



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

MELISSA KÉSSIA CAVALCANTI OLIVEIRA

**IMPACTO DOS FATORES BIOPSIKOSSOCIAIS EM MODELOS ANIMAIS SOBRE
AS RESPOSTAS DE DOR CRÔNICA PÓS-CIRÚRGICA**

**Araraquara, SP
2023**

MELISSA KÉSSIA CAVALCANTI OLIVEIRA

**IMPACTO DOS FATORES BIOPSIKOSSOCIAIS EM MODELOS ANIMAIS SOBRE
AS RESPOSTAS DE DOR CRÔNICA PÓS-CIRÚRGICA**

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

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de
Souza**

Coorientadora: **Dra. Daniela Baptista de Souza**

**Araraquara, SP
2023**

048i

Oliveira, Melissa Késsia Cavalcanti.

Impacto dos fatores biopsicossociais em modelos animais sobre as respostas de dor crônica pós-cirúrgica / Melissa Késsia Cavalcanti Oliveira. – Araraquara: [s.n.], 2023.
40 f. : il.

Orientador: Ricardo Luiz Nunes de Souza.
Coorientadora: Daniela Baptista de Souza.

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

1. Dor crônica. 2. Ansiedade. 3. Depressão. 4. Isolamento social. I. Souza, Ricardo Luiz Nunes de, orient. II. Souza, Daniela Baptista de, coorient. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, irmãs, amigos e orientadores que contribuíram com a minha caminhada, dando apoio e suporte. Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento vai primeiramente aos meus pais Márcio e Katenuse que me incentivaram a vida toda a estudar e dar o meu melhor , e nessa jornada de cinco anos sempre me apoiaram e isso permitiu que eu chegasse até aqui. As minhas irmãs Millena e Mikaela por serem minha rede de apoio estando longe de casa e deixar a minha vida mais alegre.

A Deus, que fez com que meus sonhos fossem realizados e me permitiu saúde e determinação para não desanimar.

Agradeço aos meus amigos que conheci nesse período e se tornaram minha família e pode fazer esses anos de faculdade se tornarem mais leves.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos, também fiz parte de projetos de extensão e entidades, na qual tive a oportunidade de ser Diretora na Jornada Farmacêutica onde aprendi liderança e organização, vou levar todas essas experiências com muito carinho e gratidão!

Ao laboratório de Farmacologia, meus sinceros agradecimentos. Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza e minha co-orientadora Profa. Dra. Daniela Baptista de Souza, que me ajudou a desenvolver o projeto de pesquisa e me auxiliou sempre que precisei.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) edital nº4/2022 6366 e Edital ProPe 13/2022, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Quadros de dor crônica acometem mais de dois terços da população brasileira, tendo prevalência significativamente maior em mulheres. Além disso, há alta correlação dos quadros de dores crônicas com psicopatologias, desencadeando nos diferentes sexos alterações progressivas emocionais e de humor, como ansiedade e depressão. Estes quadros são multidimensionais e envolvem aspectos físicos, psicológicos e socioculturais impactando o bem-estar individual e social. Desta forma, mostra-se relevante investigar o papel do isolamento social frente aos quadros de dor crônica e estresse, 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. O teste de labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado para a análise das respostas associadas com ansiedade; o teste de esguicho de sacarose, ganho de peso e estado do pelo para avaliação de comportamentos relacionados à depressão. Os resultados obtidos indicam que o isolamento social é capaz de causar um prejuízo na recuperação após uma lesão, diminuindo os limiares relacionados à latência de retirada de pata no teste de hiperalgisia mecânica em fêmeas 14 dias após a incisão plantar. Na escala facial de dor foi possível observar que a condição de alojamento é capaz de aumentar os escores de expressão facial de dor em fêmeas e machos 14 dias após incisão e após injeção de prostaglandina (PGE₂). A análise do LCE demonstrou que apenas os machos isolados apresentaram aumento das respostas relacionadas à ansiedade. Entretanto, embora não tenhamos observado diferença significativa entre os grupos no teste do esguicho de sacarose, na avaliação de ganho de peso e estado da pelagem foi observado um prejuízo no ganho de peso e piora na qualidade do pelo, demonstrando que o isolamento social é capaz de induzir respostas relacionadas à anedonia e apatia. Desta forma pode-se concluir que o isolamento social é capaz de promover alterações sexualmente diversas sobre a percepção dolorosa e sobre as respostas afetivas relacionadas à dor.

Palavras-chave: dor crônica; ansiedade; depressão; isolamento social.

ABSTRACT

Chronic pain affects more than two-thirds of the Brazilian population, with a significantly higher prevalence in women. Furthermore, there is a high correlation between chronic pain and psychopathologies, triggering progressive emotional and mood changes in different sexes, such as anxiety and depression. These conditions are multidimensional and involve physical, psychological, and sociocultural aspects, impacting individual and social well-being. Considering these, it is relevant to investigate the influence of social isolation in female and male mice in the nociceptive and affective responses and the influence of sexual differences on these responses. To carry out this investigation the animals were submitted to the hyperalgesic priming model and the Von Frey test and Grimace Mouse Scale as a parameter for quantifying affective aspects of pain. Moreover, the elevated plus maze was used to analyze responses associated with anxiety; the sucrose splash, weight gain, and coat state to evaluate behaviors related to depression. The results obtained indicate that social isolation is capable of causing impairment in recovery after an injury, reducing the thresholds related to paw withdrawal latency in mechanical hyperalgesia in females. In the grimace mouse scale, it was possible to observe that the housing condition is capable of increasing facial pain expression scores in females and males. Interestingly, the elevated plus maze analysis demonstrated that only isolated males showed increased anxiety-like responses. The results of the sucrose splash showed no significant difference, however, it was observed the impairment in weight gain and coat state in the male and female isolate animals. In this way, it can be concluded that social isolation is capable of promoting sexually diverse changes in pain perception and affective responses related to pain.

Keywords: chronic pain; anxiety; depression; social isolation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Incisão Plantar	14
Figura 2 -	Habituação dos camundongos	15
Figura 3 -	Teste de Von Frey	15
Figura 4 -	Microfilamentos de Von Frey	16
Figura 5 -	Escala facial em camundongos	16
Figura 6 -	Labirinto em Cruz Elevado	18
Figura 7 -	Análise estado da pelagem	19
Figura 8 -	Delineamento Experimental	20
Figura 9 -	Avaliação da hiperalgesia mecânica	22
Figura 10 -	Avaliação da expressão facial de dor	23
Figura 11 -	Avaliação da exploração labirinto em cruz elevado	24
Figura 12 -	Avaliação do comportamento de autolimpeza	25
Figura 13 -	Avaliação do ganho de peso	26
Figura 14 -	Avaliação do estado da pelagem	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 ANIMAIS	13
3.2 INCISÃO PLANTAR E TRATAMENTOS	13
3.3 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE NOCICEPÇÃO	14
3.3.1 AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA	14
3.3.2 ESCALA FACIAL DE DOR PARA CAMUNDONGOS	16
3.4 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE	17
3.4.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	17
3.5 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DEPRESSÃO	18
3.5.1 TESTE DE ESGUICHO DE SACAROSE	18
3.5.2 ESTADO DA PELAGEM	18
3.5.3 GANHO DE PESO	19
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	20
5 ÉTICA	21
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
7 RESULTADOS	21
7.1 VON FREY	21
7.2 EXPRESSÃO FACIAL DE DOR	22
7.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	23
7.4 ESGUICHO DE SACAROSE	25
7.5 GANHO DE PESO	26
7.6 ESTADO DO PELO	26
8. DISCUSSÃO	27
9 CONCLUSÃO	32
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudos da Dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tais lesões”. A experiência da dor é pessoal e individual, mesmo que seja de natureza universal, pois todos os seres humanos já tiveram pelo menos uma vez essa experiência (BRAGA; RODRIGUES, 2018). Além disso, é influenciada por fatores biológicos, sensitivos (extensão e localização da lesão), emocionais (ansiedade, medo), sociais e culturais (no estoicismo por exemplo, onde se valoriza o autocontrole, a dor será vivenciada diferente de outras culturas) (SARTI, 2001).

A dor crônica pode ser definida como a dor contínua ou recorrente de duração mínima de três meses, muitas vezes tem a etiologia incerta, não desaparece com o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais (DELLAROZA *et al.*, 2007). Quadros de dor crônica acometem mais de dois terços da população brasileira, tendo prevalência significativamente maior em mulheres, independentemente da idade e do tipo de dor (CARVALHO *et al.*, 2018). Apesar da elevada prevalência da dor crônica - estima-se que mais de 1 milhão de pessoas sejam afetadas em todo o mundo - ainda há muito a ser compreendido sobre as causas subjacentes desta condição, e há uma necessidade urgente de melhores terapias para o tratamento de quadros algícos (BURMA *et al.*, 2016). Estes quadros são multidimensionais e envolvem aspectos físicos, psicológicos e socioculturais impactando o bem-estar individual e social (GUREJE *et al.*, 1998). Além disso, o limiar de dor é variável entre espécies, estudos têm demonstrado que homens e mulheres diferem quanto à tolerância e sensibilidade à dor (TRINDADE *et al.*, 2013).

Por se tratar de um quadro de longa duração, a dor crônica perde a função de ser sinal de alerta a algum dano, causando também sofrimento, incapacidade e custo socioeconômico (DELLAROZA *et al.*, 2007). Existem evidências de que a transição de dor aguda para crônica ocorreria em consequência de alterações na neurofisiologia das vias nociceptivas (FEIZERFAN; SHEH, 2015). Neste sentido, estudos em ratos demonstraram alterações nos nervos periféricos que alteram a amplitude de resposta aos estímulos aplicados, e também pode haver alterações nas vias centrais da transmissão dolorosa (KAYSER E GUILBAUD, 1984)

Diversos estímulos estressores podem alterar respostas dolorosas e exacerbar a percepção da dor (JENNINGS *et al.*, 2014). Do ponto de vista social, um importante estímulo estressor pode ser o isolamento social que é uma preocupação crescente e associada a problemas de saúde física e mental, causando aumento das morbidades e mortalidade (BRANDT *et al.*, 2022). A pandemia decorrente do COVID-2019 foi um dos grandes desafios sociais e de saúde, com consequências drásticas na população mundial, como piora em quadros de dor, desemprego, dificuldade socioeconômica e falta de exercício, entre outros. Dados sugerem que a pandemia e o isolamento aumentam o estresse, e consequentemente o risco de desenvolver quadros de dor crônica (NIETO *et al.*, 2020).

Embora na literatura já se encontrem achados pré-clínicos (PUGLISI-ALLEGRA; OLIVERIO, 1983) e clínicos (KARAYANNIS *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2019), demonstrando o impacto do isolamento social sobre respostas álgicas, ainda não é claro de que forma esse fator interage com as diferenças sexuais na modulação da dor.

Outro aspecto importante do ponto de vista epidemiológico, relaciona-se às taxas de comorbidade de quadros de dores crônicas com psicopatologias, principalmente relacionadas aos transtornos emocionais e afetivos. Neste aspecto, estima-se que 20-40% dos pacientes com dor crônica apresentam também quadros de ansiedade e depressão (BURMA, 2017). De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) a depressão grave é um dos principais contribuintes para a carga global de doenças. Segundo a Pesquisa Vigitel 2021, em média, 11,3% dos brasileiros relataram ter recebido um diagnóstico médico da doença, sendo visto que a frequência foi maior entre as mulheres (14,7%) em comparação com os homens (7,3%). Os sintomas do transtorno depressivo maior incluem anedonia, humor deprimido, perturbação do sono, mudança no peso/apetite (HASLER *et al.* 2004).

A dor e a ansiedade são condições que se apresentam concomitantemente com muita frequência (LIU *et al.*, 2015). Especificamente, Costa e colaboradores (2019) descreveram que pacientes portadores de diferentes tipos de doenças crônicas apresentaram maior prevalência de ansiedade. Além disso, segundo o Relatório Mundial de Saúde Mental feito pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2019 no Brasil durante o primeiro ano da pandemia, os quadros de ansiedade aumentaram mais de 25%.

Cabe ainda ressaltar que diversos estudos já apontavam que são as mulheres a maioria das acometidas por processos patológicos que envolvem dor e emoções ou ambos (TSANG *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2017). Entretanto, contraditoriamente, apenas 20% de estudos da área pré-clínica da neurociência são realizados em machos e fêmeas, e 25% não especificam o sexo dos animais (BEERY, 2018). Infelizmente, esse viés em estudos pré-clínicos trouxe como consequência para a sociedade, uma série de condutas e prescrições que são ineficazes em mulheres (KLEIN *et al.*, 2015) visto que foram baseadas em estudos que tiveram como sujeitos experimentais principalmente machos. Com isso, é importante que mais estudos utilizem fêmeas em seus protocolos experimentais, assim podendo comparar os resultados obtidos com os machos, a fim de verificar se há diferenças.

Dentre os modelos animais que podem ser empregados para avaliar respostas nociceptivas, o modelo denominado *hyperalgesic priming* pode ser empregado como uma ferramenta relativamente nova, que vem sendo mais utilizada com o decorrer dos anos, em que é possível investigar mecanismos de plasticidade neuronal que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de quadros de dor crônica (REICHLING; LEVINE, 2009). A plasticidade neuronal, presente nos processos de cronificação da dor, é uma característica adaptativa do sistema nervoso que pode ser definida como a capacidade de resposta de um neurônio a estímulos intrínsecos ou extrínsecos. Nesse sentido, após uma lesão, as alterações plásticas que remodelam o sistema nervoso autônomo envolvem um equilíbrio entre a morte celular e a regeneração dos neurônios preservados (TERENGHI; KINGHAM, 2009).

Além disso, evidências apontam que dor pré-existente é um fator de risco importante para quadros de dor crônica pós-incisão, sugerindo assim que a dor pré-existente pode ser um estímulo inicial que causa um estado de dor crônica induzida por incisão (KANDASAMY; PRICE, 2015). Desta forma, no *hyperalgesic priming* os animais recebem o primeiro estímulo nocivo (incisão plantar), que vai desencadear hiperalgesia aguda, detectada como uma diminuição no limiar da resposta de retirada a um estímulo de pressão mecânica aplicado à pata inflamada. Essa inflamação irá desaparecer em poucos dias, quando os animais recebem um segundo estímulo de uma citocina inflamatória, a prostaglandina (PGE_2), que vai desencadear um processo hiperalgésico crônico. Estudos prévios já demonstraram que a hiperalgesia induzida por PGE_2 além de aumentar e prolongar esse quadro inflamatório envolve também

alterações neuroplásticas nas vias de sinalização intracelular (REICHLING; LEVINE, 2009; PRICE; RAY, 2019; KANDASAMY; PRICE, 2015).

Neste sentido, dada as evidências apontadas acima e especialmente aquelas que demonstraram que o isolamento social é capaz de interferir em respostas nociceptivas em animais (PUGLISI-ALLEGRA and OLIVERIO, 1983) e em humanos (KARAYANNIS *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2019), a hipótese para o desenvolvimento deste estudo é de que o isolamento social é capaz de alterar as respostas dos componentes sensitivo e afetivos relacionadas à dor crônica e que estas alterações englobam diferenças sexuais em camundongos machos e fêmeas.

2 OBJETIVO

Avaliar o impacto do dimorfismo sexual e do isolamento social sobre os componentes sensoriais e afetivos-emocionais no processo de cronificação da dor.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento relacionados a depressão com os testes de esguicho de sacarose, estado da pelagem e ganho de peso;
- Avaliar o comportamento relacionado a ansiedade com o teste de Labirinto em cruz elevado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 86 camundongos (44 machos e 42 fêmeas) Swiss-Webster com aproximadamente 60 dias pós natal (DPN), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo de luz 12/12h) e tiveram livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os períodos de teste.

3.2 INCISÃO PLANTAR E TRATAMENTOS

Antes do procedimento cirúrgico os animais foram submetidos ao Teste de Von Frey e escala facial de dor para mensuração das respostas nociceptivas basais. Posteriormente, sob anestesia com Isoflurano a 1%, foi realizada a incisão plantar de aproximadamente 11 mm na pata direita do animal (Figura 1). 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 a confirmação do retorno do limiar de retirada da pata para os níveis basais (aproximadamente após 15 dias), os animais receberam injeção de prostaglandina (PGE_2) (100 ng/25 μl) no mesmo local da incisão. O limiar de retirada da pata no Von Frey e a avaliação da escala facial de dor foram novamente mensurados 3 e 24 horas após as injeções de PGE_2 (BAPTISTA-DE-SOUZA *et al.*, 2020; REICHLING; LEVINE, 2009)

Figura 1 - Incisão Plantar na pata direita traseira



Fonte: Autoria própria (2023)

3.3 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE NOCICEPÇÃO

3.3.1 AVALIAÇÃO DE HIPERALGESIA MECÂNICA

Os camundongos foram acomodados individualmente em caixas de acrílico transparente para habituação por 30 minutos (Figura 2), após isso foi aplicado monofilamentos de von Frey de forças variáveis (Figura 4). As aplicações são feitas na superfície plantar da pata direita traseira do animal, com força suficiente para causar uma leve curvatura (Figura 3). No teste são consideradas respostas positivas quando o animal exibe comportamentos nocifensivos, como a retirada brusca da pata, e agitação da pata após a retirada do microfilamento (DEUIS; DVORAKOVA;

VETTER, 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 2 - Habituação dos camundongos



Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Neuropsicofarmacologia (2023)

Figura 3 - Teste de Von Frey, aplicação do microfilamento na pata onde foi feita a incisão plantar



Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Neuropsicofarmacologia (2023)

Figura 4 - Microfilamentos de Von Frey

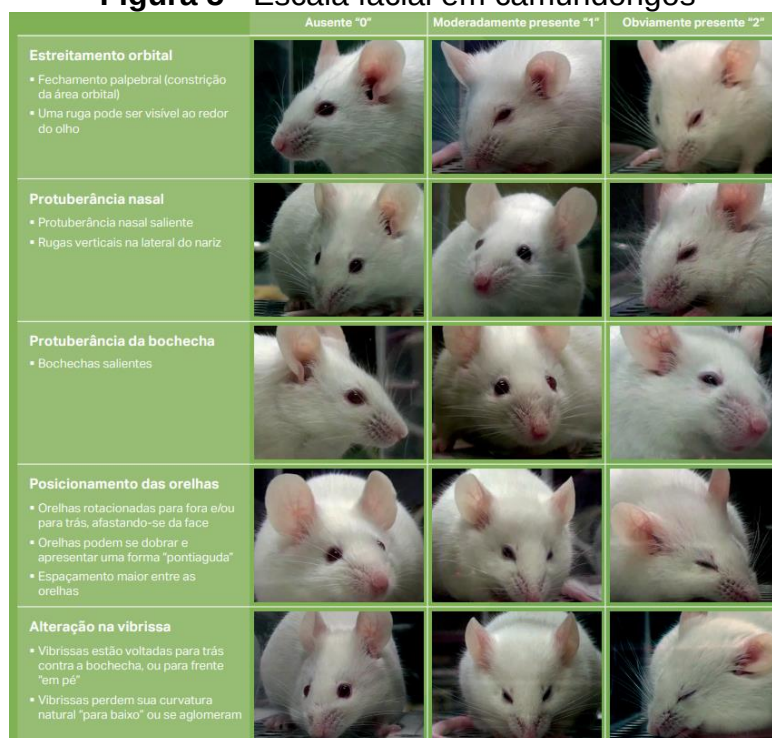


Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Neuropsicofarmacologia (2023)

3.3.2 ESCALA FACIAL DE DOR PARA CAMUNDONGOS

A escala facial de dor para camundongos foi desenvolvida por Langford e colaboradores (2010), sendo utilizada para quantificação de aspectos afetivos da dor. Para avaliação, são considerados a posição das orelhas, contração da musculatura dos olhos, do focinho e das bochechas, e posição das vibrissas. Após a análise desses aspectos os animais são classificados em (0) dor não presente/não visível; (1) dor moderada; (2) dor severa. Os resultados são apresentados como a média de cada um dos escores designado aos sujeitos experimentais. A escala está representada na Figura 5.

Figura 5 - Escala facial em camundongos



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

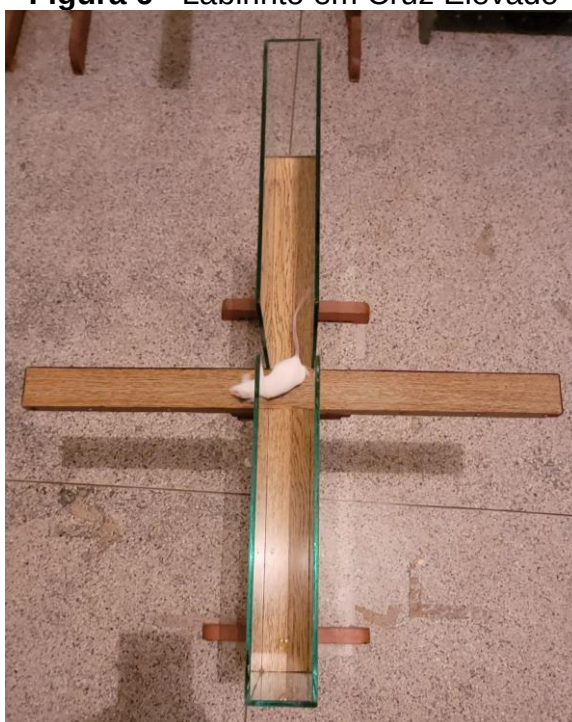
3.4 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À ANSIEDADE

3.4.1 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi previamente adaptado para camundongos por Lister (1987) e utilizado como ferramenta para avaliar respostas relacionadas a ansiedade desde seu desenvolvimento (PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS; JOHNSON, 1995). O aparato utilizado em formato de cruz é composto por: 2 braços

fechados nas laterais por vidro ($30 \times 5 \times 15$ cm), dois braços abertos ($30 \times 5 \times 0,25$ cm), os quais não possuem proteção nas laterais, e o centro que interliga os braços do aparato (5×5 cm) (Figura 6). Neste teste, camundongos foram expostos ao LCE durante 5 minutos. As sessões são gravadas por um sistema de filmagem e posteriormente analisadas no software X-plo-Rat, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do laboratório do Dr. Silvio Morato, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto-Brasil (o software pode ser baixado livremente em (<http://Scotty.FFCLRP.USP.br/X-plo-Rat.html>)). Foram analisados os comportamentos de frequência de entradas nos braços abertos (número de vezes em que o animal cruza com as quatro patas linha divisória de cada braço), porcentagem de entradas nos braços abertos [(entrada nos braços abertos/total de entradas) $\times 100$], porcentagem do tempo de permanência nos braços abertos [(tempo no braço aberto/300) $\times 100$], e como medida de atividade locomotora, o número de entradas nos braços fechados (RODGERS; JOHNSON, 1995).

Figura 6 - Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: Banco de imagens do Laboratório de Neuropsicofarmacologia (2023)

3.5 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE COMPORTAMENTOS RELACIONADOS À DEPRESSÃO

3.5.1 TESTE DE ESGUICHO DE SACAROSE

O teste consiste em “esguichar” uma solução a 10% de sacarose no dorso do

camundongo em uma gaiola. Por conta da viscosidade, a solução adere à pelagem do animal e induz o comportamento de autolimpeza (grooming). O tempo (em segundos) de grooming, avaliado por 5 minutos, pode ser usado como um índice de autocuidado e comportamento motivacional (ISINGRINI *et al.*, 2010). Também é avaliado a latência e frequência.

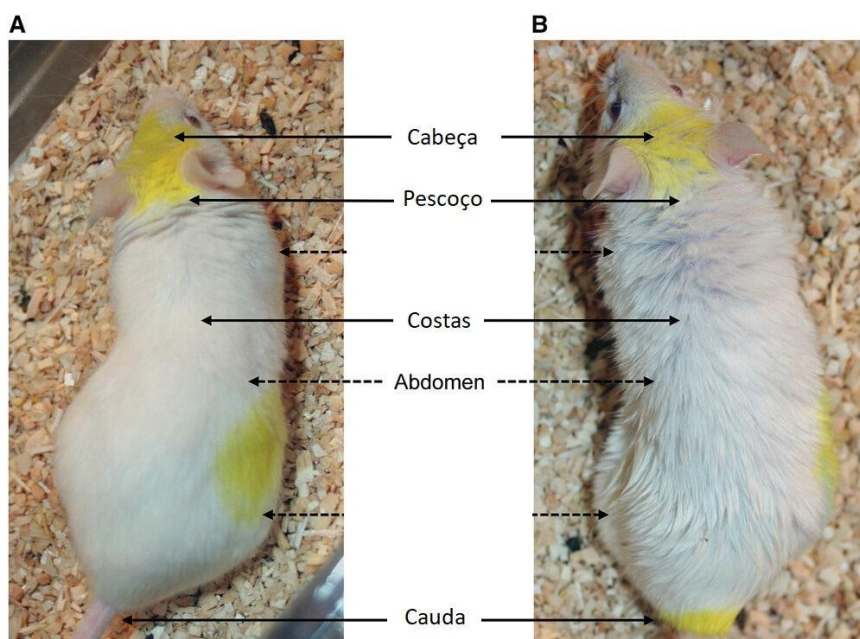
Trabalhos prévios demonstram que o estresse crônico reduz esse comportamento, o que pode ser considerado um paralelo com comportamento apático e anedônico, em razão do valor hedônico que soluções doces têm para esses roedores (BAPTISTA-DE-SOUZA *et al.*, 2020; YALCIN; AKSU; BELZUNG, 2005).

3.5.2 ESTADO DA PELAGEM

Foi avaliado o estado da pelagem dos camundongos em dois momentos, sendo no dia anterior à incisão, para avaliar a sua condição basal do estado da pelagem e no décimo sexto dia (último dia de experimento).

Como o estado da pelagem está relacionado ao comportamento de limpeza, sendo uma medida da motivação do animal. Foi avaliado a pelagem nas seguintes áreas do corpo: cabeça, pescoço, costas, abdômen e cauda (Figura 7). E dado uma pontuação ao estado da pelagem para cada área: 0 (bom) para pelagem lisa e brilhante, sem manchas desgrenhadas e espetadas; 0,5 (moderado) para pêlo levemente desarrumados e com algumas manchas pontiagudas; 1 (ruim) para pêlos desarrumados e despenteados com leves manchas (NOLLET, 2021).

Figura 7 - Análise estado da pelagem



Fonte: Nollet (2021)

3.5.3 GANHO DE PESO

O ganho de peso pode ser utilizado como parâmetro que apresenta uma relação com resposta de anedonia. Tal evidência é ressaltada pelo fato de que a maior parte dos pacientes depressivos apresentam alterações no consumo alimentar e no peso, seja com perda ou ganho de apetite (HASLER *ET AL.* 2004). Os camundongos foram pesados em dois momentos, sendo no dia anterior à incisão, para avaliar seu peso basal e no décimo sexto dia (último dia de experimento), a fim de observar uma potencial perda/ganho de peso (PLANCHEZ; SURGET; BELZUNG, 2019).

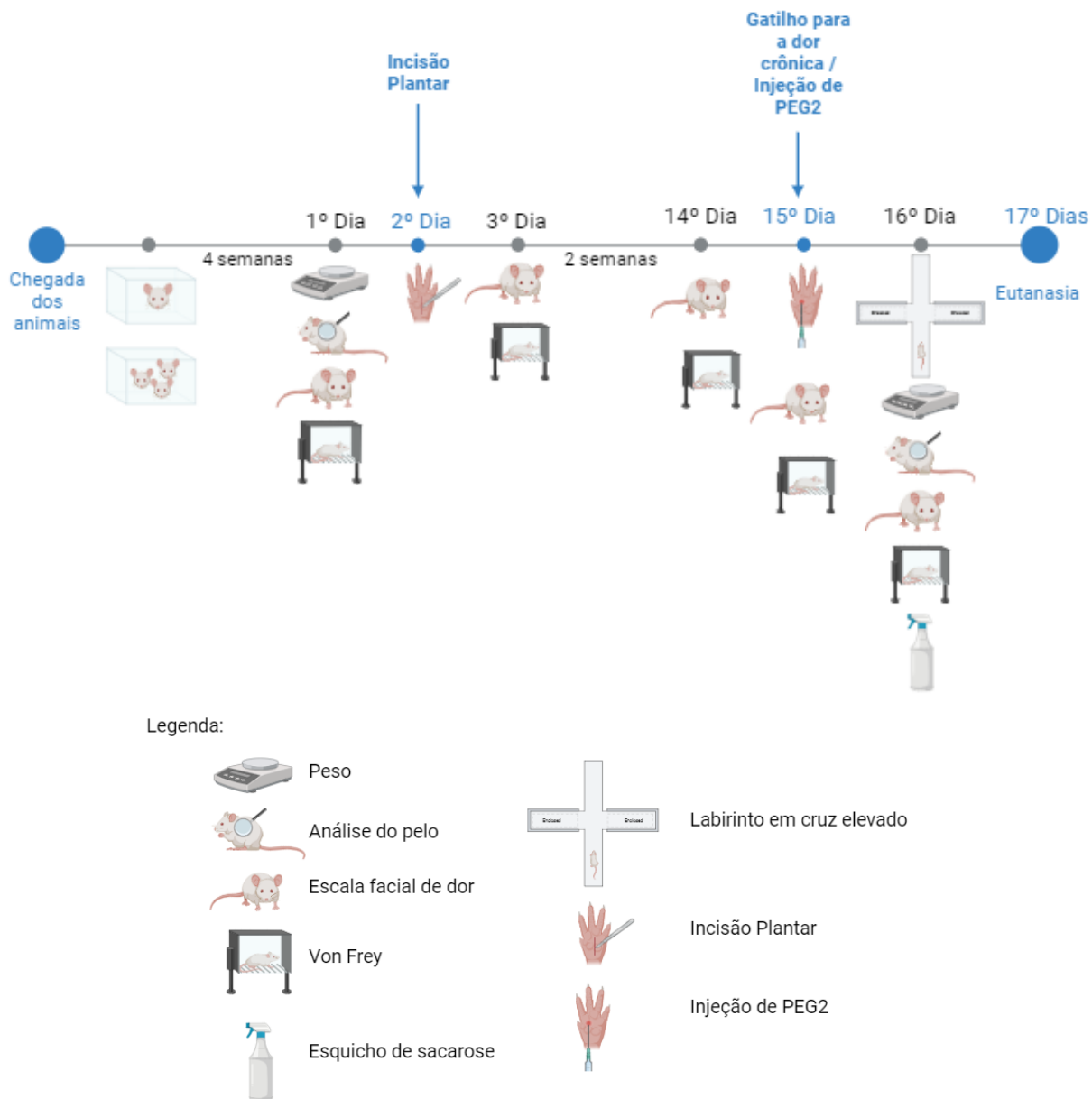
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi iniciado com a chegada dos animais ao biotério (com aproximadamente 21 DPN), com a sua distribuição de acordo com o tipo de alojamento a que cada um seria submetido (isolado ou alojado em grupo).

Com aproximadamente 60 DPN, os animais foram avaliados pelo teste de Von Frey, escala facial de dor, estado da pelagem e peso antes do procedimento cirúrgico para os registros das medidas basais de hiperalgesia mecânica e os escores para a escala facial de dor. Após a incisão plantar (todos os grupos experimentais passam por esse procedimento), 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 (Von Frey e escala facial de dor);

Avaliação de comportamento do tipo ansioso (labirinto em cruz elevado) e respostas relacionadas à depressão (esquicho de sacarose, estado da pelagem e peso). O delineamento pode ser visto na Figura 8.

Figura 8 - Delineamento Experimental



Fonte: Autoria Própria (2023)

5 ÉTICA

O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, recebendo Protocolo: CEUA/FCF/ CAR 19/2022. É conduzido seguindo os princípios do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de todos os experimentos foram analisados através da ANOVA de duas vias (fator 1: sexo ; fator 2: tipo de alojamento). Entretanto, os resultados dos testes: Von Frey, Escala Facial de Dor e Estado da Pelagem foram submetidos à ANOVA de duas vias para medidas repetidas. Nos casos de significância, as análises foram seguidas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados como significativos.

7 RESULTADOS

7.1 VON FREY

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas na análise do teste do Von Frey revelou efeitos para os fatores condição ($F_{(1,45)} = 7,89$ $P < 0.05$), dia ($F_{(4,180)} = 83,79$ $P < 0.05$) e interação entre os fatores dia e sexo ($F_{(4,180)} = 2,51$ $P < 0.05$). A análise post hoc Duncan revelou que 14 dias após a incisão plantar o grupo de fêmeas isoladas respondeu a menores pressões para retirada da pata em comparação às fêmeas alojadas em grupo e aos machos isolados (Figura 9).

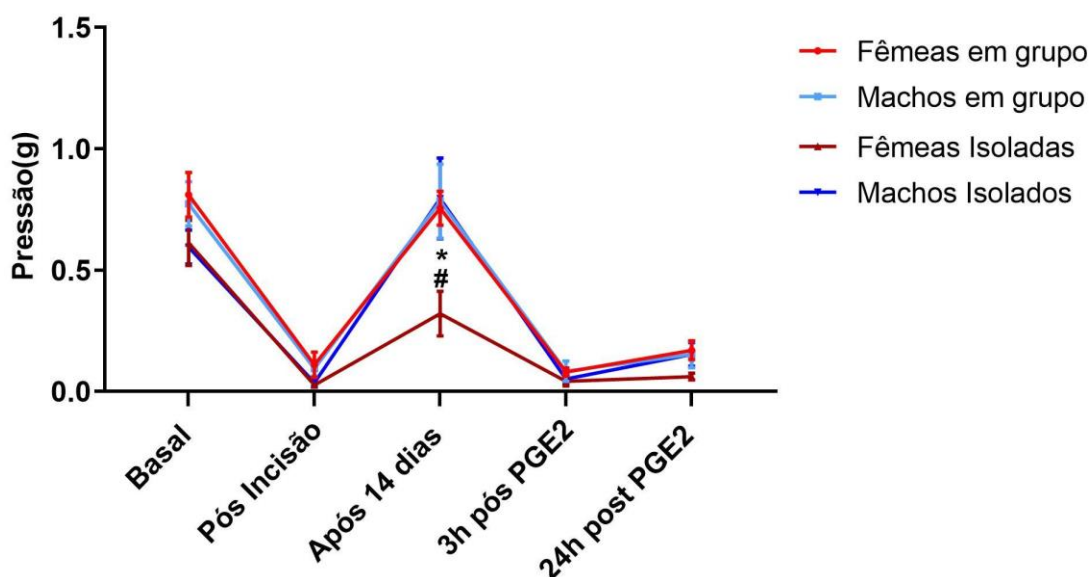


Figura 9- Avaliação da hiperalgesia mecânica avaliada no Von Frey expressa pela pressão necessária para retirada da pata em camundongos fêmeas e machos ($n=11=14$). As barras representam as médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$). * $P < 0,05$ significância com relação à condição. # $P < 0,05$ significância com relação ao sexo.

7.2 EXPRESSÃO FACIAL DE DOR

Para os dados da escala facial de dor a ANOVA de duas vias para medidas repetidas revelou efeitos para os fatores condição ($F_{(1,45)} = 16,23$ $P < 0.05$), dia ($F_{(4,180)} = 36,93$ $P < 0.05$) e interação entre os fatores dia e condição ($F_{(4,180)} = 2,55$ $P < 0.05$). A análise post hoc Duncan revelou que 14 dias após a incisão plantar o grupo de fêmeas isoladas possuem maiores escores de expressão facial de dor quando comparados com as fêmeas em grupo e os machos isolados. Após 3 horas da injeção de PGE₂ as fêmeas isoladas apresentaram maiores escores de expressão facial de dor quando comparados com as fêmeas em grupo. Além disso, foi observado também que 3h após a injeção de PGE₂, essa resposta permanece e os machos alojados individualmente também apresentaram maiores escores de expressão facial de dor quando comparados com os machos em grupo (Figura 10).

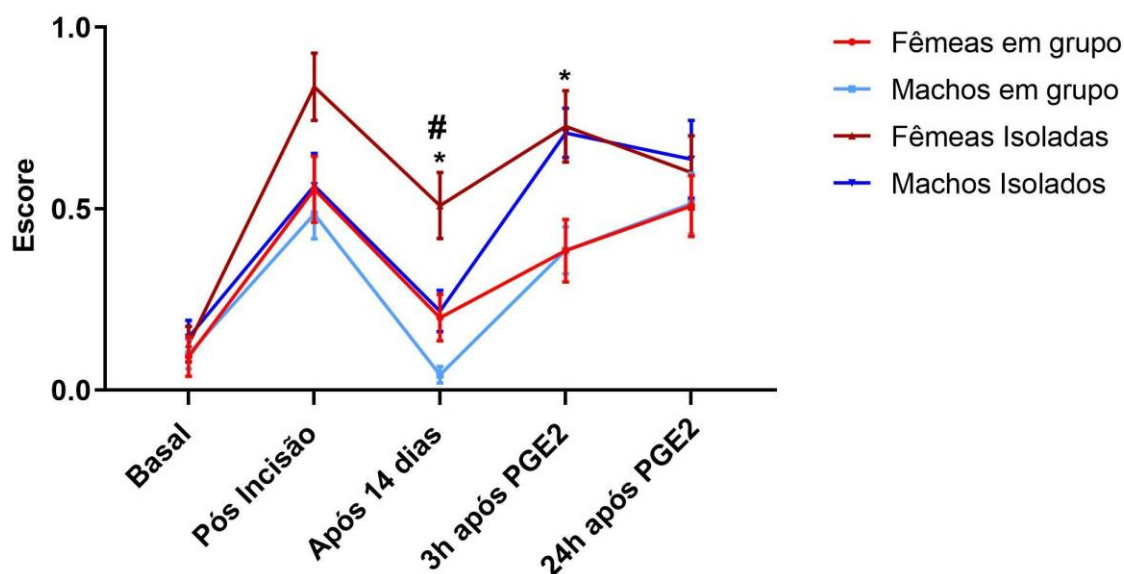


Figura 10 - Avaliação da expressão facial de dor expressa pela média de escores dado a cada região facial em camundongos fêmeas e machos (n=11=14). * $P < 0,05$ significância com relação à condição. # $P < 0,05$ significância com relação ao sexo.

7.3 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

A ANOVA bifatorial na análise da exploração aos braços do LCE para as fêmeas e machos revelou que para a porcentagem de entrada nos braços aberto foram observadas significância para o fator sexo ($F_{(1,58)} = 13,16$ $P < 0.05$) e interação entre os fatores sexo e condição ($F_{(1,58)} = 4,23$ $P < 0.05$). A análise post hoc Duncan

revelou que os machos isolados apresentam uma diminuição %EBA comparados ao grupo macho alojados em grupo e as fêmeas alojadas individualmente. Para o número de entradas nos braços fechados não foram observadas significância para nenhum dos fatores.

Para as respostas relacionadas à porcentagem de tempo gasto nos braços abertos foram observadas significância para o fator sexo ($F_{(1,58)} = 14,97$ $P < 0.05$) e condição ($F_{(1,58)} = 12,71$ $P < 0.05$). Semelhante ao observado para a porcentagem de entradas nos braços abertos foi observado que os machos isolados apresentam uma diminuição %TBA comparados ao grupo macho alojados em grupo e as fêmeas alojadas individualmente (Figura 11).

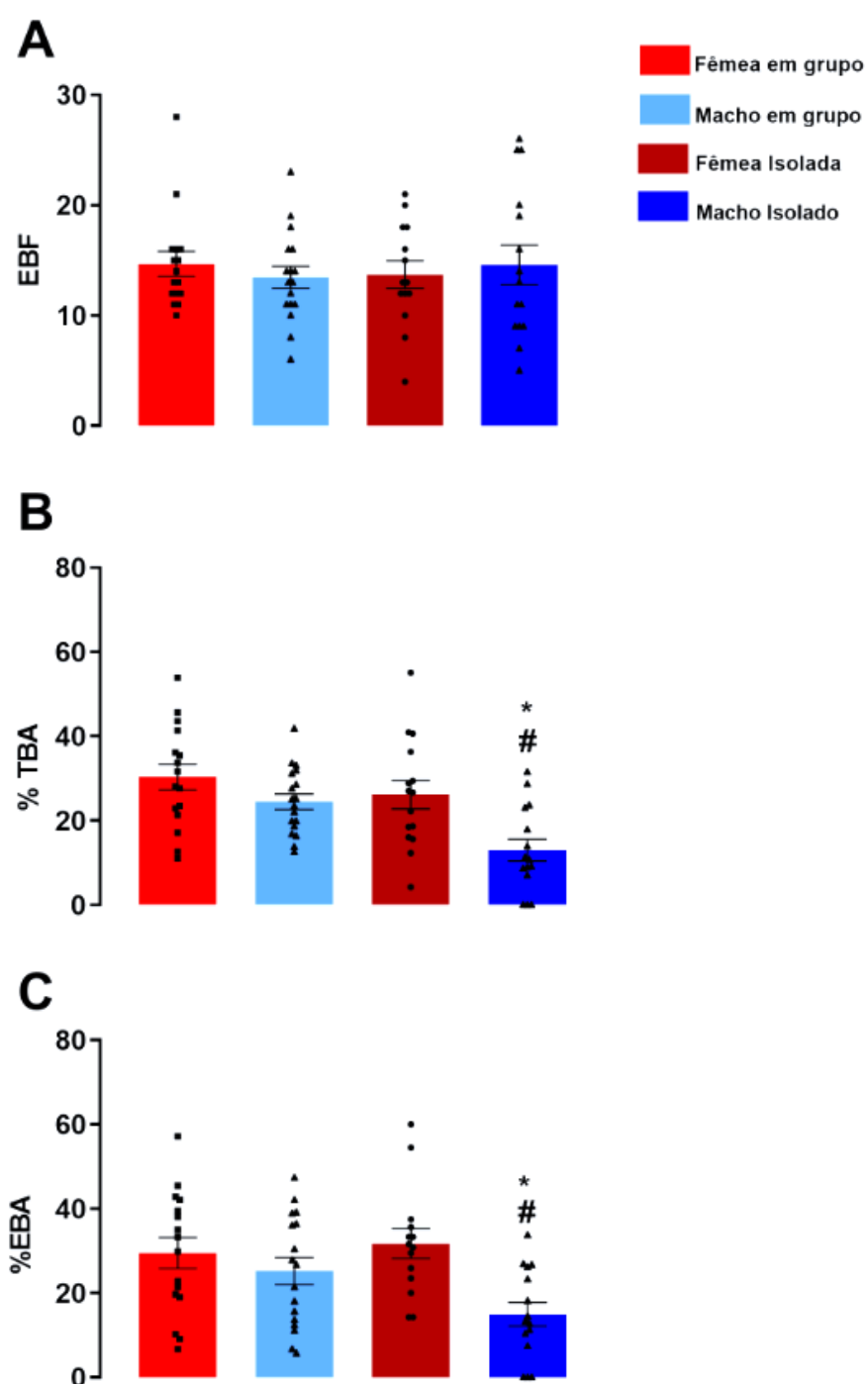


Figura 11 - Avaliação da exploração aos braços do labirinto em cruz elevado em camundongos fêmeas e machos (n=14-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM). *P < 0,05 significância com relação à condição. #P < 0,05 significância com relação ao sexo. O gráfico (A) entrada nos braços fechados; (B) porcentagem tempo braços abertos; (C) porcentagem entrada nos braços abertos

7.4 ESGUICHO DE SACAROSE

A ANOVA bifatorial na análise do comportamento de autolimpeza no teste do esguicho da sacarose revelou que não houve significância para latência para início da autolimpeza, frequência e tempo gasto no comportamento de auto-limpeza (Figura 12).

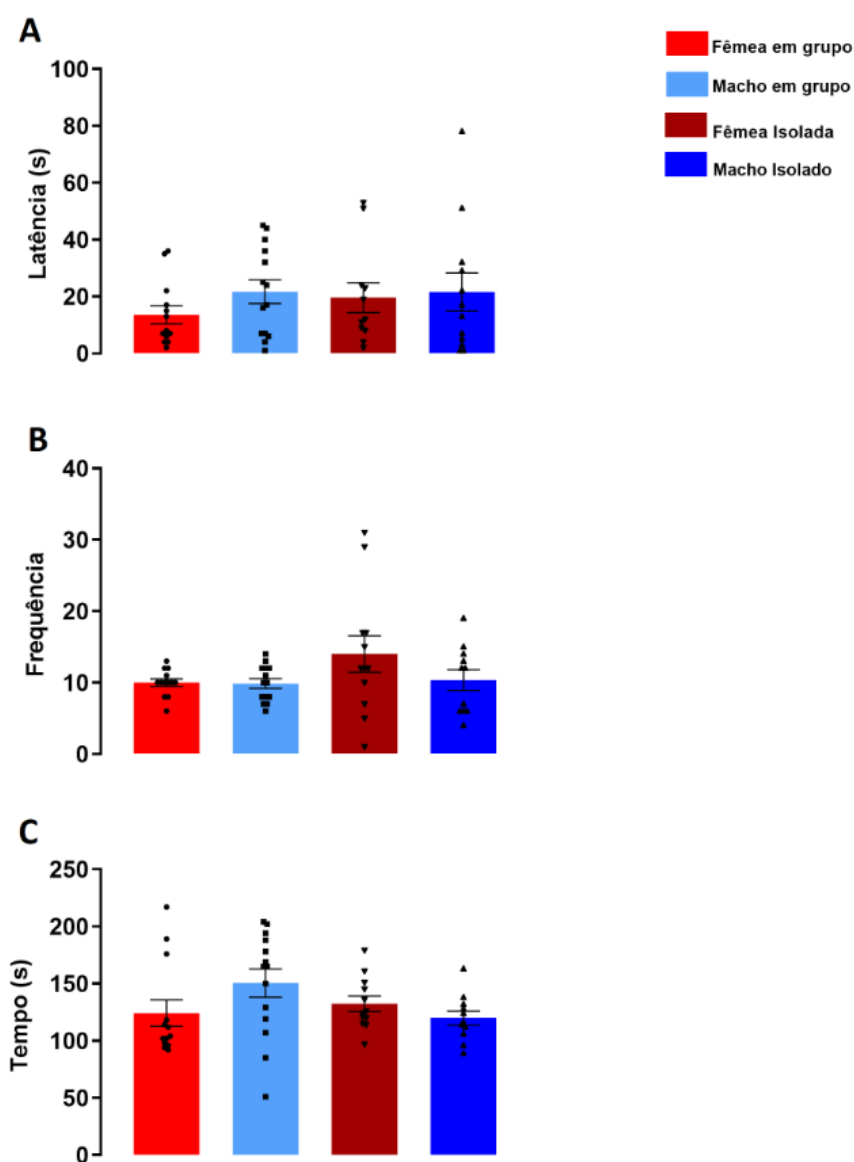


Figura 12 - Avaliação do comportamento de autolimpeza em camundongos fêmeas e machos. As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) (n=11-14). *P < 0,05 significância com relação à condição. O gráfico (A) latência, diferença de tempo entre o esguicho de sacarose e o momento do *grooming*; (B) frequência; (C) tempo total gasto.

7.5 GANHO DE PESO

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas na análise de ganho de peso nas fêmeas e machos revelou efeitos para os fatores condição ($F_{(1,46)} = 15,53$ $P < 0.05$), sexo ($F_{(1,46)} = 4,29$ $P < 0.05$). A análise post hoc Duncan revelou que os grupos machos e fêmeas isolados apresentaram um prejuízo no ganho de peso quando comparados com os machos e fêmeas alojados em grupo (Figura 13).

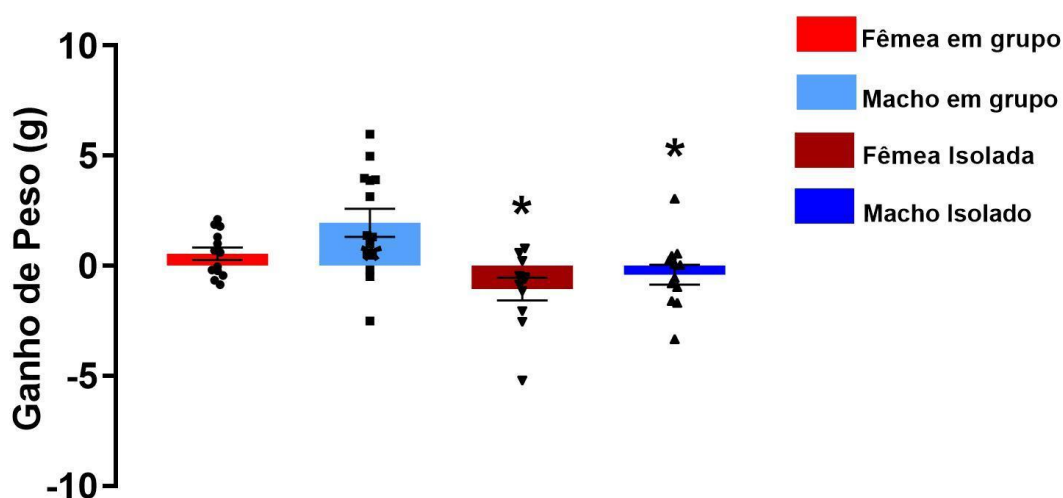


Figura 13 - Avaliação do ganho de peso em camundongos fêmeas e machos. As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) (n=11-14) . *P < 0,05 significância com relação à condição.

7.6 ESTADO DO PELO

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas na análise do estado do pelo em fêmeas e machos revelou efeitos para os fatores alojamento ($F_{(1,45)} = 46,46$ $P < 0.05$), dia ($F_{(1,45)} = 65,75$ $P < 0.05$) e interação entre os fatores dia e alojamento ($F_{(1,45)} = 7,47$ $P < 0.05$). A análise post hoc Duncan revelou que os grupos fêmeas isoladas, fêmeas grupo, machos isolados e machos grupo apresentaram maior escore, ou seja, piora na qualidade do pelo, quando comparados aos seus respectivos grupos nas condições basais. Foi observado também que os machos e fêmeas isolados após a injeção de PGE_2 apresentaram aumento do escore quando comparado com os machos e fêmeas alojados em grupo (Figura 14).

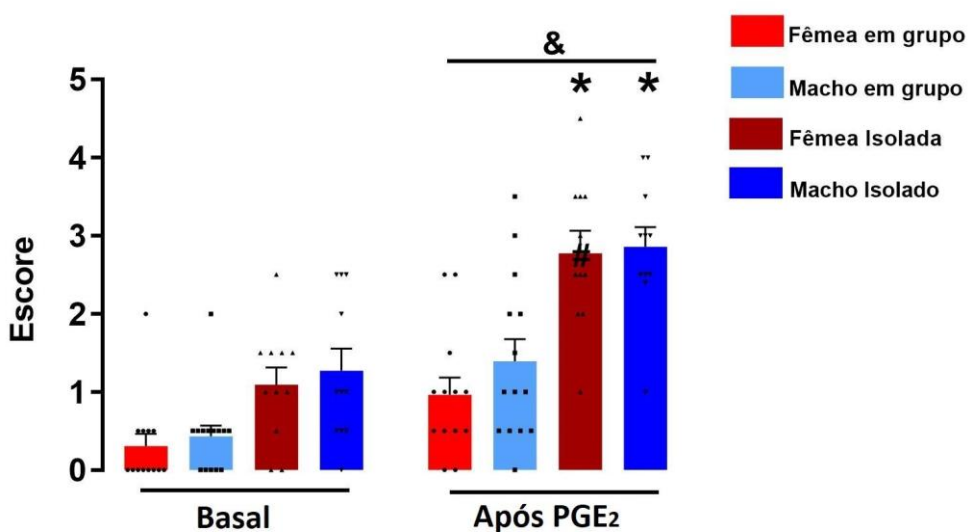


Figura 14 - Avaliação do estado da pelagem em camundongos fêmeas e machos. As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) (n=11-14). *P < 0,05 significância com relação à condição. #P < 0,05 significância com relação ao sexo. &P < 0,05 comparado ao respectivo grupo na condição basal.

8. DISCUSSÃO

Os dados descritos neste estudo demonstraram que a incisão plantar promoveu aumento de hipersensibilidade mecânica independente do tipo de alojamento e do sexo dos animal. Foi observado também que a injeção de 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 todos os grupos tiveram um aumento do escore após a incisão e após a injeção de prostaglandina, demonstrando a presença de respostas afetivas associadas à condição dolorosa. Na resposta à exposição ao LCE foi observado que apenas os machos isolados apresentaram aumento de respostas relacionadas à ansiedade. Além disso, não foram observadas diferenças entre os grupos no teste de esguicho de sacarose, embora as fêmeas e os machos isolados apresentaram um prejuízo no ganho de peso e na condição da pelagem.

Especificamente, embora não tenhamos observado diferença significativa entre os grupos para a hiperalgesia mecânica no momento da indução do quadro algico (pós-incisão) e na manutenção (pós-PGE₂) nos dados obtidos no teste do Von frey, foi possível observar que o isolamento social foi capaz de causar um prejuízo na recuperação da lesão apenas nas fêmeas isoladas. Os resultados obtidos neste teste

demonstraram que a incisão plantar promoveu a hiperalgesia mecânica em todos os grupos. Entretanto, após 14 dias os machos alojados em grupo ou isolados e fêmeas alojadas em grupo tiveram o retorno dos seus limiares para a condição basal, com exceção das fêmeas isoladas, que permaneceram com o limiar de retirada da pata reduzida, o que pode indicar que o isolamento social desencadeia um prejuízo na recuperação da lesão.

Após a injeção de PGE_2 não se observou diferença entre os grupos, embora fosse esperado que os animais isolados pudessem ter sua resposta à dor acentuada, conforme relatado em estudos prévios (ZHANG; ZHOU; ZHOU, 2022; PUGLISI-ALLEGRA AND OLIVERIO, 1983). Embora o isolamento social tenha afetado respostas relacionadas à dor em fêmeas 14 dias após a incisão plantar, o mediador inflamatório (PGE_2) desencadeou um processo hiperalgésico crônico em todos os animais, independente de seu modo de alojamento (KANDASAMY; PRICE, 2015).

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. Sentir dor é um sinal de alerta de que algo está errado. 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 de se avaliar 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). Vale ressaltar também que já foi visto em estudos anteriores que ratos expostos a um fator estressante exibiram respostas acentuadas de hiperalgesia mecânica (REICHLING; LEVINE, 2009).

Para os dados da expressão facial de dor, os resultados obtidos demonstraram que após a incisão plantar houve o aumento na expressão facial em todos os grupos, indicando 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; TAVARES *et al.*, 2023). Curiosamente, após 14 dias as fêmeas isoladas mantiveram o escore elevado quando comparados com as fêmeas em grupo e os machos isolados, este resultado

indica que, para as fêmeas, o isolamento social prejudica o processo de recuperação após uma lesão, deixando-a também com hipersensibilidade mecânica e aumento na expressão facial.

Em um estudo realizado em humanos foi observado que a sensação a dor quando submetidos ao teste “*cold pressor pain*” foi maior em participantes que estavam sozinhos do que os que estavam acompanhados (MARTIN; TUTTLE; MOGIL, 2014). Com base nisso é possível observar que o meio social influencia na percepção a dor. Além disso, também foi demonstrado que o impacto da dor é menor em casos que o indivíduo está incluído em um meio acolhedor (KARAYANNIS, 2019).

Ainda nos dados obtidos com o teste da escala facial de dor, três horas após a PGE₂ os machos isolados apresentaram maiores escores de expressão facial quando comparado com os machos em grupo. Esse resultado indica que o isolamento social pode influenciar tanto nas respostas físicas, quanto nas respostas afetivas da dor em machos e em fêmeas, embora estas diferenças entre os grupos não permaneçam 24 horas após a injeção de prostaglandina.

Adicionalmente, nos dados obtidos com o LCE para avaliação de respostas relacionadas à ansiedade foi observado que o protocolo de *hyperalgesic priming* promoveu um aumento destas respostas apenas em machos isolados com a diminuição da entrada e tempo gastos nos braços abertos do labirinto. O índice de locomoção dado pela entrada nos braços fechados (GULICK; GOULD, 2009) não apresentou diferença entre os grupos, ou seja, a locomoção de todos os animais não estava prejudicada pelo procedimento experimental.

Cabe destacar que o comportamento dos animais no LCE está diretamente relacionado à preferência dos roedores para espaços escuros/fechados e à aversão de altura/espaços abertos. Deste modo o LCE tem sido amplamente utilizado como um ensaio comportamental para avaliar os efeitos de fármacos que interferem na ansiedade (WALF; FRYE, 2007). Entretanto, apesar da simplicidade aparente do modelo, diversos são os fatores que afetam o comportamento de camundongos submetidos a esse teste como: sexo, estado nutricional, hora do dia, manipulação do animal, ruídos sonoros, luminosidade da sala experimental (MORATO, 2006).

Já foi observado na literatura que a ansiedade e quadros de dor crônica estão intimamente associados, sendo a ansiedade um importante componente para respostas de catastrofização, sensibilização à dor e evitação de movimentos ou atividades por medo da dor (HOTTA *et al.*, 2022; DERSH; POLATIN; GATCHEL,

2002). Entretanto, no presente estudo não foi observado diferença nas respostas do grupo das fêmeas isoladas. Tal fato pode ter ocorrido pelos possíveis interferentes - citados acima - no teste. Outra hipótese se baseia na insensibilidade do teste para captar a consequência emocional do protocolo nas fêmeas. Possivelmente, para avaliar as consequências no comportamento ansioso em fêmeas seja necessário maior intervalo entre a injeção de PGE_2 e a exposição ao LCE.

Embora tenha sido demonstrado anteriormente a influência do ciclo estral no perfil comportamental de camundongos fêmeas exposta ao LCE, em que no período diestro observa-se menos tempo nos braços abertos do que os machos, enquanto no período proestro passam mais tempo nos braços abertos do que machos (WALF; FRYE, 2007), dados mais recentes apontam que as fêmeas se comportam de maneira semelhante aos machos no LCE, mas apresentam níveis globais de ansiedade mais baixos (KNIGHT *et al.*, 2021). Esse fato corrobora evidências que apontam que as fêmeas possuem naturalmente comportamentos um pouco distintos dos machos. Assim, a importância da influência do ciclo no teste ainda não está totalmente estabelecida, podendo então essa alteração no resultado estar relacionada ou não ao ciclo estral (LOVICK; ZANGROSSI JR., 2021).

Além disso, embora dados prévios já obtidos pelo nosso grupo demonstraram que camundongos que foram submetidos ao modelo de *hiperalgesic priming* apresentam alterações em respostas relacionadas a anedonia avaliadas no teste de esguicho da sacarose (BAPTISTA-DE-SOUZA *et al.*, 2020), no presente trabalho não foi possível detectar alterações nesse comportamento, embora seja claro que quadros de dor crônica são estressores e capazes de alterar respostas de anedonia, todavia, esta ausência de efeitos nesse teste já foi observada (DA-COSTA *et al.*, 2023). Um importante aspecto a ser considerado nessa divergência de resultados pode estar relacionada a linhagem de camundongos utilizada, visto que no estudo de Baptista-de-Souza e colaboradores (2020) foram utilizados camundongos C57BL/6J e no presente trabalho camundongos Swiss Webster. Neste sentido, na literatura já existe essa correlação, onde diferentes comportamentos podem ser observados a depender da linhagem do animal (SHANKS; ANISMAN, 1988). Estes achados fortalecem a hipótese de que algumas consequências emocionais relacionadas ao processo de cronificação da dor podem demandar de períodos maiores para que possam ser observadas.

Entretanto, para a avaliação do ganho de peso foi observado que os machos e fêmeas isolados tiveram prejuízo neste parâmetro. Achados semelhantes foram observados em estudos prévios (HU *et al.*, 2017; ELIWA *et al.*, 2020; HAO *et al.*, 2001; CHIDA; SUDO; KUBO, 2005) e podem indicar que a condição de alojamento tenha promovido diminuição na ingestão da ração induzida pelo estímulo estressor do isolamento causando uma perda significativa no peso corporal.

Resultado semelhante foi observado para o estado da pelagem, em que os animais isolados (machos e fêmeas) apresentaram uma piora na qualidade do pelo, indicando assim que o isolamento social pode ser caracterizado como um estressor relevante sobre respostas emocionais, tal como previamente demonstrado em outros estudos (ELIWA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2017; DA-COSTA *et al.*, 2023). Cabe ressaltar, contudo, que esse resultado contrasta com os obtidos no teste de esguicho da sacarose em que após a aplicação de uma solução açucarada no dorso dos animais, não se observam diferenças entre os grupos para a atividade de auto-limpeza.

Em resumo os resultados obtidos neste trabalho corroboram as evidências clínicas que apontam estarem os quadros de dor crônica associados ao desenvolvimento de distúrbios afetivos (GONÇALVES *et al.*, 2008), e que o isolamento social aumenta o estresse e piora o quadro de pacientes com dor crônica (NIETO *et al.*, 2020), uma vez que foi possível observar no presente trabalho que os animais alojados isoladamente, apresentaram permanência de hipersensibilidade mecânica, além do mais os machos demonstraram uma exacerbação de respostas relacionadas a ansiedade e depressão, enquanto as fêmeas o efeito foi visto no comportamento depressivo. Cabe destacar que foi observada também a presença de dimorfismo sexual em que as fêmeas foram afetadas principalmente com um prejuízo na recuperação da lesão aguda e acentuação das respostas afetivas a dor, enquanto os machos parecem ser mais suscetíveis aos comportamentos relacionados a ansiedade, e, ainda ambos os sexos respondem a alguns aspectos que se relacionam com sintomas depressivos. Dessa forma, o isolamento social pode ser caracterizado como um estressor relevante sobre respostas emocionais nos camundongos.

Por fim, este estudo visa contribuir para que novas abordagens possam ser desenvolvidas para o tratamento de pessoas com dor crônica e que estas abordagens considerem a influência social e o sexo como variáveis para o sucesso terapêutico. E além disso, também ressalta a importância do bem-estar animal em protocolos

experimentais em que são investigadas respostas nociceptivas e comportamentais em roedores.

9 CONCLUSÃO

Dessa forma é possível concluir que o isolamento social altera as respostas sensitivas e afetivas-emocionais de modo distinto em camundongos machos e fêmeas submetidos ao protocolo de cronificação da dor. Enquanto as fêmeas estão mais suscetíveis aos aspectos afetivos da dor e apresentam um prejuízo na recuperação da lesão, os machos apresentam um perfil de aumento de respostas relacionadas à ansiedade e ambos a alguns sintomas da depressão.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEY, K. O.; MESSING, R. O.; MOCHLY-ROSEN, D.; LEVINE, J. D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 4680-4685, jun. 2000. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-12-04680.2000.
- 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.
- BEERY, A. K. Inclusion of females does not increase variability in rodent research studies. **Current Opinion on Behavioral Sciences**, v. 23, p. 143-149, out. 2018. DOI: 10.1016/j.cobeha.2018.06.016. PMCID: PMC6294461.
- BIRMÂNIA, N. E.; LEDUC-PESSAH, H.; FAN, C. Y.; TRANG, T. Modelos animais de dor crônica: avanços e desafios para tradução clínica. **Jornal de Pesquisa em Neurociências**, v. 95, p. 1242-1256, 2017. DOI: 10.1002/jnr.23768.
- BRAGA, H. R.; RODRIGUES, H. F. A experiência da dor na perspectiva psicanalítica. In: CONBRACIS, 3., 2018, Campina Grande. **Anais [...]**. Campina Grande: Realize Editora, 2018. Disponível em: <https://www.editorarealize.com.br/artigo/visualizar/40594>. Acesso em: 06 nov. 2023.
- BRANDT, L.; LIU, S.; HEIM, C.; HEINZ, A. Os efeitos do estresse do isolamento social e da discriminação na saúde mental. **Translational Psychiatry**, v. 12, p. 398, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41398-022-02178-4>.
- BRASIL. Ministério Público do Paraná. **Plus: saúde mental na era digital**. 2023. Disponível em: <https://site.mppr.mp.br/saude/Pagina/Edicao-no-1201-de-16-de-janeiro-de-2023>. Acesso em: 26 out 2023
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Transtornos mentais e adoecimento no ambiente de trabalho: como enfrentar?** 2023. Disponível em: <https://conselho.saude.gov.br/ultimas-noticias-cns/2971-27-04-live-transtornos->

mentais-e-adoecimento-no-ambiente-de-trabalho-como-enfrentar. Acesso em: 17 out 2023.

BUDÓ, M. de L. D.; NICOLINI, D.; RESTA, D. G.; BÜTTENBENDER, E.; PIPPI, M. C.; RESSEL, L. B. A cultura permeando os sentimentos e as reações frente à dor. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 41, n. 1, p. 36-43, mar. 2007. DOI: 10.1590/S0080-62342007000100005.

BURMA N.E. *et al.* Animal models of chronic pain: advances and challenges for clinical translation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 6, p. 1242-1256, 2017.

CARDINAL, P.; MONCHAUX DE OLIVEIRA, C.; SAUVANT, J. *et al.* A new experimental design to study inflammation-related versus non-inflammation-related depression in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, p. 290, 2021. DOI: 10.1186/s12974-021-02330-9.

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>.

CHIDA, Y.; SUDO, N.; KUBO, C. Social isolation stress exacerbates autoimmune disease in MRL/lpr mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 158, n. 1-2, Jan. 2005, p. 138-144. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2004.09.002.

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

COSTA, C. O. da; BRANCO, J. C.; VIEIRA, I. S.; SOUZA, L. D. de M.; SILVA, R. A. da. Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 68, n. 2, p. 92-100, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0047-2085000000232>.

DA COSTA, V. F.; RAMÍREZ, J. C. C.; RAMÍREZ, S. V.; AVALO-ZULUAGA, J. H.; BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; CANTO-DE-SOUZA, L.; PLANETA, C. S.; RODRÍGUEZ, J. L. R.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Emotional- and cognitive-like responses induced by social defeat stress in male mice are modulated by the BNST, amygdala, and

hippocampus. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 17, 2023, 1168640. DOI:10.3389/fnint.2023.1168640.

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>.

DERSH, J.; POLATIN, P. B.; GATCHEL, R. J. Chronic pain and psychopathology: research findings and theoretical considerations. **Psychosomatic Medicine**, v. 64, p. 773–786, 2002. DOI: 10.1097/01.psy.0000024232.11538.54.

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.

ELIWA, H.; BRIZARD, B.; LE GUIQUET, A. M.; HEN, R.; BELZUNG, C.; SURGET, A. Adult neurogenesis augmentation attenuates anhedonia and HPA axis dysregulation in a mouse model of chronic stress and depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 124, Feb. 2021, 105097. DOI:10.1016/j.psyneuen.2020.105097.

FEIZERFAN, A.; SHEH, G. Transição da dor aguda para crônica. **Educação Continuada em Cuidados Críticos de Anestesia e Dor**, v. 15, n. 2, abril de 2015, p. 98–102. DOI: <https://doi.org/10.1093/bjaceaccp/mku044>.

FERRARI, L. F.; BOGEN, O.; LEVINE, J. D. Second messengers mediating the expression of neuroplasticity in a model of chronic pain in the rat. *The Journal of Pain*, v. 15, n. 3, Mar. 2014, p. 312-320. DOI: 10.1016/j.jpain.2013.12.005. Epub 2014 Jan 7. PMID: 24407022; PMCID: PMC3987850.

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.

GULICK, D.; GOULD, T. J. Interactive effects of ethanol and nicotine on learning, anxiety, and locomotion in C57BL/6 mice in the plus-maze discriminative avoidancetask. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 3, p. 302-310, set. 2009. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.05.007.

GUREJE, O.; VON KORFF, M.; SIMON, G. E.; GATER, R. Persistent pain and well-being: a World Health Organization Study in Primary Care. **JAMA**, v. 280, n. 2, p. 147-151, 1998. DOI: 10.1001/jama.280.2.147. Erratum in: JAMA, v. 280, n. 13, p. 1142, 1998.

HASLER, G.; DREVETS, W. C.; MANJI, H. K.; CHARNEY, D. S. Discovering endophenotypes for major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 10, p. 1765-1781, 2004. DOI: 10.1038/sj.npp.1300506. PMID: 15213704.

HAO, S.; AVRAHAM, Y.; BONNE, O.; BERRY, E. M. Separation-induced body weight loss, impairment in alternation behavior, and autonomic tone: effects of tyrosine. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 68, n. 2, Feb. 2001, p. 273-281. DOI: 10.1016/s0091-3057(00)00448-2.

HOTTA, G. H.; OLIVEIRA, A. S. de; ALAITI, R. K.; REIS, F. J. J. dos. Abordagem terapêutica para o medo e a evitação relacionados à dor em adultos com dor musculoesquelética crônica: uma revisão integrativa e um roteiro para médicos. **Brazilian Journal of Pain**, v. 5, n. 1, p. 72-79, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20220015>.

HU, C.; LUO, Y.; WANG, H.; KUANG, S.; LIANG, G.; YANG, Y.; MAI, S.; YANG, J. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **PLoS One**, v. 12, n. 9, e0185129, 20 set. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0185129.

ISINGRINI, E.; CAMUS, V.; LE GUIQUET, A.; PINGAUD, M.; DEVERS, S.; BELZUNG, C. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: a model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS ONE**, v. 5, 2010.

JENNINGS, E. M.; OKINE, B. N.; ROCHE, M.; FINN, D. P. Stress-induced hyperalgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 121, p. 1-18, out. 2014. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2014.06.003. Epub 2014 Jul 8. PMID: 25010858.

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

KARAYANNIS, N. V.; BAUMANN, I.; STURGEON, J. A.; MELLOH, M.; MACKEY, S. C. The impact of social isolation on pain interference: a longitudinal study. **Annals of Behavioral Medicine**, v. 53, n. 1, p. 65-74, 2019. DOI: 10.1093/abm/kay017.

KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Evidências adicionais de mudanças na capacidade de resposta dos neurônios somatossensoriais em ratos artríticos: um estudo da região intralaminar posterior do tálamo. **Pesquisa Cerebral**, v. 323, p. 144-147, 1984.

KLEIN, A. M.; MAZUTIS, L.; AKARTUNA, I.; TALLAPRAGADA, N.; VERES, A.; LI, V.; PESHKIN, L.; WEITZ, D. A.; KIRSCHNER, M. W. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 1187-1201, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.044>.

KNIGHT, P.; CHELLIAN, R.; WILSON, R.; BEHNOOD-ROD, A.; PANUNZIO, S.; BRUIJNZEEL, A. W. Sex differences in the elevated plus-maze test and large open field test in adult Wistar rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 204, May 2021, 173168. DOI: 10.1016/j.pbb.2021.173168.

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.

LIU, Y.; YANG, L.; YU, J.; ZHANG, Y.-Q. Persistent, comorbid pain and anxiety can be uncoupled in a mouse model. **Physiology & Behavior**, v. 151, p. 55-63, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.07.004>.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOVICK, T. A.; ZANGROSSI JR., H. Effect of estrous cycle on behavior of females in rodent tests of anxiety. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, 2021, 711065. DOI: 10.3389/fpsy.2021.711065.

MARTIN, L. J.; TUTTLE, A. H.; MOGIL, J. S. The interaction between pain and social behavior in humans and rodents. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 20, p. 233-250, 2014. DOI: 10.1007/7854_2014_287.

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.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, v. 17, n. 4, p. 159-174, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-65642006000400009>.

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.

NIETO, R.; PARDO, R.; SORA, B.; FELIU-SOLER, A.; LUCIANO, J. V. Impacto das medidas de bloqueio da COVID-19 em espanhóis com dor crônica: uma pesquisa de estudo online. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, p. 3558, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm9113558>.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Depressão**. [2023]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/depressao#:~:text=A%20depress%C3%A3o%20%C3%A9%20a%20principal,e%20psicol%C3%B3gicos%20eficazes%20para%20depress%C3%A3o>. Acesso em 20 nov. 2023

PEIXOTO, H. G.; EVASCONCELOS, I. A. L.; SAMPAIO, A. C. M.; ITO, M. K.. Antidepressivos e alterações no peso corporal. **Revista De Nutrição**, v. 21, n. 3, p. 341–348, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732008000300009>

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, 1985. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7).

PLANCHEZ, B.; SURGET, A.; BELZUNG, C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. **Journal of Neural Transmission (Vienna)**, v. 126, n. 11, p. 1383-1408, nov. 2019. DOI: 10.1007/s00702-019-02084-y.

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.

PUGLISI-ALLEGRA, S.; OLIVERIO, A. Social isolation: effects on pain threshold and stress-induced analgesia. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 19, n. 4, p. 679-681, 1983. DOI: 10.1016/0091-3057(83)90344-1.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 12, p. 611-618, dez. 2009. DOI: 10.1016/j.tins.2009.07.007.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207449.

ROCHA, L. **Pesquisas apontam aumento nos casos de depressão no Brasil**. CNN, 2022. Disponível em: <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/pesquisas-apontam-aumento-nos-casos-de-depressao-no-brasil/>. Acesso em: 15 out. 2023

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995. DOI: 10.1016/0091-3057(95)00138-m.

SARTI, C. A. A dor, o indivíduo e a cultura. **Saúde e Sociedade**, v. 10, n. 1, p. 3-13, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-12902001000100002>.

SHANKS, N.; ANISMAN, H. Stressor-provoked behavioral changes in six strains of mice. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 6, p. 894-905, dez. 1988. DOI: 10.1037//0735-7044.102.6.894.

TAVARES, L. R. R.; PETRILLI, L. A.; BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; CANTO-DE-SOUZA, 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.

TERENGHI, G.; KINGHAM, P. J. Autonomic neuroplasticity and regeneration. In: ADELMAN, G.; SMITH, B. H. (ed.). **Encyclopedia of Neuroscience**. 3rd ed. Elsevier BV, 2009. p. 1017-1021.

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.

TRINDADE, H. I. *et al.* Dor: mecanismos envolvidos na sua transmissão e recursos terapêuticos aplicados à sua inibição. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 7, n. 4, p. 6–18. Disponível em: <https://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/582>.

TSANG, A.; VON KORFF, M.; LEE, S.; ALONSO, J.; KARAM, E.; ANGERMEYER, M. C.; BORGES, G. L.; BROMET, E. J.; DEMYTTENEARE, K.; DE GIROLAMO, G.; DE GRAAF, R.; GUREJE, O.; LEPINE, J. P.; HARO, J. M.; LEVINSON, D.; OAKLEY BROWNE, M. A.; POSADA-VILLA, J.; SEEDAT, S.; WATANABE, M. Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders. **The Journal of Pain**, v. 9, n. 10, p. 883-91, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.05.005>.

WALF, A.; FRYE, C. O uso do labirinto em cruz elevado como um ensaio de comportamento relacionado à ansiedade em roedores. **Nature Protocols**, v. 2, p. 322–328, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.

WANG, W.; SHI, W.; QIAN, H.; DENG, X.; WANG, T.; LI, W. Stellate ganglion block attenuates chronic stress induced depression in rats. **PLoS One**, v. 12, n. 8, e0183995, 31 ago. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0183995. Washington (DC): National Academies Press (EUA); 1987. 7, A Anatomia e Fisiologia da Dor. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK219252/>

YALCIN, I.; AKSU, F.; BELZUNG, C. Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. **European Journal of Pharmacology**, v. 514, n. 2-3, p. 165-174, 2005. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.03.029. PMID: 15910803.

ZHANG, C.; ZHOU, X.; ZHOU, X. Effect of acute brief social isolation on visceral pain. **Journal of Pain Research**, v. 15, p. 3547-3553, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2147/JPR.S378244>.