



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LILIAN CALILI CAMARGO

**O PAPEL DO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) DA  
VIA MESOLÍMBICA NA HIPERALGESIA PERSISTENTE**

**CAMPINAS**

**(2016)**

**LILIAN CALILI CAMARGO**

**O PAPEL DO FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) DA  
VIA MESOLÍMBICA NA HIPERALGESIA PERSISTENTE**

*Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do Título de  
Doutora em Biologia funcional e  
molecular, na área de Fisiologia.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA  
ALUNA LILIAN CALILI CAMARGO E ORIENTADA  
PELA PROFESSORA DOUTORA CLÁUDIA  
HERRERA TAMBELI E CO-ORIENTADA PELO  
PROFESSOR DOUTOR CESAR RENATO  
SARTORI.

*Orientador: PROFA. DRA. CLÁUDIA HERRERA TAMBELI*

*Co-Orientador: PROF. DR. CESAR RENATO SARTORI*

**CAMPINAS**

**(2016)**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/11371-7

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C14p Camargo, Lilian Calili, 1975-  
O papel do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) da via mesolímbica na hiperalgesia persistente / Lilian Calili Camargo. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Cláudia Herrera Tambeli.  
Coorientador: Cesar Renato Sartori.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fator neurotrófico derivado do cérebro. 2. Núcleo accumbens. 3. Prostaglandinas. 4. Hiperalgesia. I. Tambeli, Cláudia Herrera. II. Sartori, César Renato, 1973-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** The role of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the mesolimbic pathway persistente hyperalgesia

**Palavras-chave em inglês:**

Brain-derived neurotrophic factor

Nucleus accumbens

Prostaglandins

Hyperalgesia

**Área de concentração:** Fisiologia

**Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Cláudia Herrera Tambeli [Orientador]

André Schwambach Vieira

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Luana Fischer

**Data de defesa:** 29-08-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 29 de Agosto de 2016.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli

Prof. Dr. André Schwambach Vieira

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues De Oliveira

Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Profa. Dra. Luana Fischer

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico esta tese de doutorado ao meu filho Davi Camargo de Almeida, agora com apenas um ano e seis meses de vida. Filho amado, gestado em meios a realização dos protocolos experimentais deste trabalho acadêmico e, por vezes, amamentado nos intervalos da redação dos relatórios técnicos. E assim, entre tantos artigos científicos e livros, você foi crescendo, engatinhando, andando, falando e me inspirando. Talvez, um dia, você leia este texto, e gostaria que soubesse que fez parte desta obra.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, meu mestre.*

*Aos meus pais, Dolores Calili e Raul Augusto de Camargo (em memória), pelo amor incondicional e pelos exemplos de determinação, trabalho, superação e fé.*

*A meu filho Davi, por resgatar o meu lado Humano todos os dias e ser minha fonte de motivação.*

*Aos meus irmãos, Carla Calili, Nestor Camargo e Cesar Camargo, pelo apoio e carinho.*

*A Jesse Roberto de Almeida, pelo companheirismo, cumplicidade, e pelo cuidado dedicado ao nosso filho nos momentos em que eu não pude estar presente.*

*A Paulo Renato Pereira pelo incentivo, apoio e por ter cuidado de mim como um pai.*

*À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Herrera Tambeli, pela confiança, apoio e oportunidade de conhecer sua linha de pesquisa.*

*Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Cesar Renato Sartori, pela disponibilidade e pelas orientações.*

*Ao Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Estudos de Dor (LED).*

*Aos professores do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, do Instituto de Biologia da UNICAMP, por compartilhar seus conhecimentos, contribuindo para a minha formação profissional.*

*Aos professores membros da minha Banca de Qualificação do Doutorado, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Evanise Teresa Palomari, Prof. Dr. Fabio Rogério e Prof. Dr. André Schwambach Vieira e por enriquecer este trabalho com suas sugestões.*

*Aos professores membros da Banca de Defesa do Doutorado, Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, Prof. Dr. André Schwambach Vieira, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Celina Monteiro da Cruz Lotufo, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luana Fischer, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro, Prof. Dr. Fabio Rogério e Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, pela disponibilidade e comprometimento.*

*A todos os colegas de laboratório, Dionéia Araldi, Juliana Maia, Maria Carolina Athiê, Amanda Neves, Gilson Gonsalves, Marco Oreste Pagliusi, Ivan Bonet, Luiz Manzo, Lilian Wunch, Jalile Garcia, Fernanda Zanelatto, Silviane Magalhães, Luara Piardi, Willians Vieira, Felipe Hertzling, Felipe de Faria e Arthur Brandão, que conviveram comigo nestes últimos anos, compartilhando dúvidas e aprendizados, e me ajudando a superar as dificuldades do dia-a-dia.*

*Aos técnicos de LED, Catarine Nishijima e Cesar Bissoto, pelo auxílio na realização dos protocolos experimentais e pelos cuidados com os animais utilizados nesta pesquisa.*

*À Dra. Elayne Vieira Dias, que me ensinou a fazer pesquisa e a pensar pesquisa, sem a ajuda da qual este trabalho não teria se concretizado. Muito obrigada minha amiga pelas inúmeras vezes em que você me pegou pela mão e me conduziu. Obrigada por tudo.*

*Enfim, aos meus amigos e familiares por compreenderem a minha ausência em momentos importantes.*

## **AGRADECIMENTO INSTITUCIONAL**

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela concessão da bolsa de doutorado (processo 2012/11371-7) e pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do meu trabalho (processo 2013/04779-2).

## RESUMO

CAMARGO, L. C. **O papel do FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) da via mesolímbica na hiperalgesia persistente**, 2016.

Estudos epidemiológicos revelam uma frequente co-morbidade entre dor crônica e depressão. O tratamento de ambas as condições ainda é um grande desafio para a ciência, e denota a necessidade de maior compreensão dos mecanismos de neuroplasticidade central, subjacentes ao desenvolvimento de tais estados. Tem sido demonstrado que o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), promotor de plasticidade neuronal, participa da modulação da dor e da etiologia da depressão. No entanto, não se sabe se esta neurotrophina, no Núcleo Accumbens (NAc), através do receptor de proteína Tirosina Quinase B (TrkB), está envolvida no processo de cronificação da dor, e se esta cronificação estaria associada à depressão. Uma vez que, a Área Tegmental Ventral (VTA) é a principal fonte de BDNF do NAc, e que o Ativador de Plasminogênio tecidual (tPA) é uma protease envolvida na síntese da isoforma madura de BDNF, a partir da isoforma precursora, foi investigado o papel do BDNF do NAc no desenvolvimento da hiperalgesia persistente e se essa hipersensibilização afeta a expressão gênica de BDNF e de tPA na VTA e os níveis das isoformas precursora, truncada e madura do BDNF no NAc. Foi verificado também se o tratamento com PGE<sub>2</sub> induz comportamento do tipo depressivo nos animais sensibilizados. Para responder a estas perguntas, foi utilizado um modelo animal de desenvolvimento de hiperalgesia persistente em que a administração diária de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) na pata do rato, ao longo de 14 dias, induz um estado de sensibilização do nociceptor que dura mais de um mês. Nossos dados demonstraram que a infusão intra-NAc do antagonista selectivo de TrkB (K252a), durante os primeiros sete dias de tratamento com PGE<sub>2</sub>, impediu o desenvolvimento de hiperalgesia persistente. Além disso, a hiperalgesia persistente, não induziu comportamento depressivo nos animais, mas, durante as suas fases de indução (14 dias de administração de PGE<sub>2</sub>) e de manutenção (14 dias após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub>), aumentou significativamente a expressão gênica do BDNF e de tPA na VTA, mas não os níveis das isoformas do BDNF no NAc. Estes resultados sugerem que o BDNF no NAc desempenha um papel crucial no desenvolvimento da hiperalgesia persistente, e assim sendo, da cronificação da dor.

Palavras-chave: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), Núcleo Accumbens (NAc), Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), hiperalgesia persistente.

## **ABSTRACT**

**CAMARGO, L. C. The role of Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in the mesolimbic pathway persistent hyperalgesia, 2016.**

Epidemiological studies reveal a frequent comorbidity between chronic pain and depression. The treatment of both conditions is still a great challenge for science, and denotes the need for greater understanding of central neuroplasticity mechanisms underlying the development of such states. It has been shown that Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), promoting neuronal plasticity, participates in the modulation of pain and the etiology of depression. However, it is not known if this neurotrophin in the Nucleus Accumbens (NAc) acting through protein Tyrosine receptor Kinase B (TrkB) is involved in the process of pain chronification, and if this chronicity would be associated with depression. Since the Ventral Tegmental Area (VTA) is the primary source of BDNF in the NAc, and that tissue Plasminogen Activator (tPA) is a protease involved in the synthesis of the mature isoform of BDNF from the precursor isoform, was investigated whether the role of NAc BDNF in the development of persistent hyperalgesia and if this sensitization affects the gene expression of BDNF and tPA in the VTA and the levels of precursor isoforms, truncated and mature BDNF in the NAc. It was also tested whether the treatment with PGE<sub>2</sub> develops depressive-like behavior in animals. To answer these questions, we used an animal model of persistent hyperalgesia in which daily administration of Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in the rat paw during 14 days induces a nociceptor sensitization state that lasts more than one month. Our data demonstrated that NAc infusion of the selective TrkB antagonist (K252a), during the first seven days of treatment with PGE<sub>2</sub>, has prevented the development of persistent hyperalgesia. Furthermore, persistent hyperalgesia did not induce depressive behavior in animals, but during the induction (14 days PGE<sub>2</sub> administration) and maintenance (14 days after the end of treatment with PGE<sub>2</sub>) phases, significantly increased gene expression of BDNF and tPA VTA, but not the levels of the isoforms of BDNF in the NAc. These results suggest that BDNF in NAc plays a crucial role in the development of persistent hyperalgesia, and therefore, the chronification of pain.

**Key words:** Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Nucleus Accumbens (NAc), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), persistent hyperalgesia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do delineamento experimental da 1ª etapa do trabalho .....	38
Figura 2. Esquema do delineamento experimental da 2ª etapa do trabalho .....	38
Figura 3. Esquema do delineamento experimental da 3ª etapa do trabalho .....	39
Figura 4. Esquema do delineamento experimental da 4ª etapa do trabalho .....	40
Figura 5. Teste de Randall-Selitto.....	41
Figura 6. Cirurgia estereotáxica .....	44
Figura 7. Sistema de microinfusão para administração de droga intra-NAc .....	45
Figura 8. Referência para dissecação da VTA e NAc .....	48
Figura 9. Limiar nociceptivo mecânico na indução e na manutenção da hiperalgesia persistente .....	53
Figura 10. Preferência por sacarose na hiperalgesia persistente .....	55
Figura 11. Tempo total de imobilidade na hiperalgesia persistente .....	56
Figura 12. Limiar nociceptivo mecânico na hiperalgesia persistente associada com o estresse crônico leve .....	58
Figura 13. Tempo total de imobilidade na hiperalgesia persistente associada com o protocolo de estresse crônico leve .....	59
Figura 14. Limiar nociceptivo mecânico após bloqueio do receptor TrkB .....	60
Figura 15. Limiar nociceptivo mecânico após ativação do receptor TrkB .....	62
Figura 16. Expressão gênica do BDNF e da tPA na VTA durante a hiperalgesia persistente .....	63
Figura 17. Expressão gênica da p11 e do TrkB no NAc durante a hiperalgesia persistente .....	65
Figura 18. Expressão da proteína do BDNF no NAc .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*BDNF* - Fator Neutrónico Derivado do Cérebro

*cDNA* - Ácido Desoxirribonucléico complementar

CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DHF - Dihidroflavona

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO - Densidade óptica

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EPM - Erro padrão da média

*FST* - Teste de nado forçado

HPA – Eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal

*IASP* - Associação Internacional para Estudos da Dor

LTP - Potencialização de longa duração

*mad-BDNF* - Isoforma madura do Fator Neutrónico Derivado do Cérebro

*mRNA* - Ácido Ribonucléico mensageiro

NAc - Núcleo Accumbens

*NCBI* - Centro Nacional de Biotecnologia da Informação

*PBS* - Tampão fosfato salino

*PGE<sub>2</sub>* - Prostaglandina E<sub>2</sub>

*pró-BDNF* - Isoforma precursora do Fator Neutrónico Derivado do Cérebro

*RNA* - Ácido Ribonucléico

*RT-PCR* - Reação de cadeia polimerase em tempo real

*RVM* - Região ventro-medial rostral do bulbo

*SCL* - Estresse crônico leve

*SDS* - Dodecil sulfato de sódio

*tPA* - Ativador de Plasminogênio do tecido

Tris-HCl - Tris (hidroximetil) aminometano

TrkB - Receptor de proteína Tirosina-Quinase B

*VTA* - Área Tegmental Ventral

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	
<b>Abstract</b> .....	
<b>Lista de ilustrações</b> .....	
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	
<b>1. Introdução</b> .....	<b>16</b>
1.1 Dor e vias nociceptivas .....	18
1.1.1 Indução e processamento da dor .....	20
1.1.2 Modulação da dor .....	22
1.1.3 Hiperalgisia persistente inflamatória .....	23
1.2 Estresse e depressão .....	25
1.3 Via dopaminérgica mesolímbica .....	27
1.4 Fator Neutrófico Derivado do Cérebro (BDNF) .....	29
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>33</b>
2.1 Objetivo geral .....	34
2.2 Objetivos específicos .....	34
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>35</b>
3.1 Animais .....	36
3.2 Grupos e protocolos experimentais .....	36
3.3 Modelo de indução da hiperalgisia persistente .....	40
3.4 Avaliação do limiar nociceptivo mecânico .....	40
3.5 Avaliação do comportamento do tipo depressivo .....	42
3.5.1 Teste de preferência por sacarose .....	42
3.5.2 Teste de nado forçado .....	43
3.6 Cirurgia estereotáxica para implantação das cânulas no NAc .....	43
3.7 Sistema de microinfusão para administração intracerebral da droga .....	45
3.8 Protocolo de estresse crônico leve .....	46
3.9 Preparação do material biológico para os testes moleculares .....	47
3.10 Testes moleculares .....	49
3.10.1 Western Blot .....	49
3.10.2 PCR em tempo real .....	50
3.11 Análise estatística dos dados .....	51
<b>4. Resultados</b> .....	<b>52</b>

4.1 Limiar nociceptivo mecânico na indução e na manutenção da hiperalgesia .....	53
4.2 Hiperalgesia persistente e comportamento depressivo .....	54
4.2.1 Hiperalgesia e comportamento depressivo pelo teste de preferência por sacarose .....	54
4.2.2 Hiperalgesia e comportamento depressivo pelo teste de nado forçado .....	55
4.3 Associação da hiperalgesia persistente com o estresse crônico leve .....	56
4.4 Limiar nociceptivo mecânico após bloqueio do receptor TrkB .....	59
4.5 Limiar nociceptivo mecânico após ativação do receptor TrkB .....	61
4.6 Expressão gênica do BDNF e da tPA na VTA durante a hiperalgesia persistente .....	62
4.7 Expressão gênica da p11 e do TrkB no NAc durante a hiperalgesia persistente .....	64
4.8 Níveis da proteína do BDNF no NAc pelo Western blot .....	66
<b>5. Discussão .....</b>	<b>68</b>
5.1 A hiperalgesia persistente não induziu comportamento depressivo .....	69
5.2 Facilitação da hiperalgesia persistente pela sinalização BDNF-TrkB no NAc.....	70
5.3 O aumento da expressão gênica de BDNF e tPA na VTA .....	72
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>74</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>76</b>
<b>8. Anexos .....</b>	<b>85</b>
8.1 Anexo 1: Certificado do CEUA .....	86
8.2 Anexo 2: Certificado do CEUA.....	87
8.3 Anexo 3: Declaração.....	88

## ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. Introdução

A dor é considerada uma percepção da sensação nociceptiva, associada ou não a um dano tecidual. A dor envolve um componente sensorial-discriminativo que permite localizar, qualificar e quantificar o estímulo doloroso, e um componente emocional-motivacional, que envolve mecanismos de recompensa, aprendizagem e memória (Calvino and Grilo, 2006). Apesar da dor fisiológica ter um caráter protetor, importante para a preservação do organismo, quando crônica, a dor pode se tornar patológica e prejudicial.

Estudos epidemiológicos indicam uma frequente co-morbidade entre dor crônica e transtorno depressivo, patologias nas quais muitas manifestações clínicas são compartilhadas, e onde diversas estruturas neuroanatômicas, circuitos neurais e sistemas de neurotransmissores, relacionados a ambas as condições, encontram-se similarmente alterados (Robinson et al., 2009; Goldenberg, 2010). No entanto, busca-se ainda compreender quais seriam os mecanismos fisiopatológicos que explicam a associação entre as dores crônicas e as reações emocionais de estresse, ansiedade e depressão.

Como a dor crônica pode abranger alterações fisiopatológicas duradouras e incapacitantes, é de fundamental importância compreender e interromper a cascata de eventos relacionados com o seu processo de cronificação. É sabido que a cronificação da dor envolve alguns fatores biológicos como sensibilização central, neuroplasticidade das vias nociceptivas e alterações na modulação da dor (Basbaum and Jessel, 2000). No entanto, muitos mecanismos envolvidos na transição de um estado de dor aguda para crônica, ainda precisam ser esclarecidos.

Tomando como princípio que, tanto a cronificação da dor, quanto os transtornos depressivos, compreendem alterações plásticas permanentes nas vias neurais submetidas à sensibilização prolongada, torna-se relevante investigar a participação de fatores neurotróficos prevalentes no sistema nervoso e envolvidos na sua plasticidade, como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).

O BDNF é uma proteína da família das neurotrofinas que contribui para a plasticidade das sinapses cerebrais, especialmente aquelas envolvidas nos processos de aprendizagem e memória (Radecki et al., 2005). Recentemente, também tem sido atribuído ao BDNF um importante papel no mecanismo de modulação da dor crônica (Guo et al., 2006; Merighi et al., 2008; Vaneldereren et al.,

2010) e na etiologia da depressão (Eisch et al., 2003; Krishnan and Nestler, 2008; Castrén and Rantamäki, 2010a, 2010b).

Embora a ação da neurotrofina na dor aguda ainda seja controversa, por apresentar tanto efeitos pró quanto anti-nociceptivos, em modelos de dor crônica inflamatória o BDNF tem se demonstrado, predominantemente, pro-nociceptivo, favorecendo a gênese das respostas hiperalgésicas (Merighi et al., 2008; Vanelderen et al., 2010).

Com relação à participação do BDNF na etiologia da depressão, a observação de alterações plásticas na formação hipocampal de animais, associadas a manifestação de comportamento depressivo, induzido pelo estresse crônico, atentou para o papel relevante do BDNF na etiologia da depressão (Duman and Monteggia, 2006; Schmidt and Duman, 2007; Krishnan and Nestler, 2008, 2010; Racagni and Popoli, 2008; Castrén and Rantamäki, 2010a). Estudos recentes têm demonstrado que o BDNF tem efeito pró-depressivo quando age em estruturas do Sistema Dopaminérgico Mesolímbico, como o Núcleo Accumbens e a Área Tegmentar Ventral (Eisch et al., 2003; Nestler and Carlezon, 2006; Krishnan and Nestler, 2008; Castrén and Rantamäki, 2010a, 2010b).

## **1.1 Dor e vias nociceptivas**

A dor é definida como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada à real ou potencial lesão tecidual (*IASP*, 1994). É uma experiência que inclui as dimensões sensorial-discriminativa, afetivo-motivacional e cognitiva-avaliativa (Treede et al., 1999). Enquanto o componente sensorial-discriminativo permite localizar e discriminar a intensidade e a qualidade do estímulo doloroso, as dimensões afetiva e cognitiva estão relacionadas com a valência emocional atribuída ao estímulo nociceptivo, e com a associação da dor com o contexto geral em que ela acontece, envolvendo fatores como aprendizagem, memória e mecanismos de recompensa (Calvino and Grilo, 2006). A dor, portanto, é uma experiência subjetiva e complexa, que acontece a partir da ativação da via sensorial nociceptiva, e cuja percepção final é determinada por uma série de fatores integrados pelo Sistema Nervoso Central (SNC).

Os estímulos dolorosos são detectados por estruturas denominadas nociceptores. Os nociceptores são neurônios receptores sensoriais com

terminações nervosas livres (não encapsuladas) encontrados em toda a superfície corporal e em estruturas profundas como fáscias, músculos e tendões, ligamentos e cápsulas articulares, periósteo, tecido conectivo de órgãos viscerais e vasos sanguíneos (Julius and Basbaum, 2001; Almeida et al., 2004; Calvino and Grilo, 2006; Willis, 2007). Estes receptores respondem a estímulos que causam ou ameaçam causar danos ao organismo (Willis, 2007).

Os neurônios receptores sensoriais encontram-se segregados em dois tipos de fibras nervosas: fibras A $\delta$  (A delta) e fibras C. As fibras A $\delta$  são finamente mielinizadas, apresentam médio diâmetro (2,0 a 6,0 $\mu$ m) e velocidade de condução entre 12 e 30 m/s. Elas podem ser ativadas pelo calor, mas respondem primordialmente à estimulação mecânica, e são responsáveis pela condução da dor rápida, aguda e lancinante após a estimulação nociva. As fibras C, não mielinizadas, apresentam diâmetro pequeno (0,4 a 1,2 $\mu$ m) e velocidade de condução entre 0,5 a 2 m/s. Estas fibras são responsáveis pela dor lenta e difusa, e são classificadas como nociceptores polimodais por responderem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (Millan, 1999; Julius and Basbaum, 2001).

Os corpos celulares dos neurônios sensoriais periféricos, também denominados neurônios aferentes primários ou neurônios de primeira ordem, estão localizados nos gânglios das raízes dorsais dos nervos espinhais. A partir dos gânglios, saem os prolongamentos neuronais centrais para a medula espinal. Estes prolongamentos penetram pela substância branca medular posterior (fascículo póstero-lateral) e emitem ramos ascendentes e descendentes para 2 a 3 segmentos medulares subjacentes, constituindo o trato de Lissauer (Calvino and Grilo, 2006). Estas fibras penetram perpendicularmente na substância cinzenta medular, pela coluna posterior ipsilateral, e terminam, principalmente, nas lâminas de Rexed I (zona marginal) e II (substância gelatinosa) onde estão localizados os corpos celulares dos neurônios de segunda ordem, podendo, entretanto, se estender até camadas mais profundas (lâminas V, VI, VII e X) (Almeida et al., 2004; Calvino and Grilo, 2006). Os axônios dos neurônios de segunda ordem cruzam a linha média da medula espinal e ascendem pela substância branca contralateral (coluna anterolateral). Embora a maior parte destes neurônios projete para estruturas supraespinhais pelo lado oposto, uma pequena parte não cruza a linha média e ascende ipsilateralmente (Millan, 1999; Basbaum and Jessel, 2000; Calvino and Grilo, 2006).

A partir dos neurônios de segunda ordem, as informações nociceptivas são transmitidas para os centros superiores no encéfalo através dos tratos neuronais específicos. Existem vias ascendentes que projetam diretamente para estruturas supraespinais (vias monossinápticas) e constituem os tratos espinotalâmico, espinomesencefálico, espinoparabraquial, espinohipotálâmico, espinoreticular e cervicotalâmico, e vias indiretas (polissinápticas), como as vias espinocervicotalâmica e espinoreticulotalâmica, que apresentam sinapses ao longo de seu trajeto até os centros superiores (Millan, 1999; Basbaum and Jessel, 2000).

No tálamo, as informações nociceptivas são processadas, principalmente, nos grupos nuclear lateral (ou região posterior) e nuclear medial. A região posterior compreende o núcleo ventroposterior medial, o núcleo ventroposterior lateral e o núcleo posterior do tálamo. Estes núcleos recebem projeções monossinápticas do trato espinotalâmico ventral (neoespinotalâmico) e projetam para o córtex somatossensorial, participando do aspecto sensorial-discriminativo da dor. Os núcleos mediais do tálamo consistem no complexo intralaminar que recebe projeções polissinápticas do trato espinotalâmico dorsal (paleoespinotalâmico) e projeta para os gânglios da base e para regiões límbicas corticais, relacionados com o aspecto afetivo-motivacional da dor ( Basbaum and Jessel, 2000; Almeida et al., 2004; Calvino and Grilo, 2006). Existem também projeções espinotalâmicas monossinápticas para o núcleo medial central do tálamo (parte do complexo intralaminar) que projeta para estruturas límbicas e sensório-motoras.

### **1.1.1 Indução e processamento da dor**

Conforme mencionado previamente, a sensação dolorosa (nocicepção) pode ser induzida por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, internos ou externos ao organismo, e intensos o suficiente para ativar as fibras nervosas nociceptivas. O processo fisiológico se inicia nos nociceptores e envolve a indução de uma resposta elétrica nas fibras sensoriais que detecta o estímulo nocivo, ou potencialmente nocivo, com entrada de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) por canais específicos e subsequente disparo do potencial de ação (Gold and Gebhart, 2010). Assim, os neurônios aferentes primários são ativados e liberam aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos ou substâncias como prostaglandinas, óxido nítrico e adenosina trifosfato (ATP) no corno dorsal da medula espinal (Millan, 1999). Estes

neurotransmissores e neuromoduladores, liberados pelos terminais pré-sinápticos dos neurônios de primeira ordem, atuam nos receptores pós-sinápticos localizados nos neurônios de segunda ordem, disparando as vias de sinalização intracelulares que levam, por fim, à excitação neuronal. A partir da estimulação dos neurônios sensoriais secundários, a informação nociceptiva ascende para as áreas supraespinais através de vias neuronais específicas, ativando diferentes regiões encefálicas que participam no processamento da dor (Willis and Westlund, 1997).

As vias nociceptivas originadas no corno dorsal da medula espinal ativam estruturas encefálicas relacionadas com respostas neurovegetativas, orientação motora e comportamento de fuga e medo, como formação reticular, colículo superior, substância cinzenta periaquedutal, amígdala, hipotálamo e núcleos talâmicos mediais (Burstein et al., 1987). A ativação destas estruturas ocorre durante a fase inicial da dor e desencadeiam respostas neurovegetativas automáticas e comportamentos defensivos que envolvem um mínimo de cognição (Price, 2000). As vias sensoriais ascendentes ativam também núcleos laterais do tálamo, córtex somatossensorial e parietal posterior e estruturas cerebrais envolvidas nos aspectos perceptivo e cognitivo do processamento da dor. O córtex somatossensorial primário e secundário localiza e discrimina a intensidade e a qualidade do estímulo nociceptivo, e está interconectado ao córtex parietal posterior. O córtex parietal posterior, por sua vez, integra a informação nociceptiva com outras modalidades sensoriais e origina uma via córtico-límbica que converge para estruturas límbicas corticais e subcorticais (córtex cingulado anterior, córtex insular, amígdala) envolvidas no estabelecimento da valência emocional à experiência dolorosa (Price, 2000). A via córtico-límbica também integra a informação nociceptiva com a informação contextual e a memória, fornecendo a mediação cognitiva para o componente afetivo-motivacional da dor.

O processamento da dor, portanto, envolve a avaliação da sensação nociceptiva em relação ao seu contexto geral, a atribuição de uma valência afetiva ao estímulo doloroso e sua integração com aprendizado e memória, fornecendo ao organismo uma percepção geral da ameaça, para que, a partir disso, seja elaborada a resposta adaptativa adequada à extensão da ameaça apresentada.

### 1.1.2 Modulação da dor

A modulação da transmissão da dor é realizada por meio de circuitos neurais que envolvem diversas áreas encefálicas como córtex somatossensorial primário e secundário, córtex pré-frontal medial, córtex cingulado anterior, córtex insular, amígdala, núcleo periventricular do hipotálamo (PVC), substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo da rafe e formação reticular adjacente do bulbo (Fields and Basbaum, 2005; Heinricher et al., 2009; Ossipov et al., 2010; Mason, 2012). Vias descendentes que se originam destas estruturas, ativadas pelos sinais de dor ascendentes e sensíveis aos opiáceos, são capazes de controlar os disparos neuronais nociceptivos. Entradas de informações corticais podem ocasionar *upregulation* em núcleos do hipotálamo e do tronco encefálico que modulam o processamento da informação nociceptiva no próprio tronco encefálico e na medula espinal. O PVC do hipotálamo se comunica com a PAG através de uma via encefalinérgica, e projeções da PAG exercem uma influência excitatória em neurônios serotoninérgicos do núcleo magno da rafe no bulbo. Os neurônios do núcleo da rafe, por sua vez, projetam para o corno posterior da medula espinal e se conectam com interneurônios encefalinérgicos nas lâminas II e III de Rexed, que atuam pré- e pós-sinapticamente para suprimir o aumento da atividade nas fibras nociceptivas (Hainers, 2006).

Portanto, existem duas estruturas do tronco encefálico muito importantes para a modulação da dor: a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o bulbo ventromedial rostral (RVM) (Stamford, 1995; Fields and Basbaum, 2005). No RVM são identificadas duas populações de neurônios relacionados à via nociceptiva, denominadas células “ON” e células “OFF”, que exercem ações modulatórias opostas sobre os neurônios sensoriais do corno dorsal da medula espinal (Fields, 2004; Heinricher et al., 2009; Ossipov et al., 2010; Mason, 2012). Em condições basais, essas células disparam espontaneamente de forma fásica e recíproca, alternando sua atividade. No entanto, na presença de um estímulo nociceptivo, cessam-se os disparos das células “OFF” enquanto que as células “ON” se mantêm ativas, reduzindo o limiar nociceptivo e facilitando a resposta dolorosa (Heinricher et al., 2009; Mason, 2012). Por outro lado, quando as células “OFF” são ativadas, por opióides por exemplo, as células “ON” param de disparar e a nocicepção é inibida (Fields, 2004; Heinricher et al., 2009; Mason, 2012).

Assim sendo, a modulação da dor é vista como uma atividade dinâmica que resulta do equilíbrio entre a inibição e a facilitação da nocicepção, e que pode ser alterada em diferentes condições comportamentais, emocionais e patológicas onde as influências descendentes tornam-se tonicamente ativas (Heinricher et al., 2009). Em situações de medo ou estresse agudo intenso, por exemplo, pode-se verificar hipoalgesia (resposta reduzida ao estímulo nociceptivo) o que reflete um desequilíbrio a favor da inibição. Por outro lado, inflamação e lesão neural são associadas à hiperalgesia (resposta exacerbada ao estímulo nociceptivo), o que, por sua vez, mostra predominância da facilitação.

### **1.1.3 Hiperalgesia persistente inflamatória**

A dor de origem inflamatória resulta da produção e liberação desregulada de mediadores inflamatórios que sensibilizam os nociceptores, incluindo a bradicinina, a serotonina e, especialmente, as prostaglandinas.

As prostaglandinas são sintetizadas a partir da ação da enzima ciclooxigenase (COX) sobre o ácido aracádônico, um componente celular que após ser sintetizado é incorporado aos fosfolípidos da membrana citoplasmática. O ácido aracádônico é liberado pela ação da fosfolipase A2 (PLA2) sobre os fosfolípidos, em resposta a estímulos fisiológicos, farmacológicos ou patológicos sobre a membrana celular (Davies et al., 1984; Narumiya et al., 1999). As prostaglandinas são fisiologicamente produzidas em praticamente todas as células do organismo, onde exercem diferentes ações, autócrina e/ou parácrina, de acordo com o tipo de tecido corporal em que é encontrada (regulação de atividade quimiotáxica, resposta imunológica como inibição de agregação plaquetária, vasodilatação ou vasoconstrição, relaxamento ou contração da musculatura brônquica e uterina, ovulação, inibição de secreção gástrica no estômago e proteção da mucosa gástrica, entre outras).

Especialmente a Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) pode agir como um mediador inflamatório e como um neuromodulador que altera o processamento sináptico e a excitabilidade neuronal (Kawabata, 2011). A PGE<sub>2</sub> atua via um conjunto de receptores acoplados à proteína G denominados EPs, expressos em células periféricas e centrais, incluindo os neurônios aferentes primários. Os receptores EPs, quando estimulados, ativam a proteína G à qual estão acoplados, o que gera a

liberação de subunidades catalíticas que decompõem trifosfato inositol (IP3) em difosfato inositol (PIP2) e diacilglicerol (DAG), e convertem adenosina trifosfato (ATP) em monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). O aumento da concentração de DAG e AMPC no citosol ocasiona a estimulação de proteínas quinases (PKA e PKC $\epsilon$ ) que fosforilam os canais de sódio dependente de voltagem (NaV1.8) e os canais catiônicos com seletividade ao cálcio (TRPV1), ocasionando a abertura destes canais iônicos (Huang et al., 2006; Kawabata, 2011; Btresh et al., 2013). Toda esta sinalização intracelular leva, portanto, à diminuição do limiar de disparo de potenciais de ação dos nociceptores, facilitando a ativação neuronal.

Clinicamente, a diminuição do limiar nociceptivo, pode causar tanto um aumento da resposta dolorosa (hiperalgesia inflamatória), quanto uma sensação dolorosa a estímulos normalmente não nociceptivos (alodinia). Este aumento da sensibilidade dolorosa no tecido inflamado, na maioria das vezes, desaparece com a resolução do processo inflamatório. No entanto, pode ocorrer que, mesmo após a resolução da inflamação, a hiperalgesia continue ou o neurônio periférico fique mais suscetível à ativação (Ferreira et al., 1990; Villarreal et al., 2005). A dor que se mantém por semanas, meses ou até anos, perdurando além do período de cura tecidual (além do tempo de cura da lesão que lhe deu origem), é chamada persistente ou crônica, ou ainda “patológica”, por não ter propósito biológico aparente. Esta difere da chamada dor aguda ou “fisiológica” que se manifesta imediatamente após o estímulo nocivo, funcionando como um alarme indicando a existência de um processo lesivo, ou potencialmente lesivo, ao organismo, mas que desaparece após a cura da lesão ou doença causadora.

Para viabilizar o estudo experimental da cronificação da dor (passagem do estado de dor aguda para crônica), foi descrito um modelo animal de hiperalgesia mecânica persistente no qual a sensibilização durou por mais de 30 dias após o término de 14 dias de tratamento com administrações locais de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) no tecido subcutâneo da pata do rato (Ferreira et al., 1990). Este modelo demonstra a propriedade plástica das vias nociceptivas, após serem submetidas à sensibilização prolongada por ação do mediador inflamatório, e mimetiza as condições clínicas observadas em quadro de hiperalgesia persistente no qual a dor perdura mesmo após o processo inflamatório deixar de estar ativo.

## 1.2 Estresse e depressão

O termo estresse, no sentido como utilizado atualmente, foi definido em 1976, como sendo uma reação não específica do corpo a qualquer tipo de exigência (Selye, 1976). Compreende uma soma de reações orgânicas, fisiológicas e psíquicas, desencadeadas por determinados estímulos externos (chamados estressores), necessárias para a adaptação do organismo às exigências do meio ambiente. Essas respostas físicas e mentais, no entanto, podem provocar desequilíbrio no organismo se forem exageradas em intensidade ou duração. A dor crônica, por exemplo, é considerada um agente estressor que exige do organismo uma reação adaptativa à hipersensibilidade prolongada dos nociceptores e, este estresse crônico, por sua vez, pode ser um fator ambiental crucial para o desenvolvimento da depressão.

Assim, o estresse pode ser considerado uma doença que ocorre quando um agente ou condição de ameaça destrói o estado de equilíbrio dinâmico do qual a integridade do organismo depende (Kimball, 1982). No estresse, como patologia, os sintomas seriam as manifestações de esforço do organismo para se adaptar e enfrentar as ameaças à sua integridade e, neste sentido, a doença seria um distúrbio na extensão da adaptação (Hinkle, 1987).

Segundo a síndrome geral de adaptação do estresse, proposta por Selye, em 1936, primeiramente, o organismo reage à percepção de um estressor com uma reação momentânea de adaptação, que gera a elevação da sua resistência. Posteriormente, atingido o esgotamento devido à tensão intensa e contínua, o organismo deve seguir para um estado de relaxamento, para que, com o descanso suficiente, ele seja capaz de restabelecer o equilíbrio entre excitação-relaxamento necessário para o seu bom funcionamento. No entanto, se o organismo continuar sendo exposto a mais estressores, não poderá retornar ao estágio de equilíbrio inicial, o que, a longo prazo, pode gerar problemas de saúde e desencadear uma série de doenças associadas, como dor crônica e depressão (Nestler et al., 2002).

Dentre as anormalidades no sistema de resposta ao estresse, a hiperatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) está entre as alterações biológicas compartilhadas entre as condições de estresse, depressão e dor crônica (Maletic and Raison, 2009; Goldenberg, 2010). Crescentes evidências demonstram que, numa condição de estresse severo e prolongado, com elevação sustentada dos

níveis dos hormônios glicocorticoides devido a ativação do eixo HPA, podem ocorrer alterações neuroplásticas como a redução e a retração das ramificações dendríticas, a diminuição da densidade de espinhas dendríticas, reduzidas taxas de neurogênese no giro denteado, diminuição dos níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cerebro (BDNF) e morte de neurônios piramidais na formação hipocampal (McEwen, 2000; Sapolsky, 2000; Pittenger and Duman, 2008). Assim, a persistência dos estímulos estressantes pode acarretar disfunção hipocampal e redução no controle inibitório do hipocampo sobre eixo HPA, estabelecendo sua hiperatividade, uma alteração tipicamente observada em pacientes com dor crônica e com depressão (Nestler et al., 2002; Maletic and Raison, 2009; Goldenberg, 2010). De acordo com isso, a maioria dos modelos experimentais indutores de comportamento depressivo em animais utiliza alguma forma de estresse (Cryan et al., 2002).

O termo depressão é usado na psiquiatria para designar um transtorno de humor onde a principal queixa apresentada pelo paciente é a melancolia constante. Do ponto de vista bioquímico, a depressão se deve à alteração do funcionamento do sistema de neurotransmissores cerebrais (noradrenalina e serotonina). Segundo a Associação Americana de Psiquiatria, a depressão clínica é diagnosticada como um quadro em que o paciente apresenta pelo menos cinco de nove sintomas principais durante o período de, no mínimo, duas semanas: estado deprimido (mau humor constante, melancolia, irritabilidade), anedonia (perda de interesse em atividades que eram anteriormente prazerosas), alteração de apetite e peso (para mais ou para menos), distúrbios do sono, problemas psicomotores (agitação ou retardo motor), fadiga ou perda de energia, sensação de inutilidade (sentimento de culpa, de ter nenhum valor), dificuldade de concentração, pensamentos suicidas e de morte recorrentes (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 2013).

Apesar da dor não integrar o conjunto de sintomas considerados para diagnosticar a depressão, estudos epidemiológicos indicam uma estreita associação entre transtorno depressivo e dor crônica (Bair et al., 2003, 2008; Robinson et al., 2009). Neste contexto, destaca-se a alta comorbidade entre depressão e fibromialgia, sendo esta última, caracterizada por dor crônica difusa, persistente por, pelo menos, três meses e acompanhada por fadiga e distúrbios do sono (Maletic and Raison, 2009). Diversas características clínicas e biológicas são compartilhadas na dor e depressão, sendo que várias estruturas neuroanatômicas, circuitos neurais e sistemas de neurotransmissores apresentam alterações similares nestas duas

condições (Robinson et al., 2009; Goldenberg, 2010). Cabe salientar que as drogas mais eficazes para o tratamento da fibromialgia são os antidepressivos monoaminérgicos, que também são altamente eficazes no alívio de dores crônicas de um modo geral, revelando mais uma característica compartilhada entre dor crônica e depressão (Jann and Slade, 2007).

### **1.3 Via dopaminérgica mesolímbica**

A Via Dopaminérgica Mesolímbica é uma via do cérebro envolvida nos mecanismos de recompensa do organismo (Nestler and Carlezon, 2006), constituída por neurônios dopaminérgicos que conectam a Área Tegmentar Ventral ao córtex pré-frontal, através do Núcleo Accumbens. Esta via se origina na Área Tegmentar Ventral (VTA), um agrupamento de corpos de neurônios dopaminérgicos localizados na região ventral do tegmento do mesencéfalo, medialmente à substância negra. Da VTA partem as fibras que percorrem o feixe prosencefálico medial e fazem sinapse com neurônios do Núcleo Accumbens. O Núcleo Accumbens (NAc) é um dos núcleos da base do cérebro que, junto ao tubérculo olfatório, constitui uma estrutura denominada corpo estriado ventral, que emite projeções para o córtex pré-frontal.

Esta via dopaminérgica está envolvida na modulação das respostas comportamentais aos estímulos emocionais e no estabelecimento de memórias relacionadas às circunstâncias ameaçadoras ou recompensadoras. A dopamina liberada pela VTA exerce uma ação modulatória sobre os neurônios do estriado e do córtex pré-frontal. O córtex pré-frontal é uma área cortical fundamental para a organização dos pensamentos e comportamentos, e o NAc, que constitui quase que integralmente a parte ventral do estriado, tem um papel importante nos mecanismos de recompensa e motivação, e no reforço de aprendizagem, integrando informações sensoriais e motivacionais.

A Via Mesolímbica responsável, portanto, pela modulação das respostas comportamentais aos estímulos ambientais, é uma estrutura particularmente suscetível às alterações fisiológicas e neuroplásticas induzidas pelo estresse crônico. Durante um evento de estresse agudo como, por exemplo, um estímulo nociceptivo ou um confronto social, as projeções dopaminérgicas VTA–NAc podem ser estimuladas, aumentando a motivação do organismo para reagir ativamente à ameaça com as respostas adaptativas necessárias (Nestler and Carlezon, 2006;

Pittenger and Duman, 2008). Por outro lado, o estresse crônico pode causar alterações plásticas duradouras na via mesolímbica que, por sua vez, podem contribuir para sua disfunção (Nestler and Carlezon, 2006).

Atualmente, crescentes evidências têm apontado a participação da Via Dopaminérgica Mesolímbica na mediação de anormalidades comportamentais observadas na dor e na depressão. Neste sentido, o NAc parece exercer um papel importante no controle da dor aguda fisiológica (Magnusson and Martin, 2002), tendo sido demonstrado a ação modulatória deste núcleo na atividade tônica dos neurônios de projeção espino-supraespinal, induzindo uma antinocicepção heterosegmentar (Gear et al., 1999; Tambeli et al., 2002, 2003). Foi verificado que o aumento da atividade dopaminérgica no sistema mesolímbico pode atenuar o comportamento nociceptivo agudo em animais (Chudler and Dong, 1995; Altier and Stewart, 1999; Magnusson and Fisher, 2000; Taylor et al., 2003). Corroborando, a diminuição da liberação de dopamina, por microinjeções anestésicas em estruturas dopaminérgicas mesolímbicas, ou por lesões neurotóxicas em neurônios dopaminérgicos, induz aumento da dor aguda (Saadé et al., 1997; Magnusson and Martin, 2002). Apesar do NAc estar relacionado com a antinocicepção induzida por estímulos mecânicos agudos, recentemente nosso grupo de pesquisa verificou que este núcleo pode também exercer um papel facilitatório na manutenção da hiperalgesia persistente de origem inflamatória, contribuindo para a cronificação da dor através de mecanismos de neuroplasticidade no sistema de neurotransmissão dopaminérgica (Dias et al., 2015).

No contexto da depressão, crescem os indícios de que o Sistema Dopaminérgico Mesolímbico está envolvido nos transtornos de humor. Foi verificado que este sistema participa do desenvolvimento de anormalidades comportamentais observadas na depressão, como na anedonia, por exemplo, um comportamento caracterizado por interesse ou prazer diminuído em as atividades diárias consideradas anteriormente gratificantes (Nestler and Carlezon, 2006). Em humanos com depressão, resistente ao tratamento medicamentoso, a estimulação cerebral profunda em estruturas do Sistema Dopaminérgico Mesolímbico tem resultado em importantes efeitos antidepressivos (Schlaepfer et al., 2008; Bewernick et al., 2010).

#### 1.4 Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) é uma molécula da família das neurotrofinas presente em todo o sistema nervoso. Este fator neurotrófico regula o crescimento e a diferenciação neural durante o desenvolvimento do cérebro, e é essencial para a sobrevivência de neurônios e das células gliais no organismo adulto.

O BDNF é sintetizado na forma de uma molécula precursora denominada pró-BDNF (32 kDa) que é posteriormente clivada para gerar a forma madura da proteína (Mowla et al., 2001). Duas proteases participam do processo de clivagem extracelular do pró-BDNF: o Ativador de Plasminogênio do tecido (tPA) e a p11, uma subunidade da anexina tetrâmero (Aii1). A tPA é armazenada dentro da célula nervosa, juntamente ao pró-BDNF e ao plasminogênio (Lochner et al., 2008), e converte o plasminogênio em plasmina, a protease ativa que cliva o pró-BDNF (Pang et al., 2004; Lu et al., 2005). Já a p11 interage diretamente com o plasminogênio, aumentando a ativação da plasmina, ou liga-se à tPA, potencializando sua ação sobre o plasminogênio (Kassam et al., 1998a, 1998b; Kim and Hajjar, 2002).

As isoformas de BDNF podem apresentar ações antagônicas. O pró-BDNF se liga ao receptor de neurotrofina p75, cuja ativação está envolvida com efeitos anti-plasticidade, como o enfraquecimento das conexões sinápticas pela retração das espinas dendríticas (Lu et al., 2005). Por outro lado, o mad-BDNF, via ativação do receptor de proteína Tirosina-Quinase B (TrkB), está envolvido com sobrevivência celular e plasticidade neuronal. Esta isoforma também induz processos subjacentes a potencialização de longa duração (LTP) das respostas sinápticas como o crescimento das espinas dendríticas pós-sinápticas e aumentando a densidade sináptica (Tyler and Pozzo-Miller, 2003). Já a função da isoforma truncada do BDNF ainda é desconhecida.

De maneira geral, o BDNF é descrito como um dos mais prevalentes fatores neurotróficos do cérebro adulto e a principal neurotrofina da Formação Hipocampal, contribuindo notadamente para a plasticidade das sinapses cerebrais envolvidas com aprendizagem e memória (Nestler et al., 2002; Radecki et al., 2005). Recentemente, também tem sido atribuído ao BDNF um importante papel no mecanismo de modulação da dor crônica (Guo et al., 2006; Merighi et al., 2008;

Vanelderren et al., 2010) e na etiologia da depressão (Eisch et al., 2003; Krishnan and Nestler, 2008; Castrén and Rantamäki, 2010a, 2010b).

Embora a ação da neurotrofina na dor aguda ainda seja controversa, por apresentar tanto efeitos pró quanto anti-nociceptivos, em modelos de dor crônica inflamatória o BDNF tem se demonstrado, predominantemente, pró-nociceptivo, favorecendo a gênese das respostas hiperalgésicas (Merighi et al., 2008; Vanelderren et al., 2010). De fato, em condições de dor inflamatória, é observado um aumento na expressão de BDNF nos neurônios nociceptivos aferentes primários, e na sua subsequente liberação no corno dorsal da medula espinhal, onde a sinalização BDNF-TrkB, acarretará a hiperexcitabilidade dos neurônios pós-sinápticos contribuindo para a hipersensibilização destes neurônios aos estímulos dolorosos (Basbaum and Jessel, 2000; Merighi et al., 2008). A participação do BDNF neste processo de sensibilização central foi demonstrada em um estudo recente onde a administração intratecal de BDNF reduziu o limiar nociceptivo de ratos e contribui para a cronificação da dor (Constandil et al., 2011).

Dados da literatura têm demonstrado que em estruturas supra-espinhais o BDNF também influencia a modulação da dor crônica. Após lesão, foi observado aumento na expressão de BDNF nos neurônios da substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo que, por sua vez, liberam a neurotrofina na região ventro-medial rostral do bulbo (RVM), onde ela se liga ao TrkB e ativa uma cascata de eventos que contribui para a facilitação descendente da dor (Guo et al., 2006). Foi demonstrado que a infusão de BDNF no bulbo ventromedial rostral (RVM) facilitou a nocicepção e, em contra partida, a neutralização desta neurotrofina reverteu a hiperalgesia inflamatória, sugerindo que o aumento do BDNF e da ativação do receptor TrkB, em estruturas das vias descendentes de modulação da dor, seriam prováveis mecanismos moleculares envolvidos na facilitação da dor inflamatória (Guo et al., 2006).

Ainda, tem sido constatado que o BDNF potencializa a liberação de dopamina nos terminais neuronais do Núcleo Accumbens (Goggi et al., 2003), onde a ativação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 facilita o desenvolvimento da hiperalgesia persistente de origem inflamatória (Dias et al., 2015). Estes resultados sugerem que o BDNF pode atuar como um importante regulador da via dopaminérgica mesolímbica, mediando as alterações neuroquímicas ocorridas na hiperalgesia persistente.

Com relação à participação do BDNF na etiologia da depressão, a observação de alterações plásticas na formação hipocampal em animais, associadas a um comportamento do tipo depressivo induzido pelo estresse crônico, suscitou a hipótese de que fatores neurotróficos como o BDNF, poderiam ter um papel relevante na etiologia da depressão (Duman and Monteggia, 2006; Schmidt and Duman, 2007; Krishnan and Nestler, 2008, 2010; Racagni and Popoli, 2008; Castrén and Rantamäki, 2010a).

Estudos recentes sugerem uma ação pró-depressiva do BDNF no Sistema Dopaminérgico Mesolímbico (Eisch et al., 2003; Nestler and Carlezon, 2006; Krishnan and Nestler, 2008; Castrén and Rantamäki, 2010a, 2010b). Tem sido demonstrado que a infusão de BDNF, diretamente na VTA de ratos, aumenta o tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (FST), um comportamento tido como relacionado à depressão (Eisch et al., 2003). Por outro lado, o bloqueio da ação do BDNF no NAc, através de injeções intra-NAc de vetores virais codificantes da forma truncada do receptor TrkB, promoveu efeito do tipo anti-depressivo no FST (Eisch et al., 2003).

Em estudos experimentais de depressão induzida por modelo de estresse crônico por subjugação social, foi constatado aumento dos níveis de BDNF no NAc e da ativação de proteínas pertencentes as vias de sinalização intracelular do TrkB (Akt e ERK) de camundongos deprimidos (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007). Estes estudos comprovaram também efeito antidepressivo promovido pela deleção do gene do BDNF na VTA dos camundongos (Berton et al., 2006) e aumento da suscetibilidade à depressão após infusão bilateral de BDNF no NAc dos animais, em resposta a exposição submáxima à submissão social (Krishnan et al., 2007). Como o aumento da expressão protéica do BDNF no NAc, após a exposição a subjugação social, não foi acompanhado pelo aumento do seu RNA mensageiro, e a deleção local do gene do BDNF no NAc não evitou o comportamento do tipo depressivo nos animais (Krishnan et al., 2007), os autores postularam que a fonte do BDNF ativo no NAc é a VTA, onde, de fato, a deleção local do gene preveniu o comportamento de depressivo induzido por subjugação, além de reduzir os níveis da proteína do BDNF no NAc (Berton et al., 2006; Krishnan et al., 2007).

Cabe aqui atentar para o fato de que cerca de 95% dos neurônios que compõem o NAc são os chamados neurônios espinhais médios que expressam receptores dopaminérgicos do tipo D1 ou do tipo D2 (Lobo et al., 2010) sendo que,

este último, tem demonstrado uma efetiva participação na resposta antidepressiva (Gershon et al., 2007; Lobo et al., 2010). De acordo com isso, foi verificado que o BDNF no NAc, sinalizando via TrkB, diminui a excitabilidade de neurônios espinhais médios que expressam receptores D2 (Lobo et al., 2010), podendo assim contribuir indiretamente para um efeito pró-depressivo.

Diante dos dados até aqui expostos parece bastante provável que, as condições de dor crônica e de depressão podem compartilhar mecanismos de neuroplasticidade, envolvendo o BDNF, em determinadas estruturas neurais como o Sistema Dopaminérgico Mesolímbico.

Considerando que a ativação prolongada deste sistema pode ser mal-adaptativa, estabelecendo associações anormais baseada em uma percepção alterada da experiência sensorial, onde eventos inócuos são transformados em aversivos, é possível pressupor que este seja um mecanismo que explica a manifestação concomitante de sintomas relacionados a depressão e a dor crônica. Conforme previamente mencionado, a fisiologia da via mesolímbica pode sofrer profundas alterações em condições de estresse crônico, decorrentes da hiperativação e subsequente disfunção das suas estruturas. Uma vez que os neurônios da VTA e do NAc, integrantes desta via dopaminérgica, são também ativados frente aos estímulos nociceptivos, é plausível especular que processos semelhantes ocorrem em condições de dor crônica.

Assim, tomando como base o contexto de que a cronificação da dor, assim como a depressão, sejam respostas mal adaptativas do organismo que envolvem alterações moleculares e plásticas em vias neurais comuns a estes estados, como o sistema mesolímbico, buscou-se, no presente trabalho, estudar o papel do BDNF do NAc na instalação da hiperalgesia persistente, e analisar se há alterações na expressão gênica e protéica de BDNF na via mesolímbica, durante os períodos de instalação e de manutenção da hipersensibilidade nociceptiva. Além disso, tivemos como objetivo verificar se a hiperalgesia persistente de origem inflamatória induz comportamento do tipo depressivo em ratos, para estudar uma possível correlação entre estas condições patológicas.

***OBJETIVOS***

---

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Verificar o papel do BDNF na via mesolímbica (VTA-NAc) na instalação da hiperalgesia persistente de origem inflamatória e se a mesma induz comportamento do tipo depressivo em ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar se o bloqueio, ou ativação, do receptor TrkB no NAc, afeta o desenvolvimento da hiperalgesia persistente em ratos;
- Verificar se há alterações na expressão gênica do BDNF e da tPA na VTA, durante os períodos de instalação e manutenção da hiperalgesia persistente;
- Verificar se há alterações nos níveis da proteína do BDNF no NAc, durante os períodos de instalação e manutenção da hiperalgesia persistente.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 - Animais

Foram utilizados 138 ratos *Wistar* machos, com 6 semanas de idade (180-200g), provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional da Unicamp, sob condições controladas de temperatura (21 °C) e de luminosidade (ciclo 12:12 horas de claro-escuro), com livre acesso à água e à ração.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia da Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) para o uso de animais de laboratório (Zimmermann, 1983). Todos os procedimentos e protocolos experimentais foram submetidos à aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Unicamp (protocolo nº 2779-1 e protocolo nº 2779-1-1, Anexos 1 e 2).

#### 3.2 - Grupos e protocolos experimentais

O presente trabalho foi realizado em 4 etapas, sendo que, em cada uma delas, o protocolo experimental durou 28 dias e foi dividido em 2 períodos: (1) período de indução da hiperalgesia, correspondente aos 14 primeiros dias nos quais os animais receberam as injeções de PGE<sub>2</sub>, ou seu veículo, e (2) período de manutenção da hiperalgesia, correspondente aos 14 dias subsequentes, após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub>.

Foram realizados 14 grupos experimentais, constituídos da seguinte forma, ao longo das etapas do trabalho:

Etapa 1:

- grupo PGE<sub>2</sub>: animais que receberam injeções diárias de PGE<sub>2</sub> na pata, durante 14 dias (n=9);
- grupo Salina (estabelecido como controle): animais que receberam injeções do veículo da PGE<sub>2</sub> (NaCl) (n=9);

Etapa 2:

- grupo PGE<sub>2</sub> + SCL: animais que receberam PGE<sub>2</sub> na pata enquanto foram submetidos ao protocolo de estresse crônico leve (n=9);

- grupo Salina + SCL: animais que receberam salina na pata enquanto foram submetidos ao protocolo de estresse crônico leve (n=9);
- grupo PGE<sub>2</sub>: animais que receberam PGE<sub>2</sub> na pata, mas não foram submetidos ao protocolo de estresse crônico leve (n=6);
- grupo Salina: animais que receberam salina na pata, mas não foram submetidos ao protocolo de estresse crônico leve(n=6);

#### Etapa 3:

- grupo PGE<sub>2</sub> + K252a: animais que receberam PGE<sub>2</sub> na pata e K252a no NAc (n= 8);
- grupo PGE<sub>2</sub> + Veículo: animais que receberam PGE<sub>2</sub> na pata e o veículo do K252a no NAc (n=8);
- grupo Salina + K252a: animais que receberam salina na pata e o K252a no NAc (n=8);
- grupo Salina + Veículo: animais que receberam salina na pata e o veículo do K252a no NAc (n=6);

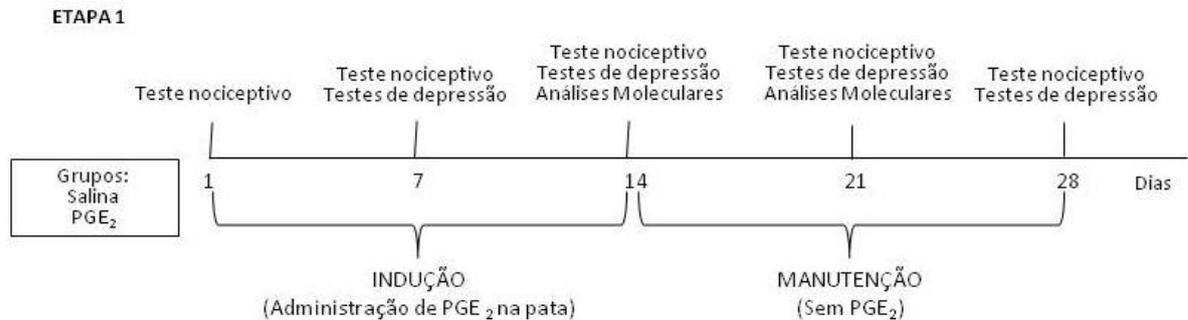
#### Etapa 4:

- grupo PGE<sub>2</sub> + DHF: animais que receberam PGE<sub>2</sub> na pata e DHF no NAc (n=6);
- grupo Salina + DHF: animais que receberam salina na pata e DHF no NAc (n=6);
- grupo PGE<sub>2</sub> + Veículo: animais que receberam PGE<sub>2</sub> na pata e o veículo do DHF no NAc (n=6);
- grupo Salina + Veículo: animais que receberam salina na pata e o veículo do DHF no NAc (n=6).

No decorrer do trabalho, as etapas foram desenvolvidas conforme descrito abaixo:

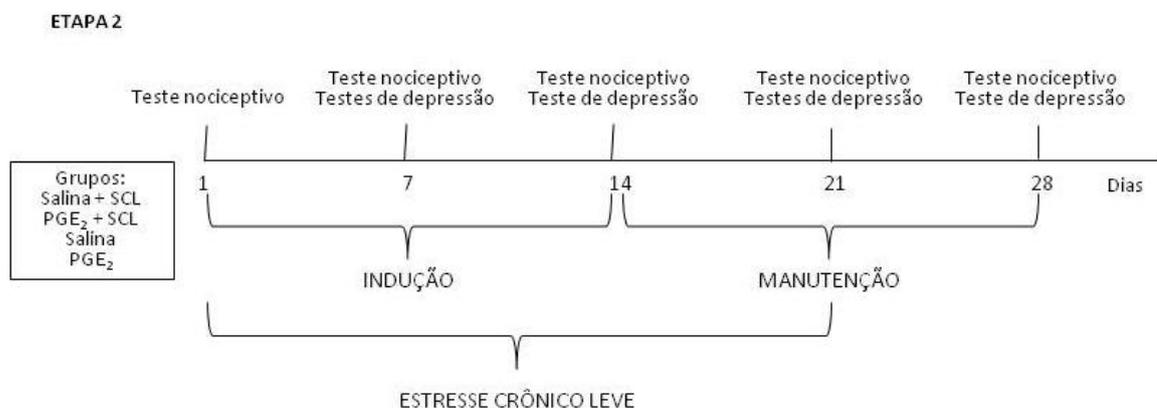
- Etapa 1 - Para comprovar a efetiva reprodução do modelo de hiperalgesia persistente pelo tratamento crônico com PGE<sub>2</sub>, e avaliar se a hiperalgesia induziu comportamento depressivo nos animais, foram realizadas as avaliações do limiar nociceptivo mecânico (teste de Randall-Selitto) e/ou do comportamento tido como depressivo dos animais (testes de Preferência por Sacarose e de Nado Forçado) nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 do protocolo experimental (Figura 1). Os ratos

foram aleatoriamente divididos em 2 grupos experimentais: (1) grupo PGE<sub>2</sub> e grupo Salina.



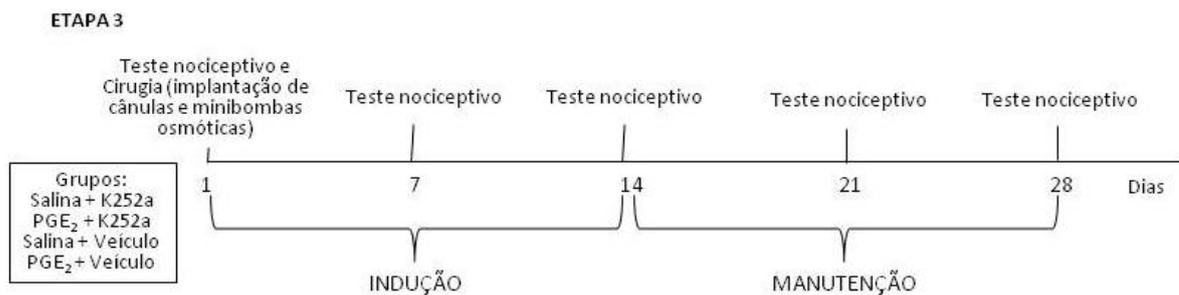
**Figura 1: Esquema do delineamento experimental da 1ª etapa do trabalho.** Indução da hiperalgesia persistente e avaliação do comportamento do tipo depressivo.

- Etapa 2 - Para verificar se o modelo de hiperalgesia persistente, associado a um segundo fator perturbador, foi capaz de gerar comportamento depressivo nos animais, eles foram submetidos, simultaneamente, ao tratamento com PGE<sub>2</sub> na pata e à um protocolo de Estresse Crônico Leve (SCL) e divididos em 4 grupos experimentais: (1) grupo PGE<sub>2</sub> + SCL, (2) grupo Salina + SCL, (3) grupo PGE<sub>2</sub> e (4) grupo Salina. Os testes de Randall-Selitto, para avaliação do limiar nociceptivo mecânico, e/ou de nado forçado, para avaliação do comportamento tido como depressivo, foram realizados nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 do protocolo experimental (Figura 2).



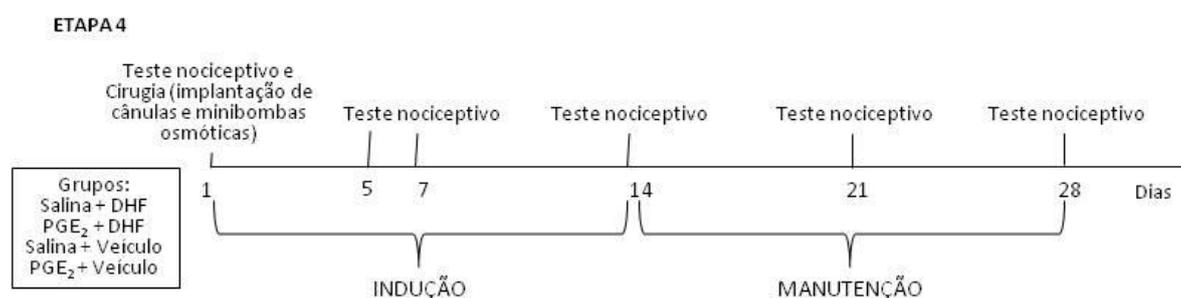
**Figura 2: Esquema do delineamento experimental da 2ª etapa do trabalho.** Associação do modelo de indução da hiperalgesia persistente com o protocolo de estresse crônico leve.

- Etapa 3 - Para verificar se a resposta hiperalgésica seria ou não mediada pelo BDNF do NAc, através da ativação de receptor TrkB, durante os 7 primeiros dias do período de indução da hiperalgésia, foi administrado K252a (inibidor do receptor TrkB) intra-NAc. Imediatamente após ao teste nociceptivo, e à aplicação periférica da primeira dose de PGE<sub>2</sub>, ou salina, foi realizada a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guias e minibombas osmóticas nos animais para administração da droga no NAc. As avaliações do limiar nociceptivo mecânico foram realizadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 do protocolo experimental (Figura 3). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: (1) grupo PGE<sub>2</sub> + K252a, (2) grupo PGE<sub>2</sub> + Veículo, (3) grupo Salina + K252a e (4) grupo Salina + Veículo.



**Figura 3: Esquema do delineamento experimental da 3ª etapa do trabalho.** Bloqueio do receptor TrkB durante a indução da hiperalgésia persistente.

- Etapa 4: Para verificar se a ativação dos receptores TrkB anteciparia a instalação da hiperalgésia, foi administrado intra-NAc 7,8 Dihydroflavona Hidatado (DHF), um agonista seletivo de TrkB, ou seu veículo, durante os 7 primeiros dias de indução da hiperalgésia. Imediatamente após ao teste nociceptivo, e à aplicação periférica da primeira dose de PGE<sub>2</sub>, ou salina, os ratos foram canulados e divididos em 4 grupos experimentais: (1) grupo PGE<sub>2</sub> + DHF, (2) grupo Salina + DHF, (3) grupo PGE<sub>2</sub> + Veículo e (4) grupo Salina + Veículo. O limiar nociceptivo mecânico dos animais foi avaliado nos dias 1, 5, 7, 14, 21 e 28 do protocolo experimental (Figura 4).



**Figura 4: Esquema do delineamento experimental da 4ª etapa do trabalho.** Ativação do receptor TrkB durante a indução da hiperalgia persistente.

### 3.3 Modelo de indução da hiperalgia persistente

Para a indução da hiperalgia persistente, dose diária de Prostaglandina E<sub>2</sub> (100ng/50µl/pata), ou salina (50µl/pata), foi administrada no tecido subcutâneo da superfície dorsal da pata traseira direita do rato, durante 14 dias consecutivos. Dados da literatura comprovam que a administração subcutânea de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) por 2 semanas induz uma hiperalgia mecânica que persiste por cerca de 30 dias, após a interrupção do tratamento (Ferreira et al., 1990).

A dose de PGE<sub>2</sub> utilizada no presente trabalho corresponde a uma dose submáxima previamente estabelecida, obtida de uma curva dose-resposta (Ferreira et al., 1978). A administração da droga foi realizada com seringa de insulina (BD Ultra Fine 30U, agulha 29G).

Os 14 dias nos quais os animais receberam as injeções de PGE<sub>2</sub> na pata correspondeu ao período do protocolo experimental de indução da hiperalgia persistente, e os 14 dias subsequentes, após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub>, ao período de manutenção.

### 3.4 Avaliação do limiar nociceptivo mecânico

O limiar nociceptivo mecânico dos animais foi quantificado pelo teste de Randall-Selitto (Randall and Sellito, 1957), utilizando um analgesímetro (Ugo Basile, Itália) que aplica uma pressão sobre a pata do animal, que aumenta linearmente ao longo do tempo.

Para o teste, o animal foi posicionado no analgesímetro de tal maneira que sua pata direita, ficou presa em um dispositivo de compressão constituído de uma parte plana, sobre a qual repousou a superfície plantar da pata, e uma parte cônica que exerceu a pressão sobre a superfície dorsal da pata (conforme Figura 5). Este dispositivo passou então a exercer uma pressão crescente sobre a pata do animal, a medida que um pedal, conectado ao analgesímetro, foi acionado pelo experimentador. No momento em que a pressão induziu a resposta de retirada da pata do animal, o pedal deixou de ser acionado e a força exercida pelo dispositivo foi registrada (em gramas). O limiar nociceptivo mecânico foi calculado pela média de três registros realizados em intervalos de 5 minutos.

Os testes nociceptivos foram realizados no 7º e 14º dia de administração de PGE<sub>2</sub>, para avaliar a resposta do animal no início e no fim do período de indução da hiperalgesia, e no 7º e 14º dia após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub> (dias 21 e 28 do protocolo experimental, respectivamente), para avaliar o limiar mecânico ao longo do período de manutenção.



**Figura 5: Teste de Randall-Selitto.** Para avaliação do limiar nociceptivo mecânico, a pata traseira direita do rato posicionada no dispositivo de compressão do analgesímetro constituído por uma parte plana (b), sobre a qual repousou a superfície plantar da pata, e uma parte cônica (a) que exerceu a pressão sobre a superfície dorsal da pata.

### **3.5 Avaliação do comportamento do tipo depressivo**

Para analisar dois aspectos do comportamento animal relacionados à depressão, foram realizados 2 testes: (1) o Teste de Preferência por Sacarose, associado à anedonia (Alexander et al., 2010), comportamento caracterizado por perda de interesse em estímulos normalmente gratificantes, e (2) o Teste de Nado Forçado, relacionado ao desamparo aprendido (Bravo et al., 2012; Wang et al., 2012), definido como sendo uma redução da responsividade do organismo ao ambiente, produzido pela exposição a estímulos aversivos incontroláveis.

#### **3.5.1 Teste de Preferência por Sacarose**

No teste de preferência por sacarose os ratos têm livre acesso a duas garrafas: uma contendo água (600ml) e outra contendo solução de sacarose 3% (600ml). Nesta situação, o comportamento normal de roedores é ter preferência pela solução de sacarose. Assim sendo, a mudança neste comportamento (o consumo maior de água) é considerada uma resposta de anedonia, que caracteriza um comportamento depressivo do animal.

Primeiramente, os ratos foram habituados às condições de acesso às duas garrafas, bem como a exposição à solução de sacarose, ao longo das 48 horas que precederam o primeiro dia de teste, para evitar os efeitos de neo-fobia à exposição inicial (Amico et al., 2005). Posteriormente, os volumes das duas garrafas, consumidos ao longo de 3 dias consecutivos (1 bateria de teste), foram medidos a cada 24h, sendo que, a cada dia, a posição das garrafas foi invertida para prevenir a preferência lateral do rato no comportamento de beber.

A preferência por sacarose foi calculada como um valor percentual referente à:  $[\text{média de solução de sacarose consumida nos 3 dias (ml)}/\text{média de volume total (sacarose + água) consumido nos 3 dias (ml)}] \times 100$ .

As baterias de 3 dias consecutivos de testes, foram iniciadas nos dias 7, 14, 21 e 28 do protocolo experimental da etapa 1 do trabalho, para avaliar o comportamento depressivo do animal no início e no fim do período de indução da hiperalgesia, assim como ao longo do período de manutenção da hiperalgesia.

### **3.5.2 Teste de Nado Forçado**

No Teste de Nado Forçado os animais são colocados, individualmente, para nadar em um cilindro de vidro e é realizada a filmagem dos animais, para mensurar o tempo em que eles, nesta situação, permanecem imóveis.

No presente trabalho foi utilizado um cilindro de vidro de 20 cm de diâmetro e 40 cm de altura, preenchido em 30 cm de profundidade com água à 25 °C (Bravo et al., 2012; Wang et al., 2012). Vinte e quatro horas antes do teste, os ratos foram habituados a nadar por 15 minutos. O teste foi realizado em um único dia, no qual cada animal foi filmado nadando por 5 minutos. Posteriormente, as imagens foram analisadas para que o tempo de imobilidade do animal (em segundos) fosse cronometrado. Esta variável corresponde ao tempo total em que o animal permanece sem nadar, com movimentos mínimos apenas para se manter flutuando, com a cabeça acima da superfície da água, não demonstrando tentativas de escapar. A imobilidade do animal, que deixa de nadar e de tentar escapar da situação ameaçadora, é considerada um indicador de comportamento anormal depressivo em roedores (Cryan et al., 2002).

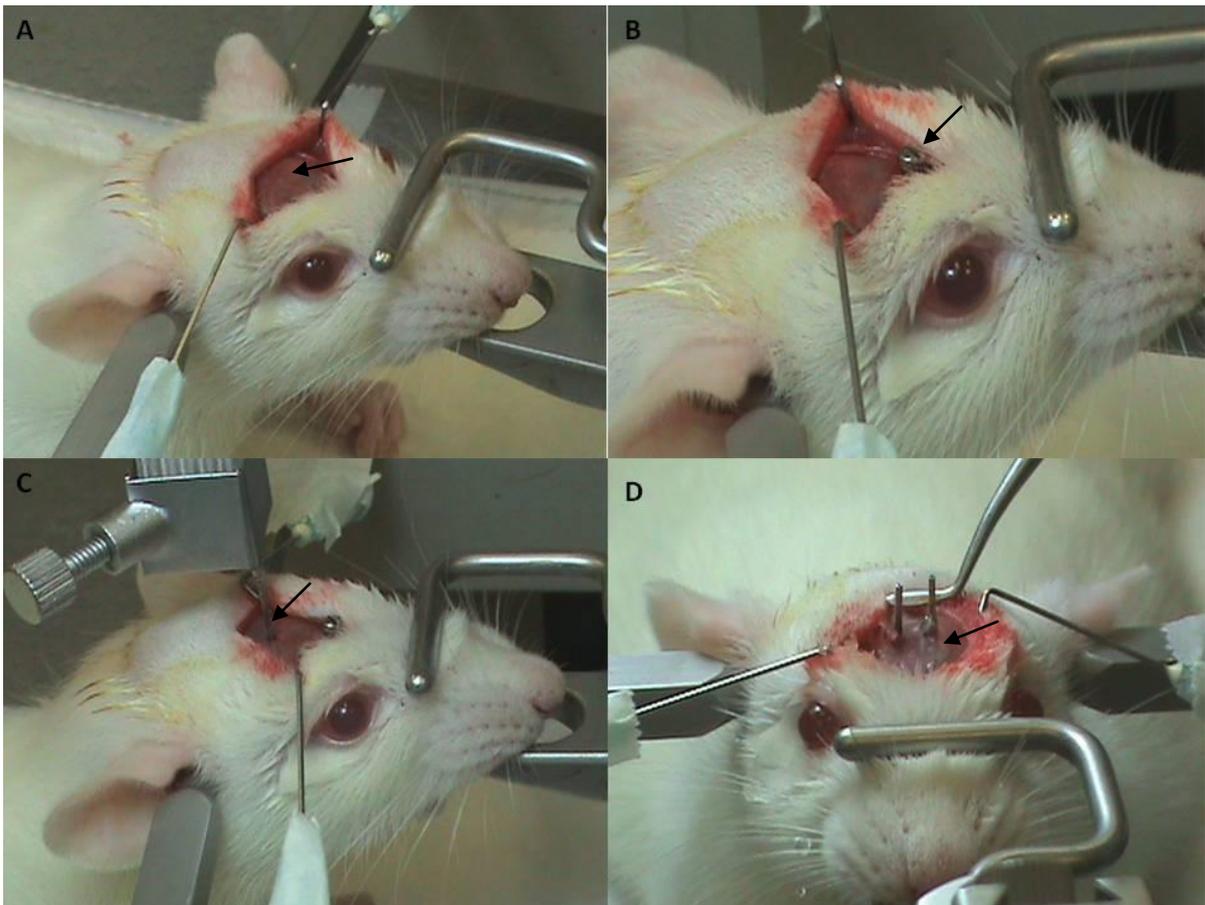
Os animais foram testados nos dias 7, 14, 21 e 28 do protocolo experimental nas etapas 1 e 2 do trabalho, para avaliar o comportamento depressivo no início e no fim do período de indução da hiperalgesia, assim como ao longo do período de manutenção da hiperalgesia.

### **3.6 Cirurgia estereotáxica para implantação das cânulas no NAc**

Para a cirurgia, primeiramente, os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina (Cetamin, Syntec) 10 mg/100 g de peso do animal e xilazina (Xilazin, Syntec) 8 mg/100 g de peso do animal.

Após sedação, o animal foi fixado no aparelho estereotáxico, por meio de barras auriculares e de presilha nasal para fixação dos dentes incisivos superiores. Foi realizada então a tricotomia e a assepsia da pele na região superior da cabeça do rato e, posteriormente, uma incisão longitudinal de cerca de 20 mm na região, através da qual o tecido subcutâneo do dorso do rato foi divulsionamento, e o sistema de microinfusão foi implantado na região interescapular do animal. Em seguida, o periósteo foi afastado para trepanação, com broca odontológica, de um

ponto aleatório do crânio, para fixação de um parafuso de aço (Figura 6B). Posteriormente, foram realizadas mais duas perfurações para implantação de cânulas bilaterais de aço inoxidável, calibre 23 e 15 mm de comprimento (Figura 6C). Para o posicionamento adequado das cânulas, o bregma (ponto anatômico de junção das suturas sagital e coronal do crânio) foi devidamente localizado (Figura 6A) e, a partir deste, utilizadas as seguintes coordenadas estereotáticas: AP +1.3mm (relativo ao Bregma); L  $\pm$ 1,8 mm (relativo à sutura sagital); H -7,2mm (relativo à superfície do crânio) (Paxinos and Watson, 1998). Após serem implantadas, as cânulas foram fixadas ao parafuso de aço, por meio de resina acrílica odontológica (Vipi Flash; VIPI Indústria, Comércio, Exportação e Importação de Produtos Odontológicos Ltda., Brasil). Esta resina constituiu um capacete acrílico na região dorsal da cabeça do animal sobre a qual foi realizada a sutura da incisão (Figura 6D).



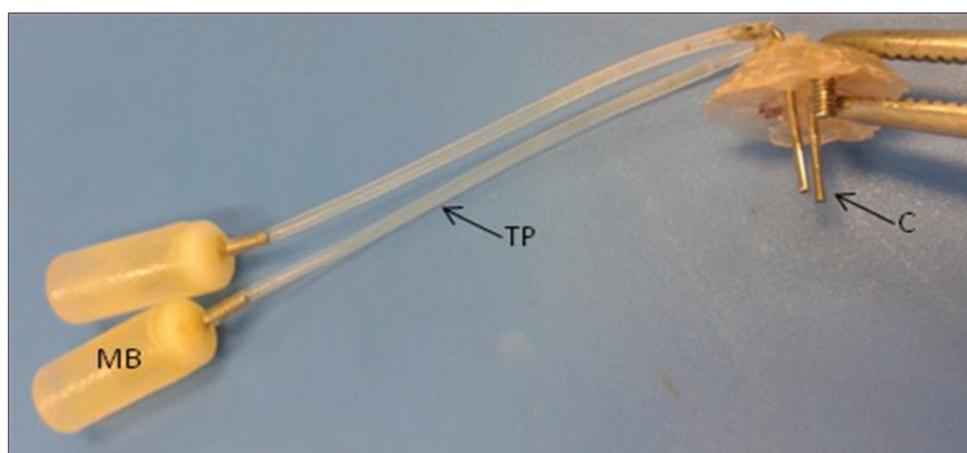
**Figura 6: Cirurgia estereotaxica.** (A) Incisão na região dorsal da cabeça do animal e identificação do bregma (seta) (B) Incisão na região dorsal da cabeça do animal e parafuso fixado ao crânio (seta). (C) Cânula sendo implantada no crânio do animal (seta). (D) Cânulas implantadas bilateralmente, fixadas ao parafuso pela resina acrílica (seta).

Terminada a cirurgia, foi realizada a administração intraperitoneal de dipirona diluída em salina (0,03g/300 $\mu$ l) para prevenir a dor pós-operatória do animal.

Os animais foram canulados, nas etapas 3 e 4 do presente trabalho, imediatamente após a avaliação do limiar mecânico e da aplicação da primeira dose de PGE<sub>2</sub> na pata (primeiro dia de indução da hiperalgesia).

### 3.7 Sistema de microinfusão para administração intracerebral da droga

Para otimizar a infusão contínua de droga no NAc, foi utilizado um sistema de microinfusão. Este sistema consistiu de mini-bombas osmóticas de 7 dias (Alzet ®), com velocidade de liberação de 0,5 $\mu$ l/h, conectadas às cânulas implantadas na estereotaxia, por cateteres de polietileno (Figura 7).



**Figura 7: Sistema de microinfusão para administração da droga intra-NAc.** Sistema de microinfusão removido após o sacrifício do animal, constituído pela mini-bomba (MB) conectada à cânula (C) pelo tubo de polietileno (TP).

Minutos antes da cirurgia estereotáxica, as mini-bombas foram carregadas com a droga de interesse, e conectadas às cânulas, em ambiente estéril da capela de fluxo laminar.

As drogas administradas através das mini-bombas foram: o K252a (um inibidor não seletivo de kinase com alta afinidade para os receptores TrkB) e o 7,8 Dihidroxi-flavona Hidatado (um agonista seletivo de TrkB). As mini-bombas foram preenchidas com 90 $\mu$ l de solução contendo 0,016 $\mu$ g/ $\mu$ l de K252a (Ou and Gean, 2006; Whitfield et al., 2011), ou seu veículo (DMSO), e 7,8 Dihidroxi-flavona Hidatado

a uma concentração de  $0,83\mu\text{M}/\mu\text{l}$  (Duclot and Kabbaj, 2013) ou seu veículo (PBS e DMSO).

O sistema de infusão foi implantado no primeiro dia do protocolo experimental, para que a droga de interesse fosse liberada no NAc, continuamente, durante um período de 7 dias em que, concomitantemente,  $\text{PGE}_2$  estivesse sendo injetada na pata do animal. Assim, apesar da droga intra-NAc atuar sobre o receptor TrkB apenas durante o início do tratamento com  $\text{PGE}_2$ , este intervalo de tempo já seria suficiente para interferir no modelo de indução utilizado no presente trabalho, onde são preconizados 14 dias consecutivos de administração de  $\text{PGE}_2$ , sem nenhuma outra intervenção, para a efetiva redução do limiar nociceptivo mecânico do animal (Ferreira et al., 1990).

### **3.8 Protocolo de estresse crônico leve**

Para verificar se hiperalgesia, associada ao estresse, poderia induzir comportamento do tipo depressivo nos animais, na etapa 2 do presente trabalho, um protocolo de Estresse Crônico Leve (SCL) foi associado ao modelo de indução da hiperalgesia persistente. Assim, além do tratamento com  $\text{PGE}_2$ , os animais foram submetidos a intervenções e/ou manipulações estressantes diárias, durante 21 dias consecutivos (adaptado de Moreau et al., 1994), conforme descrito no quadro abaixo:

**Quadro 1 - Protocolo do Estresse Crônico Leve**

	<b>2ª FEIRA</b>	<b>3ª FEIRA</b>	<b>4ª FEIRA</b>	<b>5ª FEIRA</b>	<b>6ª FEIRA</b>
<b>Período matutino</b>	Restrição dos movimentos por 1h*	Restrição dos movimentos por 1h*	Acesso restrito a comida por 2h	Restrição dos movimentos por 1h* e exposição à garrafa de água vazia por 1h	Restrição dos movimentos por 1h*
<b>Período vespertino</b>	Restrição dos movimentos por 1h*	Restrição dos movimentos por 1h*	Restrição dos movimentos por 1h*	Restrição dos movimentos por 1h*	Nenhuma intervenção
<b>Período noturno</b>	Iluminação contínua durante toda a noite	Retirada de água e comida durante toda a noite	Retirada de água durante toda a noite	Animais agrupados em gaiola suja durante toda a noite	inversão do ciclo claro-escuro (intervenção mantida no sábado e no domingo)

\* A restrição dos movimentos foi realizada pela contenção física do animal em um recipiente de plástico, cilíndrico, de 200 mm de comprimento e diâmetro ajustável, e aberto nas extremidades.

### 3.9 Preparação do material biológico para os testes moleculares

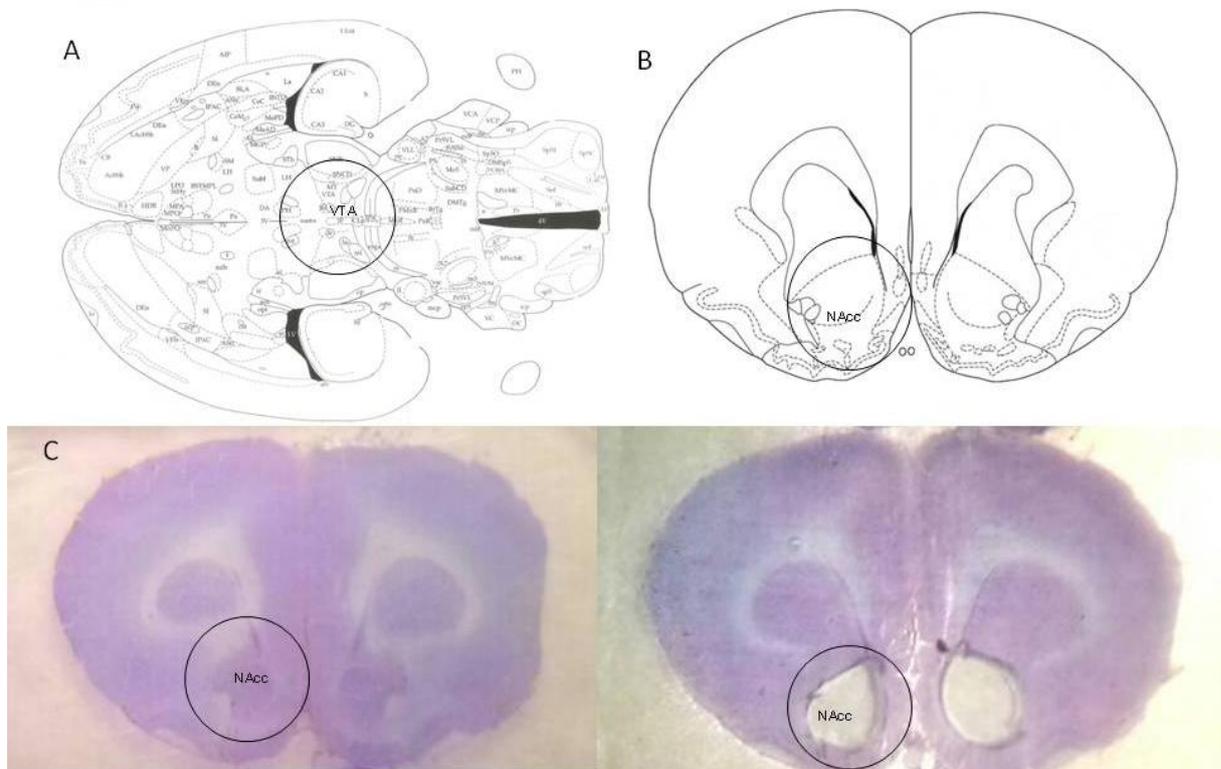
Na etapa 1 do presente trabalho, ao término do período de indução e no sétimo dia de manutenção da hiperalgesia (dias 14 e dia 21 do protocolo experimental, respectivamente), os animais foram eutanasiados por decapitação e tiveram seus encéfalos removidos do crânio, congelados em 2-metilbutano (Sigma) em gelo seco e armazenados a -80°C. Posteriormente, os encéfalos foram cortados no criostato (Leica), sendo obtidos 32 cortes histológicos de 60µm de espessura do NAc, e 18 de VTA, por animal. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de microscopia comuns revestidas de Parafilm®, e realizou-se a desidratação com a série alcoólica crescente e a coloração com Cresyl Violeta conforme descrito abaixo:

- 2 minutos em álcool 70% à 4 °C;
- 1,5 minuto em Cresyl Violeta 1% (diluído em álcool 50%) à 4 °C;
- Lavagem em álcool 70% à 4 °C;
- 2 minutos em álcool 100% à 4 °C;

- 2 minutos em álcool 100% à temperatura ambiente;
- Secagem das lâminas em fluxo por 15 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram visualizadas sob microscópio cirúrgico para microdissecação manual do NAc e da VTA (Figura 8), com bisturi nº 11. O material microdissecado foi colocado em tubos de microcentrifuga (1,5µl) e reservado a -80°C para as análises moleculares subsequentes.

Para a realização dos cortes no criostato, assim como para a microdissecação manual do material, foram utilizadas as referências anatômicas descritas no atlas de cérebro de ratos (Paxinos and Watson, 1998).



**Figura 8: Referência para dissecação da VTA e do NAc.** (A) Esquema do corte transversal do encéfalo do rato, ao nível da VTA (círculo), ilustrando as referências anatômicas para a microdissecação. (B) Esquema do corte coronal do encéfalo do rato, ao nível do NAc (círculo), utilizado como referência anatômica para a microdissecação. (C) Corte coronal do encéfalo do rato, ao nível do NAc (círculo), corados com cresyl violeta. (C) Corte coronal do encéfalo do rato, com o NAc removido (círculo) após a dissecação manual.

### 3.10 Testes moleculares

As amostras previamente dissecadas foram utilizadas para a análise da expressão protéica pelo teste de Western Blot e análise da expressão gênica pelo teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

#### 3.10.1 Western Blot

O Western Blot foi realizado para determinar a expressão das diferentes isoformas de BDNF (precursora, truncada e madura) no NAc, que mereceram uma análise discriminada por apresentarem funções antagônicas em relação a plasticidade neuronal.

Para realizar esta análise, primeiramente as amostras foram homogenizadas com um tampão de extração contendo Tris-HCl 8,9 10%; SDS 10%; de EDTA 0,2 M 0,5%; mix completo de inibidor de protease 1% (P8340, Sigma, EUA) e  $\beta$ -mercaptoetanol 5%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 7500g por 10 minutos, a 25°C, e o sobrenadante resultante foi coletado para a continuação do procedimento.

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford e o volume correspondente à 25ug de proteína total de cada amostra foi pipetado no gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). As proteínas foram separadas em bandas de acordo com o seu peso molecular, através de eletroforese, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,22  $\mu$ m). Esta membrana foi então corada com Ponceau S USB™ para evidenciar a eficiência da transferência, e fotodocumentada para determinar a densidade óptica das bandas de proteína total.

Em seguida, a membrana foi incubada por 2h em uma solução de leite em pó desnatado a 5%, em temperatura ambiente, para bloquear os sítios de ligação não específicos das proteínas. Após o bloqueio, a membrana foi incubada em anticorpo primário anti-BDNF (*rabbit*, policlonal, [N-20] SC- 546, Santa Cruz Biotechnology, EUA), na concentração de 1:500, por 12h a 4°C, para que as isoformas de BDNF precursora (32 KDa), truncada (28 KDa) e madura (14 KDa) fossem detectadas pela interação antígeno-anticorpo. A membrana foi então lavada com PBS contendo Tween-20 0,1% e, em seguida, incubada com o anticorpo

secundário conjugado com peroxidase (*goat anti-rabbit*, 656120, Invitrogen, EUA) na concentração de 1:10.000, por 2h, em temperatura ambiente. Um ensaio de quimioluminescência (Supersigma, West Pico, Pierce, EUA) foi realizado para identificar a imunorreatividade das bandas, através do software GeneSnap (Syngene).

Para quantificação da densitometria óptica empregou-se o software Gene Tools (Syngene). Para cada amostra, foi calculada a razão entre a densidade óptica (DO) da banda da isoforma de BDNF detectada e a DO da banda de proteína total corada com Ponceau S, utilizada como controle interno (Romero-Calvo et al., 2010). Os dados foram apresentados como valores de densidade óptica relativos ao grupo controle (veículo) considerado 1.0.

### 3.10.2 PCR em tempo real

Para a realização do método PCR em tempo real (RT-PCR), o RNA foi extraído a partir de tecido dissecado por Reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), seguindo o protocolo sugerido pelo do fabricante. Subsequentemente, foi feita a quantificação das amostras por meio de um espectrofotômetro de volume ultra-baixo (Epoch Microplacas Espectrómetro, BioTek Instruments Inc., EUA), e utilizado 500ng do RNA total para a síntese do cDNA (com estojo de síntese de cDNA SuperScript® VILO, Life Technologies, EUA). O cDNA obtido foi diluído 10 vezes em água deionizada e armazenado em -80°C.

Foram analisados os níveis de expressão dos genes de BDNF, S100A10 (símbolo oficial do gene da proteína p11), Ntrk2 (símbolo oficial do gene da proteína TrkB) e tPA, em relação ao controle endógeno do gene GAPDH, pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Reações de PCR foram realizadas na máquina StepOne Plus Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA), utilizando SYBR Green como sinal fluorescente (SYBR Select Master Mix, Applied Biosystems, EUA).

Os *primers* foram concebidos usando software Beacon Designer™ v8.14 da Premier Biosoft International (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>), entre exons quando possível, e a especificidade para o gene de interesse foi validada por comparação com o genoma do rato usando a ferramenta *Primer-blast* do NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). As sequências dos *primers* utilizados foram as seguintes:

**Quadro 2 - Sequência *forward* e *reverse* dos *primers* utilizados no presente trabalho**

Gene	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
BDNF	5'-ACTTAGGCAGAATGAGCAATGTCT-3'	5'-AGCAGTATTTCTCCTGTGTTCTT-3'
S100a10	5'-CACCTTGATGCGTCCTCT-3'	5'-TCTGCTTGTCGAATTGGAGTT-3'
Ntrk2	5'-GAGCCATACTGAATGAATCCAAGT-3'	5'-GCCATTAGGGTGTAGTCTCCAT-3'
tPA	5'-GTCTTGGGCAGAACATACAGAGT-3'	5'-GGCACACTGACTGGAATCTGA-3'
GAPDH	5'-AGAAACCTGCCAAGTATGATG3'	5'-TGGAAGAATGGGAGTTGCT'3'

Repetições técnicas para todas as amostras, bem como controles negativos, foram utilizados para cada gene submetido a PCR.

### 3.11 Análise estatística dos dados

Para a análise do limiar nociceptivo mecânico foi utilizado o teste de análises repetidas ANOVA Two-way seguido do teste de Bonferroni ( $P < 0,05$ ). O teste t de Student ( $P < 0,05$ ) foi utilizado para a análise estatística dos dados referentes ao comportamento tido como depressivo (teste de preferência por sacarose e teste de nado forçado) e às análises moleculares (Western blot e RT-PCR). As análises foram realizadas com o programa *Graph Pad Prism 4.0* e os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM.

***RESULTADOS***

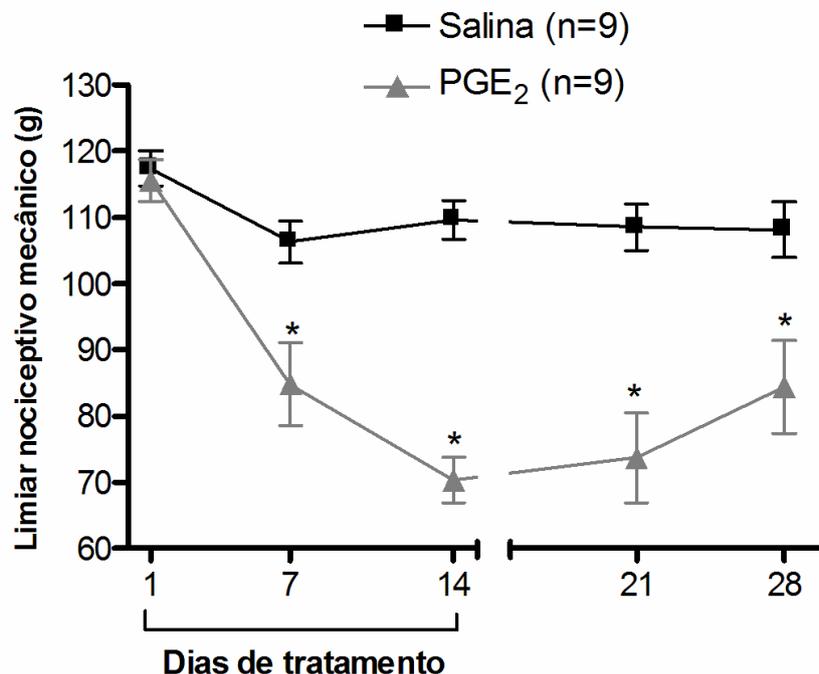
---

## 4. Resultados

### 4.1 Limiar nociceptivo mecânico na indução e na manutenção da hiperalgesia

Para avaliar o limiar nociceptivo mecânico dos ratos ao longo do período de tratamento com PGE<sub>2</sub> (período de indução) e no período de manutenção da hiperalgesia persistente, após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub>, foi utilizado o Teste de Randall-Selitto (1957).

Os resultados demonstraram uma diminuição significativa do limiar nociceptivo mecânico dos animais que receberam PGE<sub>2</sub> ( $p < 0.05$ , Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni), a partir do dia 7 do tratamento, comprovando a indução efetiva da hiperalgesia persistente, e sua manutenção até o 14<sup>o</sup> dia após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub>, ou seja, 28 dias após o início do protocolo experimental (Figura 9).



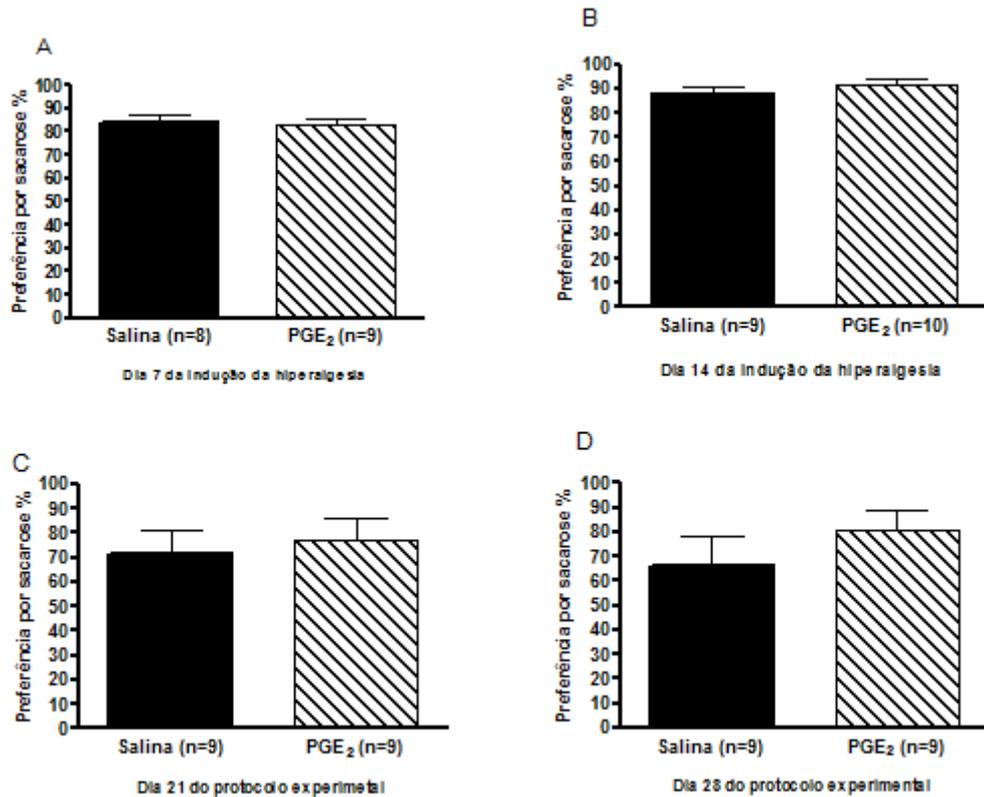
**Figura 9: Limiar nociceptivo mecânico na indução e na manutenção da hiperalgesia persistente.** A hiperalgesia foi induzida pela administração de PGE<sub>2</sub> (100ng/50µl/pata) durante 14 dias consecutivos. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado nos dias 7 e 14 do período de indução da hiperalgesia e, após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub> (período de manutenção), nos dias 21 e 28 do protocolo experimental. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 9 animais por grupo. Houve redução significativa do limiar nociceptivo no grupo PGE<sub>2</sub> do 7<sup>o</sup> ao 28<sup>o</sup> dia do protocolo experimental (\* $p < 0.05$ , Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni).

## **4.2 Hiperalgisia persistente e comportamento depressivo**

Para avaliar se o tratamento com PGE<sub>2</sub>, induziu comportamento do tipo depressivo nos animais hiperalgésicos, foram realizados o teste de preferência por sacarose e o teste de nado forçado, nos dias 7 e 14 do período de indução da hiperalgisia, e nos dias 21 e 28 do protocolo experimental (no período de manutenção da hiperalgisia, correspondente aos dias 7 e 14 após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub>, respectivamente).

### **4.2.1 Hiperalgisia e comportamento depressivo pelo teste de preferência por sacarose**

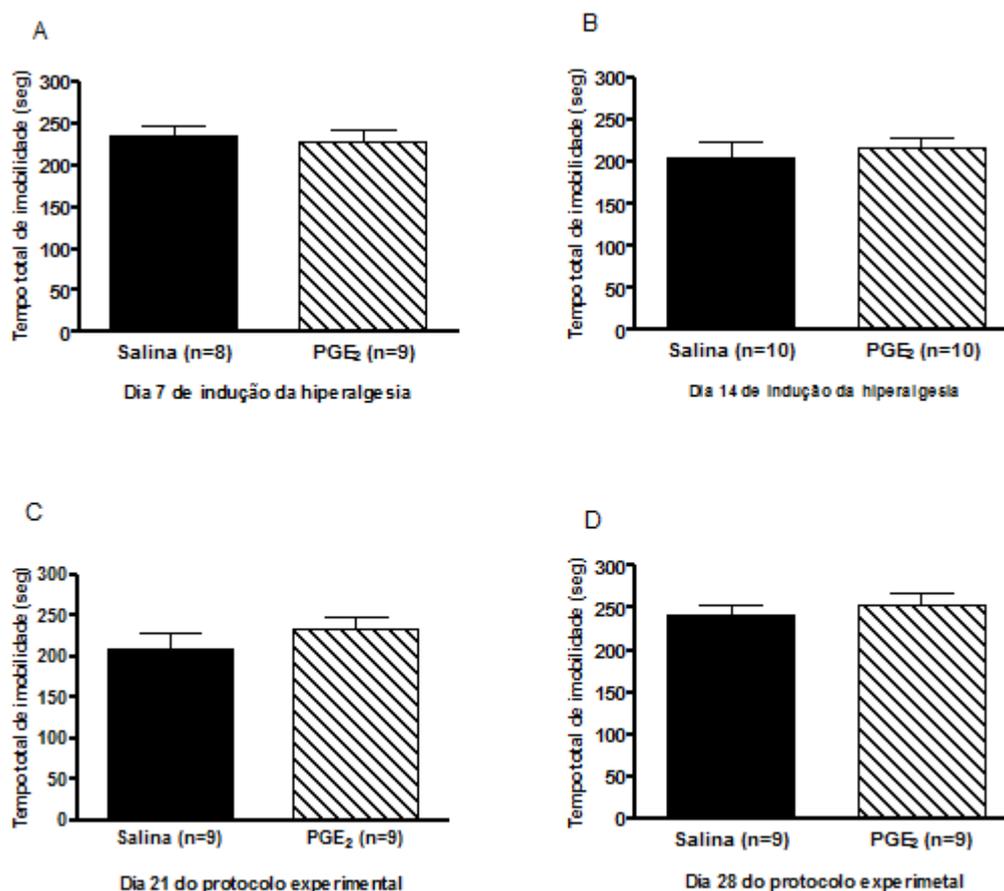
No teste de preferência por sacarose, não foi observada diferença significativa no consumo de solução de sacarose entre os grupos PGE<sub>2</sub> e salina (Teste t não pareado,  $p > 0.05$ ), no período de indução da hiperalgisia (Figuras 10A e 10B). Também não houve diferença no período de manutenção da hiperalgisia, dias 21 e 28 do protocolo experimental (Figuras 10C e 10D).



**Figura 10: Preferência por sacarose na hiperalgesia persistente.** O teste de preferência por sacarose foi realizado nos dias 7 (A) e 14 (B) do período de indução da hiperalgesia, assim como nos dias 21 (C) e 28 (D) do protocolo experimental (período de manutenção da hiperalgesia persistente). Os resultados correspondem ao percentual do consumo de solução de sacarose pelo consumo total (água + solução de sacarose). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de grupos experimentais constituídos por 8 a 10 animais. Não houve diferença significativa na preferência por sacarose entre os grupos PGE<sub>2</sub> e salina, em nenhum dos dias avaliados (Teste t não pareado,  $p > 0.05$ ).

#### 4.2.2 Hiperalgesia e comportamento depressivo pelo teste de nado forçado

No teste de nado forçado não foi observado diferença significativa no tempo total de imobilidade entre os grupos PGE<sub>2</sub> e salina (Teste t não pareado,  $p > 0.05$ ), nos dias 7 e 14 do período de indução da hiperalgesia (Figuras 11A e 11B), assim como nos dias 21 e 28 do protocolo experimental (Figuras 11C e 11D).



**Figura 11: Tempo total de imobilidade na hiperalgesia persistente.** O teste de nado forçado realizado no dia 7 (A) e 14 (B) do período de indução da hiperalgesia, e nos dias 21 (C) e 28 (D) do protocolo experimental. Os dados são expressos como média  $\pm$  epm de grupos experimentais constituídos por 8 a 10 animais. Não houve diferença significativa no tempo total de imobilidade entre os animais que receberam PGE<sub>2</sub> e os que receberam salina, em nenhum dos dias avaliados (Teste t não pareado,  $p > 0.05$ ).

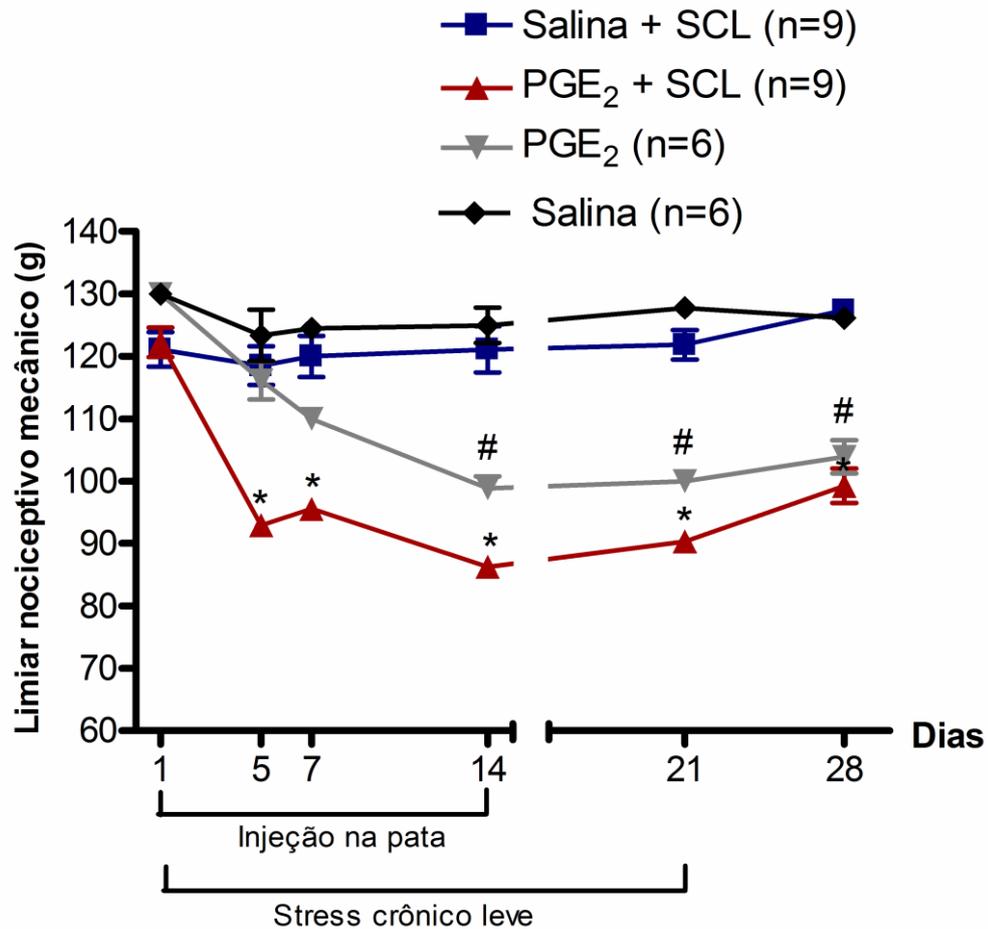
### 4.3 Associação da hiperalgesia persistente com o estresse crônico leve

Mediante o nosso resultado prévio, de que o modelo de hiperalgesia persistente utilizado não induziu comportamento tido como depressivo nos animais tratados com PGE<sub>2</sub>, decidimos verificar se a associação da hiperalgesia persistente com o estresse crônico, que é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da depressão (Anisman and Zacharko, 1982; Moreau et al., 1994), seria então capaz de tornar os animais deprimidos.

Os animais foram então, simultaneamente, submetidos à indução da hiperalgesia persistente pela administração de PGE<sub>2</sub> na pata durante 14 dias, e a um protocolo de estresse crônico leve, e os testes para verificar o limiar nociceptivo e o

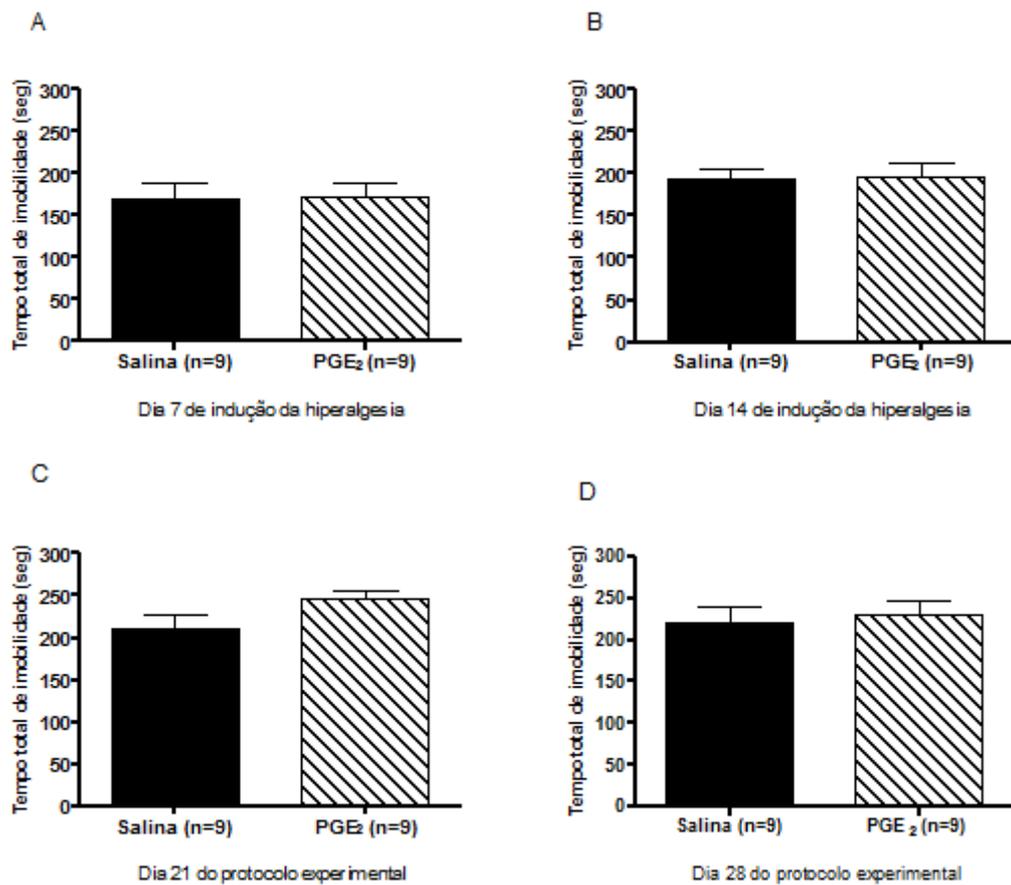
comportamento depressivo foram realizados nos dias 7 e 14 do período de indução da hiperalgesia e nos dias 21 e 28 do protocolo experimental.

Os resultados demonstraram que o grupo de animais que recebeu PGE<sub>2</sub>, e foi submetido ao estresse crônico, apresentou uma redução significativa no limiar nociceptivo mecânico a partir do 5º dia de indução ( $p < 0.001$ , Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni), mantida até o final do protocolo experimental (Figura 12). No dia 5 da indução, o limiar nociceptivo dos demais grupos avaliados permaneceu sem alteração. O grupo tratado com PGE<sub>2</sub>, mas que não foi submetido ao estresse, apresentou uma redução significativa no limiar nociceptivo a partir do dia 14 da indução ( $p < 0.01$ ). Já o limiar nociceptivo dos animais submetidos ao estresse, mas tratados com salina, não sofreu alteração ao longo do tempo.



**Figura 12: Limiar nociceptivo mecânico na hiperalgesia persistente associada com estresse crônico leve.** Os animais que receberam PGE<sub>2</sub> na pata por 14 dias, e foram submetidos ao protocolo de estresse durante 21 dias, apresentaram redução significativa do limiar nociceptivo mecânico a partir do dia 5 de indução da hiperalgesia, mantida até o final do protocolo experimental (\* $p < 0.001$ , Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Redução significativa do limiar nociceptivo do grupo tratado com PGE<sub>2</sub> não submetido ao estresse, foi observada a partir do dia 14 do protocolo experimental ( $^{\#}p < 0.01$ , Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de grupos experimentais constituídos por 6 a 9 animais.

Os resultados referentes ao teste de nado forçado, demonstraram que não houve diferença significativa no tempo total de imobilidade entre os animais submetidos ao estresse, e tratados com PGE<sub>2</sub> ou salina ( $p > 0.05$ , Teste t), em nenhum dos dias avaliados (Figura 13), comprovando que o modelo de hiperalgesia persistente não induziu comportamento tido como depressivo nos animais mesmo quando sua execução foi associada com o protocolo de estresse crônico leve.



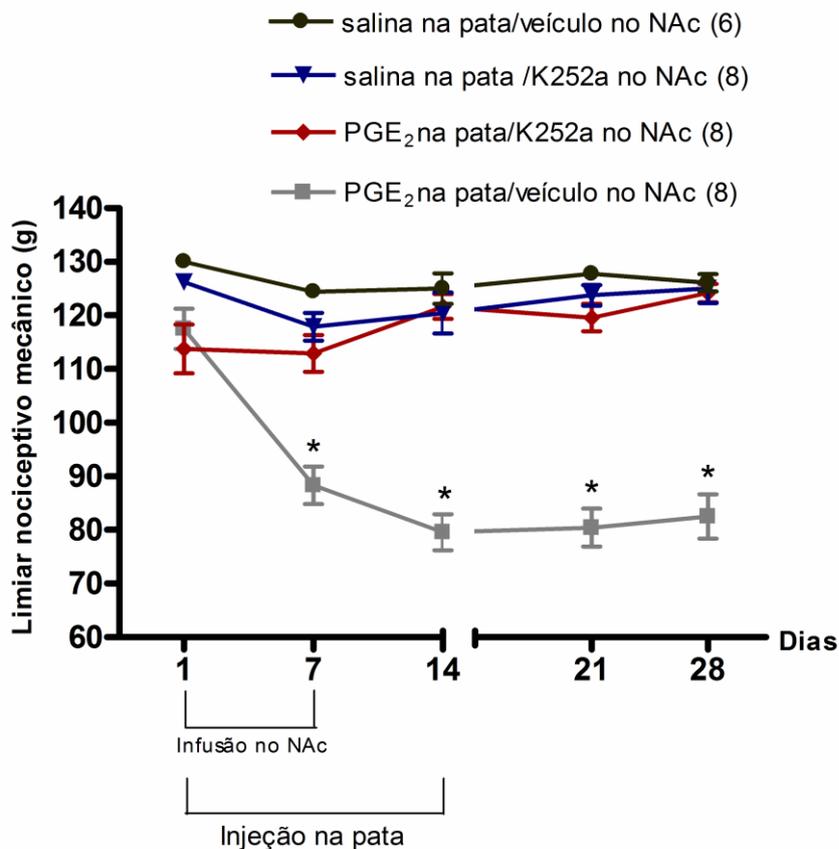
**Figura 13: Tempo total de imobilidade na hiperalgesia persistente associada com o estresse crônico leve.** O teste de nado forçado, dos ratos submetidos à indução da hiperalgesia persistente e ao protocolo de estresse crônico, foi realizado nos dias 7 e 14 da indução, e nos dias 21 e 28 do protocolo experimental. Não foi observado diferença significativa no tempo de imobilidade entre os animais submetidos ao protocolo de estresse crônico leve, e tratados com PGE<sub>2</sub> ou com salina, em nenhum dos dias de avaliação ( $p > 0.05$ , Teste t). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 9 animais por grupo.

#### 4.4 Limiar nociceptivo mecânico após bloqueio do receptor TrkB

Para avaliar o papel do BDNF do NAc na indução da hiperalgesia persistente, foi realizado o bloqueio de receptor TrkB pela administração intra-NAc de K252a (16,08ng/12 $\mu$ L/day), ou seu veículo, durante os 7 primeiros dias em que os animais foram tratados com PGE<sub>2</sub> na pata. O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado nos dias 7 e 14 do período de indução da hiperalgesia, e nos dias 21 e 28 do protocolo experimental.

Os resultados demonstraram que o bloqueio do receptor de BDNF no NAc, induzido pela administração de K252a, impediu a instalação da hiperalgesia persistente, uma vez que, não houve redução no limiar nociceptivo mecânico do

grupo tratado com PGE<sub>2</sub> mas que recebeu o inibidor de TrkB intra-NAc (Figura 14). Ao contrário disso, o limiar nociceptivo neste grupo experimental não sofreu alteração ao longo do tempo e permaneceu como os grupos de animais que receberam salina na pata. Apenas no grupo tratado com PGE<sub>2</sub> e que recebeu o veículo do K252a no NAc, é que o limiar nociceptivo mecânico sofreu uma redução significativa a partir do dia 7 de indução, mantida até o dia 28 do protocolo experimental ( $p < 0.01$ , Two-wayANOVA seguido do teste de Bonferroni).

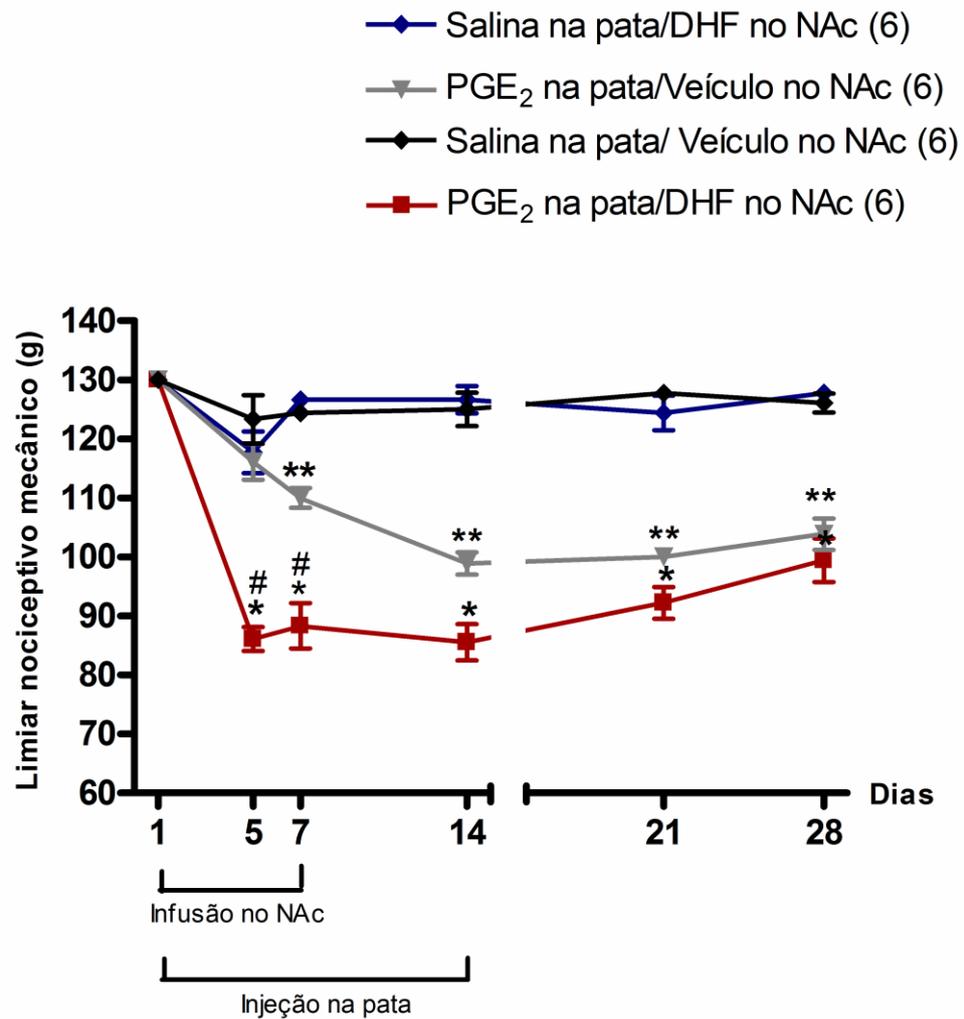


**Figura 14: Limiar nociceptivo mecânico após bloqueio do receptor TrkB.** Limiar nociceptivo mecânico dos ratos que receberam K252a no NAc, ou seu veículo, durante os primeiros 7 dias em que receberam injeções de PGE<sub>2</sub>, ou salina, na pata. Houve redução significativa no limiar nociceptivo do grupo que recebeu PGE<sub>2</sub> na pata, e o veículo do K252a no NAc, a partir do dia 7 de indução da hiperalgesia, mantida até o dia 28 do protocolo experimental ( $*p < 0.01$ , Two-wayANOVA seguido do teste de Bonferroni). Nos demais grupos experimentais o limiar nociceptivo não sofreu alteração ao longo do tempo. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de grupos experimentais constituídos de 6 a 8 animais.

#### 4.5 Limiar nociceptivo mecânico após ativação do receptor TrkB

Para verificar se a ativação do receptor TrkB do NAc, pela administração do 7,8 Dihidroflavona Hidatado, facilitaria o desenvolvimento da hiperalgesia, o agonista do receptor TrkB foi infundido no NAc durante os 7 primeiros dias de indução da hiperalgesia. O teste nociceptivo mecânico foi realizado nos dias 7, 14, 21 e 28 do protocolo experimental.

Os resultados demonstraram que a ativação do receptor de BDNF antecipou a instalação da hiperalgesia, uma vez que os animais que receberam o agonista seletivo de TrkB, e PGE<sub>2</sub> na pata, apresentaram uma redução significativa no limiar nociceptivo mecânico a partir do dia 5 de indução da hiperalgesia ( $p < 0.001$ , Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni), enquanto que os demais grupos experimentais, neste dia, permaneceram sem alterações (Figura 15). Foi observada redução do limiar nociceptivo do grupo que recebeu PGE<sub>2</sub> na pata e veículo no Nac, em relação aos grupos que receberam a salina na pata ( $p < 0.05$ ), a partir do dia 7 de indução da hiperalgesia (Figura 15). Ambos os grupos que receberam PGE<sub>2</sub> na pata, tiveram o limiar nociceptivo significativamente diminuído no dia 7 da indução, mas foi verificada uma diferença entre eles no que diz respeito ao grau de redução do limiar mecânico indicando que, destes, os animais que receberam DHF intra-Nac demonstraram hiperalgesia mais intensa.

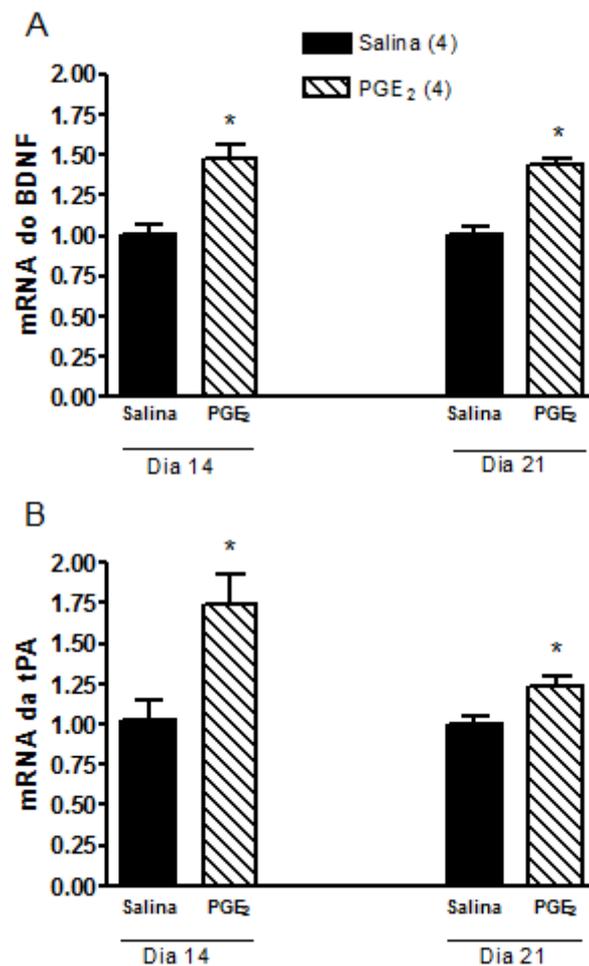


**Figura 15 - Limiar nociceptivo mecânico após ativação do receptor TrkB.** Limiar nociceptivo mecânico dos ratos que receberam do 7,8 Dihidroxi flavona Hidatado intra-NAc, ou seu veículo, por 7 dias, e PGE<sub>2</sub> na pata, ou salina, durante os 14 dias de indução da hiperálgia persistente. O grupo DHF e PGE<sub>2</sub>, apresentou uma redução significativa no limiar nociceptivo mecânico, a partir do dia 5 de indução da hiperálgia, se comparado aos demais grupos experimentais (\* $p < 0.001$ , Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Houve redução significativa do limiar nociceptivo no grupo que recebeu o veículo no NAc e PGE<sub>2</sub> na pata, em relação aos grupos que receberam salina na pata, a partir do dia 7 do protocolo experimental (\*\* $p < 0.05$ , Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Os grupos que receberam PGE<sub>2</sub> na pata diferiram entre si nos dias 5 e 7 do protocolo experimental (# $p < 0.01$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo.

#### 4.6 Expressão gênica do BDNF e da tPA na VTA durante a hiperálgia persistente

É sabido que o BDNF encontrado no NAc é sintetizado na VTA (Wang et al., 2014) e que a tPA é uma protease envolvida na síntese do mad-BDNF, a partir do pró-BDNF (Pang et al., 2004; Lu et al., 2005). Sendo assim, para verificar se o

desenvolvimento da hiperalgesia persistente afetou a expressão gênica do BDNF e da tPA na VTA, foi realizado o RT-PCR no dia 14 do período de indução da hiperalgesia e no sétimo dia do período de manutenção (dia 21 do protocolo experimental). Foi observado um aumento significativo na expressão gênica do BDNF (Figura 16 A) e de tPA (Figura 16 B) na VTA dos animais tratados com PGE<sub>2</sub> ( $p < 0.005$  e  $p < 0.05$ , Teste t, respectivamente) em ambos os períodos de indução e manutenção da hiperalgesia.



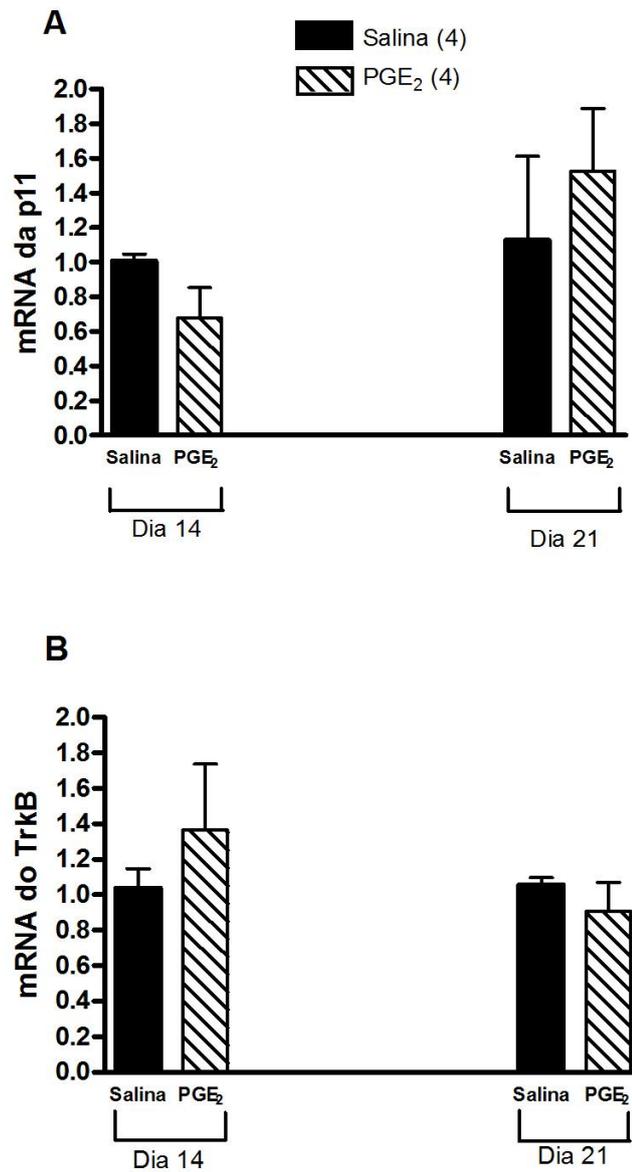
**Figura 16: Expressão gênica do BDNF e da tPA na VTA durante a hiperalgesia persistente.** Foi realizado RT-PCR para analisar a expressão gênica do BDNF e da tPA na VTA dos ratos submetidos a indução da hiperalgesia persistente, no final de indução (dia 14) e no sétimo dia após o término da administração da PGE<sub>2</sub> (dia 21 do protocolo experimental). Foi observado aumento significativo na expressão gênica do BDNF ( $*p < 0.005$ , Teste t) e da tPA ( $*p < 0.05$ ) na VTA do grupo tratado com PGE<sub>2</sub>, em ambos os tempos analisados. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 4 animais por grupo.

#### **4.7 Expressão gênica da p11 e do TrkB no NAc durante a hiperalgesia persistente**

Para verificar se o desenvolvimento da hiperalgesia persistente afetou a expressão gênica do receptor TrkB no NAc foi realizado o RT-PCR no dia 14 do período de indução da hiperalgesia e no sétimo dia do período de manutenção (dia 21 do protocolo experimental). Nestes mesmos dias, também foi realizada a análise da expressão gênica da protease p11, relacionada com a clivagem do BDNF e que poderiam, portanto, indicar uma alteração na disponibilidade do mad-BDNF.

Não foi observada diferença significativa na expressão gênica da p11 entre os grupos experimentais ( $p > 0.05$ , Teste t) nos dias avaliados (Figura 17A).

Também nenhuma diferença significativa na expressão gênica do receptor TrkB entre os grupos tratados ( $p > 0.05$ , Teste t) foi observada nos dias 14 e 21 do protocolo experimental (Figura 17B).



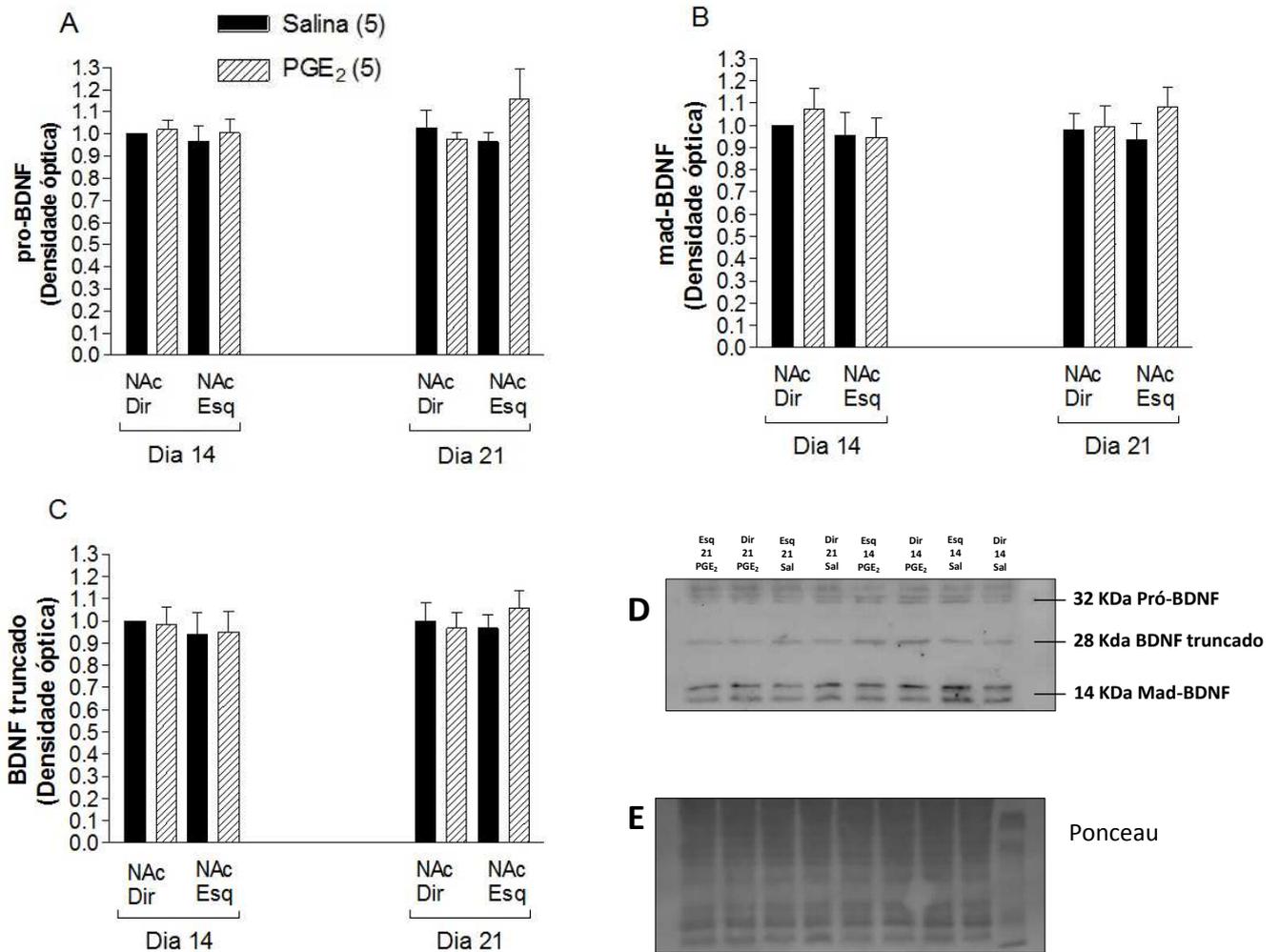
**Figura 17: Expressão gênica da p11 e do TrkB no NAc durante a hiperalgesia persistente.** RT-PCR para análise da expressão gênica da p11 (A) e do receptor trkB (B) no NAc dos ratos submetidos a indução da hiperalgesia persistente, no final de indução (dia 14) e no sétimo dia após o término da administração da PGE<sub>2</sub> (dia 21 do protocolo experimental). Não foi observada diferença significativa na expressão gênica da p11, entre os grupos experimentais, nos tempos analisados ( $p > 0.05$ , Teste t). Também nenhuma diferença significativa na expressão gênica do receptor TrkB foi constatada, entre os grupos experimentais, nos dias avaliados ( $p > 0.05$ , Teste t). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 4 animais por grupo.

#### 4.8 Níveis da proteína do BDNF no NAc pelo Western blot

O BDNF é sintetizado como uma isoforma precursora com 32 KDa (pró-BDNF), a partir da qual é gerada, por clivagem proteolítica, a isoforma madura com 14KDa (mad-BDNF) ou uma isoforma truncada de 28 KDa (Mowla et al., 2001). A função da isoforma truncada é ainda desconhecida. O mad-BDNF liga-se, preferencialmente, ao receptor tirosina-quinase B (TrkB) disparando uma cascata de sinalização intracelular que garante a sobrevivência celular e promove a plasticidade neuronal, enquanto o pró-BDNF tem alta afinidade pelo receptor de neurotrofina p75, iniciando efeitos pró-apoptóticos e anti-plasticidade (Lu et al., 2005). Tomando isto como base, no presente trabalho, foi realizada a análise das isoformas do BDNF para verificar alguma possível alteração nos níveis das proteínas que pudesse sinalizar um efeito pró ou anti-plasticidade relacionado ao estabelecimento da hiperalgesia persistente.

Foi utilizado o teste Western blot para analisar os níveis de BDNF no NAc dos ratos no final do período de indução da hiperalgesia (dia 14) e 7 dias após o término do tratamento com PGE<sub>2</sub> (dia 21 do protocolo experimental). O NAc direito (ipsolateral à administração da PGE<sub>2</sub> na pata) e o esquerdo (contralateral à injeção de PGE<sub>2</sub>) foram analisados separadamente para verificar se haveria diferença em relação ao lado de administração periférica da PGE<sub>2</sub>.

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa das isoformas do BDNF (precursora, truncada e madura) entre os grupos de animais que receberam PGE<sub>2</sub> e os que receberam salina na pata, no dia 14 da indução da hiperalgesia ( $p > 0.05$ , Teste t), em nenhum dos lados analisados (Figura 18). Também não foi observada diferença significativa entre as amostra do dia 21 ( $p > 0.05$ ), após o término da indução (Figura 18).



**Figura 18: Expressão da proteína do BDNF no NAc.** Western blot foi realizado para analisar as isoformas precursora (A), madura (B) e truncada (C) de BDNF no NAc dos ratos tratados com PGE<sub>2</sub>, ou salina, no final do período de indução da hiperalgesia (dia 14) e no sétimo dia após o término da administração da PGE<sub>2</sub> (dia 21 do protocolo experimental). Não foi observada diferença significativa nos níveis das isoformas entre os grupos experimentais, nos dias analisados ( $p > 0.05$ , Teste t). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM de 5 animais por grupo. (D) Foto representativa das bandas imunorreativas das isoformas de BDNF dos animais tratados e controles, nos dias 14 e 21 do protocolo experimental. (E) Membrana eletrotransferida corada com Ponceau S.

***DISCUSSÃO***

---

## 5. Discussão

### 5.1 A hiperalgesia persistente não induziu comportamento depressivo

Os resultados previamente apresentados demonstraram que o modelo animal de hipersensibilização nociceptiva provocada pela administração periférica de PGE<sub>2</sub> ao longo de 14 dias, utilizado no presente trabalho, induziu efetivamente hiperalgesia persistente nos animais, o que está de acordo com os dados obtidos em outros trabalhos da literatura que utilizaram o mesmo modelo experimental (Ferreira et al., 1990; Villarreal et al., 2005; Miranda et al., 2015). No entanto, foi visto que o modelo não desencadeou qualquer tipo de comportamento depressivo nos ratos hiperalgésicos.

Na tentativa de avaliar mais de um aspecto do comportamento animal relacionado à depressão (a anedonia e o desamparo aprendido) e buscar uma confirmação dos dados referentes ao possível desenvolvimento do transtorno depressivo, foram utilizados dois testes comportamentais (teste de preferência por sacarose e teste de nado forçado) mas, em nenhum deles, os animais hiperalgésicos apresentaram alterações comportamentais indicativas da doença.

É possível que o modelo de hiperalgesia persistente utilizado não tenha desencadeado comportamento do tipo depressivo nos animais por não provocar dor espontânea continuamente. É possível constatar que, em outros modelos experimentais utilizados para estudar a comorbidade entre dor crônica e depressão, a dor gerada é espontânea e constante (Bravo et al., 2012; Wang et al., 2012). Em contrapartida, a hipersensibilização da via nociceptiva gerada pela administração crônica de PGE<sub>2</sub> não induz dor contínua e em razão disto, possivelmente, não constituiu a intensidade de estimulação sensorial e emocional necessária para desencadear os mecanismos biológicos responsáveis pelo estabelecimento do transtorno depressivo no animal.

No intuito de confirmar esta hipótese, decidimos associar um protocolo de estresse crônico leve ao modelo indução da hiperalgesia persistente, uma vez que o estresse é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da depressão (Anisman and Zacharko, 1982; Moreau et al., 1994). No entanto, apesar de ter sido constatado que a associação dos procedimentos antecipou o aparecimento da hiperalgesia, não foi observada diferença significativa no tempo

total de imobilidade nos animais hiperalgésicos submetidos ao estresse crônico leve, inviabilizando o uso do modelo de hiperalgisia persistente pelo tratamento crônico com PGE<sub>2</sub>, como uma ferramenta para o estudo da associação entre dor crônica e depressão.

## **5.2 Facilitação da hiperalgisia persistente pela sinalização BDNF-TrkB no NAc**

O presente estudo revelou que o BDNF no NAc tem um papel importante na instalação da hiperalgisia persistente de origem inflamatória, uma vez que não foi observada redução do limiar nociceptivo mecânico nos animais tratados com PGE<sub>2</sub> cujos receptores TrkB do NAc foram bloqueados. Foi verificado aumento da expressão gênica de BDNF e tPA na VTA dos animais hiperalgésicos, durante os períodos de instalação e manutenção da hiperalgisia, que não foi acompanhado pelo aumento da expressão protéica de BDFN no NAc. Nossos achados suportam a idéia de que a dor crônica seja uma resposta adaptativa do organismo que envolve mudanças plásticas neuronais no NAc que depende de fatores neurotróficos como BDNF.

Trabalhos recentes demonstraram que o BDNF potencializa a liberação de dopamina nos terminais neuronais do NAc (Goggi et al., 2003). Em estudos prévios, nós verificamos que o aumento do tônus dopaminérgico no NAc pode facilitar a indução da hiperalgisia persistente via ativação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2. Isso foi demonstrado pela facilitação da hiperalgisia em ratos tratados com PGE<sub>2</sub> após a administração de um inibidor de recapitação de dopamina no NAc (Dias et al., 2015). Em conjunto, estes achados apontam uma possível via de atuação do BDNF na cronificação da dor, por meio do sistema dopaminérgico do NAc.

Ainda, tem sido constatado que o NAc apresenta uma atividade eferente tônica pronociceptiva, demonstrada pela atenuação do reflexo de abertura bucal em ratos, após administração intra-NAc de lidocaína quartenária (Gear and Levine, 2011). Foi verificado também que a administração do agonista do receptor de aminoácido excitatório cainato no NAc aumentou o reflexo dos animais (Gear and Levine, 2011). Estudos recentes mostraram que o BDNF, via TrkB, pode aumentar a expressam de subunidades dos receptores AMPA permeáveis ao Ca<sup>++</sup> no NAc (Li and Wolf, 2011). Associando estes resultados poderíamos especular que o BDNF

aumenta a atividade eferente pronociceptiva no NAc, facilitando o desenvolvimento da hiperalgesia. É provável que a ligação do BDNF aos receptores TrkB provoque a auto-fosforilação destes receptores e o disparo das cascatas intracelulares que geram a ativação de receptores glutamatérgicos (NMDA e/ou AMPA), levando ao influxo de íons ( $\text{Ca}^{++}$  e/ou  $\text{Na}^+$ ) e à hiperexcitação dos neurônios. Estes mecanismos são bem conhecidos em neurônios do corno dorsal da medula espinhal para a sensibilização central que ocorre na hiperalgesia (Basbaum and Jessel, 2000; Merighi et al., 2008; Vaneldereren et al., 2010; Constandil et al., 2011) e poderiam estar acontecendo também no NAc.

Além disso, trabalhos vem demonstrando que o bulbo ventral rostral (RVM), embora seja uma estrutura importante para a inibição descendente da dor, também pode estar envolvido na facilitação nociceptiva (Porreca et al., 2002; Vanegas and Schaible, 2004). Após inflamação, pode ser observado aumento de BDNF no RVM que, via receptor TrkB, dispara a cascata PLC/PKC e libera os estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  (Suzuki et al., 2004; Ren and Dubner, 2007). O aumento intracelular de  $\text{Ca}^{++}$  provoca a fosforilação e ativação dos receptores NMDA, com influxo de  $\text{Ca}^{++}$  e hiperexcitabilidade dos neurônios bulbares. Neurônios excitatórios do RVM, por sua vez, projetam-se para a medula espinhal e contribuem para a sensibilização central (Guo et al., 2006). No entanto, evidências revelam que esta influência facilitatória sobre as vias nociceptivas não se origina no RVM (Porreca et al., 2002) e sugerem que a via estriado-nigral constitui um circuito NAc-RVM (Gear and Levine, 2009) através do qual estímulos originados no NAc possam agir sobre o RVM desencadeando os eventos subseqüentes que facilitam a dor.

Assim, os resultados discutidos acima, advertem para o uso de terapias que buscam aumentar a produção endógena de BDNF no cérebro, objetivando o tratamento de doenças neurodegenerativas (You et al., 2016), mas que, por outro lado, podem facilitar o desenvolvimento da dor crônica.

### 5.3 O aumento da expressão gênica de BDNF e tPA na VTA

No presente trabalho foi verificado aumento da expressão gênica de BDNF e tPA na VTA dos animais tratados com PGE<sub>2</sub>, durante os períodos de instalação (7<sup>o</sup> dia da indução) e manutenção (21<sup>o</sup> dia do protocolo experimental) da hiperalgesia. Considerando que o BDNF encontrado no NAc é sintetizado como pró-BDNF na VTA (Wang et al., 2014), e assim liberado no NAc, juntamente as outras proteínas que participam do seu processo de clivagem (plasminogênio e tPA), onde ele é convertido em BDNF maduro (Mowla et al., 2001), era previsto que o aumento da expressão de mRNA do BDNF e da tPA na VTA fosse acompanhado por um aumento nos níveis de BDNF maduro no NAc.

No entanto, nossos resultados revelaram que o aumento da expressão gênica de BDNF e tPA na VTA, durante a hiperalgesia, não foi acompanhado por alterações nos níveis de BDNF maduro no NAc. Estes resultados podem ser justificados se consideradas as conexões do NAc e da VTA com outras áreas encefálicas. Estudos demonstraram que cerca de 88% do BDNF liberado no estriado são provenientes de projeções do córtex pré-frontal (Altar et al., 1997). Assim sendo, uma alteração nos níveis do BDNF liberado pela VTA no NAc, pode não ser visualizada, uma vez que o BDNF proveniente da VTA representam apenas uma pequena proporção do BDNF total encontrado no NAc. Foi demonstrado também que os neurônios da VTA se projetam para outras áreas límbicas, além do NAc, como o córtex pré-frontal, córtex orbitofrontal, giro do cíngulo, formação hipocampal e amígdala (Goto et al., 2010; Guo et al., 2014), onde o BDNF sintetizado na VTA alternativamente pode ser liberado. Além disso, não deve ser descartada a hipótese de um aumento do BDNF em uma via neuronal específica do NAc, que não tenha sido detectado pela técnica molecular utilizada para análise. Relatos na literatura demonstram a existência de diferentes populações de neurônios e vias neurais relacionadas com a dor no NAc que, mediante uma determinada intervenção, podem sofrer, cada qual, diferentes alterações (Ren et al., 2016). Porém estas alterações podem deixar de ser detectadas numa técnica molecular onde a estrutura é analisada como um todo, e as diferenças em circuitos segregados se diluem.

Com relação aos resultados referentes à expressão gênica da proteína de clivagem p11 e do receptor TrkB no NAc, sem alterações significativas durante a indução e manutenção da hiperalgesia, eles estão de acordo com os dados da

análise dos níveis da proteína do BDNF no NAc, onde, conforme discutido anteriormente, também não foram constatadas alterações.

***CONCLUSÕES***

---

## 6. Conclusões

Considerando os dados apresentados no presente trabalho, foi possível concluir que:

- A hiperalgesia mecânica persistente induzida através da administração de PGE<sub>2</sub> na pata do rato não gerou comportamento do tipo depressivo nos animais, mesmo quando associada ao estresse crônico leve.
- O BDNF no NAc possui um papel essencial no desenvolvimento da hiperalgesia persistente, uma vez que o bloqueio do receptor TrkB no NAc impediu a instalação da mesma.
- É observado aumento da expressão gênica de BDNF e de tPA na VTA dos animais hiperalgésicos, durante a indução e manutenção da hiperalgesia persistente, mas esta alteração não é acompanhada pelo aumento do mRNA da p11 e do receptor TrkB, e nem mesmo dos níveis da proteína do BDNF no NAc.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 7. Referências bibliográficas

- Alexander B, Warner-Schmidt J, Eriksson TM, Tamminga C, Arango-Lievano M, Ghose S, Vernov M, Stavarache M, Musatov S, Flajolet M, Svenningsson P, Greengard P, Kaplitt MG (2010) Reversal of Depressed Behaviors in Mice by p11 Gene Therapy in the Nucleus Accumbens. *Sci Transl Med* 2:54ra76-54ra76.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 1000:40–56.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389:856–860.
- Altier N, Stewart J (1999) The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sci* 65:2269–2287.
- Amico JA, Vollmer RR, Cai H, Miedlar JA, Rinaman L (2005) Enhanced initial and sustained intake of sucrose solution in mice with an oxytocin gene deletion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R1798-806.
- Anisman H, Zacharko RM (1982) Depression: The predisposing influence of stress. *Behav Brain Sci* 5:89.
- Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K (2003) Depression and pain comorbidity: a literature review. *Arch Intern Med* 163:2433–2445.
- Bair MJ, Wu J, Damush TM, Sutherland JM, Kroenke K (2008) Association of depression and anxiety alone and in combination with chronic musculoskeletal pain in primary care patients. *Psychosom Med* 70:890–897.
- Basbaum AI; Jessel TM (2000) The Perception of Pain. In: *Principles of Neural Science*, 4<sup>a</sup>. (MacGraw-Hill, ed), pp 472–491. KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864–868.
- Bewernick BH, Hurlmann R, Matusch A, Kayser S, Grubert C, Hadrysiewicz B, Axmacher N, Lemke M, Cooper-Mahkorn D, Cohen MX, Brockmann H, Lenartz D, Sturm V, Schlaepfer TE (2010) Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression.

- Biol Psychiatry 67:110–116.
- Bravo L, Mico JA, Rey-Brea R, Pérez-Nievas B, Leza JC, Berrocoso E (2012) Depressive-like states heighten the aversion to painful stimuli in a rat model of comorbid chronic pain and depression. *Anesthesiology* 117:613–625.
- Btsh J, Fischer MJM, Stott K, McNaughton PA (2013) Mapping the binding site of TRPV1 on AKAP79: implications for inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 33:9184–9193.
- Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ (1987) Direct somatosensory projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. *J Neurosci* 7:4159–4164.
- Calvino B, Grilo RM (2006) Central pain control. *Joint Bone Spine* 73:10–16.
- Castrén E, Rantamäki T (2010a) Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Aetiology of Depression. *CNS Drugs* 24:1–7.
- Castrén E, Rantamäki T (2010b) The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol* 70:289–297.
- Chudler EH, Dong WK (1995) The role of the basal ganglia in nociception and pain. *Pain* 60:3–38.
- Constandil L, Aguilera R, Goich M, Hernández A, Alvarez P, Infante C, Pelissier T (2011) Involvement of spinal cord BDNF in the generation and maintenance of chronic neuropathic pain in rats. *Brain Res Bull* 86:454–459.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23:238–245.
- Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford-Hutchinson AW (1984) The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol* 2:335–357.
- Dias EV, Sartori CR, Marião PR, Vieira AS, Camargo LC, Athie MCP, Pagliusi MO, Tambeli CH, Parada CA (2015) Nucleus accumbens dopaminergic neurotransmission switches its modulatory action in chronification of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Neurosci* 42:2380–2389.
- Duclot F, Kabbaj M (2013) Individual differences in novelty seeking predict subsequent vulnerability to social defeat through a differential epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor expression. *J Neurosci* 33:11048–11060.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood

- Disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116–1127.
- Eisch AJ, Bolaños CA, de Wit J, Simonak RD, Pudiak CM, Barrot M, Verhaagen J, Nestler EJ (2003) Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain–nucleus accumbens pathway: a role in depression. *Biol Psychiatry* 54:994–1005.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, De Campos DI (1990) Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. *Pain* 42:365–371.
- Ferreira SH, Nakamura M, de Abreu Castro MS (1978) The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Prostaglandins* 16:31–37.
- Fields HL, Basbaum AI (2005) Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: *Textbook of Pain*, 5a. (Elsevier Health Sciences, ed), pp 125–142. Burlington.
- Fields H (2004) State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5:565–575.
- Gear RW, Aley KO, Levine JD (1999) Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci* 19:7175–7181.
- Gear RW, Levine JD (2009) Rostral ventral medulla cholinergic mechanism in pain-induced analgesia. *Neurosci Lett* 464:170–172.
- Gear RW, Levine JD (2011) Nucleus accumbens facilitates nociception. *Exp Neurol* 229:502–506.
- Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L (2007) Dopamine D<sub>2</sub>-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry* 61:145–153.
- Goggi J, Pullar IA, Carney SL, Bradford HF (2003) Signalling pathways involved in the short-term potentiation of dopamine release by BDNF. *Brain Res* 968:156–161.
- Gold MS, Gebhart GF (2010) Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 16:1248–1257.
- Goldenberg DL (2010) Pain/Depression Dyad: A Key to a Better Understanding and Treatment of Functional Somatic Syndromes. *Am J Med* 123:675–682.
- Goto Y, Yang CR, Otani S (2010) Functional and Dysfunctional Synaptic Plasticity in Prefrontal Cortex: Roles in Psychiatric Disorders. *Biol Psychiatry* 67:199–207.
- Guo F, Zhang Q, Zhang B, Fu Z, Wu B, Huang C, Li Y (2014) Burst-firing patterns in the prefrontal cortex underlying the neuronal mechanisms of depression probed by antidepressants. *Eur J Neurosci* 40:3538–3547.
- Guo W, Robbins MT, Wei F, Zou S, Dubner R, Ren K (2006) Supraspinal brain-derived neurotrophic factor signaling: a novel mechanism for descending pain

- facilitation. *J Neurosci* 26:126–137.
- Hainers DE (2006) *Neurociências fundamental para aplicações básicas e clínicas*, 3a. Rio de Janeiro: Elsevier.
- Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM (2009) Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev* 60:214–225.
- Hinkle LE (1987) Stress and disease: the concept after 50 years. *Soc Sci Med* 25:561–566.
- Huang J, Zhang X, McNaughton PA (2006) Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol* 4:197–206.
- Jann MW, Slade JH (2007) Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression. *Pharmacotherapy* 27:1571–1587.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203–210.
- Kassam G, Choi KS, Ghuman J, Kang HM, Fitzpatrick SL, Zackson T, Zackson S, Toba M, Shinomiya A, Waisman DM (1998a) The role of annexin II tetramer in the activation of plasminogen. *J Biol Chem* 273:4790–4799.
- Kassam G, Le BH, Choi KS, Kang HM, Fitzpatrick SL, Louie P, Waisman DM (1998b) The p11 subunit of the annexin II tetramer plays a key role in the stimulation of t-PA-dependent plasminogen activation. *Biochemistry* 37:16958–16966.
- Kawabata A (2011) Prostaglandin E2 and pain--an update. *Biol Pharm Bull* 34:1170–1173.
- Kim J, Hajjar KA (2002) Annexin II: a plasminogen-plasminogen activator co-receptor. *Front Biosci* 7:d341-8.
- Kimball CP (1982) Stress and psychosomatic illness. *J Psychosom Res* 26:63–71.
- Krishnan V et al. (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131:391–404.
- Krishnan V, Nestler EJ (2008) The molecular neurobiology of depression. *Nature* 455:894–902.
- Krishnan V, Nestler EJ (2010) Linking Molecules to Mood: New Insight Into the Biology of Depression. *Am J Psychiatry* 167:1305–1320.
- Li X, Wolf ME (2011) Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases AMPA receptor surface expression in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 34:190–198.
- Lobo MK, Covington HE, Chaudhury D, Friedman AK, Sun H, Damez-Werno D, Dietz

- DM, Zaman S, Koo JW, Kennedy PJ, Mouzon E, Mogri M, Neve RL, Deisseroth K, Han M-H, Nestler EJ (2010) Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward. *Science* 330:385–390.
- Lochner JE, Spangler E, Chavarha M, Jacobs C, McAllister K, Schuttner LC, Scalettar BA (2008) Efficient copackaging and cotransport yields postsynaptic colocalization of neuromodulators associated with synaptic plasticity. *Dev Neurobiol* 68:1243–1256.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6:603–614.
- Magnusson JE, Fisher K (2000) The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res* 855:260–266.
- Magnusson JE, Martin R V (2002) Additional evidence for the involvement of the basal ganglia in formalin-induced nociception: the role of the nucleus accumbens. *Brain Res* 942:128–132.
- Maletic V, Raison CL (2009) Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:5291–5338.
- Mason P (2012) Medullary circuits for nociceptive modulation. *Curr Opin Neurobiol* 22:640–645.
- McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886:172–189.
- Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, Bardoni R (2008) BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol* 85:297–317.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1–164.
- Miranda J, Lamana SMS, Dias E V., Athie M, Parada CA, Tambeli CH (2015) Effect of pain chronification and chronic pain on an endogenous pain modulation circuit in rats. *Neuroscience* 286:37–44.
- Moreau JL, Bourson A, Jenck F, Martin JR, Mortas P (1994) Curative effects of the atypical antidepressant mianserin in the chronic mild stress-induced anhedonia model of depression. *J Psychiatry Neurosci* 19:51–56.
- Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphyl RA (2001) Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor. *J Biol Chem* 276:12660–12666.
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures,

- properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193–1226.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13–25.
- Nestler EJ, Carlezon WA (2006) The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biol Psychiatry* 59:1151–1159.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120:3779–3787.
- Ou L, Gean P (2006) Regulation of Amygdala-Dependent Learning by Brain-Derived Neurotrophic Factor is Mediated by Extracellular Signal-Regulated Kinase and Phosphatidylinositol-3-Kinase. *Neuropsychopharmacology* 31:287–296.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung W-H, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487–491.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Press A, ed). California.
- Pittenger C, Duman RS (2008) Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33:88–109.
- Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF (2002) Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 25:319–325.
- Price DD (2000) Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science* 288:1769–1772.
- Racagni G, Popoli M (2008) Cellular and molecular mechanisms in the long-term action of antidepressants. *Dialogues Clin Neurosci* 10:385–400.
- Radecki DT, Brown LM, Martinez J, Teyler TJ (2005) BDNF protects against stress-induced impairments in spatial learning and memory and LTP. *Hippocampus* 15:246–253.
- Randall LO, Sellito JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn therapie* 111:409–419.
- Ren K, Dubner R (2007) Pain facilitation and activity-dependent plasticity in pain modulatory circuitry: Role of BDNF-TrkB signaling and NMDA receptors. *Mol Neurobiol* 35:224–235.
- Ren W, Centeno MV, Berger S, Wu Y, Na X, Liu X, Kondapalli J, Apkarian AV, Martina M, Surmeier DJ (2016) The indirect pathway of the nucleus accumbens shell amplifies neuropathic pain. *Nat Neurosci* 19:220–222.

- Robinson MJ, Edwards SE, Iyengar S, Bymaster F, Clark M, Katon W (2009) Depression and pain. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:5031–5051.
- Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401:318–320.
- Saadé NE, Atweh SF, Bahuth NB, Jabbur SJ (1997) Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res* 751:1–12.
- Sapolsky RM (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry* 57:925–935.
- Schlaepfer TE, Cohen MX, Frick C, Kosel M, Brodesser D, Axmacher N, Joe AY, Kreft M, Lenartz D, Sturm V (2008) Deep brain stimulation to reward circuitry alleviates anhedonia in refractory major depression. *Neuropsychopharmacology* 33:368–377.
- Schmidt HD, Duman RS (2007) The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol* 18:391–418.
- Selye H (1976) Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 115:53–56.
- Stamford JA (1995) Descending control of pain. *Br J Anaesth* 75:217–227.
- Suzuki R, Rahman W, Hunt SP, Dickenson AH (2004) Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury. *Brain Res* 1019:68–76.
- Tambeli CH, Parada CA, Levine JD, Gear RW (2002) Inhibition of tonic spinal glutamatergic activity induces antinociception in the rat. *Eur J Neurosci* 16:1547–1553.
- Tambeli CH, Quang P, Levine JD, Gear RW (2003) Contribution of spinal inhibitory receptors in heterosegmental antinociception induced by noxious stimulation. *Eur J Neurosci* 18:2999–3006.
- Taylor BK, Joshi C, Uppal H (2003) Stimulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. *Brain Res* 987:135–143.
- Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH, Jones AK (1999) The cortical representation of pain. *Pain* 79:105–111.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller L (2003) Miniature synaptic transmission and BDNF modulate

- dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J Physiol* 553:497–509.
- Vanegas H, Schaible H (2004) Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev* 46:295–309.
- Vanelderen P, Rouwette T, Kozicz T, Roubos E, Zundert J Van, Heylen R, Vissers K (2010) The role of brain-derived neurotrophic factor in different animal models of neuropathic pain. *Eur J Pain* 14:473.e1-473.e9.
- Villarreal CF, Sachs D, De Queiroz Cunha F, Parada CA, Ferreira SH (2005) The role of NaV1.8 sodium channel in the maintenance of chronic inflammatory hypernociception. *Neurosci Lett* 386:72–77.
- Wang J, Bina RW, Wingard JC, Terwilliger EF, Hammer RP, Nikulina EM (2014) Knockdown of tropomyosin-related kinase B receptor expression in the nucleus accumbens shell prevents intermittent social defeat stress-induced cross-sensitization to amphetamine in rats. *Eur J Neurosci* 39:1009–1017.
- Wang S, Tian Y, Song L, Lim G, Tan Y, You Z, Chen L, Mao J (2012) Exacerbated mechanical hyperalgesia in rats with genetically predisposed depressive behavior: role of melatonin and NMDA receptors. *Pain* 153:2448–2457.
- Whitfield TW, Shi X, Sun W-L, McGinty JF (2011) The Suppressive Effect of an Intra-Prefrontal Cortical Infusion of BDNF on Cocaine-Seeking Is Trk Receptor and Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Dependent. *J Neurosci* 31:834–842.
- Willis WD (2007) The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. *Brain Res Rev* 55:297–313.
- Willis WD, Westlund KN (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14:2–31.
- You HJ, Park JH, Pareja-Galeano H, Lucia A, Shin J II (2016) Targeting MicroRNAs Involved in the BDNF Signaling Impairment in Neurodegenerative Diseases. *Neuromolecular Med*.
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110.



## 8. Anexos

### 8.1 Anexo 1 – Certificado do CEUA



UNICAMP



CEUA/Unicamp

---

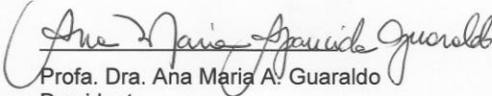
**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp**

**CERTIFICADO**

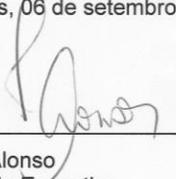
Certificamos que o projeto "Participação da hiperalgesia inflamatória persistente no desenvolvimento da depressão e na expressão do fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), na Área Tegmental Ventral e no Núcleo Accumbens de ratos" (protocolo nº 2779-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli / Lilian Calili Camargo, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 06 de setembro de 2012.

Campinas, 06 de setembro de 2012.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente



Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

## 8.2 Anexo 2 – Certificado do CEUA



CEUA/Unicamp

### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

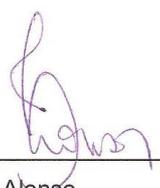
#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Participação da hiperalgesia inflamatória persistente no desenvolvimento da depressão e na expressão do fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), na Área Tegmental Ventral e no Núcleo Accumbens de ratos** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **2779-1-1**), de responsabilidade da **Profa. Dra. Cláudia Herrera Tambeli / Lilian Calili Camargo**, teve seu título alterado para **O papel do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) da via mesolímbica na hiperalgesia persistente**, por solicitação do responsável, tendo em vista a adequação do título aos resultados trabalho.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com o certificado emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 06/09/2012.

Campinas, 15 de julho de 2016.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Liana M. C. Verinaud  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

### 8.3 Anexo 3 – Declaração

**Profa. Dra. Rachel Meneguello**  
Presidente  
Comissão Central de Pós-Graduação  
**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **O PAPEL DO FATOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF) DA VIA MESOLÍMBICA NA HIPERALGESIA PERSISTENTE**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de Julho de 2016

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) autor(a): **Lilian Calili Camargo**

RG n.º 24.524.689/7

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): **Cláudia Herrera Tambeli**

RG n.º 18.241.780