



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

AMANDA SANTIAGO DUARTE SOUSA

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE PRECOCE E DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE AS
RESPOSTAS DE DOR CRÔNICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS**

Araraquara, SP
2024

AMANDA SANTIAGO DUARTE SOUSA

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE PRECOCE E DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE AS
RESPOSTAS DE DOR CRÔNICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico(a) Bioquímico(a).

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
Coorientador: Prof. Dr. Lucas Canto de Souza

Araraquara, SP

2024

S725i Sousa, Amanda Santiago Duarte.
Influência do estresse precoce e do dimorfismo sexual sobre as respostas de dor crônica em camundongos adultos / Amanda Santiago Duarte Sousa. – Araraquara, 2024.
35 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.
Coorientador: Lucas Canto de Souza.

1. Dor crônica. 2. Estresse. 3. Diferenças sexuais. 4. Hiperalgesia. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Souza, Lucas Canto de, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara

Esta ficha não pode ser modificada

AMANDA SANTIAGO DUARTE SOUSA

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE PRECOCE E DO DIMORFISMO SEXUAL SOBRE
RESPOSTA DE DOR CRÔNICA EM CAMUNDONGOS ADULTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, para obtenção do título de Bacharela em Farmácia.

Data da defesa: 09/12/2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Lígia Renata Rodrigues Tavares
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dedico este trabalho a Deus, o maior orientador da minha vida, pela ajuda de sua Infinita Sabedoria. O Senhor nunca me abandonou e sem Ele nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho representa muito mais do que o término de uma etapa acadêmica; simboliza o fim de uma jornada repleta de desafios, aprendizado e crescimento pessoal. Agradeço imensamente a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para que este momento fosse possível.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que me fortaleceu em cada passo desse caminho. Foi em Sua presença que encontrei paz nos momentos de incerteza e força quando me senti enfraquecida.

À minha família, minha base de amor e apoio incondicional, que sempre acreditou no meu potencial, mesmo nos dias em que eu duvidava de mim mesma. Agradeço especialmente aos meus pais, Maria Alvina e Renato, que me ensinaram o valor da educação e do esforço. Vocês são minha inspiração diária e, sem o incentivo e paciência de vocês, esta conquista não seria possível.

Ao meu marido, Marcus, meu companheiro de vida e meu maior apoiador. Sua paciência, carinho e encorajamento foram fundamentais para que eu seguisse em frente, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por estar ao meu lado em cada etapa, compartilhando comigo as dificuldades e celebrando as conquistas. Sua confiança no meu potencial e seu amor foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, cada ensinamento foi essencial para moldar o profissional e o ser humano que estou me tornando.

Ao Laboratório de Farmacologia, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza e coorientadores Prof. Dr. Lucas Canto de Souza e Profa. Dra. Daniela Baptista de Souza, sou profundamente grata pela paciência, pelo conhecimento compartilhado e pela dedicação ao longo desse processo. Sua orientação foi essencial para a realização deste trabalho e para o meu crescimento como pesquisadora. Muito obrigada por acreditar no meu potencial e por me guiar com sabedoria e compreensão.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro durante a realização desta pesquisa (Edital ProPe 09/2023).

“A excelência, portanto, não é um ato, mas
sim um hábito”
(Aristóteles)

RESUMO

Em termos de saúde pública, a dor destaca-se como um importante problema, sendo o principal motivo da procura por consultas médicas em serviços de saúde. Em nível mundial, os quadros de dor crônica possuem alta prevalência, afetando mais de um quarto da população e mais de dois terços da população brasileira, sendo as mulheres mais amplamente representadas entre os pacientes com dor crônica. No entanto, há alta correlação dos quadros de dores crônicas com fatores psicológicos e sociais que podem, nos diferentes sexos, transformar a dor aguda, pontual, em dor crônica, persistindo mesmo após a cura da lesão. Desta forma, mostra-se relevante investigar o papel do estresse precoce frente aos quadros de dor crônica e a influência da diferença sexual sob estas respostas. Para realizar essa investigação foi empregado o modelo hyperalgesic priming e para avaliação de respostas relacionadas a nocicepção o teste de Von Frey e a escala facial de dor como um parâmetro para a quantificação de aspectos afetivos da dor e o estado do pelo para avaliação de comportamentos relacionados à depressão. Os resultados obtidos indicam que o estresse precoce é capaz de causar um prejuízo na recuperação após uma lesão, diminuindo os limiares relacionados à latência de retirada de pata no teste de hiperalgesia mecânica após a incisão plantar. Na escala facial de dor foi possível observar que o estresse precoce é capaz de aumentar os escores de expressão facial de dor após a incisão plantar e após a injeção de prostaglandina (PGE₂). Na avaliação do estado da pelagem foi observado piora na qualidade do pelo em machos, demonstrando que o estresse psicossocial é capaz de induzir comportamentos relacionados a sintomas depressivos. Desta forma pode-se concluir que o estresse precoce é capaz de promover alterações sexualmente diversas sobre a percepção dolorosa e sobre as respostas afetivas relacionadas à dor.

Palavras-chave: dor crônica; estresse; diferenças sexuais; hiperalgesia.

ABSTRACT

In terms of public health, pain stands out as an important problem, being the main reason for seeking medical consultations in health services. Chronic pain is highly prevalent worldwide, affecting more than a quarter of the population and more than two thirds of the Brazilian population, with women being more widely represented among patients with chronic pain. However, there is a high correlation between chronic pain and psychological and social factors that can, in both sexes, transform acute, punctual pain into chronic pain, persisting even after the injury has healed. Thus, it is relevant to investigate the role of early stress in chronic pain and the influence of sexual differences on these responses. To conduct this investigation, the hyperalgesic priming model was used, and to evaluate responses related to nociception, the Von Frey test and the facial pain scale were used as a parameter for quantifying the affective aspects of pain, and the condition of the hair to evaluate behaviors related to depression. The results obtained indicate that early stress can impair recovery after injury, decreasing thresholds related to paw withdrawal latency in the mechanical hyperalgesia test after plantar incision. In the facial pain scale, it was possible to observe that early stress can increase facial expression scores of pain after plantar incision and after prostaglandin (PGE₂) injection. In the assessment of coat condition, a worsening of coat quality was observed in males, demonstrating that psychosocial stress can induce behaviors related to depressive symptoms. Thus, it can be concluded that early stress can promote sexually diverse changes in pain perception and affective responses related to pain.

Keywords: chronic pain; stress; sexual differences; hyperalgesia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estresse de testemunho de derrota social.....	16
Figura 2 - Análise da condição da pelagem.....	17
Figura 3 – Habituação dos camundongos.....	18
Figura 4 - Teste de Von Frey.....	18
Figura 5 – Microfilamentos de Von Frey.....	19
Figura 6 – Incisão Plantar	19
Figura 7 – Escala facial de dor para camundongos.....	20
Figura 8 – Delineamento Experimental.....	21
Figura 9 - Avaliação da hiperalgesia mecânica	22
Figura 10 - Avaliação da expressão facial de dor.....	23
Figura 11 - Avaliação do estado da pelagem.....	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVO.....	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1	ANIMAIS.....	14
3.2	ESTRESSE DE TESTEMUNHA DE DERROTA SOCIAL (ETDS).....	15
3.3	CONDIÇÃO DA PELAGEM.....	16
3.4	AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA (TESTE DE VON FREY).....	17
3.5	HIPERALGESIA LATENTE - INCISÃO PLANTAR.....	19
3.6	ESCALA FACIAL DE DOR PARA CAMUNDONGOS.....	19
3.7	DELIENAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
3.8	ÉTICA.....	21
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4	RESULTADOS.....	21
4.1	AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA (TESTE DE VON FREY).....	21
4.2	EXPRESSÃO FACIAL DE DOR.....	22
4.3	ESTADO DO PELO.....	23
5	DISCUSSÃO.....	24
6	CONCLUSÃO.....	28
	REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

A dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (Desantana *et al.*, 2020). Em termos de saúde pública, a dor destaca-se como um importante problema, sendo o principal motivo da procura por consultas médicas em serviços de saúde (Solano G. *et al.*, 2022).

A ativação prolongada das vias neurais da dor e o desequilíbrio entre a sinalização somatossensorial excitatória e inibitória nociceptiva, juntamente com a variabilidade na modulação das mensagens de dor no Sistema Nervoso Central (SNC), podem transformar a dor aguda, pontual, em dor crônica, persistindo mesmo após a cura da lesão (Sallum, A. *et al.*, 2011; Colloca *et al.*, 2017). Entretanto, a dor crônica muitas vezes tem a etiologia incerta, o que acarreta o não desaparecimento após o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais (Dellaroza *et al.*, 2007). Nesse sentido, a dor crônica é uma condição que possui alta influência negativa na qualidade de vida dos indivíduos e a ineficácia farmacoterapêutica, gerando a busca pelo desenvolvimento de novos analgésicos (Lemos *et al.*, 2019).

Em nível mundial, os quadros de dor crônica possuem alta prevalência, afetando mais de um quarto da população (Mogil, 2012) e mais de dois terços da população brasileira (Carvalho *et al.*, 2018). Nesse cenário, destaca-se o dimorfismo sexual presente na modulação da dor, sendo as mulheres mais amplamente representadas entre os pacientes com dor crônica (Carvalho *et al.*, 2018; Berkley, 1997). Isso porque algumas síndromes de dor crônica altamente prevalentes que são encontradas em ambos os sexos ocorrem com muito mais frequência em mulheres (Blanton; Barnes; McHann *et al.*, 2021; Freynhagen *et al.*, 2006; Unruh, 1996), como as dores neuropática, pós-operatória e temporomandibular, podendo afetar permanentemente a qualidade de vida (Ostrom *et al.*, 2017; Mogil, 2012).

Evidências clínicas e pré-clínicas demonstram efeitos potentes do estresse no processamento e resposta à dor, sugerindo que a natureza, a duração e a intensidade do estressor são determinantes fundamentais como o fenômeno de hiperalgesia induzida por estresse (Jennings *et al.*, 2014). Dessa forma, experiências aversivas no início da vida, principalmente em relação ao ambiente, como o estresse social causados por negligência na criação, abuso físico, sexual ou psicológico, conflitos interpessoais, derrota devido desgosto e a morte de parentes podem ser

estressores psicológicos e sociais e afetar o desenvolvimento do cérebro contribuindo para o desenvolvimento da dor crônica (Green; Alvarez; Levine, 2021). Além disso, a exposição ao estresse repetitivo foi relatada como um fator de risco para a disfunção dos mecanismos reguladores da dor, incluindo a dor crônica (Imbierowicz; Egle, 2003; Jones; Power; Macfarlane, 2009).

Neste sentido, a exposição crônica à estressores físicos ou psicológicos, aqueles relacionados ao comprometimento da integridade física do indivíduo e aqueles que podem dar origem a efeitos psicológicos ou emocionais sob forma de sintomas, respectivamente, é capaz de desencadear a hiperalgesia induzida pelo estresse tanto em humanos como em roedores (Gibbons *et al.*, 2012; Dina *et al.*, 2011; Le Roy *et al.*, 2011). Por exemplo, há evidências de que o estresse social e a dor compartilham vias neurais que se sobrepõe, o que sugere que o sistema de detecção de dor pode ter sido adaptado para identificar e reagir à ameaças sociais (Karos *et al.*, 2018). No entanto, o modelo animal de Estresse de Testemunho de Derrota Social (Social Defeat Stress Witness, em inglês) é considerado um modelo de estresse psicossocial porque envolve a exposição de um indivíduo a situações sociais estressantes de forma indireta, por meio da observação de conflitos ou agressões entre outros indivíduos. Assim, este modelo é utilizado em estudos com animais, especialmente roedores, para investigar os efeitos do estresse sobre o cérebro, o comportamento e a fisiologia. Os indivíduos submetidos ao Estresse de Testemunho de Derrota Social (ETDS) não sofrem agressão física direta, mas vivenciam o evento ao observar a derrota social de outro indivíduo, o que reproduz o estresse psicológico causado por presenciar eventos traumáticos na vida real (Nollet, *et al.*, 2021). Dessa forma, a exposição ao ETDS afeta comportamentos sociais, emocionais e funções fisiológicas, como alterações nos níveis de hormônios do estresse (cortisol em humanos e corticosterona em roedores), também podendo induzir comportamentos de depressão e retraimento social (Gibbons *et al.*, 2012; Dina *et al.*, 2011; Le Roy *et al.*, 2011).

Em relação às diversas causas de dores crônicas na população, como nos casos resultantes de procedimentos cirúrgicos (Joshi; Ogunnaike, 2005), esses estão associados à processos neuroplásticos no SNC (May, 2008). Neste sentido, o modelo animal de hiperalgesia latente, do inglês *hyperalgesic priming*, distingue as fases aguda e crônica da dor (Reichling; Levine, 2009) e assim possibilita intervenções moleculares e farmacológicas específicas para entender os mecanismos envolvidos

na persistência da dor. Em suma, o modelo envolve a aplicação de um estímulo nociceptivo primário, como a incisão plantar, que sensibiliza os nociceptores periféricos e o SNC. Após a supressão dessa sensibilização inicial, um segundo estímulo (por exemplo, injeção plantar de prostaglandina, PGE2) resulta em um estado prolongado de hiperalgesia (Burton *et al.*, 2017; Reichling; Levine, 2009; Price; Ray, 2019).

Embora na literatura já se encontrem achados demonstrando relações diretas entre o estresse no início da vida e o surgimento de dor crônica em humanos e em animais (Jennings *et al.*, 2014; Amini-Khoei *et al.*, 2017; Nishinaka *et al.*, 2015; Niwa *et al.*, 2011), ainda não é claro de que forma esse fator interage com as diferenças sexuais na modulação da dor. Diante disso, o presente estudo torna-se importante pela busca da compreensão dos mecanismos de interação destes fatores, por meio de investigações relacionadas às alterações comportamentais sobre as respostas perceptivas discriminativas e dos componentes afetivos-emocionais da dor em camundongos de diferentes sexos submetidos previamente ao estresse de testemunho de derrota social e posteriormente submetidos ao modelo de hiperalgesia latente.

Diante disso, a hipótese deste estudo é de que o estresse precoce de testemunho de derrota social em camundongos fêmeas resultará em hiperalgesia exacerbada após a submissão ao protocolo de hiperalgesia latente quando comparadas aos machos.

2 OBJETIVO

Investigar as possíveis alterações nas respostas dolorosas de camundongos machos e fêmeas submetidos precocemente ao estresse de testemunho de derrota social (ETDS).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 24 camundongos machos familiares e não agressores para o protocolo de Testemunho de Interação não Agressiva (TINA) e 12

camundongos como intrusos no protocolo de Estresse de Testemunho de Derrota Social (ETDS) de aproximadamente 30 dias pós-natal (DPN), junto com 64 camundongos como residentes no protocolo de Estresse de Testemunho de Derrota Social (ETDS) - que são animais já mantidos no laboratório de experimentos anteriores de outros alunos, com aproximadamente 60 DPN -, 12 camundongos machos como Testemunhas de Estresse de Derrota Social (ETDS) de aproximadamente 28 DPN, 12 camundongos fêmeas como Testemunhas de Estresse de Derrota Social (ETDS) de aproximadamente 28 DPN, 12 camundongos machos como Testemunhas da Interação não Agressiva (TINA) de aproximadamente 28 DPN e 12 camundongos fêmeas como Testemunhas da Interação não Agressiva (TINA) de aproximadamente 28 DPN, resultando em, ao todo, 148 camundongos heterogênicos machos e fêmeas da linhagem *Swiss-Webster*. Os animais provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA) do Instituto de Biotecnologia da UNESP (IBTEC) de Botucatu, foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAr-UNESP) em caixas coletivas (3 animais por caixa), com condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (ciclo claro-escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00), com intensidade luminosa de aproximadamente 100 Lux e livre acesso ao alimento e água.

3.2 ESTRESSE DE TESTEMUNHA DE DERROTA SOCIAL (ETDS)

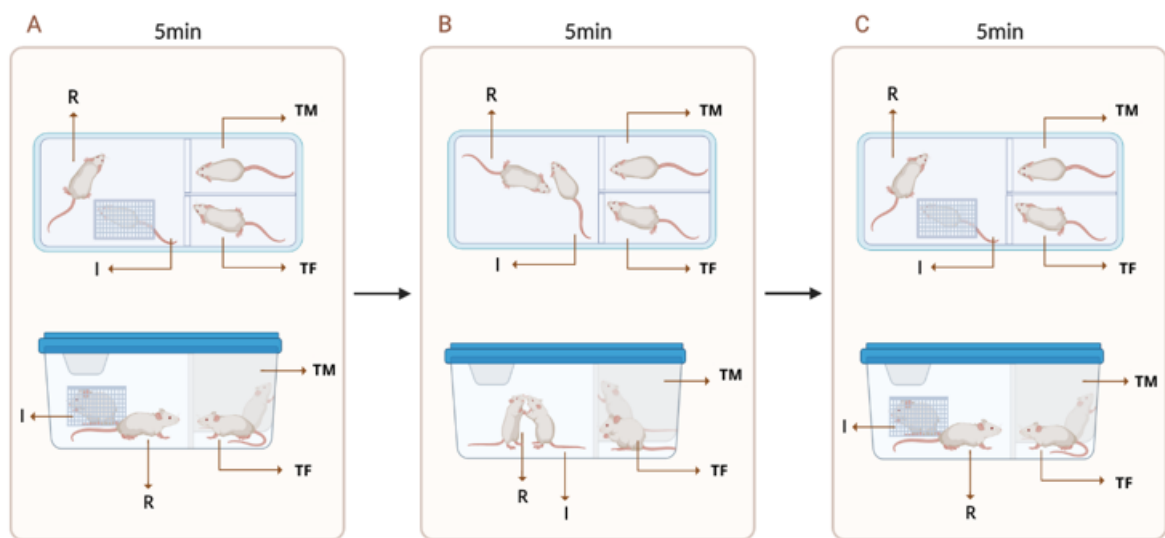
Foi utilizado modelo intruso-residente semelhante aos de Golden *et al.* (2011) e Sial *et al.* (2016), permitindo a exposição simultânea de duas testemunhas ao estímulo agressor. Dessa forma, o animal intruso (camundongo macho com 60 DPN) foi colocado em uma gaiola individual (10,5 × 8 × 20,7 cm), que contém perfurações e exposto à caixa-moradia (31,6 × 21,5 × 20,7 cm) de um coespecífico agressivo não familiar, denominado residente, e submetido a ataques de derrota social, enquanto animais experimentais (machos e fêmeas com 28 DPN), denominados testemunhas, assistiram o encontro agonístico entre os machos, através de uma gaiola protetora de acrílico (8 × 8,5 cm) no interior da caixa do residente a fim de testemunharem a agressão ao intruso e sua consequente submissão.

O episódio de estresse de derrota social teve duração de 15 minutos, divididos em três fases de 5 minutos cada: inicialmente tanto o intruso quanto as testemunhas foram colocados em suas respectivas gaiolas protetoras e inseridos na

caixa-moradia do residente (Figura 1A). Na sequência, o intruso foi retirado da gaiola protetora e exposto aos ataques do residente, enquanto o episódio foi assistido pelas testemunhas (Figura 1B). Na terceira fase, o intruso foi então colocado de volta na gaiola protetora (Figura 1C). As testemunhas permaneceram o episódio somente mantendo interações auditivas, visuais e olfativas com os animais intrusos e residentes e sem contato visual entre elas. Ao final, o intruso e as testemunhas retornaram às suas caixas-moradia (28,5 x 17,5 x 12 cm).

Os episódios ocorreram por 10 dias, sendo um por dia. O grupo controle consistiu em animais que passaram pela interação não-agressiva (INA), isto é, o intruso foi exposto a um camundongo não agressor e familiar, e foi observado por outras duas testemunhas (TINA) (machos e fêmeas com 28 DPN).

Figura 1 – Representação esquemática de uma sessão de estresse de testemunho de derrota social vista de cima e de frente



Legenda: A) Camundongo intruso confinado na gaiola protetora. B) Período de confrontação com o residente. C) Período pós-derrota, onde o camundongo intruso retorna para a gaiola protetora. R, residente; I, intruso; TM, testemunha macho; TF, testemunha fêmea.

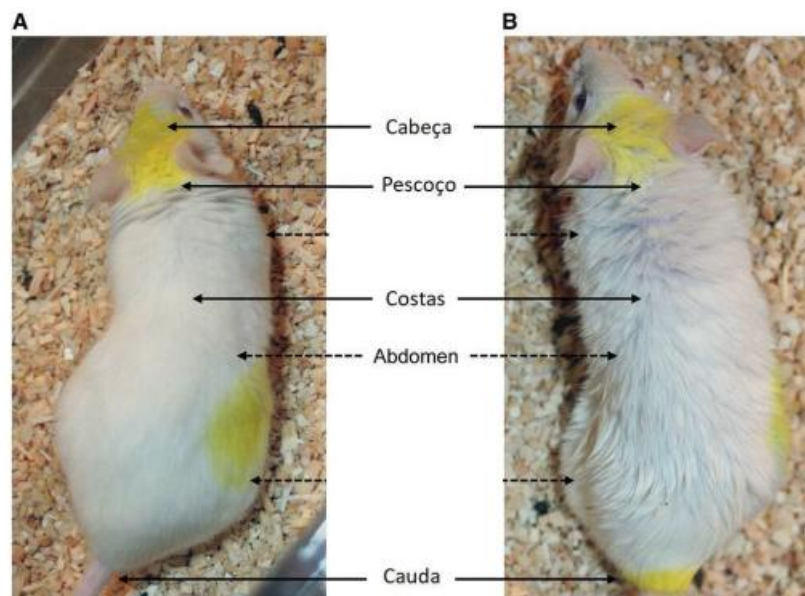
Fonte: Banco de representações esquemáticas do Laboratório de Farmacologia (2024)

3.3 CONDIÇÃO DA PELAGEM

Assim como descrito por Nollet e colaboradores (2021), foi avaliado a condição da pelagem dos animais que passaram pelo processo de testemunha de derrota social. Isto porque, em roedores, a má condição da pelagem é relacionada a um estado de apatia e é definida como um déficit em comportamentos orientados a

objetivos, de tal forma que foi atribuído à qualidade do pelo um valor numérico entre 0 e 1, considerado então como 0, pelagem em boas condições; 0,5, pelagem moderadamente em más condições e 1, pelagem em más condições. Ao final, foi feita a soma de cada área do corpo do animal, incluindo a cabeça, pescoço, dorso, abdômen, patas dianteiras, patas traseiras e começo da cauda, sendo 7 a pontuação máxima (Figura 2).

Figura 2 – Análise da condição da pelagem



Fonte: Nollet *et al*, (2021)

3.4 AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA (TESTE DE VON FREY)

Os animais foram confinados em caixas de acrílico (12 x 20 x 17 cm) que permitiam acesso às suas patas para habituação por 30 minutos (Figura 3) e submetidos, posteriormente, a aplicações de microfilamentos de Von Frey de forças variáveis em ordem crescente (Figura 5) na superfície plantar de sua pata direita traseira, de forma a causar uma leve curvatura (Figura 4). Dessa forma, quando o animal apresentou comportamento nocifensivo, como a retirada brusca da pata e agitação da mesma após a retirada do microfilamento, foi considerada resposta positiva para o teste (DEUIS *et al.*, 2017). Para a análise dos resultados, é utilizado o cálculo estabelecido por Chaplan e seus colaboradores (1994), que converte os registros obtidos para o limiar de retirada da pata em gramas. Assim quanto menor o limiar de retirada da pata, mais sensível está o animal.

Figura 3 – Habituação dos camundongos



Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Farmacologia (2024)

Figura 4 - Teste de Von Frey, aplicação do microfilamento na pata onde foi feito a incisão plantar



Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Farmacologia (2024)

Figura 5 – Microfilamentos de Von Frey



Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Farmacologia (2024)

3.5 HIPERALGESIA LATENTE - INCISÃO PLANTAR

Os animais foram submetidos a anestesia com Isoflurano a 1% e em seguida ao procedimento de incisão plantar de aproximadamente 11 mm na pata direita traseira (Figura 6). Os animais passaram por um período de recuperação e 24 horas após a incisão os limiares de retirada da pata no Teste de Von Frey e a avaliação da escala facial de dor foram mensurados. Após 14 dias, em que os animais passaram por um período de recuperação enquanto seus limiares de retirada da pata no teste Von Frey e a avaliação da escala facial de dor foram mensurados com retorno para os níveis basais confirmado, eles receberam injeção de prostaglandina (PGE₂) (100 mg/25 µL) no mesmo local da incisão, para o desencadeamento do processo de dor crônica.

Figura 6 – Incisão Plantar na pata direita traseira



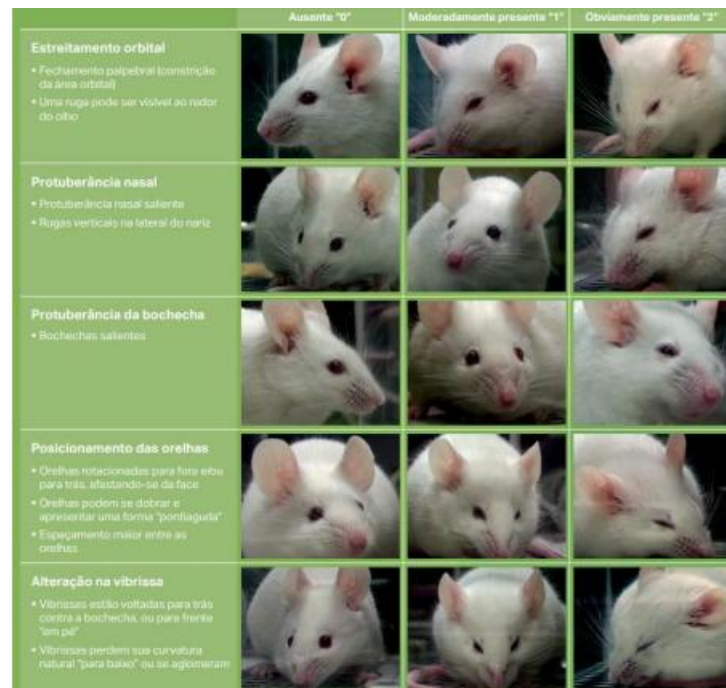
Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Farmacologia (2024)

3.6 ESCALA FACIAL DE DOR PARA CAMUNDONGOS

Juntamente com o teste de Von Frey, foi realizada a avaliação da escala facial de dor, desenvolvida por Langford e colaboradores (2010) para a quantificação dos aspectos afetivos de dor. Neste sentido, foram avaliados aspectos como a posição

das orelhas do animal, contração da musculatura dos olhos, do focinho e das bochechas e a posição das vibrissas. Após a análise desses aspectos os animais foram classificados em (0) dor não presente/não visível; (1) dor moderada; (2) dor severa. Os resultados foram apresentados como a média de cada um dos escores designado aos sujeitos experimentais. A escala está representada na Figura 7.

Figura 7 – Escala facial de dor para camundongos



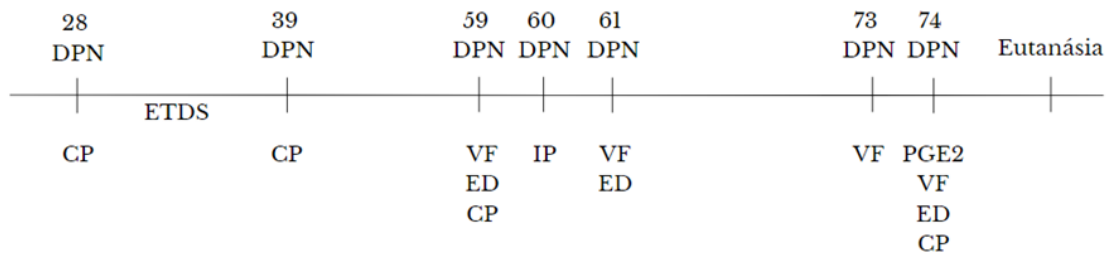
Fonte: National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research (2015)

3.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Conforme representado na Figura 8, o protocolo de ETDS, que teve 10 dias de duração, teve início no 28º DPN, o que seria equivalente à adolescência nos humanos (Laviola *et al.*, 2003). Passado este período, os animais foram mantidos em suas gaiolas, sendo monitorados diariamente. No 39º DPN, os sujeitos passaram pelo processo de avaliação da condição da pelagem. No DPN 59, os sujeitos foram avaliados nos testes de Von Frey e de Escala Facial de Dor para os registros de medidas basais, junto com a avaliação de condição da pelagem. No DPN 60, equivalente à fase adulta (Laviola *et al.*, 2003), as testemunhas foram submetidas à cirurgia de incisão plantar. Vinte e quatro horas após a incisão os animais foram submetidos novamente aos testes para avaliação da dor (Von frey e escala facial de

dor). Quatorze dias após a incisão, os animais receberam as injeções de PGE2 na mesma pata da incisão e foram submetidos aos testes para avaliação da dor. Após este período, os animais foram eutanasiados.

Figura 8 – Delineamento Experimental



Legenda: DPN, dias pós-natal; CP, condição da pelagem; VF, Von Frey; ED, escala facial de dor; IP, incisão plantar; PGE2, injeção plantar de prostaglandina.

Fonte: Autoria própria (2024)

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através da ANOVA de três vias para medidas repetidas (fator 1: condição; fator 2: sexo; fator 3: dia). Nos casos de significância, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

3.9 ÉTICA

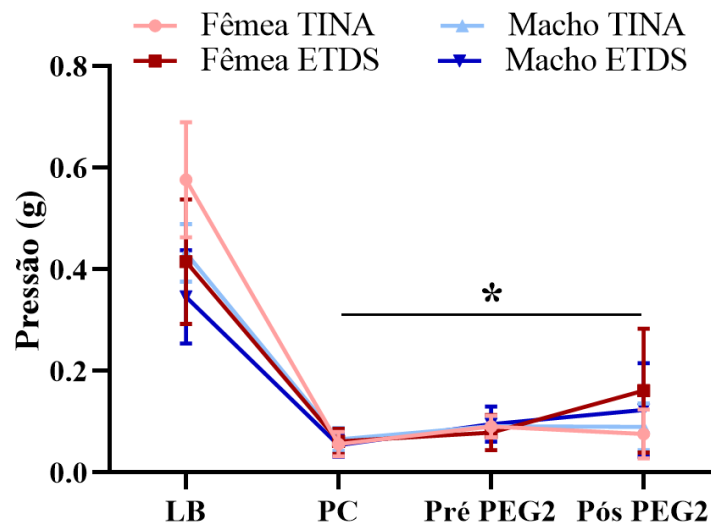
Todos os procedimentos e o protocolo experimental foram submetidos ao Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da FCFAr-UNESP, e conduzido seguindo os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 14/2023

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA (TESTE DE VON FREY)

A ANOVA multifatorial para medidas repetidas na análise do teste do Von Frey indicou diferença significativa apenas entre os dias [$F_{3(3,132)} = 29,80$, $p < 0,001$], sem interação entre os fatores [$F_{1 \times F_2 \times F_3(3,132)} = 0,18$, $p = 0,91$]. A análise post hoc revelou que independente do grupo, os animais apresentaram hiperalgesia mecânica em relação à linha de base (LB) a partir da pós-cirurgia (PC, $p < 0,05$) (Figura 9).

Figura 9 - Avaliação da hiperalgesia mecânica avaliada no Von Frey expressa pela pressão necessária para retirada da pata em camundongos fêmeas e machos.



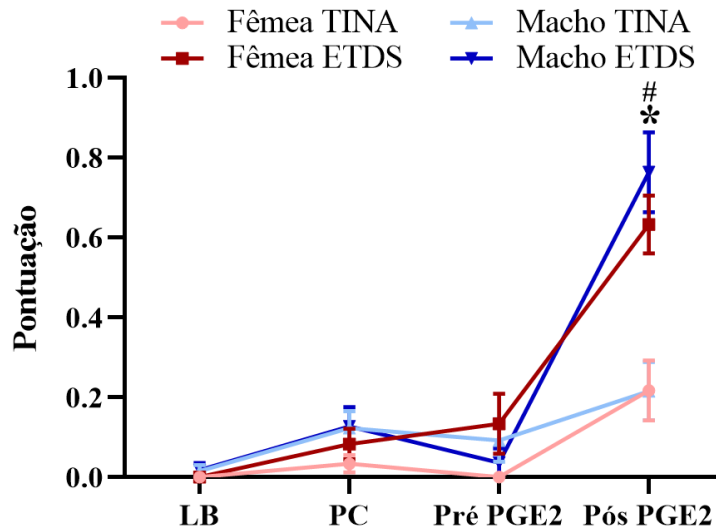
Legenda: * $p \leq 0,05$ em relação à LB. TINA, testemunho da interação não agressiva; ETDS, estresse de testemunho da derrota social; LB, linha basal; PC, pós cirurgia; Pré PGE2, pré injeção de prostaglandina 2; Pós PGE2, pós injeção de prostaglandina 2.

Fonte: Autoria própria (2024)

4.2 EXPRESSÃO FACIAL DE DOR

Na avaliação da escala facial de dor (Figura 10), a ANOVA multifatorial para medidas repetidas indicou diferença significativa para os fatores condição [$F_{2(1,44)} = 43,20$, $p < 0,001$], dia [$F_{3(3,132)} = 54,38$, $p < 0,001$], e interação entre condição e dia [$F_{2 \times F_3(3,132)} = 16,44$, $p < 0,001$]. A análise post hoc revelou que independente do sexo, houve piora na expressão do componente emocional da dor após a cronificação da dor (pós PGE2) nos animais que testemunharam a derrota social.

Figura 10 - Avaliação da expressão facial de dor expressa pela média de escores dado a cada região facial em camundongos fêmeas e machos.



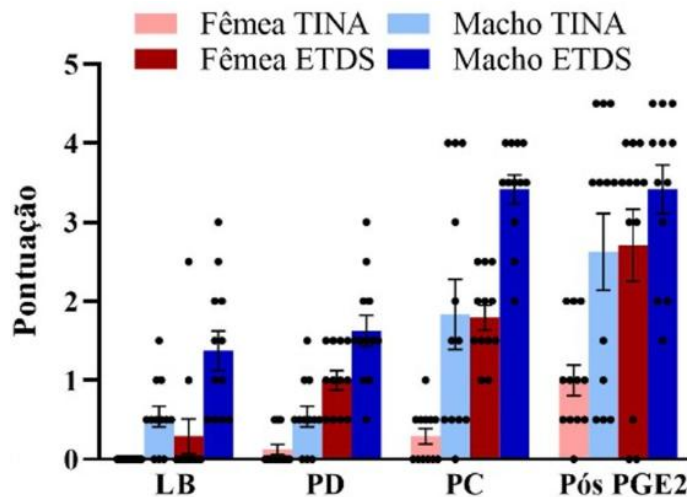
Legenda: * $p \leq 0,05$ em relação à LB. # $p \leq 0,05$ para machos vs fêmeas. TINA, testemunho da interação não agressiva; ETDS, estresse de testemunho da derrota social; LB, linha basal; PC, pós cirurgia; Pré PGE2, pré injeção de prostaglandina 2; Pós PGE2, pós injeção de prostaglandina 2.

Fonte: Autoria própria (2024)

4.3 ESTADO DO PELO

Com relação ao estado da pelagem (Figura 11), a ANOVA multifatorial para medidas repetidas indicou diferença significativa para os três fatores [$F_{1(1,44)} = 38,70$, $p < 0,001$; $F_{2(1,44)} = 43,57$, $p < 0,001$; $F_{3(3,132)} = 60,95$, $p < 0,001$], interação entre os fatores sexo e dia [$F_{1 \times F_{3(3,132)}} = 4,15$, $p < 0,008$] e condição e dia [$F_{2 \times F_{3(3,132)}} = 3,42$, $p < 0,02$], mas sem interação entre os fatores [$F_{1 \times F_{2 \times F_{3(3,132)}}} = 1,95$, $p = 0,13$].

Figura 11 - Avaliação do estado da pelagem em camundongos fêmeas e machos



Legenda: TINA, testemunho da interação não agressiva; ETDS, estresse de testemunho da derrota social; LB, linha basal; PD, pós derrota; PC, pós cirurgia; Pré PGE2, pré injeção de prostaglandina 2; Pós PGE2, pós injeção de prostaglandina 2.

Fonte: Autoria própria (2024)

5 DISCUSSÃO

Os dados descritos neste estudo demonstraram que o modelo de hiperalgesia latente promoveu aumento de hipersensibilidade mecânica, através da incisão plantar, independente do grupo experimental e do sexo dos animais. Foi observado também que a injeção de prostaglandina (PGE2) desencadeou o processo de dor crônica, como já demonstrado na literatura (Asiedu *et al.*, 2011; Reichling; Levine, 2009). Além disso, também foi possível observar os efeitos da incisão plantar nos grupos experimentais, para a expressão facial em que os animais que passaram pelo procedimento de estresse de testemunho de derrota social, modelo utilizado para induzir o estresse psicossocial precoce, tiveram um aumento do escore após a injeção de prostaglandina, demonstrando a presença de respostas afetivas associadas à condição dolorosa.

Embora não tenha sido observado diferença significativa entre os grupos para a hiperalgesia mecânica no momento da indução do quadro álgico (pós-incisão) e na manutenção (pós-PGE2), nos dados obtidos no Von Frey foi possível observar que a incisão plantar promoveu hiperalgesia mecânica em todos os grupos, causando certo prejuízo na recuperação da lesão a ponto de não haver retorno dos seus limiares para a condição basal.

Além disso, após a injeção de PGE2 não se observou diferença entre os grupos, embora fosse esperado que animais do grupo experimental que passaram pelo procedimento de testemunho de derrota social, especialmente as fêmeas, pudessem ter sua resposta à dor acentuada, conforme relatado em estudos prévios (Lemos *et al.*, 2019; Mogil, 2012; Berkley, 1997; Unruh, 1996; Ostrom *et al.*, 2017). Contudo, o mediador inflamatório (PGE2) desencadeou um processo hiperálgico crônico em todos os animais, o que já era esperado, de acordo com a literatura (Kandasamy; Price, 2015).

No entanto, os resultados mostraram que o estresse psicossocial precoce afetou as respostas relacionadas à dor, após a incisão plantar, induzindo hiperalgesia

mecânica persistente (Pagliusi *et al.*, 2018). Embora a questão da causalidade permaneça sem resposta, levantamos a hipótese de que o estresse de testemunha de derrota social e a injeção de PGE2 estariam gerando neuroplasticidade em áreas cerebrais específicas da dor crônica e, como consequência, predispondo à cronificação da dor. Corroborando essa ideia, Norman, Karelina e Zhang (2010) mostraram que 2 semanas de estresse crônico por contenção antes da lesão do nervo poupado exacerbaram a hiperalgesia mecânica (Norman *et al.*, 2010).

Considerando os resultados, vale mencionar um possível efeito de *priming* no nociceptor induzido por estresse crônico. É bem conhecido que o estresse crônico, incluindo o estresse de derrota social, resulta em ativação crônica do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que, por sua vez, induz um aumento de citocinas inflamatórias circulantes (Tian *et al.*, 2014; Nasef *et al.*, 2017). Esse ambiente inflamatório induzido pelo estresse crônico pode alternar o nociceptor, tornando-o mais suscetível à PGE2 em um processo chamado *priming* hiperalgésico (Reichling; Levine, 2009). Nesse contexto, um estudo desenvolvido por Aghajani e colaboradores (2012) mostrou que o estresse social crônico foi capaz de retardar a recuperação do limiar nociceptivo após um modelo de dor pós-operatória em camundongos, indicando que citocinas inflamatórias locais, juntamente com citocinas liberadas pelo estresse, estariam desencadeando a hiperresponsividade do nociceptor (Aghajani *et al.*, 2012).

A hiperalgesia é uma resposta aumentada a um estímulo doloroso (Meeker *et al.*, 2021). Dessa forma altera a maneira como o corpo gera e processa sinais de dor, como um limiar de dor mais baixo e maior sensibilidade à dor. A dor é resposta fisiológica a um estímulo e é importante para o funcionamento do corpo. Sem a capacidade de sentir dor, as pessoas não teriam como saber quando agir para se protegerem das lesões (Cleveland Clinic, 2022). Em humanos a intensidade da dor pode ser verbalizada. No caso de camundongos, para se avaliar a nocicepção, uma das formas é a utilização de microfilamentos de von Frey, que possuem uma força calibrada na qual é aplicada a uma parte do corpo do animal, nesse caso a pata direita traseira (mesma em que foi realizada a incisão), e assim avaliar a sensibilidade nociceptiva mecânica (McMackin *et al.*, 2016).

Para os dados da expressão facial de dor, os resultados obtidos demonstraram que após a aplicação da prostaglandina (PGE2) houve o aumento na expressão facial em todos os grupos, porém, mais exacerbada nos grupos que foram submetidos ao estresse de testemunho de derrota social, não diferindo entre os sexos,

o que indica que este modelo de dor é capaz de induzir alterações nas respostas afetivas, e não apenas sensoriais em camundongos, tal qual descrito em outros estudos (Baptista-de-Souza *et al.*, 2020; Tillu *et al.*, 2015), assim como outros modelos de dor, como por exemplo a constrição do nervo ciático (Tavares *et al.*, 2023). Além disso, é indicado também por esses resultados que o estresse psicossocial prejudica o processo de recuperação após uma lesão, deixando-a com hipersensibilidade mecânica e aumento na expressão facial.

Para o estado da pelagem foi observado resultado em que os grupos que passaram pelo procedimento de estresse psicossocial precoce apresentaram aumento de escore no decorrer do delineamento experimental, quando comparados ao grupo controle, mais especialmente os animais machos apresentaram uma piora na qualidade do pelo após a derrota social e cronificação da dor, caracterizando assim o dimorfismo sexual como relevante sobre as respostas emocionais.

Em síntese, os resultados obtidos neste trabalho corroboram as evidências clínicas que indicam a associação entre quadros de dor crônica e o desenvolvimento de distúrbios afetivos (Gonçalves *et al.*, 2008). Além disso, reforçam a hipótese de que o estresse precoce desempenha um papel significativo no agravamento e intensificação da dor crônica (Jennings *et al.*, 2014; Amini-Khoei *et al.*, 2017), uma vez que os achados do presente estudo revelaram que os animais submetidos ao procedimento de testemunho de derrota social apresentaram uma persistência da hipersensibilidade mecânica e comprometimento no processo de recuperação da lesão.

Por fim, cabe destacar que não foi observada presença significativa do dimorfismo sexual no que tange ao prejuízo na recuperação da lesão aguda e à intensificação das respostas afetivas à dor. Entretanto, no que se refere a comportamentos associados a sintomas depressivos, os machos demonstraram maior suscetibilidade, respondendo de maneira mais acentuada a esses aspectos. Embora o presente estudo não tenha investigado mecanismos por trás da causalidade entre a dor e comportamentos do tipo depressivo, é plausível considerar que o estresse de testemunho de derrota social estaria estimulando a neuroplasticidade em áreas cerebrais específicas provavelmente compartilhadas pela dor crônica e depressão e, como consequência, predispondo tanto à cronificação da dor quanto ao comportamento do tipo depressivo, como descrito em outros estudos (Suarezroca *et al.*, 2006; Rivat *et al.*, 2007; Conti *et al.*, 2002; Pollak *et al.*, 2010).

Dessa forma, houve avanço na compreensão das interrelações entre estresse social e cronificação da dor, mostrando que o estresse precoce pode ser caracterizado como um fator estressor relevante, influenciando tanto as respostas emocionais quanto os mecanismos de dor crônica em camundongos.

6 CONCLUSÃO

Este estudo visa contribuir para que novas abordagens possam ser desenvolvidas para o tratamento de pessoas com dor crônica, destacando a necessidade de se considerar fatores como a influência social, o estresse psicossocial e o sexo como variáveis determinantes para o sucesso terapêutico. Além disso, também ressalta a importância do bem-estar animal em protocolos experimentais em que são investigadas respostas nociceptivas e comportamentais em roedores.

Com base nos resultados, conclui-se que experiências aversivas no início da vida afetaram de maneira distinta as respostas sensoriais e afetivo-emocionais em camundongos submetidos ao protocolo de cronificação da dor. Enquanto a exposição ao TINA ou ETDS durante a adolescência torna camundongos mais vulneráveis ao processo de cronificação da dor avaliada no modelo de hiperalgesia latente, os resultados ainda indicam que o ETDS promove exacerbação da expressão facial de dor e piora na qualidade do pelo, um indicativo de sintomas associados à depressão.

REFERÊNCIAS

- AGHAJANI, M. *et al.* The Effect of Social Stress on Chronic Pain Perception in Female and Male Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47218, 17 out. 2012.
- AMINI-KHOEI, H. *et al.* Experiencing neonatal maternal separation increased pain sensitivity in adult male mice: Involvement of oxytocinergic system. **Neuropeptides**, v. 61, p. 77–85, fev. 2017.
- ASIEDU, M. N.; TILLU, D. V.; MELEMEDJIAN, O. K.; SHY, A.; SANOJA, R.; BODELL, B.; GHOSH, S.; PORRECA, F.; PRICE, T. J. Spinal Protein Kinase M Underlies the Maintenance Mechanism of Persistent Nociceptive Sensitization. **Journal of Neuroscience**, vol. 31, no. 18, 4 May 2011. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6286-10.2011>.
- BAPTISTA-DE-SOUZA, D., TAVARES-FERREIRA, D., MEGAT, S., SANKARANARAYANAN, I., SHIERS, S., FLORES, C. M., GHOSH, S., LUIZ NUNES-DE-SOUZA, R., CANTO-DE-SOUZA, A., PRICE, T. J. Sex differences in the role of atypical PKC within the basolateral nucleus of the amygdala in a mouse hyperalgesic priming model. **Neurobiology of Pain**, v. 8, p. 100049, 2020. DOI: 10.1016/j.ynpai.2020.100049.
- BERKLEY, K. J. Sex differences in pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 20, n. 3, p. 371–380, set. 1997.
- BLANTON, H. L., BARNES, R. C., MCHANN, M. C.; *et al.* Sex differences and the endocannabinoid system in pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 202, p. 173107, Mar. 2021.
- BURTON, M. D.; TILLU, D. V.; MAZHAR, K.; MEJIA, G. L.; ASIEDU, M. N.; INYANG, K.; HUGHES, T.; LIAN, B.; DUSSOR, G.; PRICE, T. J. Pharmacological activation of AMPK inhibits incision-evoked mechanical hypersensitivity and the development of hyperalgesic priming in mice. **Neuroscience**, vol. 359, p. 119–129, Sep. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.020>.
- CARVALHO, R. C. de; MAGLIONI, C. B.; MACHADO, G. B.; ARAÚJO, J. E. de; SILVA, J. R. T. da; SILVA, M. L. da. Prevalência e características da dor crônica no Brasil: um estudo nacional baseado na Internet. **Brazilian Journal of Pain**, v. 1, n. 4, p. 331–333, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20180063>.
- CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55-63, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).

- CLEVELAND CLINIC. **Hyperalgesia**. 2022. Disponível em: <https://my.clevelandclinic.org/health/symptoms/23550-hyperalgesia>. Acesso em: 25 set. 2023.
- COLLOCA, L. *et al.* Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, 16 fev. 2017.
- CONTI, A. C. *et al.* cAMP Response Element-Binding Protein Is Essential for the Upregulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcription, But Not the Behavioral or Endocrine Responses to Antidepressant Drugs. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3262–3268, 15 abr. 2002.
- DELLAROZA, M. S. G.; FURUYA, R. K.; CABRERA, M. A. S.; MATSUO, T.; TRELHA, C.; YAMADA, K. N. Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos utilizados por idosos da comunidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 36–41, jan. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-4230200800010001>.
- DESANTANA, J. M. *et al.* Definition of pain revised after four decades. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 3, n. 3, 2020.
- DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 284, 2017. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00284.
- DINA, O. A.; LEVINEL, J. D.; GREENL, P. G. Enhanced cytokine-induced mechanical hyperalgesia in skeletal muscle produced by a novel mechanism in rats exposed to unpredictable sound stress. **European Journal of Pain**, v. 15, n. 8, p. 796–800, set. 2011.
- FREYNHAGEN, R. *et al.* Screening of neuropathic pain components in patients with chronic back pain associated with nerve root compression: a prospective observational pilot study (MIPOPT). **Current Medical Research and Opinion**, v. 22, n. 3, p. 529–537, fev. 2006.
- GIBBONS, C. H. *et al.* Experimental hypoglycemia is a human model of stress-induced hyperalgesia. **Pain**, v. 153, n. 11, p. 2204–2209, nov. 2012.
- GOLDEN, S. A. *et al.* A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. **Nature Protocols**, v. 6, n. 8, p. 1183–1191, 2011.
- GONÇALVES, L.; SILVA, R.; PINTO-RIBEIRO, F.; PÊGO, J. M.; BESSA, J. M.; PERTOVAARA, A.; SOUSA, N.; ALMEIDA, A. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. **Experimental Neurology**, v. 213, n. 1, set. 2008, p. 48-56. DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.04.043.
- GREEN, P. G.; ALVAREZ, P.; LEVINE, J. D. Sexual dimorphic role of the glucocorticoid receptor in chronic muscle pain produced by early-life stress. **Molecular Pain**, v. 17, p. 174480692110113, jan. 2021.

IMBIEROWICZ, K.; EGGLE, U. T. Childhood adversities in patients with fibromyalgia and somatoform pain disorder. **European Journal of Pain**, v. 7, n. 2, p. 113–119, abr. 2003.

JENNINGS, E. M. *et al.* Stress-induced hyperalgesia. **Progress in neurobiology**, v. 121, p. 1–18, 2014.

JONES, G. T.; POWER, C.; MACFARLANE, G. J. Adverse events in childhood and chronic widespread pain in adult life: Results from the 1958 British Birth Cohort Study. **Pain**, v. 143, n. 1, p. 92–96, maio 2009.

JOSHI GP, OGUNNAIKE BO. Consequences of inadequate postoperative pain relief and chronic persistent postoperative pain. **Anesthesiol Clin North Am.** 2005 Mar;23(1):21-36. doi: 10.1016/j.atc.2004.11.013. PMID: 15763409.

KANDASAMY, R.; PRICE, T. J. The pharmacology of nociceptor priming. In: SCHAIBLE, H. G. (ed.). **Pain Control**. Handbook of Experimental Pharmacology, v. 227. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015. DOI: 10.1007/978-3-662-46450-2_2.

KAROS K.; *et al.* Pain as a threat to the social self: a motivational account. **Pain**. v.159, n.9, p.1690-1695, 2018.

LANGFORD D.J.; BAILEY A.L.; CHANDA M.L.; *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447-449, 2010.

LAVIOLA, G., MACRÌ, S., MORLEY-FLETCHER, S., ADRIANI, W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence.

Neuroscience & Biobehavioral Reviews, Volume 27, Issues 1–2, Pages 19-31, ISSN 0149-7634, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00006-X).

LE ROY, C. *et al.* Endogenous Opioids Released During Non-Nociceptive Environmental Stress Induce Latent Pain Sensitization Via a NMDA-Dependent Process. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 10, p. 1069–1079, out. 2011.

LEMOS, B. DE O. *et al.* The impact of chronic pain on functionality and quality of life of the elderly. **Brazilian Journal Of Pain**, v. 2, n. 3, 2019.

MAY, A. Chronic pain may change the structure of the brain. **Pain**, vol. 137, no. 1, p. 7–15, Jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.02.034>.

MCMACKIN, M. Z.; LEWIN, M. R.; TABUENA, D. R.; ARREOLA, F. E.; MOFFATT, C.; FUSE, M. Use of von Frey filaments to assess nociceptive sensitization in the hornworm, *Manduca sexta*. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 257, p. 139-146, 15 jan. 2016. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.09.015.

MEEKER, T. J.; SCHMID, A. C.; LIU, Y.; KEASER, M. L.; DORSEY, S. G.; SEMINOWICZ, D. A.; GREENSPAN, J. D. During capsaicin-induced central sensitization, brush allodynia is associated with baseline warmth sensitivity, whereas mechanical hyperalgesia is associated

with painful mechanical sensibility, anxiety and somatization. **European Journal of Pain**, v. 25, n. 9, p. 1971-1993, out. 2021. DOI: 10.1002/ejp.1815.

MOGIL, J. S. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 859–866, 20 nov. 2012.

NATIONAL CENTRE FOR THE REPLACEMENT REFINEMENT & REDUCTION OF ANIMALS IN RESEARCH. **Grimace scale**: mouse. 2015. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales/grimace-scale-mouse>. Acesso em: 20 ago. 2023.

NASEF, N. A.; MEHTA, S.; FERGUSON, L. R. Susceptibility to chronic inflammation: an update. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1131–1141, 1 mar. 2017.

NISHINAKA, T.; NAKAMOTO, K.; TOKUYAMA, S. Enhancement of nerve-injury-induced thermal and mechanical hypersensitivity in adult male and female mice following early life stress. **Life Sciences**, v. 121, p. 28–34, jan. 2015.

NIWA, M. *et al.* Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 04, p. 459–477, 1 maio 2011.

NOLLET, M. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. **Current Protocols**, v. 1, p. e208, 2021. DOI: 10.1002/cpz1.208.

NORMAN, G. J. *et al.* Social Interaction Prevents the Development of Depressive-Like Behavior Post Nerve Injury in Mice: A Potential Role for Oxytocin. **Psychosomatic Medicine**, v. 72, n. 6, p. 519–526, 1 jul. 2010.

OSTROM, C.; BAIR, E.; MAIXNER, W.; DUBNER, R.; FILLINGIM, R. B.; OHRBACH, R.; SLADE, G. D.; GREENSPAN, J. D. Demographic Predictors of Pain Sensitivity: Results From the OPPERA Study. **The Journal of Pain**, vol. 18, no. 3, p. 295–307, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2016.10.018>.

PAGLIUSI JR, M. O. F. *et al.* Social defeat stress induces hyperalgesia and increases truncated BDNF isoforms in the nucleus accumbens regardless of the depressive-like behavior induction in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 48, n. 1, p. 1635–1646, 22 jun. 2018

POLLAK, D. D.; REY, C. E.; MONJE, F. J. Rodent models in depression research: Classical strategies and new directions. **Annals of Medicine**, v. 42, n. 4, p. 252–264, jan. 2010.

PRICE, T. J.; RAY, P. R. Recent advances toward understanding the mysteries of the acute to chronic pain transition. **Current Opinion in Physiology**, v. 11, p. 42-50, out. 2019. DOI: 10.1016/j.cophys.2019.05.015.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. **Trends in Neurosciences**, vol. 32, no. 12, p. 611–618, Dec. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.07.007>.

RIVAT, C. *et al.* Non-Nociceptive Environmental Stress Induces Hyperalgesia, Not Analgesia, in Pain and Opioid-Experienced Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 10, p. 2217–2228, 14 fev. 2007.

Sallum, Ana Maria Calil; Garcia, Dayse Maioli; Sanches, Mariana. Dor aguda e crônica: uma revisão narrativa da literatura. *Acta Paul Enferm.*, v. 25, n. edição especial 1, p. 150–154, dezembro de 2012.

SIAL, O. K. *et al.* Vicarious social defeat stress: Bridging the gap between physical and emotional stress. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 258, p. 94–103, 30 jan. 2016.

SOLANO GUILLÉN, M. J.; VILLALOBOS ZÚÑIGA, G. Principios básicos del abordaje del dolor. **Revista Ciencia y Salud Integrando Conocimientos**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. Pág. 57–62, 2022.

SUAREZROCA, H. *et al.* Role of μ -opioid and NMDA receptors in the development and maintenance of repeated swim stress-induced thermal hyperalgesia. **Behavioural Brain Research**, v. 167, n. 2, p. 205–211, 28 fev. 2006.

TAVARES, L. R. R.; PETRILLI, L. A.; BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; CANTO-DESOUZA, L.; PLANETA, C. D. S.; GUIMARÃES, F. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Cannabidiol Treatment Shows Therapeutic Efficacy in a Rodent Model of Social Transfer of Pain in Pair-Housed Male Mice. **Cannabis and Cannabinoid Research**, Apr. 2023. Epub ahead of print. DOI: 10.1089/can.2022.0300.

TIAN, R. *et al.* A Possible Change Process of Inflammatory Cytokines in the Prolonged Chronic Stress and Its Ultimate Implications for Health. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

TILLU, D. V.; HASSLER, S. N.; BURGOS-VEGA, C. C.; QUINN, T. L.; SORGE, R. E.; DUSSOR, G.; BOITANO, S.; VAGNER, J.; PRICE, T. J. Protease-activated receptor 2 activation is sufficient to induce the transition to a chronic pain state. **Pain**, v. 156, n. 5, maio 2015, p. 859–867. DOI: 10.1097/j.pain.000000000000125.

UNRUH, A. M. Gender variations in clinical pain experience. **Pain**, v. 65, n. 2, p. 123–167, maio 1996.