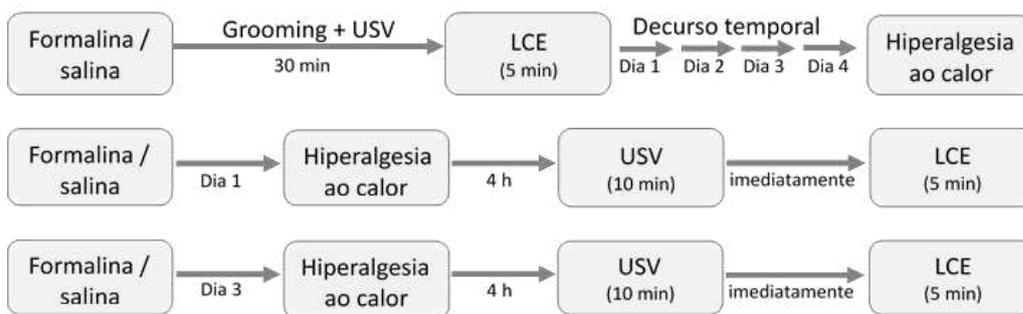
3.2.12 Quantificação da expressão de c-Fos e tirosina hidroxilase por imunohistoquímica

Os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca com paraformaldeído 4% sob anestesia profunda com inalação de isoflurano no terceiro dia após a cirurgia de incisão ou no décimo quinto dia após CION, junto com os respectivos grupos controle falso-operados. Os cérebros foram submersos em paraformaldeído a 4% durante a noite e depois transferidos para uma solução de sacarose a 30% durante 3 dias. Subsequentemente, um bloco de tecido foi feito com *Tissue-Tek* em gelo seco e armazenado a -80 °C. Fatias no NAc de 30 μ m foram obtidas com corte em criostato, em sequência foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato seguido do bloqueio por 2 horas com uma solução contendo 0,5% de albumina de soro bovino, 10% de soro de cabra normal e 0,3% de Triton X-100 em solução salina tamponada com fosfato. As seções foram então incubadas com anticorpo primário anti-TH ou anti-cFos durante a noite a 4 °C e lavadas 3 vezes (mesma solução acima) antes da incubação com anticorpo secundário por 2 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem 3 vezes em solução salina tamponada com fosfato, os cortes foram montados em lâminas. Todas as imagens foram capturadas digitalmente com uma câmera de 8 bits, dando assim valores de nível de cor (intensidade) de 0 a 255. A imunocoloração foi visualizada usando uma lente objetiva de abertura numérica 40 x 0,4 em um sistema confocal Zeiss LSM510META, velocidade de execução 6. ImageJ (National Institutes of Health) foi usado para quantificar a intensidade de fluorescência. Este protocolo foi adaptado de Huang e colaboradores (HUANG; GADOTTI; CHEN; SOUZA; *et al.*, 2019).

3.2.13 Protocolos experimentais

Experimento 1: Avaliação de alterações nos componentes sensorial e afetivo da dor induzida por formalina orofacial

Os animais foram separados aleatoriamente em 2 grupos experimentais, os animais do grupo controle receberam uma injeção subcutânea de salina no lábio superior direito e o outro grupo recebeu formalina injetada da mesma maneira. Imediatamente após foram colocados nas caixas de observação para quantificação do tempo de *grooming* bilateral facial concomitante à avaliação da emissão de USV, que neste caso foi de 30 minutos. A determinação da medida basal de cada animal foi realizada por duplicata para cálculo da média, e nos 4 dias seguintes foi avaliado o decurso temporal da hiperalgesia ao calor. Grupos independentes de animais foram submetidos a análise da emissão de USV (durante 10 minutos) seguido imediatamente do teste LCE, no dia 1 ou no dia 3 após a injeção de salina ou formalina (ESQUEMA 5).

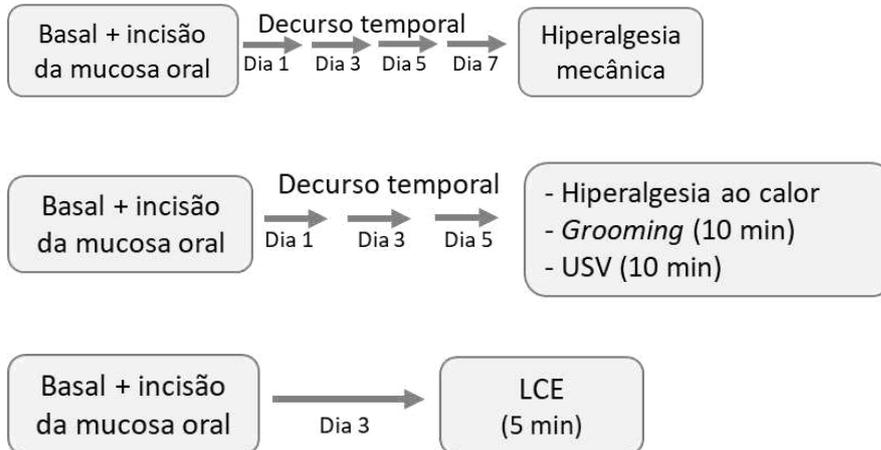


ESQUEMA 5: PROTOCOLOS PARA INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR FORMALINA OROFACIAL. USV: Vocalização ultrassônica. LCE: Labirinto em cruz elevado.

Experimento 2: Avaliação de alterações nos componentes sensorial e afetivo da dor no modelo de dor pós-operatória

Grupos independentes de ratos foram avaliados em diferentes períodos após a incisão da mucosa oral, para determinar o decurso temporal da hiperalgesia mecânica (dias 1, 3, 5 e 7) e ao calor, e *grooming* facial espontâneo (dias 1, 3 e 5). A resposta basal dos animais ao estímulo mecânico e térmico foi registrada previamente à cirurgia. O grupo de animais que foi submetido a avaliação de *grooming* espontâneo,

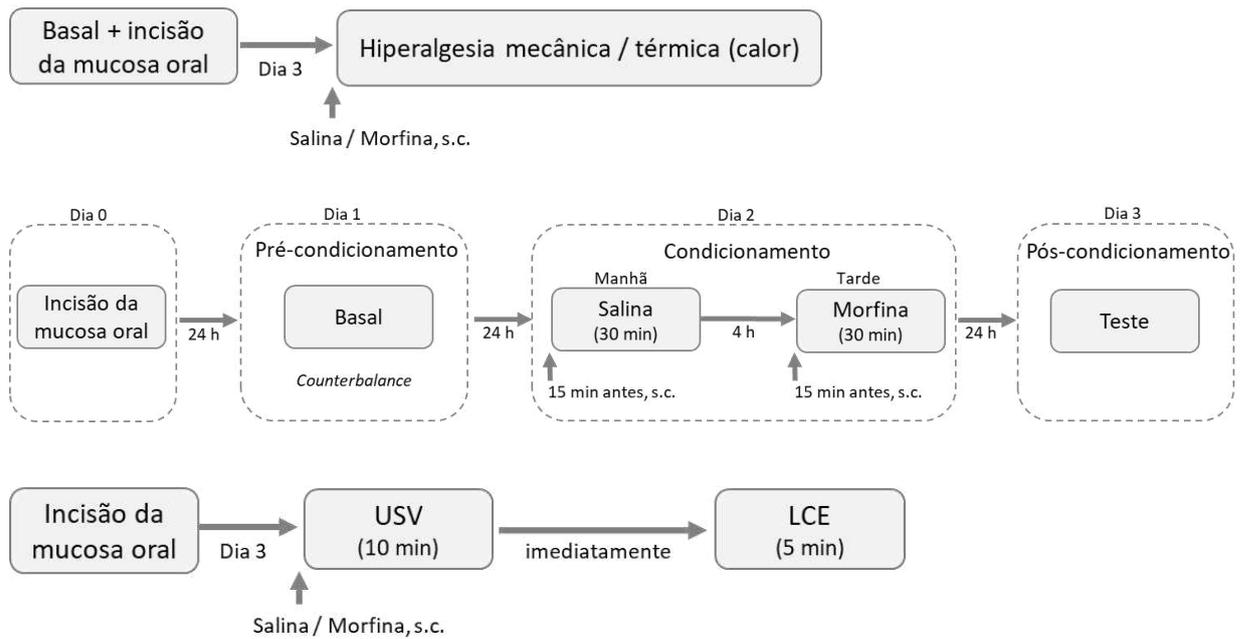
no período da tarde foi submetido ao registro espontâneo de USV nos dias 1, 3 e 5 após a incisão. Grupos independentes de animais foram submetidos a avaliação do comportamento do tipo ansioso, no teste LCE, no terceiro dia após a incisão da mucosa oral comparado com o respectivo grupo falso-operado (ESQUEMA 6).



ESQUEMA 6: PROTOCOLOS PARA INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA. USV: Vocalização ultrassônica. LCE: Labirinto em cruz elevado.

Experimento 3: Efeito da morfina nas alterações sensoriais e afetivas induzidas por incisão da mucosa oral

O efeito da morfina na hiperálgesia, dor tônica, comportamento do tipo ansioso e USV foi determinado em grupos independentes de animais no terceiro dia após a incisão da mucosa oral. Inicialmente foi determinada a resposta basal aos estímulos mecânico e térmico. Em seguida, grupos independentes de animais foram submetidos a incisão da mucosa oral ou falso-operado, e no terceiro dia foi avaliado o efeito analgésico da morfina, como controle positivo, na hiperálgesia ao calor ou mecânica. Esse teste permitiu identificar o pico analgésico para, desta maneira, estipular o tempo de condicionamento no teste do CPP. O teste de CPP foi realizado em um grupo independente de animais no modelo de dor pós-operatória e teve início no dia 1 após a cirurgia com o pré-condicionamento, seguido no dia seguinte pelo condicionamento com morfina e teste no terceiro dia após a cirurgia. O efeito da morfina também foi avaliado na emissão de USV seguido do LCE em grupos independentes de animais (ESQUEMA 7).



ESQUEMA 7: PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA MORFINA NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA. Vocalização ultrassônica (USV). Labirinto em cruz elevado (LCE).

Experimento 4: Avaliação de alterações nos componentes sensorial e afetivo da dor induzida por constrição do nervo infraorbital.

No décimo quinto dia após a CION, foi constatado em ratos do grupo falso-operado e CION a presença de hiperalgésia mecânica, e as alterações na emissão de USV seguido do comportamento do tipo ansioso. A medida basal para determinar o limiar mecânico foi realizada previamente a cirurgia (ESQUEMA 8).

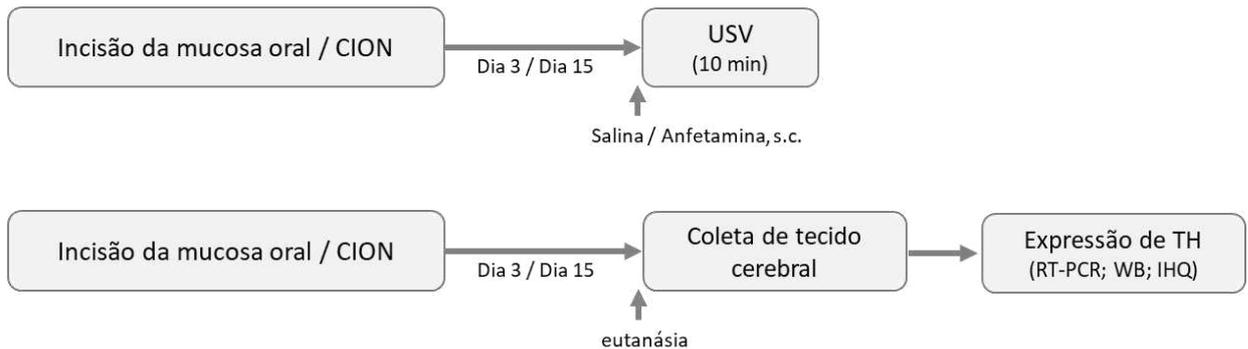


ESQUEMA 8: PROTOCOLO PARA INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL. Vocalização ultrassônica (USV). Labirinto em cruz elevado (LCE).

Experimento 5: Avaliação da participação da dopamina em modelos de dor orofacial

Com o intuito de identificar o envolvimento do sistema motivacional, foi investigado o efeito da anfetamina na emissão de USV uma vez instaurada a nocicepção tanto no terceiro dia após a incisão da mucosa oral como no décimo quinto

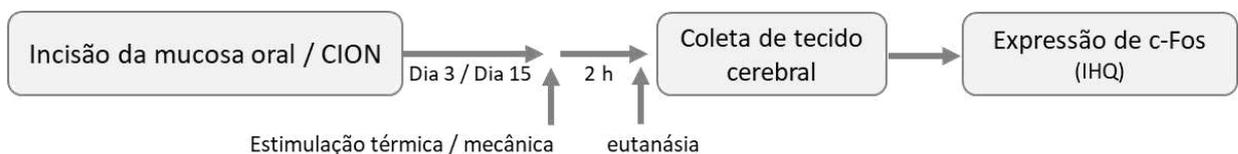
dia após a CION. No dia 3 após a incisão da mucosa oral e no dia 15 após a CION, foram coletados os cérebros dos animais e seus respectivos animais controle, a fim de quantificar a expressão de TH no NAc, e assim identificar possíveis alterações na função dopaminérgica mesolímbica em animais com dor persistente. Para isto, foram utilizadas as técnicas de RT-PCR, Western blot e imunohistoquímica, em grupos independentes de animais (ESQUEMA 9).



ESQUEMA 9: PROTOCOLOS DE INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA DOPAMINA EM MODELOS DE DOR OROFACIAL: Vocalização ultrassônica (USV). Construção do nervo infraorbital (CION). Tirosina hidroxilase (TH). Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Western blot (WB). Imunohistoquímica (IHQ).

Experimento 6: Identificação de áreas cerebrais ativadas em modelos de dor orofacial

Considerando que no terceiro dia após a cirurgia de incisão da mucosa oral e no décimo quinto dia após a CION, os animais apresentaram hiperalgesia persistente e dor tônica, foi determinada a ativação neuronal, mediante a expressão de c-Fos por imunohistoquímica, em diversas áreas cerebrais (i.e. CPF, Ace, ABL, NAc, PAG e Vc) relevantes no processamento de dor (ESQUEMA 10).



ESQUEMA 10: PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL EM MODELOS DE DOR OROFACIAL. Construção do nervo infraorbital (CION). Imunohistoquímica (IHQ).

3.2.14 Análise estatística e apresentação de resultados

A análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste post hoc de Bonferroni foi realizada para análise os testes de USV e CPP; ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post hoc de *Bonferroni* foi usada para analisar o decurso temporal de *grooming* e hiperalgesia aos estímulos térmicos e mecânico, bem como para os dados individuais de CPP segundo a condição (i.e. falso-operado/operado), e/ou tratamento (solução salina/morfina) e/ou tempo, como fatores independentes. As análises do comportamento do tipo ansioso, RT-PCR, Western blot e intensidade da imunofluorescência foram realizadas usando o teste t de Student bicaudal não pareado ou ANOVA de uma via seguido do teste de post hoc *Bonferroni*. Todos os dados foram expressos como média \pm e.p.m., e os resultados foram considerados estatisticamente significativos se $P < 0,05$. GraphPad Prism versão 6 para Windows foi usado para análise estatística dos dados (GraphPad Software, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES SENSORIAL E AFETIVO DA DOR APÓS INJEÇÃO DE FORMALINA OROFACIAL

A administração de formalina (2,5 %/50 µL) no lábio superior direito dos animais provocou uma resposta comportamental bifásica clássica observada pelo comportamento de *grooming* facial (Figura 1A), correspondendo à primeira fase de 0-3 minutos e a segunda fase de 12-27 minutos (Figura 1B) imediatamente após a injeção. A administração de salina (50 µL) não induziu aumento significativo do comportamento de *grooming*.

A latência para a resposta ao estímulo por calor foi determinada previamente (i.e. resposta basal) à administração de formalina ou salina, a qual se mostrou semelhante em ambos grupos. A administração de salina no lábio superior não alterou o limiar nociceptivo dos animais quando expostos ao calor radiante no decorrer dos 5 dias de observação, entretanto a injeção de formalina promoveu uma redução da latência para resposta durante os 3 primeiros dias subsequentes à administração (Figura 2).

A avaliação da emissão de USV após a administração de salina ou formalina demonstrou que os ratos do grupo controle emitiram USV do tipo *flat* principalmente, algumas USV de FM e raramente emitiram USV de 22 kHz. No entanto, a administração de formalina induziu um aumento significativo de emissões em 22 kHz. Por outro lado, não houve diferenças significativas no número total, bem como nos subtipos emitidos de 50 kHz pelos dois grupos experimentais (Figura 3A). As emissões um dia após a injeção, no qual os animais de ambos os grupos experimentais emitiram USV de 50 kHz, não apresentaram diferenças significativas no número total e nos subtipos (Figura 3B). No terceiro dia após a injeção, não houve emissão de 22 kHz; no entanto, o grupo tratado com formalina demonstrou uma importante redução no número total de USV, e especificamente do subtipo *flat* (Figura 3C) ao ser comparado com o grupo tratado com salina.

A análise do comportamento do tipo ansioso no teste do LCE após a injeção de salina ou formalina no lábio superior não apresentou diferença significativa logo após a administração. Ambos os grupos apresentaram porcentagem de tempo de permanência (Figura 4A) e número de entradas (Figura 4B) nos braços abertos

semelhantes. Após 24 horas da administração, ambos os grupos experimentais não apresentaram alteração significativa da porcentagem do tempo de permanência (Figura 4D) e do número de entradas (Figura 4E) nos braços abertos do LCE. No terceiro dia após a injeção de salina ou formalina, os animais tratados com formalina demonstraram uma importante redução da porcentagem do tempo de permanência (Figura 4G) e do número de entradas (Figura 4H) nos braços abertos do LCE comparado aos ratos tratados com salina. Por outro lado, a determinação da atividade locomotora pelo número de entradas nos braços fechados não evidenciou diferença significativa nos dois grupos experimentais (Figura 4C, 4F e 4I).

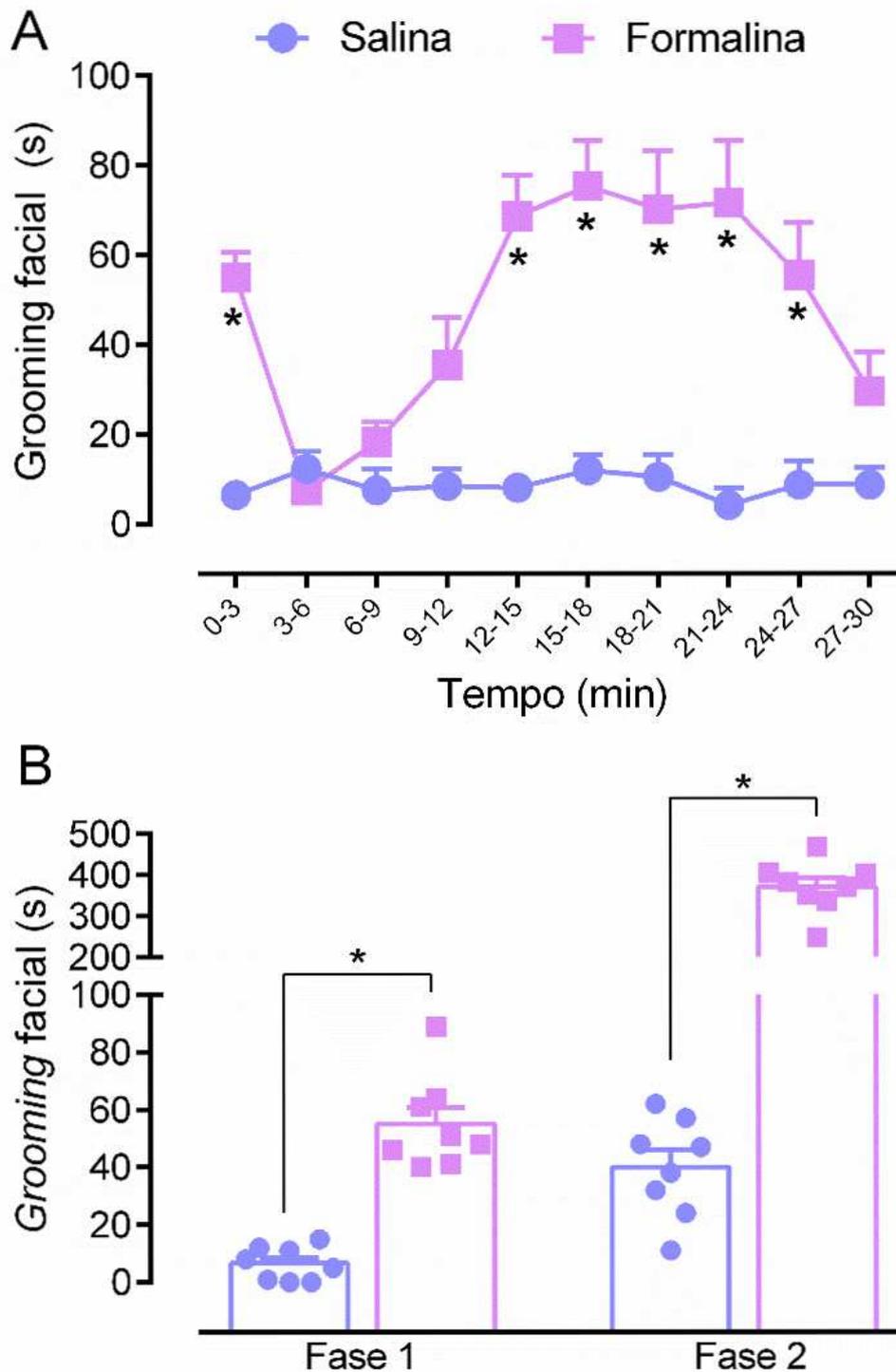


FIGURA 1: COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO IMEDIATO INDUZIDO POR FORMALINA OROFACIAL. A injeção subcutânea no lábio superior direito de salina (50 μ L) ou formalina (2,5 %/50 μ L) foi realizada imediatamente antes da avaliação comportamental. (A) Comportamento de *grooming* facial avaliado durante 30 minutos, em períodos consecutivos de 3 minutos cada. (B) *Grooming* facial cumulativo na fase 1 (0-3 minutos) e na fase 2 (12-27 minutos). Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc de Bonferroni, painel A; Teste t de Student bicaudal não pareado, painel B).

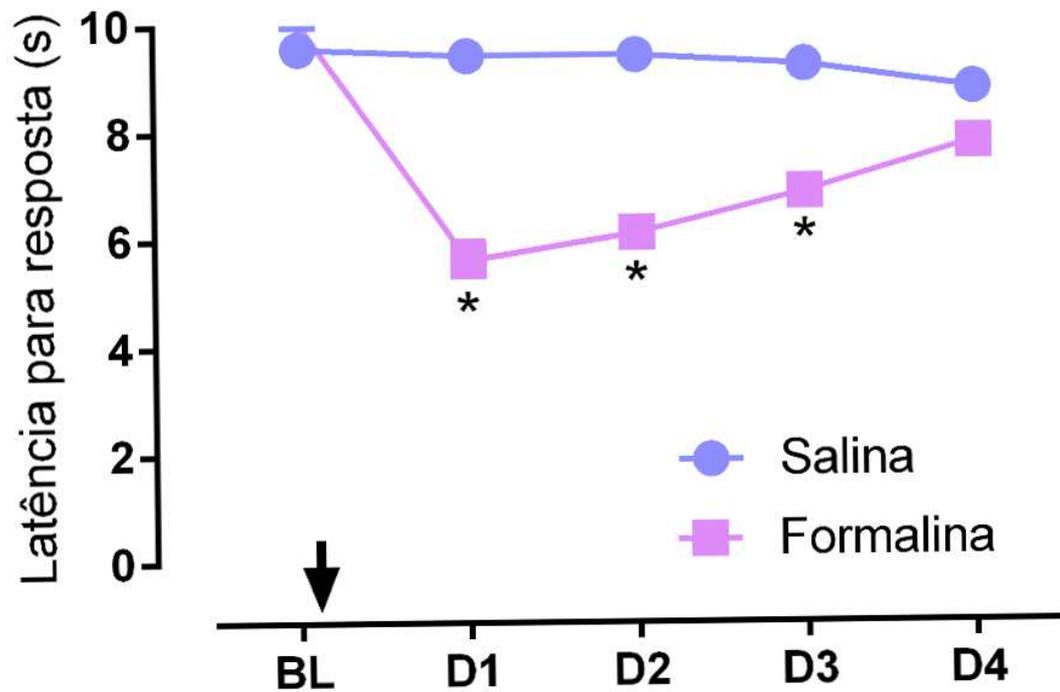


FIGURA 2: DECURSO TEMPORAL DA HIPERALGESIA AO CALOR APÓS FORMALINA OROFACIAL. A avaliação da latência para resposta à aplicação do estímulo térmico em diferentes períodos após a injeção no lábio superior direito de salina (50 μ L, s.c.) ou formalina (2,5 %/ 50 μ L, s.c.) ocorreu antes da administração (basal, BL) e nos 4 dias consecuentes (D1-D4). A seta indica o tratamento com formalina. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7-8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo salina (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de post hoc de Bonferroni). A seta indica o momento da administração da formalina.

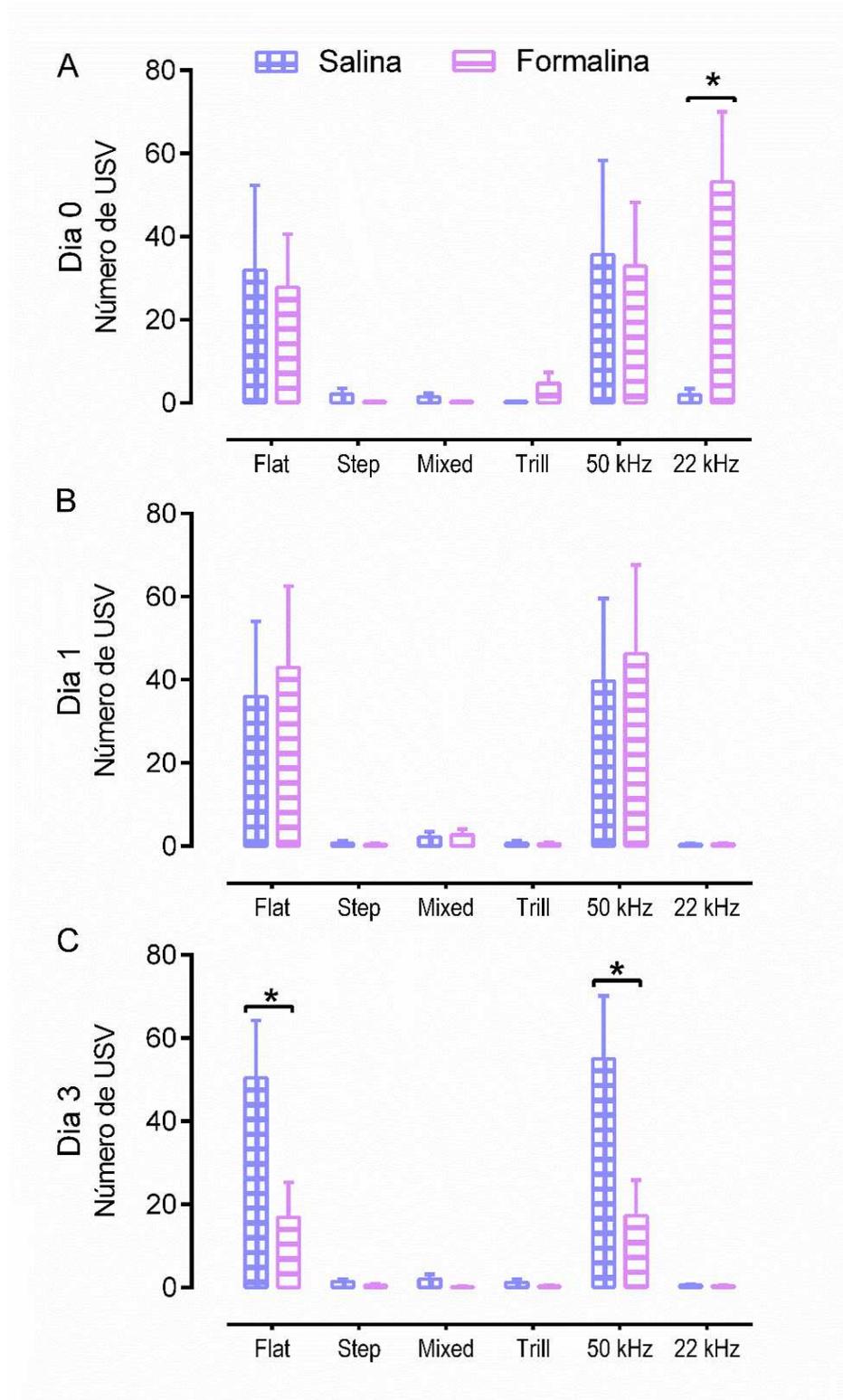


FIGURA 3: CARACTERIZAÇÃO DA EMISSÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS FORMALINA OROFACIAL. A quantificação das vocalizações ultrassônicas (USV) emitidas espontaneamente foi determinada em diferentes períodos de tempo após a administração de salina (50 μ L, s.c.) ou formalina (2,5 %/ 50 μ L, s.c.) no lábio superior direito. (A) Avaliação das emissões imediatamente, (B) um dia e (C) três dias após a administração. O tempo de avaliação foi de 30 minutos (A) e 10 minutos (B e C). Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc de Bonferroni).

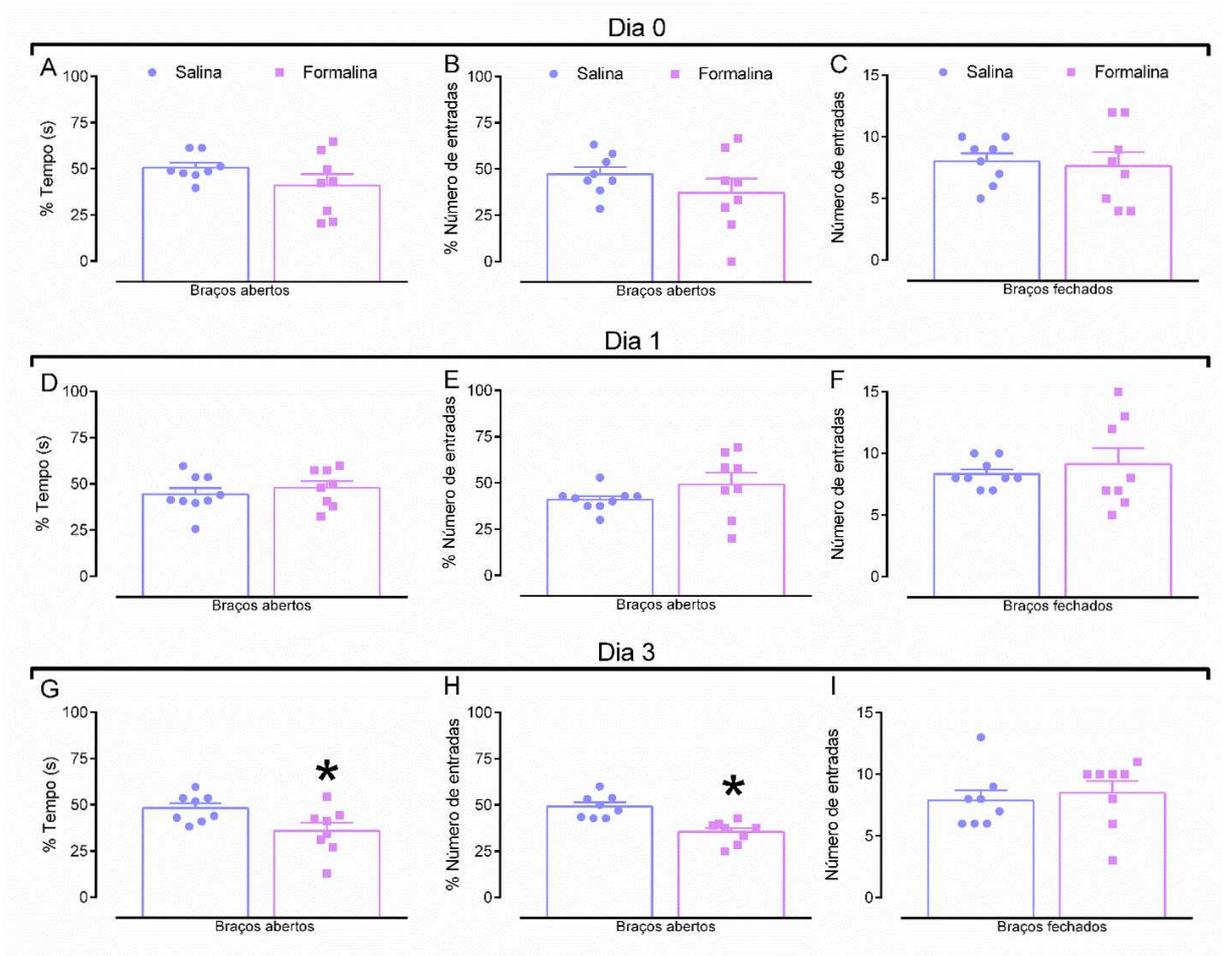


FIGURA 4: COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS A FORMALINA OROFACIAL. O comportamento do tipo ansioso foi avaliado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) em diferentes períodos de tempo após a administração de salina (50 μ L, s.c.) ou formalina (2,5 %/ 50 μ L, s.c.) no lábio superior direito. O tempo de avaliação foi de 5 minutos imediatamente após a colocação do animal no centro do LCE. (A, D e G) Porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos. (B, E e H) Porcentagem do número de entradas nos braços abertos do LCE. (C, F e I) Número de entradas nos braços fechados do LCE para avaliação da atividade locomotora. Todos os parâmetros foram registrados no período imediato (A, B e C), dia 1 (D, E e F) e dia 3 (G, H e I) após a administração da formalina. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo salina (Teste t de Student bicaudal não pareado).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR INCISIONAL PÓS OPERATÓRIA

A dor pós-operatória orofacial, promovida através da incisão da mucosa oral direita dos animais promoveu diversas alterações nos componentes sensoriais e comportamentos afetivos associados a essa condição. É oportuno destacar inicialmente que animais do grupo falso-operado não apresentaram alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados (Figuras 5, 6 e 7).

Uma alteração sensorial observada após a incisão intraoral foi a hiperalgesia a estímulos mecânicos e térmicos, com mudança significativa da resposta a partir do primeiro dia após a incisão. Com relação à estimulação mecânica, os animais do grupo falso-operado mantiveram o limiar mecânico constante ao longo dos 7 dias avaliados, entretanto a incisão na mucosa oral induziu uma redução do mesmo nos dias 1, 3 e 5 após a cirurgia, ou seja hiperalgesia mecânica (Figura 5A). Com relação à estimulação térmica ao calor, os animais do grupo falso-operado não sofreram alteração na latência para a resposta frente ao calor nocivo durante os 5 dias avaliados, enquanto que o grupo operado mostrou uma diminuição da resposta nos dias 1 e 3 após a incisão, ou seja hiperalgesia ao calor (Figura 5B). A incisão da mucosa oral também induziu o aumento do *grooming* facial, uma alteração sensorial sem estimulação aguda adicional sugestiva de comportamento nociceptivo espontâneo. Esse comportamento foi avaliado no dia 0 (i.e. medida basal), e nos dias 1, 3 e 5 após incisão intraoral, sendo que o grupo que foi submetido a incisão intraoral apresentou um aumento significativo da resposta apenas no dia 3 após a cirurgia quando comparado com o grupo falso-operado (Figura 5C).

A análise da emissão de USV revelou que no primeiro dia após a incisão intraoral os ratos do grupo controle emitiram apenas vocalizações de 50 kHz. Entretanto, os ratos do grupo operado apresentaram uma redução na emissão do número total de 50 kHz, bem como foram observadas algumas USV de 22 kHz, sem diferença estatística com o grupo falso-operado (Figura 6A). Da mesma forma, no terceiro dia após a cirurgia, os animais operados apresentaram uma redução das USV de 50 kHz totais e do subtipo *flat*, sem emissão de 22 kHz (Figura 6B). Diferentemente, no quinto dia após a incisão as USV observadas foram semelhantes em ambos os grupos experimentais (Figura 6C).

Outro parâmetro associado a dor afetiva avaliado foi o comportamento do tipo ansioso. No terceiro dia após a incisão intraoral, os ratos operados apresentaram uma redução da porcentagem do tempo permanecido nos braços abertos (Figura 7A), bem como do número de entradas nos braços abertos (Figura 7B) do LCE. A atividade locomotora foi determinada pelo número de entradas nos braços fechados do LCE, e os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 7C).

Tendo em vista os resultados descritos acima, foi estabelecido o dia 3 após a incisão para a realização dos experimentos subsequentes.

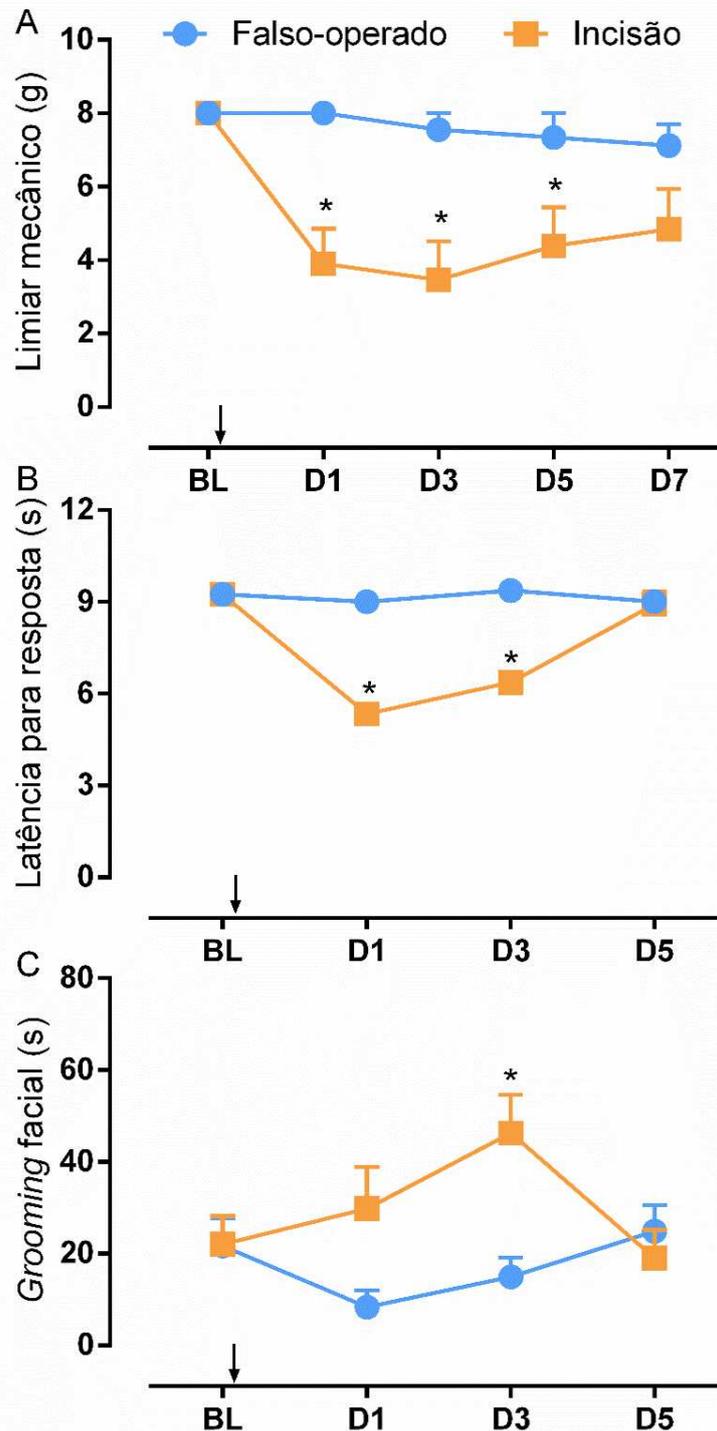


FIGURA 5: DECURSO TEMPORAL DE ALTERAÇÕES SENSORIAIS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. As avaliações da resposta a estimulação mecânica e térmica por calor, bem como do *grooming* facial espontâneo foram realizadas antes (basal, BL) e nos dias consecutivos e alternados (D1, D3, D5 e D7) após a incisão da mucosa oral ou falso-operado. (A) Decurso temporal da avaliação do limiar mecânico frente à aplicação do lado ipsilateral dos filamentos de Von Frey. (B) Decurso temporal da avaliação da latência para resposta após a aproximação do lado ipsilateral de uma fonte de calor radiante. (C) Decurso temporal da avaliação do comportamento de *grooming* espontâneo. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 9-12 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de post hoc de Bonferroni). A seta indica o momento da incisão da mucosa oral.

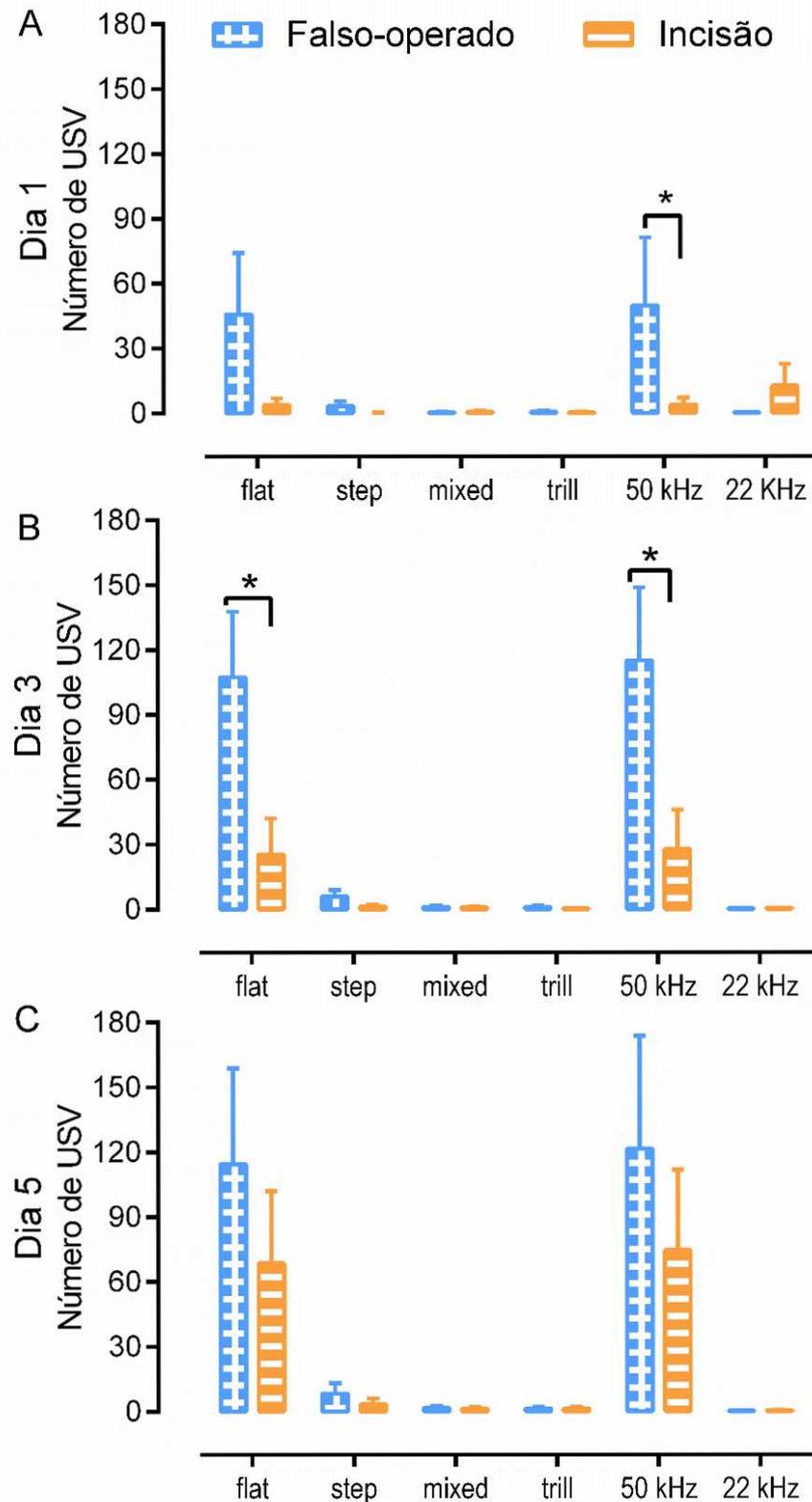


FIGURA 6: CARACTERIZAÇÃO DA EMISSÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. A quantificação das vocalizações ultrassônicas (USV) emitidas espontaneamente foi determinada em dias consecutivos e alternados após a incisão da mucosa oral ou falso-operado. (A) Um dia, (B) três dias e (C) cinco dias após cirurgia. O tempo de avaliação foi de 10 minutos imediatamente após colocação do animal na caixa de gravação. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 6-8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc Bonferroni).

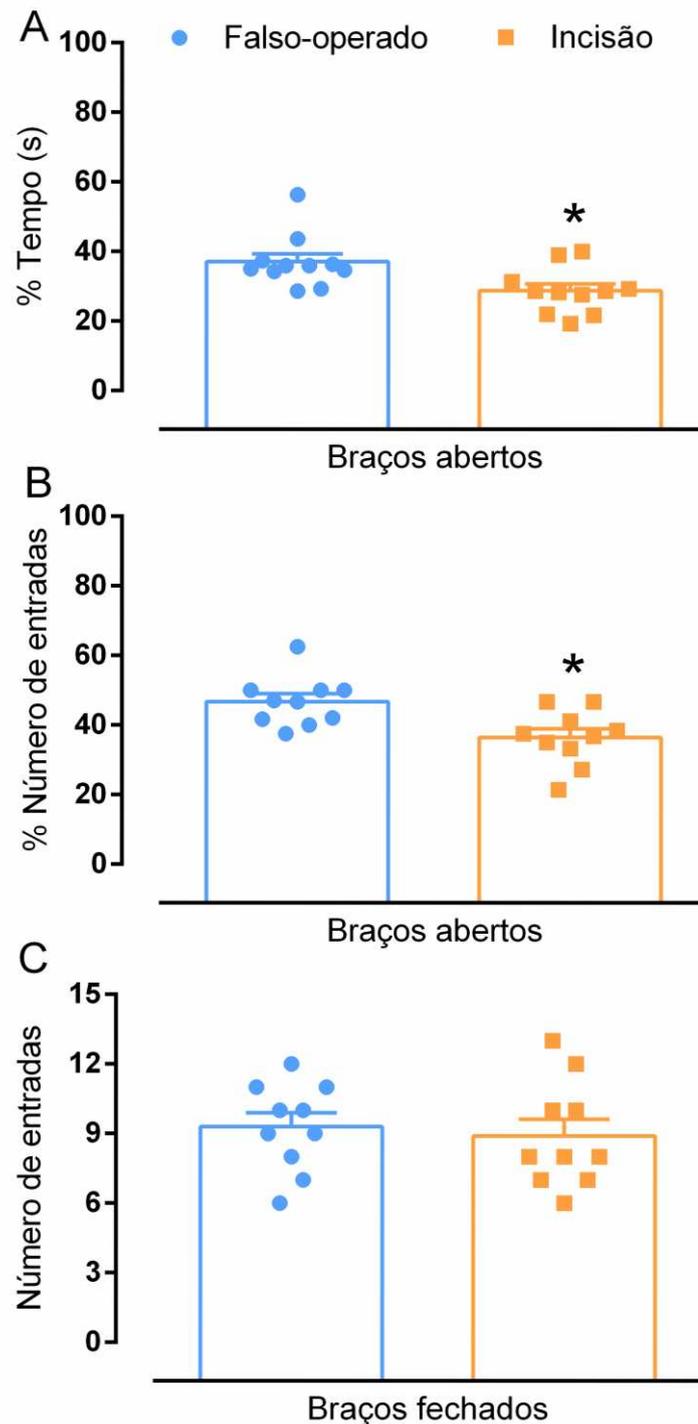


FIGURA 7: COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. O comportamento do tipo ansioso foi avaliado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) no terceiro dia após a incisão da mucosa oral ou falso-operado. O tempo de avaliação foi de 5 minutos imediatamente após a colocação do animal no centro do LCE. (A) Porcentagem do tempo de permanência. (B) Porcentagem do número de entradas nos braços abertos do LCE. (C) Número de entradas nos braços fechados do LCE para avaliação da atividade locomotora. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 10 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (Teste t de Student bicaudal não pareado).

4.3 EFEITO DA MORFINA NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA

Todas as avaliações foram realizadas no terceiro dia após a incisão da mucosa oral. É pertinente ressaltar que os animais do grupo falso-operado e o veículo utilizado (salina 1 mL/Kg; s.c.), não apresentaram alterações significativas em nenhuma das respostas comportamentais avaliadas (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Com relação ao estímulo térmico por calor, os ratos do grupo falso-operado apresentaram uma latência para a resposta estável na exposição ao calor, no entanto os animais operados demonstraram uma redução na resposta que permaneceu durante as 6 horas avaliadas no tratamento com salina (1 mL/Kg; s.c.). Por outro lado, o pré-tratamento com morfina (2,5 mg/Kg; s.c.) foi capaz de aumentar a latência de resposta à estimulação térmica aos 30 minutos e permaneceu aumentada significativamente durante 1 hora após a injeção (Figura 8A). Da mesma forma, na estimulação mecânica os animais do grupo falso-operado apresentaram elevado limiar de resposta ao estímulo mecânico que foi significativamente diminuído no grupo incisão tratado com salina, contudo o pré-tratamento com morfina incrementou o limiar mecânico aos 30 minutos e permaneceu significativamente elevado durante 1 hora após a injeção (Figura 8B).

O teste de CPP permitiu verificar a presença de dor espontânea no modelo de dor pós-operatória através do tratamento sistêmico com morfina (2,5 mg/Kg; s.c.; 30 min). Para isto, com base nos experimentos anteriores, foi definido o início do pareamento com morfina após 30 minutos da administração. Cabe destacar que os animais de ambos os grupos apresentaram tempo similar de permanência inicial nas duas câmeras do aparato, indicando a inexistência de preferência prévia (i.e. na medida basal; Figura 9B). Após o condicionamento com morfina, os animais do grupo submetido à incisão apresentaram aumento do tempo de permanência na câmara pareada com a droga no dia do teste em comparação com o dia do pré-condicionamento (Figura 9A). Adicionalmente, os animais que sofreram cirurgia de incisão intraoral apresentaram um incremento do tempo de permanência na câmara pareada com morfina em relação a câmara pareada com salina (Figura 9B). É importante ressaltar que os animais do grupo falso-operado não apresentaram diferenças significativas, no tempo dispendido na câmara (Figuras 9A e 9B).

Outro parâmetro avaliado foi o comportamento do tipo ansioso, comportamento este associado à dor afetiva. Os animais operados apresentaram uma redução da porcentagem do tempo de permanência (Figura 10A) e do número de entradas (Figura 10B) nos braços abertos do LCE quando comparados com os animais falso-operado, indicando a presença do comportamento do tipo ansioso 3 dias após incisão da mucosa oral. O tratamento com morfina (2,5 mg/Kg; s.c.) promoveu um aumento significativo da porcentagem tempo permanecido nos braços abertos (Figura 10A), no entanto não alterou a porcentagem do número de entradas nos braços abertos do LCE. A atividade locomotora, avaliada pelo número de entradas nos braços fechados do LCE, foi similar nos grupos falso-operado e incisão, e adicionalmente, o tratamento com morfina não promoveu alteração da atividade locomotora (Figura 10C).

Outro comportamento associado à dor afetiva que foi avaliado foram as vocalizações ultrassônicas. No tratamento com salina (1 mL/Kg; s.c.) os animais falso-operado emitiram USV de 50 kHz, especialmente do tipo *flat*, entretanto a incisão produziu uma redução no total de 50 kHz e das *flat* (Figura 11). O tratamento com morfina (2,5 mg/Kg; s.c.) promoveu uma importante redução das USV tanto no grupo falso-operado quanto no grupo operado, apesar disso, não alterou significativamente os subtipos de 50 kHz emitidos (Figura 11).

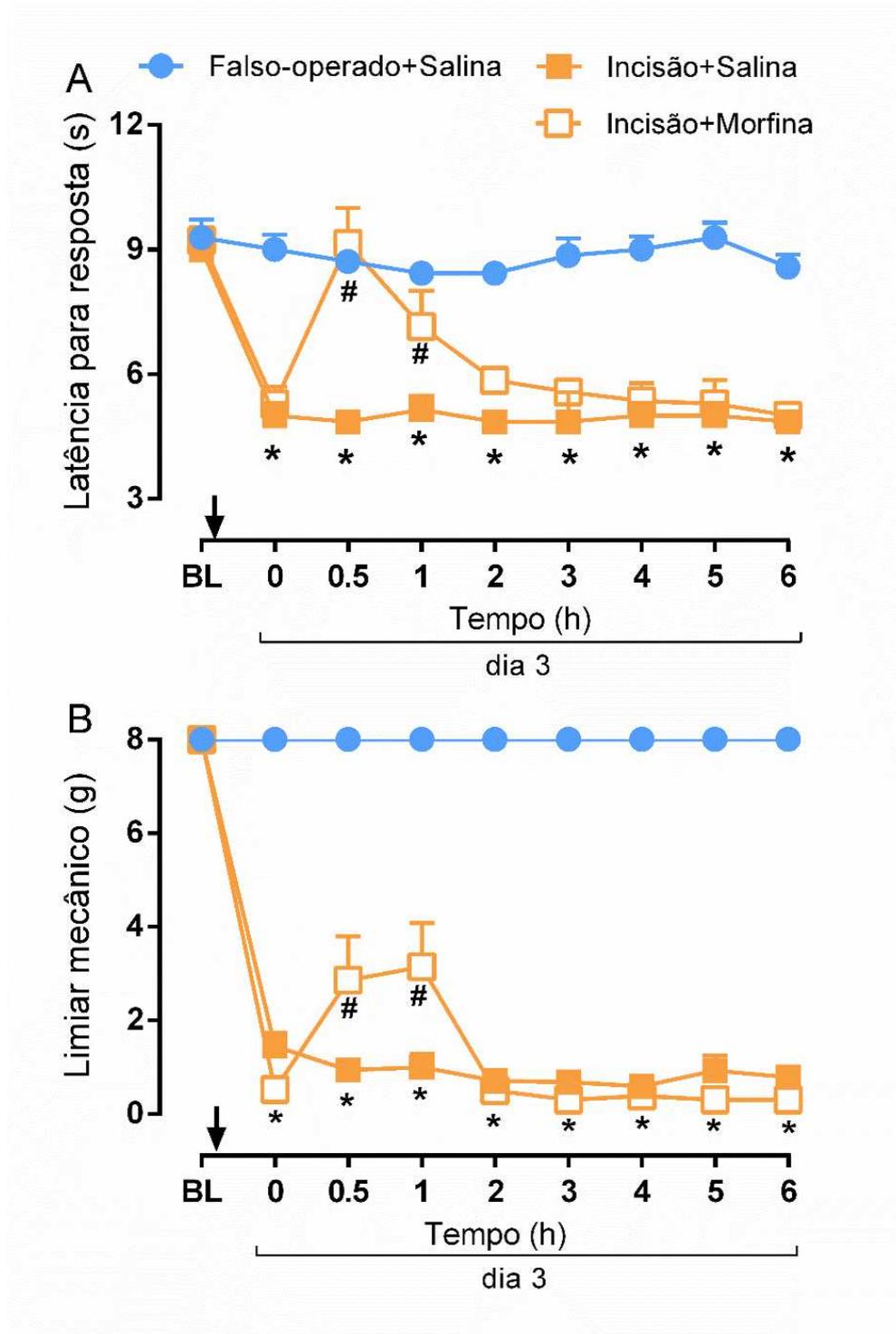


FIGURA 8: EFEITO DA MORFINA NA HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. A medida basal (BL) ao estímulo térmico ou mecânico foi determinada antes da incisão da mucosa oral ou falso-operado. No terceiro dia após a cirurgia foi comprovado o desenvolvimento de hiperalgesia (tempo 0) e seguidamente foi administrada salina (1 mL/Kg; s.c.) ou morfina (2,5 mg/Kg; s.c.) para avaliação do efeito antinociceptivo. (A) Decurso temporal da avaliação da latência para resposta após a aproximação do lado ipsilateral de uma fonte de calor radiante. (B) Decurso temporal da avaliação do limiar mecânico frente à aplicação do lado ipsilateral dos filamentos de Von Frey. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de post hoc de Bonferroni). A seta indica o momento da incisão intraoral.

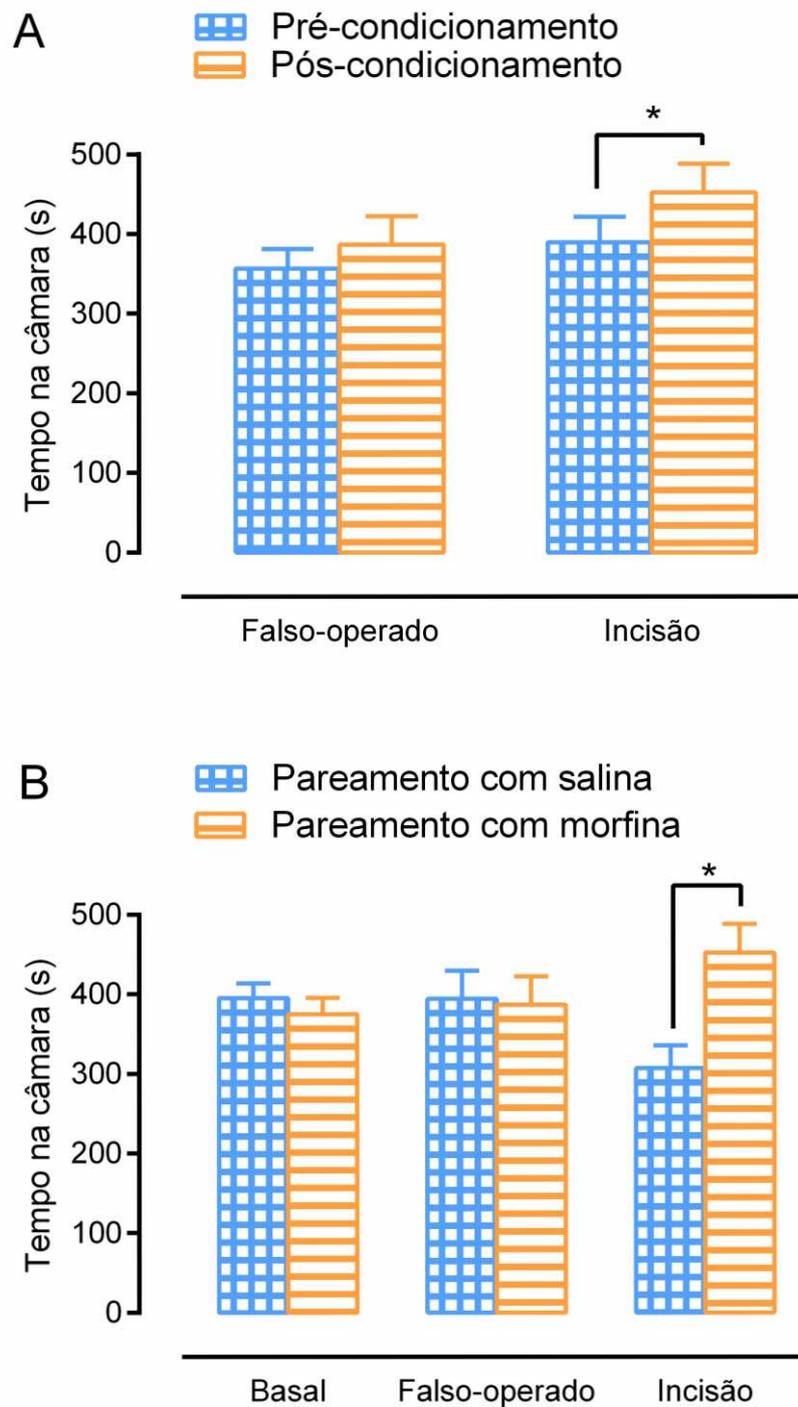


FIGURA 9: TESTE DE PREFERÊNCIA CONDICIONADA AO LUGAR APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. No dia seguinte a incisão intraoral ou falso-operado, os animais foram submetidos ao teste de preferência condicionada ao lugar (CPP). No dia 1 após a cirurgia foi realizado o pré-condicionamento para determinação da medida basal, no dia 2 foi realizado o pareamento com salina (1 mL/Kg; s.c.; 30 minutos) de manhã e morfina (2,5 mg/Kg; s.c.; 30 minutos) à tarde, e no dia 3 foi realizado o teste. (A) Avaliação do tempo de permanência apresentado na mesma câmara antes e após o pareamento com morfina. (B) Tempo de permanência apresentado por grupo experimental antes (basal) e após o pareamento. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 13-16 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de post hoc de Bonferroni).

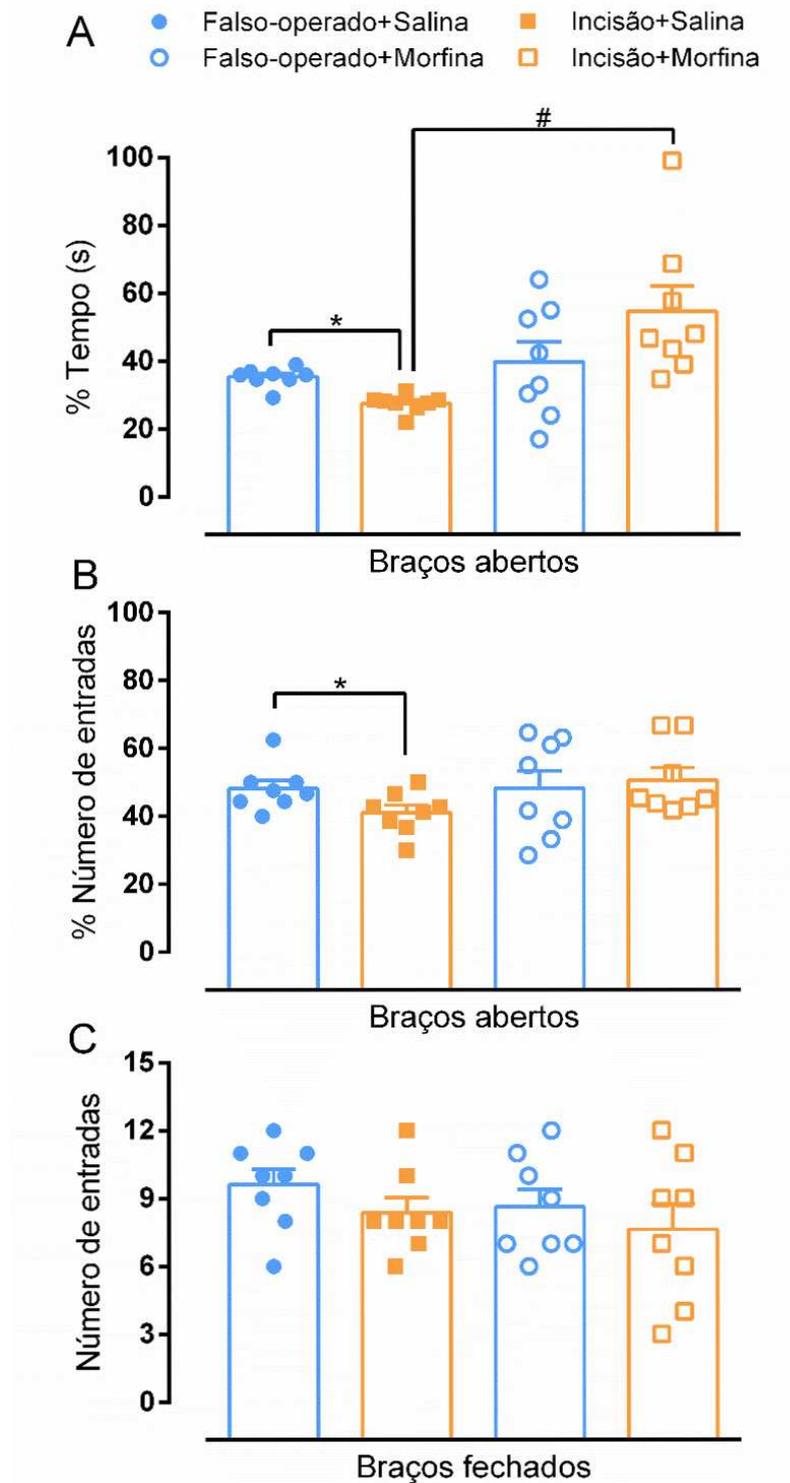


FIGURA 10: EFEITO DA MORFINA NO COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. O comportamento do tipo ansioso foi avaliado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) no terceiro dia após a incisão da mucosa oral ou falso-operado. O tempo de avaliação iniciou 30 minutos após a administração de salina (1 mL/Kg; s.c.) ou morfina (2.5 mg/Kg; s.c.) com duração de 5 minutos. (A) Porcentagem do tempo de permanência. (B) Porcentagem do número de entradas nos braços abertos do LCE. (C) Número de entradas nos braços fechados do LCE para avaliação da atividade locomotora. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado, e # indica $P < 0,05$ versus o grupo falso-operado tratado com morfina (ANOVA de uma via seguida do teste de post hoc de Bonferroni).

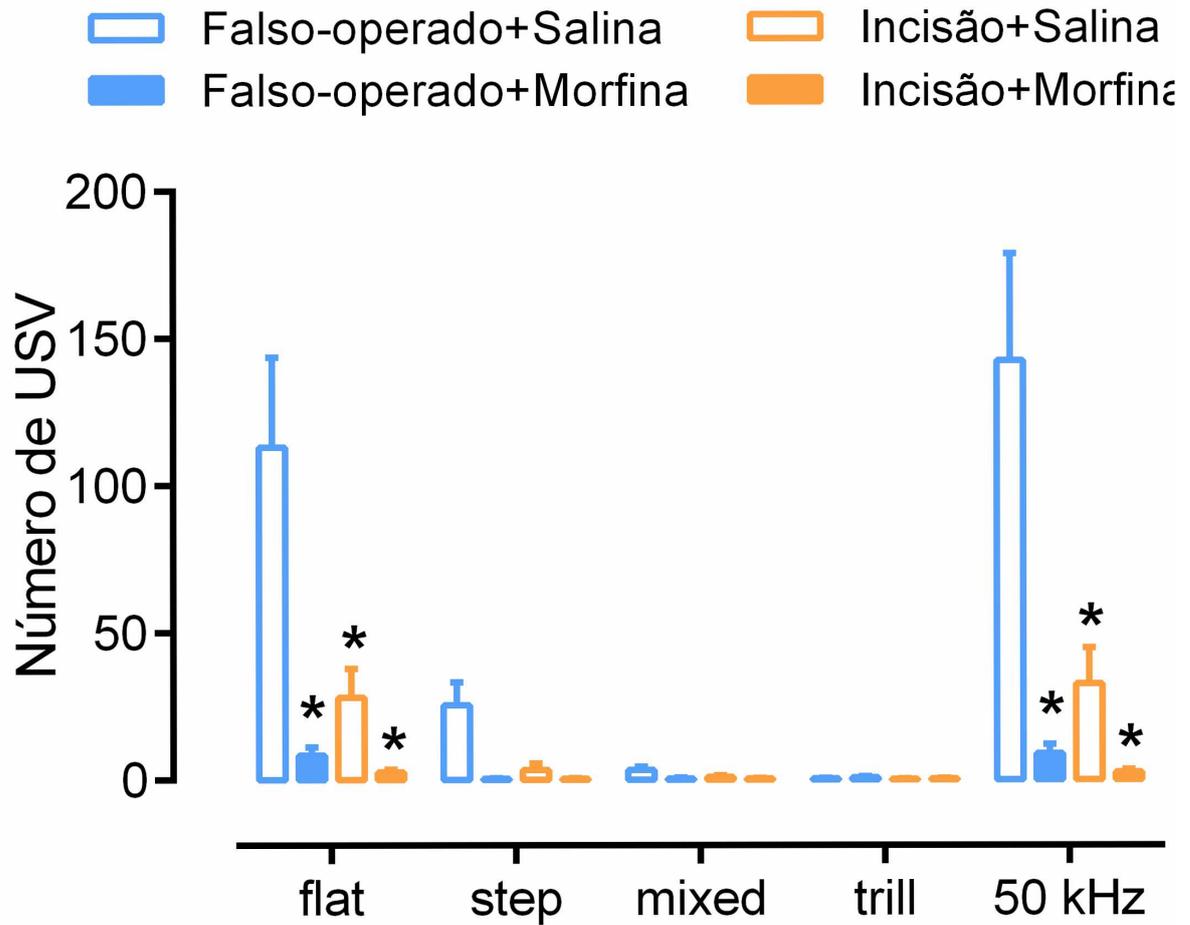


FIGURA 11: EFEITO DA MORFINA NAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS INCISÃO DE MUCOSA ORAL. A quantificação das vocalizações ultrassônicas (USV) emitidas espontaneamente após a administração de salina (1 mL/Kg, s.c.) ou morfina (2,5 mg/Kg, s.c.) foi determinada no terceiro dia após a incisão de mucosa oral ou grupo falso-operado. O início do teste começou após 15 minutos da administração da droga e o tempo de avaliação foi de 10 minutos. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado tratado com salina (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste de post hoc de Bonferroni).

4.4 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOPAMINÉRGICA MESOLÍMBICA NO MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA

As avaliações foram realizadas no terceiro dia após a incisão da mucosa oral. Os animais falso-operados (salina 1 mg/Kg; s.c.) emitiram USV de 50 kHz e especialmente do tipo *flat*, no entanto, a incisão intraoral produziu uma redução do número total de 50 kHz e das *flat*. Por outro lado, o tratamento com anfetamina (1 mg/Kg; s.c.; ANF) promoveu um importante aumento das USV no grupo operado quando comparado com os grupos falso-operado e incisão tratados com salina, no entanto não houve alteração nos subtipos de 50 kHz observados (Figura 12A). Adicionalmente, a porcentagem dos subtipos emitidos após administração da anfetamina no terceiro dia após a incisão da mucosa oral também foram apresentados através do gráfico circular (Figura 12B). Os animais de grupo falso-operado e tratados com veículo (salina 1 mL/Kg; s.c.), não apresentaram alterações significativas nas respostas comportamentais avaliadas (Figuras 12).

Para avaliação indireta da atividade dopaminérgica no NAc, a expressão da TH foi determinada, através de 3 técnicas diferentes. Inicialmente foi utilizada a técnica de RT-PCR em tempo real, na qual a expressão de RNA mensageiro da enzima TH, através da estimativa da diferença do Ct, foi semelhante em ambos os grupos experimentais (Figura 13B). Outra técnica utilizada foi o Western Blot, que revelou uma redução da expressão proteica da TH no NAc dos animais que sofreram a incisão em comparação com os animais do grupo falso-operado (Figura 14A e 14B). Finalmente, a expressão da TH foi determinada através da técnica de imunohistoquímica, na qual foi quantificada a intensidade de fluorescência da imunocoloração referente às fibras dopaminérgicas expressas no NAc *shell*. O resultado revelou uma redução da imunofluorescência do grupo incisão quando comparado com o grupo controle (Figura 15A e 15B).

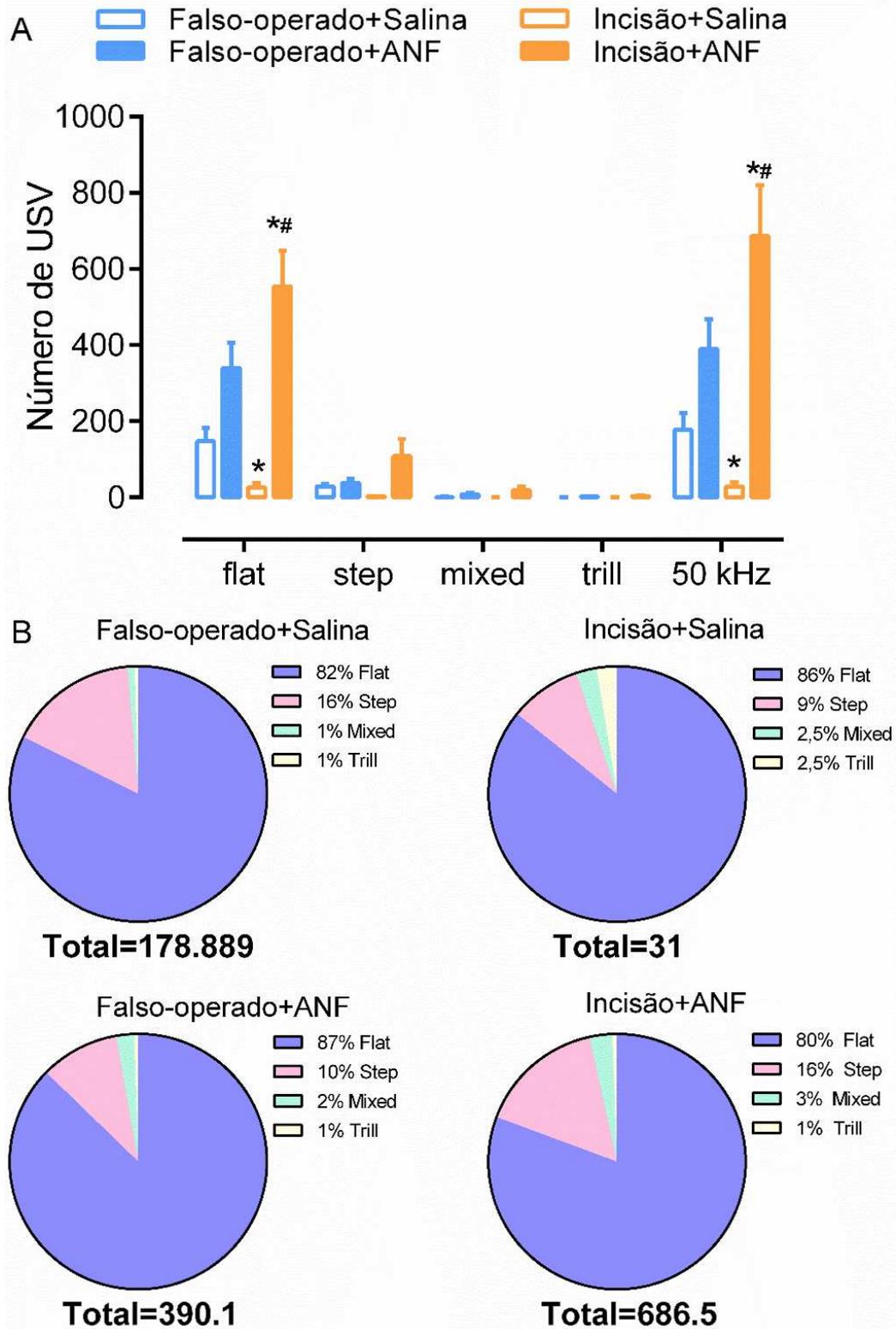


FIGURA 12: EFEITO DA ANFETAMINA NAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS INCISÃO DE MUCOSA ORAL. A quantificação das vocalizações ultrassônicas (USV) emitidas espontaneamente após a administração de salina (1 mL/Kg, s.c.) ou anfetamina (1 mg/Kg; s.c.; ANF.) foi determinada no terceiro dia após a incisão de mucosa oral ou falso-operado. O início do teste começou após 15 minutos da administração da droga e o tempo de avaliação foi de 10 minutos. (A) Número de USV emitidas. (B) Porcentagem dos subtipos de USV de 50 kHz emitidos, sendo a totalização apresentada abaixo de cada gráfico. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 9-10 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado tratado com salina, e # indica $P < 0,05$, versus grupo incisão tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc de Bonferroni).

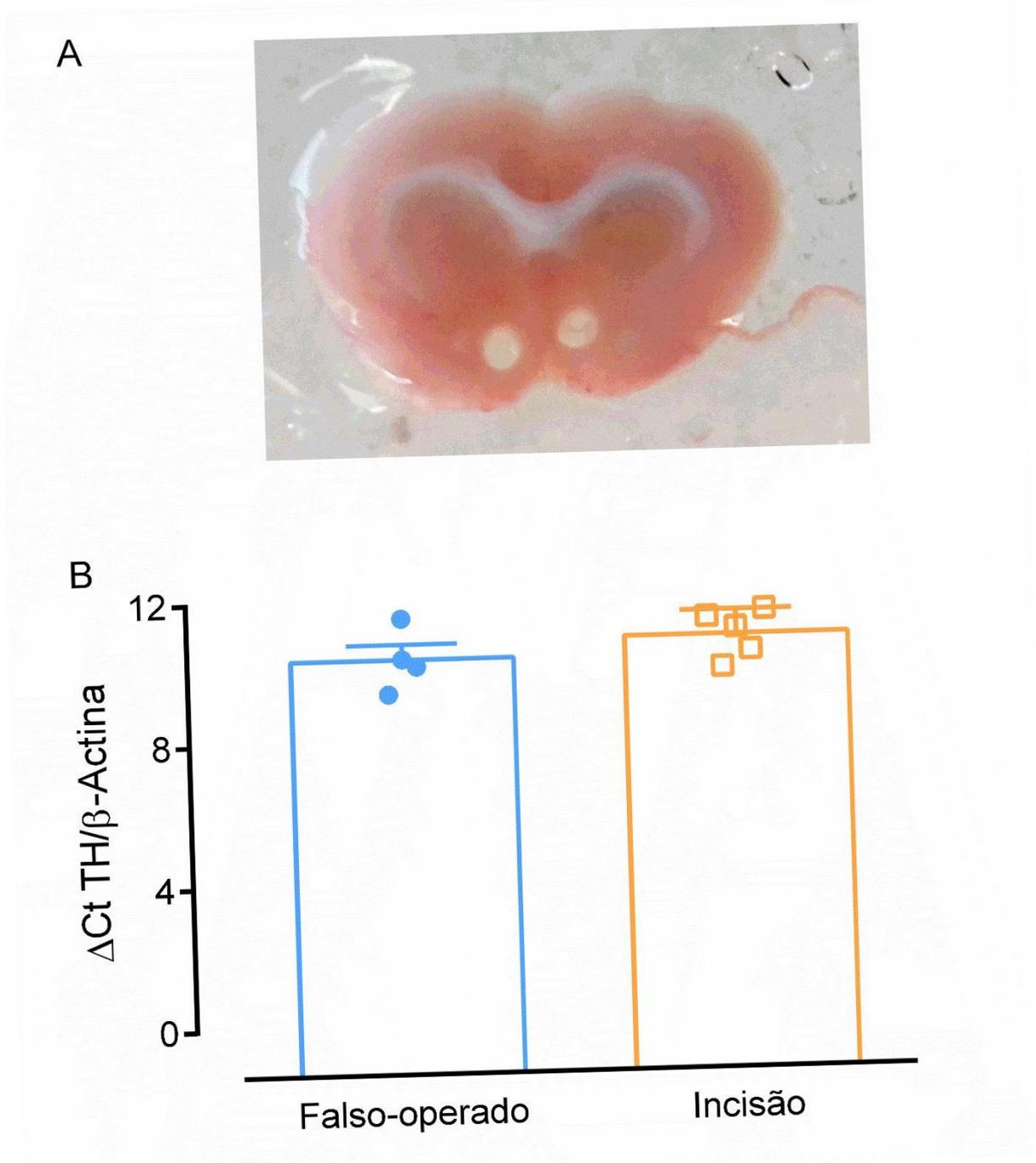


FIGURA 13: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR) PARA TIROSINA HIDROXILASE APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. Os núcleos accumbens (NAc) de animais no terceiro dia após incisão da mucosa oral ou falso-operado, foram removidos e processados para RT-PCR. A expressão de tirosina hidroxilase (TH) foi determinada pela quantificação do seu RNA mensageiro. (A) Imagem ilustrativa do tecido coletado ipsi e contralateral do núcleo accumbens (NAc). (B) Diferença do ciclo de limiar (Ct) de RNA mensageiro da TH expresso no NAc. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 4 animais. Não foi detectada diferença significativa entre os dois grupos (Teste t de Student bicaudal não pareado; $P > 0,05$).

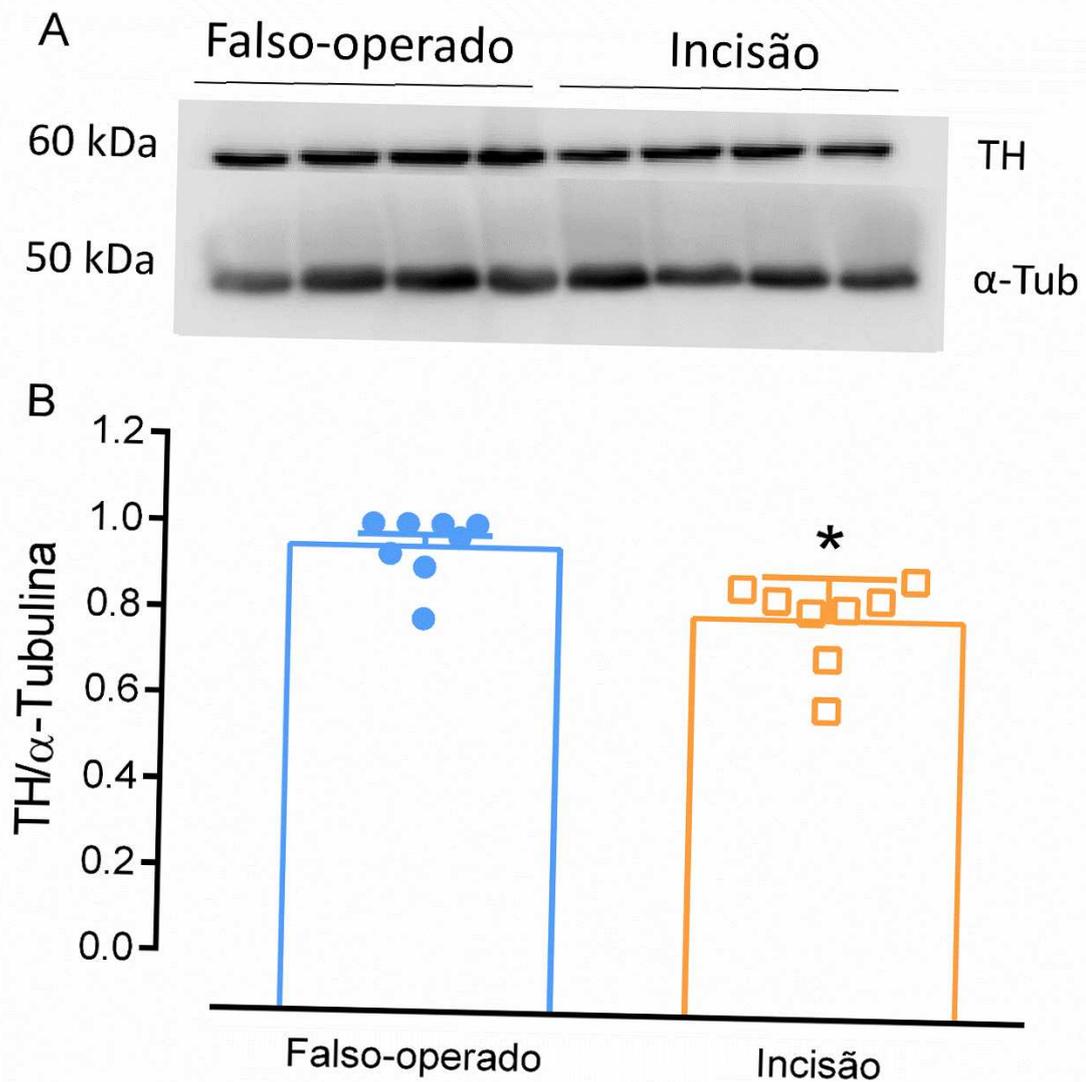


FIGURA 14: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. Os núcleos accumbens (NAc) de animais no terceiro dia após incisão da mucosa oral ou falso-operado, foram removidos e processados para Western Blot. (A) Imagem demonstrativa da transferência da corrida do gel por eletroforese. (B) Níveis de expressão de tirosina hidroxilase (TH) em relação ao controle (α -tubulina) nos NAc processados. A quantificação da intensidade dos sinais das bandas foi determinada por densitometria utilizando o software Image J. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (Teste t de Student bicaudal não pareado).

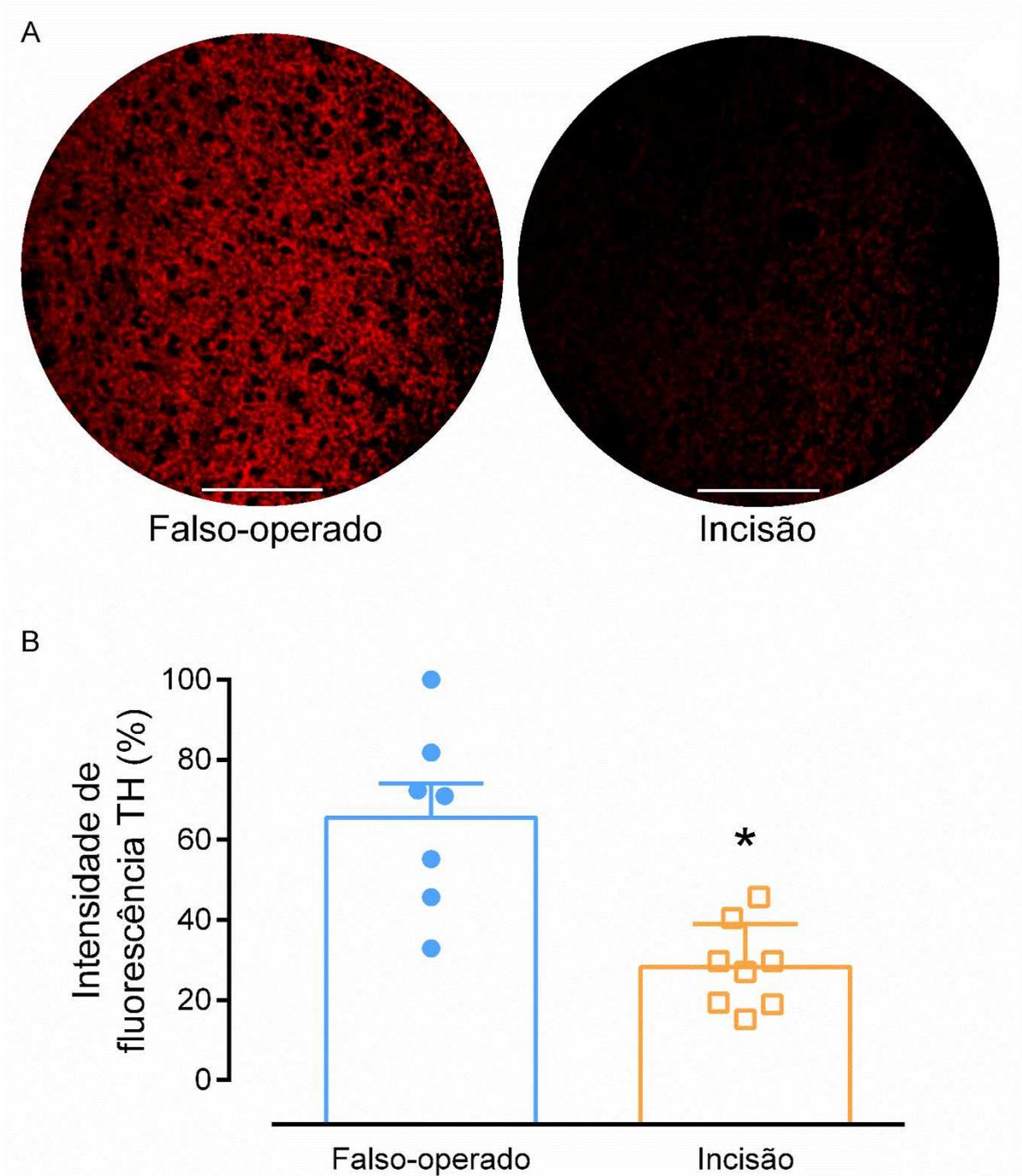


FIGURA 15: EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE EM FIBRAS DOPAMINÉRGICAS NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. Os núcleos accumbens (NAc) de animais no terceiro dia após incisão da mucosa oral ou falso-operado, foram removidos e processados para imunohistoquímica. As imagens foram visualizadas por microscopia confocal. (A) Visualização de uma imagem ilustrativa do NAc *shell* do lado ipsilateral de um animal de grupo falso-operado e do grupo incisão. (B). Intensidade de fluorescência da tirosina hidroxilase (TH) expressa nas fibras dopaminérgicas. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7-8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (Teste t de Student bicaudal não pareado). A quantificação da intensidade da fluorescência foi determinada utilizando o software Image J. Aumento de 40x e escala 100 μ m.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL EM ÁREAS CEREBRAIS IMPLICADAS NO PROCESSAMENTO DE DOR ASSOCIADA À INCISÃO DA MUCOSA ORAL

A determinação da expressão de c-Fos por imunohistoquímica serviu para identificar as alterações na ativação neuronal nas áreas cerebrais selecionadas associadas a dor orofacial após a incisão da mucosa oral. É relevante ressaltar que todos os animais, incluindo os do grupo falso-operado, foram estimulados com calor nocivo na região da área de inserção das vibrissas no terceiro dia após a incisão da mucosa oral, entre 1 e 2 horas antes da coleta do tecido.

Os animais do grupo falso-operado apresentaram baixa ativação de neurônios que expressam a proteína c-Fos tanto do lado ipsi quanto contralateral em todas as áreas centrais avaliadas. No entanto, os animais operados demonstraram uma maior ativação desses neurônios de forma ipsilateral no córtex pré-frontal medial (Figura 16A e 17A; CPFm), no núcleo accumbens shell (Figura 16A, 17B e 18; NAc *shell*), na amígdala basolateral (Figura 16C e 17 C; BLA), na amígdala central (Figura 16D e 17D; ACe), na substância cinzenta periaqueductal ventromedial (Figura 16E e 17E; PAG), e no subnúcleo caudal do trigêmeo (Figura 16F e 17F; Vc). Apenas nesta última área o aumento da atividade neuronal foi observado ipsi e contralateralmente.

Adicionalmente, na figura 18 se pode observar que a imunocoloração conjunta no NAc de animais no terceiro dia após a incisão intraoral ou falso-operado, da expressão de c-Fos e TH. Enquanto que as amostras de tecido dos ratos falso-operado apresentaram baixa ativação neuronal e alta expressão de TH, as dos animais do grupo incisão demonstraram alta ativação neuronal e baixa expressão de fibras dopaminérgicas TH-positivas.

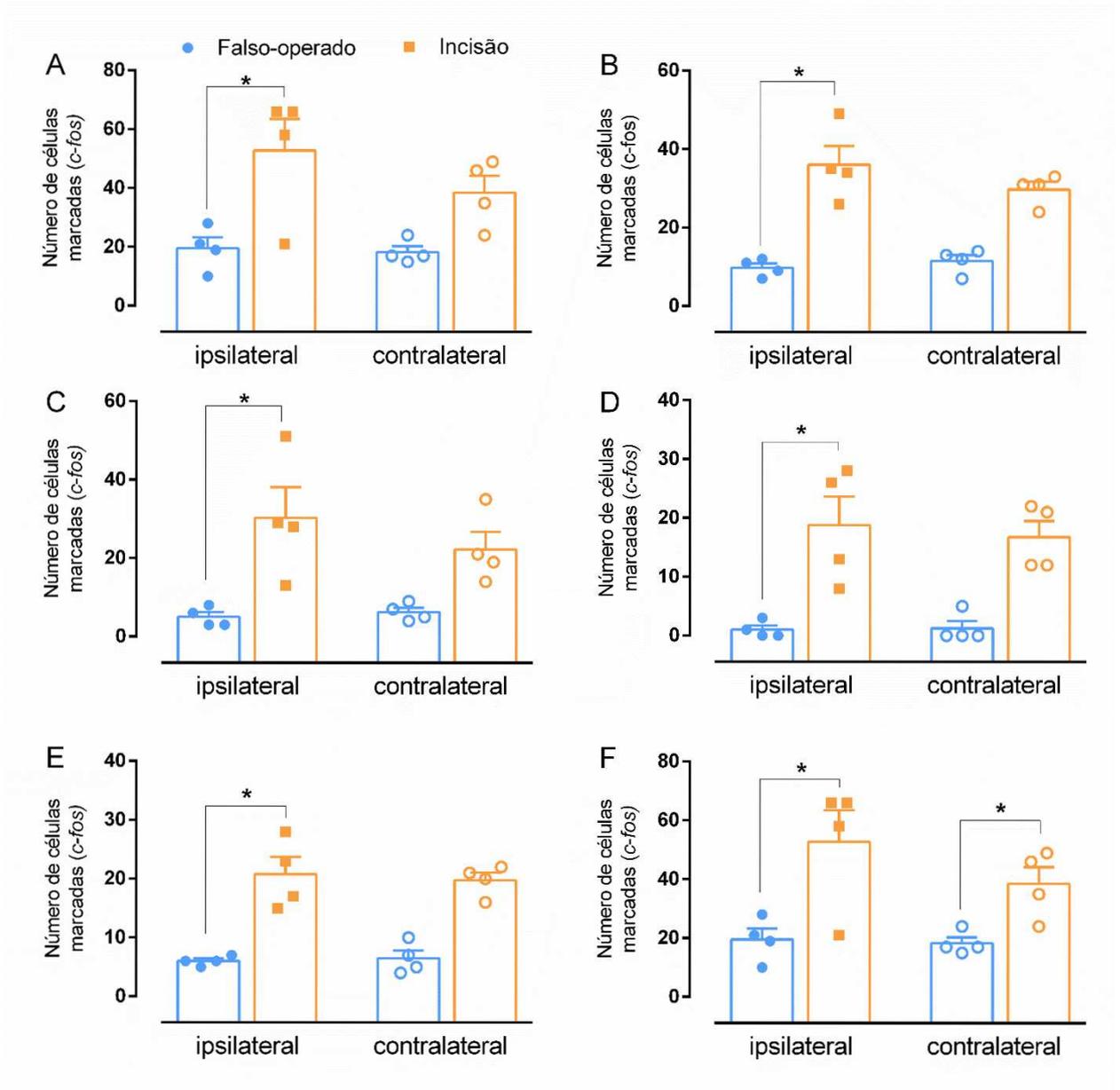


FIGURA 16: EXPRESSÃO DE c-Fos EM ÁREAS CEREBRAIS IMPLICADAS NO PROCESSAMENTO DE DOR APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. As áreas cerebrais de animais no terceiro dia após incisão da mucosa oral ou falso-operado, as quais incluem o córtex pré-frontal medial (A; mPFC), núcleo accumbens shell (B; NAc shell), amígdala basolateral (C; BLA), amígdala central (D; ACE), substância cinzenta periaqueductal (E; PAG), e subnúcleo caudal do trigêmeo (F; Vc), foram removidas e processadas para imunohistoquímica. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 4 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (ANOVA de uma via seguida do teste de post hoc de Bonferroni). A quantificação dos núcleos neuronais que expressam c-Fos foram determinados utilizando o software Image J.

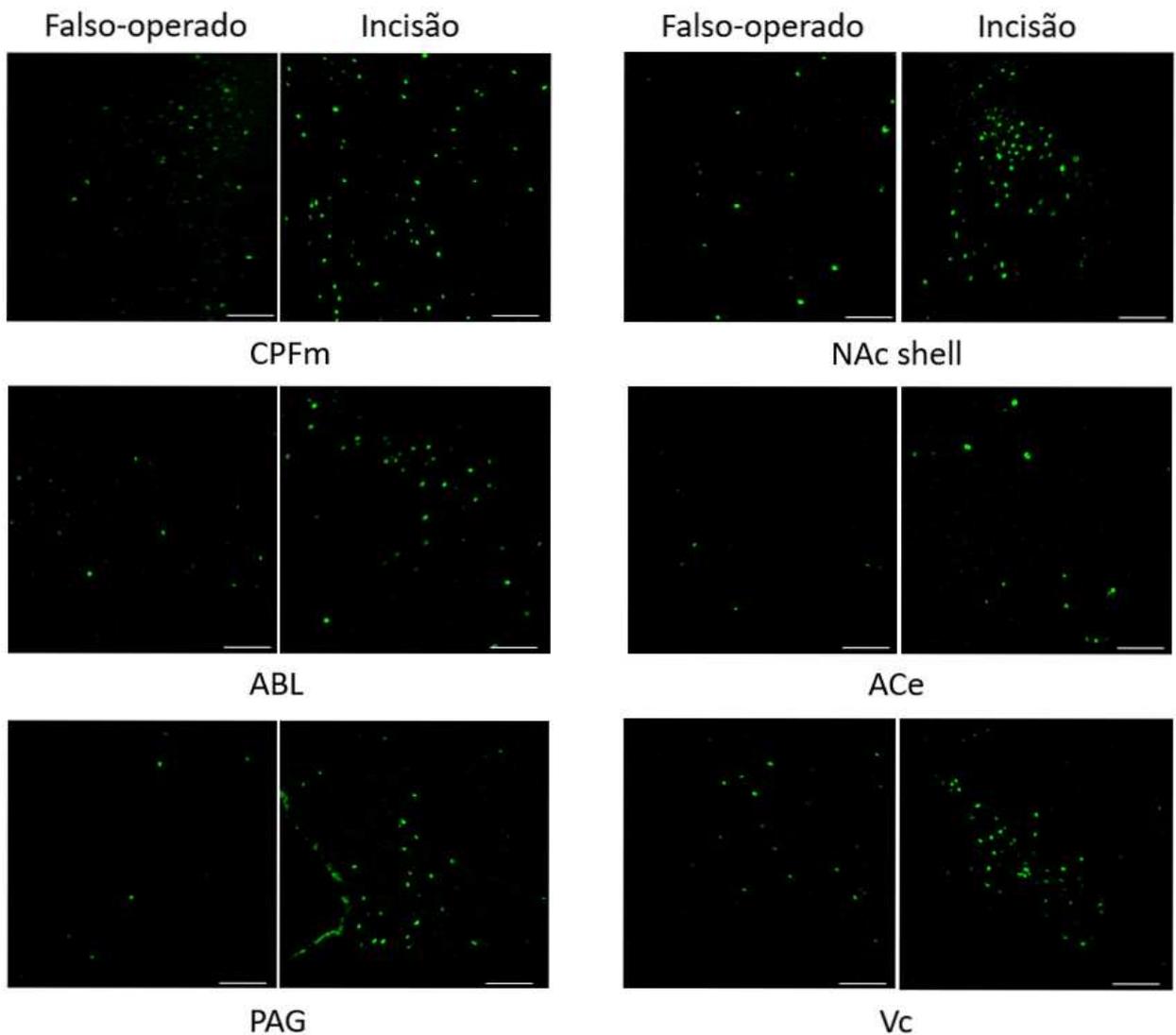


FIGURA 17: IMAGEM ILUSTRATIVA DA EXPRESSÃO DE c-Fos IPSILATERAL NO TERCEIRO DIA APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. As áreas cerebrais de animais no terceiro dia após incisão da mucosa oral ou falso-operado, as quais incluem o córtex pré-frontal medial (A; mPFC), núcleo accumbens *shell* (B; NAc *shell*), amígdala basolateral (C; BLA), amígdala central (D; CeA), substância cinzenta periaqueductal (E; PAG), e subnúcleo caudal do trigêmeo (F; Vc), foram removidas e processadas para imunohistoquímica. As imagens da expressão de c-Fos nos núcleos neuronais foram visualizados do lado ipsilateral com microscopia confocal. Aumento de 40x e escala de 100 μ m.

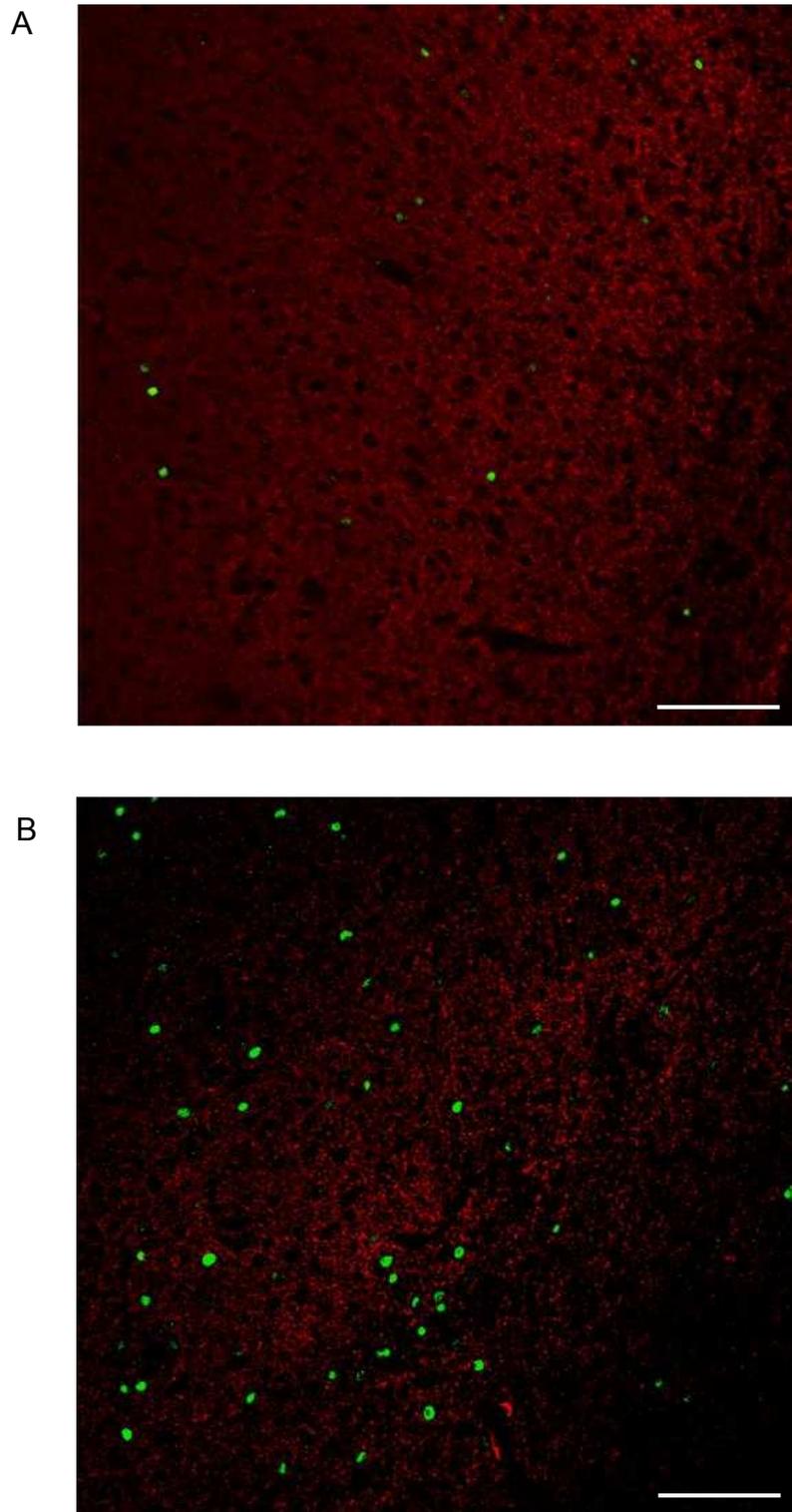


FIGURA 18: IMUNOCOLORAÇÃO CONJUNTA DA EXPRESSÃO DE c-Fos E TIROSINA HIDROXILASE NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL. Os núcleos accumbens (NAc) de animais no terceiro dia após incisão da mucosa oral ou falso-operado, foram removidos e processados para imunohistoquímica. As imagens ilustram a imunocoloração dos núcleos neuronais do NAc do lado ipsilateral que expressam c-Fos (verde) e das fibras dopaminérgicas que expressam tirosina hidroxilase (vermelho) em animais falso-operado (A) e incisão (B) foram visualizados com microscopia confocal. Aumento de 40x e escala de 100 μ m.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

A CION resultou em diversas mudanças nos componentes sensoriais e afetivos da dor. É pertinente destacar que os animais do grupo falso-operado não apresentaram alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados (Figuras 19, 20 e 21) e que todos os testes experimentais foram avaliados no décimo quinto dia após a CION.

Na avaliação da reatividade à estimulação mecânica, foi observado que a medida basal da resposta foi similar nos grupos falso-operado e constricto, entretanto no décimo quinto dia após a CION houve uma alteração sensorial observada pela diminuição do limiar mecânico em comparação com os animais controle, indicativa de hiperalgesia mecânica (Figura 19).

Com relação aos parâmetros afetivos, os dados mostram que animais constrictos apresentaram uma redução da porcentagem do tempo de permanência (Figura 20A) e do número de entradas (Figura 20B) nos braços abertos do LCE quando comparados com os animais do grupo falso-operado, indicando a presença do comportamento do tipo ansioso 15 dias após a CION. Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados do LCE foi semelhante em ambos os grupos, indicando ausência de alteração da atividade locomotora (Figura 20C).

Outra modificação do comportamento associado à dor afetiva após CION foi a quantificação de USV. Todos os animais vocalizaram apenas USV de 50 kHz, e primordialmente do subtipo *flat*. Os animais constrictos demonstraram uma importante redução do número total de emissões na frequência de 50 kHz, especialmente do subtipo *flat* (Figura 21).

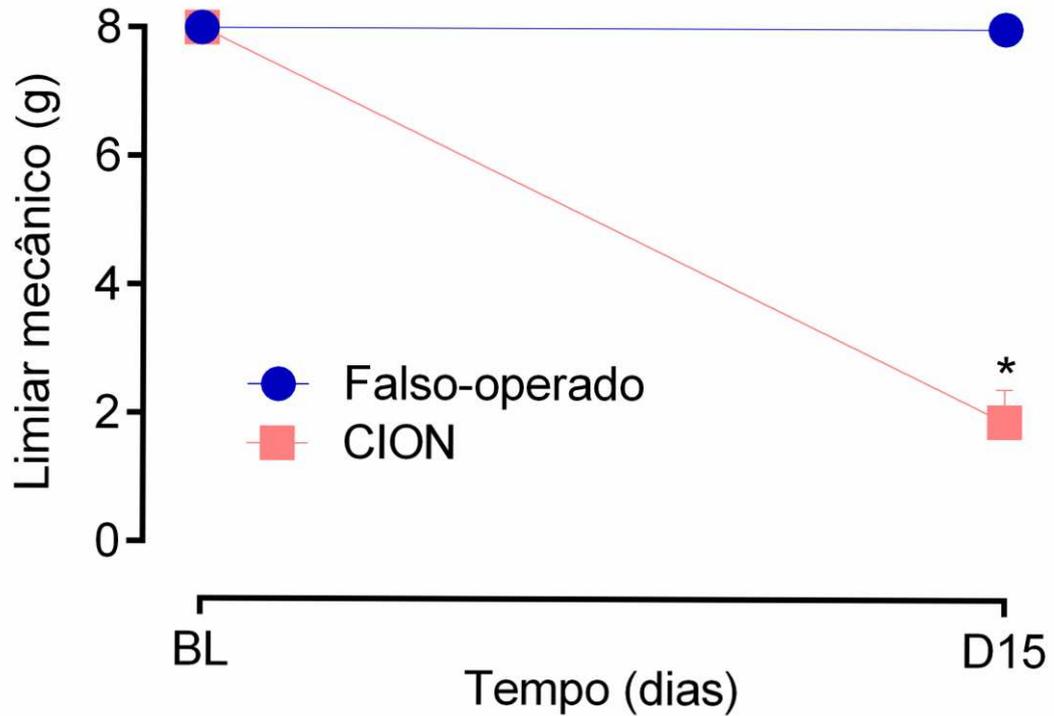


FIGURA 19: HIPERALGESIA MECÂNICA APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. A medida basal (BL) ao estímulo mecânico foi determinada antes da constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado. No décimo quinto dia (D15) após a cirurgia foi comprovado o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica frente à aplicação do lado ipsilateral à CION dos filamentos de Von Frey. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 10 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc de Bonferroni).

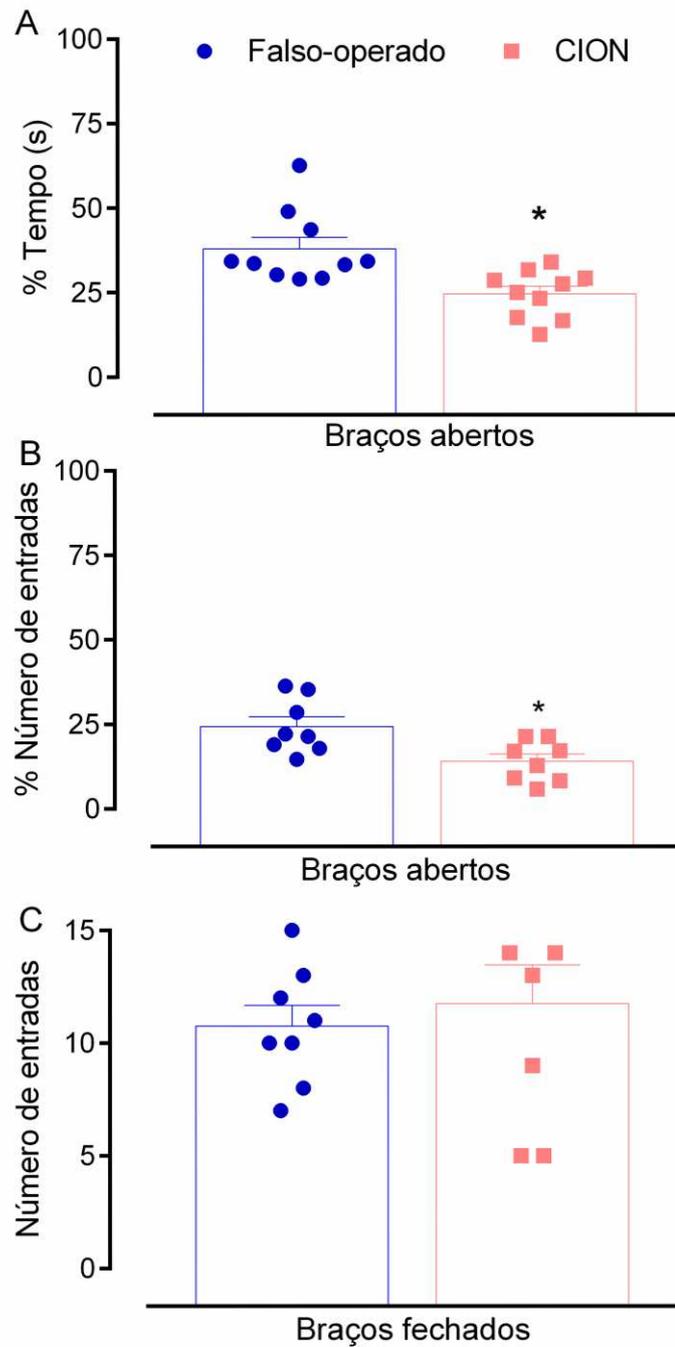


FIGURA 20: COMPORTAMENTO DO TIPO ANSIOSO APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. O comportamento do tipo ansioso foi avaliado no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) no décimo quinto dia após a constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado. O tempo de avaliação foi de 5 minutos imediatamente após a colocação do animal no centro do LCE. (A) Porcentagem do tempo de permanência. (B) Porcentagem do número de entradas nos braços abertos do LCE. (C) Número de entradas nos braços fechados do LCE para avaliação da atividade locomotora. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 10 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (Teste t de Student bicaudal não pareado).

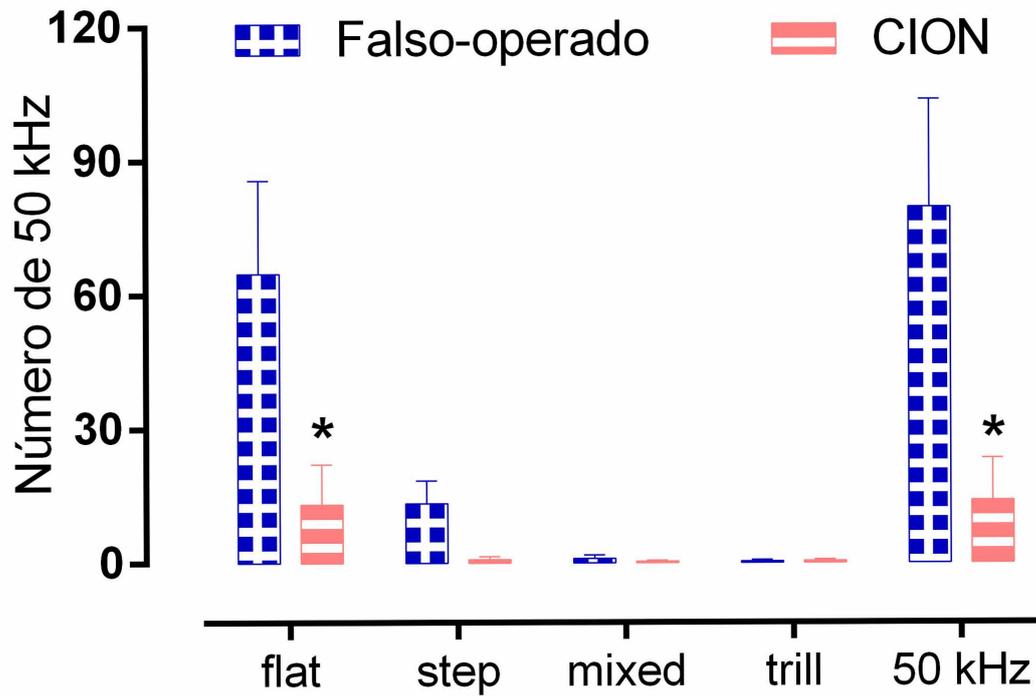


FIGURA 21: VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. A quantificação das vocalizações ultrassônicas (USV) emitidas espontaneamente ocorreu no décimo quinto dia após a constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado. O tempo de avaliação foi de 10 minutos imediatamente após colocação da caixa de gravação. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 7-8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc de Bonferroni).

4.7 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOPAMINÉRGICA MESOLÍMBICA NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

O experimento com anfetamina foi realizado com o intuito de verificar o envolvimento dopaminérgico na emissão de USV associadas a dor neuropática trigeminal, uma vez que o tratamento sistêmico com anfetamina produz um aumento da liberação de dopamina no sistema mesolímbico. O tratamento com anfetamina (1 mg/Kg; s.c.; ANF), no décimo quinto dia após a CION, não alterou significativamente as emissões de USV comparado com o tratamento com veículo (salina 1 mL/Kg; s.c.) nos animais do grupo falso-operado, os quais emitiram USV de 50 kHz e especialmente do tipo *flat*. No entanto a CION promoveu uma redução considerável do número total de 50 kHz e do subtipo *flat* no grupo tratado com veículo (Figura 22). Por outro lado, o tratamento com anfetamina resultou em um importante aumento das emissões de USV no grupo constricto em relação ao grupo falso-operado tratado com veículo (Figura 22A). Apesar disso, a administração de anfetamina não alterou os subtipos de 50 kHz emitidos, que adicionalmente, foram apresentados através do gráfico circular em forma de porcentagem (Figura 22B).

Além disso, a expressão da TH foi determinada no mesmo período, através de 3 técnicas diferentes, para avaliação indireta da atividade dopaminérgica no NAc após a CION. Inicialmente foi utilizada a técnica de RT-PCR em tempo real, na qual a expressão de RNA mensageiro da enzima TH, através da estimativa da diferença do Ct, foi semelhante em ambos os grupos experimentais (Figura 23B). Outra técnica utilizada foi o Western Blot, que revelou uma redução da expressão proteica da TH no NAc dos animais constrictos comparado com os animais falso-operado (Figura 24A e 24B). Finalmente, a expressão da TH foi determinada com a técnica de imunohistoquímica, na qual foi quantificada a intensidade de fluorescência da imunocoloração referente as fibras dopaminérgicas expressas no NAc *shell*. O resultado revelou uma redução da imunofluorescência do grupo CION comparado com o grupo controle (Figura 25A e 25B).

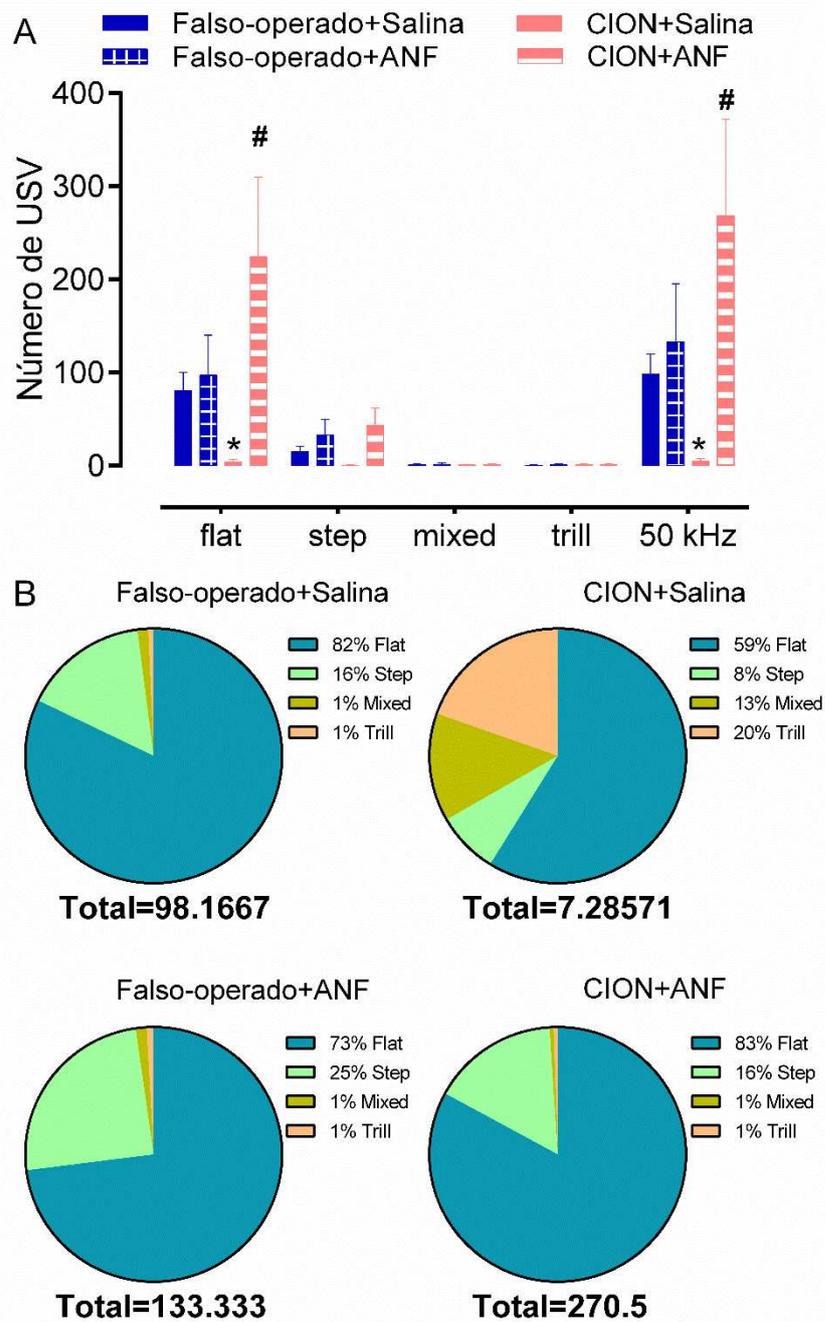


FIGURA 22: EFEITO DA ANFETAMINA NAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. A quantificação das vocalizações ultrassônicas (USV) emitidas espontaneamente após a administração de salina (1 mL/Kg, s.c.) ou anfetamina (1 mg/Kg; s.c.; ANF) foi determinada no décimo quinto dia após a constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado. O início do teste começou após 15 minutos da administração da droga e o tempo de avaliação foi de 10 minutos. (A) Número de USV emitidas. (B) Porcentagem dos subtipos de USV de 50 kHz emitidos, sendo a totalização apresentada abaixo de cada gráfico. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 6-8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado tratado com salina, e # indica $P < 0,05$, versus grupo versus o grupo CION tratado com salina (ANOVA de duas vias seguida do teste de post hoc de Bonferroni).

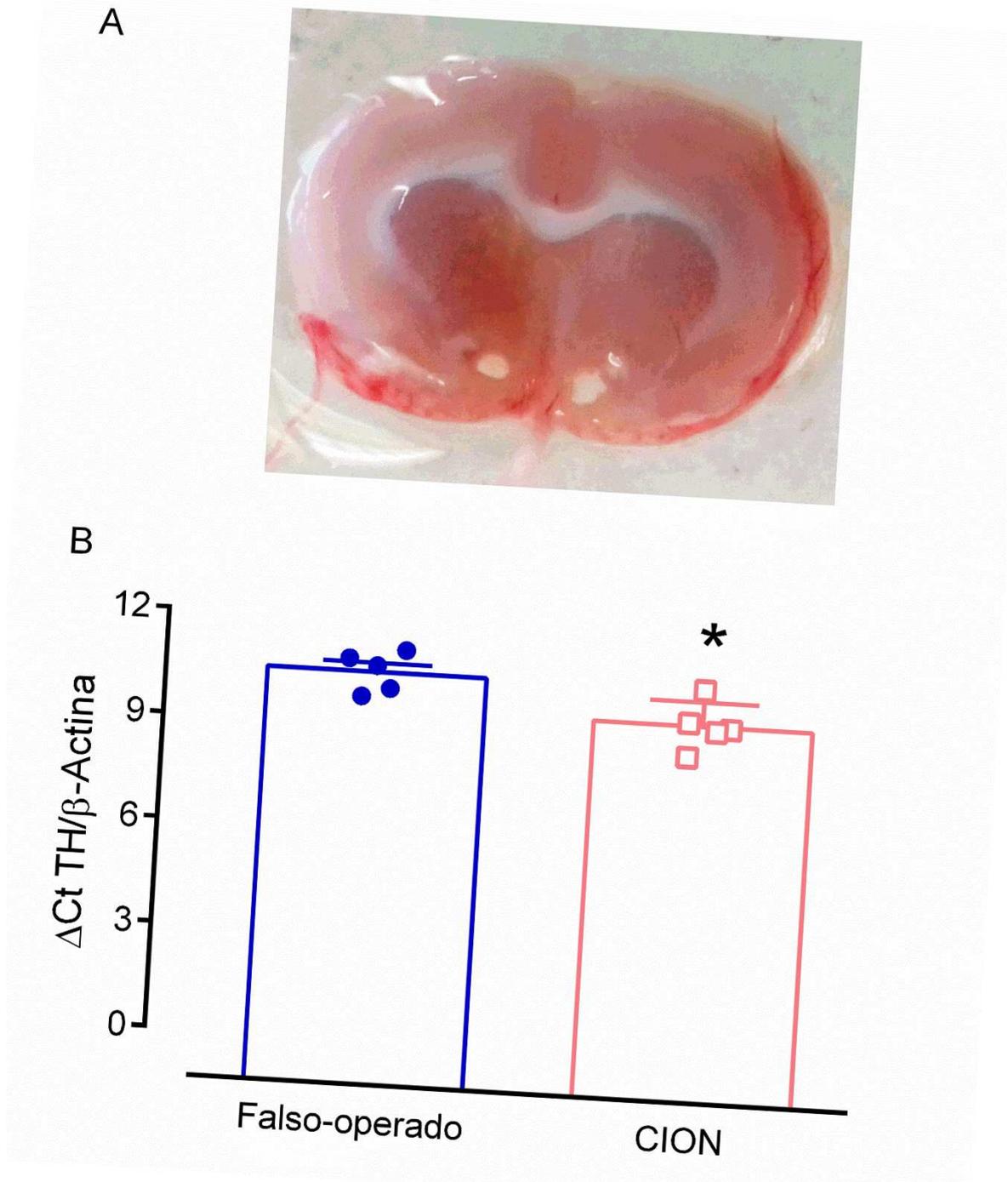


FIGURA 23: REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR) PARA TIROSINA HIDROXILASE APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. Os núcleos accumbens (NAc) de animais no décimo quinto dia após a constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado, foram removidos e processados para RT-PCR. A expressão de tirosina hidroxilase (TH) foi determinada pela quantificação do seu RNA mensageiro. (A) Imagem ilustrativa do tecido coletado ipsi e contralateral do núcleo accumbens (NAc). (B) Diferença do ciclo de limiar (Ct) de RNA mensageiro da TH expresso no NAc. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 5 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (Teste t de Student bicaudal não pareado).

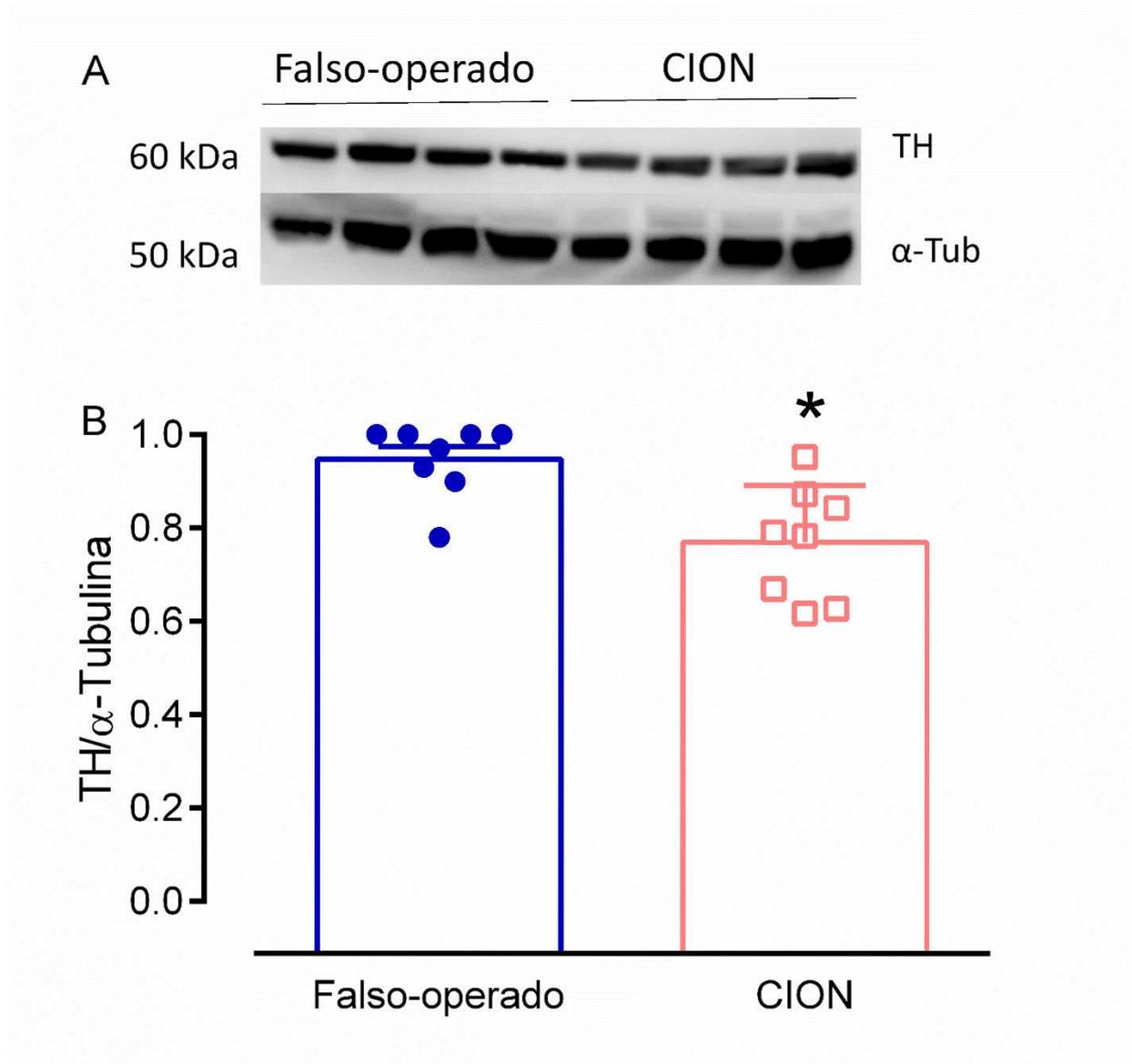


FIGURA 24: NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAOTBIRAL. Os núcleos accumbens (NAc) de animais no décimo quinto dia após constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado, foram removidos e processados para Western Blot. (A) Imagem demonstrativa da transferência da corrida do gel por eletroforese. (B) Níveis de expressão de tirosina hidroxilase (TH) em relação ao controle (α -tubulina) expressa nos NAc processados. A quantificação da intensidade dos sinais das bandas foi determinada por densitometria utilizando o software Image J. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (Teste t de Student bicaudal não pareado).

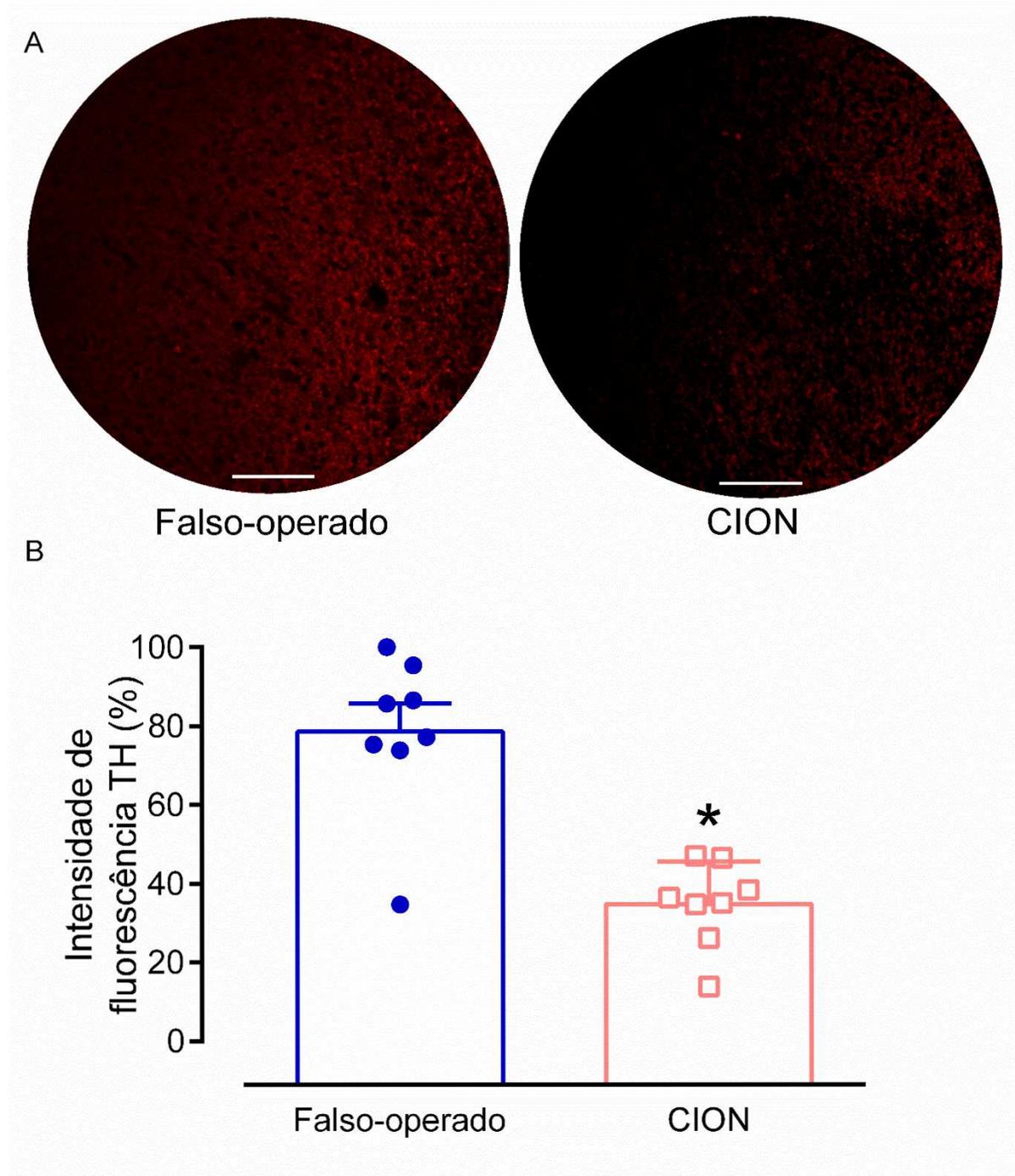


FIGURA 25: EXPRESSÃO DE TIROSINA HIDROXILASE EM FIBRAS DOPAMINÉRGICAS NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS A CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. Os núcleos accumbens (NAc) de animais no décimo quinto dia após constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado, foram removidos e processados para imunohistoquímica. As imagens foram visualizadas por microscopia confocal. (A) Visualização de uma imagem ilustrativa do NAc do lado ipsilateral de um animal falso-operado e CION. (B). Intensidade de fluorescência da tirosina hidroxilase (TH) expressa nas fibras dopaminérgicas. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (Teste t de Student bicaudal não pareado). Aumento de 40x e escala 100 μ m. A quantificação da intensidade da fluorescência foi determinada utilizando o software Image J.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL EM ÁREAS CEREBRAIS IMPLICADAS NO PROCESSAMENTO DA DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

A expressão de c-Fos por imunohistoquímica permitiu identificar as alterações na ativação neuronal em áreas cerebrais associadas ao processamento de dor após a CION. É importante ressaltar que todos os animais foram estimulados mecanicamente na região da área de inserção das vibrissas entre 1 e 2 horas antes da coleta do tecido.

Os animais falso-operado apresentaram baixa ativação de neurônios que expressam a proteína c-Fos tanto do lado ipsilateral quanto contralateral em todas as áreas centrais avaliadas. No entanto, nos animais constrictos foi verificada uma maior ativação desses neurônios de forma ipsi e contralateral no córtex pré-frontal medial (Figura 26A e 27A; CPFm), no núcleo accumbens *shell* (Figura 26B, 27B e 28; NAc *shell*), na amígdala basolateral (Figura 26C e 27C; BLA), na amígdala central (Figura 26D e 27D; ACe), na substância cinzenta periaquedutal ventromedial (Figura 26E e 27E; PAG), e no subnúcleo caudal do trigêmeo (Figura 26F e 27F; Vc).

Adicionalmente na figura 28, se observa a imunocoloração conjunta da expressão de c-Fos e TH no NAc de animais no décimo quinto dia após CION ou falso-operado. Enquanto que os ratos do grupo falso-operado apresentaram baixa ativação neuronal e alta expressão das fibras dopaminérgicas, os animais CION demonstraram alta ativação neuronal e baixa expressão de fibras dopaminérgicas.

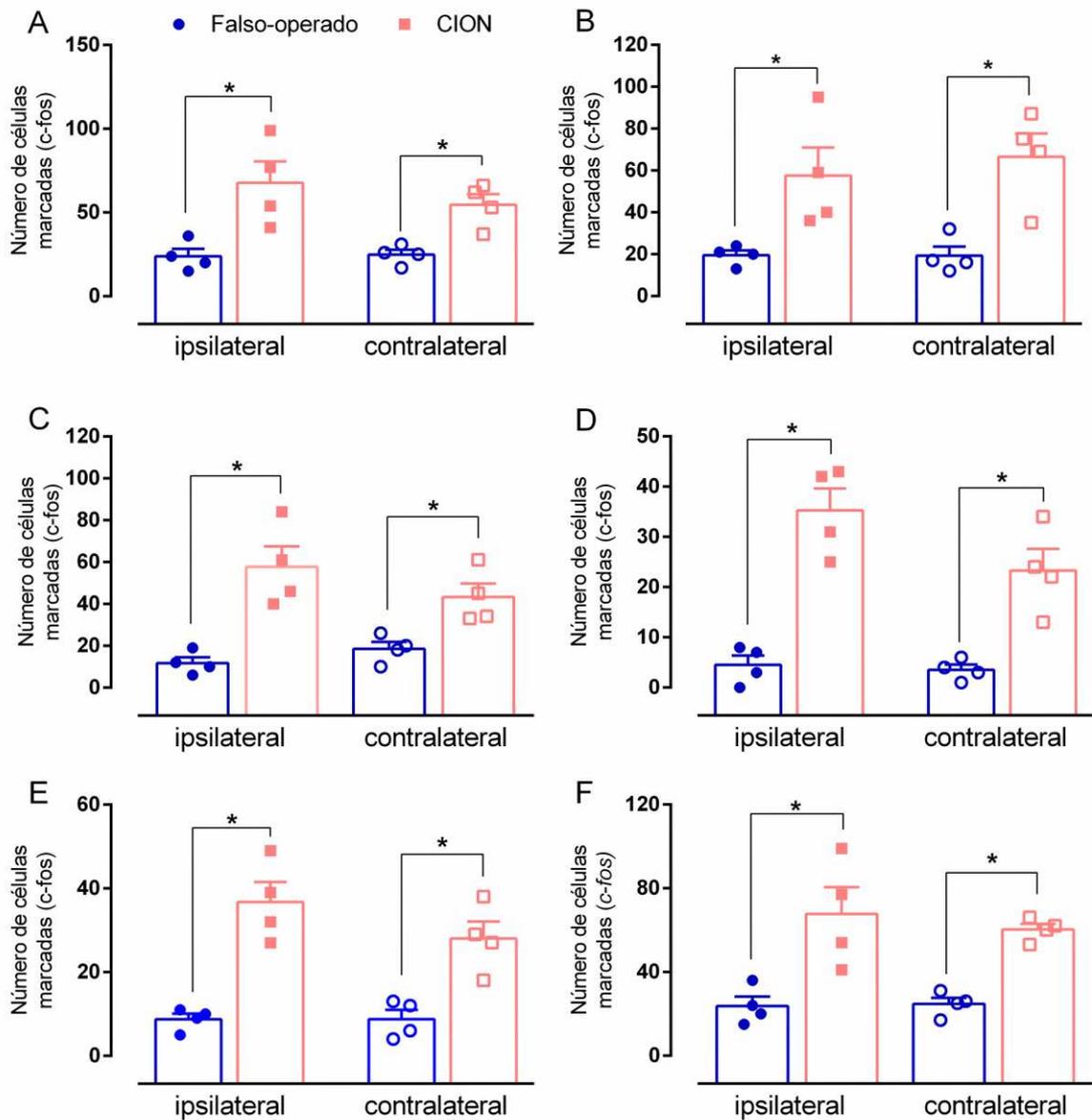


FIGURA 26: EXPRESSÃO E c-Fos APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. As áreas cerebrais de animais no décimo quinto dia após constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado, as quais incluem o córtex pré-frontal medial (A; mPFC), núcleo accumbens *shell* (B; NAC *shell*), amígdala basolateral (C; ABL), amígdala central (D; ACe), substância cinzenta periaquedutal (E; PAG), e subnúcleo caudal do trigêmeo (F; Vc), foram removidas e processadas para imunohistoquímica. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 4 animais. * indica $P < 0,05$, versus grupo falso-operado (Teste t de Student bicaudal não pareado). A quantificação dos núcleos neuronais que expressam c-Fos foram determinados utilizando o software Image J.

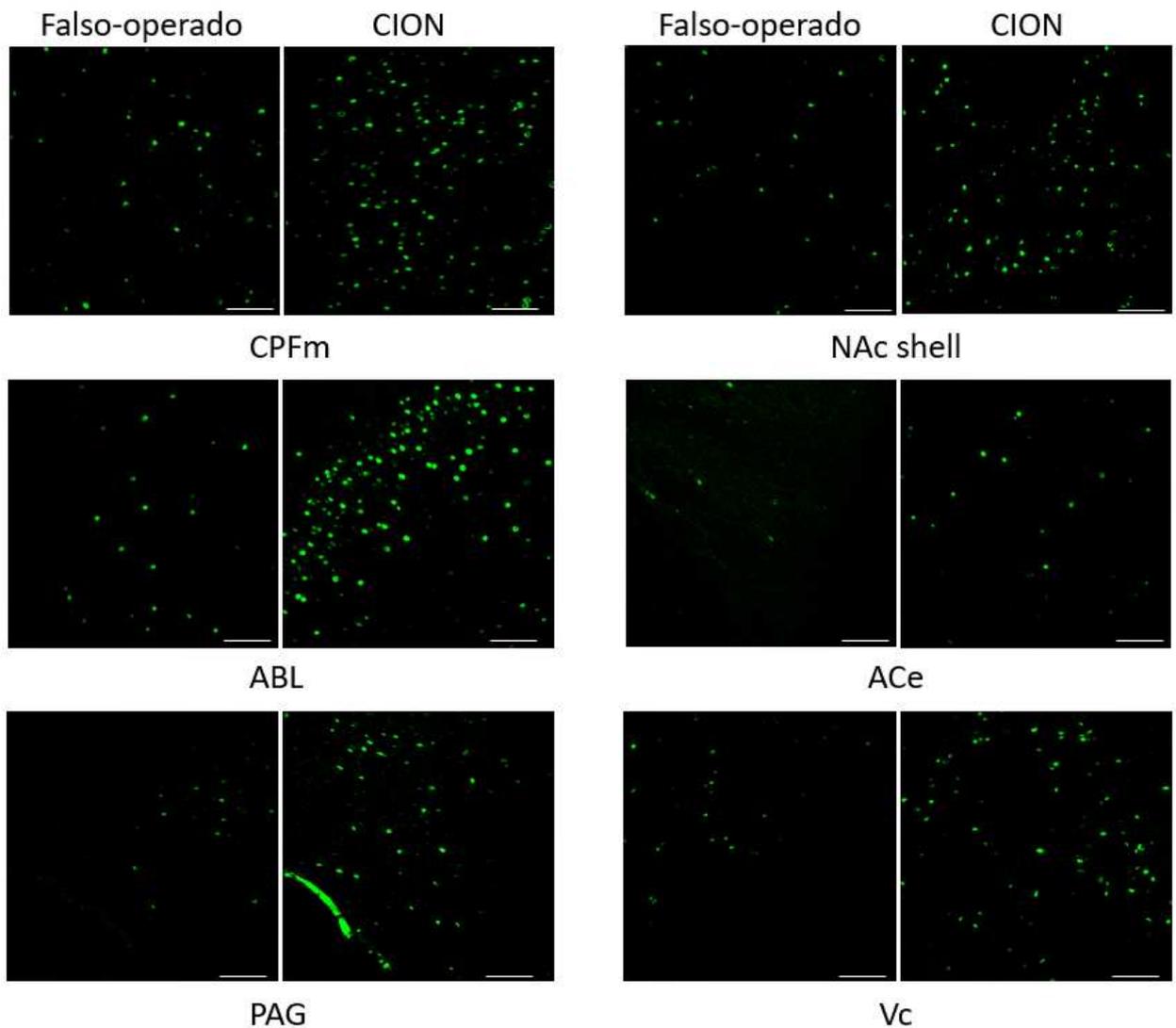


FIGURA 27: IMAGEM ILUSTRATIVA DA EXPRESSÃO DE c-Fos IPSILATERAL APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. As áreas cerebrais de animais no décimo quinto dia após constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado, as quais incluem o córtex pré-frontal medial (A; mPFC), núcleo accumbens *shell* (B; NAc *shell*), amígdala basolateral (C; BLA), amígdala central (D; ACe), substância cinzenta periaqueductal (E; PAG), e subnúcleo caudal do trigêmeo (F; Vc), foram removidas e processadas para imunohistoquímica. As imagens da expressão de c-Fos nos núcleos neuronais foram visualizados do lado ipsilateral com microscopia confocal. Aumento de 40x e escala de 100 μ m.

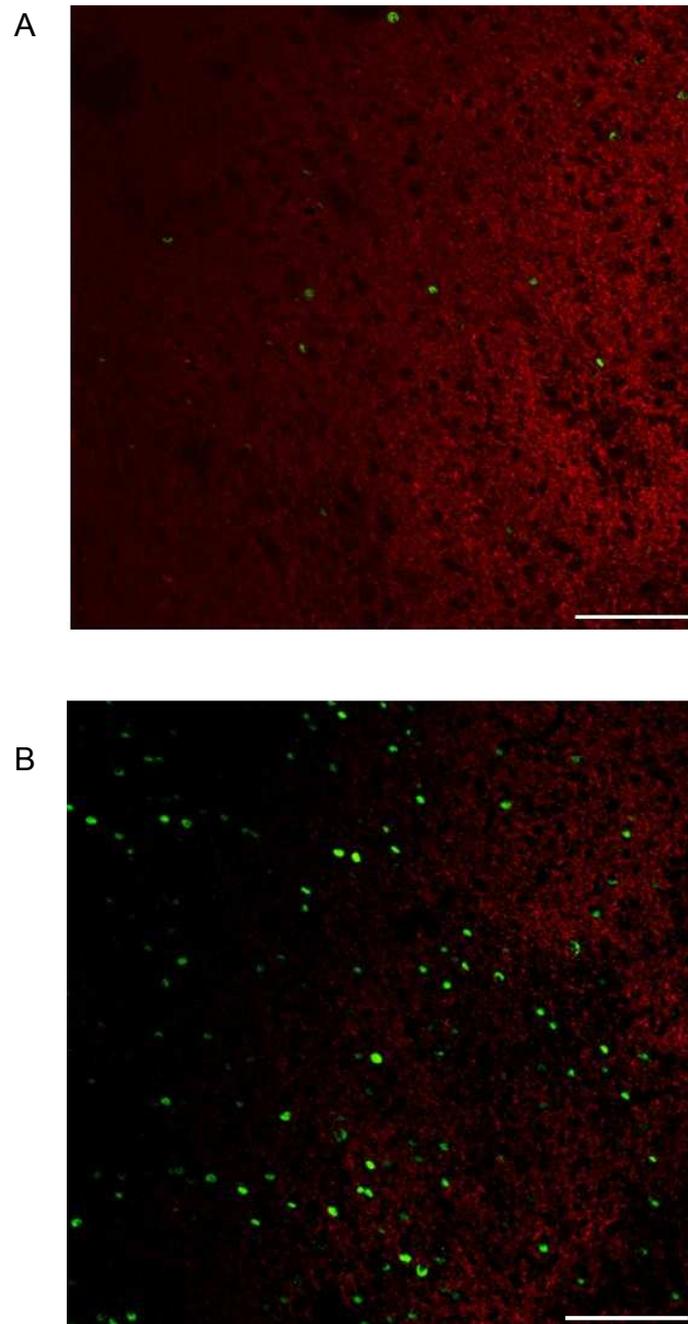


FIGURA 28: IMUNOCOLORAÇÃO CONJUNTA DA EXPRESSÃO DE c-Fos E TIROSINA HIDROXILASE NO NÚCLEO ACCUMBENS APÓS CONSTRIÇÃO DO NERVO INFRAORBITAL. Os núcleos accumbens (NAc) de animais no décimo quinto dia após constrição do nervo infraorbital (CION) ou falso-operado, foram removidos e processados para imunohistoquímica. A imunocoloração dos núcleos neuronais do lado ipsilateral que expressam c-Fos (verde) e das fibras dopaminérgicas que expressam tirosina hidroxilase (vermelho) em animais falso-operado (A) e CION (B) foram visualizados com microscopia confocal. Aumento de 40x e escala de 100 μ m.

5 DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA PERSISTENTE E CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS AFETIVOS NO TESTE DA FORMALINA OROFACIAL

A injeção de formalina induz tipicamente duas fases de resposta, a primeira fase que reflete a ativação direta dos nociceptores, e a segunda fase que é causada pela sensibilização central originada pela atividade contínua das fibras aferentes. Nossos resultados mostraram que no período imediato após a injeção de formalina, embora os animais apresentem o comportamento nociceptivo bifásico, não houve desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso. Este achado está de acordo com observações anteriores de que a ansiedade se desenvolve como consequência da dor persistente (GAMBETA; BATISTA; MASCHIO; TURNES *et al.*, 2018; GAMBETA; KOPRUSZINSKI; DOS REIS; ZANOVELI *et al.*, 2017; ROESKA; DOODS; ARNDT; TREEDE *et al.*, 2008; SEMINOWICZ; LAFERRIERE; MILLECAMPS; YU *et al.*, 2009; ZHANG; LIU; ZHAO; TANG *et al.*, 2017).

A avaliação da emissão de USV por animais submetidos ao modelo de formalina orofacial revelou que a injeção de formalina induz imediatamente, além do comportamento nociceptivo, um aumento na emissão de USV de 22 kHz. Esses dados corroboram estudos anteriores, nos quais a injeção da formalina causou emissões de 22 kHz, as quais foram significativamente atenuadas pelo tratamento sistêmico com morfina (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; OLIVEIRA; BARROS, 2006). Segundo BRUDZYNSKI, 2009 os ratos emitem USV de 22 kHz em situações aversivas, pois expressam estados negativos e funcionam como chamadas de alarme. Nesse sentido, Barroso e colaboradores (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019) sugeriram que as chamadas de 22 kHz emitidas nos primeiros minutos após a injeção orofacial de formalina podem representar uma chamada de alerta que reflete a aversividade do estímulo. De acordo com essas observações, os dados do presente estudo revelam que uma única injeção de formalina no lábio superior dos ratos evoca um aumento significativo de emissões USV a 22 kHz. Assim, a emissão de USV tem sido considerada uma medida bem estabelecida do estado emocional de ratos (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; BRUDZYNSKI, 2009; CALVINO; BESSON; BOEHRER; DEPAULIS, 1996; MARTINO; PERKINS, 2008; SIMOLA, 2015).

Por outro lado, nosso estudo fornece a primeira evidência de que a formalina orofacial promove hiperalgesia facial persistente por três dias após sua administração. De acordo com a literatura, a injeção de formalina na pata traseira do rato pode induzir hiperalgesia que persiste por até quatorze dias, dependendo da concentração empregada (AMBRIZ-TUTUTI; CRUZ; URQUIZA-MARÍN; GRANADOS-SOTO, 2011; MARTÍNEZ-ROJAS; BARRAGÁN-IGLESIAS; ROCHA-GONZÁLEZ; MURBARTIÁN *et al.*, 2014; MARTÍNEZ-ROJAS; GARCÍA; NORIEGA-NAVARRO; GUZMÁN-PRIEGO *et al.*, 2018; SALINAS-ABARCA; AVILA-ROJAS; BARRAGÁN-IGLESIAS; PINEDA-FARIAS *et al.*, 2017). Com relação aos parâmetros associados ao componente afetivo da dor, nossos dados mostram que um dia após a injeção de formalina no lábio, os ratos ainda não exibem comportamento do tipo ansioso, embora a hiperalgesia orofacial ao calor fosse detectada neste momento, o que corrobora resultados anteriores de que a administração de formalina na pata é capaz de induzir hiperalgesia por vários dias (MARTÍNEZ-ROJAS; BARRAGÁN-IGLESIAS; ROCHA-GONZÁLEZ; MURBARTIÁN *et al.*, 2014; MARTÍNEZ-ROJAS; GARCÍA; NORIEGA-NAVARRO; GUZMÁN-PRIEGO *et al.*, 2018; NEMOTO; YAMADA; OGATA; NAKAGAWASAI *et al.*, 2016; ZHANG; YIN; HU; ZHAO *et al.*, 2018; ZHAO; YIN; WU; DING *et al.*, 2018). Além disso, um dia após a injeção de formalina não há emissão de USV a 22 kHz nem alteração na emissão de 50 kHz entre os ratos do grupo controle e os injetados com formalina. Esta observação reforça o papel das 22 kHz como chamadas capazes de alertar membros da mesma espécie de possíveis situações de perigo ou aversivas (WÖHR; ENGELHARDT; SEFFER; SUNGUR *et al.*, 2017). Apenas no terceiro dia após a formalina houve desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso, o que está de acordo com observações anteriores após administração de formalina na pata (LUO; ZHANG; LUO; ZHOU *et al.*, 2015). Na avaliação das USV, de forma semelhante ao primeiro dia após a injeção de formalina, a emissão de 22 kHz não foi detectada após 3 dias da administração, no entanto, este estudo fornece as primeiras evidências de alterações na emissão de 50 kHz ao observar uma redução no número de 50 kHz, mais especificamente no subtipo *flat*. Evidências anteriores indicam que embora as chamadas FM estejam associadas à recompensa e a um estado afetivo positivo, as *flat* podem ter uma função de coordenação social (BURGDORF; PANKSEPP; MOSKAL, 2011; BURGDORF; WOOD; KROES; MOSKAL *et al.*, 2007; WÖHR; ENGELHARDT; SEFFER; SUNGUR *et al.*, 2017). Assim, a redução na emissão de *flat* em ratos com dor persistente sugere uma diminuição da comunicação social,

hipótese apoiada por observações anteriores de que a dor persistente está frequentemente associada a uma interação social reduzida no ambiente pré-clínico e clínico (GRÉGOIRE; WATTIEZ; ETIENNE; MARCHAND *et al.*, 2014; HENNE; MORRISSEY; CONLON, 2015; PITCHER; TARUM; LEHMANN; BUSHNELL, 2019).

5.2 DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS APÓS INCISÃO DA MUCOSA ORAL

No modelo de dor pós-operatória, os animais apresentaram hiperalgesia mecânica nos dias 1, 3 e 5 e hiperalgesia térmica ao calor nos dias 1 e 3 após a cirurgia. Esses resultados corroboram o estudo de Urata e colaboradores que mostra o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica por cinco dias e térmica ao calor por três dias após a incisão (URATA; SHINODA; HONDA; LEE *et al.*, 2015). Além disso, nossos dados demonstraram que no terceiro dia após a incisão da mucosa oral, houve um aumento de *grooming* espontâneo em relação ao grupo falso-operado, sugerindo a presença de dor tônica. A resposta de *grooming* facial é considerada uma medida de dor espontânea, uma vez que é diminuída por medicamentos que comprovadamente aliviam a dor no ambiente clínico (BENOLIEL; ELIAV; IADAROLA, 2001; HIDAKA; ONO; HARANO; SAGO *et al.*, 2011; KOPRUSZINSKI; DOS REIS; GAMBETA; ACCO *et al.*, 2018; SAGO; ONO; HARANO; FURUTA-HIDAKA *et al.*, 2012). Embora nossa investigação tenha se limitado a 3 dias após a incisão, de acordo com estudos anteriores que utilizaram o modelo de incisão da pata, a dor tônica, evidenciada pelo paradigma CPP, foi detectada 24 horas, mas não 96 horas, após o procedimento cirúrgico (NAVRATILOVA; XIE; OKUN; QU *et al.*, 2012). Esse achado está de acordo com o estudo anterior, que mostrou que no terceiro dia após a cirurgia de incisão intraoral, um grupo de neurônios no GT que inerva a mucosa bucal expressa TRPV1 e TRPA1 de maneira significativamente aumentada quando comparados aos animais controle (URATA; SHINODA; HONDA; LEE *et al.*, 2015), o que possivelmente contribuiu para a hiperalgesia facial térmica e mecânica, bem como na dor espontânea (WANG; BRIGOLI; LIM; KARLEY *et al.*, 2018). Por outro lado, na avaliação do decurso temporal das USV, consistente com os dados do teste da formalina, nos dias 1 e 3 após a incisão, não houve emissão significativa de USV de 22 kHz. Apesar disso, os ratos operados apresentaram redução na emissão total de 50 kHz em ambos momentos e, mais especificamente, nas *flat* no terceiro dia após a cirurgia. Esses dados reforçam a ideia de que a comunicação social diminui quando a

dor persiste. Curiosamente, não há diferença significativa na emissão de USV no grupo operado em comparação com o grupo falso-operado no quinto dia após a cirurgia, visto que da mesma forma que a hiperalgesia, essa alteração foi transitória. Com base nesses resultados, em adição ao estudo de Urata e colaboradores, que estabeleceram o dia 3 após a incisão da mucosa oral para avaliação dos testes experimentais com antagonistas de TRPV1 e TRPA1 na hiperalgesia térmica e mecânica (URATA; SHINODA; HONDA; LEE *et al.*, 2015), foi definido esse momento para as avaliações posteriores.

Adicionalmente, o comportamento do tipo ansioso foi detectado no terceiro dia após a incisão da mucosa oral. A este respeito, estudos anteriores demonstraram que o comportamento do tipo ansioso é mais proeminente no período inicial (até 3 dias), porém não está presente no dia 7 após a incisão da pata (DAI; LI; ZHANG; LI *et al.*, 2011; GUPTA; GAUTAM; PRASOON; KUMAR *et al.*, 2018; LI; ZHANG; DAI; WANG *et al.*, 2010). Os resultados do presente estudo corroboram evidências prévias de que a ansiedade se desenvolve em decorrência da dor persistente. Nesse sentido, animais com lesão na polpa dentária desenvolveram comportamento do tipo ansioso (SHANG; XU; LI; SU *et al.*, 2015) e ratos com carcinoma facial desenvolveram hiperalgesia e comportamento do tipo ansioso após a indução do tumor (GAMBETA; KOPRUSZINSKI; DOS REIS; ZANOVELI *et al.*, 2016). Mais estudos são necessários para explorar a persistência dessas alterações, bem como os fatores subjacentes aos mecanismos e suas susceptibilidades aos tratamentos farmacológicos. No entanto, com base nos presentes achados, é possível sugerir que uma pequena lesão tecidual, infligida pela incisão intraoral, leva a mudanças nos aspectos comportamental e afetivo da dor.

5.3 EFEITO DA MORFINA NAS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR PÓS-OPERATÓRIA

Os opioides são extensamente utilizados na analgesia após procedimentos operatórios, inclusive após alguns procedimentos cirúrgicos orofaciais (PERGOLIZZI; MAGNUSSON; LEQUANG; GHARIBO *et al.*, 2020). Além disso, seu efeito analgésico foi bem caracterizado em modelo de incisão na pata de ratos (TAT; JOKSIMOVIC; KRISHNAN; COVEY *et al.*, 2020). Em vista dessas considerações, usamos a morfina como controle positivo nas avaliações das alterações sensoriais e afetivas no terceiro

dia após a incisão. O resultado demonstrou que a morfina foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica e térmica por uma hora, começando o efeito aos 30 minutos. Isto, permitiu definir o tempo de condicionamento com morfina no teste do CPP em 30 minutos, o que está de acordo com dados anteriores (KOPRUSZINSKI; DOS REIS; GAMBETA; ACCO *et al.*, 2018).

A dor tônica foi detectada no terceiro dia após a incisão da mucosa oral, indiretamente demonstrada pelo teste de CPP, no qual os ratos operados passaram mais tempo na câmara pareada com morfina. De acordo com os dados obtidos, estudos anteriores reportaram a presença de dor tônica após incisão na pata (KING; VERA-PORTOCARRERO; GUTIERREZ; VANDERAH *et al.*, 2009; OKUN; DEFELICE; EYDE; REN *et al.*, 2011). Por outro lado, a morfina apresentou efeito ansiolítico, observado pelo aumento da porcentagem do tempo gasto nos braços abertos do LCE. Estudos anteriores também observaram esse efeito da morfina quando administrado sistemicamente (MOTEVASSELI; REZAYOF; ZARRINDAST; NAYER-NOURI, 2010; REZAYOF; ASSADPOUR; ALIJANPOUR, 2013). Além disso, o tratamento com morfina demonstrou reduzir a hiperalgesia e o comportamento do tipo ansioso após a incisão na pata (LI; ZHANG; DAI; WANG *et al.*, 2010). Na dose usada neste estudo, a morfina não afetou o limiar mecânico dos ratos controle, nem alterou a atividade locomotora observada pelo número de entradas nos braços fechados do LCE, o que está de acordo com estudos anteriores de nosso grupo (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; KOPRUSZINSKI; DOS REIS; GAMBETA; ACCO *et al.*, 2018; NONES; REIS; JESUS; VERONEZ *et al.*, 2013). A dor afetiva é modulada em parte pelo sistema dopaminérgico mesolímbico e, particularmente, o NAc foi reconhecido por seu papel no comportamento motivado por recompensas. Dessa maneira, as recompensas, incluindo drogas analgésicas, ativam os neurônios mesolímbico, os quais liberam dopamina no NAc e promovem uma experiência prazerosa (LEKNES; TRACEY, 2008). Neste sentido, sugere-se que a morfina aumenta a liberação de dopamina no NAc desempenhando um papel crucial para a CPP bem como para o efeito ansiolítico observado em nossos experimentos (NAVRATILOVA; XIE; MESKE; QU *et al.*, 2015; RIPPBERGER; VAN GAALEN; SCHWARTING; WOHR, 2015).

Adicionalmente, observamos que a morfina aboliu praticamente todas as emissões de USV em ambos os grupos experimentais no terceiro dia após a incisão

da mucosa oral, o que está de acordo com estudos anteriores que constataram que a administração aguda de morfina em roedores inibe a emissão de USV de 50 kHz (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; HAMED; TARACHA; SZYNDLER; KRZAŚCIK *et al.*, 2012; WRIGHT; DENG; CLARKE, 2012). Ademais, no tratamento repetido com morfina foi verificado um aumento significativo de 50 kHz após a última administração associada à expectativa de receber a morfina (HAMED; TARACHA; SZYNDLER; KRZAŚCIK *et al.*, 2012; WRIGHT; DENG; CLARKE, 2012). Neste sentido, a morfina é capaz de ativar os receptores opioides dos tipos mu (MOR), kappa (KOR) e delta (DOR), no entanto, sabe-se que a ativação dos MOR e KOR têm ações opostas em uma série de sistemas centrais, incluindo aqueles mediando recompensa, motivação e modulação da dor (PAN, 1998). Por exemplo, animais que receberam injeções intra-ATV de agonistas de MOR passaram mais tempo na câmara pareada com a droga opioide no teste do CPP do que em um ambiente pareado com solução salina (BALS-KUBIK; ABLEITNER; HERZ; SHIPPENBERG, 1993; NADER; VAN DER KOOY, 1997; PHILLIPS; LEPIANE, 1980). Em contrapartida, injeções intra-ATV de agonistas KOR produziram CPA (BALS-KUBIK; ABLEITNER; HERZ; SHIPPENBERG, 1993). Tendo em vista essas considerações estudos posteriores observaram, que a ação aversiva de agonistas KOR administrados sistemicamente depende da inibição da liberação de DA dos terminais dos neurônios da ATV no NAc (XI; STEIN, 2002) e, mais especificamente, pela inibição direta de um subconjunto de neurônios dopaminérgicos na ATV (MARGOLIS; HJELMSTAD; BONCI; FIELDS, 2003). Isto sugere que a ativação de receptores KOR mediada pela administração aguda de morfina, somado à redução da expressão de TH no NAc de animais com dor orofacial persistente, estaria contribuindo para a baixa atividade dopaminérgica mesolímbica e conseqüente redução da emissão de USV de 50 kHz.

Em conjunto, nossos dados mostram que a morfina reduz os componentes sensorial e afetivo da dor, evidenciado pela redução da hiperalgesia, dor tônica e comportamento do tipo ansioso. No entanto, não foi possível avaliar o efeito da morfina sobre a emissão de USV.

5.4 ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS NO MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

Os resultados demonstraram que animais submetidos a CION desenvolveram hiperalgesia mecânica no décimo quinto dia após a cirurgia, o que corrobora estudos anteriores (CHICHORRO; ZAMPRONIO; RAE, 2006; DOS REIS; KOPRUSZINSKI; NONES; AGUIAR *et al.*, 2020; GAMBETA; BATISTA; MASCHIO; TURNES *et al.*, 2018; NONES; CLAUDINO; FERREIRA; DOS REIS *et al.*, 2017). O comportamento do tipo ansioso também foi detectado no mesmo período, o que está de acordo com resultados anteriores do nosso grupo, no qual os animais constrictos apresentaram comportamento do tipo ansioso somente após a instauração da dor crônica (GAMBETA; BATISTA; MASCHIO; TURNES *et al.*, 2018). Desta maneira, sugere-se que um controle satisfatório da dor poderia contribuir para uma redução no estado de ansiedade.

Por outro lado, a redução da emissão de USV de 50 kHz do subtipo *flat* foi detectada quinze dias após a CION em relação aos animais falso-operado, em concordância com estudos anteriores que observaram que em estados dolorosos persistentes existe uma redução significativa neste tipo de USV (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019). A este respeito, tem sido considerado que as USV emitidas a 50 kHz estão associadas a maior atividade dopaminérgica no NAc, tanto em contextos sociais como não sociais (BURGDORF; KNUTSON; PANKSEPP; IKEMOTO, 2001; THOMPSON; LEONARD; BRUDZYNSKI, 2006).

5.5 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO MESOLÍMBICO NA DOR OROFACIAL PERSISTENTE

A emissão de USV de 50 kHz sinaliza para membros da mesma espécie um estado emocional hedônico e positivo, rotulado em termos humanos como alegria, prazer ou euforia. Essas chamadas também foram sugeridas como sendo um homólogo evolutivo do riso humano (PANKSEPP, 2007; PANKSEPP; BURGDORF, 2000). Assim, emissões de 50 kHz causaram respostas comportamentais nos animais que as ouvem, bem como, ratos expostos a um áudio gravado com emissões de 50 kHz emitiram em resposta ao áudio, um maior número dessas vocalizações (BURGDORF; KROES; MOSKAL; PFAUS *et al.*, 2008; SEFFER; SCHWARTING;

WÖHR, 2014; WÖHR; SCHWARTING, 2007; 2009). Portanto, as USV de 50 kHz tem sido interpretadas como um comportamento para solicitar contato social, correspondendo a sinais que estabelecem proximidade social ou como emissão de sinais de jogo (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; BIALY; RYDZ; KACZMAREK, 2000; HIMMLER; KISKO; EUSTON; KOLB *et al.*, 2014; SEFFER; SCHWARTING; WÖHR, 2014). Mais especificamente, as emissões do subtipo *flat* servem como chamadas de contato durante a interação social e são consideradas dependentes do sistema dopaminérgico mesolímbico (MULVIHILL; BRUDZYNSKI, 2019; RIPPBERGER; VAN GAALEN; SCHWARTING; WOHR, 2015; WÖHR; HOUX; SCHWARTING; SPRUIJT, 2008). Prosseguindo essa linha de raciocínio, nossos resultados constataram um aumento na emissão total de USV de 50 kHz e do subtipo *flat* após a administração sistêmica de anfetamina nos modelos experimentais de dor pós-operatória e neuropática trigeminal, em relação aos respectivos grupos controle. A anfetamina pertence à classe de medicamentos denominados β -feniletilaminas com efeito farmacológico principal relacionado à liberação de monoaminas, entre as quais destacamos a dopamina, noradrenalina e serotonina, o que sustenta os benefícios terapêuticos e também o seu abuso recreativo (HEAL; SMITH; GOSDEN; NUTT, 2013). Sendo um psicoestimulante, a anfetamina induz um aumento mais pronunciado na emissão de 50 kHz quando aplicado sistemicamente (BRUDZYNSKI; GIBSON; SILKSTONE; BURGDORF *et al.*, 2011) ou localmente no NAc (BRUDZYNSKI; SILKSTONE; KOMADOSKI; SCULLION *et al.*, 2011). Isto se deve aos diversos mecanismos de ação deste fármaco que incluem a inibição da recaptação de dopamina com consequente aumento da concentração da mesma na fenda sináptica (EASTON; STEWARD; MARSHALL; FONE *et al.*, 2007; FLECKENSTEIN; VOLZ; RIDDLE; GIBB *et al.*, 2007), os efeitos em receptores noradrenérgicos α 1 (WRIGHT; DOBOSIEWICZ; CLARKE, 2012) e serotoninérgicos 5-HT_{2C} (WÖHR; RIPPBERGER; SCHWARTING; VAN GAALEN, 2015), bem como o envolvimento da sinalização da proteína fosfoquinase C (PEREIRA; ANDREATINI; SCHWARTING; BRENES, 2014; RIPPBERGER; VAN GAALEN; SCHWARTING; WOHR, 2015). Assim, podemos sugerir que a anfetamina estaria produzindo um aumento na atividade dopaminérgica mesolímbica com consequente incremento na emissão de USV de 50 kHz. É válido mencionar que a dose de anfetamina usada neste estudo é considerada baixa visto que não produz alteração da atividade locomotora (MATHEWS; MCCORMICK, 2007). Isso pode estar

relacionado à não observação da emissão dos subtipos de FM. Neste sentido, estudos demonstram que a emissão de USV do subtipo *trill* induzida por anfetamina é claramente dose dependente (WRIGHT; GOURDON; CLARKE, 2010; WÖHR; RIPPBERGER; SCHWARTING; VAN GAALEN, 2015).

Em consonância com esses achados, nossos resultados detectaram uma redução da expressão da TH no NAc nos mesmos períodos experimentais nos modelos de dor pós-operatória e dor neuropática trigeminal, mostrando que a dor persistente resulta em diminuição da atividade dopaminérgica do NAc. A ativação dopaminérgica mesolímbica com consequente liberação de dopamina no NAc medeia as emoções positivas que estão relacionadas à motivação e emissão de USV de 50 kHz (HORI; SHIMOJU; TOKUNAGA; OHKUBO *et al.*, 2013; SILKSTONE; BRUDZYNSKI, 2020). Desta forma, os efeitos motivacionais de drogas de abuso como a cocaína, anfetaminas, nicotina e psicoestimulantes são avaliados pelo estudo das emissões de USV de 50 kHz (SIMOLA, 2015). Assim, os resultados corroboram evidências prévias de que a dor afetiva associada a condições de hiperalgesia contínua, envolve o sistema dopaminérgico mesolímbico, o qual poderia ser um alvo terapêutico em potencial para condições de dor persistente.

5.6 ATIVAÇÃO NEURONAL EM ÁREAS CEREBRAIS RELACIONADAS A DOR EM MODELOS DE DOR OROFACIAL PERSISTENTE

O c-Fos constitui um fator de transcrição de expressão rápida, o qual é detectado quando há alta atividade cerebral e tem sido comumente utilizado como um marcador para tal atividade (METZ; BANNISTER; SUTHERLAND; HAGEMEIER *et al.*, 1994). Ao ser polimodal, o c-Fos pode ser ativado por múltiplos sinais extracelulares, como por exemplo fatores de crescimento, bem como através da fosforilação de proteínas envolvidas na sinalização intermediária de processos de plasticidade neuronal, tal como a proteína quinase A. Dessa forma, o c-Fos está intimamente relacionado aos processos produzidos na formação de novas sinapses, e portanto, a grande atividade cerebral realizada nesses processos, servindo para identificar subpopulações de neurônios ativados em resposta a estímulos nocivos e as vias nociceptivas relacionadas (CHUNG, 2015).

Nesse estudo foram investigadas áreas cerebrais sabidamente implicadas em estados dolorosos, tanto no modelo de dor pós-operatória quanto no modelo de dor

neuropática trigeminal, a fim de verificar se as alterações sensoriais e afetivas, observadas nos testes experimentais, estariam em concordância com a atividade neuronal. Especificamente, na transmissão nociceptiva craniofacial as entradas e interconexões no subnúcleo caudal do trigêmeo fornecem um circuito intrínseco que permite a interação entre as aferências provenientes dos tecidos periféricos e as projeções descendentes originadas em diversas áreas do SNC, que incluem a formação reticular, núcleos da rafe, área parabraquial, loco cerúleo, hipotálamo, amígdala e córtex cerebral (incluindo pré-frontal, sensório-motor e cíngulo anterior, entre outras), que se projetam para áreas subcorticais. Inúmeros mediadores químicos, tais como GABA, glicina, 5-HT, noradrenalina, dopamina, orexina e opioides endógenos, direcionam os efeitos modulatórios na transmissão nociceptiva craniofacial nos núcleos sensoriais trigeminais, e primordialmente no subnúcleo caudal (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017). Assim, diversos estudos acerca da dor orofacial demonstraram ativação neuronal no subnúcleo caudal (BIRD; IANNITTI; CHRISTMAS; OBARA *et al.*, 2018; CHA; SALLEM; JANG; JUNG, 2020; CHATTIPAKORN; SIGURDSSON; LIGHT; NARHI *et al.*, 2002; MARTINEZ; BELMONTE, 1996; RO; CAPRA; MASRI, 2004), o que está de acordo com os resultados aqui obtidos, visto que houve ativação ipsi e contralateral dessa estrutura em ambos os modelos de dor orofacial persistente.

A dor, como outras experiências, está sujeita a um processo de elaboração de conduta pelo CPF, o que explica, em parte, muitas das respostas individuais bem como a maneira coletiva, social e cultural de agir e responder à dor. Assim o CPF medial está envolvido no aspecto afetivo da dor e sofre plasticidade durante o desenvolvimento de dor crônica (APKARIAN; SOSA; SONTY; LEVY *et al.*, 2004; METZ; YAU; CENTENO; APKARIAN *et al.*, 2009). Desta maneira, dados clínicos relataram uma hiperatividade no CPF em pacientes com dor crônica quando aplicada estimulação térmica nociva, o que fornece evidências diretas do seu papel na fisiopatologia desta condição (APKARIAN; THOMAS; KRAUSS; SZEVERENYI, 2001; NAKATA; TAMURA; SAKAMOTO; AKATSUKA *et al.*, 2008). Especificamente, o CPF medial desempenha uma função relevante nos sistemas de dor e recompensa (DOSSANTOS; MOURA; DASILVA, 2017; ONG; STOHLER; HERR, 2019; TZSCHENTKE, 2000), e estudos de imagem em seres humanos sugerem que o sistema de recompensa e motivação, bem como a conectividade com o CPF podem participar no desenvolvimento de dor crônica (BALIKI; PETRE; TORBEY;

HERRMANN *et al.*, 2012; HASHMI; BALIKI; HUANG; BARIA *et al.*, 2013; NAVRATILOVA; MORIMURA; XIE; ATCHERLEY *et al.*, 2016). Além disso, evidências emergentes sugerem que a inervação dopaminérgica no CPF medial desempenha um papel relevante na aversão (LAMMEL; LIM; RAN; HUANG *et al.*, 2012; VANDER WEELE; SICILIANO; MATTHEWS; NAMBURI *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram um aumento na expressão de c-Fos do lado ipsilateral após a incisão da mucosa oral e bilateral após CION.

Outra área avaliada foi a amígdala, a qual é evolutivamente conservada em roedores e humanos e desempenha funções semelhantes para detecção de ameaças, aprendizado aversivo e codificação da nocicepção (KIMMEY; MCCALL; WOOLDRIDGE; SATTERTHWAITTE *et al.*, 2020). Nesse sentido, há estudos que demonstram o papel da amígdala na emissão de USV de 22 kHz (PARSANA; MORAN; BROWN, 2012; SADANANDA; WOHR; SCHWARTING, 2008). Da mesma forma, evidências apontam para a amígdala como um substrato neural da interação entre dor e emoção (FIELDS, 2000; HAN; NEUGEBAUER, 2004; KANG; MOR; KEAY, 2021; MEAGHER; ARNAU; RHUDY, 2001; SENO; ASSIS; GOUVEIA; ANTUNES *et al.*, 2018). Assim, os estímulos sensoriais nociceptivos específicos da medula espinhal e do tronco encefálico são recebidos pela ACe, também denominada amígdala nociceptiva porque integra as informações polissensoriais e nociceptivas específicas atribuindo significado emocional aos estímulos dolorosos). Por outro lado, os estímulos polimodais altamente processados, incluindo as informações nociceptivas do tálamo e do córtex atingem a AL e ABL, respectivamente (NEUGEBAUER; LI; BIRD; HAN, 2004). Em contrapartida, a ACe forma conexões diretas e indiretas generalizadas, emitindo projeções para o tálamo e áreas corticais relacionadas com componentes cognitivos e conscientes da dor, para o hipotálamo implicado nas respostas dolorosa autonômicas e neuroendócrinas, e para áreas do tronco cerebral que fazem parte de um sistema modulador de dor endógeno, incluindo os circuitos que conectam a PAG, RVM e corno dorsal da medula espinhal, as informações emocionais e a modulação do comportamento da dor (NEUGEBAUER; LI; BIRD; HAN, 2004). Dessa forma, a ABL se integra com circuitos corticostriatais de ordem superior (BURGOS-ROBLES; KIMCHI; IZADMEHR; PORZENHEIM *et al.*, 2017; JANAK; TYE, 2015; JI; SUN; FU; LI *et al.*, 2010; RAMIREZ; MOSCARELLO; LEDOUX; SEARS, 2015), enquanto que a ACe influencia amplamente os circuitos descendentes de controle de nocicepção, como a PAG (FOX; SORENSON, 1994; OLIVEIRA; PRADO,

2001; OZAWA; YCU; KUMAR; YEH *et al.*, 2017; TOVOTE; ESPOSITO; BOTTA; CHAUDUN *et al.*, 2016). Os resultados da ativação da amígdala demonstraram igualmente, que a ABL e ACe apresentaram maior expressão de c-Fos do lado ipsilateral após 3 dias da incisão da mucosa oral e em ambos lados após quinze dias da CION, o que está de acordo com outros estudos que demonstram o papel da amígdala no componente afetivo da dor (KANG; MOR; KEAY, 2021; KIMMEY; MCCALL; WOOLDRIDGE; SATTERTHWAITTE *et al.*, 2020; NEUGEBAUER; LI; BIRD; HAN, 2004; SENO; ASSIS; GOUVEIA; ANTUNES *et al.*, 2018; ZHOU; LI; MENG; LIU *et al.*, 2021).

Adicionalmente, uma área cerebral implicada no processamento do componente afetivo da dor é o NAc que recebe estímulos excitatórios de regiões límbicas (CPF, hipocampo, amígdala, núcleos intralaminares da linha média) e projeta eferentes para várias regiões, incluindo o globo pálido ventral e o tronco cerebral. Estudos descreveram certa especificidade de conectividade aferente e eferente no que diz respeito ao NAc *shell* e NAc *core* em ratos (GROENEWEGEN; WRIGHT; BEIJER; VOORN, 1999) e primatas não humanos (MEREDITH; PATTISELANNO; GROENEWEGEN; HABER, 1996), sugerindo que o NAc contém sistemas neuronais com diferentes entradas e saídas que desempenham diferentes funções. O NAc *core*, acredita-se que medeia a ativação comportamental condicionada por pistas ou dicas, como a busca de recompensa, enquanto que o NAc *shell* mostrou codificar as projeções de uma condição comportamental (SESACK; GRACE, 2010). Assim, o NAc pode mediar funções envolvidas tanto na recompensa quanto na aversão (BERRIDGE; ROBINSON, 2003). Dor e analgesia oferecem a possibilidade para compreender os circuitos de aversão e recompensa. Neste sentido, foi relatado que a aversão induzida em seres humanos por um estímulo doloroso nocivo ativa regiões, incluindo o NAc, uma região classicamente associada à recompensa (AHARON; BECERRA; CHABRIS; BORSOOK, 2006; BECERRA; BREITER; WISE; GONZALEZ *et al.*, 2001). Os dados obtidos na expressão de c-Fos correspondem a um aumento na ativação do NAc *shell* do lado ipsilateral no terceiro dia após a incisão da mucosa oral e um aumento ipsi e contralateral no décimo quinto dia após a CION. Em vista disso, o NAc *shell* integra informações afetivas dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos, bem como os neurônios do hipocampo ventral, da amígdala e do córtex frontal (BRITT; BENALIOUAD; MCDEVITT; STUBER *et al.*, 2012; BROMBERG-MARTIN; MATSUMOTO; HIKOSAKA, 2010). Além do mais, estudos de

imageamento cerebral em humanos sugerem que essa convergência no NAc é importante tanto nos estados de dor aguda quanto da dor crônica (BALIKI; GEHA; FIELDS; APKARIAN, 2010; BALIKI; MANSOUR; BARIA; HUANG *et al.*, 2013), o que está de acordo com os resultados aqui obtidos.

Finalmente, outra área no processamento da dor avaliada foi a PAG, que é amplamente responsável pela modulação descendente da dor, tanto na inibição quanto na facilitação, o que pode levar a outras comorbidades associadas a dor crônica, como depressão e ansiedade. Existem subdivisões dorsal, lateral e ventrolateral (PAGvl) da PAG, e estudos iniciais examinaram as funções dessas subdivisões em comportamentos antinociceptivos e de ansiedade. A estimulação elétrica e farmacológica das áreas dorsal e lateral produziram reações tais como correr e pular, enquanto a PAGvl mostrou participar mais diretamente na analgesia (FARDIN; OLIVERAS; BESSON, 1984). A este respeito, a PAGvl é composta por uma população diversa de neurônios, incluindo células glutamatérgicas, GABAérgicas, serotoninérgicas e dopaminérgicas, e tem sido identificada como um dos principais locais de supressão da dor induzida por opioides endógenos e analgesia profunda mediada por estimulação elétrica (FIELDS, 2004; HOSOBUCHI; ADAMS; LINCHITZ, 1977). Adicionalmente, a PAGvl participa no processamento nociceptivo espinhal mediado por projeções descendentes provenientes do RVM (BASBAUM; FIELDS, 1979; WATERS; LUMB, 2008). Embora a PAGvl tenha sido extensivamente estudada por seu papel na modulação descendente da dor endógena (BASBAUM; FIELDS, 1978; MORGAN; WHITTIER; HEGARTY; AICHER, 2008; TOVOTE; ESPOSITO; BOTTA; CHAUDUN *et al.*, 2016; VAUGHAN; INGRAM; CONNOR; CHRISTIE, 1997), existe uma subpopulação de neurônios que modulam a neurotransmissão inibitória conhecidos por modular comportamentos nociceptivos, uma vez que a microinjeção de um agonista GABA produz efeitos pronociceptivos, enquanto a administração de antagonistas GABA produz efeitos antinociceptivos a estímulos nocivos (BUDAI; FIELDS, 1998; MOREAU; FIELDS, 1986; MORGAN; CLAYTON; LANE, 2003). Em concordância com esses achados, os resultados na expressão de c-Fos, da mesma forma que nas estruturas anteriores, indicam um aumento da atividade neuronal na PAGvl do lado ipsilateral de ratos no terceiro dia após a incisão da mucosa oral, e em ambos os lados no décimo quinto dia após a CION.

O conjunto de resultados deste presente trabalho demonstra que após 3 dias da incisão da mucosa oral, há um aumento na atividade neuronal, predominantemente ipsilateral das áreas centrais avaliadas associadas a dor pós-operatória. Em relação à dor neuropática trigeminal, o aumento na atividade neuronal é bilateral, evidenciando a sensibilização central. Tendo em vista estes resultados, podemos sugerir que mesmo após alguns dias de hiperalgesia persistente, ocorrem alterações plásticas que podem estar implicadas, ao menos em parte, na manutenção do estado doloroso bem como nas alterações relacionadas ao aspecto afetivo, tais como ansiedade e redução da interação social. Além disso, esses dados fornecem características adicionais de ambos os modelos, o que aumenta a validação dos mesmos para o estudo translacional destas condições.

5.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS PRINCIPAIS ACHADOS RELACIONADOS AO COMPONENTE AFETIVO NOS DIFERENTES MODELOS DE DOR OROFACIAL

O modelo de formalina orofacial é considerado um modelo de dor aguda, no qual a primeira fase corresponde a dor aguda produzida pela ativação direta dos nociceptores e a segunda fase, à sensibilização central (CLAVELOU; PAJOT; DALLEL; RABOISSON, 1989). Frequentemente o teste da formalina é utilizado para a avaliação do efeito analgésico de drogas na primeira ou segunda fase, totalizando um tempo de avaliação em torno aos 30 minutos imediatos após a injeção de formalina no lábio (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019; CLAVELOU; PAJOT; DALLEL; RABOISSON, 1989; DE OLIVEIRA; ARAYA; GAMBETA; FERREIRA *et al.*, 2019; RABOISSON; DALLEL, 2004). No entanto, nosso resultado é a primeira evidência de hiperalgesia persistente por 3 dias após a injeção de formalina no lábio, permitindo através deste modelo o estudo do componente afetivo da dor. Por outro lado, o modelo de incisão da mucosa oral é um modelo de dor aguda pós-operatória, o qual se caracteriza por promover hiperalgesia térmica e mecânica que perdura de 3 e 5 dias, respectivamente, com redução gradativa da intensidade da mesma conforme a recuperação do tecido acontece (URATA; SHINODA; HONDA; LEE *et al.*, 2015). Contrariamente, o modelo de CION corresponde a um modelo de dor neuropática trigeminal, caracterizado por produzir hiperalgesia mecânica bilateral por até 120 dias (CHICHORRO, 2006) e comportamento do tipo ansioso após instauração da hiperalgesia mecânica (GAMBETA; BATISTA; MASCHIO; TURNES *et al.*, 2018), o qual mimetiza características da dor crônica.

As emissões de USV de 22 kHz foram detectadas apenas no modelo de formalina orofacial no período imediato após a injeção de formalina. Neste sentido, as USV de 22 kHz são emitidas por ratos machos em situações de estresse ou perigo iminente, já que possuem uma função de alerta para os membros da mesma espécie (BLANCHARD; BLANCHARD; AGULLANA; WEISS, 1991). Estudos anteriores têm demonstrado que a injeção de formalina na pata ou no lábio dos animais provoca a emissão de USV de 22 kHz nos primeiros minutos após a administração (OLIVEIRA e BARROS, 2006; BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019), mais especificamente na primeira fase da formalina quando administrada no lábio de ratos machos (BARROSO; ARAYA; DE SOUZA; ANDREATINI *et al.*, 2019). Por outro lado, nos modelos de incisão intraoral e CION é necessária a administração sistêmica de drogas anestésicas para iniciar o procedimento cirúrgico, o que poderia interferir na apreciação do componente aversivo da dor no período imediato após as cirurgias. Entretanto, é válido mencionar que na dor operatória induzida por incisão na pata foi detectado um aumento das USVs aversivas 6 e 24 horas depois do procedimento (LIM; KIM; HAN; KIM, 2014).

As emissões de USV de 50 kHz, especialmente do subtipo *flat* foram reduzidas após instauração da hiperalgesia persistente e presença do comportamento do tipo ansioso nos 3 modelos experimentais de dor orofacial. As *flat* são as USV de 50 kHz mais frequentemente emitidas, visto que possuem um papel importante na comunicação e coordenação social (WÖHR; HOUX; SCHWARTING; SPRUIJT, 2008). Esses achados permitem sugerir que, assim como ocorre na clínica, os animais que por vários dias permanecem com hiperalgesia apresentam comportamento do tipo ansioso e interação social diminuída (GRÉGOIRE; WATTIEZ; ETIENNE; MARCHAND *et al.*, 2014; HENNE; MORRISSEY; CONLON, 2015; PITCHER; TARUM; LEHMANN; BUSHNELL, 2019). Desta forma, a quantificação das USV emitidas espontaneamente podem ser utilizadas para avaliar o componente afetivo da dor, no entanto, mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo associado a dor afetiva.

A atividade dopaminérgica mesolímbica tem sido associada as emissões de 50 kHz, incluindo o subtipo *flat* (MULVIHILL; BRUDZYNSKI, 2019; RIPPBERGER; VAN GAALLEN; SCHWARTING; WOHR, 2015; WÖHR; HOUX; SCHWARTING; SPRUIJT, 2008). O estudo atual demonstrou que nos períodos de tempo avaliados nos modelos cirúrgicos, os quais foram determinados pela instauração da hiperalgesia em presença

do comportamento do tipo ansioso e redução das USV *flat*, houve uma redução da expressão de TH no NAc nos animais operados em relação aos respectivos falso-operados. Esses dados, indiretamente sugerem que a atividade dopaminérgica na via da ATV para o NAc está reduzida em presença de dor persistente. Entretanto, observamos algumas diferenças entre os modelos. O tratamento sistêmico com amfetamina promoveu um aumento mais pronunciado da emissão de USV de 50 kHz do subtipo *flat* em animais submetidos a incisão da mucosa oral em relação aos animais CION. Esse achado sugere que há uma maior atividade dopaminérgica mesolímbica em ratos no terceiro dia após a incisão intraoral que nos ratos no décimo quinto dia após a CION. Além disso, no modelo de incisão intraoral não foi observada uma redução significativa no teste de RT-PCR no modelo de dor pós-operatória, contrariamente ao modelo de CION. No entanto, em ambos os modelos houve uma diminuição da expressão de TH nos ensaios de WB e IHQ. Esses resultados reforçam a ideia de que a redução da atividade dopaminérgica mesolímbica é mais sutil no modelo de dor pós-operatória que no modelo de dor neuropática trigeminal, o que pode estar associado às características da dor e sua persistência em cada modelo.

A atividade neuronal nas áreas cerebrais avaliadas (i.e. CPFm, ACe, ABL, NAc *shell* e PAG), com exceção do Vc que apresentou ativação bilateral em ambos os modelos cirúrgicos, foi do lado ipsilateral no modelo de dor pós-operatória e bilateral no modelo de dor neuropática trigeminal. Dados prévios do nosso grupo mostraram que no modelo de dor pós operatória não foi detectada hiperalgesia do lado contralateral à incisão ou hiperalgesia na pata, o que sugere que não há desenvolvimento de sensibilização central (ARAYA; BARROSO; TURNES; RADULSKI *et al.*, 2020). Entretanto, no modelo de CION, a hiperalgesia mecânica persiste por vários meses e é detectada nos lados ipsi- e contralateral ao procedimento. Portanto, é bastante provável que ocorra o desenvolvimento de sensibilização central neste modelo, o que poderia estar relacionado com a ativação bilateral das estruturas centrais que foram avaliadas. Desta maneira, os dados do presente estudo acrescentam características dos modelos para o estudo translacional destas condições dolorosas.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a dor orofacial persistente, induzida por formalina, incisão intraoral ou CION, leva ao desenvolvimento de alterações comportamentais e afetivas persistentes, incluindo hiperalgesia térmica e mecânica, dor tônica, comportamento do tipo ansioso e redução das USV sociais (TABELA 1). De acordo com a literatura atual, algumas dessas alterações podem estar relacionadas a uma alteração da via dopaminérgica mesolímbica, o que também foi demonstrado neste estudo. Além disso, os dados corroboram evidências recentes de que a análise de emissões de USV pode ser usada como uma medida adicional do componente afetivo da dor, visto que as emissões sociais se mostraram reduzidas após hiperalgesia persistente. No entanto mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos associados a esta condição. Assim, os dados obtidos enfatizam a importância do controle satisfatório da dor no ambiente clínico e incentivam o desenvolvimento de novos estudos visando determinar a persistência dessas alterações, bem como explorar substratos neuronais comuns para as alterações comportamentais e afetivas.

TABELA 1: PRINCIPAIS ALTERAÇÕES SENSORIAIS E AFETIVAS ASSOCIADAS À DOR OROFACIAL PERSISTENTE.

<i>PARÂMETROS</i>	<i>FORMALINA</i>	<i>INCISÃO</i>	<i>CION</i>
<i>Hiperalgesia persistente</i>	↑	↑	↑
<i>Comportamento do tipo ansioso</i>	↑	↑	↑
<i>Vocalizações ultrassônicas</i>	↓ 50 kHz	↓ 50 kHz	↓ 50 kHz
<i>Atividade dopaminérgica mesolímbica</i>	ND	↓	↓

Os símbolos ↑, ↓ e ND indicam presença, redução e não determinado, respectivamente.

Em conclusão, o presente estudo acrescenta evidências de que a dor orofacial persistente, mesmo que por poucos dias, pode causar plasticidade neuronal, a qual está relacionada com a expressão comportamental e afetiva da dor, e sugere que as mudanças em ambos esses aspectos estão relacionadas à redução da atividade dopaminérgica mesolímbica.

7 REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, K.; MONCONDUIT, L.; ARTOLA, A.; LUCCARINI, P. *et al.* GABAergic inhibition or dopamine denervation of the A11 hypothalamic nucleus induces trigeminal analgesia. **Pain**, 156, n. 4, p. 644-655, Apr 2015.
- AHARON, I.; BECERRA, L.; CHABRIS, C. F.; BORSOOK, D. Noxious heat induces fMRI activation in two anatomically distinct clusters within the nucleus accumbens. **Neurosci Lett**, 392, n. 3, p. 159-164, Jan 16 2006.
- AMBRIZ-TUTUTI, M.; CRUZ, S. L.; URQUIZA-MARÍN, H.; GRANADOS-SOTO, V. Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. **Pharmacol Biochem Behav**, 98, n. 3, p. 417-424, May 2011.
- APKARIAN, A. V.; BUSHNELL, M. C.; TREEDE, R. D.; ZUBIETA, J. K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **Eur J Pain**, 9, n. 4, p. 463-484, Aug 2005.
- APKARIAN, A. V.; SOSA, Y.; SONTY, S.; LEVY, R. M. *et al.* Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density. **J Neurosci**, 24, n. 46, p. 10410-10415, Nov 17 2004.
- APKARIAN, A. V.; THOMAS, P. S.; KRAUSS, B. R.; SZEVERENYI, N. M. Prefrontal cortical hyperactivity in patients with sympathetically mediated chronic pain. **Neurosci Lett**, 311, n. 3, p. 193-197, Oct 5 2001.
- ARAYA, E. I.; BARROSO, A. R.; TURNES, J. M.; RADULSKI, D. R. *et al.* Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the trigeminal ganglion mediates facial mechanical and thermal hyperalgesia in rats. **Physiol Behav**, 226, p. 113127, Nov 1 2020.
- AUGUSTIN, S. M.; LOEWINGER, G. C.; O'NEAL, T. J.; KRAVITZ, A. V. *et al.* Dopamine D2 receptor signaling on iMSNs is required for initiation and vigor of learned actions. **Neuropsychopharmacology**, 45, n. 12, p. 2087-2097, Nov 2020.
- BALIKI, M. N.; GEHA, P. Y.; FIELDS, H. L.; APKARIAN, A. V. Predicting value of pain and analgesia: nucleus accumbens response to noxious stimuli changes in the presence of chronic pain. **Neuron**, 66, n. 1, p. 149-160, Apr 15 2010.
- BALIKI, M. N.; MANSOUR, A.; BARIA, A. T.; HUANG, L. *et al.* Parceling human accumbens into putative core and shell dissociates encoding of values for reward and pain. **J Neurosci**, 33, n. 41, p. 16383-16393, Oct 9 2013.
- BALIKI, M. N.; PETRE, B.; TORBEY, S.; HERRMANN, K. M. *et al.* Corticostriatal functional connectivity predicts transition to chronic back pain. **Nat Neurosci**, 15, n. 8, p. 1117-1119, Jul 1 2012.
- BALS-KUBIK, R.; ABLEITNER, A.; HERZ, A.; SHIPPENBERG, T. S. Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. **J Pharmacol Exp Ther**, 264, n. 1, p. 489-495, Jan 1993.
- BARFIELD, R. J.; GEYER, L. A. SEXUAL BEHAVIOR - ULTRASONIC POSTEJACULATORY SONG OF MALE RAT. **Science**, 176, n. 4041, p. 1349+, 1972. Article.
- BARROSO, A. R.; ARAYA, E. I.; DE SOUZA, C. P.; ANDREATINI, R. *et al.* Characterization of rat ultrasonic vocalization in the orofacial formalin test: Influence of the social context. **Eur Neuropsychopharmacol**, 29, n. 11, p. 1213-1226, Nov 2019.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Ann Neurol**, 4, n. 5, p. 451-462, Nov 1978.

- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. **J Comp Neurol**, 187, n. 3, p. 513-531, Oct 1 1979.
- BATHLA, G.; HEGDE, A. N. The trigeminal nerve: an illustrated review of its imaging anatomy and pathology. **Clin Radiol**, 68, n. 2, p. 203-213, Feb 2013.
- BECERRA, L.; BORSOOK, D. Signal valence in the nucleus accumbens to pain onset and offset. **Eur J Pain**, 12, n. 7, p. 866-869, Oct 2008.
- BECERRA, L.; BREITER, H. C.; WISE, R.; GONZALEZ, R. G. *et al.* Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. **Neuron**, 32, n. 5, p. 927-946, Dec 2001. Review.
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, 46, n. 6, p. 575-605, Aug 1995.
- BENARROCH, E. E. Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. **Neurology**, 78, n. 3, p. 210-217, Jan 17 2012.
- BENOLIEL, R.; ELIAV, E.; IADAROLA, M. J. Neuropeptide Y in trigeminal ganglion following chronic constriction injury of the rat infraorbital nerve: is there correlation to somatosensory parameters? **Pain**, 91, n. 1-2, p. 111-121, Mar 2001.
- BERRIDGE, K. C.; ROBINSON, T. E. Parsing reward. **Trends Neurosci**, 26, n. 9, p. 507-513, Sep 2003.
- BIALY, M.; RYDZ, M.; KACZMAREK, L. Precontact 50-kHz vocalizations in male rats during acquisition of sexual experience. **Behav Neurosci**, 114, n. 5, p. 983-990, Oct 2000.
- BIRD, E. V.; IANNITTI, T.; CHRISTMAS, C. R.; OBARA, I. *et al.* A Novel Role for Lymphotoxin (XCL1) Signaling in the Nervous System: XCL1 Acts via its Receptor XCR1 to Increase Trigeminal Neuronal Excitability. **Neuroscience**, 379, p. 334-349, May 21 2018.
- BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; AGULLANA, R.; WEISS, S. M. 22 KHZ ALARM CRIES TO PRESENTATION OF A PREDATOR, BY LABORATORY RATS LIVING IN VISIBLE BURROW SYSTEMS. **Physiol Behav**, 50, n. 5, p. 967-972, Nov 1991. Article.
- BOBADE, V.; BODHANKAR, S. L.; ASWAR, U.; MOHAN, V. *et al.* Prophylactic effects of asiaticoside-based standardized extract of *Centella asiatica* (L.) Urban leaves on experimental migraine: Involvement of 5HT_{1A/1B} receptors. **Chin J Nat Med**, 13, n. 4, p. 274-282, Apr 2015. Article.
- BRITT, J. P.; BENALIOUAD, F.; MCDEVITT, R. A.; STUBER, G. D. *et al.* Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. **Neuron**, 76, n. 4, p. 790-803, Nov 21 2012.
- BROMBERG-MARTIN, E. S.; MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. **Neuron**, 68, n. 5, p. 815-834, Dec 9 2010.
- BRUDZYNSKI, S. M. Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches. **Ilar j**, 50, n. 1, p. 43-50, 2009.
- BRUDZYNSKI, S. M. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. **Curr Neuropharmacol**, 13, n. 2, p. 180-192, 2015.
- BRUDZYNSKI, S. M.; GIBSON, B.; SILKSTONE, M.; BURGDORF, J. *et al.* Motor and locomotor responses to systemic amphetamine in three lines of selectively bred Long-Evans rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 100, n. 1, p. 119-124, Nov 2011.
- BRUDZYNSKI, S. M.; SILKSTONE, M.; KOMADOSKI, M.; SCULLION, K. *et al.* Effects of intraaccumbens amphetamine on production of 50 kHz vocalizations in three lines of selectively bred Long-Evans rats. **Behav Brain Res**, 217, n. 1, p. 32-40, Feb 2 2011.

- BUDAI, D.; FIELDS, H. L. Endogenous opioid peptides acting at mu-opioid receptors in the dorsal horn contribute to midbrain modulation of spinal nociceptive neurons. **J Neurophysiol**, 79, n. 2, p. 677-687, Feb 1998.
- BURGDORF, J.; KNUTSON, B.; PANKSEPP, J.; IKEMOTO, S. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Behav Neurosci**, 115, n. 4, p. 940-944, Aug 2001.
- BURGDORF, J.; KROES, R. A.; MOSKAL, J. R.; PFAUS, J. G. *et al.* Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. **J Comp Psychol**, 122, n. 4, p. 357-367, Nov 2008.
- BURGDORF, J.; PANKSEPP, J.; MOSKAL, J. R. Frequency-modulated 50 kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. **Neurosci Biobehav Rev**, 35, n. 9, p. 1831-1836, Oct 2011.
- BURGDORF, J.; WOOD, P. L.; KROES, R. A.; MOSKAL, J. R. *et al.* Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. **Behav Brain Res**, 182, n. 2, p. 274-283, Sep 4 2007.
- BURGOS-ROBLES, A.; KIMCHI, E. Y.; IZADMEHR, E. M.; PORZENHEIM, M. J. *et al.* Amygdala inputs to prefrontal cortex guide behavior amid conflicting cues of reward and punishment. **Nat Neurosci**, 20, n. 6, p. 824-835, Jun 2017.
- BUSHNELL, M. C.; CEKO, M.; LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, 14, n. 7, p. 502-511, Jul 2013.
- CALVINO, B.; BESSON, J. M.; BOEHRER, A.; DEPAULIS, A. Ultrasonic vocalization (22-28 kHz) in a model of chronic pain, the arthritic rat: Effects of analgesic drugs. **Neuroreport**, 7, n. 2, p. 581-584, Jan 1996. Article.
- CAMPBELL, F. G.; GRAHAM, J. G.; ZILKHA, K. J. Clinical trial of carbamazepine (tegretol) in trigeminal neuralgia. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 29, n. 3, p. 265-267, Jun 1966.
- CHA, M.; SALLEM, I.; JANG, H. W.; JUNG, I. Y. Role of transient receptor potential vanilloid type 1 in the trigeminal ganglion and brain stem following dental pulp inflammation. **Int Endod J**, 53, n. 1, p. 62-71, Jan 2020.
- CHANG, P. C.; POLLEMA-MAYS, S. L.; CENTENO, M. V.; PROCISSI, D. *et al.* Role of nucleus accumbens in neuropathic pain: linked multi-scale evidence in the rat transitioning to neuropathic pain. **Pain**, 155, n. 6, p. 1128-1139, Jun 2014.
- CHAPMAN, C. R.; VIERCK, C. J. The Transition of Acute Postoperative Pain to Chronic Pain: An Integrative Overview of Research on Mechanisms. **J Pain**, 18, n. 4, p. 359.e351-359.e338, Apr 2017.
- CHATTIPAKORN, S. C.; SIGURDSSON, A.; LIGHT, A. R.; NARHI, M. *et al.* Trigeminal c-Fos expression and behavioral responses to pulpal inflammation in ferrets. **Pain**, 99, n. 1-2, p. 61-69, Sep 2002.
- CHEN, Y. C.; BARONIO, D.; SEMENOVA, S.; ABDURAKHMANOVA, S. *et al.* Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor Regulates Multiple Neuronal Subtypes and Behavior. **J Neurosci**, 40, n. 32, p. 6146-6164, Aug 5 2020.
- CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **Br J Pharmacol**, 141, n. 7, p. 1175-1184, Apr 2004. Article.
- CHICHORRO, J. G.; PORRECA, F.; SESSLE, B. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, 37, n. 7, p. 613-626, Jun 2017. Review.

- CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; CABRINI, D. A.; FRANCO, C. R. C. *et al.* Mechanisms operated by endothelin ET(A) and ET(B) receptors in the trigeminal ganglion contribute to orofacial thermal hyperalgesia induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Neuropeptides**, 43, n. 2, p. 133-142, Apr 2009. Article.
- CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ETB receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Exper Biol Med**, 231, n. 6, p. 1136-1140, Jun 2006. Article; Proceedings Paper.
- CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E. P.; RAE, G. A. Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain**, 123, n. 1-2, p. 64-74, Jul 2006. Article.
- CHUNG, L. A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal. **Dev Reprod**, 19, n. 2, p. 61-67, Jun 2015.
- CLAVELOU, P.; DALLEL, R.; ORLIAGUET, T.; WODA, A. *et al.* The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**, 62, n. 3, p. 295-301, Sep 1995.
- CLAVELOU, P.; PAJOT, J.; DALLEL, R.; RABOISSON, P. APPLICATION OF THE FORMALIN TEST TO THE STUDY OF OROFACIAL PAIN IN THE RAT. **Neurosci Lett**, 103, n. 3, p. 349-353, Sep 1989. Article.
- DAHLHAMER, J.; LUCAS, J.; ZELAYA, C.; NAHIN, R. *et al.* Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults - United States, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 67, n. 36, p. 1001-1006, Sep 14 2018.
- DAI, R. P.; LI, C. Q.; ZHANG, J. W.; LI, F. *et al.* Biphasic activation of extracellular signal-regulated kinase in anterior cingulate cortex distinctly regulates the development of pain-related anxiety and mechanical hypersensitivity in rats after incision. **Anesthesiology**, 115, n. 3, p. 604-613, Sep 2011.
- DALLEL, R.; RABOISSON, P.; CLAVELOU, P.; SAADE, M. *et al.* EVIDENCE FOR A PERIPHERAL ORIGIN OF THE TONIC NOCICEPTIVE RESPONSE TO SUBCUTANEOUS FORMALIN. **Pain**, 61, n. 1, p. 11-16, Apr 1995. Article.
- DAUBNER, S. C.; LE, T.; WANG, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. **Arch Biochem Biophys**, 508, n. 1, p. 1-12, Apr 1 2011.
- DAVIS, M. Anatomic and physiologic substrates of emotion in an animal model. **J Clin Neurophysiol**, 15, n. 5, p. 378-387, Sep 1998.
- DE OLIVEIRA, S. B.; ARAYA, E. I.; GAMBETA, E.; FERREIRA, L. E. N. *et al.* Comparison of antinociceptive effects of plain lidocaine versus lidocaine complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in animal models of acute and persistent orofacial pain. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 392, n. 5, p. 573-583, May 2019.
- DE TOLEDO, I. P.; REUS, J. C.; FERNANDES, M.; PORPORATTI, A. L. *et al.* Prevalence of trigeminal neuralgia A systematic review. **J. Am. Dent. Assoc.**, 147, n. 7, p. 570-+, Jul 2016. Review.
- DEFELICE, M.; EYDE, N.; DODICK, D.; DUSSOR, G. O. *et al.* Capturing the Aversive State of Cephalic Pain Preclinically. **Ann. Neurol.**, 74, n. 2, p. 257-265, Aug 2013. Article.
- DEGROOT, S. R.; ZHAO-SHEA, R.; CHUNG, L.; KLENOWSKI, P. M. *et al.* Midbrain Dopamine Controls Anxiety-like Behavior by Engaging Unique Interpeduncular Nucleus Microcircuitry. **Biol Psychiatry**, 88, n. 11, p. 855-866, Dec 1 2020.
- DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Front Mol Neurosci**, 10, p. 284, 2017.

- DEVOR, M.; AMIR, R.; RAPPAPORT, Z. H. Pathophysiology of trigeminal neuralgia: the ignition hypothesis. **Clin J Pain**, 18, n. 1, p. 4-13, Jan-Feb 2002.
- DINH, H. K.; LARKIN, A.; GATLIN, L.; PIEPMEIER, E. Rat ultrasound model for measuring pain resulting from intramuscularly injected antimicrobials. **Pda J Pharm Sci Technol**, 53, n. 1, p. 40-43, Jan-Feb 1999. Article.
- DOS REIS, R. C.; KOPRUSZINSKI, C. M.; NONES, C. F. M.; AGUIAR, D. A. *et al.* The opposing contribution of neurotrophin-3 and nerve growth factor to orofacial heat hyperalgesia in rats. **Behav Pharmacol**, 31, n. 1, p. 27-33, Feb 2020.
- DOSSANTOS, M. F.; MOURA, B. S.; DASILVA, A. F. Reward Circuitry Plasticity in Pain Perception and Modulation. **Front Pharmacol**, 8, p. 790, 2017.
- DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest**, 120, n. 11, p. 3760-3772, Nov 2010.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. FORMALIN TEST - QUANTITATIVE STUDY OF ANALGESIC EFFECTS OF MORPHINE, MEPERIDINE, AND BRAIN-STEM STIMULATION IN RATS AND CATS. **Pain**, 4, n. 2, p. 161-174, 1977. Article.
- EASTON, N.; STEWARD, C.; MARSHALL, F.; FONE, K. *et al.* Effects of amphetamine isomers, methylphenidate and atomoxetine on synaptosomal and synaptic vesicle accumulation and release of dopamine and noradrenaline in vitro in the rat brain. **Neuropharmacology**, 52, n. 2, p. 405-414, Feb 2007.
- EL-TALLAWY, H. N.; FARGHALY, W. M.; RAGEH, T. A.; SHEHATA, G. A. *et al.* Prevalence of trigeminal neuralgia in Al-Quseir city (Red sea Governorate), Egypt. **Clin. Neurol. Neurosurg**, 115, n. 9, p. 1792-1794, Sep 2013. Article.
- FAN, J.; GANDINI, M. A.; ZHANG, F. X.; CHEN, L. *et al.* Down-regulation of T-type Cav3.2 channels by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 (HCN1): Evidence of a signaling complex. **Channels (Austin)**, 11, n. 5, p. 434-443, Sep 3 2017.
- FARDIN, V.; OLIVERAS, J. L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. II. Differential characteristics of the analgesia induced by ventral and dorsal PAG stimulation. **Brain Res**, 306, n. 1-2, p. 125-139, Jul 23 1984.
- FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nat Rev Neurosci**, 5, n. 7, p. 565-575, Jul 2004.
- FIELDS, H. L. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. **Prog Brain Res**, 122, p. 245-253, 2000.
- FINK, B. R.; KISH, S. J.; BYERS, M. R. Rapid axonal transport in trigeminal nerve of rat. **Brain Res**, 90, n. 1, p. 85-95, Jun 6 1975.
- FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. **Fundam Clin Pharmacol**, 21, n. 2, p. 129-136, Apr 2007. Review.
- FLECKENSTEIN, A. E.; VOLZ, T. J.; RIDDLE, E. L.; GIBB, J. W. *et al.* New insights into the mechanism of action of amphetamines. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 47, p. 681-698, 2007.
- FOX, R. J.; SORENSON, C. A. Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. **Brain Res**, 648, n. 2, p. 215-221, Jun 20 1994.
- GAMBETA, E.; BATISTA, M. A.; MASCHIO, G. P.; TURNES, J. M. *et al.* Anxiety- but not depressive-like behaviors are related to facial hyperalgesia in a model of trigeminal neuropathic pain in rats. **Physiol Behav**, 191, p. 131-137, Jul 1 2018.

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M. *et al.* Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neurosci Lett**, 619, p. 100-105, Apr 2016. Article.

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M. *et al.* Facial pain and anxiety-like behavior are reduced by pregabalin in a model of facial carcinoma in rats. **Neuropharmacology**, 125, p. 263-271, Oct 2017.

GHISELLI, W. B.; LARIVIERE, C. CHARACTERISTICS OF ULTRASONIC VOCALIZATIONS EMITTED BY RATS DURING SHOCK-ELICITED AGGRESSION. **Anim Learn. Behav.**, 5, n. 2, p. 199-202, 1977. Article.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 351, n. 1346, p. 1445-1453, Oct 29 1996.

GROENEWEGEN, H. J.; WRIGHT, C. I.; BEIJER, A. V.; VOORN, P. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. **Ann N Y Acad Sci**, 877, p. 49-63, Jun 29 1999.

GRÉGOIRE, S.; WATTIEZ, A. S.; ETIENNE, M.; MARCHAND, F. *et al.* Monoarthritis-induced emotional and cognitive impairments in rats are sensitive to low systemic doses or intra-amygdala injections of morphine. **Eur J Pharmacol**, 735, p. 1-9, Jul 15 2014.

GUPTA, S.; GAUTAM, M.; PRASOON, P.; KUMAR, R. *et al.* Involvement of Neuropeptide Y in Post-Incisional Nociception in Rats. **Ann Neurosci**, 25, n. 4, p. 268-276, Dec 2018.

HADDAD, M.; PUD, D.; TREISTER, R.; SUZAN, E. *et al.* The effects of a dopamine agonist (apomorphine) on experimental and spontaneous pain in patients with chronic radicular pain: A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. **PLoS One**, 13, n. 4, p. e0195287, 2018.

HAMED, A.; TARACHA, E.; SZYNDLER, J.; KRZAŚCIK, P. *et al.* The effects of morphine and morphine conditioned context on 50 kHz ultrasonic vocalisation in rats. **Behav Brain Res**, 229, n. 2, p. 447-450, Apr 15 2012.

HAN, J. S.; NEUGEBAUER, V. Synaptic plasticity in the amygdala in a visceral pain model in rats. **Neurosci Lett**, 361, n. 1-3, p. 254-257, May 6 2004.

HANEY, M.; MICZEK, K. A. ULTRASOUNDS EMITTED BY FEMALE RATS DURING AGONISTIC INTERACTIONS - EFFECTS OF MORPHINE AND NALTREXONE. **Psychopharmacology**, 114, n. 3, p. 441-448, Apr 1994. Article.

HARTMANN, A.; WELTE-JZYK, C.; AL-NAWAS, B.; DAUBLÄNDER, M. Neurophysiological changes and chronic pain in cleft patients. **J Craniomaxillofac Surg**, 47, n. 12, p. 1875-1880, Dec 2019.

HASHMI, J. A.; BALIKI, M. N.; HUANG, L.; BARIA, A. T. *et al.* Shape shifting pain: chronification of back pain shifts brain representation from nociceptive to emotional circuits. **Brain**, 136, n. Pt 9, p. 2751-2768, Sep 2013.

HEAL, D. J.; SMITH, S. L.; GOSDEN, J.; NUTT, D. J. Amphetamine, past and present--a pharmacological and clinical perspective. **J Psychopharmacol**, 27, n. 6, p. 479-496, Jun 2013.

HENNE, E.; MORRISSEY, S.; CONLON, E. An investigation into the relationship between persistent pain, psychological distress and emotional connectedness. **Psychol Health Med**, 20, n. 6, p. 710-719, 2015.

HIDAKA, K.; ONO, K.; HARANO, N.; SAGO, T. *et al.* Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model. **Neuroscience**, 180, p. 334-343, Apr 28 2011.

- HIMMLER, B. T.; KISKO, T. M.; EUSTON, D. R.; KOLB, B. *et al.* Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? I. Evidence from the timing and context of their use. **Behav Processes**, 106, p. 60-66, Jul 2014.
- HOLMAN, A. J.; MYERS, R. R. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole, a dopamine agonist, in patients with fibromyalgia receiving concomitant medications. **Arthritis Rheum**, 52, n. 8, p. 2495-2505, Aug 2005.
- HONDA, Y.; HANDA, T.; FUKUDA, K. I.; KOUKITA, Y. *et al.* Comparison of Risk Factors in Patients With Acute and Chronic Orofacial Pain. **Anesth Prog**, 65, n. 3, p. 162-167, Fall 2018.
- HORI, M.; SHIMOJU, R.; TOKUNAGA, R.; OHKUBO, M. *et al.* Tickling increases dopamine release in the nucleus accumbens and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent rats. **Neuroreport**, 24, n. 5, p. 241-245, Mar 27 2013.
- HOSOBUCHI, Y.; ADAMS, J. E.; LINCHITZ, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. **Science**, 197, n. 4299, p. 183-186, Jul 8 1977.
- HUANG, J.; GADOTTI, V. M.; CHEN, L.; SOUZA, I. A. *et al.* A neuronal circuit for activating descending modulation of neuropathic pain. **Nat Neurosci**, 22, n. 10, p. 1659-1668, Oct 2019.
- HUNG, C. H.; WANG, J. C. F.; STRICHARTZ, G. R. Spontaneous Chronic Pain After Experimental Thoracotomy Revealed by Conditioned Place Preference: Morphine Differentiates Tactile Evoked Pain From Spontaneous Pain. **J Pain**, 16, n. 9, p. 903-912, Sep 2015. Article.
- IKEDA, Y.; FUNAYAMA, T.; TATENO, A.; FUKAYAMA, H. *et al.* Bupropion increases activation in nucleus accumbens during anticipation of monetary reward. **Psychopharmacology (Berl)**, 236, n. 12, p. 3655-3665, Dec 2019.
- IKEMOTO, S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. **Neurosci Biobehav Rev**, 35, n. 2, p. 129-150, Nov 2010.
- IMAMURA, Y.; KAWAMOTO, H.; NAKANISHI, O. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. **Exp. Brain Res**, 116, n. 1, p. 97-103, Aug 1997. Article.
- IWATA, K.; IMAMURA, Y.; HONDA, K.; SHINODA, M. Physiological mechanisms of neuropathic pain: the orofacial region. **Int Rev Neurobiol**, 97, p. 227-250, 2011.
- JACQUIN, M. F.; HESS, A.; YANG, G.; ADAMO, P. *et al.* Organization of the infraorbital nerve in rat: a quantitative electron microscopic study. **Brain Res**, 290, n. 1, p. 131-135, Jan 2 1984.
- JAGODIC, M. M.; PATHIRATHNA, S.; NELSON, M. T.; MANCUSO, S. *et al.* Cell-specific alterations of T-type calcium current in painful diabetic neuropathy enhance excitability of sensory neurons. **J Neurosci**, 27, n. 12, p. 3305-3316, Mar 21 2007.
- JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, 517, n. 7534, p. 284-292, Jan 15 2015.
- JANNETTA, P. J. Arterial compression of the trigeminal nerve at the pons in patients with trigeminal neuralgia. **J Neurosurg**, 26, n. 1, p. Suppl:159-162, Jan 1967.
- Jl, G.; SUN, H.; FU, Y.; LI, Z. *et al.* Cognitive impairment in pain through amygdala-driven prefrontal cortical deactivation. **J Neurosci**, 30, n. 15, p. 5451-5464, Apr 14 2010.
- JOURDAN, D.; ARDID, D.; CHAPUY, E.; ESCHALIER, A. *et al.* AUDIBLE AND ULTRASONIC VOCALIZATION ELICITED BY SINGLE ELECTRICAL NOCICEPTIVE STIMULI TO THE TAIL IN THE RAT. **Pain**, 63, n. 2, p. 237-249, Nov 1995. Article.

- KALTWASSER, M. T. STARTLE-INDUCING ACOUSTIC STIMULI EVOKE ULTRASONIC VOCALIZATION IN THE RAT. **Physiol Behav**, 48, n. 1, p. 13-17, Jul 1990. Article.
- KANEKO, M.; HAMMOND, D. L. Role of spinal gamma-aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, 282, n. 2, p. 928-938, Aug 1997.
- KANG, J. W. M.; MOR, D.; KEAY, K. A. Nerve injury alters restraint-induced activation of the basolateral amygdala in male rats. **Brain Struct Funct**, Feb 13 2021.
- KARAMAN, S.; KARAMAN, T.; DOGRU, S.; ONDER, Y. *et al.* Prevalence of sleep disturbance in chronic pain. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 18, n. 17, p. 2475-2481, 2014.
- KIMMEY, B. A.; MCCALL, N. M.; WOOLDRIDGE, L. M.; SATTERTHWAITTE, T. D. *et al.* Engaging endogenous opioid circuits in pain affective processes. **J Neurosci Res**, Dec 13 2020.
- KING, T.; VERA-PORTOCARRERO, L.; GUTIERREZ, T.; VANDERAH, T. W. *et al.* Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. **Nature Neurosci**, 12, n. 11, p. 1364-1366, Nov 2009. Article.
- KNUTSON, B.; BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. **J. Comp. Psychol**, 112, n. 1, p. 65-73, Mar 1998. Article.
- KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; GAMBETA, E.; ACCO, A. *et al.* Blockade of endothelin receptors reduces tumor-induced ongoing pain and evoked hypersensitivity in a rat model of facial carcinoma induced pain. **Eur J Pharmacol**, 818, p. 132-140, Jan 5 2018.
- KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; RAE, G. A.; CHICHORRO, J. G. Blockade of peripheral endothelin receptors abolishes heat hyperalgesia and spontaneous nociceptive behavior in a rat model of facial cancer. **Arch Oral Biol**, 97, p. 231-237, Jan 2019.
- KUCHNIAK, K.; WYSZOGRODZKA, E.; CHRAPUSTA, S. J.; CZARNA, M. *et al.* Using anticipatory and drug-evoked appetitive ultrasonic vocalization for monitoring the rewarding effect of amphetamine in a rat model of drug self-administration. **Behav Brain Res**, 376, p. 112187, Dec 30 2019.
- KUCYI, A.; DAVIS, K. D. The dynamic pain connectome. **Trends Neurosci**, 38, n. 2, p. 86-95, Feb 2015.
- LAMMEL, S.; LIM, B. K.; RAN, C.; HUANG, K. W. *et al.* Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. **Nature**, 491, n. 7423, p. 212-217, Nov 8 2012.
- LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, 10, n. 9, p. 895-926, Sep 2009.
- LAVIGNE, G. J.; SESSLE, B. J. The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and Their Interactions. **J Dent Res**, 95, n. 10, p. 1109-1116, Sep 2016.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, 23, p. 155-184, 2000.
- LEKNES, S.; TRACEY, I. A common neurobiology for pain and pleasure. **Nat Rev Neurosci**, 9, n. 4, p. 314-320, Apr 2008.
- LI, C.; LIU, S.; LU, X.; TAO, F. Role of Descending Dopaminergic Pathways in Pain Modulation. **Curr Neuropharmacol**, 17, n. 12, p. 1176-1182, 2019.
- LI, C. Q.; ZHANG, J. W.; DAI, R. P.; WANG, J. *et al.* Surgical incision induces anxiety-like behavior and amygdala sensitization: effects of morphine and gabapentin. **Pain Res Treat**, 2010, p. 705874, 2010.
- LIM, D. W.; KIM, J. G.; HAN, D.; KIM, Y. T. Analgesic Effect of Harpagophytum procumbens on Postoperative and Neuropathic Pain in Rats. **Molecules**, 19, n. 1, p. 1060-1068, Jan 2014. Article.

- LITVIN, Y.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Rat 22kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. **Behav Brain Res**, 182, n. 2, p. 166-172, Sep 4 2007.
- LIU, J.; DAI, J.; E, L.; WANG, D. *et al.* Trigeminal neuralgia may be caused by abnormality of the trigger zone. **Med Hypotheses**, 74, n. 5, p. 818-819, May 2010.
- LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, 353, n. 9164, p. 1607-1609, May 1999. Article.
- LORE, R.; FLANNELLY, K.; FARINA, P. ULTRASOUNDS PRODUCED BY RATS ACCOMPANY DECREASES IN INTRASPECIFIC FIGHTING. **Aggress Behav**, 2, n. 3, p. 175-181, 1976. Article.
- LUO, C.; ZHANG, Y. L.; LUO, W.; ZHOU, F. H. *et al.* Differential effects of general anesthetics on anxiety-like behavior in formalin-induced pain: involvement of ERK activation in the anterior cingulate cortex. **Psychopharmacology (Berl)**, 232, n. 24, p. 4433-4444, Dec 2015.
- MAARBJERG, S.; GOZALOV, A.; OLESEN, J.; BENDTSEN, L. Trigeminal neuralgia--a prospective systematic study of clinical characteristics in 158 patients. **Headache**, 54, n. 10, p. 1574-1582, Nov-Dec 2014.
- MARGOLIS, E. B.; HJELMSTAD, G. O.; BONCI, A.; FIELDS, H. L. Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons. **J Neurosci**, 23, n. 31, p. 9981-9986, Nov 5 2003.
- MARTINEZ, S.; BELMONTE, C. C-Fos expression in trigeminal nucleus neurons after chemical irritation of the cornea: reduction by selective blockade of nociceptor chemosensitivity. **Exp Brain Res**, 109, n. 1, p. 56-62, Apr 1996.
- MARTINO, G.; PERKINS, M. N. Tactile-induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel assay to assess anti-migraine therapies in vivo. **Cephalalgia**, 28, n. 7, p. 723-733, Jul 2008. Article.
- MARTÍNEZ-ROJAS, V. A.; BARRAGÁN-IGLESIAS, P.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; MURBARTIÁN, J. *et al.* Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia. **Pharmacol Rep**, 66, n. 6, p. 964-971, Dec 2014.
- MARTÍNEZ-ROJAS, V. A.; GARCÍA, G.; NORIEGA-NAVARRO, R.; GUZMÁN-PRIEGO, C. G. *et al.* Peripheral and spinal TRPA1 channels contribute to formalin-induced long-lasting mechanical hypersensitivity. **J Pain Res**, 11, p. 51-60, 2018.
- MATHEWS, I. Z.; MCCORMICK, C. M. Female and male rats in late adolescence differ from adults in amphetamine-induced locomotor activity, but not in conditioned place preference for amphetamine. **Behav Pharmacol**, 18, n. 7, p. 641-650, Nov 2007.
- MEAGHER, M. W.; ARNAU, R. C.; RHUDY, J. L. Pain and emotion: effects of affective picture modulation. **Psychosom Med**, 63, n. 1, p. 79-90, Jan-Feb 2001.
- MEREDITH, G. E.; PATTISELANNO, A.; GROENEWEGEN, H. J.; HABER, S. N. Shell and core in monkey and human nucleus accumbens identified with antibodies to calbindin-D28k. **J Comp Neurol**, 365, n. 4, p. 628-639, Feb 19 1996.
- METZ, A. E.; YAU, H. J.; CENTENO, M. V.; APKARIAN, A. V. *et al.* Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 7, p. 2423-2428, Feb 17 2009.
- METZ, R.; BANNISTER, A. J.; SUTHERLAND, J. A.; HAGEMEIERS, C. *et al.* c-Fos-induced activation of a TATA-box-containing promoter involves direct contact with TATA-box-binding protein. **Mol Cell Biol**, 14, n. 9, p. 6021-6029, Sep 1994.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, 66, n. 6, p. 355-474, Apr 2002.

- MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nat Rev Neurosci**, 10, n. 4, p. 283-294, Apr 2009.
- MOLONY, V.; KENT, J. E. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. **J Anim Sci**, 75, n. 1, p. 266-272, Jan 1997.
- MONTANO, N.; CONFORTI, G.; DI BONAVENTURA, R.; MEGLIO, M. *et al.* Advances in diagnosis and treatment of trigeminal neuralgia. **Ther Clin Risk Manag**, 11, p. 289-299, 2015.
- MOREAU, J. L.; FIELDS, H. L. Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. **Brain Res**, 397, n. 1, p. 37-46, Nov 5 1986.
- MORGAN, M. M.; CLAYTON, C. C.; LANE, D. A. Behavioral evidence linking opioid-sensitive GABAergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray to morphine tolerance. **Neuroscience**, 118, n. 1, p. 227-232, 2003.
- MORGAN, M. M.; WHITTIER, K. L.; HEGARTY, D. M.; AICHER, S. A. Periaqueductal gray neurons project to spinally projecting GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. **Pain**, 140, n. 2, p. 376-386, Nov 30 2008.
- MORONE, N. E.; WEINER, D. K. Pain as the fifth vital sign: exposing the vital need for pain education. **Clin Ther**, 35, n. 11, p. 1728-1732, Nov 2013.
- MOTEVASSELLI, T.; REZAYOF, A.; ZARRINDAST, M. R.; NAYER-NOURI, T. Role of ventral hippocampal NMDA receptors in anxiolytic-like effect of morphine. **Physiol Behav**, 101, n. 5, p. 608-613, Dec 2 2010.
- MULVIHILL, K. G.; BRUDZYNSKI, S. M. Effect of microinjections of dopamine into the nucleus accumbens shell on emission of 50 kHz USV: Comparison with effects of d-amphetamine. **Pharmacol Biochem Behav**, 176, p. 23-32, Jan 2019.
- NADER, K.; VAN DER KOOY, D. Deprivation state switches the neurobiological substrates mediating opiate reward in the ventral tegmental area. **J Neurosci**, 17, n. 1, p. 383-390, Jan 1 1997.
- NAKATA, H.; TAMURA, Y.; SAKAMOTO, K.; AKATSUKA, K. *et al.* Evoked magnetic fields following noxious laser stimulation of the thigh in humans. **Neuroimage**, 42, n. 2, p. 858-868, Aug 15 2008.
- NAVRATILOVA, E.; MORIMURA, K.; XIE, J. Y.; ATCHERLEY, C. W. *et al.* Positive emotions and brain reward circuits in chronic pain. **J Comp Neurol**, 524, n. 8, p. 1646-1652, Jun 1 2016.
- NAVRATILOVA, E.; XIE, J. Y.; KING, T.; PORRECA, F. Evaluation of reward from pain relief. *In*: UHL, G. R. (Ed.). **Addiction Rev**. Oxford: Blackwell Science Publ, 2013. v. 1282, p. 1-11. (Annals of the New York Academy of Sciences).
- NAVRATILOVA, E.; XIE, J. Y.; MESKE, D.; QU, C. *et al.* Endogenous opioid activity in the anterior cingulate cortex is required for relief of pain. **J Neurosci**, 35, n. 18, p. 7264-7271, May 6 2015.
- NAVRATILOVA, E.; XIE, J. Y.; OKUN, A.; QU, C. L. *et al.* Pain relief produces negative reinforcement through activation of mesolimbic reward-valuation circuitry. **PNAS**, 109, n. 50, p. 20709-20713, Dec 2012. Article.
- NEMOTO, W.; YAMADA, K.; OGATA, Y.; NAKAGAWASAI, O. *et al.* Chondroitin sulfate attenuates formalin-induced persistent tactile allodynia. **J Pharmacol Sci**, 131, n. 4, p. 275-278, Aug 2016.
- NEUGEBAUER, V.; LI, W.; BIRD, G. C.; HAN, J. S. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, 10, n. 3, p. 221-234, Jun 2004.
- NONES, C. F. M.; CLAUDINO, R. F.; FERREIRA, L. E. N.; DOS REIS, R. C. *et al.* Descending facilitatory pain pathways mediate ongoing pain and tactile hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Neurosci Lett**, 644, p. 18-23, Mar 2017. Article.

- NONES, C. F. M.; REIS, R. C.; JESUS, C. H. A.; VERONEZ, D. A. D. *et al.* Orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brain Research**, 1501, p. 56-67, Mar 2013. Article.
- OKAMOTO, K.; IMBE, H.; TASHIRO, A.; KUMABE, S. *et al.* Blockade of peripheral 5HT₃ receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. **Neurosci Lett**, 367, n. 2, p. 259-263, Sep 2 2004.
- OKUN, A.; DEFELICE, M.; EYDE, N.; REN, J. Y. *et al.* Transient inflammation-induced ongoing pain is driven by TRPV1 sensitive afferents. **Molecular Pain**, 7, p. 11, Jan 2011. Article.
- OKUN, A.; LIU, P.; DAVIS, P.; REN, J. Y. *et al.* Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. **Pain**, 153, n. 4, p. 924-933, Apr 2012. Article.
- OLIVEIRA, A. R.; BARROS, H. M. T. Ultrasonic rat vocalizations during the formalin test: A measure of the affective dimension of pain? **Anesth Anal**, 102, n. 3, p. 832-839, Mar 2006. Article.
- OLIVEIRA, M. A.; PRADO, W. A. Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats. **Brain Res Bull**, 54, n. 1, p. 55-63, Jan 1 2001.
- ONG, W. Y.; STOHLER, C. S.; HERR, D. R. Role of the Prefrontal Cortex in Pain Processing. **Mol Neurobiol**, 56, n. 2, p. 1137-1166, Feb 2019.
- ONGÜR, D.; PRICE, J. L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cereb Cortex**, 10, n. 3, p. 206-219, Mar 2000.
- OZAWA, T.; YCU, E. A.; KUMAR, A.; YEH, L. F. *et al.* A feedback neural circuit for calibrating aversive memory strength. **Nat Neurosci**, 20, n. 1, p. 90-97, Jan 2017.
- PAK, D. J.; YONG, R. J.; KAYE, A. D.; URMAN, R. D. Chronification of Pain: Mechanisms, Current Understanding, and Clinical Implications. **Curr Pain Headache Rep**, 22, n. 2, p. 9, Feb 5 2018.
- PAN, B.; YU, H. W.; FISCHER, G. J.; KRAMER, J. M. *et al.* Dorsal Root Ganglionic Field Stimulation Relieves Spontaneous and Induced Neuropathic Pain in Rats. **J Pain**, 17, n. 12, p. 1349-1358, Dec 2016. Article.
- PAN, Z. Z. mu-Opposing actions of the kappa-opioid receptor. **Trends Pharmacol Sci**, 19, n. 3, p. 94-98, Mar 1998.
- PANKSEPP, J. Neuroevolutionary sources of laughter and social joy: modeling primate human laughter in laboratory rats. **Behav Brain Res**, 182, n. 2, p. 231-244, Sep 4 2007.
- PANKSEPP, J.; BURGDORF, J. 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. **Behav Brain Res**, 115, n. 1, p. 25-38, Oct 2000.
- PARSANA, A. J.; MORAN, E. E.; BROWN, T. H. Rats learn to freeze to 22-kHz ultrasonic vocalizations through autoconditioning. **Behav Brain Res**, 232, n. 2, p. 395-399, Jul 1 2012.
- 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. **J Neurosci. Methods**, 14, n. 3, p. 149-167, 1985. Article.
- PEREIRA, M.; ANDREATINI, R.; SCHWARTING, R. K. W.; BRENES, J. C. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? **Psychopharmacology**, 231, n. 13, p. 2567-2577, Jul 2014. Article.
- PERGOLIZZI, J. V.; MAGNUSSON, P.; LEQUANG, J. A.; GHARIBO, C. *et al.* The pharmacological management of dental pain. **Expert Opin Pharmacother**, 21, n. 5, p. 591-601, Apr 2020.

- PHILLIPS, A. G.; LEPIANE, F. G. Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. **Pharmacol Biochem Behav**, 12, n. 6, p. 965-968, Jun 1980.
- PITCHER, M. H.; TARUM, F.; LEHMANN, M.; BUSHNELL, M. C. Persistent inflammatory pain alters sexually-motivated behavior in male rats. **Behav Brain Res**, 356, p. 380-389, Jan 1 2019.
- PORRO, C. A.; BARALDI, P.; PAGNONI, G.; SERAFINI, M. *et al.* Does anticipation of pain affect cortical nociceptive systems? **J Neurosci**, 22, n. 8, p. 3206-3214, Apr 15 2002.
- QU, C. L.; KING, T.; OKUN, A.; LAI, J. *et al.* Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. **Pain**, 152, n. 7, p. 1641-1648, Jul 2011. Article.
- RABOISSON, P.; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neurosci Biobehav Rev**, 28, n. 2, p. 219-226, Apr 2004.
- RAJA, S. N.; CARR, D. B.; COHEN, M.; FINNERUP, N. B. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, 161, n. 9, p. 1976-1982, Sep 1 2020.
- RAMIREZ, F.; MOSCARELLO, J. M.; LEDOUX, J. E.; SEARS, R. M. Active avoidance requires a serial basal amygdala to nucleus accumbens shell circuit. **J Neurosci**, 35, n. 8, p. 3470-3477, Feb 25 2015.
- RENTON, T.; YILMAZ, Z. Profiling of patients presenting with posttraumatic neuropathy of the trigeminal nerve. **J Orofac Pain**, 25, n. 4, p. 333-344, Fall 2011.
- 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**, 103, n. 3, p. 460-466, Jan 2013.
- RIPPBERGER, H.; VAN GAALEN, M. M.; SCHWARTING, R. K. W.; WOHR, M. Environmental and Pharmacological Modulation of Amphetamine-Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. **Current Neuropharmacology**, 13, n. 2, p. 220-232, 2015. Article.
- RO, J. Y.; CAPRA, N. F.; MASRI, R. Contribution of peripheral N-methyl-D-aspartate receptors to c-fos expression in the trigeminal spinal nucleus following acute masseteric inflammation. **Neuroscience**, 123, n. 1, p. 213-219, 2004.
- RODRIGUEZ, E.; SAKURAI, K.; XU, J. N.; CHEN, Y. *et al.* A craniofacial-specific monosynaptic circuit enables heightened affective pain. **Nature Neuroscience**, 20, n. 12, p. 1734+, Dec 2017. Article.
- ROESKA, K.; DOODS, H.; ARNDT, K.; TREEDE, R. D. *et al.* Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. **Pain**, 139, n. 2, p. 349-357, Oct 15 2008.
- ROSLAND, J. H.; TJØLSEN, A.; MÆHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, 42, n. 2, p. 235-242, Aug 1990.
- ROZEN, T. D. Trigeminal neuralgia and glossopharyngeal neuralgia. **Neurologic Clinics**, 22, n. 1, p. 185+, Feb 2004. Article.
- SADANANDA, M.; WOHR, M.; SCHWARTING, R. K. W. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. **Neurosci Lett**, 435, n. 1, p. 17-23, Apr 2008. Article.
- SAGO, T.; ONO, K.; HARANO, N.; FURUTA-HIDAKA, K. *et al.* Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model. **Brain Res**, 1457, p. 70-80, May 31 2012.

- SALES, G. D. ULTRASOUND AND AGGRESSIVE BEHAVIOR IN RATS AND OTHER SMALL MAMMALS. **Anim Behav**, 20, n. FEB, p. 88-+, 1972. Article.
- SALINAS-ABARCA, A. B.; AVILA-ROJAS, S. H.; BARRAGÁN-IGLESIAS, P.; PINEDA-FARIAS, J. B. *et al.* Formalin injection produces long-lasting hypersensitivity with characteristics of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, 797, p. 83-93, Feb 15 2017.
- SCHUG, S. A.; LAVAND'HOMME, P.; BARKE, A.; KORWISI, B. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic postsurgical or posttraumatic pain. **Pain**, 160, n. 1, p. 45-52, Jan 2019.
- SCHWARTING, R. K. W.; JEGAN, N.; WOHR, M. Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. **Behav Brain Res**, 182, n. 2, p. 208-222, Sep 2007. Article.
- SEFFER, D.; SCHWARTING, R. K.; WÖHR, M. Pro-social ultrasonic communication in rats: insights from playback studies. **J Neurosci Methods**, 234, p. 73-81, Aug 30 2014.
- SEMINOWICZ, D. A.; LAFERRIERE, A. L.; MILLECAMP, M.; YU, J. S. *et al.* MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. **Neuroimage**, 47, n. 3, p. 1007-1014, Sep 2009.
- SENO, M. D. J.; ASSIS, D. V.; GOUVEIA, F.; ANTUNES, G. F. *et al.* The critical role of amygdala subnuclei in nociceptive and depressive-like behaviors in peripheral neuropathy. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 13608, Sep 11 2018.
- SERAFINI, R. A.; PRYCE, K. D.; ZACHARIOU, V. The Mesolimbic Dopamine System in Chronic Pain and Associated Affective Comorbidities. **Biol Psychiatry**, 87, n. 1, p. 64-73, Jan 1 2020.
- SESACK, S. R.; GRACE, A. A. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. **Neuropsychopharmacology**, 35, n. 1, p. 27-47, Jan 2010.
- SESSLE, B. J. Neurophysiology of orofacial pain. **Dent Clin North Am**, 31, n. 4, p. 595-613, Oct 1987.
- 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, n. 1, p. 57-91, Feb 2000. Review.
- SESSLE, B. J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. **J. Oral Rehabil.**, 33, n. 4, p. 243-261, Apr 2006. Article; Proceedings Paper.
- SESSLE, B. J. PERIPHERAL AND CENTRAL MECHANISMS OF OROFACIAL INFLAMMATORY PAIN. *In*: KOBAYASHI, M.; KOSHIKAWA, N., *et al* (Ed.). **Translating Mechanisms of Orofacial Neurological Disorder**. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, 2011. v. 97, p. 179-206. (International Review of Neurobiology).
- SESSLE, B. J.; YAO, D.; NISHIURA, H.; YOSHINO, K. *et al.* Properties and plasticity of the primate somatosensory and motor cortex related to orofacial sensorimotor function. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol**, 32, n. 1-2, p. 109-114, Jan-Feb 2005. Article; Proceedings Paper.
- SHANG, L.; XU, T. L.; LI, F.; SU, J. *et al.* Temporal dynamics of anxiety phenotypes in a dental pulp injury model. **Mol Pain**, 11, p. 40, Jun 30 2015.
- SHUEB, S. S.; NIXDORF, D. R.; JOHN, M. T.; ALONSO, B. F. *et al.* What is the impact of acute and chronic orofacial pain on quality of life? **J Dent**, 43, n. 10, p. 1203-1210, Oct 2015.
- SILKSTONE, M.; BRUDZYNSKI, S. M. Dissimilar interaction between dopaminergic and cholinergic systems in the initiation of emission of 50-kHz and 22-kHz vocalizations. **Pharmacol Biochem Behav**, 188, p. 172815, Jan 2020.

- SIMOLA, N. Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease. **Curr Neuropharmacol**, 13, n. 2, p. 164-179, 2015.
- STUGINSKI-BARBOSA, J.; RODRIGUES, G. G.; BIGAL, M. E.; SPECIALI, J. G. Burning mouth syndrome responsive to pramipexol. **J Headache Pain**, 9, n. 1, p. 43-45, Feb 2008.
- TAPPE-THEODOR, A.; KUNER, R. Studying ongoing and spontaneous pain in rodents--challenges and opportunities. **Eur J Neurosci**, 39, n. 11, p. 1881-1890, Jun 2014.
- TAT, Q. L.; JOKSIMOVIC, S. M.; KRISHNAN, K.; COVEY, D. F. *et al.* Preemptive Analgesic Effect of Intrathecal Applications of Neuroactive Steroids in a Rodent Model of Post-Surgical Pain: Evidence for the Role of T-Type Calcium Channels. **Cells**, 9, n. 12, Dec 12 2020.
- THOMAS, D. A.; BARFIELD, R. J. ULTRASONIC VOCALIZATION OF THE FEMALE RAT (*RATTUS-NORVEGICUS*) DURING MATING. **Anim Behav**, 33, n. AUG, p. 720-725, 1985. Article.
- THOMAS, K. L.; VILENSKY, J. A. The Anatomy of Vascular Compression in Trigeminal Neuralgia. **Clin Anat**, 27, n. 1, p. 89-93, Jan 2014. Review.
- THOMPSON, B.; LEONARD, K. C.; BRUDZYNSKI, S. M. Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: a quantitative mapping study and acoustic analysis. **Behav Brain Res**, 168, n. 1, p. 64-73, Mar 15 2006.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H. *et al.* THE FORMALIN TEST - AN EVALUATION OF THE METHOD. **Pain**, 51, n. 1, p. 5-17, Oct 1992. Review.
- TOVOTE, P.; ESPOSITO, M. S.; BOTTA, P.; CHAUDUN, F. *et al.* Midbrain circuits for defensive behaviour. **Nature**, 534, n. 7606, p. 206-212, Jun 9 2016.
- TZSCHENTKE, T. M. The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. **Amino Acids**, 19, n. 1, p. 211-219, 2000.
- URATA, K.; SHINODA, M.; HONDA, K.; LEE, J. *et al.* Involvement of TRPV1 and TRPA1 in Incisional Intraoral and Extraoral Pain. **J Dental Res**, 94, n. 3, p. 446-454, Mar 2015. Article.
- VAN KLEEF, M.; VAN GENDEREN, W. E.; NAROUZE, S.; NURMIKKO, T. J. *et al.* 1. Trigeminal Neuralgia. **Pain Practice**, 9, n. 4, p. 252-259, Jul-Aug 2009. Article.
- VANDER WEELE, C. M.; SICILIANO, C. A.; MATTHEWS, G. A.; NAMBURI, P. *et al.* Dopamine enhances signal-to-noise ratio in cortical-brainstem encoding of aversive stimuli. **Nature**, 563, n. 7731, p. 397-401, Nov 2018.
- VAUGHAN, C. W.; INGRAM, S. L.; CONNOR, M. A.; CHRISTIE, M. J. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. **Nature**, 390, n. 6660, p. 611-614, Dec 11 1997.
- VIVIAN, J. A.; MICZEK, K. A. ULTRASOUNDS DURING MORPHINE-WITHDRAWAL IN RATS. **Psychopharmacology**, 104, n. 2, p. 187-193, 1991. Article.
- VIVIAN, J. A.; MICZEK, K. A. MORPHINE ATTENUATES ULTRASONIC VOCALIZATION DURING AGONISTIC ENCOUNTERS IN ADULT MALE-RATS. **Psychopharmacology**, 111, n. 3, p. 367-375, Jun 1993. Article.
- VOS, B.; MACIEWICZ, R. BEHAVIORAL-CHANGES FOLLOWING LIGATION OF THE INFRAORBITAL NERVE IN RAT - AN ANIMAL-MODEL OF TRIGEMINAL NEUROPATHIC PAIN. **Lesions of Primary Afferent Fibers as a Tool for the Study of Clinical Pain**, 981, p. 147-158, 1991. Proceedings Paper.
- VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. BEHAVIORAL EVIDENCE OF TRIGEMINAL NEUROPATHIC PAIN FOLLOWING CHRONIC CONSTRICTION INJURY TO THE RATS INFRAORBITAL NERVE. **J Neurosci**, 14, n. 5, p. 2708-2723, May 1994. Review.

- WANG, H.; WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Selective distribution and function of primary afferent nociceptive inputs from deep muscle tissue to the brainstem trigeminal transition zone. **J Comp Neurol**, 498, n. 3, p. 390-402, Sep 20 2006.
- WANG, S.; BRIGOLI, B.; LIM, J.; KARLEY, A. *et al.* Roles of TRPV1 and TRPA1 in Spontaneous Pain from Inflamed Masseter Muscle. **Neuroscience**, 384, p. 290-299, Aug 1 2018.
- WANG, X.; LIANG, H.; ZHOU, C.; XU, M. *et al.* Sensitization induces hypersensitivity in trigeminal nerve. **Clin. Exp. Allergy**, 42, n. 11, p. 1638-1642, Nov 2012. Article.
- WATERS, A. J.; LUMB, B. M. Descending control of spinal nociception from the periaqueductal grey distinguishes between neurons with and without C-fibre inputs. **Pain**, 134, n. 1-2, p. 32-40, Jan 2008.
- WHEELER-ACETO, H.; PORRECA, F.; COWAN, A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. **Pain**, 40, n. 2, p. 229-238, Feb 1990.
- WRIGHT, J. M.; DENG, L.; CLARKE, P. B. Failure of rewarding and locomotor stimulant doses of morphine to promote adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations. **Psychopharmacology (Berl)**, 224, n. 4, p. 477-487, Dec 2012.
- WRIGHT, J. M.; DOBOSIEWICZ, M. R.; CLARKE, P. B. α - and β -Adrenergic receptors differentially modulate the emission of spontaneous and amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult rats. **Neuropsychopharmacology**, 37, n. 3, p. 808-821, Feb 2012.
- WRIGHT, J. M.; DOBOSIEWICZ, M. R. S.; CLARKE, P. B. S. alpha- and beta-Adrenergic Receptors Differentially Modulate the Emission of Spontaneous and Amphetamine-Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Adult Rats. **Neuropsychopharmacology**, 37, n. 3, p. 808-821, Feb 2012. Article.
- WRIGHT, J. M.; GOURDON, J. C.; CLARKE, P. B. Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. **Psychopharmacology (Berl)**, 211, n. 1, p. 1-13, Jul 2010.
- WU, T. H.; HU, L. Y.; LU, T.; CHEN, P. M. *et al.* Risk of psychiatric disorders following trigeminal neuralgia: a nationwide population-based retrospective cohort study. **J Headache Pain**, 16, p. 64, 2015.
- WÖHR, M.; ENGELHARDT, K. A.; SEFFER, D.; SUNGUR, A. *et al.* Acoustic Communication in Rats: Effects of Social Experiences on Ultrasonic Vocalizations as Socio-affective Signals. **Curr Top Behav Neurosci**, 30, p. 67-89, 2017.
- WÖHR, M.; HOUX, B.; SCHWARTING, R. K.; SPRUIJT, B. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. **Physiol Behav**, 93, n. 4-5, p. 766-776, Mar 18 2008.
- WÖHR, M.; RIPPBERGER, H.; SCHWARTING, R. K.; VAN GAALEN, M. M. Critical involvement of 5-HT_{2C} receptor function in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 232, n. 10, p. 1817-1829, May 2015.
- WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K. Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? **PLoS One**, 2, n. 12, p. e1365, Dec 26 2007.
- WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K. Ultrasonic communication in rats: effects of morphine and naloxone on vocal and behavioral responses to playback of 50-kHz vocalizations. **Pharmacol Biochem Behav**, 94, n. 2, p. 285-295, Dec 2009.
- XI, Z. X.; STEIN, E. A. GABAergic mechanisms of opiate reinforcement. **Alcohol Alcohol**, 37, n. 5, p. 485-494, Sep-Oct 2002.
- YANG, S.; CHANG, M. C. Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. **Int J Mol Sci**, 20, n. 13, Jun 26 2019.

ZAKRZEWSKA, J. M.; LINSKEY, M. E. Trigeminal neuralgia. **BMJ Clin Evid**, 2014, Oct 06 2014.

ZAKRZEWSKA, J. M.; MCMILLAN, R. Trigeminal neuralgia: the diagnosis and management of this excruciating and poorly understood facial pain. **Postgrad Med J**, 87, n. 1028, p. 410-416, Jun 2011.

ZALD, D. H. The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. **Brain Res Brain Res Rev**, 41, n. 1, p. 88-123, Jan 2003.

ZHANG, L.; YIN, J. B.; HU, W.; ZHAO, W. J. *et al.* Analgesic Effects of Duloxetine on Formalin-Induced Hyperalgesia and Its Underlying Mechanisms in the CeA. **Front Pharmacol**, 9, p. 317, 2018.

ZHANG, M.; LIU, Y.; ZHAO, M.; TANG, W. *et al.* Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. **J Headache Pain**, 18, n. 1, p. 27, Dec 2017.

ZHAO, Y. Q.; YIN, J. B.; WU, H. H.; DING, T. *et al.* Contribution of Spinal PKC γ Expression to Short- and Long-lasting Pain Behaviors in Formalin-induced Inflamed Mice. **Pain Physician**, 21, n. 5, p. E555-e564, Sep 2018.

ZHOU, W.; LI, Y.; MENG, X.; LIU, A. *et al.* Switching of delta opioid receptor subtypes in central amygdala microcircuits is associated with anxiety states in pain. **J Biol Chem**, p. 100277, Jan 8 2021.

ANEXO

ANEXO 1 – Publicação referente à padronização do modelo de incisão.

Physiology & Behavior 226 (2020) 113127



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

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



Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the trigeminal ganglion mediates facial mechanical and thermal hyperalgesia in rats

Erika Ivanna Araya, Amanda Ribeiro Barroso, Joelle de Melo Turnes, Débora Rasec Radulski, Jovia-Roy Ashley Jaganaught, Aleksander Roberto Zampronio, Juliana Geremias Chichorro*

Department of Pharmacology, Biological Sciences Building, Federal University of Paraná, 210 Cel. Francisco H. dos Santos Ave, Curitiba 81531-970, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Toll-like receptor 4
LPS
Postoperative pain
Incision
NFκB

ABSTRACT

There is increasing evidence that the toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway contribute to development of hyperalgesia in the trigeminal system. The aim of the present study was to investigate the role of TLR4 in the trigeminal ganglion (TG) in facial hyperalgesia induced by injection of Lipopolysaccharide (LPS) or intraoral mucosal incision, which is an orofacial postoperative pain model, in male Wistar rats. The TLR4 antagonist (LPS-RS, 20 µg/10 µL) was administrated 30 min before LPS injection into the TG (10 µg/10 µL) or oral mucosa (10 µg/50 µL). In the postoperative pain model, rats were treated with LPS-RS (20 µg/10 µL) into the TG for three consecutive days after the incision. Facial heat and mechanical hyperalgesia were assessed hourly after LPS injection or intraoral incision. In addition, expression of NFκB was assessed in the TG on day 3 after intraoral incision. Our results showed that blockade of TLR4 in the TG attenuated facial heat and mechanical hyperalgesia induced by LPS or by mucosal incision, and that both conditions are associated to increase of phosphorylated NFκB in the TG. In conclusion, the present study suggests that activation of TLR4-NFκB signaling pathway in the TG contributes to the development of facial heat and mechanical hyperalgesia and may contribute to pain in inflammatory oral conditions.

Physiol Behav. 2020 Nov 1;226:113127. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.113127.

ANEXO 2 – Publicação referente a USV e atividade dopaminérgica em modelos de dor orofacial aguda.

Research Paper

PAIN



Acute orofacial pain leads to prolonged changes in behavioral and affective pain components

Erika Ivanna Araya^a, Darciane Favero Baggio^a, Laura de Oliveira Koren^a, Roberto Andreatini^a, Rainer K. W. Schwarting^b, Gerald W. Zamponi^c, Juliana Geremias Chichorro^{a,*}

Abstract

Acute pain that persists for a few days is associated with a reduction in patients' quality of life. Orofacial persistent pain promotes psychological disorders such as anxiety, impairs daily essential activities such as eating, and results in decreased social interaction. Here, we investigated whether rats subjected to orofacial formalin injection or intraoral incision surgery display persistent facial heat hyperalgesia, ongoing pain, anxiety-like behavior, and changes in ultrasonic vocalization. Orofacial formalin injection or intraoral incision caused facial heat hyperalgesia for 3 days compared with saline-injected and sham animals. In addition, both experimental groups showed a reduction in the number of entries and in the time spent in the open arms in the elevated plus maze test on day 3, suggesting that anxiety-like behavior developed as a consequence of persistent pain. At this time point, both groups also displayed a reduction in the number of 50-kHz calls, specifically in the flat subtype, which suggests a decrease in social communication. Moreover, on day 3 after surgery, systemic morphine produced robust conditioned place preference in rats subjected to intraoral incision compared with sham, and the former group also presented increased spontaneous facial grooming, revealing the presence of ongoing pain. Finally, Western blot and immunohistochemistry analysis showed a reduction in tyrosine hydroxylase expression in the nucleus accumbens, which may reflect a decrease in mesolimbic dopaminergic activity. Altogether, the results demonstrate that acute orofacial pain causes prolonged changes in behavioral and affective pain components, which may be related to dopaminergic changes in the nucleus accumbens.

Keywords: Trigeminal pain, Ultrasonic vocalization, Anxiety, Orofacial formalin, Ongoing pain, Postoperative pain

Pain. 2020 Dec;161(12):2830-2840. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001970