

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DARCIANE FAVERO BAGGIO

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA CARBAMAZEPINA EM MODELO DE  
NEURALGIA DO TRIGÊMEO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS

CURITIBA

2023

DARCIA NE FAVERO BAGGIO

CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA CARBAMAZEPINA EM MODELO DE  
NEURALGIA DO TRIGÊMEO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS

Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção de grau de mestre em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Geremias Chichorro.

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Baggio, Darciane Favero

Caracterização do efeito da carbamazepina em modelo de neuralgia do trigêmeo em ratos machos e fêmeas / Darciane Favero Baggio. – Curitiba, 2023. 1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Geremias Chichorro.

1. Hiperalgesia. 2. Neuropatia. 3. Ansiedade. 4. Vocalização animal. 5. Anticonvulsivantes. 6. Dopamina. 7. Neuralgia do trigêmeo. I. Chichorro, Juliana Geremias, 1975-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



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 FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DARCIANE FAVERO BAGGIO** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA CARBAMAZEPINA EM MODELO DE NEURALGIA DO TRIGÊMEO EM RATOS MACHOS E FÊMEAS**, 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 mestra 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, 18 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

20/01/2023 16:43:50.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/01/2023 10:15:38.0

SERGIO JOSE MACEDO JUNIOR

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

22/01/2023 16:30:25.0

CAMILA PASQUINI DE SOUZA

Avaliador Externo (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: 249585

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 249585

*Aos meus pais, minhas inspirações de vida e de amor.*

## AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora, Professora Juliana Geremias Chichorro, nossa querida Prof. Ju! Obrigada por ter confiado em mim desde o primeiro momento que entrei no laboratório, como iniciação científica, lá em 2018. Com seu jeito doce e carinhoso despertou-me o gosto e o interesse pela pesquisa. Obrigada por me desafiar, me encorajar e me mostrar que eu posso mais, todos os dias! Obrigada por toda paciência e toda calma em entender minhas limitações e meus erros. Como tenho orgulho em ser sua aluna... aprender com você me fez uma profissional mais capacitada e uma pessoa melhor.*

*À Erika Ivanna Araya, por ter me ensinado com muito amor tudo que sei dentro do laboratório, ensinamentos que até hoje utilizo e que me fazem lembrar de você com muito carinho.*

*À professora Cristina Stern e a Gisele Guaita, pelo auxílio e colaboração com a dosagem de monoaminas no HPLC.*

*Aos meus colegas de laboratório, que se tornaram meus amigos... Em especial à Fernanda da Luz, Vanessa Lejeune, Julia Zortea, Fernanda Fiatcoski, Carlos Jesus, Wagner Hummig, Raphael Lopes e Laura Koren. Obrigada por cada ajuda, cada conversa, cada risada.... Vocês tornaram o dia-a-dia do laboratório muito mais leve e divertido!*

*Aos professores e colegas do Departamento de Farmacologia da UFPR, que participaram da minha formação desde à graduação e que continuam me inspirando a cada dia.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro.*

*Aos animais que cederam suas vidas à ciência.*

*À minha família, em particular meus pais, Darci e Janete Baggio. Obrigada por abrirem mão dos sonhos de vocês para que eu pudesse realizar os meus. Obrigada por todos os ensinamentos e valores, por todo o amor e todo o carinho. Devo tudo a vocês!*

*Ao meu namorado, Fernando Cordeiro, com quem eu compartilho a vida, objetivos pessoais e sonhos. Obrigada por ser meu porto seguro nos momentos sombrios, por ser meu melhor amigo e confidente. Amo você!*

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.*

*(Leonardo da Vinci*

## RESUMO

A neuralgia do trigêmeo, representa uma condição de dor neuropática trigeminal severa e incapacitante, pois, além de conviver com a dor, os portadores dessa condição sofrem com comorbidades, incluindo ansiedade e depressão. Estudos recentes demonstram que circuitos neurais específicos podem estar associados com a correlação entre dor e ansiedade, tal como a via dopaminérgica mesolímbica. Ademais, a maioria dos modelos animais para o estudo da dor envolve a aplicação de estímulos e avaliação das respostas comportamentais de dor evocada. Porém, sabe-se que a dor espontânea e o componente afetivo da dor são de grande relevância em condições dolorosas crônicas. Por fim, é importante ressaltar que a maioria dos estudos pré-clínicos que avaliam a eficácia de substâncias com potencial analgésico utilizam ratos machos, a despeito da maior prevalência de várias condições dolorosas crônicas no sexo feminino. No presente trabalho, avaliou-se a influência da carbamazepina na nocicepção evocada e espontânea, no aspecto afetivo/motivacional da dor e no comportamento do tipo ansioso em ratos machos e fêmeas submetidos à constrição do nervo infraorbital (CCI-ION), um modelo pré-clínico bem estabelecido de dor neuropática trigeminal. Na nocicepção evocada, avaliada pelo teste de Von Frey, a carbamazepina foi eficaz em reduzir a resposta de fêmeas e machos CCI-ION, também foi capaz de reduzir o comportamento de *grooming*, uma medida de nocicepção espontânea, sem influenciar a locomoção desses animais, avaliada no teste de campo aberto. Quanto à dor tônica, avaliada no teste de preferência condicionada ao lugar, apenas as fêmeas CCI-ION desenvolveram preferência à câmara pareada com a carbamazepina. As vocalizações ultrassônicas e o teste de labirinto em cruz elevado foram utilizados para avaliar o componente afetivo da dor e o comportamento do tipo-ansioso, respectivamente. Nossos resultados reforçam a teoria de que a presença de dor crônica provoca redução na emissão de vocalizações apetitivas (i.e. 50 kHz), porém o tratamento com a carbamazepina foi eficiente em restaurar esse comportamento apenas em machos. Também, no teste de labirinto em cruz elevado, apenas os machos CCI-ION apresentaram comportamento do tipo-ansioso, que não foi revertido pelo tratamento com a carbamazepina. Foram encontradas diferenças sexuais na concentração plasmática de carbamazepina, em que as fêmeas CCI-ION apresentaram uma concentração maior em relação aos machos do mesmo grupo. Por fim, a análise da concentração de dopamina no *nucleo accumbens* de machos e fêmeas submetidos à CCI-ION foi significativamente maior em relação aos animais falso-operados. As fêmeas apresentaram um aumento da dopamina na porção *shell* do *nucleo accumbens*, enquanto que os machos apresentaram esse aumento na porção *core*. Em ambos os casos o tratamento com a carbamazepina reverteu o aumento da dopamina. Esses resultados contribuem para ampliar a caracterização do modelo de CCI-ION em ratos machos e fêmeas, bem como fornecem evidências adicionais da eficácia da carbamazepina em parâmetros de dor que aumentam o valor translacional do modelo.

**Palavras-chave:** dor neuropática; hiperalgesia mecânica; ansiedade; vocalizações ultrassônicas; anticonvulsivantes; dopamina.

## ABSTRACT

Trigeminal neuralgia represents a condition of severe and disabling trigeminal neuropathic pain, and in addition to living with severe pain, patients suffer from comorbidities, including anxiety and depression. Recent studies demonstrate that specific neural circuits, such as the mesolimbic dopaminergic pathway, may be associated with the correlation between pain and anxiety. Furthermore, most animal models for the study of pain involve the application of stimuli and evaluation of behavioral evoked pain responses. However, it is well known that spontaneous pain and the affective component of pain are of great relevance in chronic painful conditions. Finally, it is important to emphasize that most preclinical studies that evaluate the efficacy of substances with analgesic potential use male rats, despite the higher prevalence of several chronic painful conditions in females. In the present study, we evaluated the influence of carbamazepine on evoked and spontaneous nociception, on the affective/motivational aspect of pain and on anxiety-like behavior in male and female rats submitted to infraorbital nerve constriction (CCI-ION), a well-established experimental model of trigeminal neuropathic pain. In evoked nociception, evaluated by the Von Frey test, carbamazepine was effective in reducing mechanical hyperalgesia of females and males CCI-ION. Carbamazepine treatment also reduced the grooming behavior, a measure of spontaneous nociception, without influencing the locomotion of the animals, assessed in the open field test. As for tonic pain, evaluated in the conditioned place preference test, only CCI-ION females developed a preference for the chamber paired with carbamazepine. Ultrasonic vocalizations and the elevated plus maze test were used to assess the affective component of pain and anxiety-like behavior, respectively. Our results reinforce the idea that the presence of chronic pain causes a reduction in the emission of appetitive vocalizations (i.e. 50 kHz). Still, the treatment with carbamazepine was efficient in restoring this behavior, but only in males. As well as in the elevated plus maze test, in which only CCI-ION males showed anxious-like behavior, which was not reversed by treatment with carbamazepine. Sex differences were also found in the plasma concentration of carbamazepine, in which CCI-ION females had a higher concentration than males that received the same dosage. Finally, the analysis of dopamine concentration in the *nucleus accumbens* of males and females submitted to CCI-ION was significantly higher in relation to sham-operated animals. Females showed an increase in dopamine in the shell portion of the *nucleus accumbens*, while males showed this increase in the core portion of the *nucleus accumbens*. In both cases, treatment with carbamazepine reversed this increase in dopamine in rats' *nucleus accumbens* submitted to CCI-ION. These results contribute to broadening the characterization of the CCI-ION model in male and female rats, as well as to provide additional evidence of the effectiveness of carbamazepine in parameters that enhance the translational value of the model.

**Keywords:** neuropathic pain; mechanical hyperalgesia, anxiety, ultrasonic vocalization; anticonvulsants; dopamine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELA

<b>Figura 1:</b> Sistema trigeminal.....	<b>15</b>
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das conexões e estruturas envolvidas na via mesolímbica dopaminérgica.....	<b>19</b>
<b>Figura 3:</b> Representação das USVs de 50 kHz emitidas por ratos adultos.....	<b>22</b>
<b>Figura 4:</b> Esquematização do protocolo experimental do CPP.....	<b>29</b>
<b>Figura 5:</b> Efeito da CBZ na hiperalgesia mecânica em ratos fêmeas submetidas à CCI-ION. ....	<b>36</b>
<b>Figura 6:</b> Efeito da CBZ na hiperalgesia mecânica em ratos machos submetidos à CCI-ION ....	<b>37</b>
<b>Figura 7.</b> Efeito da carbamazepina no teste de campo aberto.....	<b>38</b>
<b>Figura 8:</b> Comparação da AUC entre os sexos.....	<b>39</b>
<b>Figura 9:</b> Efeito da CBZ no CPP após CCI-ION em fêmeas ....	<b>41</b>
<b>Figura 10:</b> Efeito da CBZ no CPP após CCI-ION em machos.....	<b>42</b>
<b>Figura 11:</b> Efeito da CBZ nas USVs e no comportamento tipo-ansioso após CCI-ION em fêmeas.....	<b>44</b>
<b>Figura 12:</b> Efeito da CBZ nas USVs e no comportamento tipo-ansioso após CCI-ION em machos ....	<b>45</b>
<b>Figura 13:</b> Dosagem plasmática de CBZ após CCI-ION em ratos machos e fêmeas.....	<b>47</b>
<b>Figura 14:</b> Efeito da CBZ no conteúdo de DA e DOPAC no <i>Nac shell</i> e <i>core</i> de ratos fêmeas e machos submetidos à CCI-ION.....	<b>49</b>
<b>Tabela:</b> Resumo dos principais resultados obtidos.....	<b>58</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

**IASP** – Associação internacional para o estudo da dor

**TG** – Gânglio do Trigêmeo

**V** – Nervo Trigêmeo

**V1** – Ramo oftálmico do nervo trigêmeo

**V2** – Ramo mandibular do nervo trigêmeo

**V3** – Ramo maxilar do nervo trigêmeo

**NT** – Neuralgia do Trigêmeo

**Nav** – Canais de sódio dependentes de voltagem

**CCI-ION** – Cirurgia de constrição do nervo infraorbital

**CBZ** – Carbamazepina

**DA** – Dopamina

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**NAc** – *Nucleo Accumbens*

**CPP** – Preferência condicionada ao lugar

**USVs** – Vocalizações Ultrassônicas

**FO** – Falso-Operado

**VF** – Von Frey

**CA** – Campo Aberto

**VEI** – Veículo

**CPA** – Aversão condicionada ao lugar

**LCE** – Labirinto em cruz elevado

**HPLC** – Cromatografia Líquida de alta performance

**ANOVA** – Análise de variância

**AUC** – Área sob a curva

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Processamento da dor na região orofacial	14
1.2 Neuralgia do Trigêmeo	16
1.2.1 Tratamento farmacológico para a neuralgia do trigêmeo	16
1.3 Ansiedade e dor crônica	17
1.4 Sistema mesolímbico dopaminérgico	19
1.5 Investigação do componente emocional associado a dor	20
1.5.1 Teste de CPP	21
1.5.2 Vocalizações Ultrassônicas	21
JUSTIFICATIVA	24
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
3.1 Animais	26
3.2 Drogas e Soluções	26
3.3 Modelo de NT	27
3.4 Avaliação da Hiperálgia Mecânica	27
3.5 Teste do CA	28
3.6 Teste de CPP	28
3.7 Avaliação das vocalizações ultrassônicas	30
3.8 Avaliação do comportamento do tipo-ansioso	30
3.9 Dosagem de DA e DOPAC	31
3.10 Dosagem plasmática de CBZ	31
3.11 Protocolos Experimentais	32
3.12 Análise estatística	33
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1 Efeito da CBZ na hiperálgia mecânica e no teste de CA em ratos machos e fêmeas submetidos à CCI-ION	34
4.2 Efeito do tratamento com CBZ no CPP após CCI-ION em ratos machos e fêmeas	40
4.3 Efeito do tratamento com CBZ na emissão de USVs e no comportamento do tipo ansioso após CCI-ION em machos e fêmeas	43
4.4 Dosagem plasmática de CBZ após CCI-ION em ratos machos e fêmeas	46
4.5 Efeito da CBZ no conteúdo de DA e DOPAC no Nac <i>Shell</i> e <i>Core</i> de ratos fêmeas e machos após CCI-ION.	48

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
5.1 Efeito da CBZ na hiperalgesia mecânica e no teste de CA em ratos machos e fêmeas submetidos à CCI-ION .....	50
5.2 Efeito do tratamento com CBZ no CPP após CCI-ION em ratos machos e fêmeas .....	52
5.3 Efeito do tratamento com CBZ na emissão de USVs e no comportamento do tipo ansioso após CCI-ION em machos e fêmeas .....	53
5.4 Dosagem plasmática de CBZ após CCI-ION em ratos machos e fêmeas	56
5.5 Efeito da CBZ no conteúdo de DA e DOPAC no Nac <i>Shell</i> e <i>Core</i> de ratos machos e fêmeas após CCI-ION. ....	56
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

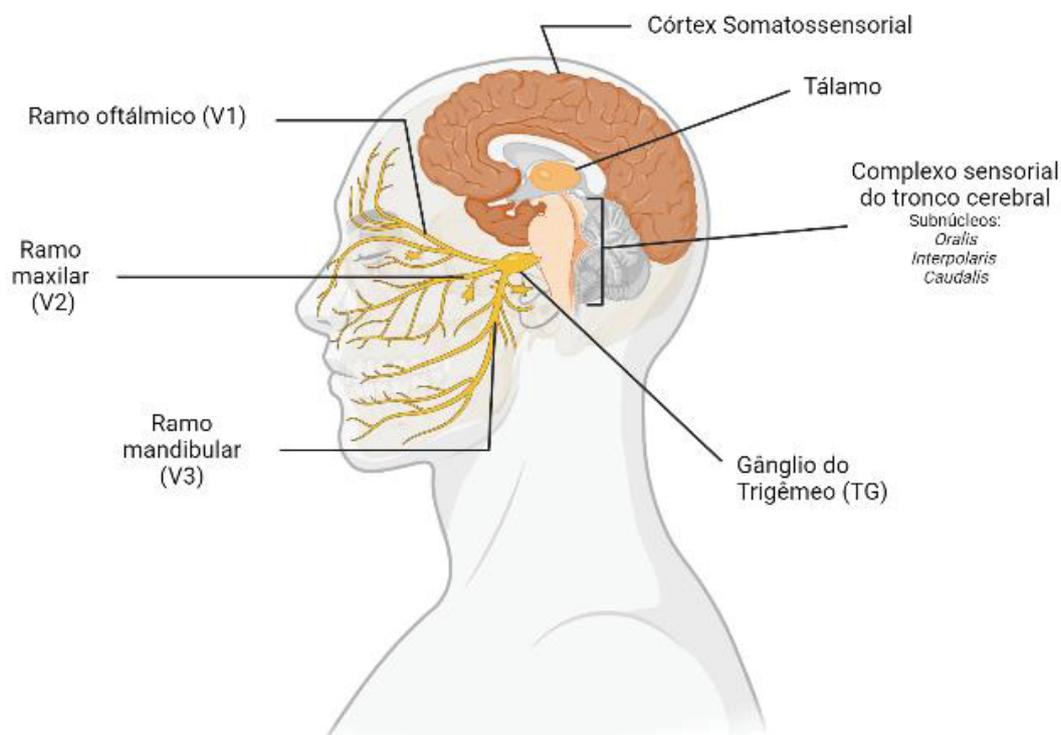
### 1.1 Processamento da dor na região orofacial

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, em inglês) a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial ao tecido. Ou seja, a dor é a composição de dois sistemas: sensorial e emocional. Existem evidências de que a dor na região orofacial apresenta um componente emocional mais significativo em relação a outras regiões, isso devido à grande importância e significado da região orofacial em funções fisiológicas essenciais e na interação social (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017).

A inervação sensorial da região orofacial, demonstrada na figura 1, é dependente do sistema sensorial trigeminal. Este sistema é composto por estruturas periféricas, como gânglio do trigêmeo (TG) e o nervo trigêmeo; e estruturas centrais como o complexo sensorial do tronco cerebral (TERRIER; HADJIKHANI; DESTRIEUX, 2022). O nervo trigêmeo, também denominado como quinto (V) par de nervo craniano, possui três divisões: o ramo oftálmico (V1), responsável por inervar a córnea e íris, pálpebras, nariz e as meninges (SHANKLAND, 2001a); o ramo maxilar (V2) que inerva todas as estruturas dentro e ao redor do osso maxilar como o lábio superior, membrana mucosa da nasofaringe, seio maxilar, palato mole, tonsila palatina, região gengival maxilar, assim como dentes da arcada superiores (SHANKLAND, 2001b); e o ramo mandibular (V3) é responsável pela inervação sensorial de todos os dentes e gengiva da mandíbula, lábio inferior, língua e assoalho da boca, além de inervação motora dos músculos envolvidos na mastigação como masseter e temporal (SHANKLAND, 2001c). Dessa maneira, o ramo V1 e V2 são puramente sensoriais, já o ramo V3 possui componentes sensoriais e motores (GAMBETA; CHICHORRO; W. ZAMPONI, 2020).

As fibras que inervam a região trigeminal são classificadas em fibras nociceptivas (A $\delta$  e C) e os mecanorreceptores de baixo limiar (A $\alpha$  e A $\beta$ ), responsáveis pela propriocepção. Das fibras nociceptivas, a fibra C não possui mielina e por isso, sua velocidade de condução é reduzida em comparação com as fibras A $\delta$ , que possuem bainha de mielina (SESSLE, 2011). A porcentagem de fibras mielinizadas envolvidas no toque e na propriocepção é maior na raiz do trigêmeo (50%) do que na

raiz dorsal dos nervos espinhais (20-30%), justamente devido à alta discriminação tátil da região orofacial (SAMII and JANNETTA, 1981).



**FIGURA 1: Sistema Trigeminal.** O nervo trigêmeo é 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, do qual emergem as projeções centrais que conectam principalmente com o subnúcleo *caudalis*. Por sua vez, a partir do subnúcleo *caudalis*, a informação nociceptiva é transmitida por neurônios de projeção para o tálamo, que funciona como um centro de distribuição da informação para diferentes estruturas cerebrais. Produzido com biorender.com.

As fibras A $\delta$  e C possuem receptores sensíveis a temperatura, estímulos químicos e pressão mecânica. Assim, estímulos dessa natureza ativam as fibras nociceptivas, que conduzem a informação gerada na periferia até o complexo sensorial do trigêmeo, (TERRIER; HADJIKHANI; DESTRIEUX, 2022) principalmente para o *subnucleus caudalis*. Além do *caudalis*, o complexo sensorial trigeminal é constituído dos subnúcleos *oralis* e *interpolaris*. Dentre eles, o *subnúcleo caudalis* é considerado uma extensão do corno dorsal da medula espinhal, mantendo inclusive sua organização laminar. Assim, quando ativado, transmite a informação nociceptiva, para o tálamo via trato trigemino-espinotalâmico (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017). O tálamo possui uma grande conexão com o córtex somatossensorial - associado à discriminação da dor - e também com o sistema límbico e córtex cingulado anterior - associada ao componente afetivo da dor (YOU; LEI; PERTOVAARA, 2022).

## 1.2 Neuralgia do Trigêmeo

A neuralgia do trigêmeo (NT) é caracterizada por dor orofacial unilateral breve e recorrente, semelhante a um choque elétrico de início e término abruptos. A dor é restrita a uma ou mais regiões inervadas pelo trigêmeo e pode ser desencadeada por estímulos sensoriais inócuos, como por exemplo, falar, comer, pentear o cabelo e escovar os dentes (ARAYA *et al.*, 2019). A NT é uma doença considerada rara, com prevalência variando de 0,03% a 0,3% na população mundial com predominância do sexo feminino, sendo a proporção de 3:1 entre mulheres e homens (DE TOLEDO *et al.*, 2016).

Inúmeros mecanismos têm sido propostos para a dor na NT. No que se refere à neuralgia clássica, que abrange 80-90% dos casos, a causa mais aceita é a compressão das raízes do nervo trigêmeo pela artéria cerebelar superior antes da sua entrada na ponte, resultando na desmielinização das fibras nervosas, que então começam a disparar ectopicamente, o que justifica a característica de dor em paroxismos (ARAYA *et al.*, 2019; GAMBETA; CHICHORRO; W. ZAMPONI, 2020).

Também, foi observado que a compressão do nervo trigêmeo está associada ao decréscimo do número de fibras nervosas, que resultam nos episódios dolorosos com grande perda axonal (DEVOR; GOVRIN-LIPPMANN; RAPPAPORT, 2002). Além disso, tem sido descrito uma *up-regulation* da expressão dos canais de sódio voltagem dependentes (Nav), principalmente do tipo Nav 1.3, contribuindo para a sensibilização das fibras nociceptivas (CHEN *et al.*, 2022).

Baseado no proposto por Vos (1994), Chichorro e colaboradores (2006) propuseram um modelo animal de dor orofacial crônica de origem neuropática como modelo de dor neuropática trigeminal, o qual reproduz características dessa condição, inclusive hiperalgesia térmica e mecânica. Nesse modelo, é realizada a constrição do nervo infraorbital (CCI-ION), principal ramo da divisão maxilar, através de um acesso na face. Esse modelo foi amplamente caracterizado em estudos anteriores do nosso grupo (ARAYA *et al.*, 2021; CHICHORRO *et al.*, 2006; CLAUDINO *et al.*, 2018; GAMBETA *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2018; TURNES *et al.*, 2022).

### 1.2.1 Tratamento farmacológico para a neuralgia do trigêmeo

A primeira linha de tratamento para a NT são os bloqueadores de canais de sódio, principalmente a carbamazepina (CBZ), sendo eficaz em cerca de 70% dos casos (CRUCCU *et al.*, 2008; NURMIKKO; ELDRIDGE, 2001). Seu mecanismo de

ação envolve a estabilização do estado inativo do Nav, que diminui o disparo neuronal e por consequência, reduz os paroxismos (ARAYA et al., 2022). Porém, os efeitos adversos que incluem sonolência, tontura, enjoo, *rashs* cutâneos e tremores, limitam sua utilização terapêutica, e resultam em altas taxas de descontinuação do tratamento (BRICK, 2011; CRUCCU et al., 2008). As características farmacocinéticas da CBZ são importantes, pois podem influenciar a resposta ao tratamento. Após a administração oral, a CBZ atinge o pico de concentração em meia hora após a administração e apresenta tempo de meia-vida de aproximadamente 3 horas e meia, sendo metabolizada por processos oxidativos do citocromo P450, principalmente pela enzima CYP3A4 (FORTUNA et al., 2013). A utilização repetida de CBZ promove um aumento na expressão da CYP3A4 no fígado, favorecendo seu metabolismo, num processo chamado de autoindução enzimática. Como consequência o tempo de meia-vida da CBZ é reduzida e a dose inicial pode perder a eficácia com 2-3 semanas após o início do tratamento (ARAYA et al., 2022).

Juntamente com a CBZ, têm se utilizado a oxcarbamazepina, que possui mecanismo de ação semelhante a CBZ sem a característica de autoindução. Dessa forma, necessita de uma concentração menor, o que garante menos efeitos colaterais (GAMBETA; CHICHORRO; W. ZAMPONI, 2020). Os agentes de segunda linha incluem o anticonvulsivante lamotrigina e o relaxante muscular baclofeno, assim como os anticonvulsivantes mais novos, incluindo gabapentina, pregabalina e topiramato (ARAYA et al., 2019).

Em estudos pré-clínicos, a eficácia da CBZ foi avaliada e o tratamento foi capaz de reduzir dor espontânea, hiperalgesia térmica e hiperalgesia mecânica, em modelos de dor neuropática trigeminal, corroborando a validação farmacológica do modelo (ARAYA et al., 2022b; DESEURE and HANS, 2017; JEON et al., 2012; KOPRUSZINSKI et al., 2012).

### **1.3 Ansiedade e dor crônica**

A correlação existente entre dor e ansiedade, principalmente em condições crônicas já é bem descrito na literatura (NARITA et al., 2006; PLOGHAUS et al., 2001; ZHUO, 2016). Inclusive, a NT é associada a transtornos depressivos e ansiosos e redução da qualidade de vida. Foi relatado que o sofrimento dos pacientes está relacionado a atrasos no diagnóstico, medo da recorrência repentina da dor, efeitos adversos dos medicamentos e falta de apoio psicológico (MELEK; DEVINE; RENTON,

2018). Cerca de metade dos pacientes afetados desenvolve ansiedade, representando a condição de dor orofacial mais debilitante. Há evidências de que a NT leva a alterações psicológicas que podem ser expressas em tentativas de suicídio, por exemplo (MAČIANSKYTE *et al.*, 2011; ZAKRZEWSKA *et al.*, 2017).

Corroborando os dados clínicos, no modelo proposto por Chichorro e colaboradores (2006) somente os animais hiperalgésicos apresentam comportamento do tipo-ansioso que se desenvolve 15 dias após a CCI-ION (GAMBETA *et al.*, 2018), sugerindo uma relação temporal entre dor e ansiedade. No entanto, o alívio breve da dor pelo bloqueio nervoso periférico com lidocaína não foi capaz de interferir com o comportamento do tipo ansioso, bem como o alívio da ansiedade com midazolam não resultou no alívio da dor, quando já estabelecida (ARAYA *et al.*, 2022).

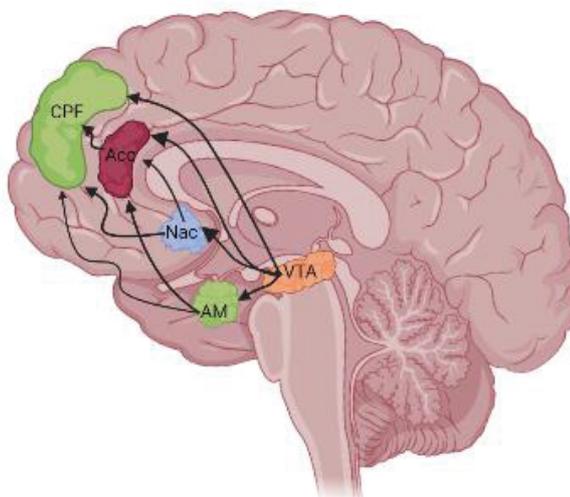
Essa possível causalidade foi observada em outros modelos de dor orofacial. Gambeta e colaboradores (2016) demonstraram que animais com tumor na região facial desenvolveram hiperalgesia térmica facial e comportamento do tipo ansioso, novamente o alívio da dor pelo bloqueio nervoso periférico com lidocaína não foi capaz de interferir com o comportamento do tipo ansioso, bem como o alívio da ansiedade com midazolam não resultou no alívio da dor, porém ambas as condições foram revertidas com a administração do anticonvulsivante pregabalina. Também, o comportamento do tipo-ansioso foi observado como consequência da dor persistente em animais submetidos ao teste de formalina orofacial e em modelo de dor pós-operatória (ARAYA *et al.*, 2020). Esses dados vão de encontro com a literatura (LI *et al.*, 2010; NARITA *et al.*, 2006; SEMINOWICZ *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2017) e reforçam a teoria que a dor crônica leva ao desenvolvimento da ansiedade, de maneira que o estabelecimento dessa correlação em modelos animais contribui para o aumento da capacidade translacional. Apesar da alta incidência de ansiedade em pacientes que sofrem com NT, não existem evidências de que a CBZ seja capaz de afetar esse parâmetro em estudos clínicos e pré-clínicos.

Com essas informações, é possível sugerir que um controle satisfatório da dor poderia contribuir para uma redução no estado de ansiedade do paciente. Os mecanismos responsáveis pela possível interação entre dores crônicas e ansiedade ainda não foram totalmente estabelecidos, mas sabe-se que projeções dopaminérgicas via área tegmental ventral modulam comportamento tipo-ansiosos em camundongos (DEGROOT *et al.*, 2017), o que demonstra um envolvimento do neurotransmissor dopamina (DA) tanto na dor como no comportamento tipo-ansioso.

#### 1.4 Sistema mesolímbico dopaminérgico

A DA é um neurotransmissor do sistema nervoso central (SNC) com propriedades modulatórias, que tem sua síntese limitada pela enzima tiroxina-hidroxilase. A DA é armazenada em vesículas que são liberadas na fenda sináptica (DAUBNER; LE; WANG, 2012). Esse neurotransmissor é responsável por muitas funções no cérebro, incluindo ações e percepções, movimentos voluntários, punição e recompensa, inibição da produção de prolactina, sono, humor, atenção, memória de trabalho e aprendizagem (CHEN *et al.*, 2020).

Recentemente tem se demonstrado o papel da DA na modulação da dor, principalmente pelo sistema mesolímbico. Esse sistema participa do circuito do SNC no qual entradas dopaminérgicas da área tegmental ventral inervam regiões cerebrais envolvidas em funções executivas, afetivas e motivacionais, (FARMER; BALIKI; APKARIAN, 2013; SERAFINI; KERRI; ZACHARIOU, 2021) incluindo o córtex pré-frontal, amígdala e núcleo accumbens (NAc). Baliki e colaboradores (2013) observaram que a conectividade via dopaminérgica do Nac com o córtex pré-frontal prediz a persistência da dor, sugerindo que esse circuito contribui para transição para a dor crônica. A figura 2 esquematiza as conexões e estruturas cerebrais envolvidas na via mesolímbica dopaminérgica. Outros achados evidenciaram que estados de dor crônica diminuem o metabolismo pré-sináptico da DA na área tegmental ventral, corroborando assim com a hipótese da participação do sistema dopaminérgico mesolímbico na fisiopatologia da dor crônica (WOOD *et al.*, 2007).



**Figura 2: Representação esquemática das conexões e ligações envolvidas no sistema mesolímbico dopaminérgico.** A área tegmentar ventral (VTA) realiza conexões dopaminérgicas com a amígdala (AM), o núcleo accumbens (Nac), córtex cingulado anterior (ACC) e córtex pré-frontal (CPF).

A via mesolímbica está envolvido com recompensa e motivação, além disso, estudos demonstram modulação dessa via em condições de dores crônicas. Produzido com *bioender.com*.

Como citado, uma estrutura de importância na modulação dopaminérgica da dor é o Nac que é responsável pela motivação e recompensa (IKEDA *et al.*, 2019). Em um estudo clínico, pacientes com NT idiopática apresentavam alterações na substância cinzenta no Nac, associada com um maior volume da estrutura (DESOUZA *et al.*, 2013). Evidências pré-clínicas também confirmam essa relação através da demonstração que a expressão de tirosina-hidroxilase estava reduzida em modelos de dor aguda e crônica orofaciais, o que sugere um decréscimo da atividade da via dopaminérgica descendente, favorecendo a instalação do processo doloroso (ARAYA *et al.*, 2020; ARAYA *et al.*, 2022a).

Quando se trata de dores orofaciais, um grupo de células dopaminérgicas chamadas de núcleo A11, que se localizam no hipotálamo posterior, têm grande importância na nocicepção, pois enviam projeções inibitórias diretamente para o subnúcleo *caudalis*, que recebe os aferentes trigeminais ativados por estímulos nocivos (AKERMAN; HOLLAND; GOADSBY, 2011; LIU *et al.*, 2016). Ademais, estudos apontam que a modulação do sistema dopaminérgico pode contribuir para o efeito da CBZ (POST *et al.*, 1986).

A DA tem seus efeitos em associação com cinco diferentes receptores metabotrópicos acoplados à proteína G (D1-D5) que se organizam em duas subfamílias D1 (D1 e D5) e a subfamília D2 (D2, D3 e D4) (MISHRA; SINGH; SHUKLA, 2018). Com exceção do receptor D3, todos os outros se encontram presentes no complexo trigeminal, inclusive o receptor D2 é o mais expresso no subnúcleo *caudalis*, o qual foi observado como o responsável pela excitação dos neurônios dopaminérgicos A11, resultando na atenuação da dor neuropática trigeminal (CHARBIT *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 2016). Além disso, estudos em ratos observaram que a administração crônica de CBZ regula negativamente a sinalização cerebral do ácido araquidônico via receptores do tipo D2 (BASSELIN *et al.*, 2008), o que demonstra o envolvimento da CBZ com o receptor dopaminérgico D2, mecanismo que pode participar do efeito analgésico desse fármaco.

### **1.5 Investigação do componente emocional associado a dor**

A dor é definida como uma experiência subjetiva e, portanto, os estudos animais avaliando dor também devem avaliar nocicepção não evocada. Alguns dos

testes em que é possível avaliar os componentes afetivos relacionados com a dor são o teste de preferência condicionada ao lugar (CPP), utilizado para avaliar a dor tônica e motivação do animal pela busca do alívio da dor, e a avaliação das vocalizações ultrassônicas (USVs) que pode refletir o componente emocional dos animais (JOHANSEN; FIELDS; MANNING, 2001; VIERCK; HANSSON; YEZIERSKI, 2008).

### **1.5.1 Teste de CPP**

O alívio da dor é recompensador, por essa afirmativa, os agentes analgésicos que não são recompensadores na ausência de dor, tornam-se na presença de dor tônica, isto é dor contínua, não evocada. Para avaliar e determinar a presença de dor tônica em ratos e a eficácia dos agentes que promovem seu alívio, têm-se utilizado o CPP (KING *et al.*, 2009), que se baseia na premissa de que a redução de um estado aversivo, como no caso o alívio da dor, induz um aprendizado associativo, como reforço negativo. Assim os animais devem abordar pistas contextuais previamente associadas ao alívio da dor (JOHANSEN; FIELDS; MANNING, 2001).

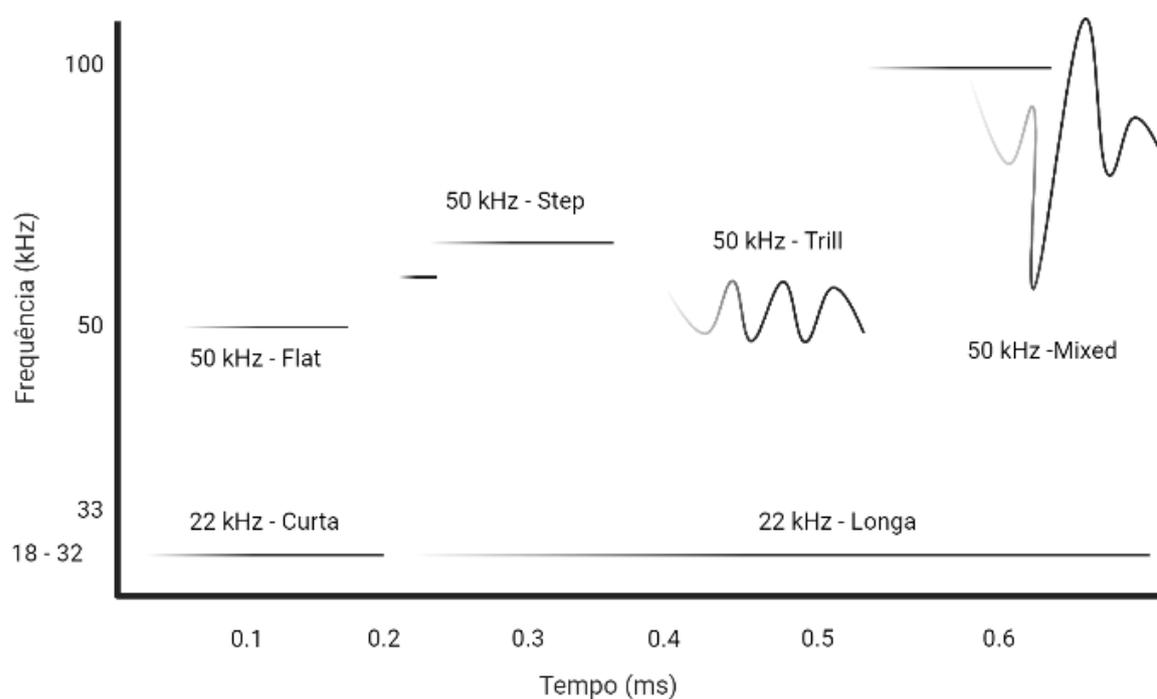
Vários estudos já validaram o emprego do CPP em condições de dores crônicas. Nesse sentido, King e colaboradores (2009), utilizando o modelo de ligadura do nervo espinhal em ratos demonstraram, pela primeira vez, que as drogas que comprovadamente aliviam a dor neuropática em humanos poderiam reverter a alodinia tátil evocada e, concomitantemente, produzir CPP.

A ativação dos neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral é relacionada com o comportamento de recompensa, quando um estímulo nocivo está presente essa via é inibida. Isso levanta a hipótese de que o alívio da dor ativaria os neurônios dopaminérgicos, fornecendo uma conexão entre os circuitos moduladores de recompensa e dor (FIELDS, 2004). Ademais, em modelo de dor pós-cirúrgica orofacial foi demonstrado que a morfina induz CPP e que a liberação de dopamina no NAc é um dos mecanismos subjacentes ao seu efeito (ARAYA *et al.*, 2020).

### **1.5.2 Vocalizações Ultrassônicas**

Ratos adultos emitem vocalizações em frequência ultrassônica como um papel comunicativo, por exemplo, para estabelecer hierarquias de dominância, durante encontros agressivos, durante comportamento sexual, alimentação, defesa de território e outras situações que necessitem de uma regulação social (SCHWEINFURTH, 2020). Essas USVs são classificadas de acordo com a frequência de emissão e possuem mecanismos neurais diferentes. As USVs de 22 kHz são

frequentemente emitidas em situações estressantes e/ou dolorosas, apresentam uma frequência sonora entre 20 e 35 kHz e não possuem modulação de frequência, enquanto que as USVs de 50 kHz estão relacionadas a estímulos apetitivos e interação social. A figura 3 demonstra a classificação, de acordo com o espectrograma, em *flat* (por serem planas) que possuem função de coordenação social e as de frequência modulada – *mixed*, *step* e *trill* - que refletem um estado afetivo positivo (PEREIRA *et al.*, 2014; SIMOLA; GRANON, 2019).



**FIGURA 3: Representação das USVS emitidas por ratos adultos.** Ratos adultos emitem dois tipos de USVs as de 22 kHz, emitidas em situações aversivas e as de 50 kHz, emitidas em situações apetitivas. As USVs de 50 kHz são classificadas em subtipos de acordo com o espectrograma em flat, mixed, step e trill. Produzido com biorender.com.

Quando se trata de modelos animais de dor, a relação entre USVs ainda não é totalmente elucidada, porém, o aumento das USVs de 22 kHz é observado em estados de dor aguda (ARAYA *et al.*, 2020; BARROSO *et al.*, 2019), enquanto que, a redução das USVs de 50 kHz é evidenciado em estados de dor crônica (ARAYA *et al.*, 2022b; BURGDORF *et al.*, 2019). Apesar dessas observações, as USVs estão relacionadas com o componente afetivo associado a dor e não como resposta direta à própria dor (BRUDZYNSKI, 2021).

## 1.6 Diferença Sexual no Processamento da Dor Crônica

Em diversas condições de dores crônicas, incluindo a NT, as mulheres são as mais afetadas (MOGIL, 2020). Essa observação tem sido justificada por uma variedade de diferenças sexuais, incluindo a maior busca por atendimento médico pelas mulheres, sendo que elas reportam melhor a dor comparado com os homens (KANNAN; VEAZIE, 2015). Além disso, as mulheres são biologicamente mais suscetíveis a desenvolver dores crônicas, com maior sensibilidade à dor e maior resistência aos tratamentos farmacológicos (MOGIL; BAILEY, 2010).

De fato, o processamento doloroso envolve não só fatores biológicos, mas também sociais, econômicos, culturais e psicológicos. Por conta disso, os experimentos pré-clínicos com animais têm grande importância, visto que, é possível observar puramente o fator biológico envolvido na diferença sexual à dor, ou seja, o mecanismo nociceptivo envolvido no processamento doloroso (MOGIL, 2020). Por exemplo, evidências indicam que a sinalização neuronal essencial para a hipersensibilidade na dor crônica possui mecanismos distintos entre os sexos. Em animais machos é relatado que a comunicação entre micróglia e neurônio é importante para o desenvolvimento da dor crônica, porém, em fêmeas a hipersensibilidade neuronal é decorrente da interação com os linfócitos T (SORGE *et al.*, 2015).

Logicamente, a influência dos hormônios sexuais no processamento da dor é de grande importância. Estudos sugerem que a testosterona atua aumentando o limiar de dor, com um papel protetor (MOGIL, 2012). A literatura evidencia que a testosterona limita a produção de citocinas pró-inflamatórias e diminui a sinalização intracelular dependente de TRPV1 (LENERT *et al.*, 2021). Enquanto que em mulheres, a sensibilidade a dor pode variar de acordo com a fase do ciclo menstrual que se encontra, estudos reportam que as mulheres durante a fase folicular têm um limiar de dor aumentado em relação às outras fases do ciclo menstrual (ATHNAIEL *et al.*, 2023). Assim, baixos níveis de estrógeno estão associados com o aumento das respostas pró-inflamatórias, porém a terapia hormonal em mulheres não tem evidenciando resultados promissores em diminuir a resposta inflamatória (LENERT *et al.*, 2021). Esse dimorfismo sexual biológico evidencia, mais uma vez, que os machos não podem ser considerados um representante de fêmeas em pesquisa sobre dor.

## JUSTIFICATIVA

A NT, representa a condição de dor orofacial mais debilitante, pois, além de conviver com a dor, os portadores dessa condição sofrem com comorbidades, incluindo ansiedade e depressão. Além disso, a incidência de NT é maior em mulheres (3:1) do que homens. Apesar dessas observações, a pesquisa em dor nos animais geralmente se limita à avaliação da nocicepção, negligenciando os componentes afetivos e emocionais. Ademais a grande maioria desses estudos avalia apenas animais machos, o que pode reduzir o aspecto translacional da pesquisa básica, devido às evidências de que várias condições dor crônica são mais prevalentes em mulheres e de que existem diferenças sexuais nos mecanismos fisiopatológicos.

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que em modelos de dor orofacial persistente (i.e dor pós-operatória, dor associada a carcinoma orofacial e dor neuropática trigeminal) é possível investigar o componente emocional da dor através do paradigma do CPP e da avaliação da emissão de USVs. Além disso, também demonstramos que esses modelos permitem a avaliação do comportamento do tipo ansioso, que se desenvolve em consequência da dor persistente.

Diante disso, o presente estudo teve a finalidade de caracterizar o efeito da CBZ nas respostas sensoriais e os comportamentos associados ao aspecto afetivo da dor em modelo animal de NT em ratos machos e fêmeas. O melhor entendimento do efeito da CBZ em diversos parâmetros associados a NT pode contribuir na determinação do seu benefício clínico de acordo com as características individuais dos pacientes.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo investigar a influência do tratamento com CBZ em aspectos sensoriais e afetivos da NT em ratos machos e fêmeas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da CBZ na hiperalgesia mecânica facial induzida por CCI-ION em ratos machos e fêmeas;
- Avaliar o efeito da CBZ na dor tônica induzida por CCI-ION em ratos machos e fêmeas;
- Avaliar o efeito da CBZ na emissão de USVs e no comportamento do tipo ansioso em ratos machos e fêmeas submetidos à CCI-ION;
- Avaliar uma possível diferença sexual na concentração plasmática de CBZ em ratos submetidos à CCI-ION;
- Investigar a influência da CBZ no conteúdo de DA no Nac de ratos machos e fêmeas submetidos à CCI-ION.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Em todos os experimentos foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, com sessenta dias de idade, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), mantidos em condições controladas de temperatura e umidade ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso a ração e água.

Os animais foram trazidos do biotério e organizados em, no máximo, 4 animais por caixa e permaneceram no laboratório por pelo menos 48 horas para ambientação, antes do início dos experimentos. Os experimentos foram realizados em sala silenciosa, mantendo o controle da temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e sempre durante a fase clara do ciclo. Todos os protocolos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/BIO) da UFPR sob o número de registro 1445. O  $n$  amostral foi determinado com base em estudos prévios do grupo (ARAYA *et al.*, 2021; BARROSO *et al.*, 2019; GAMBETA *et al.*, 2018; KOPRUSZINSKI *et al.*, 2018) em adição com o software GPower 3.1, definindo um tamanho de efeito de  $F=0.5$ ; poder de 0.8 e  $\alpha=0.05$  e estimando 8 a 12 ratos por grupo nos diferentes designs experimentais.

#### 3.2 Drogas e Soluções

Para a anestesia: Cloridrato de Cetamina (60 mg/kg, i.p.) - Cetamina®, Vetnil; Louveira, São Paulo, Brasil; Cloridrato de Xilasina (7 mg/kg, i.p.) - Xilasin®, Syntec Santana de Parnaíba, São Paulo, Brasil; diluídas em solução salina estéril a 0,9%.

Tratamentos: CBZ (10 e 30 mg/Kg, i.p.) – Santa Cruz, Dallas, Texas, EUA- que foi dissolvida no veículo (VEI) que corresponde à uma solução em dimetil sulfóxido, propileno glicol, álcool etílico e acetona em uma proporção de 42:42:15:1, respectivamente (CAIN *et al.*, 2009; DESEURE; HANS, 2017).

### 3.3 Modelo de NT

Para a indução da NT foi realizada a CCI-ION conforme o método proposto anteriormente por Vos (1994) e modificado por Chichorro (2006). Nesse modelo, os animais foram anestesiados com solução cetamina e xilasina e foi realizada a assepsia da face com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, foi feita uma incisão na pele abaixo do olho direito, aproximadamente 3 mm posterior à região de inserção das vibrissas de modo que a porção rostral do nervo infraorbital foi exposta. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e, em seguida, foram realizadas duas amarras frouxas, separadas aproximadamente 2 mm, com fio de seda 4.0 ao redor do feixe nervoso. Os tecidos foram suturados com o mesmo tipo de fio usado para a confecção das amarras. Os animais do grupo falso-operado (FO) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com exceção das amarras. Ao término da cirurgia os animais foram mantidos em sala aquecida até sua completa recuperação da anestesia.

### 3.4 Avaliação da Hiperalgisia Mecânica

A fim de avaliar a hiperalgisia mecânica foram utilizados os filamentos de Von Frey (VF). Antes de cada sessão de teste ou seleção os animais foram colocados individualmente em caixas de observação, por um período de 2 horas para a ambientação. Primeiramente, foi realizada uma seleção que consiste na aplicação crescente de 8 filamentos de VF (Semmes- Weinstein monofilaments, Stoelting, USA: 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 g). Os filamentos foram aplicados na face direita dos animais, próxima à região de inserção das vibrissas, sendo que cada filamento foi aplicado 3 vezes, com um intervalo de 3 segundos entre cada aplicação. O limiar de resposta desse teste foi considerado quando o estímulo mecânico do filamento evocou, por duas vezes, comportamentos como retirada rápida da cabeça e reações de ataque/escape (CHICHORRO *et al.*, 2006). Nessa fase, foram selecionados os animais que não apresentarem comportamentos nociceptivos após aplicação dos 8 filamentos, ou seja, os animais que apresentaram limiar basal de resposta à estimulação mecânica igual a 8 g. Na sessão teste, os animais passaram pelos mesmos procedimentos da seleção, sendo que uma redução significativa do limiar basal de resposta à estimulação mecânica foi considerada como indicativo de hiperalgisia mecânica facial.

### 3.5 Teste do CA

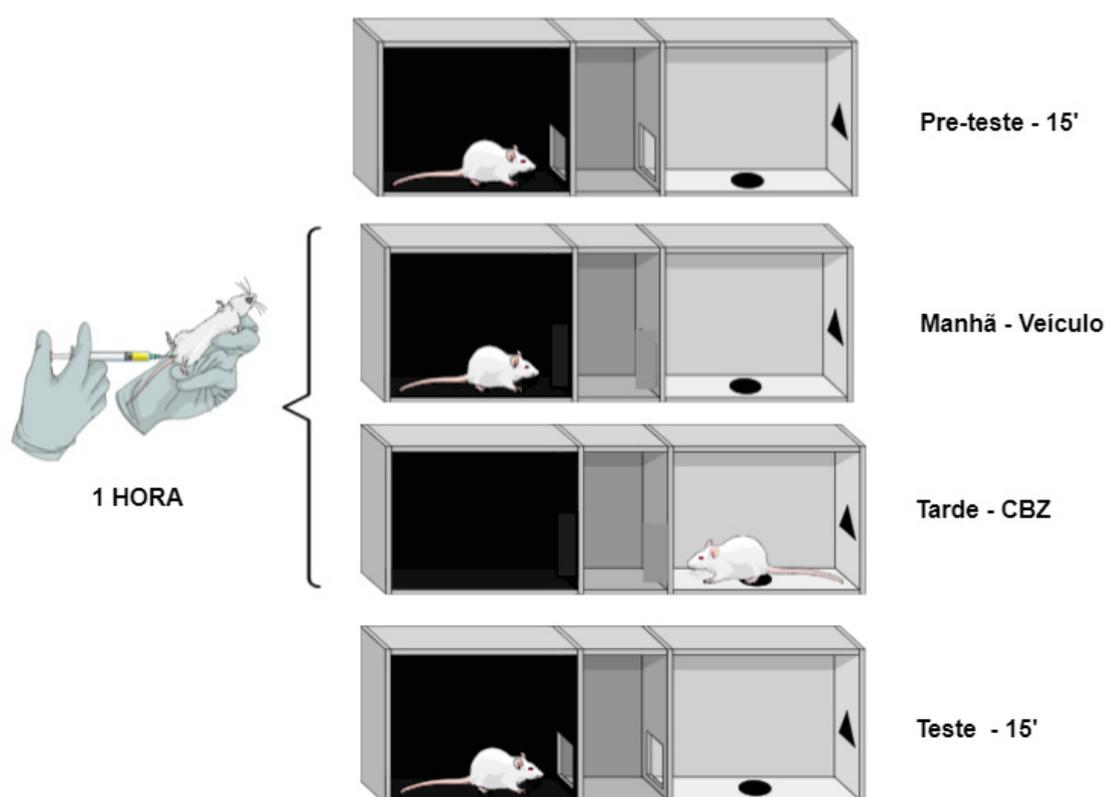
O teste de campo aberto (CA) foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais, bem como para corroborar a avaliação do comportamento tipo-ansioso. Os animais foram colocados individualmente no centro de uma arena quadrada de madeira (30 × 60 × 60 cm), cujo piso foi dividido por linhas em seis pequenos quadrados. O deslocamento dos animais foi gravado durante 5 minutos. Nesse tempo, foi contado manualmente os cruzamentos entre os quadrantes. Somente quando o animal colocava suas duas patas dianteiras no próximo quadrado e avançava com as duas patas traseiras, o quadrado foi considerado cruzado (CHAVES *et al.*, 2020; CLAUDINO *et al.*, 2018). Ademais, foi avaliado o tempo de permanência e o número de entradas no quadrante central, número de *rearing* (i.e. número de vezes que o animal permaneceu sob as patas traseiras) e o número de *grooming* (i.e. número de vezes que o animal esfregava a face com as duas patas dianteiras), para avaliação do comportamento do tipo-ansioso (ORUMIYEHEI *et al.*, 2022).

### 3.6 Teste de CPP

O protocolo de CPP foi realizado de acordo com King e colaboradores (2009). O equipamento utilizado foi uma caixa de madeira composta de três câmaras diferentes, separadas por duas divisórias móveis com e sem aberturas (10 x 7 cm) que permitiam, ou não, o livre acesso dos animais entre os compartimentos. Os dois compartimentos de condicionamento (36,5 x 31 x 25 cm) apresentam diferentes pistas visuais e táteis que são separados por um compartimento central “neutro” (31 x 10 x 25 cm) de cor preta e que permanece iluminado.

Os experimentos foram realizados em três 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 durante 15 min. Ao final de cada sessão, os animais retornaram para suas caixas e o equipamento foi higienizado com álcool diluído à 10%. Foi registrado com auxílio de uma câmera de vídeo o tempo que cada animal permaneceu em cada uma das câmaras para verificar a inexistência de preferência pré-condicionamento. Foram eliminados os animais que permaneçam mais do que 720 ou menos do que 180 segundos em uma única câmara. Na sequência, os dados foram contrabalanceados (para garantir que a média dos tempos de permanência entre as câmaras não tinham diferença entre os grupos) e os animais foram

designados às respectivas câmaras para pareamento com CBZ. No segundo dia (condicionamento), durante o período da manhã, os animais receberam VEI (1 mL/kg, i.p.) e foram imediatamente colocados no compartimento correspondente por 1 hora (sem livre acesso entre os compartimentos). Quatro horas mais tarde, os animais receberam CBZ (30 mg/kg; i.p.) e imediatamente foram colocados na câmara oposta por 1 hora. O mesmo procedimento foi repetido no terceiro dia. No quarto dia, os animais foram colocados na câmara neutra e permaneceram por 15 min, com livre acesso entre as câmaras. O tempo de permanência de cada animal foi registrado e posteriormente analisado para determinar se o tratamento foi capaz de produzir CPP. A figura 4 retrata o design experimental e a caixa designada para o CPP.



**Figura 4: Esquemática do protocolo experimental do CPP.** Inicialmente o animal passa por uma sessão pré-teste de 15 minutos, os animais que apresentarem preferência prévia foram excluídos do experimento. O condicionamento, conduzido por dois dias seguidos, compreende o pareamento da câmara com a carbamazepina (CBZ). Pela manhã o animal recebe uma injeção intraperitoneal de salina e permanece na cabine confinado por uma hora, à tarde, o mesmo animal recebe CBZ e permanece por uma hora na câmara oposta. No último dia é realizada a sessão teste, em que o animal é gravado por 15 minutos com livre acesso à ambas as cabines. Produzido com *biorender.com*.

Um aumento no tempo de permanência, no dia teste, na câmara pareada com CBZ comparado ao tempo de permanência nesta mesma câmara no pré-condicionamento indica preferência condicionada. Uma redução neste tempo indica aversão (CPA). A não alteração no tempo de permanência na câmara pareada com a droga indica ausência de CPP ou CPA. A diferença de escore foi calculada subtraindo o tempo de permanência na câmara pareada com a CBZ no pós-condicionamento do tempo de permanência no pré-condicionamento.

### **3.7 Avaliação das vocalizações ultrassônicas**

A avaliação da emissão de USVs foi realizada de acordo com protocolos previamente descritos pelo grupo (ARAYA *et al.*, 2020; BARROSO *et al.*, 2019). Foi registrada a emissão de USVs na categoria de 22-27 kHz (aversivas) e 50 kHz (apetitivas) em um período de 10 minutos utilizando um microfone ultrassônico (CM16 Avisoft Bioacoustics, Berlin, Alemanha) sensível a frequências entre 15-180 kHz, o qual foi colocado a uma distância de 45 cm do chão da caixa de movimentação, utilizando o programa Avisoft Recorder (versão 2.95; Avisoft Bioacoustics).

A gravação foi então transferida para o software AvisoftSASLab Pro (versão 4.34 AvisoftBioacoustics) que produziu um espectrograma (com frequência de 488 kHz e resolução 0,512 ms) das USVs emitidas pelo animal, e foi posteriormente analisado de forma manual (PEREIRA *et al.*, 2014). O número total de USVs de 22 kHz e 50 kHz foi determinado, bem como os subtipos de USVs apetitivas.

### **3.8 Avaliação do comportamento do tipo-ansioso**

Para a avaliação do comportamento do tipo-ansioso em ratos foi utilizado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE), que consiste em um aparato de madeira, elevado a 50 cm do chão, o qual apresenta 4 braços, sendo 2 abertos e 2 fechados e no cruzamento entre os braços forma-se uma área central de 10 cm<sup>2</sup>. Para a realização desse teste, os animais foram colocados individualmente no centro do aparato por 10 minutos, sendo que a exposição ao aparato ocorreu somente no dia do teste. Todos os testes foram filmados. Os parâmetros avaliados foram: percentual de tempo nos braços abertos; percentual de tempo nos braços fechados; número de entradas no braço aberto; número de entradas no braço fechado e o percentual de tempo gasto na porção final dos braços abertos. Sendo que a entrada ou permanência nos braços foi considerada quando o animal ultrapassou com as 4 patas as

delimitações de cada braço. Após avaliação de cada animal, o aparato foi limpo com uma solução de etanol a 10% (HOGG, 1996; WALF; FRYE, 2007).

### 3.9 Dosagem de DA e DOPAC

Os animais não anestesiados foram decaptados e os cérebros foram imediatamente removidos e o NAc dissecado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As amostras de tecido foram homogeneizadas em um sonicador e em ácido perclórico 0,1 M contendo metabissulfito de sódio a 0,02% e padrão interno. Após centrifugação a  $10000 \times g$  por 30 minutos a  $124^{\circ}\text{C}$ , 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram injetados no cromatógrafo. A fase móvel (pH 4,0) foi composta de ácido cítrico monohidratado (Merck), de sal de sódio do ácido octano-1-sulfônico (Merck), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma) e 900 ml de água deionizada e filtrada através de um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Em seguida foi adicionado metanol (Merck) para uma composição final de 10% de metanol (v/v). A concentração de dopamina, DOPAC foi avaliada por HPLC de fase reversa com detecção eletroquímica. O sistema consiste em uma coluna de fase reversa Synergi Fusion-RPC-18 (150  $\times$  4,6 mm i.d., tamanho de partícula de 4  $\mu\text{m}$ ) equipada com uma pré-coluna de 4  $\times$  3,0 mm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP); um detector eletroquímico (detector eletroquímico ESA Coulochem III) equipado com uma célula guarda (ESA 5020), com o eletrodo ajustado em 350 mV e uma célula analítica de eletrodo duplo (ESA 5011A); e uma bomba LC-20AT (Shimadzu) equipada com um injetor Rheodyne 7725 manual com um *loop* de 20  $\mu\text{L}$ . A coluna foi mantida dentro de um forno com temperatura controlada ( $25^{\circ}\text{C}$ , Shimadzu). A célula possui duas câmaras em série: cada câmara incluía um eletrodo colorimétrico de grafite poroso, um contra-eletrodo duplo e um eletrodo de referência duplo. Os potenciais oxidantes foram estabelecidos em 100 mV para o primeiro eletrodo e em 450 mV para o segundo eletrodo. A DA e o DOPAC foram detectados no segundo eletrodo. As áreas de pico dos padrões foram usadas para quantificar os picos da amostra. Os dados foram expressos em ng/g de tecido com base em estudos anteriores (CHAVES *et al.*, 2020; MOREIRA *et al.*, 2012; VERGARA *et al.*, 2020).

### 3.10 Dosagem plasmática de CBZ

Os animais foram anestesiados profundamente com cetamina e xilasina, e posicionados em decúbito dorsal para realização de toracotomia e acesso à veia cava. Com uma agulha 24 g (20  $\times$  0,55 mm) a veia cava foi puncionada e 5 ml de sangue

foram coletados. Logo após a coleta, a amostra de sangue foi armazenada em um tubo de coleta de sangue com ativador de coágulo e os animais foram eutanasiados. Em seguida, as amostras foram enviadas ao laboratório LANAC-PR que realizou a dosagem plasmática de CBZ por quimiluminescência de micropartículas em suspensão.

### **3.11 Protocolos Experimentais**

Cada protocolo experimental foi realizado em grupos independentes de animais machos e fêmeas. Foram utilizadas duas doses de CBZ (10 e 30 mg/kg, i.p.), a menor dose foi utilizada em testes que dependem da integridade motora do animal, confirmada pelo teste de CA, enquanto que a maior dose foi utilizada nos testes de CPP, dosagem plasmática de CBZ e dosagem de DA no Nac. A representação esquemática dos protocolos experimentais pode ser encontrada acima das figuras correspondentes na seção de Resultados.

#### 1) Avaliação do efeito da CBZ no componente sensorial da dor e locomoção em ratos machos e fêmeas submetidos à CCI-ION

Primeiramente, foi avaliada a eficácia da CBZ em promover redução da hiperalgesia mecânica induzida pela cirurgia de CCI-ION. Para tanto, os animais passaram pela sessão de seleção com os filamentos de VF. Os animais selecionados foram submetidos à cirurgia de CCI-ION. Quinze dias após a cirurgia, os animais passaram por uma nova avaliação da hiperalgesia mecânica pelo VF e então receberam o tratamento com CBZ (10 mg/kg, i.p.) ou VEI (1 mL/kg, i.p.). Foi avaliado o limiar mecânico dos animais 30 minutos após o tratamento e de hora em hora até completar 4 horas. Ao final da medida de uma hora após a injeção, os animais foram colocados no CA, onde foram gravados para posterior análise dos comportamentos exibidos durante 5 minutos. A partir desse experimento, foi estipulado o tempo de uma hora após a injeção de CBZ como o pico do efeito antinociceptivo da droga.

#### 2) Avaliação do efeito da CBZ no paradigma de CPP após CCI-ION em ratos machos e fêmeas

Após 12 dias da cirurgia de CCI-ION, os animais foram expostos ao aparato do CPP com livre acesso entre as câmaras e o tempo de permanência em cada compartimento foi contabilizado. No 13<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia ocorreram as sessões de

condicionamento em que pela manhã o animal recebeu VEI (1 mL/kg, i.p.) e ficou confinado à uma das câmaras e à tarde recebeu CBZ (30 mg/kg, i.p.) e ficou confiando na câmara oposta, por uma hora. No 15º dia após a cirurgia, novamente os animais foram expostos à câmara com livre acesso aos compartimentos e foram gravados durante 15 minutos para posterior análise.

### 3) Avaliação do efeito da CBZ nas USVs e no LCE após CCI-ION em ratos machos e fêmeas

Quinze dias após a CCI-ION, os animais receberam o tratamento com CBZ (10 mg/kg, i.p.) ou VEI (1 mL/kg, i.p.) e após uma hora foram expostos ao microfone ultrassônico para gravação da emissão espontânea de USVs durante 10 minutos. Imediatamente após esse registro, os animais foram colocados no LCE e foram gravados para posterior análise dos comportamentos durante 5 minutos.

### 4) Dosagem plasmática de CBZ e coleta do Nac após a cirurgia de CCI-ION em ratos machos e fêmeas

Para realizar a dosagem de CBZ plasmática, os animais foram primeiramente submetidos à CCI-ION e passados quinze dias foram tratados com CBZ (30 mg/kg, i.p.). Uma hora após o tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina para coleta do sangue, o qual foi enviado para dosagem.

Um grupo independente de animais recebeu tratamento com CBZ (30 mg/kg, i.p.) ou VEI (1 mL/kg, i.p.) no 15º dia após CCI-ION. Uma hora após o tratamento os animais foram eutanasiados com guilhotina e imediatamente após foi realizada a coleta do Nac dividido na porção *shell* e *core*. As amostras foram congeladas à -80°C e posteriormente foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para dosagem de DA e DOPAC.

## **3.12 Análise estatística**

Para a análise dos dados de hiperalgesia mecânica, da emissão de USVs e dosagem de DA e DOPAC foi utilizada Análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste *post hoc* de Bonferroni (ARAYA *et al.*, 2020; GAMBETA *et al.*, 2018; VERGARA *et al.*, 2020). Já para a análise dos resultados do teste de CA, LCE e AUC foi utilizado ANOVA de uma-via com teste de *post hoc* de Bonferroni (CLAUDINO *et al.*, 2018; PRUT; BELZUNG, 2003). Os resultados da dosagem plasmática de CBZ foram avaliados através do teste t de *Student* não pareado, assim como para o teste

do CPP, utilizados para avaliar o score de diferença entre o tempo de permanência antes e depois do condicionamento. Também foi utilizado o teste t de *Student* pareado a fim de observar diferenças em relação ao número de entradas na câmara pareada e o tempo de permanência no teste de CPP (JESUS *et al.*, 2022). Os dados foram apresentados como média  $\pm$  e.p.m. e valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

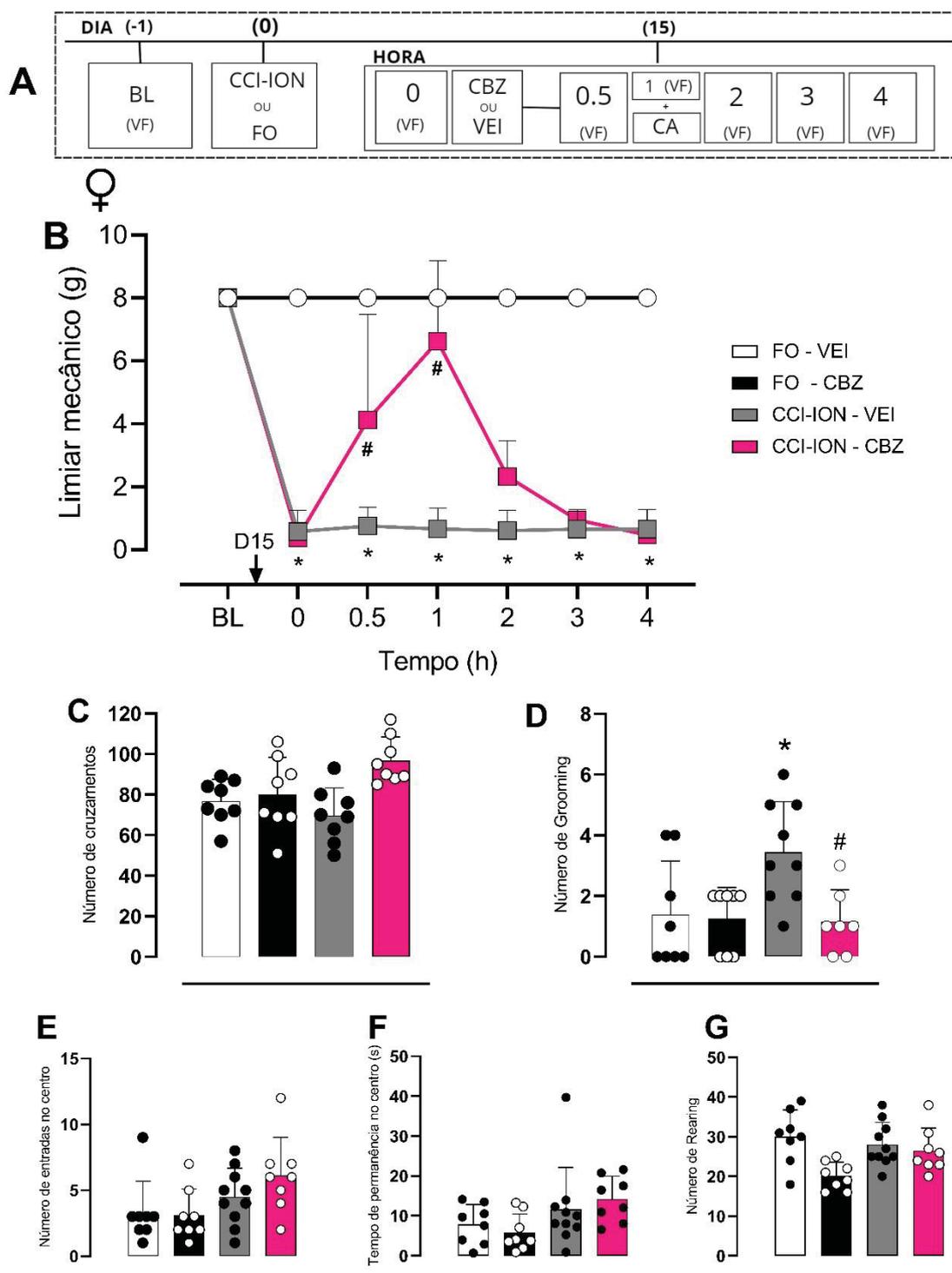
### 4.1 Efeito da CBZ na hiperalgesia mecânica e no teste de CA em ratos machos e fêmeas submetidos à CCI-ION

As Figuras 5A e 6A representam o timeline dos protocolos experimentais. Em fêmeas (Figura 5), a CCI-ION induziu hiperalgesia mecânica evidenciada no 15º dia após a cirurgia, que perdurou durante toda a avaliação, já os animais FO tratados com VEI ou CBZ (10 mg/kg; i.p.) não apresentaram nenhuma alteração no limiar mecânico basal (Figuras 5B). As fêmeas CCI-ION tratadas com CBZ apresentaram uma redução significativa da hiperalgesia mecânica 30 minutos após o tratamento e com o pico da resposta na primeira hora após a administração, quando comparados com o grupo CCI-ION tratado com VEI com uma porcentagem de aumento de 83% (Figura 5B). Na segunda hora após a administração de CBZ essa diferença no limiar mecânico não foi mais observada. Para os machos (Figura 6), a CCI-ION também provocou redução acentuada no limiar mecânico desses animais durante todo o experimento, além disso não foram observadas alterações significativas no limiar de animais FO tratados com VEI ou CBZ (Figura 6B), já os machos CCI-ION tratados com CBZ apresentaram um aumento no limiar de resposta apenas após uma hora do tratamento com CBZ, uma porcentagem de aumento de 66% (Figura 6B). Com isso, podemos observar que a reversão da hiperalgesia mecânica foi maior em fêmeas CCI-ION tratados com a CBZ do que machos do mesmo grupo.

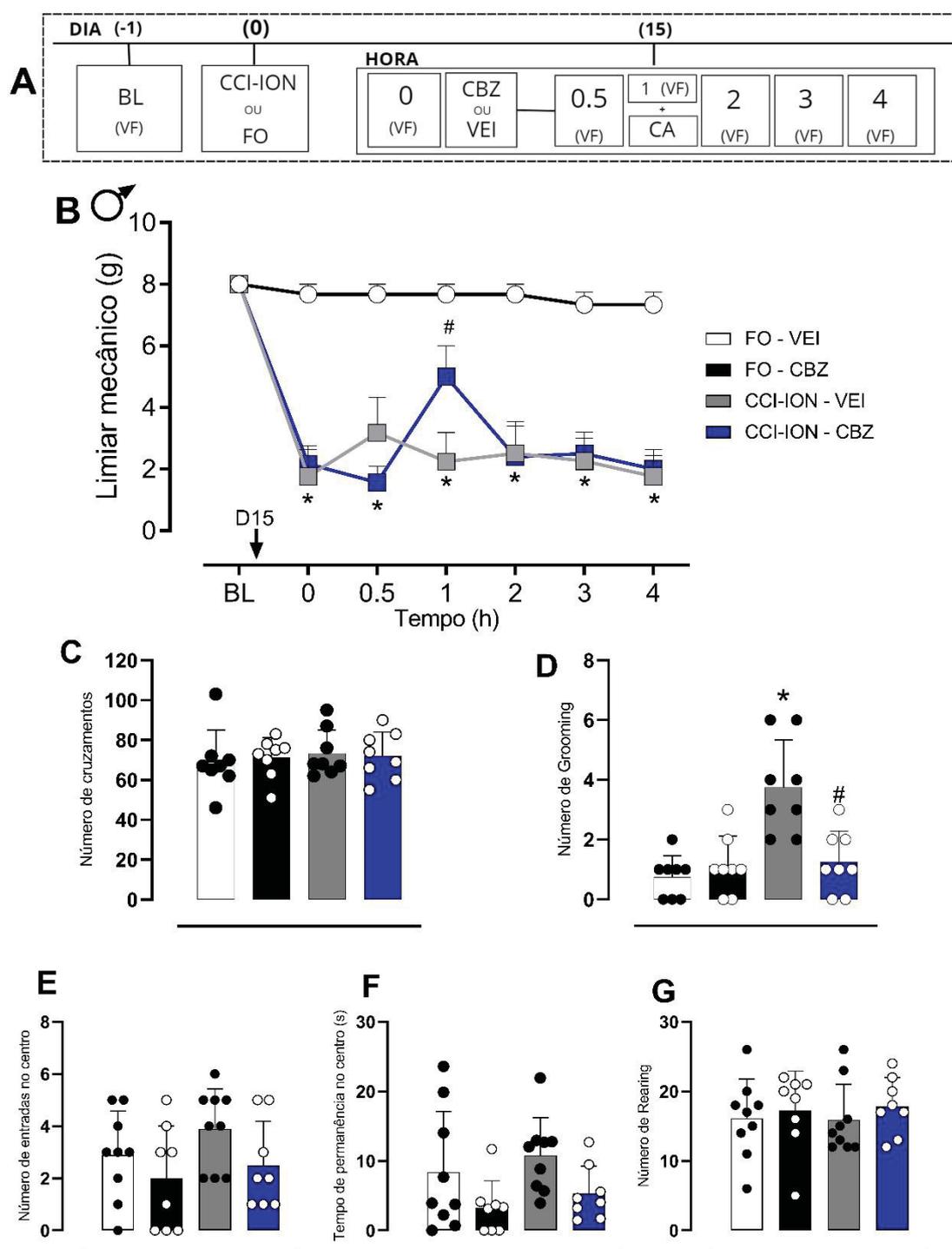
Quanto ao teste de CA, nas fêmeas não foi observado alteração no número de cruzamentos (Figura 5C) demonstrando que nem a CCI-ION nem o tratamento com CBZ (10 mg/kg; i.p.) foi capaz de provocar alterações de locomoção, além disso, foi observado um aumento no comportamento de *grooming* das fêmeas CCI-ION tratadas com VEI e o tratamento com CBZ foi capaz de restaurar esse comportamento (Figura

5D). Foram analisados também outros três comportamentos: o número de cruzamentos no quadrante do centro, tempo de permanência no centro e número de *rearing*, em ratos fêmeas (Figura 5E, 5F, 5G), porém não foram encontradas nenhuma diferença significativa entre os grupos. Para os machos, não houve diferenças estatísticas entre os grupos no número de cruzamento no teste de CA, evidenciando que o tratamento com a CBZ (10 mg/kg; i.p.) não produziu sedação (Figura 6C). Assim como nas fêmeas, foi observado o aumento no comportamento de *grooming* dos machos CCI-ION tratados com VEI e novamente o tratamento com a CBZ foi capaz de impedir esse aumento no comportamento de *grooming* (Figura 6D). Em relação aos demais parâmetros analisados, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos no número de entradas no centro (Figura 6E), tempo de permanência no centro (Figura 6F) e número de *rearing* (Figura 6G). A fim de observação, foi avaliado efeito do tratamento com CBZ (30 mg/kg;i.p.) no teste de CA, nossos resultados (Figura 7) sugerem uma possível sedação desses animais, visto que os animais machos e fêmeas CCI-ION tratados com a CBZ (30 mg/kg;i.p.) apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos no teste de CA.

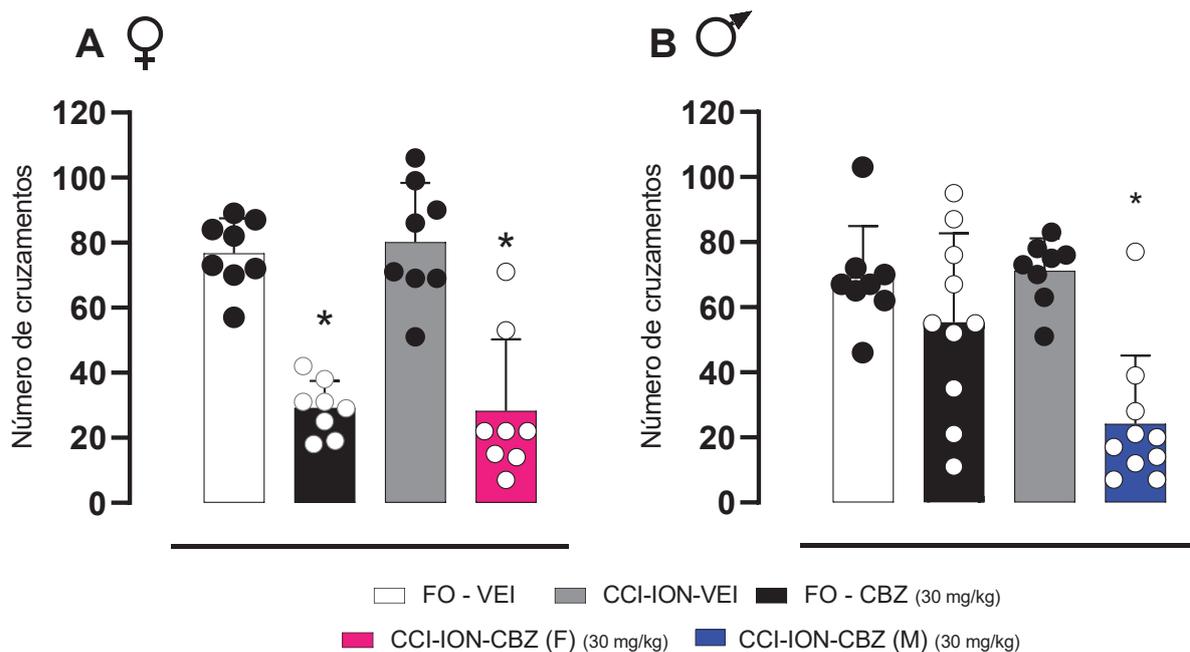
Na tentativa de fornecer uma comparação da hiperalgesia mecânica entre os sexos, foi realizada a análise de área sob a curva (AUC). Foram comparados os valores de AUC entre os grupos FO tratados com VEI e CCI-ION tratados com VEI ou CBZ entre machos e fêmeas no período entre 0 e 4 horas após o tratamento com a CBZ no teste de VF (Figura 8). Nas fêmeas foi observado uma redução da AUC no grupo CCI-ION em comparação com o seu controle (FO). O tratamento com a CBZ produziu um aumento na AUC significativa em relação aos animais que receberam VEI. Quanto aos machos, também observamos uma redução na AUC dos animais CCI-ION em comparação aos FO, porém o tratamento com a CBZ não foi capaz de produzir um aumento significativo na AUC. Além disso, foi realizado um teste t entre fêmeas e machos do mesmo grupo, essa análise mostrou diferenças sexuais entre o grupo CCI-ION tratado com CBZ ( $p=0.024$ ), evidenciando que as fêmeas possuem uma AUC maior que os machos do mesmo grupo. Esses dados sugerem que a CBZ foi mais eficaz nas fêmeas em relação aos machos.



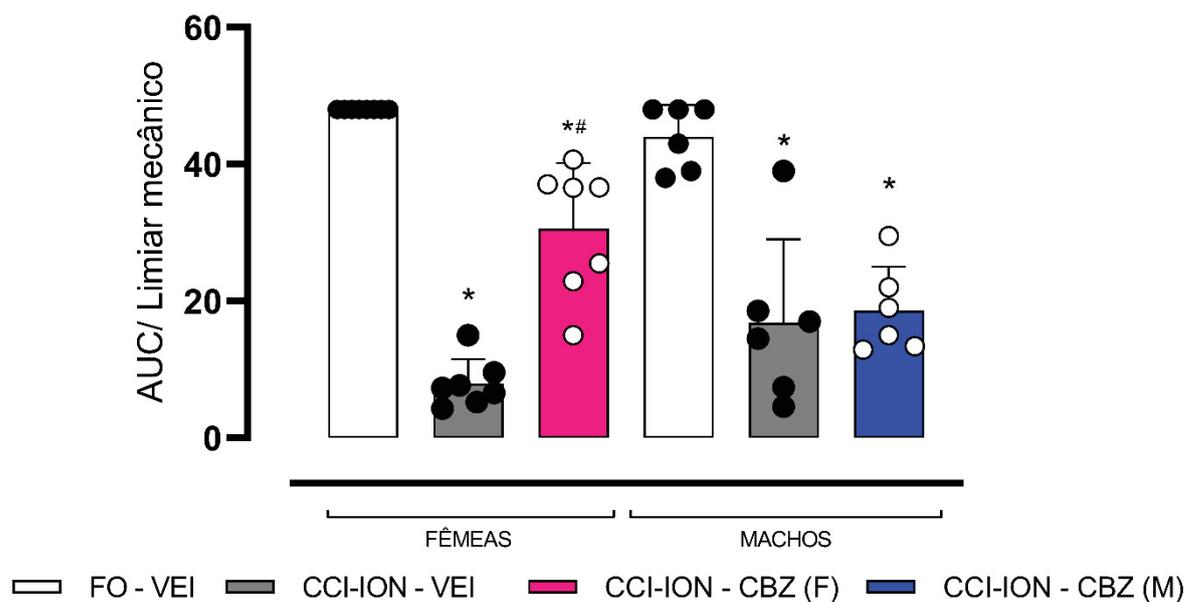
**Figura 5. Efeito da CBZ (10mg/kg) na hiperalgesia mecânica e teste de CA em ratos fêmeas submetidas à CCI-ION.** Timeline do protocolo experimental (A). No 15º dia pós CCI-ION ou falso operado (FO) os animais foram tratados com carbamazepina (CBZ: 10 mg/kg; i.p.) ou veículo (VEI:1 mL/Kg), e o limiar mecânico (VF) foi avaliado 30 minutos e de hora em hora até a quarta hora após os tratamentos (B). Após 1 hora do tratamento os animais foram expostos ao campo aberto (CA), onde foram gravados por 5 minutos. Foram avaliados o número de cruzamentos totais (C), o número de *grooming* (D), o número de cruzamentos no quadrante central (E), o tempo de permanência no centro (F) e o número de *rearing* (G). Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. (n= 8). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo FO- VEI, e # indica  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo CCI-ION – VEI. ANOVA de duas-vias seguido de teste *post hoc* de Bonferroni para a avaliação da hiperalgesia mecânica e ANOVA de uma-avia seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni para a avaliação do teste de CA.



**Figura 6. Efeito da CBZ (10mg/kg) na hiperalgesia mecânica e teste de CA em ratos machos submetidos à CCI-ION.** Timeline do protocolo experimental (A). No 15º dia pós CCI-ION ou falso operado (FO) os animais foram tratados com carbamazepina (CBZ: 10 mg/kg; i.p.) ou veículo (VEI:1 mL/Kg), e o limiar mecânico (VF) foi avaliado 30 minutos e de hora em hora até a quarta hora após os tratamentos (B). Após 1 hora do tratamento os animais foram expostos ao campo aberto (CA), onde foram gravados por 5 minutos. Foram avaliados o número de cruzamentos totais (C), o número de *grooming* (D), o número de cruzamentos no quadrante central (E), o tempo de permanência no centro (F) e o número de *rearing* (G). Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. (n=7-8). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo FO-VEI, e # indica  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo CCI-ION-VEI. ANOVA de duas-vias seguido de teste de Bonferroni para a avaliação da hiperalgesia mecânica e ANOVA de uma-via seguido do teste de post-hoc de Bonferroni para a avaliação do teste de CA.



**Figura 7. Efeito da carbamazepina (30mg/kg) no teste de campo aberto.** No 15º dia pós CCI-ION ou falso operado (FO) os animais foram tratados com carbamazepina (CBZ: 30 mg/kg; i.p.) ou veículo (VEI:1 mL/Kg). Após 1 hora do tratamento os animais foram expostos ao campo aberto (CA), onde foram gravados por 5 minutos. Foram avaliados o número de cruzamentos totais. Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. (n= 8- 10). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo FO– VEI. ANOVA de uma-via seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni para a avaliação do teste de CA.

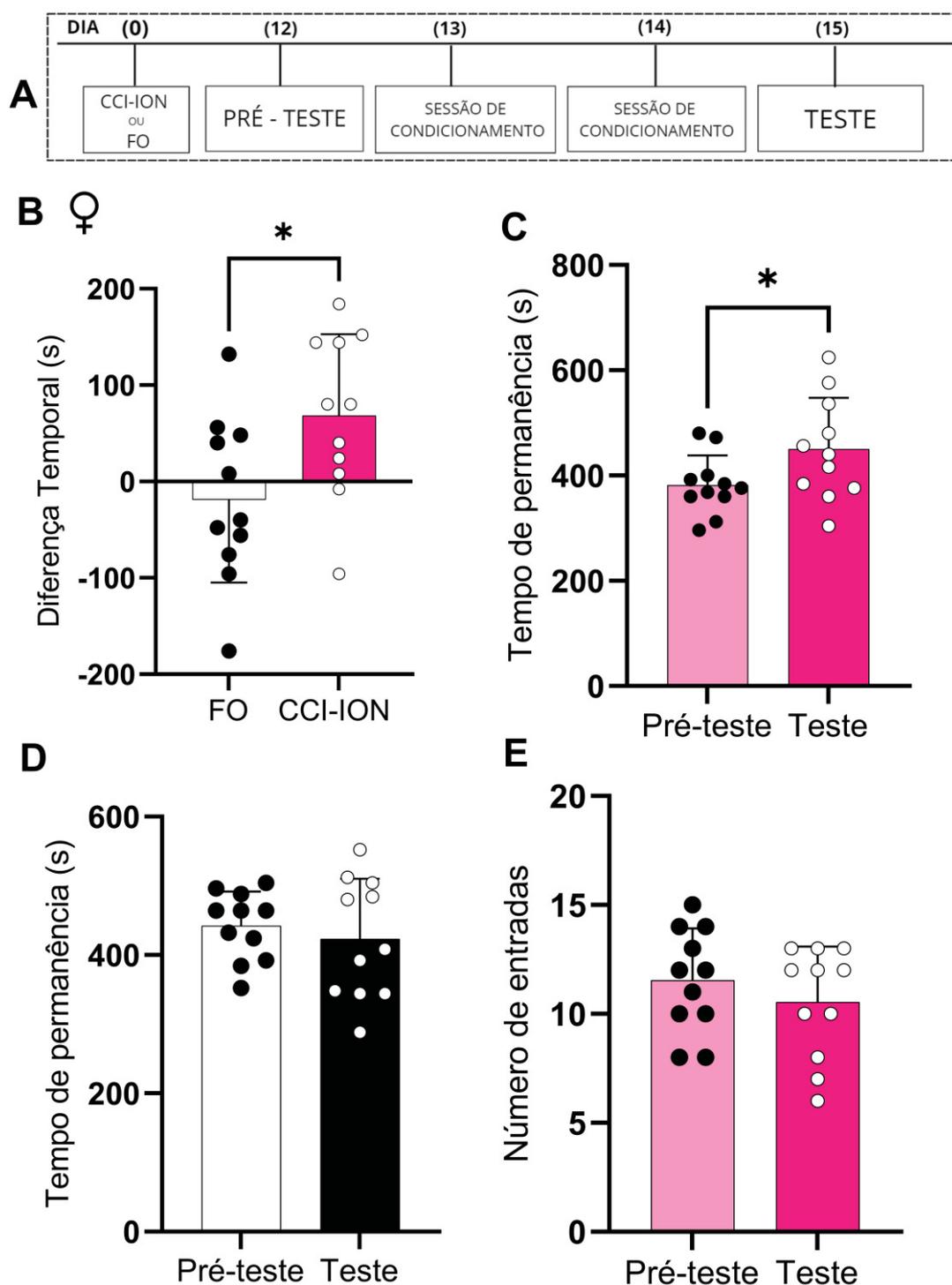


**Figura 8. Comparação da AUC entre os sexos.** A análise da AUC foi realizada com os valores da hiperalgesia mecânica avaliada entre 0 e 4 horas após os tratamentos entre os grupos falso-operado (FO) tratado com veículo (VEI) e CCI-ION tratados com VEI ou carbamazepina (CBZ :10 mg/kg;i.p.) entre machos e fêmeas. Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. (n=7-8). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo FO- VEI, e # indica  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo CCI-ION - VEI. ANOVA de uma-via seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni da AUC entre os grupos.

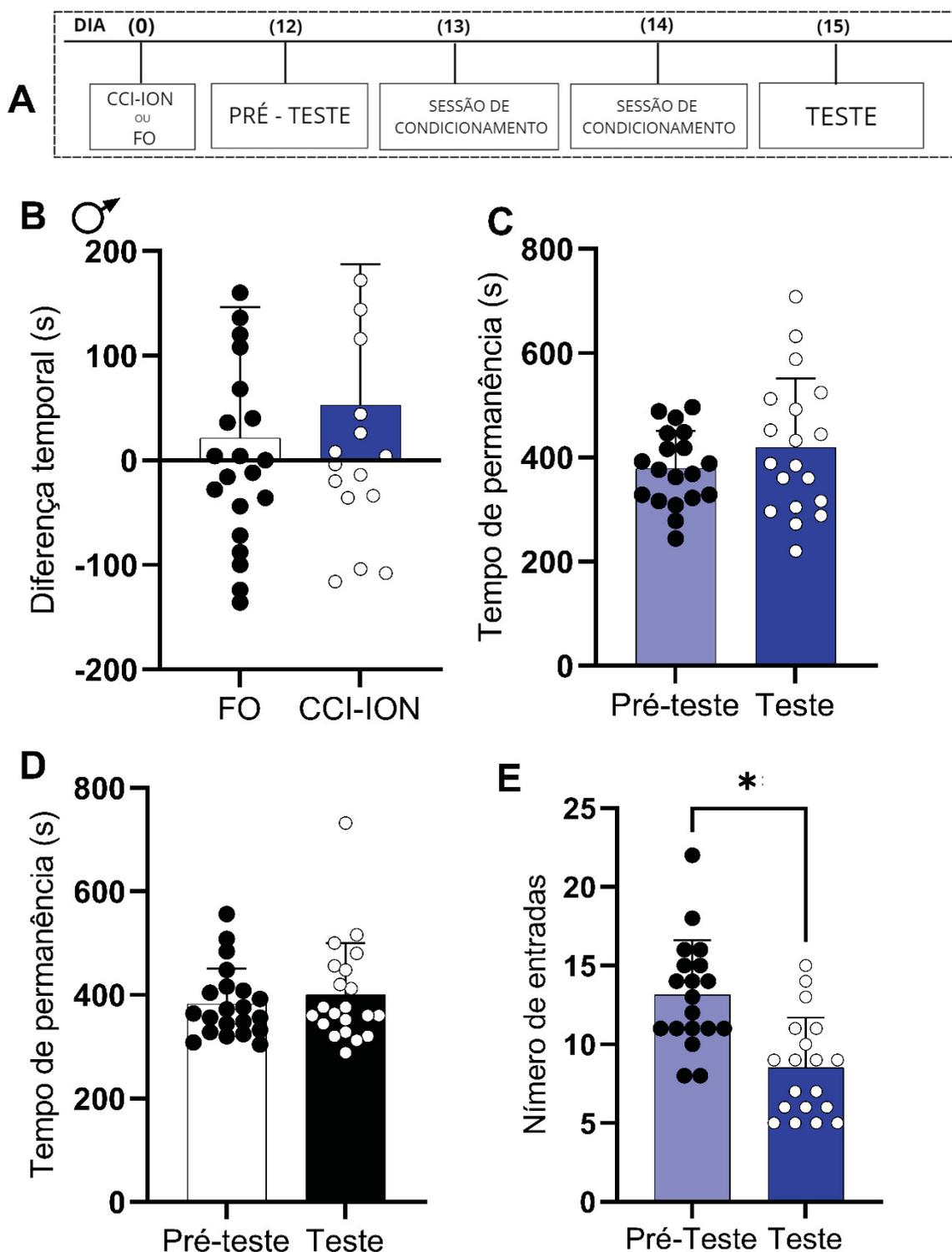
## **4.2 Efeito do tratamento com CBZ no CPP após CCI-ION em ratos machos e fêmeas**

As Figuras 9A e 10A representam o timeline dos protocolos experimentais. Na Figura 6B está representada a diferença estatística encontrada do tempo de permanência na câmara pareada com a CBZ depois e antes do condicionamento em ratos fêmeas FO e CCI-ION. As fêmeas CCI-ION tiveram um resultado positivo da diferença da permanência na cabine pareada com CBZ, indicando um CPP somente nos animais CCI-ION (Figura 9B). Esse dado evidencia que a CBZ não provoca CPP por si só. Quando são comparados os valores brutos de permanência na câmara pareada com a CBZ, os animais CCI-ION fêmeas apresentaram um aumento na permanência após o pareamento (Figura 9C). Também, foram analisados os valores brutos de tempos de permanência das fêmeas FO no pré-teste e teste, mas não foram encontradas diferenças significativas (Figuras 9D). Além disso, foi contabilizado o número de entradas dos animais CCI-ION na câmara pareada com a CBZ. As fêmeas não apresentaram diferenças no número de entradas na sessão pré-teste e teste (Figura 9E).

Já, quanto aos animais machos, não foram encontradas diferenças significativas entre os escores de diferença na permanência na cabine pareada (Figura 10B). Também, não foram observadas diferenças no tempo de permanência nos machos CCI-ION (Figura 10C) e FO (Figura 10E). Foi observado uma redução no número de entradas na cabine pareada com a CBZ em machos no teste em relação ao pré-teste (Figura 10E).



**Figura 9. Efeito do tratamento com CBZ no CPP após CCI-ION em fêmeas.** Timeline dos protocolos experimentais (A). Os parâmetros avaliados foram: a diferença temporal entre a medida basal e o teste (B), o tempo de permanência apresentado na mesma câmara antes e após o pareamento com a CBZ (30 mg/kg; i.p.) nos animais CCI-ION (C), o tempo de permanência apresentado na mesma câmara antes e após o pareamento com a CBZ nos FO (D) e o número de entradas na cabine antes e depois o pareamento com a CBZ (30 mg/kg; i.p.) em animais CCI-ION (E). Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m.. \* indica  $P < 0,05$ , versus grupo FO e ao pré-teste ( $n = 11$ ). Teste t de *Student* pareado (9B) e não pareado (9C,9D,9E).

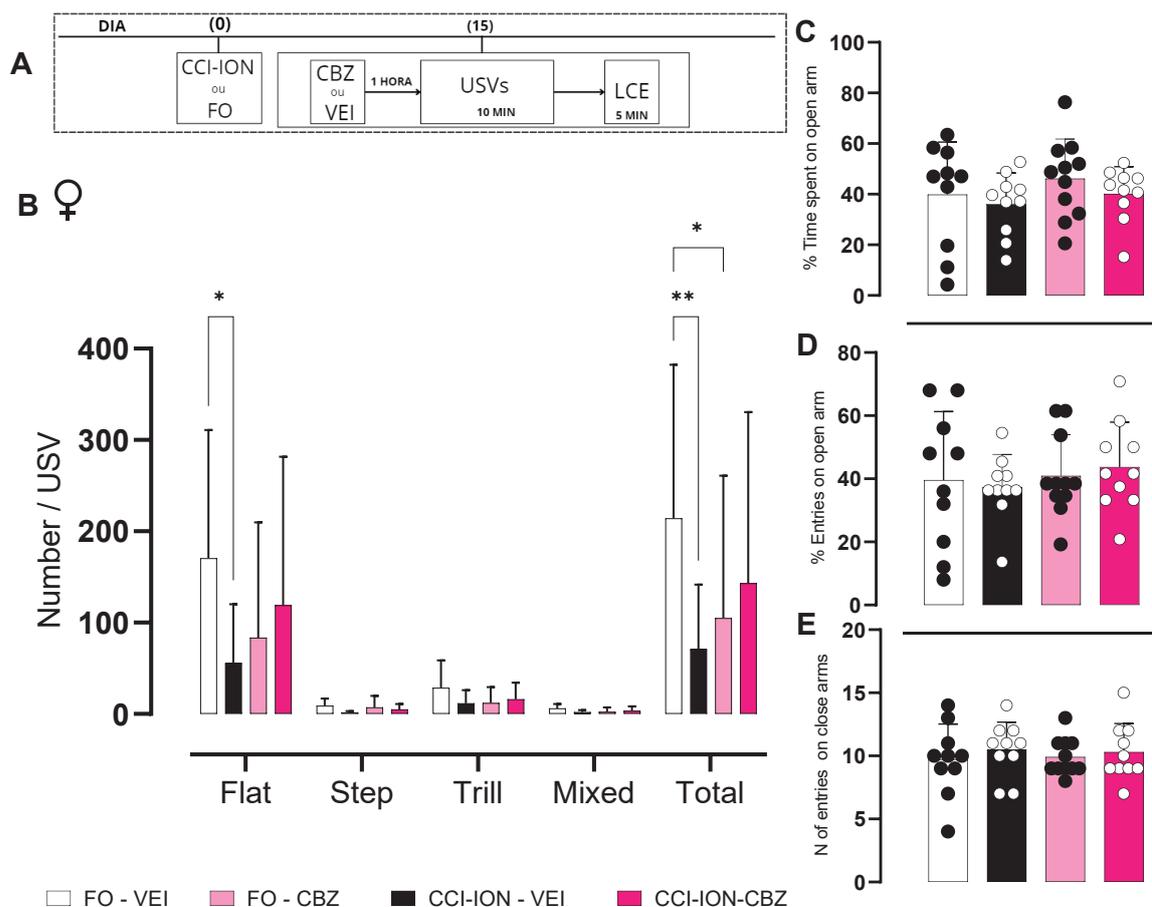


**Figura 10. Efeito do tratamento com CBZ no CPP após CCI-ION em machos.** Timeline dos protocolos experimentais (A). Os parâmetros avaliados foram: a diferença temporal entre a medida basal e o teste (B), o tempo de permanência apresentado na mesma câmara antes e após o pareamento com a CBZ (30 mg/kg; i.p.) nos animais CCI-ION (C), o tempo de permanência apresentado na mesma câmara antes e após o pareamento com a CBZ nos animais FO (E) e o número de entradas na câmara antes e depois o pareamento com a CBZ (30 mg/kg; i.p.) em animais CCI-ION (D). Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. (n= 19 -20) \* indica  $P < 0,05$ , versus grupo FO e ao pré-teste, segundo o teste t de *Student* pareado (10B) e não pareado (10C,10D,10E).

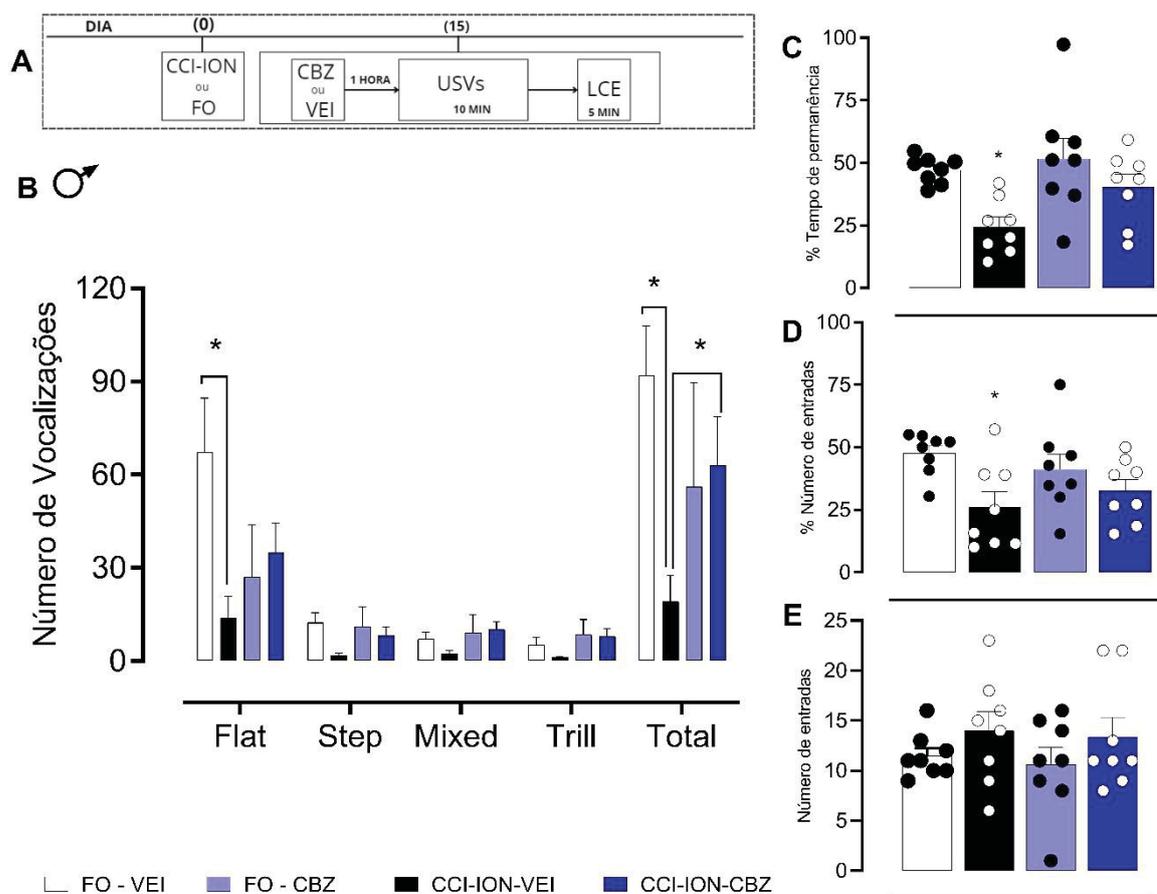
### **4.3 Efeito do tratamento com CBZ na emissão de USVs e no comportamento do tipo ansioso após CCI-ION em machos e fêmeas**

A Figura 11A e 12A ilustram o timeline dos protocolos experimentais. A análise da emissão de USVs revelou que no 15 dia após CCI-ION ratos fêmeas e machos do grupo controle (i.e., FO-VEI) emitiram majoritariamente USVs de 50 kHz, especialmente do subtipo flat (Figuras 11B e 12B, respectivamente). Em fêmeas CCI-ION tratadas com VEI foi observado uma redução na emissão de vocalizações de 50 kHz, porém o tratamento com CBZ (10 mg/Kg; i.p.) não foi capaz de reverter esse comportamento em animais CCI-ION e reduziu as vocalizações totais das fêmeas FO tratados com CBZ em relação as tratadas com VEI (Figura 11B). Foi detectado um número muito baixo de USV de 22 kHz em fêmeas, sem diferença entre os grupos (Figura 11B). Quanto aos machos, assim como as fêmeas, foi observado uma redução significativa na emissão de USVs de 50 kHz e o tratamento com a CBZ (10 mg/kg; i.p.) foi capaz de reverter a redução no número total de vocalizações emitidas, sem diferenças entre os animais FO tratados com VEI ou CBZ. Não foram detectadas USVs de 22 kHz em ratos machos.

Na análise do comportamento do tipo-ansioso pelo LCE, no 15 dia após a CCI-ION, as fêmeas não apresentaram nenhum comportamento associado ao tipo-ansioso. Já os ratos machos CCI-ION apresentaram uma redução da porcentagem do tempo gasto nos braços abertos (Figura 12C), bem como do número de entradas nos braços abertos (Figura 12D) do LCE, porém o tratamento com a CBZ não foi capaz de reverter esse comportamento. 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, em ambos os sexos (Figuras 11E e 12E).



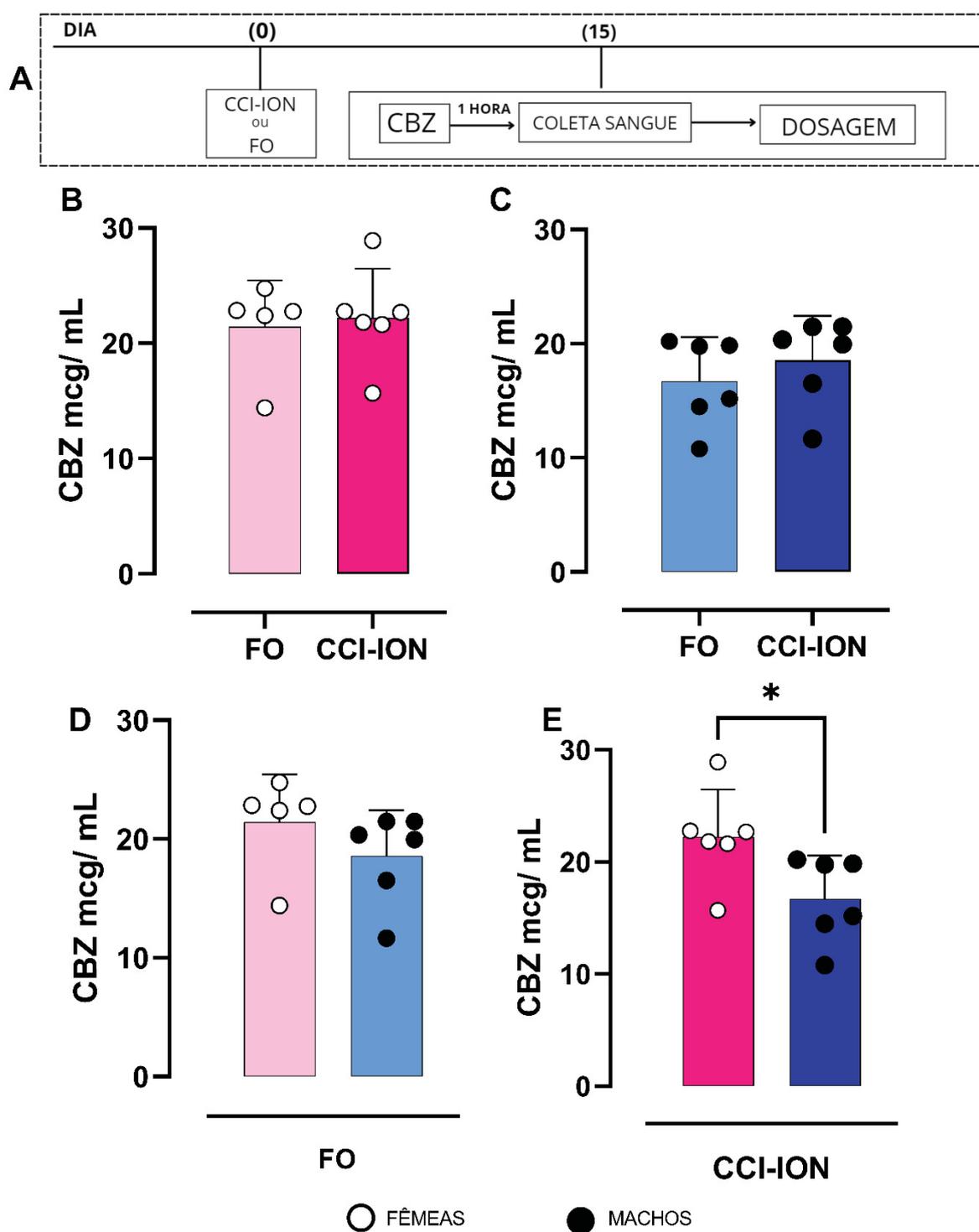
**Figura 11. Efeito da CBZ nas USVs e no comportamento do tipo ansioso após CCI-ION em fêmeas.** Timeline dos protocolos experimentais (A). Quantificação e análise dos subtipos de USVs durante 10 min 1 hora após o tratamento com CBZ (10 mg/kg; i.p.) ou VEI em ratos fêmeas submetidas à CCI-ION ou FO (B). Parâmetros Avaliados no LCE: porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (C); porcentagem do número de entradas nos braços abertos (D); número de entradas nos braços fechados para avaliação da atividade locomotora (E). Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m. \* indica  $P < 0,05$ , versus grupo FO-VEI, e # indica  $P < 0,05$  versus o grupo CCI-ION tratado com CBZ ( $n = 9-11$ ). Para análise das USVs foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni, enquanto que para o LCE foi utilizada ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni.



**Figura 12. Efeito da CBZ nas USVs e no comportamento do tipo ansioso após CCI-ION em machos.** Timeline dos protocolos experimentais (A). Quantificação e análise dos subtipos de USVs durante 10 min 1 hora após o tratamento com CBZ (10 mg/kg; i.p.) ou VEI em ratos machos submetidos à CCI-ION ou FO (B). Parâmetros Avaliados no LCE: porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos (C); porcentagem do número de entradas nos braços abertos (D); número de entradas nos braços fechados para avaliação da atividade locomotora (E). Os valores representam a média  $\pm$  e.p.m.(n= 8)\* indica  $P < 0,05$ , versus grupo FO-VEI, e # indica  $P < 0,05$  versus o grupo CCI-ION tratado com CBZ. Para análise das USVs foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni, enquanto que para o LCE foi utilizada ANOVA de uma via seguida do teste de *post hoc* de Bonferroni.

#### **4.4 Dosagem plasmática de CBZ após CCI-ION em ratos machos e fêmeas**

A Figura 13A ilustra o timeline do protocolo experimental. Foi comparada a concentração plasmática de CBZ dosada 1 hora após o tratamento no 15º dia pós CCI-ION entre as fêmeas FO e CCI-ION, porém não foi encontrada diferença significativa (Figura 13B). Da mesma maneira, não houve diferenças na concentração plasmática de CBZ em ratos machos FO e CCI-ION (Figura 13C). A Figura 13D demonstra que ratos machos e fêmeas do grupo FO não apresentam diferença na concentração plasmática de CBZ. Por outro lado, a Figura 13E mostra que ratos machos submetidos à CCI-ION apresentam concentração plasmática de carbamazepina significativamente inferior àquela detectada nas fêmeas submetidas à CCI-ION.

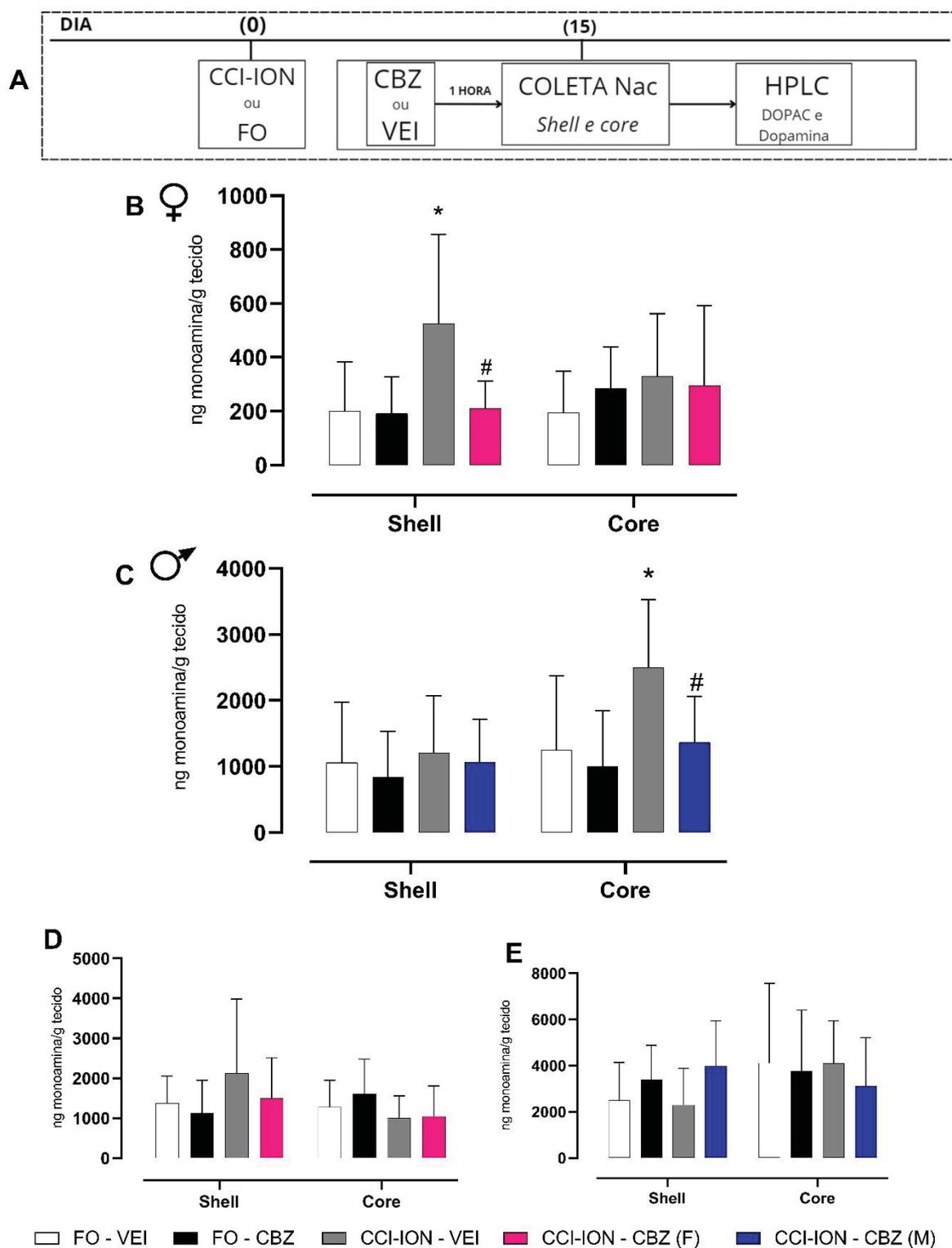


**Figura 13. Dosagem plasmática de CBZ após CCI-ION em ratos machos e fêmeas.** Timeline do protocolo experimental (A). Concentração plasmática de CBZ em fêmeas (B). Concentração plasmática de CBZ em machos (C). Diferença da concentração plasmática de CBZ entre machos e fêmeas, em animais FO (C). Diferença da concentração plasmática de CBZ entre machos e fêmeas, em animais CCI-ION (E). Os valores indicam a média  $\pm$  e.p.m. da variação na concentração plasmática de CBZ (mcg/ mL) ( $n = 5 -6$ ). \*  $p < 0,05$  quando encontrado diferença significativa entre machos e fêmeas, segundo o teste t de *Student* não pareado.

#### **4.5 Efeito da CBZ no conteúdo de DA e DOPAC no NAc *Shell* e *Core* de ratos fêmeas e machos após CCI-ION.**

A Figura 14A ilustra o timeline do protocolo experimental. As fêmeas FO tratadas com VEI ou CBZ não apresentaram diferenças na concentração de DA no NAc *shell* e *core*. Já, as fêmeas CCI-ION tratadas com VEI em comparação às fêmeas FO tratadas com VEI apresentaram um aumento significativo na concentração de DA, somente na porção do NAc *shell*. O tratamento com CBZ foi capaz de reverter esse aumento (Figura 14B).

Quanto aos machos, também não houve diferenças significativas na dosagem de DA nos animais FO tratados com VEI e CBZ. Porém, machos CCI-ION tratados com VEI apresentaram uma concentração elevada de DA em relação ao grupo controle apenas da porção *core* do Nac. O tratamento com a CBZ foi capaz de reverter esse aumento (Figura 14C). A dosagem do metabólito da DA, o DOPAC, não foi diferente entre os grupos, em ambos os sexos (Figura 14D e 14E).



**Figura 14. Efeito da CBZ no conteúdo de DA e DOPAC no NAc *Shell* e *Core* de ratos machos e fêmeas após CCI-ION.** Timeline do protocolo experimental (A). Influência da CBZ (30 mg/kg; i.p.) na concentração de DA no NAc *shell* e *core* de fêmeas (B) Influência da CBZ na concentração de DA no NAc de machos (C). Influência da CBZ na concentração de DOPAC no NAc de fêmeas (D). Influência da CBZ na concentração de DOPAC no NAc de machos (E). Os valores indicam a média  $\pm$  e.p.m. da variação na concentração da monoamina (ng/ tecido) ( $n = 10$ ). \*  $p < 0,05$  quando encontrado diferença significativa entre FO-VEI e # $p < 0,05$  quando encontrado diferença entre CCI-ION-VEI. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida do teste post *hoc* de Bonferroni.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da CBZ na hiperalgesia mecânica e no teste de CA em ratos machos e fêmeas submetidos à CCI-ION

No presente estudo, a CCI-ION foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica, 15 dias após o procedimento e perdurou durante toda a avaliação, em ratos machos e fêmeas. Essa constatação vai de acordo com dados prévios da literatura (ARAYA *et al.*, 2020, 2021; CLAUDINO *et al.*, 2018; DESEURE; HANS, 2017; KOPRUSZINSKI;2012; PINEDA-FARIAS *et al.*, 2021), inclusive, estudos do grupo demonstraram que ratos submetidos à CCI-ION desenvolvem hiperalgesia mecânica tardiamente (10 dias após a CCI-ION) e que perdura por pelo menos três meses (CHICHORRO *et al.*, 2006), além de evidenciar o desenvolvimento de sensibilização central e a participação de projeções descendentes facilitatórias na manutenção da dor crônica nesse modelo (NONES *et al.*, 2017) .

Considerando que a CBZ é a primeira linha de escolha para o tratamento da NT, diversos estudos pré-clínicos já evidenciaram o efeito da CBZ em modelos de dor neuropática trigeminal em ratos (DESEURE; HANS, 2017; KOIZUMI *et al.*, 2021; WEI *et al.*, 2022). Nossos dados estão de acordo com o encontrado na literatura e evidenciam que uma injeção intraperitoneal de CBZ (10 mg/kg) é capaz de diminuir a hiperalgesia mecânica induzida por CCI-ION em ratos machos e fêmeas. Em fêmeas, o efeito anti-hiperalgésico se deu logo após 30 minutos da injeção e perdurou até a primeira hora, enquanto que, em machos, o efeito se restringiu à primeira hora. Esse dado corrobora uma publicação prévia do nosso grupo em que foi demonstrado o efeito anti-hiperalgésico da CBZ em ratos machos submetidos a CCI-ION apenas na primeira hora após a administração, mesmo com a utilização de uma dose maior, 30 mg/kg (ARAYA 2022b).

A fim de avaliar as possíveis diferenças sexuais na resposta à CBZ na hiperalgesia mecânica, foi realizado a análise da AUC que evidenciou melhor efeito da CBZ nos ratos fêmeas em comparação com os machos.

A diferença sexual do efeito da CBZ já foi explorada na literatura, Pineda-Farias e colaboradores (2021) avaliaram o efeito da CBZ em dois modelos de dor neuropática – constrição do nervo infraorbital e constrição do nervo ciático – em ratos machos e fêmeas. A CBZ foi eficaz na redução da hiperalgesia mecânica apenas no modelo de CCI-ION, o que está de acordo com sua indicação clínica que se restringe a dores

neuropáticas trigeminais. Ademais, o efeito cumulativo da CBZ (50mg/kg; i.p.) na sensibilidade mecânica orofacial (30 minutos até a 3 hora) medida pelo *Orofacial Pain Test* (i.e. teste automatizado para avaliação da hiperalgesia orofacial) foi maior em fêmeas do que em machos, corroborando nossos achados.

O teste de CA é realizado para avaliar a locomoção, sedação e também comportamento do tipo-ansioso de ratos (BÖRCHERS *et al.*, 2022; PRUT; BELZUNG, 2003). Sabe-se que a CBZ provoca sedação e alterações no controle motor (KAUSSNER *et al.*, 2010), portanto analisamos o efeito da CBZ no teste de CA em ratos submetidos à CCI-ION. Tanto em fêmeas quanto em machos não houve alteração de locomoção após a CCI-ION, assim como o tratamento com a CBZ (10 mg/kg; i.p.) não foi capaz de alterar os parâmetros de locomoção em ambos os sexos.

O tratamento com CBZ (30 mg/kg; i.p.) reduziu o número de cruzamentos em machos e fêmeas evidenciando uma possível sedação desses animais e, por isso, a dose de 10 mg/kg foi considerada em todos os testes que dependem da integridade locomotora do animal (i.e., VF, USVs e LCE). Assim como já demonstrado em machos pelo nosso grupo (CLAUDINO *et al.*, 2018; GAMBETA *et al.*, 2018), no presente estudo evidenciamos que a CCI-ION não promove comprometimento motor em ratos machos e fêmeas. Para avaliar o comportamento do tipo ansioso no CA, foram registrados quatro comportamentos: número de *rearing*, número de *grooming*, cruzamentos no centro do CA e tempo de permanência no centro do CA (BÖRCHERS *et al.*, 2022; DOMONKOS *et al.*, 2017). Dentre os parâmetros avaliados, apenas o número de comportamento de *grooming* mostrou diferença entre grupos. Em fêmeas e machos, os animais CCI-ION tratados com VEI apresentaram um aumento no comportamento de *grooming* e o tratamento com a CBZ foi capaz de reverter essa diferença. Geralmente, esse comportamento é associado à ansiedade (ORUMIYEHEI *et al.*, 2022), porém o comportamento de *grooming* também é considerado uma medida de dor espontânea em diversos modelos de dor orofacial (NAGAKURA; NAGAOKA; KUROSE, 2021). Além disso, o efeito ansiolítico da CBZ é controverso na literatura, mas dados do nosso grupo comparam o efeito da CBZ e do midazolam em ratos CCI-ION no teste do LCE (ARAYA, *et al.*, 2022). Diferentemente do controle positivo midazolam, a CBZ não foi capaz de impedir o desenvolvimento de comportamento tipo-ansioso. Com essas considerações, o aumento do número de *grooming* parece indicar nocicepção. Já foram observados um aumento do *grooming* espontâneo em modelo de CCI-ION (DESEURE; HANS, 2017; NONES *et al.*, 2017;

VOS; STRASSMAN; MACIEWICZ, 1994). E o tratamento com a CBZ foi capaz de reverter esse comportamento, Deseure e Hans (2017) avaliaram o comportamento de *grooming* em animais submetidos à CCI-ION em diferentes dias após a cirurgia. O pico do comportamento de *grooming* se deu na primeira semana após CCI-ION e a diferença estatística permaneceu até o final da avaliação (i.e., 26 dias). Deseure e Hans observaram que o tratamento com a CBZ (30 mg/kg; i.p.) foi capaz de reduzir o comportamento de *grooming* dos animais CCI-ION no decorrer de toda a avaliação.

Com isso, a CBZ é eficiente em reduzir tanto a dor evocada (i.e. dependente de uma resposta à estímulo externo, como o VF) como a dor espontânea (i.e. determinada pelo comportamento espontâneo do animal, como a contagem de *grooming*) em ratos machos e fêmeas submetidos à CCI-ION.

## **5.2 Efeito do tratamento com CBZ no CPP após CCI-ION em ratos machos e fêmeas**

O CPP foi originalmente desenvolvido para observar o efeito aditivo de drogas de abuso, justamente por avaliar o componente motivacional associado à recompensa (MCKENDRICK; GRAZIANE, 2020). Posteriormente, estudos utilizaram o CPP como parâmetro para avaliar o componente de dor tônica (GEE *et al.*, 2020; KING *et al.*, 2009; PORRECA; NAVRATILOVA, 2017), partindo do princípio que o alívio da dor é recompensador, assim, drogas que não são recompensadoras na ausência de dor, podem se tornar na presença dela (KING *et al.*, 2009). Além das crises paroxísticas de dor, a dor tônica na NT afeta cerca de metade dos pacientes com a doença (MAARBJERG; BENOLIEL, 2021). Por isso, utilizamos o CPP para avaliar a presença de dor tônica no modelo de CCI-ION e a eficácia da CBZ nesse parâmetro.

Pineda-Farias e colaboradores (2021) já demonstraram a presença de CPP em animais CCI-ION tratados com CBZ, porém machos e fêmeas foram avaliados conjuntamente. No presente estudo, dados dos animais machos e fêmeas foram analisados separadamente, indicando que a CBZ induz CPP apenas nas fêmeas. Pelas nossas pesquisas, essa é a primeira demonstração de diferenças sexuais no CPP em animais tratados com CBZ. Tomados em conjunto, nossos resultados indicam melhor eficácia da CBZ na dor evocada e na dor tônica em fêmeas e reforçam a importância de avaliar possíveis diferenças na eficácia clínica da CBZ na NT em homens e mulheres.

Em machos FO tratados com CBZ, foi observado uma redução no número de entradas na câmara associada à CBZ. Esse resultado não foi esperado e necessita de maiores investigações. Porém, não podemos considerar um efeito sedativo pois os animais são testados na ausência da droga.

Biologicamente, a motivação direcionada à recompensa é associada ao sistema mesolímbico dopaminérgico, pela a ativação dos neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral que partem para o NAc, o que nos leva à crer que o alívio da dor ativaria essa via (KING *et al.*, 2009). De fato, a dor crônica está associada à uma redução da dopamina nessa via, e por isso, pacientes com essa condição são mais propícios à desenvolverem dependência (PORRECA; NAVRATILOVA, 2017). Com isso, nossos resultados sugerem que o mecanismo recompensador/motivacional participa, de maneira mais significativa em fêmeas CCI-ION. Parte da justificativa pode estar relacionada às diferenças hormonais entre os sexos, visto que o estradiol tem efeito modulador no sistema mesolímbico dopaminérgico (CALIPARI *et al.*, 2017).

### **5.3 Efeito do tratamento com CBZ na emissão de USVs e no comportamento do tipo ansioso após CCI-ION em machos e fêmeas**

Nossos resultados confirmam relatos prévios da literatura de que a presença de dor neuropática reduz a emissão de USVs de 50 kHz em ratos (ARAYA *et al.*, 2021; BURGDORF *et al.*, 2019) e ampliam essas observações com a demonstração de que fêmeas também apresentam essa redução .

De fato, as fêmeas CCI-ION tratadas com VEI apresentaram uma redução no número de USVs de 50 kHz, porém o tratamento com CBZ (10 mg/kg; i.p.) não foi capaz de reverter esse comportamento. As fêmeas FO tratadas com CBZ apresentaram uma redução significativa no número total de USVs de 50 kHz significativa quando comparada com os animais FO tratados com VEI. Essa observação é uma limitação do nosso estudo, pois a CBZ por si só foi capaz de reduzir a emissão de vocalizações. Isso pode estar relacionado com os efeitos colaterais da CBZ, visto que o animal FO não apresenta dor. Essa redução é melhor visualizada em fêmeas, o que pode ser justificada pela oscilação hormonal nas diferentes fases do ciclo estral. É sabido que os hormônios esteroidais e o ciclo estral podem interferir na emissão de USVs de ratos fêmeas, evidenciando que períodos de alto estrógeno estão relacionados com uma maior emissão de vocalizações em ratos fêmeas

(LENELL; JOHNSON, 2017). Essa também pode ser uma justificativa para não encontramos diferenças significativas no tratamento com a CBZ em fêmeas, visto que diferenças no ciclo estral podem ter contribuído para a grande variabilidade intergrupo da análise da USVs. Além disso, é possível observar que as fêmeas vocalizam mais que os machos, o que pode dificultar a detecção do efeito da CBZ em fêmeas.

Os machos CCI-ION apresentaram uma redução na emissão de USVs de 50 kHz, quando comparados com os animais FO. O tratamento com a CBZ (10 mg/kg) foi capaz de reverter a emissão de USVs ao padrão normal. Esse resultado foi publicado no artigo analisando a emissão das USVs como modelo de avaliação da dor emocional (ARAYA et al., 2022b), foi observado que o alívio da dor tanto com a utilização da CBZ ou da lidocaína, restaura o padrão de USV em animais CCI-ION. Já o tratamento com midazolam não promove alterações nos animais CCI-ION, mas reduz as vocalizações dos animais FO. Com isso, nesse trabalho foi discutida a participação do sistema dopaminérgico na emissão de USVs de 50 kHz, visto que um aumento na concentração de DA no NAc é associado à emissão de 50 kHz (BRUDZYNSKI, 2009; BURGDORF; PANKSEPP, 2001).

De fato, é amplamente discutido na literatura que o sistema colinérgico mesolímbico inicia o estado aversivo de ansiedade com emissão das vocalizações de 22 kHz, enquanto o sistema dopaminérgico mesolímbico inicia o estado apetitivo de hedonia com emissão das vocalizações de 50 kHz (BRUDZYNSKI, 2021). Estudos do nosso grupo comprovam essa observação, já que a administração de drogas psicoestimulantes dopaminérgicas como as anfetaminas aumentam as USVs de 50 kHz em animais CCI-ION (ARAYA et al., 2021). Assim, é possível inferir que a redução de vocalizações de 50 kHz em animais CCI-ION está relacionada à diminuição da atividade dopaminérgica da via mesolímbica, como resultado do estado de dor crônica. Além disso, é possível inferir que o estado de dor crônica afeta a interação social desses animais, visto que as vocalizações do tipo flat têm a função de coordenação social (WÖHR et al., 2008). Ademais, não foram detectadas vocalizações de 22 kHz de relevância em machos e fêmeas, o que está de acordo com um estudo prévio do grupo (ARAYA et al., 2022). Tem sido sugerido que o aumento significativo da emissão de vocalizações de 22 kHz está associado à dor aguda, pois indica um sinal de alerta, e o aumento da emissão desse tipo de USV não foi detectado em modelos de dor orofacial persistente (ARAYA et al., 2022; BARROSO et al., 2019).

O teste de LCE é utilizado para avaliar comportamento do tipo-ansioso e se baseia no princípio do roedor evitar locais abertos (BÖRCHERS *et al.*, 2022). Nosso grupo já demonstrou o desenvolvimento de comportamento tipo ansioso, porém não depressivo, em animais machos submetidos a CCI-ION (GAMBETA *et al.*, 2018). Os dados do presente estudo revelam que, enquanto as fêmeas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, os machos CCI-ION permaneceram menos tempo no braço aberto em relação ao respectivo controle, demonstrando um comportamento do tipo-ansioso. Segundo nossas observações, é a primeira vez que se demonstra essa diferença sexual no desenvolvimento de comportamento tipo ansioso após CCI-ION. Uma possível explicação para essa diferença sexual observada pode ser decorrente da variação hormonal presente nas fêmeas. De fato, diversos estudos já observaram o efeito do ciclo estral no teste de LCE. Frye e Walf (2004) observaram que fêmeas ovariectomizadas passaram menos tempo no braço aberto do LCE do que fêmeas naive, inclusive o tratamento com estradiol em fêmeas ovariectomizadas aumentou o tempo de permanência no braço aberto, tendo efeitos ansiolíticos.

Apesar disso, o tratamento com CBZ não foi capaz de restaurar o comportamento tipo-ansioso em machos. Esse dado está de acordo com outros estudos que mostram que uma única administração de CBZ não foi capaz de promover um alívio da ansiedade (MULA; PINI; CASSANO, 2007), porém, outros demonstram efeito ansiolíticos desses fármacos (MIRZA *et al.*, 2005; ZIMCIKOVA *et al.*, 2017). Devido essa controvérsia da literatura, esse resultado corrobora uma publicação prévia do nosso grupo que avaliou o efeito ansiolítico da CBZ em ratos machos. Nesse estudo foi demonstrado que drogas com potencial analgésico na NT, tais como lidocaína e CBZ eram eficazes na dor evocada e na dor tônica, porém não tinham influencia com comportamento do tipo ansioso de ratos machos submetidos a CCI-ION. Por outro lado, o ansiolítico midazolam não afetou nenhum parâmetro de dor, mas promoveu um aumento no tempo de permanência nos braços abertos de animais CCI-ION (ARAYA *et al.*, 2022). Esses resultados sugerem que apesar de dor e ansiedade serem condições relacionadas, o desenvolvimento da dor crônica e do comportamento tipo ansioso são dependentes de mecanismos diferentes e podem ser diferenciados através de ferramentas farmacológicas.

#### **5.4 Dosagem plasmática de CBZ após CCI-ION em ratos machos e fêmeas**

A dosagem de CBZ no plasma de ratos machos e fêmeas foi realizado para avaliar as diferenças na biodisponibilidade da CBZ entre os sexos. Nossos resultados mostraram que as fêmeas CCI-ION possuem uma concentração plasmática de CBZ elevada em relação aos machos do mesmo grupo, essa diferença não foi observada em animais FO. Essa diferença sexual já foi reportada na literatura, inclusive clinicamente sugere-se o uso de doses menores de CBZ em pacientes do sexo feminino, devido ao maior potencial de toxicidade (BRICK, 2011). A CYP3A4, principal enzima metabolizadora da CBZ, é um grande alvo de estudos de diferenças sexuais, evidenciando que o sexo feminino apresenta uma atividade da enzima diminuída em relação ao sexo masculino (WOLBOLD *et al.*, 2003). De fato, estudos demonstram que diferenças na farmacocinética parecem ser a principal causa para essa diferença sexual evidenciada. Marino e colaboradores (2012) observaram que o *clearance* absoluto e o tempo de meia-vida da CBZ foram significativamente menores em homem em relação às mulheres. Assim como é demonstrado no presente trabalho, essas diferenças significativas em parâmetros farmacocinéticos indicam a necessidade de menores doses para pacientes do sexo feminino.

#### **5.5 Efeito da CBZ no conteúdo de DA e DOPAC no NAc *Shell* e *Core* de ratos machos e fêmeas após CCI-ION.**

A transição da dor aguda para a crônica inicialmente requer atividade dopaminérgica na via mesolímbica e posteriormente é associada com o decaimento da DA nessa via (VERGARA *et al.*, 2020). Nosso grupo observou uma ativação neuronal do NAc após 15 dias da CCI-ION que foi acompanhado com uma redução na expressão da tirosina-hidroxilase, o que indica diminuição no nível de DA no NAc (ARAYA *et al.*, 2021). Novamente evidenciando que uma baixa atividade dopaminérgica no sistema mesolímbico está associado à manutenção da dor crônica.

Nossos resultados sugerem o oposto. A dosagem de DA por HPLC no Nac *shell* e *core* de animais evidenciou que a CCI-ION promove um aumento da concentração de DA enquanto que o tratamento com CBZ reverte essa diferença. Em fêmeas, esse aumento foi observado na região *shell*, e nos machos na região *core*. Essa diferença encontrada se dá pela técnica utilizada, de fato, os estudos que observam uma diminuição na concentração de DA em estados de dor crônica, fazem uso da técnica de micro-diálise em que se observa o tônus dopaminérgico liberado especificamente

na região da fenda sináptica. Já o HPLC quantifica toda a DA presente intra e extracelular, com menos especificidade (FLORESCO *et al.*, 2003). Apesar dessa diferença metodológica, nosso dado sugere alterações no sistema mesolímbico dependentes da CCI-ION e apresenta diferenças sexuais até então não reportada na literatura. Por exemplo, pode-se observar que as fêmeas possuem uma diferença basal de dopamina na via mesolímbica em relação aos machos, sugerindo uma diferença sexual importante nesse parâmetro.

O NAc é considerado um regulador motivacional e que possui diversas conexões com áreas cerebrais que modulam a dor e é subdividido em duas regiões com funções diferentes: *shell* e *core*. Enquanto o NAc *shell* participa no controle do comportamento de busca de recompensa por informações espaciais/contextuais, o NAc *core* é responsável pelo controle sobre tais comportamentos (ISLAM *et al.*, 2021). Há também evidências de modulação do receptor de DA, principalmente o receptor D1, evidenciando que o aumento de DA no NAc *shell* aumenta o controle espacial sobre a aprendizagem apetitiva. Em contraste, o bloqueio da neurotransmissão DA no NAc *shell* atenua o controle espacial sobre o condicionamento, a mesma manipulação no NAc *core* tem o efeito de não apenas atenuar o condicionamento de sinalização, mas também de aumentar o condicionamento espacial (CALIPARI *et al.*, 2017). Com essas observações é possível inferir que as fêmeas apresentaram CPP na presença da CBZ pela alteração dopaminérgica no NAc *shell*, implicado na consolidação de memórias afetivas, enquanto que os machos, por apresentarem alterações no NAc *core*, não apresentam CPP. Experimentos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese, entretanto, esses dados reforçam possíveis diferenças sexuais no mecanismo e eficácia da CBZ com potencial relevância clínica. A tabela 1 descreve resumidamente os principais resultados obtidos.

RESULTADO	CCI-ION - VEI Em relação ao FO - VEI		CCI-ION - CBZ Em relação ao CCI-ION -VEI	
	MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA
VF	↑ hiperalgesia mecânica	↑ hiperalgesia mecânica	↓ hiperalgesia mecânica (1 hora)	↓ hiperalgesia mecânica (0.5 e 1 hora)
CA	↔ locomoção ↑ grooming	↔ locomoção ↑ grooming	↔ locomoção ↓ grooming	↔ locomoção ↓ grooming
AUC	Sem diferença sexual		Fêmeas + sensível à CBZ	
CPP	-----	-----	↔	PRESENÇA DE CPP
USVs	↓ USVs 50kHz	↓ USVs 50kHz	↑ USVs 50kHz	↔
LCE	comportamento tipo-ansioso	↔	↔	↔
CBZ	-----	-----	Fêmeas + sensível à CBZ	
DA	↑ core	↑ shell	↓ core	↓ shell
DOPAC	↔	↔	↔	↔

**Tabela 1 – Resumo dos principais resultados encontrados.** São apresentados os resultados encontrados e as principais diferenças sexuais apresentadas: ↑ aumento; ↔ sem alteração observada; ↓ diminuição, --- não analisado.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados contribuíram para ampliar a caracterização do modelo de CCI-ION em ratos machos e fêmeas, bem como forneceram evidências adicionais da eficácia da CBZ em parâmetros com valor translacional. Nossos dados sugerem que a CBZ é mais eficaz em fêmeas, que inclusive apresentaram concentração plasmática superior do fármaco em comparação com machos tratados com a mesma dose. Entretanto, mais estudos são necessários para a compreensão das diferenças sexuais nos efeitos da CBZ e sua implicação na prática clínica. Adicionalmente, nossos dados reforçaram observações prévias de que a CBZ não modifica o comportamento do tipo ansioso dos animais CCI-ION, o que sugere a necessidade de acompanhamento clínico diferenciado para o paciente que apresenta ansiedade associada à NT. Por

fim, nossos dados indicam que o efeito analgésico da CBZ pode estar relacionado à sua capacidade modular o tônus dopaminérgico no NAc. Uma investigação mais aprofundada sobre o papel da via mesolímbica dopaminérgica na manutenção da dor contínua em decorrência da lesão do nervo trigêmeo pode permitir a detecção de novos alvos moleculares, bem como contribuir para o desenvolvimento de novas terapias.

## REFERÊNCIAS

- AHN, Dong K. *et al.* Compression of the trigeminal ganglion produces prolonged nociceptive behavior in rats. **European Journal of Pain**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 568–575, 2009.
- AKERMAN, Simon; HOLLAND, Philip R.; GOADSBY, Peter J. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 570–584, 2011.
- ARAYA, Erika *et al.* Acute orofacial pain leads to prolonged changes in behavioral and affective pain components. [s. l.], v. 161, p. 2830–2840, 2020.
- ARAYA, Erika I *et al.* Chronic Pain: Focus on Anticonvulsants. **CNS and Neurological Disorders**, [s. l.], v. 10, p. 269–313, 2022.
- ARAYA, Erika Ivanna *et al.* Trigeminal Neuralgia: Basic and Clinical Aspects. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 109–119, 2019.
- ARAYA, Erika I. *et al.* Trigeminal neuropathic pain causes changes in affective processing of pain in rats. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 17, p. 1–11, 2021.
- ARAYA, Erika Ivanna *et al.* Trigeminal neuropathic pain reduces 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats, which are restored by analgesic drugs. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 922, n. February, p. 174905, 2022.
- ATHNAIEL, Onella *et al.* The Role of Sex Hormones in Pain-Related Conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 101–104, 2023.
- BALIKI, Marwan N *et al.* Corticostriatal functional connectivity predicts transition to chronic back pain. **Nat Neurosci**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 1117–1119, 2013.
- BARROSO, Amanda Ribeiro *et al.* Characterization of rat ultrasonic vocalization in the orofacial formalin test: Influence of the social context. **European Neuropsychopharmacology**, [s. l.], p. 1–14, 2019.
- BASSELIN, Mireille *et al.* Chronic carbamazepine administration attenuates dopamine D2-like receptor-initiated signaling via arachidonic acid in rat brain. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1373–1383, 2008.
- BÖRCHERS, Stina *et al.* Commonly-used rodent tests of anxiety-like behavior lack predictive validity for human sex differences. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 141, n. March, 2022.
- BRICK, Nerys. Carbamazepine for acute and chronic pain in adults. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 335–336, 2011.
- BRUDZYNSKI, Stefan M. Biological functions of rat ultrasonic vocalizations, arousal mechanisms, and call initiation. **Brain Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2021.
- BRUDZYNSKI, Stefan M. Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: Biological, sociobiological, and neuroscience approaches. **ILAR Journal**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 43–50, 2009.
- BURGDORF, Jeffrey S. *et al.* Rat ultrasonic vocalizations as a measure of the emotional component of chronic pain. **NeuroReport**, [s. l.], v. 30, n. 13, p. 863–866, 2019.
- BURGDORF, Jeffrey; PANKSEPP, Jaak. Tickling induces reward in adolescent rats. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 167–173, 2001.
- CAIN, Stuart M. *et al.* High resolution micro-SPECT scanning in rats using 125I  $\beta$ -CIT: Effects of chronic treatment with carbamazepine. **Epilepsia**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 1962–1970, 2009.
- CALIPARI, Erin S. *et al.* Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. **Nature Communications**, [s. l.], v. 8, p. 1–15, 2017.

- CHARBIT, Annabelle R. *et al.* Neurons of the dopaminergic/calcitonin gene-related peptide A11 cell group modulate neuronal firing in the trigeminocervical complex: An electrophysiological and immunohistochemical study. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 29, n. 40, p. 12532–12541, 2009.
- CHAVES, Yane Costa *et al.* Two-weeks treatment with cannabidiol improves biophysical and behavioral deficits associated with experimental type-1 diabetes. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 729, n. February, p. 135020, 2020.
- CHEN, Yu-chia *et al.* Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor Regulates Multiple Neuronal Subtypes and Behavior. [s. l.], v. 40, n. 32, p. 6146–6164, 2020.
- CHEN, J. F. *et al.* Neuronal localization and modulation of the D2 dopamine receptor mRNA in brain of normal mice and mice lesioned with 6-hydroxydopamine. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 927–941, 1991.
- CHEN, Qiliang *et al.* The Molecular Basis and Pathophysiology of Trigeminal Neuralgia. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 7, 2022.
- CHICHORRO, Juliana Geremias *et al.* Orofacial cold hyperalgesia due to infraorbital nerve constriction injury in rats: Reversal by endothelin receptor antagonists but not non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Pain**, [s. l.], v. 123, n. 1–2, p. 64–74, 2006.
- CHICHORRO, Juliana Geremias; PORRECA, Frank; SESSLE, Barry. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, [s. l.], p. 1–14, 2017.
- CLAUDINO, Rafaela *et al.* Analgesic Effects of Intranasal Ketamine in Rat Models of Facial Pain. **Journal of Oral & Facial Pain and Headache**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 238–246, 2018.
- CRUCCU, G. *et al.* AAN-EFNS guidelines on trigeminal neuralgia management. **European Journal of Neurology**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 1013–1028, 2008.
- DAUBNER, S Colette; LE, Tiffany; WANG, Shanzhi. Tyrosine Hydroxylase and Regulation of Dopamine Synthesis. [s. l.], v. 508, n. 1, p. 1–12, 2012.
- DE TOLEDO, Isabela Porto *et al.* Prevalence of trigeminal neuralgia: A systematic review. **Journal of the American Dental Association**, [s. l.], v. 147, n. 7, p. 570-576.e2, 2016.
- DEGROOT, Steven R. *et al.* Midbrain dopamine controls anxiety-like behavior by engaging unique interpeduncular nucleus microcircuitry. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.
- DESEURE, K.; HANS, G. H. Differential drug effects on spontaneous and evoked pain behavior in a model of trigeminal neuropathic pain. **Journal of Pain Research**, [s. l.], v. 10, p. 279–286, 2017.
- DESOUZA, Danielle D. *et al.* Sensorimotor and Pain Modulation Brain Abnormalities in Trigeminal Neuralgia: A Paroxysmal, Sensory-Triggered Neuropathic Pain. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 6, 2013.
- DEVOR, Marshall; GOVRIN-LIPPMANN, Ruth; RAPPAPORT, Z. Harry. Mechanism of trigeminal neuralgia: An ultrastructural analysis of trigeminal root specimens obtained during microvascular decompression surgery. **Journal of Neurosurgery**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 532–543, 2002.
- DOMONKOS, Emese *et al.* Sex differences and sex hormones in anxiety-like behavior of aging rats. **Hormones and Behavior**, [s. l.], v. 93, p. 159–165, 2017.
- FARMER, Melissa; BALIKI, Marwan; APKARIAN, A. Vania. A Dynamic Network Perspective of Chronic Pain. **Neurosci Lett**, [s. l.], v. 520, n. 2, p. 197–203, 2013.
- FIELDS, Howard. State-dependent opioid control of pain. **Nature Reviews**, [s. l.], v. 5, n. July, 2004.
- FLORESCO, Stan B. *et al.* Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic

and phasic dopamine transmission. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 968–973, 2003.

FORTUNA, Ana *et al.* Pharmacokinetics, brain distribution and plasma protein binding of carbamazepine and nine derivatives: New set of data for predictive in silico ADME models. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 107, n. 1–2, p. 37–50, 2013

FRYE, Cheryl A.; WALF, Alicia A. Estrogen and/or Progesterone Administered Systemically or to the Amygdala Can Have Anxiety-, Fear-, and Pain-Reducing Effects in Ovariectomized Rats. **Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 118, n. 2, p. 306–313, 2004.

GAMBETA, Eder *et al.* Anxiety- but not depressive-like behaviors are related to facial hyperalgesia in a model of trigeminal neuropathic pain in rats. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 191, n. November 2017, p. 131–137, 2018.

GAMBETA, Eder *et al.* Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety like-behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 619, p. 100–105, 2016.

GAMBETA, Eder; CHICHORRO, Juliana G.; W. ZAMPONI, Gerald. Trigeminal neuralgia: An overview from pathophysiology to pharmacological treatments. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 16, 2020.

GEE, Taylor A. *et al.* A pain-induced tonic hypodopaminergic state augments phasic dopamine release in the nucleus accumbens. **Pain**, [s. l.], v. 161, n. 3, p. 139–148, 2020.

GOMES, Lenyta Oliveira *et al.* Facial hyperalgesia due to direct action of endothelin-1 in the trigeminal ganglion of mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 70, n. 7, p. 893–900, 2018.

HOGG, Sandy. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 21–30, 1996.

IKEDA, Yumiko *et al.* Bupropion increases activation in nucleus accumbens during anticipation of monetary reward. [s. l.], p. 3655–3665, 2019.

ISLAM, Jaisan *et al.* Stimulating gabaergic neurons in the nucleus accumbens core alters the trigeminal neuropathic pain responses in a rat model of infraorbital nerve injury. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 16, 2021.

JEON, Hye J. *et al.* A novel trigeminal neuropathic pain model: Compression of the trigeminal nerve root produces prolonged nociception in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 149–158, 2012.

JESUS, Carlos Henrique Alves *et al.* Cannabidiol enhances the antinociceptive effects of morphine and attenuates opioid-induced tolerance in the chronic constriction injury model. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 435, n. June, 2022.

JOHANSEN, Joshua P; FIELDS, Howard L; MANNING, Barton H. The affective component of pain in rodents : Direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. [s. l.], v. 98, n. 14, p. 8077–8082, 2001.

KANNAN, Viji Diane; VEAZIE, Peter J. Who Avoids Going to the Doctor and Why? Audience Segmentation Analysis for Application of Message Development. **Health Communication**, [s. l.], v. 30, n. 7, p. 635–645, 2015.

KAUSSNER, Yvonne *et al.* Effects of oxcarbazepine and carbamazepine on driving ability: A double-blind, randomized crossover trial with healthy volunteers. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 210, n. 1, p. 53–63, 2010.

KING, Tamara *et al.* Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1364–1366, 2009.

KOIZUMI, Momoko *et al.* P2X3 receptor upregulation in trigeminal ganglion neurons through TNF $\alpha$

production in macrophages contributes to trigeminal neuropathic pain in rats. **Journal of Headache and Pain**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–12, 2021.

KOPRUSZINSKI, Caroline Machado *et al.* Blockade of endothelin receptors reduces tumor-induced ongoing pain and evoked hypersensitivity in a rat model of facial carcinoma induced pain. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 818, p. 132–140, 2018.

KOPRUSZINSKI, Caroline M.; REIS, Renata C.; CHICHORRO, Juliana G. B vitamins relieve neuropathic pain behaviors induced by infraorbital nerve constriction in rats. **Life Sciences**, [s. l.], v. 91, n. 23–24, p. 1187–1195, 2012.

LENELL, Charles; JOHNSON, Aaron M. The Effects of the Estrous Cycle, Menopause, and Recording Condition on Female Rat Ultrasonic Vocalizations. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

LENERT, Melissa E. *et al.* Sensory neurons, neuroimmunity, and pain modulation by sex hormones. **Endocrinology (United States)**, [s. l.], v. 162, n. 8, p. 1–17, 2021.

LI, Chang-qi *et al.* Surgical Incision Induces Anxiety-Like Behavior and Amygdala Sensitization : Effects of Morphine and Gabapentin. [s. l.], v. 2010, 2010.

LIU, Sufang *et al.* Dopamine receptor D2, but not D1, mediates descending dopaminergic pathway-produced analgesic effect in a trigeminal neuropathic pain mouse model. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 1, p. 139–148, 2016.

MAARBJERG, Stine; BENOLIEL, Rafael. The changing face of trigeminal neuralgia—A narrative review. **Headache**, [s. l.], v. 61, n. 6, p. 817–837, 2021.

MAČIANSKYTE, Diana *et al.* Associations between chronic pain and depressive symptoms in patients with trigeminal neuralgia. **Medicina**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 386–392, 2011.

MARINO, SE *et al.* Steady-state Carbamazepine Pharmacokinetics following Oral and Stable-Labeled Intravenous Administration in Epilepsy Patients: Effect of Race and Sex. **Clin Pharmacol Ther**, [s. l.], v. 3, n. 91, p. 483–488, 2012.

MCKENDRICK, Greer; GRAZIANE, Nicholas M. Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. September, p. 1–15, 2020.

MELEK, L. N.; DEVINE, M.; RENTON, T. The psychosocial impact of orofacial pain in trigeminal neuralgia patients: a systematic review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 869–878, 2018.

MIRZA, N. R. *et al.* Lamotrigine has an anxiolytic-like profile in the rat conditioned emotional response test of anxiety: A potential role for sodium channels?. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 180, n. 1, p. 159–168, 2005.

MISHRA, Akanksha; SINGH, Sonu; SHUKLA, Shubha. Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. **Journal of Experimental Neuroscience**, [s. l.], v. 12, 2018.

MOGIL, Jeffrey S. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 353–365, 2020.

MOGIL, Jeffrey S. Sex differences in pain and pain inhibition: Multiple explanations of a controversial phenomenon. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 859–866, 2012.

MOGIL, Jeffrey S.; BAILEY, Andrea L. **Sex and gender differences in pain and analgesia**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2010-. ISSN 00796123.v. 186.

MOREIRA, Camila G. *et al.* Behavioral, neurochemical and histological alterations promoted by bilateral intranigral rotenone administration: A new approach for an old neurotoxin. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 291–301, 2012.

MULA, Marco; PINI, Stefano; CASSANO, Giovanni B. The role of anticonvulsant drugs in anxiety disorders: A critical review of the evidence. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 263–272, 2007.

NAGAKURA, Yukinori; NAGAOKA, Shogo; KUROSE, Takahiro. Potential molecular targets for treating neuropathic orofacial pain based on current findings in animal models. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 12, 2021.

NARITA, Minoru *et al.* Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 739–750, 2006.

NONES, C F M *et al.* Descending facilitatory pain pathways mediate ongoing pain and tactile hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 644, p. 18–23, 2017.

NURMIKKO, T J; ELDRIDGE, P R. Trigeminal neuralgia-pathophysiology , diagnosis and current treatment. **British Journal of Anaesthesia**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 117–132, 2001.

ORUMIYEHEI, Amin *et al.* High-Intensity Interval Training-Induced Hippocampal Molecular Changes Associated with Improvement in Anxiety-like Behavior but Not Cognitive Function in Rats with Type 2 Diabetes. **Brain Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 10, 2022.

PEREIRA, Marcela *et al.* Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: A marker of affect in mania?. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 231, n. 13, p. 2567–2577, 2014.

PINEDA-FARIAS, Jorge Baruch *et al.* Mechanisms underlying the selective therapeutic efficacy of carbamazepine for attenuation of trigeminal nerve injury pain. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 41, n. 43, p. 8991–9007, 2021.

PLOGHAUS, Alexander *et al.* Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 21, n. 24, p. 9896–9903, 2001.

PORRECA, Frank; NAVRATILOVA, Edita. Reward, motivation, and emotion of pain and its relief. **Pain**, [s. l.], v. 158, n. 4, p. S43–S49, 2017.

POST, Robert M. *et al.* Dopaminergic Effects of Carbamazepine: Relationship to Clinical Response in Affective Illness. **Archives of General Psychiatry**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 392–396, 1986.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

RAMAN, Swarnalakshmi *et al.* Analgesic Effect of Tranilast in an Animal Model of Neuropathic Pain and Its Role in the Regulation of Tetrahydrobiopterin Synthesis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 11, 2022.

SAMII, M.; JANNETTA, Peter J. **The Cranial Nerves**. [S. l.: s. n.], 1981.

SCHWEINFURTH, Manon K. The social life of Norway rats ( *Rattus norvegicus* ). **eLife**, [s. l.], v. 9, p. 1–26, 2020.

SEMINOWICZ, David A. *et al.* MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. **NeuroImage**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 1007–1014, 2009.

SERAFINI, Randal; KERRI, Pryce; ZACHARIOU, Venetia. The Mesolimbic Dopamine System in

Chronic Pain and Associated Affective Comorbidities. [s. l.], v. 87, n. 1, p. 64–73, 2021.

SESSLE, Barry J. **PERIPHERAL AND CENTRAL MECHANISMS OF OROFACIAL INFLAMMATORY PAIN**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2011-. ISSN 0074-7742.v. 97

SHANKLAND, Wesley E. The Trigeminal Nerve. Part II: The Ophthalmic Division. **Cranio - Journal of Craniomandibular and Sleep Practice**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 8–12, 2001.

SHANKLAND, Wesley E. The Trigeminal Nerve. Part III: The Maxillary Division. **Cranio - Journal of Craniomandibular and Sleep Practice**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 78–83, 2001.

SHANKLAND, Wesley E. The Trigeminal Nerve. Part IV: The Mandibular Division. **Cranio - Journal of Craniomandibular and Sleep Practice**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 153–161, 2001.

SIMOLA, Nicola; GRANON, Sylvie. Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 159, n. September 2018, p. 107420, 2019.

SORGE, Robert. *et al.* Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 1, p. 139–148, 2015.

TERRIER, Louis Marie; HADJIKHANI, Nouchine; DESTRIEUX, Christophe. The trigeminal pathways. **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 269, n. 7, p. 3443–3460, 2022.

TURNES, Joelle de Melo *et al.* Blockade of kappa opioid receptors reduces mechanical hyperalgesia and anxiety-like behavior in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 417, n. September 2021, p. 113595, 2022.

VERGARA, Fernanda *et al.* Contribution of mesolimbic dopamine and kappa opioid systems to the transition from acute to chronic pain. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 178, n. August, p. 108226, 2020.

VIERCK, C. J.; HANSSON, Per T.; YEZIERSKI, R. p. Clinical and pre-clinical pain assessment : Are we measuring the same thing ?. **Pain**, [s. l.], v. 135, p. 7–10, 2008.

VOS, Bart P.; STRASSMAN, Andrew M.; MACIEWICZ, Raymond J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. 5 I, p. 2708–2723, 1994.

WALF, Alicia A; FRYE, Cheryl A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 322–328, 2007.

WEI, Wenbin *et al.* Characterization of Acetylation of Histone H3 at Lysine 9 in the Trigeminal Ganglion of a Rat Trigeminal Neuralgia Model. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2022, 2022.

WÖHR, Markus *et al.* Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. **Physiology and Behavior**, [s. l.], v. 93, n. 4–5, p. 766–776, 2008.

WOLBOLD, Renzo *et al.* Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. **Hepatology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 978–988, 2003.

WOOD, Patrick B. *et al.* Reduced Presynaptic Dopamine Activity in Fibromyalgia Syndrome Demonstrated With Positron Emission Tomography: A Pilot Study. **Journal of Pain**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 51–58, 2007.

YOU, Hao Jun; LEI, Jing; PERTOVAARA, Antti. Thalamus: The 'promoter' of endogenous modulation of pain and potential therapeutic target in pathological pain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 139, n. April, p. 104745, 2022.

ZAKRZEWSKA, Joanna M *et al.* Evaluating the impact of trigeminal neuralgia. [s. l.], v. 1, p. 1166–1174, 2017.

ZHANG, Mingjie *et al.* Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. **Journal of Headache and Pain**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2017.

ZHUO, Min. Neural Mechanisms Underlying Anxiety-Chronic Pain Interactions. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 136–145, 2016.

ZIMCIKOVA, Eva *et al.* Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test?. **Seizure**, [s. l.], v. 52, p. 35–40, 2017.