

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JÁDINA SANTOS VIEIRA DOMINGUES

**TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO AUMENTA A
SENSIBILIDADE À DOR POR REDUZIR A MODULAÇÃO DESCENDENTE
SEROTONINÉRGICA E NORADRENÉRGICA**

Alfenas/MG

2020

JÁDINA SANTOS VIEIRA DOMINGUES

TRANSTORNO DO ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO AUMENTA A SENSIBILIDADE
À DOR POR REDUZIR A MODULAÇÃO DESCENDENTE
SEROTONINÉRGICA E NORADRENÉRGICA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociência e comportamento. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Cardoso Vilela Giusti
Coorientador Prof. Dr.: Guilherme Rabelo de Souza

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Domingues, Jádina Santos Vieira

D671t Transtorno do estresse pós-traumático aumenta a sensibilidade à dor por
reduzir a modulação descendente serotoninérgica e noradrenérgica. / Jádina
Santos Vieira Domingues. – Alfenas, MG, 2021.
89 f.: il. –

Orientadora: Fabiana Cardoso Vilela Giusti.

Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal
de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Transtornos de Estresse Pós-Traumáticos. 2. Serotonina. 3. Noradrenalina.
4. Nocicepção. I. Giusti, Fabiana Cardoso Vilela. II. Título.

CDD- 617

JÁDINA SANTOS VIEIRA DOMINGUES

Transtorno do estresse pós-traumático aumenta a sensibilidade à dor por reduzir a modulação descendente serotoninérgica e noradrenérgica

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em: 15 de dezembro de 2020

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti .

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Luciana Maria dos Reis

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Anderson Luiz Bezerra da Silveira

Instituição: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

UFRRJ

Profa. Dra. Fernanda Crunfli

Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

UNICAMP



Documento assinado eletronicamente por **Giovane Galdino de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 17/12/2020, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria dos Reis, Professor do Magistério Superior**, em 18/12/2020, às 11:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Cardoso Vilela Giusti, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 11:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Crunfli, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anderson Luiz Bezerra da Silveira, Usuário Externo**, em 30/12/2020, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0438538** e o código CRC **397B5017**.

Dedico à Deus, Autor de tudo e à minha família: pais, irmã e marido que me apoiaram durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Com todas as forças e de todo o meu coração sou grata a Deus pela saúde, motivação, força, paz, momentos de crescimento pessoal e espiritual e por me sustentar até aqui. Pela alegria, recomeços, por seu grande amor, por bênçãos, pelos dias de sol e chuva e por ser meu refúgio e segurança em todo tempo.

Aos meus pais Beatriz e Vander que amo sem medida, que são minha inspiração, orgulho, incentivo, por me ajudarem de todas as formas possíveis me amparando, apoiando, mostrando a direção e o caminho e me instruindo com sabedoria, lealdade e paz. Minha gratidão é infinita por terem feito e ainda fazerem isso sempre, permanecendo com um caráter impecável, refletindo em todo tempo a luz de Jesus. Obrigada por acreditarem em mim e que eu era capaz, por me levantarem e por estarem literalmente do meu lado sendo meus maiores amigos me dando conforto, estabilidade, paz e amor. Eu não consigo agradecer por tudo que fizeram e fazem por mim!

À minha irmã Laila por ser sempre tão dedicada, inteligente, honesta e me mostrar que sempre é possível conquistar o que sonhamos. Essas características tão nobres que a definem me inspiraram e não me deixaram desistir nem fraquejar nos momentos difíceis. Te amo desde a barriga da mamãe!

Ao meu marido Paulo Henrique Domingues pelo amor, compreensão e carinho, por sonhar e vibrar comigo de emoção a cada conquista, por sofrer comigo todos os momentos de angústia, por trazer alegria e risadas tornando os dias mais leves e alegres, por me fazer crescer como profissional, mulher e esposa.

A minha orientadora professora Dr^a Fabiana Cardoso Vilela Giusti que me acolheu tão bem e prontamente no laboratório me dando primeiramente o presente de uma amizade concreta fazendo com que nossa relação desde o princípio fosse inabalável. Desde o mestrado já era minha maior inspiração profissional! Sou imensamente grata por trazer de volta meu amor pela ciência e pela pesquisa, por me mostrar um universo cheio de oportunidades e crescimento científico e pessoal, por não deixar que eu me frustrasse, por proporcionar momentos de alegria, reconhecimento e aprendizado. Pelos trabalhos paralelos que me fizeram crescer e enxergar o universo científico e experimental com olhos mais abertos e aptos a aprender mais, por criar um grupo forte e unificado que se ajuda e permanece sempre unido independente das afinidades. Esses quatro anos realmente foram o céu para

mim. Foi maravilhoso aprender cada técnica que levarei para a vida. Você me mostrou na prática e na teoria que evidências científicas podem ser construídas com educação, conversa, muito estudo, empenho e dedicação. Você literalmente me orientou, me mostrou o alvo e não deixou que eu desistisse, me reconhecendo, motivando, dando esperança e acreditando que seria possível. Obrigada pela confiança em mim, na minha postura na bancada e pelo incentivo na escrita para que eu pudesse crescer. Sou grata pelos cafés, pelos abraços carinhosos, pela amizade, pela orientação, pelos conselhos e principalmente pela paciência. Os prêmios e menções honrosas que ganhamos só nos mostram o quanto somos fortes juntas e que estamos no caminho certo. A lição que levarei para a vida com certeza será: ‘Não importa o que aconteceu com você, mas o que você fez com o que aconteceu.’ Minha imensa gratidão por tudo!

Ao professor Dr Alexandre Giusti Paiva por abrir as portas do Laboratório de Fisiologia Translacional, me acolher com confiança, respeito e muitos ensinamentos. Sua paixão pela ciência com certeza motiva todos ao seu redor. Obrigada por aprimorar na prática ou em uma simples conversa as técnicas, leituras, planejamentos e sets experimentais.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa que aceitaram o convite colaborando para a finalização do trabalho.

A profa e amiga Dra Bruna Kalil que se dispôs a ensinar, ajudou muito prontamente na imunohistoquímica, doou anticorpos, tirou dúvidas frequentemente e me acalmou com muita alegria e paz inúmeras vezes. Agradeço pela amizade sólida, leal e pelos vários cafés e chás que tomamos juntas. Isso me revigorou e curou!

Agradeço às amigas sempre presentes no lab pela parceria e pelos cafés sensacionais pra relaxar: Bárbara e Cintia (também pelas aventuras) Carol, Maria, Tati, e as que tanto me ensinaram no mestrado: Layla e Mara. Também aos pós graduandos e colegas da pós. Aos amigos da vida que sempre me incentivam e me dão força: Bruna Tuia, Ana Paula, Aristela, Karen, Daiana, Ana Matumoto e Ellen.

Ao técnico José por todo carinho e cuidado com os animais e com o laboratório.

À secretária, Adriana, que sempre com muito zelo resolveu todos os problemas e esclareceu todas as dúvidas.

Aos animais roedores criados sabiamente por Deus, que nos permitem estudar de forma ética e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todos que de uma forma ou outra participaram para que o trabalho fosse concluído, meu muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Nunca deixe que ninguém diga que você não pode fazer alguma coisa. Se você tem um sonho, corra atrás dele." À procura da felicidade

"O vencedor sabe que o caminho da vitória é longo, mas nunca tira os olhos da meta." Provérbio japonês

RESUMO

Estresses psicológicos crônicos têm afetado grande parte da população mundial, promovendo mudanças negativas a curto e a longo prazo. Um tipo de estresse que vem sendo estudado é a PTSD (*Post Traumatic Stress Disorder*) ou Desordem do Estresse Pós-Traumático, caracterizada por alterações psiquiátricas crônicas desencadeadas após uma experiência traumática. Dentre as principais características clínicas dessa desordem, destacam-se o medo, isolamento social, depressão e ansiedade, reduzindo de alguma forma a sensibilidade nociceptiva. A fisiopatologia dessas manifestações envolve déficits de serotonina e noradrenalina, responsáveis também pela modulação na via descendente modulatória da dor. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos verificar o desenvolvimento da PTSD em animais expostos ao choque, avaliar a resposta nociceptiva desses animais e investigar o envolvimento e participação da via descendente modulatória da dor. Antes de iniciarem os experimentos, os procedimentos experimentais foram previamente encaminhados e obtiveram aprovação do CEUA da UNIFAL-MG com protocolo nº50/2016. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, submetidos ao choque de 0,8 mA por 5 vezes aleatórias seguido por isolamento social. Para indução da PTSD, os animais foram reexpostos à caixa indutora de choque sob retenção e isolamento social por 7, 14 e 21 dias, divididos em grupos diferentes. Para confirmação do desenvolvimento da PTSD foi avaliado o comportamento em *freezing* e realizados os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, interação social, memória, avaliação do número de bolos fecais e peso das glândulas adrenais. Para avaliação do limiar nociceptivo e mecânico, foram realizados os testes de formalina e Von Frey com filamentos. Para o estudo da participação do sistema descendente inibitório da dor, foram utilizadas Fluoxetina e Desipramina administradas por via intratecal previamente ao teste de formalina. Após os testes, os animais foram perfundidos e o Núcleo Dorsal da Rafe, *Locus Coeruleus* (LC) e medula espinal (L4-L6) foram dissecados para imunohistoquímica para avaliar o número de neurônios imunorreativos para c-Fos, triptofano hidroxilase c-Fos/triptofano hidroxilase, c-Fos/tirosina hidroxilase respectivamente. Nossos resultados demonstraram um aumento do tempo em *freezing* dos animais expostos ao choque quando comparados aos não expostos, aumento do tempo de permanência nos braços fechados frente ao teste de labirinto em cruz elevado, redução da interação social, prejuízo nas memórias

de curta e longa duração, aumento do número do peso das glândulas adrenais e do número de bolos fecais quando comparados ao grupo não exposto ao choque. Observamos ainda uma redução da distância percorrida nos animais expostos ao choque sob retenção de 21 dias quando comparados aos não expostos. Os animais com PTSD apresentaram diminuição do limiar mecânico e aumento da sensibilidade à dor em todos os períodos de retenção nos testes de Von Frey com filamentos e formalina respectivamente, quando comparados aos seus respectivos controles. Foi observado que os animais com PTSD demonstraram uma diminuição do número de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos e proteína c-fos imunorreativas no Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus* respectivamente. Além disso, foi avaliado o número de ativações neuronais no corno dorsal da medula espinal e observado uma redução do número de c-FOS ativados. Diante de todos os dados apresentados, conclui-se que a Desordem do Estresse Pós Traumático (PTSD) aumentou a sensibilidade à dor através da redução da atividade de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos no Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus* respectivamente e através da redução da ativação neuronal (c-FOS no corno dorsal da medula espinal, possivelmente influenciando na via descendente modulatória da dor.

Palavras-chave: PTSD. Serotonina. Noradrenalina. nocicepção.

ABSTRACT

Chronic psychological stresses have affected a large part of the world's population, promoting negative changes in the short and long term. One type of stress that has been studied is PTSD (*Post Traumatic Stress Disorder*), characterized by chronic psychiatric changes triggered after a traumatic experience. Among the main clinical characteristics of this disorder are fear, social isolation, depression and anxiety, reducing in some way the nociceptive sensitivity. The pathophysiology of these manifestations involves deficits of serotonin and noradrenalin, also responsible for modulation in the modulatory descending path of pain. Thus, the present work aimed to verify the development of PTSD in animals exposed to shock, to evaluate the nociceptive response of these animals and to investigate the involvement and participation of the modulatory pathway of pain. Before starting the experiments, the experimental procedures were previously forwarded and obtained approval from the CEUA of UNIFAL-MG with protocol nº50/2016. Male Wistar rats were used, submitted to 0.8 mA shock for 5 random times followed by social isolation. For PTSD induction, the animals were re-exposed to the shock inducing box under restraint and social isolation for 7, 14 and 21 days, divided into different groups. To confirm the development of PTSD, the behavior in freezing was evaluated and open field tests, high cross labyrinth, social interaction, memory, evaluation of the number of fecal cakes and weight of adrenal glands were performed. For evaluation of the nociceptive and mechanical threshold, formalin and Von Frey tests with filaments were performed. For the study of the participation of the descending inhibitory pain system, Fluoxetine and Desipramine administered intratecal before the formalin test were used. After the tests, the animals were perfused and the Dorsal Nucleus of Rafe, Locus Coeruleus (LC) and spinal cord (L4-L6) were dissected for immunohistochemistry to evaluate the number of immunoreactive neurons for c-Pos, tryptophan hydroxylase c-Pos/tryptophan hydroxylase, c-Pos/tyrosine hydroxylase respectively. Our results showed an increase in freezing time of animals exposed to shock when compared to those not exposed, an increase in the time spent in closed arms in front of the high cross labyrinth test, a reduction in social interaction, damage in short and long lasting memories, an increase in the number of adrenal glands weight and in the number of fecal cakes when compared to the group not exposed to shock. We also observed a reduction in the distance traveled in animals exposed to shock under 21 days of

retention when compared to those not exposed. The animals with PTSD showed a decrease in the mechanical threshold and increased sensitivity to pain in all retention periods in the Von Frey tests with filaments and formalin respectively, when compared to their respective controls. It was observed that the animals with PTSD showed a decrease in the number of serotonergic and noradrenergic neurons and c-fos immunoreactive protein in the Dorsal Nucleus of Rafe and Locus Coeruleus respectively. In addition, the number of neuronal activations in the dorsal spinal cord was evaluated and a reduction in the number of activated c-FOS was observed. In view of all the data presented, it was concluded that Post-traumatic Stress Disorder (PTSD) increased pain sensitivity by reducing the activity of serotonergic and noradrenergic neurons in the Dorsal Nucleus of Rafe and Locus Coeruleus respectively and by reducing neuronal activation (c-FOS in the dorsal horn of the spinal cord, possibly influencing the modulatory descending pathway of pain.

Keywords: PTSD. Serotonin. Noradrenalin. nociception.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Vias centrais de modulação nociceptiva e suas projeções para o corno dorsal da medula espinal.....	23
Figura 2 -	Fluxograma evidenciando fatores internos e externos do trauma.....	24
Figura 3 -	Receptores e neurotransmissores envolvidos na via descendente modulatória no processo de modulação da dor...	25
Figura 4 -	Representação cronológica – experimento 1.....	30
Figura 5 -	Representação cronológica – experimento 2.....	31
Figura 6 -	Representação cronológica – experimento 3.....	32
Figura 7 -	Avaliação do comportamento em <i>freezing</i> dos animais expostos e não expostos ao choque os períodos de retenção de 7, 14 e 21 dias	41
Figura 8 -	Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado	42
Figura 9 -	Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de campo aberto.....	43
Figura 10 -	Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de interação social.....	44
Figura 11 -	Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina a sob retenção de 7 dias.....	45
Figura 12 -	Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina a sob retenção de 14 dias....	45
Figura 13 -	Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina a sob retenção de 21 dias.....	46
Figura 14 -	Avaliação do tempo em <i>freezing</i> dos animais expostos e não expostos ao choque nos períodos de retenção de 7,14 e 21 dias.....	47
Figura 15 -	Avaliação do número de bolos fecais dos animais expostos e não expostos ao choque nos períodos de retenção de 7,14 e 21 dias.....	48

Figura 16 - Avaliação do peso das glândulas adrenais dos animais expostos e não expostos ao choque nos períodos de retenção de 7,14 e 21 dias.....	49
Figura 17 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de memória de curta duração.....	50
Figura 18 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de memória de longa duração.....	51
Figura 19 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de Von Frey com filamentos após 7 dias de retenção.....	52
Figura 20 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de Von Frey com filamentos após 14 dias de retenção.....	53
Figura 21 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de Von Frey com filamentos após 21 dias de retenção.....	54
Figura 22 - Avaliação do tempo em <i>freezing</i> dos animais expostos e não expostos ao choque nos períodos de retenção de 14 dias.....	55
Figura 23 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de campo aberto no período de retenção de 14 dias.....	56
Figura 24 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de interação social.....	57
Figura 25 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina sob retenção de 14 dias nos tempos de 0 a 5 até 25 a 30 minutos.....	59
Figura 26 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina sob retenção de 14 dias nos tempos de 30 a 35 até 55 a 60 minutos.....	60
Figura 27 - Tempo total de <i>flinches</i> dos animais expostos e não expostos ao choque durante 60 minutos no teste de formalina.....	61

Figura 28 -	Representação gráfica imuno-histoquímica de neurônios serotoninérgicos no Núcleo Dorsal da Rafe de ratos dos grupos não choque e choque.....	62
Figura 29-	Fotomicrografias representativas do Núcleo Dorsal da Rafe de ratos do grupo não choque e choque.....	63
Figura 30 -	Representação gráfica imuno-histoquímica de neurônios noradrenérgicos no <i>Locus Coeruleus</i> de ratos dos grupos não choque e choque.....	64
Figura 31-	Fotomicrografias representativas do <i>Locus Coeruleus</i> de ratos do grupo não choque e choque.....	64
Figura 32 -	Representação gráfica imuno-histoquímica de c-FOS no corno dorsal da medula espinal de ratos dos grupos não choque e choque.....	65
Figura 33-	Fotomicrografias representativas do corno dorsal da medula espinal de ratos do grupo não choque e choque.....	66

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

5HT1	- 5-hidroxitriptofano
CEUA	- Comissão de ética no uso animal
CFA	- Complet Freund's Adjuvant
EPM	- Erro Padrão da Média
EUA	- Estados Unidos da América
G	- Gramas
H	- Horas
Hz	- Hertz
IASP	- International Association for the Study of Pain
L4	-4ª Vértebra Lombar
L6	- 6ª Vértebra Lombar
MG	- Minas Gerais
mg/kg	- Miligrama por kilo
Min	- Minutos
Mm	- Milímetro
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS.....	28
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	ANIMAIS.....	29
4.2	DELINEAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
4.2.1	Avaliação do desenvolvimento da PTSD e da sensibilidade à dor no teste de formalina nos tempos de retenção de 7, 14 e 21 dias.....	29
4.2.2	Avaliação do desenvolvimento da PTSD e da sensibilidade à dor no teste de von frey nos tempos de retenção de 7, 14 e 21 dias.....	30
4.2.3	Avaliação da atividade serotoninérgica e noradrenérgica na resposta à sensibilidade à dor no teste de formalina e na via descendente modulatória da dor no núcleo dorsal da rafe e <i>Locus Coeruleus</i> respectivamente.....	31
4.3	EXPOSIÇÃO AO CHOQUE PARA INDUÇÃO DA PTSD.....	32
4.3.1	Avaliação do comportamento em <i>freezing</i>	33
4.4	LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	33
4.5	CAMPO ABERTO.....	33
4.6	INTERAÇÃO SOCIAL.....	34
4.7	TESTE DE FORMALINA.....	34
4.8	AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE BOLOS FECALIS.....	35
4.9	RECONHECIMENTO DE OBJETOS (MEMÓRIA) DE CURTA E LONGA DURAÇÃO.....	35
4.10	TESTE DE VON FREY COM FILAMENTOS.....	36
4.11	AVALIAÇÃO DO PESO DAS GLÂNDULAS ADRENAIS.....	36
4.12	DROGAS UTILIZADAS.....	36
4.13	ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL.....	37
4.14	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	37
5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39

6	RESULTADOS.....	40
6.1	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS EXPOSTOS E NÃO EXPOSTOS AO CHOQUE, SOB ISOLAMENTO SOCIAL E RETENÇÃO POR 7, 14 e 21 DIAS.....	40
6.1.1	Avaliação do comportamento em <i>freezing</i>	40
6.1.2	Labirinto em Cruz Elevado.....	41
6.1.3	Campo Aberto.....	42
6.1.4	Interação Social.....	43
6.1.5	Teste de Formalina.....	44
6.1.6	Avaliação do comportamento em <i>freezing</i>	47
6.1.7	Avaliação do número de bolos fecais.....	37
6.1.8	Avaliação do peso das glândulas adrenais.....	48
6.1.9	Memória de reconhecimento de objetos – curta duração.....	49
6.1.10	Memória de reconhecimento de objetos – longa duração.....	50
6.1.11	Teste de Von Frey.....	51
6.2	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS EXPOSTOS E NÃO EXPOSTOS AO CHOQUE, SOB ISOLAMENTO SOCIAL E RETENÇÃO POR 14 DIAS.....	54
6.2.1	Avaliação do comportamento em <i>freezing</i>	54
6.2.2	Campo Aberto.....	55
6.2.3	Interação Social.....	56
6.2.4	Teste de formalina após a administração intratecal de salina ou fluoxetina ou desipramina avaliados a cada 5 minutos por 60 minutos.....	57
6.2.5	Teste de formalina após a administração intratecal de salina ou fluoxetina ou desipramina avaliados por 60 minutos totais.....	61
6.3	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	62
6.3.1	Avaliação da atividade serotoninérgica no Núcleo Dorsal da Rafe.....	62
6.3.2	Avaliação da atividade noradrenérgica no <i>Locus Coeruleus</i>	63
6.3.3	Avaliação da atividade neuronal através de c-FOS no corno dorsal da medula espinal.....	65
7	DISCUSSÃO.....	67
8	CONCLUSÃO.....	79

REFERÊNCIAS	80
ANEXOS.....	88

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o estresse tem afetado mais de 80% da população mundial, gerando mudanças a curto e longo prazo, alterações neuropsicológicas e imunes, comprometendo atividades cerebrais e diversos sistemas (BATISTA; BIANCHI, 2006). Esses comprometimentos são refletidos em desordens, síndromes e afecções, como desordens psíquicas, metabólicas e algias musculoesqueléticas, alterando a sensibilidade à dor. Há uma estreita relação entre estresse e dor, sendo que o estresse crônico promove hiperalgesia, enquanto o estresse agudo é capaz de desencadear respostas analgésicas (IMBE; IWAI- LIAL; SEMBA, 2006).

No desenvolvimento fisiopatológico do estresse, há a participação do sistema endócrino, primordialmente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. No estresse, inúmeras são as situações que podem ser consideradas traumáticas. Dentre os vários tipos de estresse, pode-se citar o Transtorno do Estresse Pós Traumático (TEPT), também conhecido como Desordem do Estresse Pós-Traumático ou *Post Traumatic Stress Disorder* (PTSD), que é uma desordem psiquiátrica crônica, desencadeada após uma experiência ou evento traumático como violência, ataques terroristas, guerras territoriais, combates bélicos, acidentes automobilísticos ou que envolvam risco de vida, desastres naturais, assaltos, estupros, entre outros (YEHUDA, R., *et al*, 2015).

Atualmente, a pandemia causada pelo novo coronavírus COVID-19 entrou para o grupo dos fatores desencadeantes e potenciais para desenvolvimento da Desordem do Estresse Pós Traumático, não só pelas implicações de alterações da saúde mental e física, mas pelas consequências causadas pelo isolamento social e efeito quarentena, como depressão, ansiedade, desemprego, falta de recursos financeiros e mantimentos, diminuição da imunidade e aumento de doenças respiratórias, além de outros impactos psicossociais causados (VINDEGAARD, N.; BENROS, M., 2020; SHUJA, K., *et al.*, 2020).

A Desordem do Estresse Pós Traumático começou a ser estudada durante a Segunda Guerra Mundial após soldados e veteranos de guerra apresentarem os mesmos sintomas de isolamento social, intrusão, tristeza, sintomas depressivos, medo, taquicardia e ansiedade. Os estudos concentraram-se também em refugiados, militares e indivíduos que passaram por grandes experiências traumáticas como violência sexual, acidentes automobilísticos e assaltos. Dessa forma, as pesquisas

tiveram a finalidade de aprofundar e elucidar os mecanismos e fisiopatologia envolvidos nessa desordem (SCHESTATSKY, *et al.*, 2003).

Sabe-se diante disso, que há uma estreita relação entre 3 sintomas frequentes, formando a tríade da PTSD, que são: o estresse causado pela reexposição ao trauma, a fuga de situações semelhantes às anteriores que levaram ao desenvolvimento da desordem e o estado de hipervigilância; além de alterações no humor e cognição, anedonia e alterações no ciclo e ritmo circadiano interferindo no sono (BERARDI *et al.*, 2014). Indivíduos com Estresse Pós Traumático além de apresentarem desordens psiquiátricas e psicossomáticas concomitantes, são mais propensos a cometerem suicídio, experimentarem instabilidades emocionais, fazer uso e abuso de substâncias, apresentar comportamentos impulsivos e automutilações (PACE, T.; HEIM, C., 2001; YEHUDA, R., 2015). Juntamente com tais manifestações clínicas já mencionadas, a PTSD está associada ao aumento das taxas de desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos como depressão, ansiedade, psicose e outros distúrbios como disfunções musculoesqueléticas, cardiovasculares, respiratórias e dor (DASKALAKIS, N.; YEHUDA, R.; DIAMOND, D., 2013).

É possível ainda, destacar o prejuízo na consolidação de memórias, especialmente a memória espacial. Contudo, a memória ligada ao trauma e à fonte estressora são bem estabelecidas e evitadas (WILGENFELD *et al.*, 2016).

Os mecanismos pelos quais a PTSD se desenvolve ainda não estão bem estabelecidos. Entretanto, Wang *et al* (2018), por meio de seu estudo, ressaltou que a fisiopatologia da PTSD envolve um *feedback* excessivo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA), assim como um desequilíbrio biológico entre as áreas dos circuitos de medo no córtex pré frontal medial (mCPF), no hipocampo e amígdala. Além disso, tem sido estudado que o fator genético pode estar envolvido no desenvolvimento ou manutenção do trauma, sendo considerado um fator de risco da desordem (SAAREN, J., 2014). Alguns marcadores genéticos estão sob investigação, incluindo o transportador do gene de serotonina (transportador de 5-hidroxitriptamina/5-HTT) e seu gene SLC6A4, bem como genes associados ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A importância do gene relativo à serotonina se dá à evidência do seu papel na modulação à sensibilidade ao estresse e à vulnerabilidade à psicopatologia (NAVARRO-MATEU, F., *et al.*, 2013).

Destacando o aspecto translacional, em humanos, existem sinais clínicos peculiares ao desenvolvimento do PTSD, assim como em roedores. Sabe-se que em

roedores há uma forte tendência ao comportamento de *freezing* (paralisação ou 'congelamento' dos movimentos) quando reexpostos ao momento de estresse vivenciado anteriormente, além da diminuição da interação social. Esse comportamento remete-se à ativação intacta da memória relacionada ao trauma (BERARDI *et al.* 2014).

Em indivíduos, o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, (DSM-5) definiu e padronizou os critérios que devem embasar o diagnóstico da PTSD: 1- Exposição a um evento traumático; 2- Revivência frequente do evento traumático através de *flashbacks*, pesadelos ou situações associadas ao trauma; 3- Fuga persistente de estímulos associados ao trauma; 4- Mudanças negativas na cognição e humor, bem como outros efeitos indiretos, tais como aumento da irritabilidade, insônia, diminuição da capacidade de concentração e da interação social; 5- Resposta exagerada ao susto e hipervigilância; 6- Os sintomas apresentados devem ser persistentes ao longo do tempo; 7- Os sintomas devem afetar substancialmente o funcionamento do indivíduo; 8- Outros fatores que podem causar tais sintomas devem ser excluídos.

Um modelo experimental reconhecido para indução da PTSD, além da exposição ao odor de gato, é o choque elétrico inescapável, onde os animais são expostos a pequenos choques aleatórios e isolados socialmente em caixas individuais. Para que a desordem seja estabelecida, é necessário que os animais sejam reexpostos ao local do trauma, gerando mudanças plásticas e neurofisiológicas. Dessa forma, os animais não mostram apenas respostas aos estímulos associados ao trauma, mas comportamentos excessivos e respostas fisiológicas intensas relacionadas ao estresse, chamadas de sensibilização (STAM, 2007).

Durante esse processo, algumas reações estão associadas, como o sentimento de medo. Este é bem representado no comportamento de indivíduos e animais com PTSD, sendo caracterizado por uma resposta natural a ameaças, desencadeando alterações fisiológicas com o objetivo de evitar o perigo. Sendo assim, a patogênese da desordem também inclui mudanças fisiológicas negativas no desenvolvimento de memória e de outras desordens emocionais, como os comportamentos depressivos e ansiosos (TREZZA; CAMPOLONGO, 2013).

Patologias psicossomáticas são responsáveis por provocar um déficit funcional de monoaminas como serotonina e noradrenalina nos principais sistemas e circuitos envolvidos nos processos de memória e cognição. Essas monoaminas exercem

efeitos de modulação e integração de atividades corticais e subcorticais estando envolvidas em processos básicos como controle do sono, atividade psicomotora, humor e controle da dor. Dessa forma, o sistema monoaminérgico se origina em pequenos núcleos do tronco cerebral e mesencéfalo, projetando-se para o córtex e sistema límbico, responsável pela modulação das emoções e comportamentos sociais (LAFER; VALLADA FILHO, 1999).

Existem alguns poucos estudos demonstrando que há uma relação entre estresse e dor no modelo de indução do estresse pós traumático, porém pouco se sabe sobre como o estresse interfere frente a resposta e modulação da sensibilidade dolorosa (IMBE; IWAI-LIAL; SENBA, 2006; LIU, *et al.*, 2019; TORRES, *et al.*, 2003; YAMASHITA, *et al.*, 2013).

Como já mencionado anteriormente, a dor é um sintoma presente em indivíduos com PTSD (PHIFER, *et al.*, 2011). Até o presente momento, resultados contrastantes foram obtidos entre estudos sobre estresse crônico e agudo em relação a dor. Estressores agudos, por exemplo, reduzem a dor em um fenômeno chamado antinocicepção induzida por estresse pela ativação do sistema opióide. De forma antagônica, o estresse crônico promove hiperalgesia, sendo que o fator estresse facilita a transmissão do processo doloroso através da sensibilização neuronal. Acredita-se, no entanto, que a magnitude, duração e natureza do estressor sejam fatores coadjuvantes para a produção de hiperalgesia induzida por estresse (YAMASHITA, *et al.*, 2013).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2020), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à danos reais ou potenciais aos tecidos. A definição também abrange terminologias que afirmam que a dor é sempre uma experiência pessoal influenciada por fatores biológicos, psicológicos e sociais. Além disso, a IASP também pontua observações importantes sobre a dor:

- A dor e a nocicepção são fenômenos diferentes, sendo que a dor pode ser inferida a partir da atividade de neurônios sensoriais;
- Através de suas experiências de vida, os indivíduos aprendem o conceito de dor;
- O relato sobre dor de um indivíduo deve ser respeitado;
- Embora a dor geralmente tenha um papel adaptativo, ela pode ter um efeito adverso sobre a função e o bem-estar social e psicológico;

- A descrição verbal é apenas um de vários comportamentos que podem expressar a dor;

A incapacidade de se comunicar não nega a possibilidade de que um humano ou um animal experimentem a dor em algum momento de suas vidas (RAJA, S. *et al*, 2020).

Existem alguns fenômenos que participam do processo de interpretação da dor, que são: transdução, transmissão e modulação. O processo de transdução é iniciado após um estímulo nocivo ativar receptores altamente específicos para dor, denominados nociceptores. Essas terminações nervosas livres localizadas ao longo da pele, tecidos e órgãos, conduzem o estímulo às fibras aferentes primárias C e A δ , presentes nos processos de transdução e transmissão do impulso, sendo fibras aferentes ou ascendentes, traduzindo o estímulo em potencial de ação. Então, este impulso ascende, atingindo o corno dorsal da medula, passando por vias neoespinotalâmicas e paleoespinotalâmicas onde chegará ao córtex somatosensorial para ser interpretado como estímulo doloroso. A partir desse fenômeno, as vias descendentes modulatórias da dor são ativadas fazendo com que haja a modulação, ativação do arco reflexo quando necessário e interrupção desse estímulo. As monoaminas têm um papel excepcional na modulação e controle da dor. Essas incluem a serotonina, noradrenalina e dopamina que agem por vias com diferentes subtipos de receptores para exercer uma complexa modulação da liberação desses neurotransmissores em resposta à nocicepção, através da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal da medula espinal (JI, 2008).

Quando de caráter inflamatório, a dor caracteriza-se por uma inflamação local ou lesão tecidual acompanhada pela presença e liberação de mediadores químicos e inflamatórios como bradicinina, histamina, substância P, leucotrieno, tromboxano e ativação de citocinas pró inflamatórias como TNF α , IL-6 por sinalização de macrófagos (JI *et al.*, 2004). Estudos demonstram que a dor inflamatória em animais pode ser induzida pela administração intraplantar de carragenina, CFA (Adjuvante Completo de Freund composto por *Mycobacterium Tuberculosis*), ou formalina (ALLEN, A., CORTRIGHT, D., MCCARSON, K., 2003).

Relacionando o estresse com a alteração do limiar nociceptivo e a resposta dolorosa, Torres *et al.*, (2003) demonstraram que a exposição de ratos Wistar ao estresse crônico promoveu hiperalgesia no teste de *tail flick* (teste de retirada da cauda). Semelhantemente, o estudo de Liu *et al.*, (2019) mostrou que animais

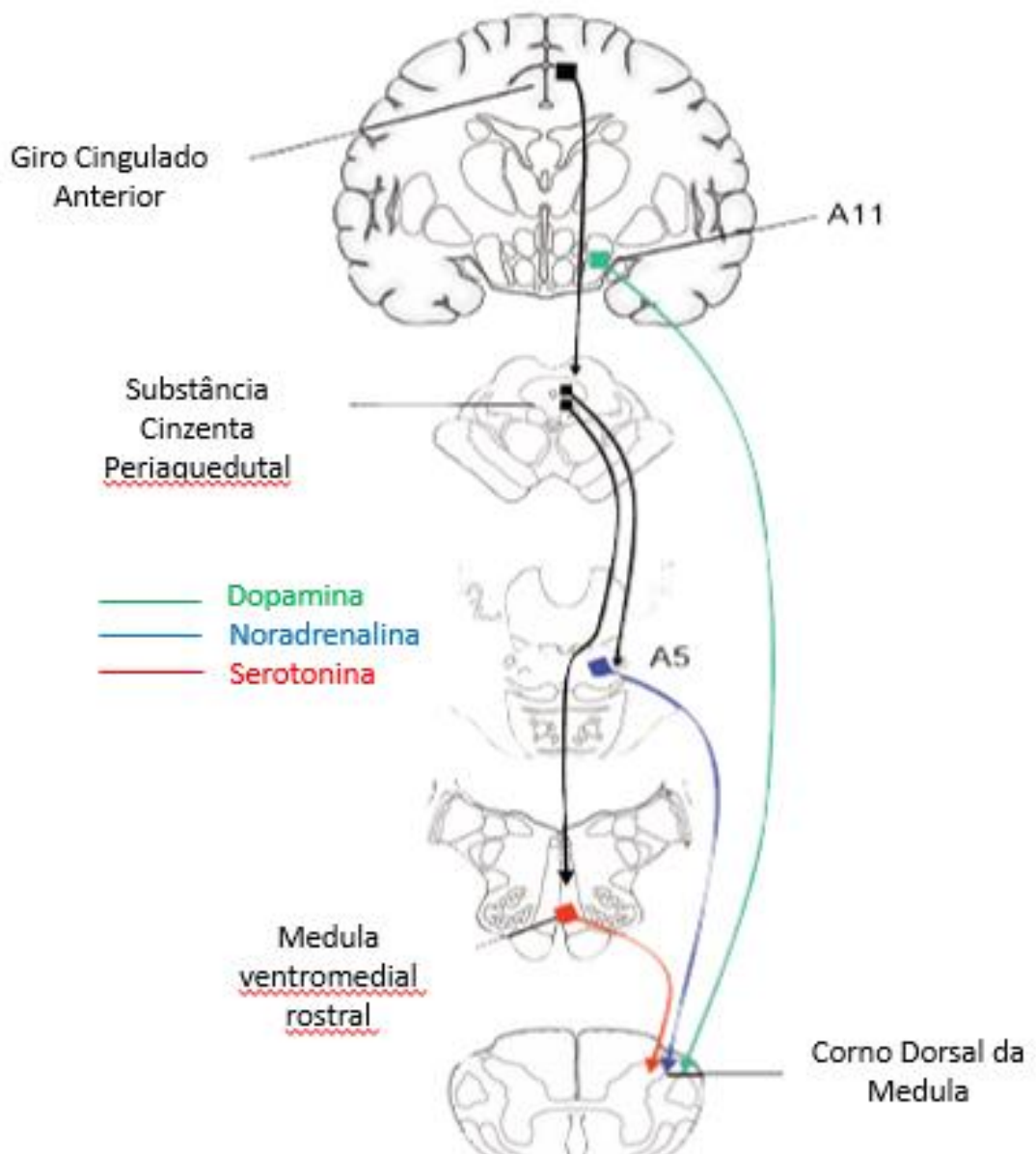
submetidos ao estresse crônico após o nado forçado, apresentaram uma diminuição do limiar nociceptivo no teste de Hargreaves, que emitia um feixe de luz infra vermelho na pata de animais estressados, assim como Quintero *et al* (2000) no teste de placa quente no mesmo modelo de estresse crônico. Diante disso, é de grande relevância elucidar os fatos relacionados ao estresse crônico, à PTSD e a dor.

De acordo com Jong *et al.* (2016), há uma relação direta entre distúrbios depressivos e a dor, sendo que indivíduos com depressão apresentam um limiar doloroso mais baixo, ou seja, sentem mais dor, quando comparados à indivíduos que não apresentam essa desordem. Evidências sugerem que a dor é um sintoma comum em indivíduos que apresentam estresses crônicos como a PTSD, e que esses indivíduos podem apresentar comprometimentos músculoesqueléticos, síndromes musculares, fibromialgia e algumas comorbidades associadas à PTSD. Experimentalmente, quando animais apresentaram alguns sintomas da PTSD observou-se uma redução do limiar nociceptivo, sendo tratados posteriormente com antidepressivos inibidores de recaptção de serotonina e noradrenalina, obtendo um efeito significativo de reversão (MURAI, 2015). Sabe-se, então, que o estresse é capaz de modificar respostas e modulações nociceptivas. Há, portanto, uma evidência que a Desordem do Estresse Pós Traumático e a dor atuem em comorbidade através da manutenção contínua e formação de um ciclo vicioso. Asmundson, *et al.*, (2002) concentraram seus estudos afirmando que a dor atua como um lembrete do evento traumático que aciona *flashbacks* e lembranças relacionadas ao trauma. Sintomas da PTSD como insônia são capazes de atuar na diminuição do limiar doloroso. Além disso, a desordem também está associada à comorbidades como dor crônica, dor músculoesquelética, dor gastrointestinal, além de distúrbios cardiometabólicos (SAREEN, J., 2014; YEHUDA, R.,2015).

As manifestações fisiológicas em animais, especialmente roedores, são semelhantes às manifestações clínicas. Segundo Stam R. (2007), o estresse pode alterar a sensibilização à dor de alguma forma. Embora os mecanismos pelos quais isso ocorra ainda sejam obscuros, sabe-se que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal assim como alguns neurotransmissores como serotonina, noradrenalina, dopamina e neuropeptídeo y podem estar envolvidos de alguma forma modulando fisiologicamente essas respostas. A serotonina e noradrenalina, assim como a dopamina, desempenham um papel fundamental na modulação nociceptiva, ao ponto de que essa modulação ocorre por vias monoaminérgicas descendentes.

As vias demonstradas abaixo na figura 1, podem inibir ou facilitar a informação nociceptiva a nível de corno dorsal. Do bulbo ventromedial rostral (RVM) incluindo o núcleo magno da rafe e o núcleo magnocelular reticular originam-se neurônios serotoninérgicos que se projetam para o corno dorsal da medula espinal. De forma semelhante, do *Locus Coeruleus* (LC) provém a inervação noradrenérgica projetando-se para o corno dorsal. Além disso, da substância cinzenta periaquedutal (PAG) partem projeções para o LC e do RVM tendo a função de modular informações (BENARROCH, 2008).

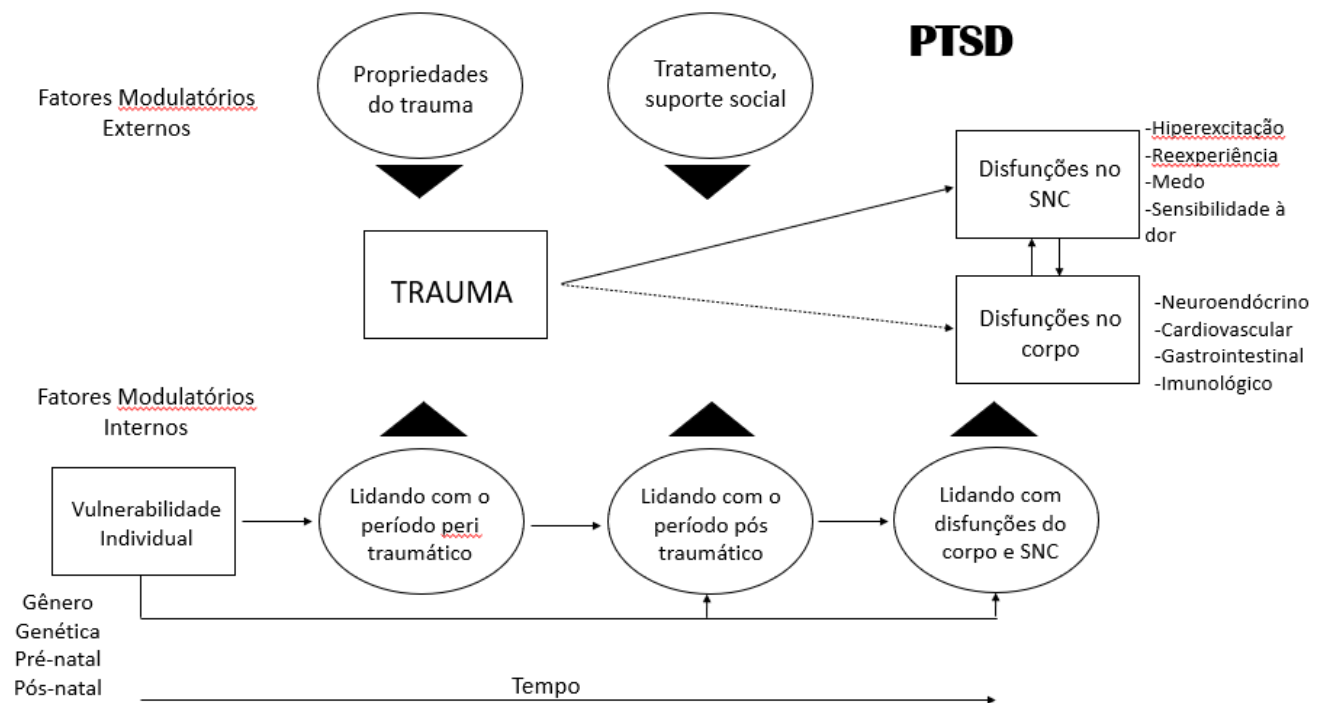
Figura 1 - Vias centrais de modulação nociceptiva e suas projeções para o corno dorsal da medula espinal.



FONTE: Adaptado de BENARROCH, 2008.

Retomando às evidências, é possível observar na figura 2, modificada de Stam (2007), que há uma relação entre fatores que precedem ao trauma e respostas à reação ao evento traumático, demonstrando alterações na sensibilidade e limiar nociceptivo resultando em uma síndrome de distúrbios fisiológicos envolvendo o Sistema Nervoso Central.

Figura 2 - Fluxograma evidenciando fatores internos e externos do trauma e suas respectivas respostas



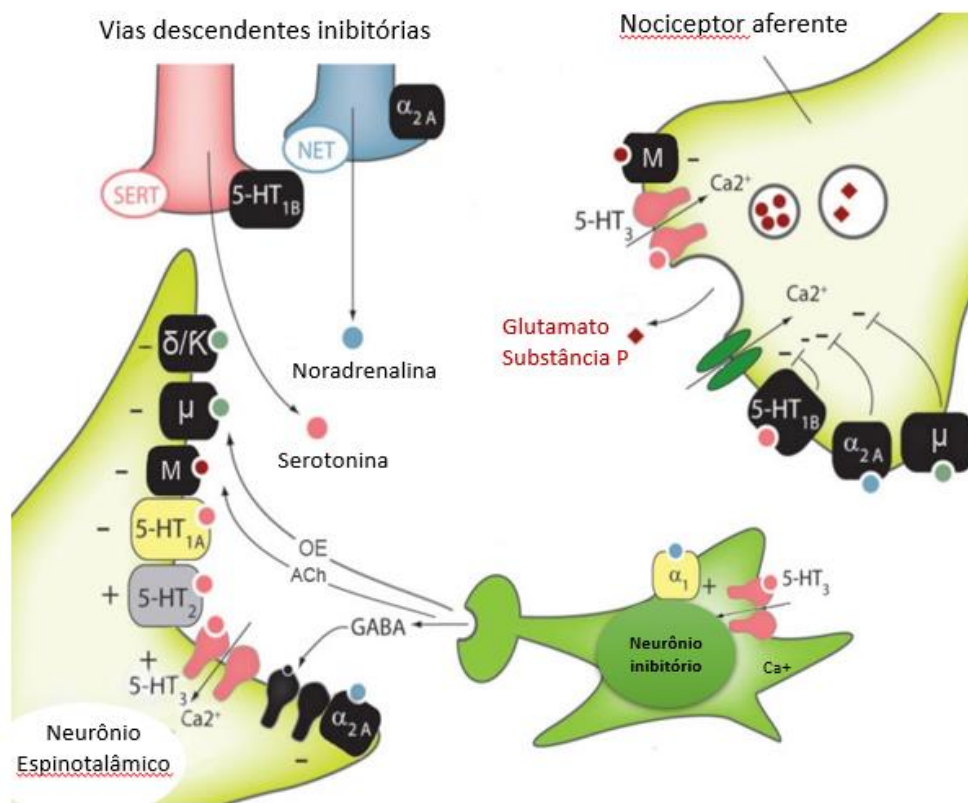
FONTE: Modificado de STAM, R. 2007

Os vários tipos de estresse são capazes de alterar o sistema monoaminérgico em algum ponto gerando um desequilíbrio que pode acarretar em complicações na ativação do sistema descendente inibitório da dor, contribuindo para uma hiperexcitabilidade da via de transmissão supra espinal, resultando em dor persistente (MURAI, *et al.*, 2015).

A serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) apresentam um papel modulador essencial nesse processo. Uma vez liberadas por neurônios, por exemplo, do Núcleo Rostromedial ou pelo *Locus Coeruleus* respectivamente, podem atuar nas fibras aferentes primárias reduzindo a liberação de neurotransmissores como o glutamato. Além disso, a 5-HT e/ou NA ligam-se em seus receptores em interneurônios inibitórios e com isso estimulam a liberação de neurotransmissores como ácido gama-

aminobutírico (GABA) que hiperpolarizará neurônios de segunda ordem do trato espinotalâmico. Os interneurônios inibitórios podem também liberar outros neurotransmissores como acetilcolina (ACh) e opioides que atuam em receptores muscarínicos no caso da ACh e em receptores mu, kappa e delta (μ , κ e δ) no caso dos opióides, inibindo também a atividade dos neurônios do trato espinotalâmico. Por fim, a 5-HT e/ou NA exercem seus efeitos modulatórios por atuar diretamente em receptores pós-sinápticos de neurônios do trato espinotalâmico inibindo a atividade desses neurônios reduzindo a resposta nociceptiva como ilustrado na figura abaixo (BENARROCH, 2008).

Figura 3 - Receptores e neurotransmissores envolvidos na via descendente modulatória no processo de modulação da dor.



Fonte: modificado de BENARROCH, 2008.

Diante da descrição das alterações comportamentais e manifestações clínicas envolvidas na PTSD citadas acima, e reforçando nossa hipótese que a desordem possa comprometer a transmissão serotoninérgica e noradrenérgica alterando o limiar nociceptivo em resposta à diferentes estímulos, há a necessidade de aprofundar os

estudos e elucidar os mecanismos pelos quais a relação de animais com PTSD e alterações no limiar nociceptivo estão envolvidos. Nosso estudo até o presente momento é o único proposto a avaliar a resposta à dor em animais submetidos à PTSD em animais induzidos por choques aleatórios inescapáveis, com o intuito de investigar a participação da via descendente modulatória da dor nesse processo. Portanto, um déficit de aminas biogênicas no Sistema Nervoso Central presente em animais com PTSD pode causar um aumento da sensibilização e uma supressão das vias descendentes modulatórias, possibilitando uma amplificação central da dor (BLASCO-SERRA *et al.*, 2015).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a participação serotoninérgica e noradrenérgica na via descendente modulatória da dor nas regiões do Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus* respectivamente, e ativação neuronal da proteína c-fos no corno dorsal da medula espinal de animais com e sem PTSD.

2 JUSTIFICATIVA

A Desordem Do Estresse Pós Traumático (PTSD) acomete mais de dois terços da população que já enfrentou experiências traumáticas em algum momento da vida, sendo a quarta desordem psiquiátrica mais desenvolvida no mundo. Essa desordem implica em muitos aspectos de saúde relacionados à qualidade de vida, incluindo funções psicossociais e estilos de vida estressantes, sendo um grande fator de risco para o desenvolvimento de depressão, ansiedade, transtornos psíquicos e disfunções monoaminérgicas (TREZZA; CAMPOLONGO, 2013). É conhecido que as monoaminas como a serotonina e noradrenalina participam ativamente da modulação da via descendente modulatória da dor. Diante disso, tendo conhecimento dos efeitos fisiológicos e impactos sociais que a PTSD desencadeia, propusemos avaliar neste estudo se a PTSD foi capaz de alterar a sensibilidade à dor de ratos adultos, e como essa alteração impactaria nas vias descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas no Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus* respectivamente, e se impactaria também na ativação neuronal no corno dorsal da medula espinal.

Diante da escassez de estudos na literatura que demonstrem a influência da PTSD na sensibilidade à dor, os mecanismos pelos quais essas alterações ocorrem, e o aspecto translacional, ressalta-se a importância desse estudo.

3 OBJETIVOS

A seguir serão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos do presente trabalho.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da via descendente modulatória da dor, avaliar a ativação neuronal e atividade de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos nas seguintes estruturas: Núcleo Dorsal da Rafe, *Locus Coeruleus* respectivamente e ativação neuronal por meio da proteína c-FOS no corno dorsal da medula espinal de animais com e sem PTSD.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o comportamento de *freezing* em animais expostos (PTSD) e não expostos ao choque sob o período de retenção de 7, 14 e 21 dias;
- b) Avaliar o comportamento tipo ansioso, atividade locomotora, comportamento de interação social e memória de reconhecimento de objetos de curta e longa duração dos animais expostos (PTSD) e não expostos ao choque sob o período de retenção de 7, 14 e 21 dias;
- c) Avaliar o número de bolos fecais e peso das glândulas adrenais em animais expostos (PTSD) e não expostos ao choque sob o período de retenção de 7, 14 e 21 dias;
- d) Avaliar a resposta nociceptiva dos animais expostos (PTSD) e não expostos ao choque sob o período de retenção de 7, 14 e 21 dias;
- e) Avaliar o limiar mecânico dos animais expostos (PTSD) e não expostos ao choque sob o período de retenção de 7, 14 e 21 dias;
- f) Avaliar se a fluoxetina e desipramina alteram a sensibilidade à dor induzida pela PTSD no teste de formalina;
- g) Avaliar a atividade serotoninérgica e noradrenérgica de animais com e sem PTSD no Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus* respectivamente e avaliar a ativação neuronal através da proteína c-FOS no corno dorsal da medula espinal após o teste de formalina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo seguem as metodologias referente à amostra e procedimentos utilizados.

4.1 ANIMAIS

Este trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) – Universidade Federal de Alfenas com protocolo número 50/2016. Foram utilizados ratos *Wistar* provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas, com peso de 250g e idade aproximada de 7 semanas, mantidos em ambiente com temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$, com ciclo de luz claro (7:00 às 19:00) e escuro (19:00 às 7:00) com água e ração *ad libitum*.

4.2 DELINEAMENTOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Abaixo serão descritos os grupos experimentais 1, 2 e 3.

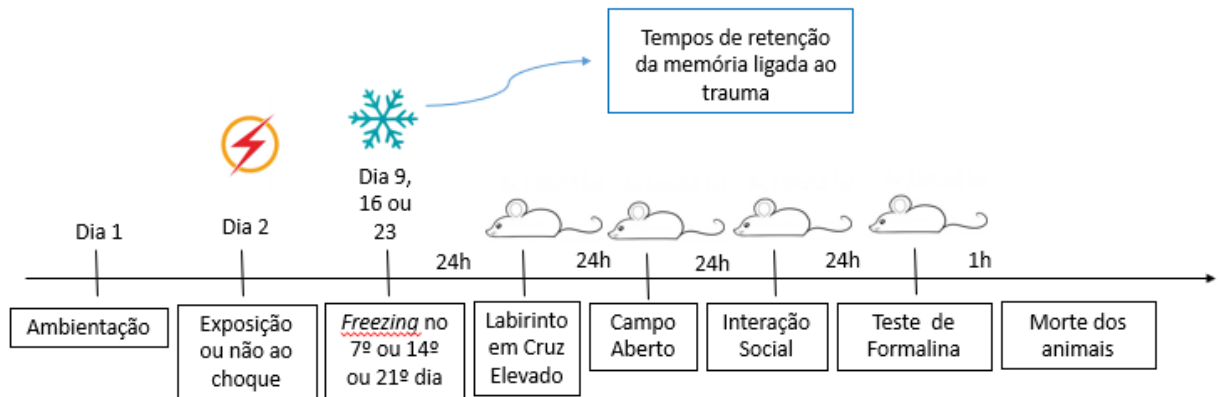
4.2.1 Avaliação do desenvolvimento da PTSD e da sensibilidade à dor no teste de formalina nos tempos de retenção de 7, 14 e 21 dias

O **grupo experimental 1** foi composto por 6 grupos de 8 animais cada: grupos choque e não choque sob retenção de 7 dias, choque e não choque sob retenção de 14 dias e choque e não choque sob retenção de 21 dias. Cada grupo de animais passou pelos mesmos testes comportamentais em seus respectivos períodos de retenção. Primeiramente foram ambientados na caixa indutora de choque por 5 minutos. No dia seguinte, foram expostos a 5 choques inescapáveis aleatórios de 8mA e 2 ms para indução da PTSD. Logo em seguida foram isolados socialmente em caixas individuais e permaneceram pelo tempo de retenção determinado previamente. O grupo não choque passou pelos mesmos procedimentos, porém não foi exposto ao choque. No 7º, 14º ou 21º dia, os animais foram inseridos na caixa indutora de choque, porém sem levar choque, com o intuito de avaliar o comportamento em *freezing*, relativo à ativação da memória ligada ao trauma.

No dia seguinte, os animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado, no próximo dia, ao teste de campo aberto, no dia seguinte, ao teste de

interação social e no último dia ao teste de formalina, seguido pela morte dos animais. Abaixo, encontra-se a representação cronológica relativa ao experimento 1:

Figura 4 - Representação cronológica – experimento 1

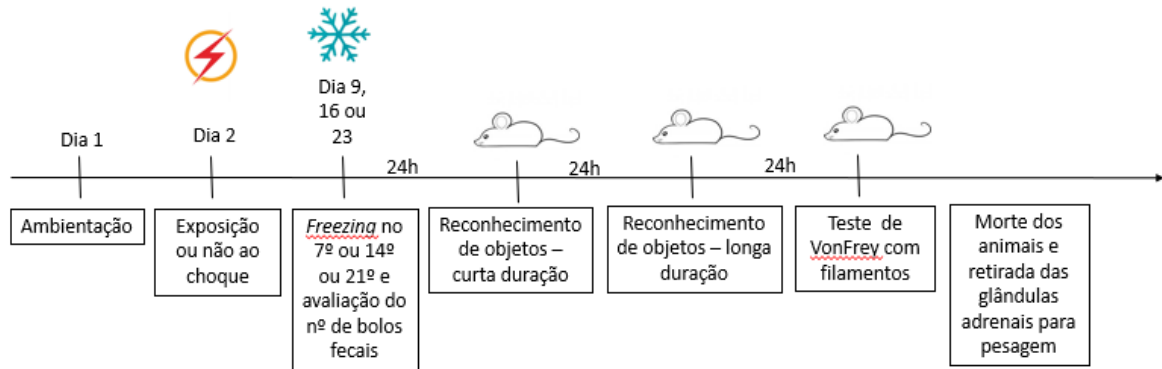


FONTE: DA AUTORA

4.2.2 Avaliação do desenvolvimento da PTSD e da sensibilidade à dor no teste de von frey nos tempos de retenção de 7, 14 e 21 dias

O **grupo experimental 2** foi composto por 6 grupos de 16 animais cada: grupos choque salina e choque carragenina e grupos não choque salina e não choque carragenina, sob retenção de 7, 14 e 21 dias. O protocolo de choque foi mantido, e, da mesma forma, no 7º, 14º ou 21º dia, os animais foram avaliados quanto ao comportamento em *freezing* e avaliação do número de bolos fecais simultaneamente. No dia seguinte, os animais foram ambientados no aparato de campo aberto por 10 minutos para o teste de reconhecimento de objetos de curta duração (memória) no dia subsequente. 24 horas após, foram submetidos ao teste de memória de longa duração e por fim, no dia seguinte foram submetidos ao teste de Von Frey com filamentos. Antes do sacrifício, os animais dos grupos choque e não choque salina, tiveram suas glândulas adrenais retiradas e pesadas. Logo em seguida todos os outros animais foram sacrificados. Abaixo, é possível acompanhar a representação cronológica referente ao experimento 2:

Figura 5 - Representação cronológica – experimento 2



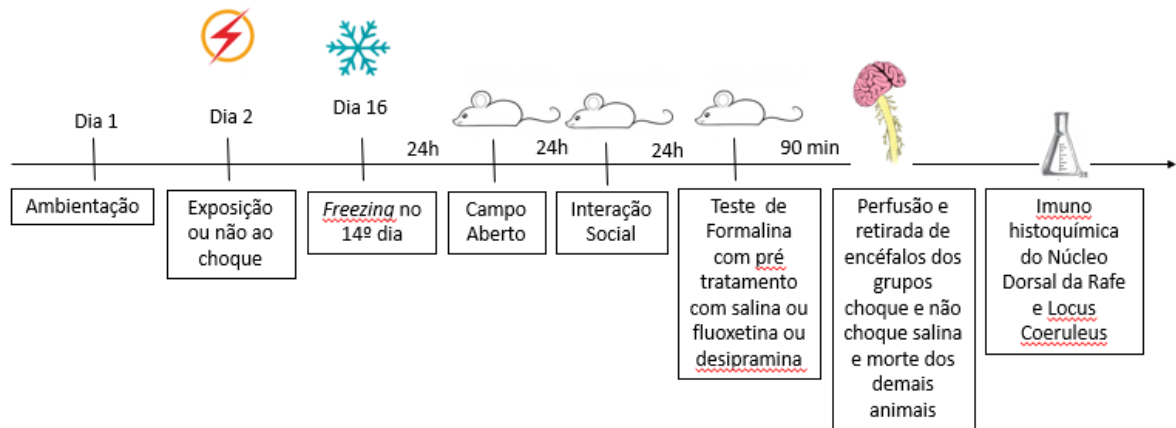
FONTE: DA AUTORA

4.2.3 Avaliação da atividade serotoninérgica e noradrenérgica na resposta à sensibilidade à dor no teste de formalina e na via descendente modulatória da dor no núcleo dorsal da rafe e *locus coeruleus* respectivamente

O **grupo experimental 3** foi composto por 6 grupos de 8 animais cada: grupos choque salina e não choque salina, choque fluoxetina e não choque fluoxetina, choque desipramina e não choque desipramina e permaneceram sob retenção 14 dias. O protocolo de choque foi mantido e no 14º dia os animais foram avaliados quanto ao comportamento em *freezing*. No dia seguinte, foram submetidos ao teste de campo aberto, no dia seguinte, interação social e no último dia, foram submetidos ao teste de formalina com pré tratamento por via intratecal de salina ou fluoxetina ou desipramina. Após 1 hora e 30 minutos do teste, os animais dos grupos choque salina e não choque salina foram anestesiados e perfundidos para coleta dos encéfalos e medulas espinais. Posteriormente, os cérebros foram cortados e foi realizada a técnica de imunohistoquímica do Núcleo Dorsal da Rafe, *Locus Coeruleus* respectivamente e medula espinal. Os demais animais foram sacrificados logo após o término do teste de formalina.

Por último, encontra-se a figura que representa cronologicamente o experimento 3.

Figura 6 - Representação cronológica – experimento 3



FONTE: DA AUTORA

4.3 EXPOSIÇÃO AO CHOQUE PARA INDUÇÃO DA PTSD

Para indução do estresse pós-traumático, foi seguido o protocolo de Berardi *et al.* (2013). Os animais foram inseridos individualmente na caixa de choque por cinco minutos um dia antes do teste, para habituação. No dia seguinte os animais foram levados um a um para a sala em que foram habituados e colocados na caixa indutora. Nos primeiros dois minutos, os animais não receberam choque, assim como no último minuto. Durante os três minutos intermediários, foram aplicados cinco choques aleatórios de 0,8 mA e 2 segundos de duração. Os animais não expostos ao choque passaram pelos mesmos procedimentos e permaneceram pelo mesmo tempo na caixa indutora, porém sem receber os choques. A cada animal a caixa foi limpa com álcool 5%.

Ao final do processo experimental todos os animais foram mantidos isolados socialmente em caixas individuais com ração e água disponíveis à vontade. O isolamento social faz parte do protocolo de choque de Berardi *et al.* (2013) e permite o desenvolvimento adequado da desordem do estresse pós traumático.

Abaixo estão descritos os testes comportamentais utilizados durante os experimentos do presente estudo.

4.3.1 Avaliação do Comportamento em *Freezing*

Para que o estresse pós-traumático fosse induzido, os animais permaneceram em caixas isoladas e foram avaliados quanto ao tempo em que permaneceram no comportamento de *freezing* dentro da caixa de indução, sendo reexpostos à mesma situação e contexto traumáticos, e avaliados por 10 minutos, no 7^o, 14^o ou 21^o dias após o choque, sendo que para cada dia analisado foram grupos distintos de animais.

4.4 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

O labirinto em cruz elevado consiste em um aparato suspenso do chão, com dois braços fechados, dois braços abertos e uma plataforma central. Ao início do teste, cada animal foi colocado de frente para um dos braços fechados, na plataforma central e filmado durante cinco minutos consecutivos na ausência do experimentador. O parâmetro comportamental analisado foi o tempo de permanência nos braços fechados. Após o experimento com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5% (BORTOLATO, *et al.* 2006).

Este teste é conhecido como preditivo para mensurar comportamento tipo ansioso em animais segundo File (2001) e foi realizado para verificar se os animais que estão desenvolvendo PTSD apresentam transtorno de ansiedade ou comportamento tipo ansioso, sendo está uma característica clínica presente em animais que apresentam a desordem.

4.5 CAMPO ABERTO

O aparato consiste em uma arena circular acrílica com diâmetro de 60cm e paredes com 50cm de altura, com o piso dividido em quadrantes dos quais oito áreas junto as paredes do aparato são consideradas periféricas e as quatro áreas restantes consideradas centrais. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e filmado por cinco minutos, na ausência do experimentador, para posterior análise. Foi registrado o tempo de imobilidade em segundos e a distância percorrida em metros para avaliação da atividade locomotora/exploratória (VALLE, F., 1970).

Após cada animal ser exposto ao teste, o aparato foi limpo com álcool 5%. As análises comportamentais foram realizadas utilizando o programa *EthoVision XT*

versão 9.0 um sistema de observação computadorizado que é capaz de realizar rastreamento, análise e reconhecimento comportamental por meio da análise dos vídeos (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001).

4.6 INTERAÇÃO SOCIAL

O teste de interação social baseia-se na avaliação comportamental de dois animais no aparato de campo aberto. De acordo com File e Hyde (1979), a frequência e o tempo gasto pelos animais em diferentes tipos de interação social pode ser classificada em comportamentos agressivos como agarrar, chutar, boxear ou morder e comportamentos não agressivos como cheirar, perseguir e realizar *grooming*.

Este teste foi realizado para verificar a sociabilidade dos animais, uma vez que animais que apresentam a desordem de estresse pós-traumático apresentam uma diminuição da interação social (FILE, S., SETH, P. 2003). Durante o teste foi observado o comportamento e tempo total de interação social de cada animal testado.

No dia anterior ao teste, os animais foram habituados ao aparato por 10 minutos e no dia do teste um animal intruso pesando cerca de 100 g a menos que o animal teste foi colocado na arena, sem que este fosse irmão do animal avaliado. Então, os mesmos foram filmados por 10 minutos.

4.7 TESTE DE FORMALINA

O teste de formalina foi realizado com base em diluições de Han et al. (2012), sendo a concentração de 5% de formaldeído diluído em solução salina em um volume de 50µl administrados por via intraplantar na pata direita traseira de cada animal.

As avaliações foram realizadas baseadas no número de *flinches* (reflexos de retirada da pata) dos animais, sendo avaliados a cada 5 minutos por 60 minutos totais. A fase 1 do presente teste (fase aguda ou neurogênica) refere-se aos primeiros 5 minutos e a fase 2 (inflamatória) a partir de 15 minutos até o fim do teste. (GONG, N. et al, 2014).

4.8 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE BOLOS FECAIS

A avaliação do número de bolos fecais foi realizada juntamente com a avaliação do tempo em *freezing* (reexposição) durante o experimento 2 após os períodos de retenção de 7, 14 e 21 dias. O objetivo da avaliação foi verificar possíveis respostas do Sistema Nervoso Autônomo, refletidas em aumento do número de bolos fecais mediante situações de medo, estresse ou perigo. Um número elevado demonstra comportamento preditivo de ansiedade (McFADDEN; HOOKER, 2019).

4.9 RECONHECIMENTO DE OBJETOS (MEMÓRIA) DE CURTA E LONGA DURAÇÃO

O teste de memória de reconhecimento de objetos foi realizado por meio do aparato de campo aberto. Um dia antes do teste, os animais foram habituados ao aparato por 10 minutos. No dia seguinte, foram posicionados na arena e apresentados a cada animal 2 objetos de formas idênticas (A e B), aguardando-se a exploração desses, por 10 minutos. A memória de curta duração foi verificada após 2 horas quando o objeto B foi retirado, e um novo objeto de forma diferente (C) foi apresentado ao animal. A memória de longa duração foi verificada 24 horas após, quando o objeto C foi retirado e outro novo objeto, de forma diferente (D) foi apresentado ao animal. Os animais foram filmados durante 10 minutos para posteriores análises. Foram considerados como parâmetros de avaliação o tempo de exploração de cada objeto (familiar e novo) e o índice de reconhecimento (IR), calculado de acordo com a equação $IR = TEC / TEA + TEC$ para memória de curta duração e $IR = TD / TEA + TED$ para memória de longa duração, sendo TEA (tempo de exploração do objeto A; TEC (tempo de exploração do objeto C) e TED (tempo de exploração do objeto D).

4.10 TESTE DE VON FREY COM FILAMENTOS

A avaliação do limiar mecânico dos animais foi realizada por meio de filamentos de VonFrey (North Coast Medical, Inc. Morgan Hill, CA) que expressam quantidades crescentes de massa dos filamentos determinadas em gramas (CHAPLAN et al., 1994).

O teste consiste em inserir os animais em caixas de acrílico individuais, posicionadas sobre uma tela de arame, proporcionando acesso a pata dos animais. Os mesmos permanecem em ambientação por aproximadamente 20 minutos. Por meio dos filamentos, estimula-se perpendicular e diretamente a pata dos animais, por um período de 3 segundos ou até que apresentem reação de *flinch* ou reflexo de retirada da pata. Nesse método, aproximadamente 6 avaliações, com intervalos de 10 segundos foram realizadas, considerando os 3 valores mais próximos. A ausência de resposta do animal a um determinado filamento levou à utilização de outro filamento de maior massa, até que ocorresse a resposta de retirada. Havendo retirada, um filamento de menor massa foi aplicado. A resposta à alodinia é quantificada após a realização da média de três medidas repetidas, segundo Goldman, et al (2010).

4.11 AVALIAÇÃO DO PESO DAS GLÂNDULAS ADRENAIS

A avaliação do peso das glândulas adrenais foi realizada com o objetivo de verificar a hipertrofia e aumento da densidade das mesmas. Em situações de estresse crônico, glicocorticóides são liberados de forma excessiva, podendo hipertrofiar as adrenais. Com esse objetivo de avaliar, foi considerado o peso bruto das glândulas (WILSON, et al. 2013).

4.12 DROGAS UTILIZADAS

a) Formalina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA); 5% diluída em solução salina estéril 0,9%, em um volume de 50µl administrada via intraplantar (Munro, G., 2009).

b) Carragenina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); diluída em salina estéril 0,9%, 10µg/100µL administrada via intraplantar na para direita traseira (adaptado de Amdekar, S., et al, 2012).

c) Fluoxetina – Inibidor da recaptção de 5-TH (Sigma, St. Louis, MO, USA) dose de 12 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ diluída em salina estéril 0,9%, em um volume de 10 μl (da Silva et al., 2013).

d) Desipramina – Inibidor da recaptção de noradrenalina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) dose de 12 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ diluída em salina estéril 0,9%, em um volume de 10 μl (da Silva et al., 2013).

4.13 ADMINISTRAÇÃO INTRATECAL

As injeções via intratecal foram realizadas imediatamente antes do teste de formalina, em animais ligeiramente anestesiados por inalação de isoflurano com auxílio de uma agulha hipodérmica 25-G 1". Com a coluna vertebral lombar arqueada, a agulha foi introduzida no espaço subaracnóide medular, perfurando a região medial entre as vértebras L5-L6 num ângulo de 45°. Um movimento lateral repentino da cauda foi indicativo de que a agulha atingiu a localização correta. Um volume de 10 μL foi injetado cuidadosamente com uma seringa de Hamilton e a agulha foi mantida alguns segundos após a injeção para que não houvesse perda da solução injetada. Cada animal recebeu somente uma injeção intratecal de salina, desipramina ou fluoxetina e aqueles animais que não recuperaram a consciência imediatamente após a injeção ou tiveram algum comprometimento motor observado, foram excluídos do experimento (da Silva et al., 2013).

4.14 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para avaliar a atividade de neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos foi realizada a técnica de imunohistoquímica das regiões do *Locus Coeruleus* e Núcleo Dorsal da Rafe respectivamente. Foi utilizada a mesma técnica para avaliar a ativação neuronal através da expressão da proteína c-fos no corno dorsal da medula espinal.

Após 90 minutos da injeção de formalina, os animais foram anestesiados profundamente com tribromoetanol (250 mg / kg). Foi realizada a perfusão intracardíaca com 250 ml de solução fria de NaCl a 0,9% contendo heparina (50 UI / l), seguido por 400 ml de solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M (PB) com pH 7,2. Em seguida, os cérebros e medulas espinais foram removidos, pós-fixados por 4 h em solução de paraformaldeído a 4% em 0,1 M e em seguida

armazenados a 4 ° C em solução de sacarose a 30%. Um criostato foi utilizado para obter cortes coronais na espessura de 30 µm que foram coletados e adicionados na solução de PB 0,01 M. Os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio a 0,03% por 30 min e lavados com PB 0,01 M e em seguida, incubados em albumina bovina a 5% em PB 0,1 M por 1 h para bloquear locais de ligações inespecíficas. Os cortes foram incubados durante a noite à temperatura ambiente com um anticorpo anti-c-Fos de coelho (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, EUA, 1: 10.000). Após as lavagens, foram incubados com imunoglobulina anti-coelho marcada com biotina produzida no soro de cabra (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA, 1: 200 em 0,1 M PB contendo 1,5% de soro de cabra normal) seguido de um complexo avidina-biotina peroxidase (Vector Elite, 1: 200 em 0,1 MPB). Cada incubação durou 1 h à temperatura ambiente. A marcação dos núcleos celulares foi realizada com cloridrato de diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) intensificado com sulfato de níquel a 1%. Para a dupla marcação no Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus*, os cortes foram incubados por 48 horas a 4 ° C com um anticorpo anti-TPH (criado em coelho, Thyptophan Hydroxylase 2, Abcam, 1: 5.000) ou um anticorpo anti-TH (criado em camundongo, TH2, Sigma, 1: 200.000) respectivamente. Os cortes foram enxaguados e submetidos ao mesmo protocolo descrito para a marcação de c-Fos usando um anticorpo biotilado secundário apropriado seguido por um complexo avidina-biotina peroxidase. A cor citoplasmática marrom foi detectada usando solução DAB não intensificada. Finalmente, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos ao ar durante a noite, desidratados, limpos em xileno e cobertos com lamínulas com meio de montagem. Os cortes que foram contados foram selecionados com base na similaridade em áreas entre os grupos experimental e controle, de acordo com as pistas neuroanatômicas fornecidas por um atlas de cérebro de rato. As contagens do Núcleo Dorsal da Rafe e do *Locus Coeruleus* foram realizadas unilateralmente em um corte por animal. No Núcleo Dorsal da Rafe foram demarcadas 3 regiões: dorsal, ventral e lateral e em cada região foram contados o número de c-Fos positivas, neurônios TPH imunorreativos e duplas marcações (LAWTHER, A. et al., 2015). Na região do *Locus Coeruleus* foram contados o número de neurônios c-Fos/TH imunorreativos (RASSNICK, S et al., 1998).

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0 e expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

Foi realizado o Teste t Student para comparação de dois grupos (Não choque e Choque) ou Two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni para comparação de dois fatores no teste de von frey (choque ou carragenina) para os grupos Não choque e Choque e no teste de formalina os fatores choque ou tratamento com o pré tratamento de salina ou fluoxetina ou desipramina para os grupos Não Choque e Choque (com e sem PTSD). Foram considerados estatisticamente diferentes grupos analisados em que $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo consistem nas avaliações comportamentais de animais expostos e não expostos ao choque, sendo avaliados sobre o desenvolvimento da PTSD em diferentes tempos de retenção: 7, 14 ou 21 dias.

6.1 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS EXPOSTOS E NÃO EXPOSTOS AO CHOQUE, SOB ISOLAMENTO SOCIAL E RETENÇÃO POR 7, 14 e 21 DIAS

Os resultados apresentados abaixo foram divididos em cronograma experimental 1 e 2. A seguir serão apresentados os resultados comportamentais obtidos no cronograma experimental 1, referente aos animais que foram expostos e não expostos ao choque, retidos e isolados socialmente por 7, 14 e 21 dias.

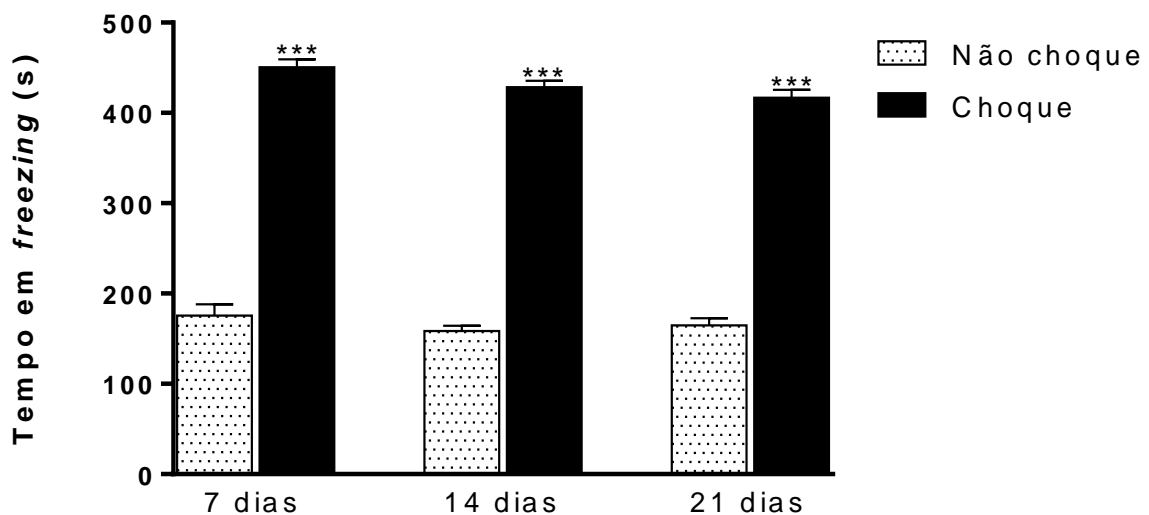
- Experimento 1

6.1.1 Avaliação do comportamento em *Freezing*

A figura abaixo (figura 7) corresponde à avaliação dos animais no comportamento em *freezing* avaliados por 10 minutos (600 segundos) após o tempo de retenção de 7, 14 e 21 dias isolados socialmente.

Os animais do grupo choque, em todos os tempos estudados apresentaram maior tempo em *freezing* (em segundos) ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo de animais não expostos ao choque.

Figura 7 - Avaliação do comportamento em *freezing* dos animais expostos e não expostos ao choque nos períodos de retenção de 7, 14 e 21 dias



FONTE: DA AUTORA

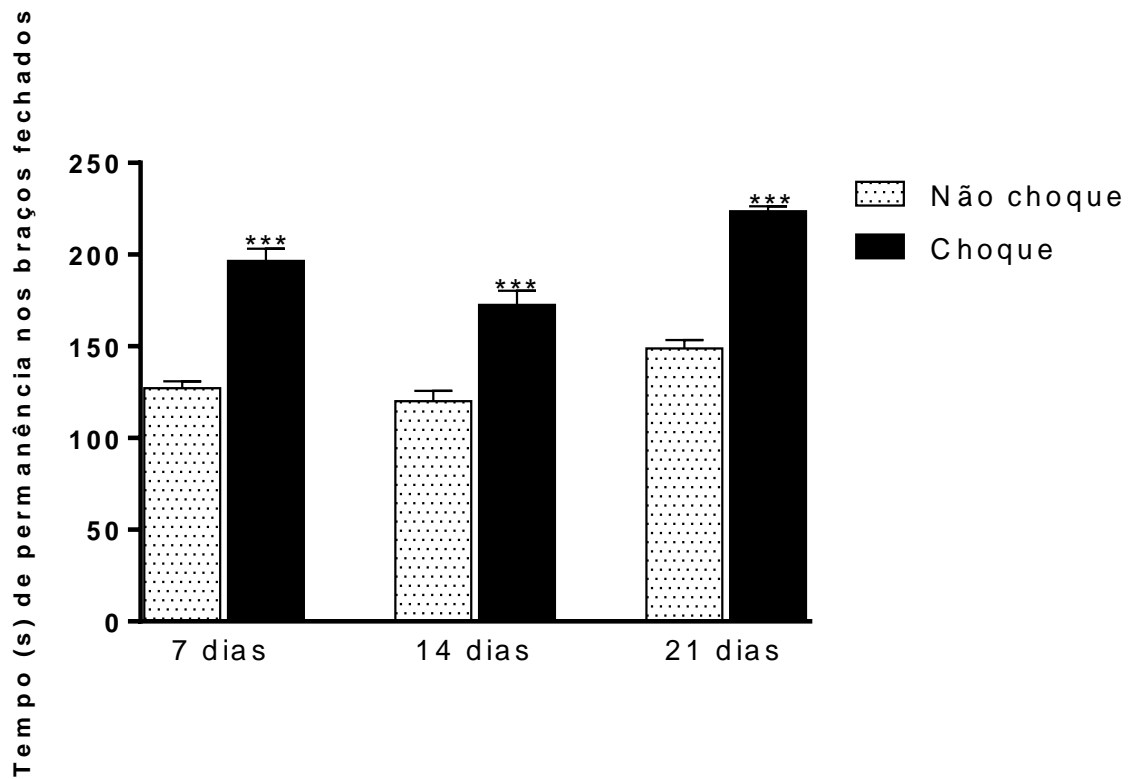
Nota: Avaliação do tempo em *freezing* (reexposição) *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.1.2 Labirinto em Cruz Elevado

A figura abaixo demonstra o desempenho comportamental de animais expostos ao choque quando comparados ao grupo de animais não expostos, sendo avaliados por 5 minutos no aparato de labirinto em cruz elevado. O teste foi realizado após a avaliação do tempo em *freezing*, seguindo o protocolo de Berardi (2008). Nesse teste, foi avaliado o parâmetro de tempo de permanência nos braços fechados.

Houve um aumento do número de entradas nos braços fechados ($p < 0,001$) observado no grupo de animais expostos ao choque nos tempos de retenção de 7, 14 e 21 dias quando comparados aos seus respectivos grupos controle.

Figura 8 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado



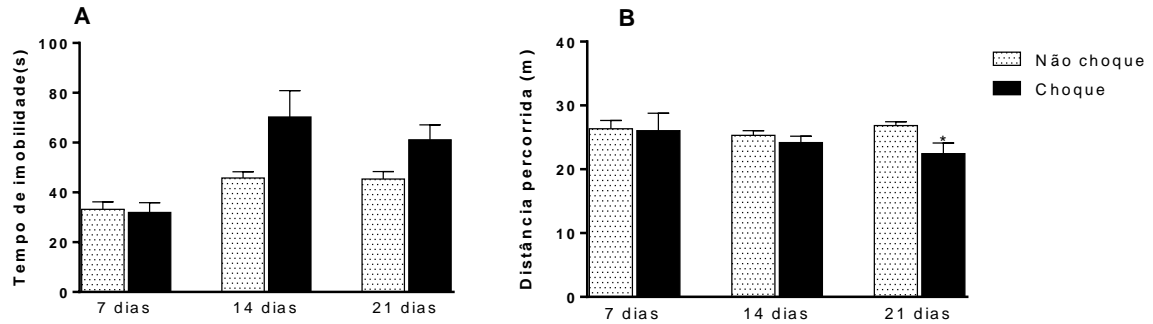
FONTE: DA AUTORA

Nota: Influência da exposição ao choque no desenvolvimento da PTSD no teste de Labirinto em Cruz Elevado. $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.1.3 Campo Aberto

A figura 9 demonstra o desempenho comportamental dos animais expostos e não expostos ao choque no teste de campo aberto realizado um dia após o teste de labirinto em cruz elevado. Foram avaliados os parâmetros de distância percorrida (em metros) e tempo de imobilidade (em segundos). Não foram observadas diferenças estatísticas no parâmetro de distância percorrida ($p > 0,05$) no grupo de animais sob retenção de 7 e 14 dias quando comparados aos seus respectivos controles (Não choque), porém houve uma redução da distância percorrida ($p < 0,05$) no grupo de animais sob retenção de 21 dias quando comparados ao seu grupo controle. Em relação ao tempo de imobilidade, não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos tempos de retenção (7, 14 e 21 dias).

Figura 9 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de campo aberto na distância percorrida e tempo de imobilidade



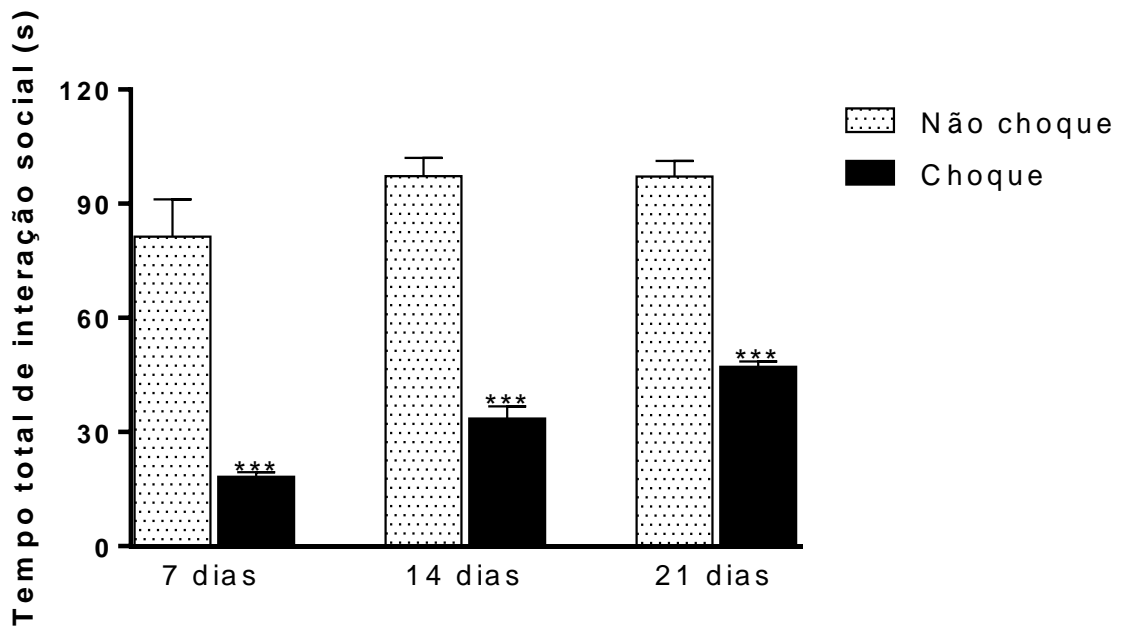
FONTE: DA AUTORA

Nota: Influência da exposição ao choque no desenvolvimento da PTSD no teste de Campo Aberto. A: Avaliação do tempo de imobilidade; B: Avaliação da distância percorrida. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.1.4 Interação Social

A figura 9 representa a avaliação comportamental de animais expostos e não expostos ao choque no teste de interação social. O comportamento de interação dos animais teste foi avaliado quando os mesmos interagem ou não com animais intrusos de aproximadamente 100 gramas menores que eles. Foram avaliados parâmetros *following* e *sniffing* e somados os parâmetros resultando em um tempo de interação total. Foi observado uma redução do tempo de interação total ($p < 0,001$) nos animais expostos ao choque em todos os tempos de retenção estudados quando comparados ao grupo de animais não expostos ao choque.

Figura 10 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de interação social



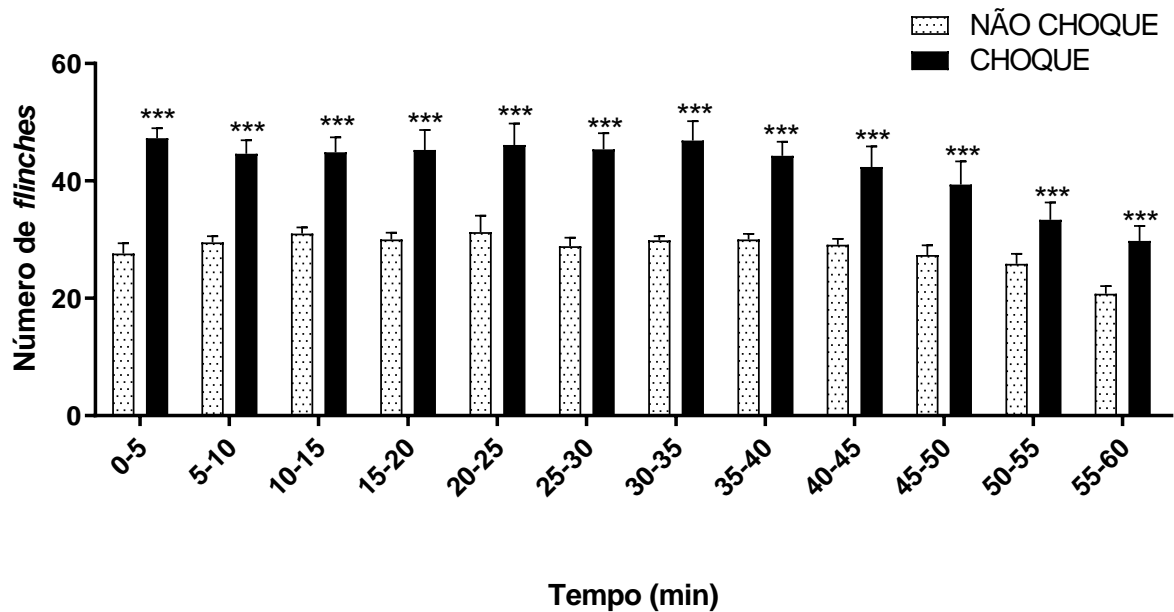
FONTE: DA AUTORA

Nota: Influência da exposição ao choque no desenvolvimento da PTSD no teste de Interação Social. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.1.5 Teste de Formalina

A figura abaixo corresponde à avaliação dos animais expostos e não ao choque ao teste de formalina, avaliados a cada 5 minutos por 60 minutos totais no parâmetro de reflexo de retirada da pata pelo número de *flinches*. Os animais expostos ao choque apresentaram um maior número de *flinches* ($p < 0,001$) em todos os tempos quando comparados ao grupo de animais não expostos ao choque.

Figura 11 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina sob retenção de 7 dias

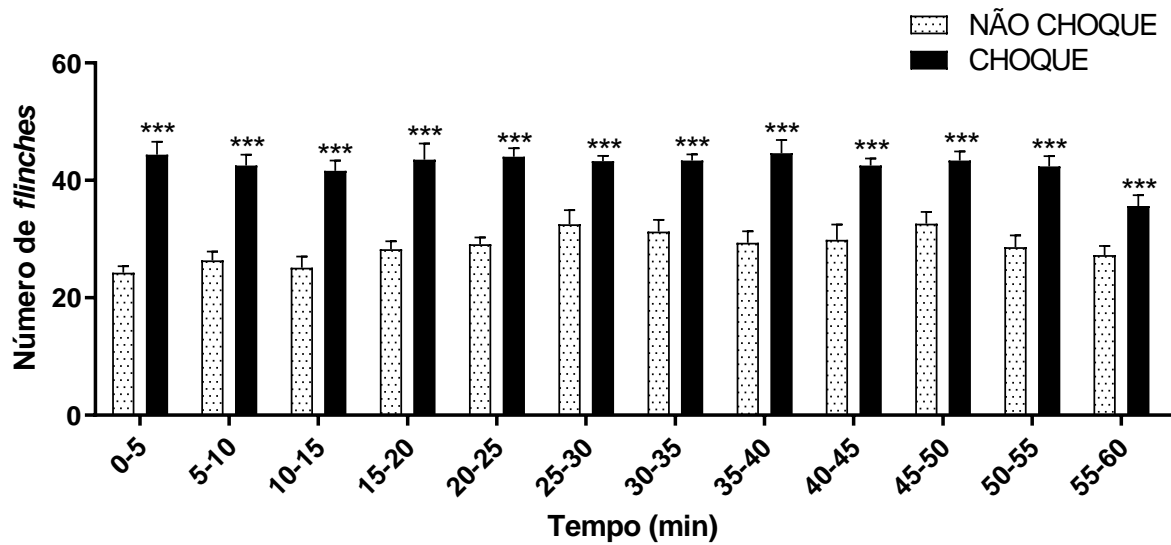


FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeito da PTSD no teste de formalina. Avaliação do número de *flinches* durante 60 minutos. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. Na primeira fase os animais foram avaliados de 0 a 5 minutos e na segunda fase de 10 a 60 minutos. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

A figura seguinte corresponde à avaliação dos animais expostos e não ao choque ao teste de formalina sob o período de retenção de 14 dias.

Figura 12 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina sob retenção de 14 dias

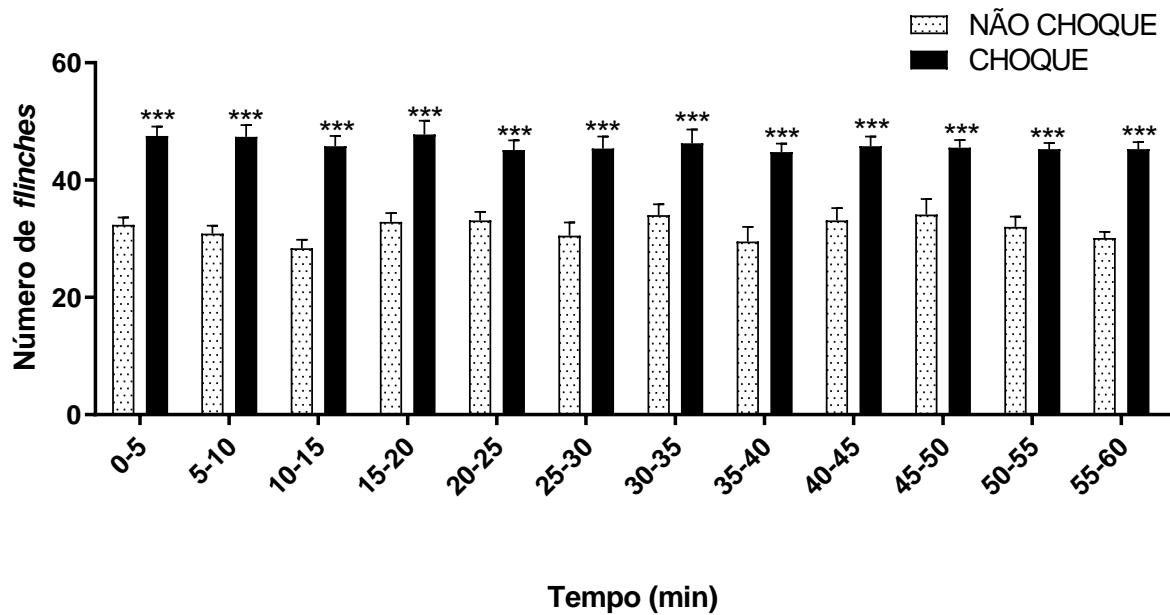


FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD no teste de formalina: número de *flinches* durante 60 minutos. ***p<0,001 quando comparado ao grupo não choque. Na primeira fase os animais foram avaliados de 0 a 5 minutos e na segunda fase de 10 a 60 minutos. Os dados representam a média ± SEM de 8 animais por grupo.

A próxima figura corresponde à avaliação dos animais expostos e não ao choque ao teste de formalina sob o período de retenção de 21 dias.

Figura 13 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina sob retenção de 21 dias



FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD no teste de formalina: número de *flinches* durante 60 minutos. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. Na primeira fase os animais foram avaliados de 0 a 5 minutos e na segunda fase de 10 a 60 minutos. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

- Experimento 2

Em outro grupo de animais expostos e não expostos ao choque, associado ao isolamento social e ao período de retenção de 7, 14 e 21 dias, foi realizada a análise do tempo em *freezing*, e os testes comportamentais referentes a memória de curta e longa duração e o teste de Von Frey com o uso de filamentos, além da análise do número de bolos fecais e a avaliação do peso das glândulas adrenais.

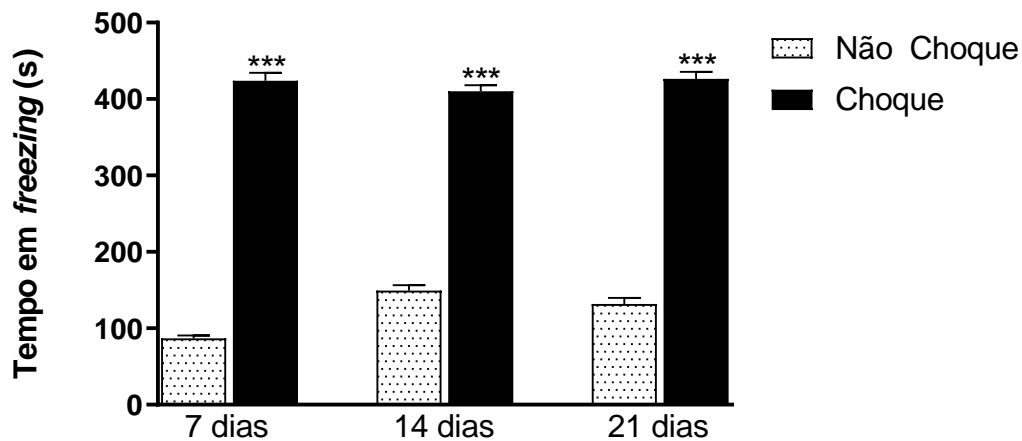
Os testes relacionados ao período de retenção de 7, 14 e 21 dias estão descritos abaixo.

6.1.6 Análise do tempo em *freezing*

No 7º, 14º e 21º dia após o choque, os animais foram reexpostos à caixa de choque sem receber choque, sendo avaliados quanto ao comportamento de *freezing*

por 10 minutos. O gráfico abaixo demonstra um maior tempo em *freezing* dos animais que foram expostos ao choque quando comparados aos animais não expostos ao choque.

Figura 14 - Avaliação do tempo em *freezing* dos animais expostos e não expostos ao choque nos períodos de retenção de 7, 14 e 21 dias.



FONTE: DA AUTORA

Nota: Avaliação do tempo em *freezing* (reexposição). *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média \pm SEM de 16 animais por grupo.

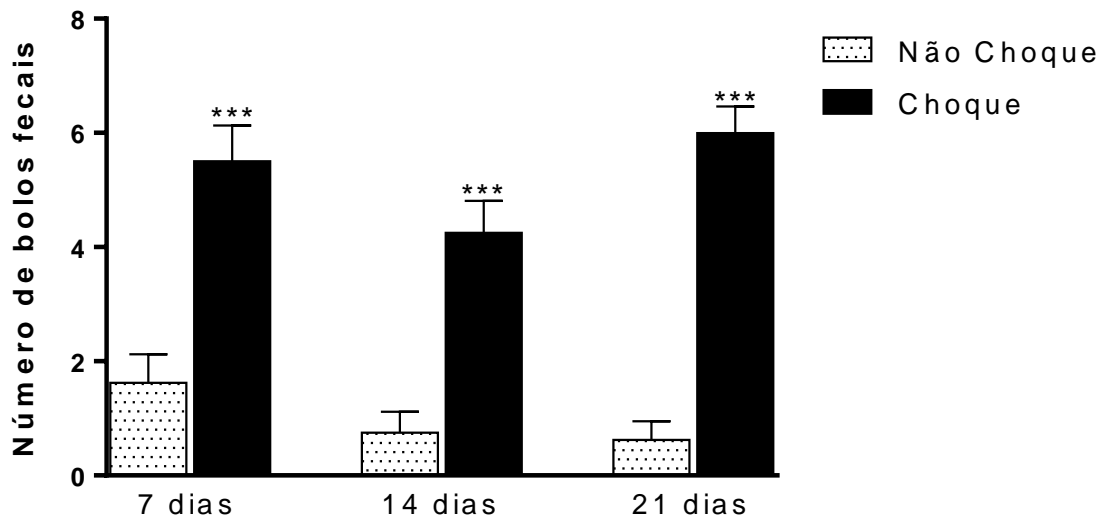
6.1.7 Avaliação do número de bolos fecais

A quantificação de bolos fecais foi realizada no momento da reexposição e avaliação do tempo em *freezing*, e realizada a contagem durante 10 minutos objetivando avaliar as reações de medo e ansiedade.

A figura 15 representa o gráfico da avaliação do número de bolos fecais do grupo choque em relação ao grupo não choque de animais sob retenção de 7, 14 e 21 dias.

Observa-se um aumento do número de bolos fecais dos animais do grupo choque quando comparados aos animais do grupo não choque em todos os tempos de retenção ($p < 0,001$).

Figura 15 - Avaliação do número de bolos fecais dos animais expostos e não expostos ao choque nos períodos de retenção de 7, 14 e 21 dias



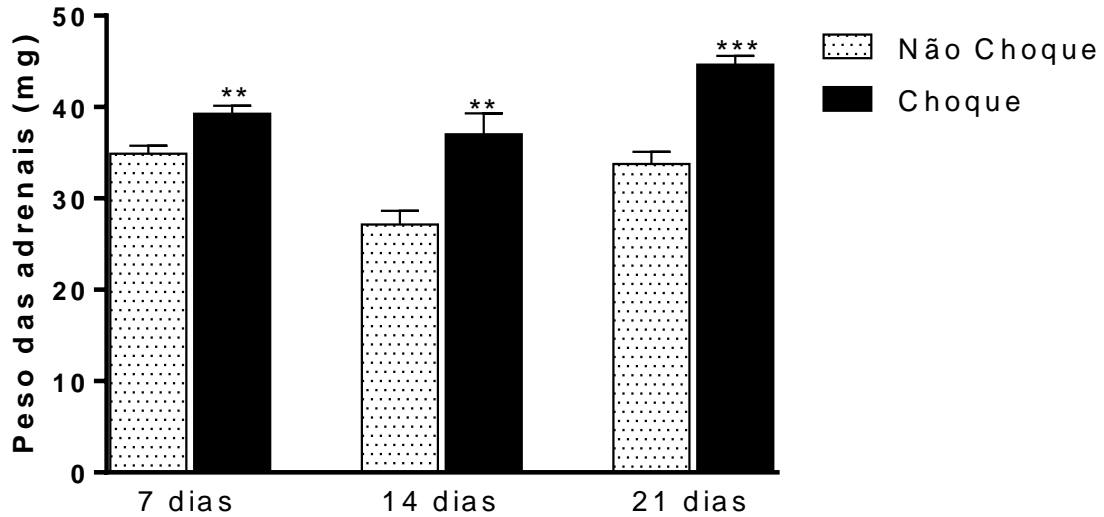
FONTE: DA AUTORA

Nota: Avaliação do número de bolos fecais durante a reexposição ***p<0,001 quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média ± SEM de 8 animais por grupo.

6.1.8 Avaliação do peso das glândulas adrenais

Foi realizada a avaliação do peso das glândulas adrenais dos animais expostos e não expostos ao choque e sob retenção de 7, 14 e 21 dias. Os animais do grupo choque apresentaram um aumento do peso das glândulas adrenais quando comparados aos animais do grupo não choque nos tempos de retenção de 7 e 14 dias ($p<0,01$) e 21 dias ($p<0,001$) respectivamente.

Figura 16 - Avaliação do peso das glândulas adrenais dos animais expostos e não expostos ao choque nos períodos de retenção de 7, 14 e 21 dias



FONTE: DA AUTORA

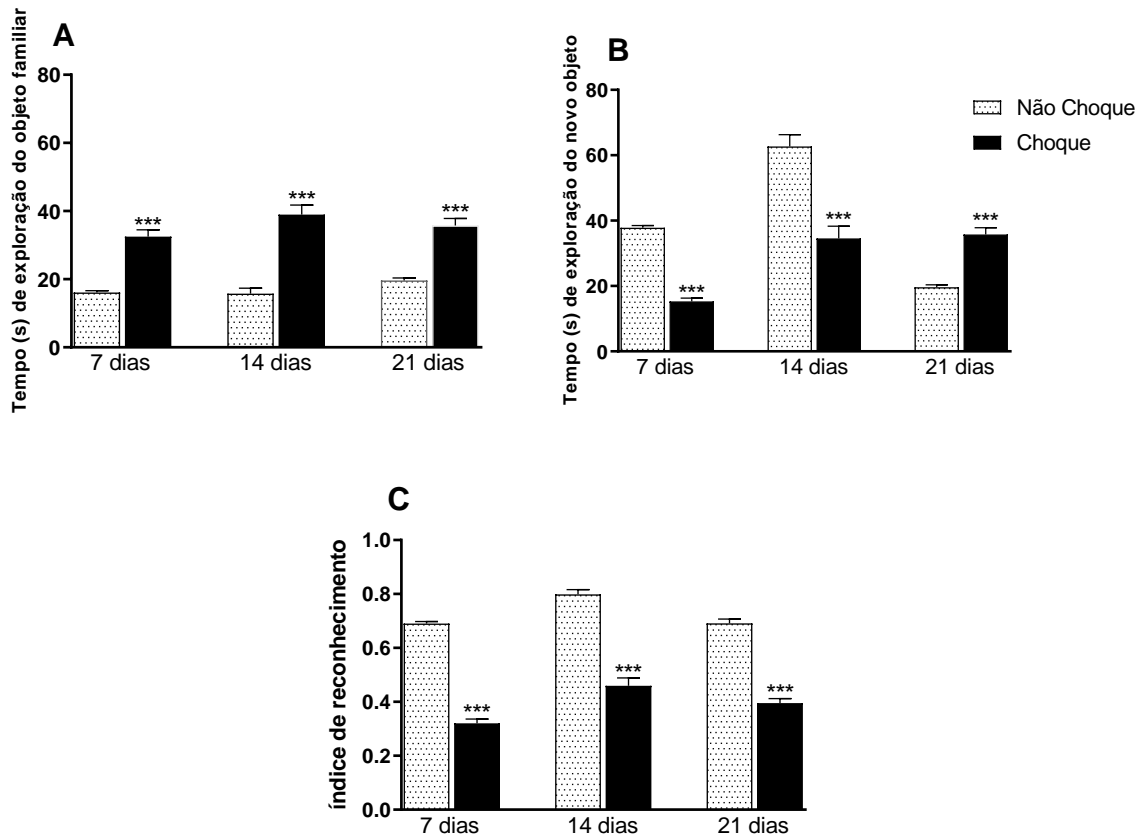
Nota: Avaliação do peso das glândulas adrenais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.1.9 Memória de Reconhecimento de Objetos – Curta Duração

Para o teste de reconhecimento de objetos avaliando a memória de curta duração, foi utilizado o mesmo aparato do teste de campo aberto (arena). Os animais do grupo choque apresentaram maior tempo de exploração do objeto familiar ($p < 0,001$), menor tempo de exploração do novo objeto ($p < 0,001$) e índice de exploração dos objetos reduzido ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo de animais que não passaram pelo choque em todos os parâmetros, em todos os tempos de retenção.

Abaixo seguem os gráficos referentes ao tempo de exploração do objeto familiar, tempo de exploração do novo objeto e índice de reconhecimento dos objetos, dos animais expostos e não expostos ao choque sob retenção de 7, 14 e 21 dias.

Figura 17 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de memória de curta duração



FONTE: DA AUTORA

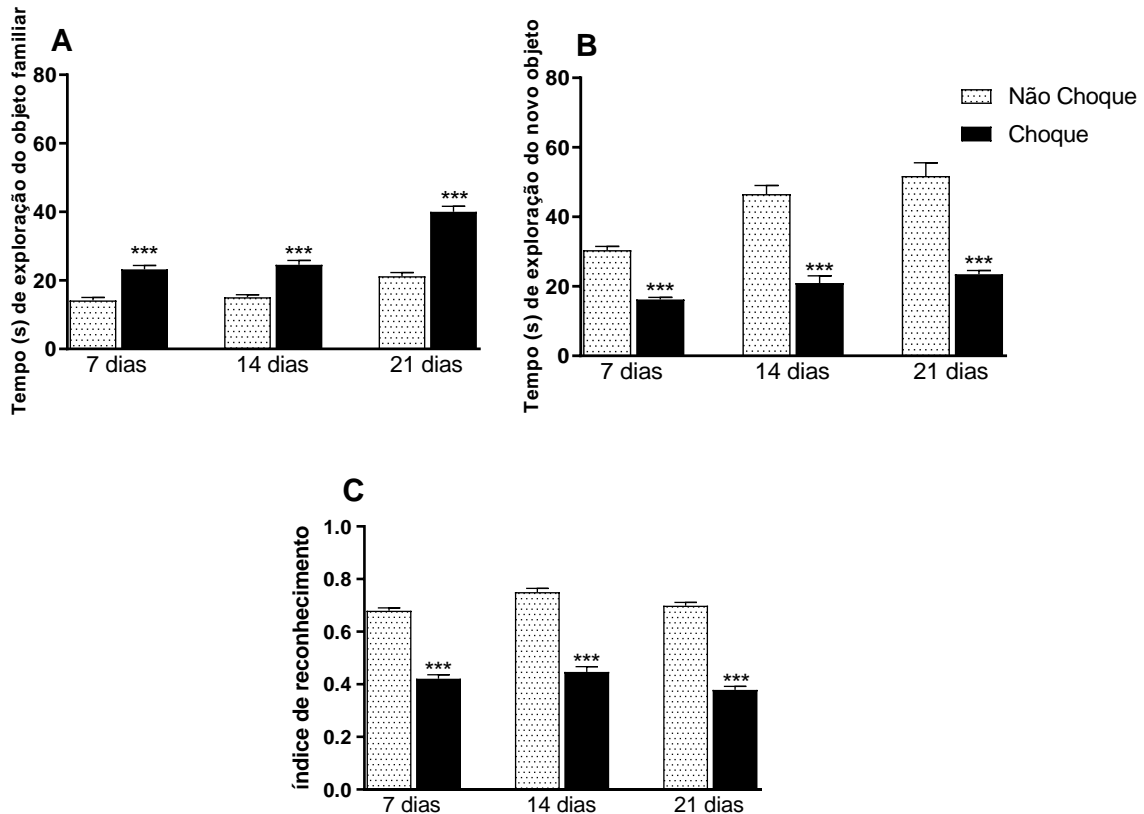
Nota: Efeitos da PTSD no teste de memória de curta duração. A: avaliação do tempo de exploração do objeto familiar. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. B: avaliação do tempo de exploração do novo objeto. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. C: avaliação do índice de reconhecimento. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. Os dados representam a média \pm SEM de 16 animais por grupo.

6.1.10 Memória de Reconhecimento de Objetos – Longa Duração

O teste de reconhecimento de objetos avaliando a memória de longa duração (figura 18) foi realizado 24 horas após o teste de reconhecimento de objetos relacionado à memória curta. Os animais do grupo choque apresentaram maior tempo de exploração do objeto familiar ($p < 0,01$), menor tempo de exploração do novo objeto ($p < 0,001$) e índice de exploração dos objetos reduzido ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo de animais que não passaram pelo choque em todos os tempos de retenção.

Abaixo seguem os gráficos referentes ao tempo de exploração do objeto familiar, tempo de exploração do novo objeto e índice de reconhecimento dos objetos, dos animais expostos e não expostos ao choque sob retenção de 7, 14 e 21 dias.

Figura 18 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de memória de longa duração



FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos do PTSD no teste de memória de curta duração. A: avaliação do tempo de exploração do objeto familiar. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. B: avaliação do tempo de exploração do novo objeto. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. C: avaliação do índice de reconhecimento. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque. Os dados representam a média \pm SEM de 16 animais por grupo.

6.1.11 Teste de Von Frey

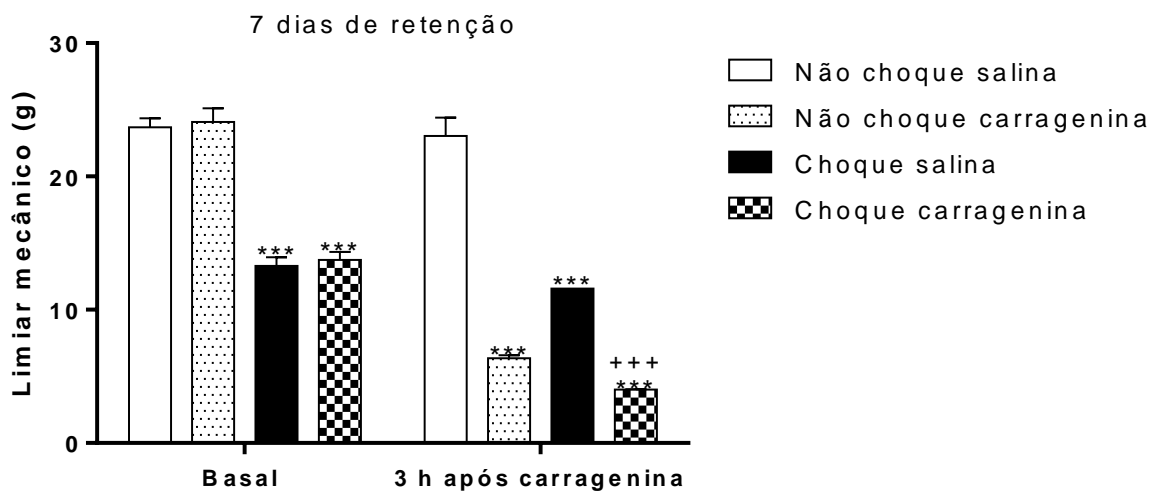
A figura abaixo corresponde à avaliação do limiar mecânico dos animais expostos e não expostos ao choque sob retenção de 7 dias. Em seguida, as figuras 20 e 21 são referentes à avaliação do limiar mecânico dos animais expostos e não expostos ao choque sob retenção de 14 e 21 dias no teste de Von Frey com filamentos. Em todos os períodos de retenção foi avaliado o limiar basal e 3 horas após a administração intraplantar de carragenina. Foram consideradas as respostas de *flinch* (retirada da pata) e o resultado confirmado após 3 medidas repetidas quando o filamento de determinada densidade (em gramas) era colocado perpendicularmente à superfície plantar do animal. Logo após foi realizada a média das 3 medidas para

quantificação no gráfico. Após a avaliação basal, observa-se nos grupos de animais expostos ao choque que os mesmos apresentaram menor limiar mecânico quando comparados aos seus respectivos grupos controle ($p < 0,001$ e $p < 0,001$).

3 horas após a administração de carragenina intraplantar foi realizada uma nova avaliação onde foi observado uma redução do limiar mecânico e portanto, aumento da sensibilidade nociceptiva dos grupos Não Choque Carragenina ($p < 0,001$), Choque Salina ($p < 0,001$) e Choque Carragenina ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo Não Choque Salina.

Observa-se também que os animais do grupo Choque Carragenina tiveram seus limiares mecânicos reduzidos ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo de animais expostos ao choque com salina. (7 dias de retenção – fator carragenina: $F_{(1,7)} = 148.5$, $p < 0.001$; fator choque: $F_{(3,21)} = 104.0$, $p < 0.001$; fator interação choque x carragenina: $F_{(3,21)} = 78.95$, $p < 0.001$; 14 dias – fator carragenina: $F_{(1,7)} = 142.0$, $p < 0.001$; fator choque: $F_{(3,21)} = 135.3$, $p < 0.001$; fator interação choque x carragenina: $F_{(3,21)} = 37.32$, $p < 0.001$; 21 dias – fator carragenina: $F_{(1,7)} = 59.63$, $p < 0.001$; fator choque $F_{(3,21)} = 281.6$, $p < 0.001$; fator interação choque x carragenina: $F_{(3,21)} = 22.86$, $p < 0.001$).

Figura 19 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de Von Frey com filamentos após 7 dias de retenção

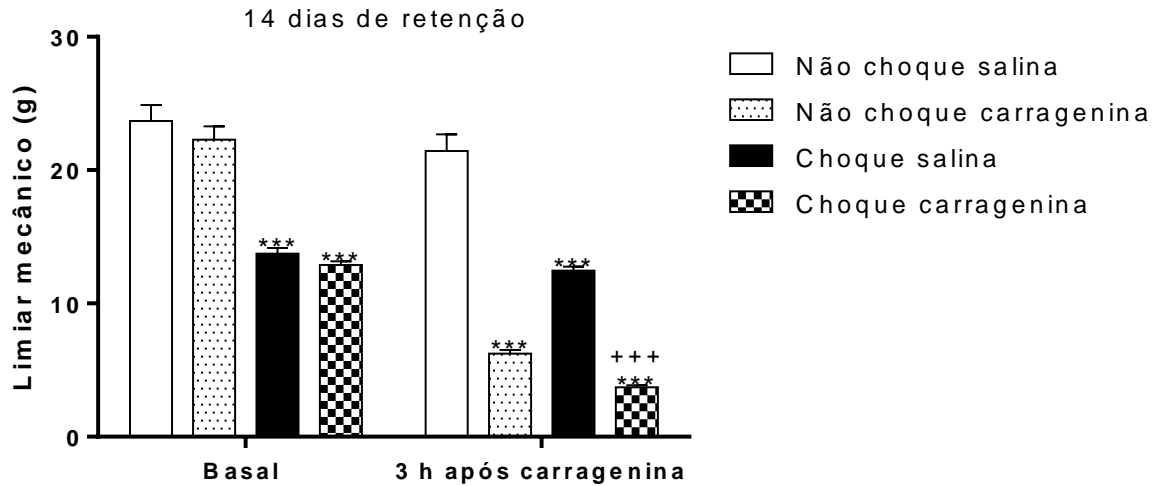


FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD no teste de Von Frey filamentos no tempo basal e após 3 horas da administração de carragenina intraplantar após 7 dias de retenção. *** $p < 0.001$ quando comparado ao respectivo grupo Não choque; +++ $p < 0.001$ quando comparado ao grupo Choque salina. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

A figura abaixo corresponde aos resultados da avaliação dos animais com e sem PTSD após 14 dias de retenção.

Figura 20 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de Von Frey com filamentos após 14 dias de retenção

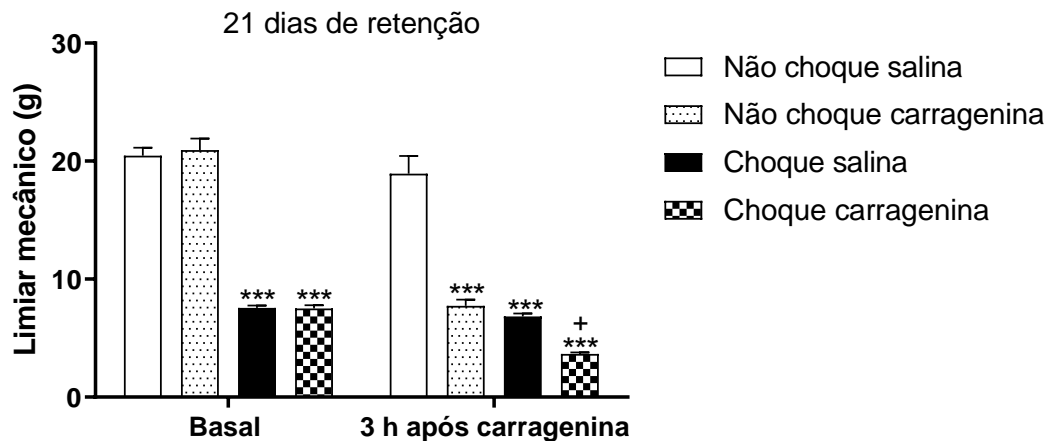


FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD no teste de Von Frey filamentos no tempo basal e após 3 horas da administração de carragenina intraplantar após 14 dias de retenção. *** $p < 0.001$ quando comparado ao respectivo grupo Não choque; +++ $p < 0.001$ quando comparado ao grupo Choque salina. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

A próxima figura demonstra aos resultados da avaliação dos animais com e sem PTSD após 21 dias de retenção.

Figura 21 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de Von Frey com filamentos após 21 dias de retenção



FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD no teste de Von Frey filamentos no tempo basal e após 3 horas da administração de carragenina intraplantar após 21 dias de retenção. *** $p < 0.001$ quando comparado ao respectivo grupo Não choque; +++ $p < 0.001$ quando comparado ao grupo Choque salina. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.2 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS DE ANIMAIS EXPOSTOS E NÃO EXPOSTOS AO CHOQUE, SOB ISOLAMENTO SOCIAL E RETENÇÃO POR 14 DIAS

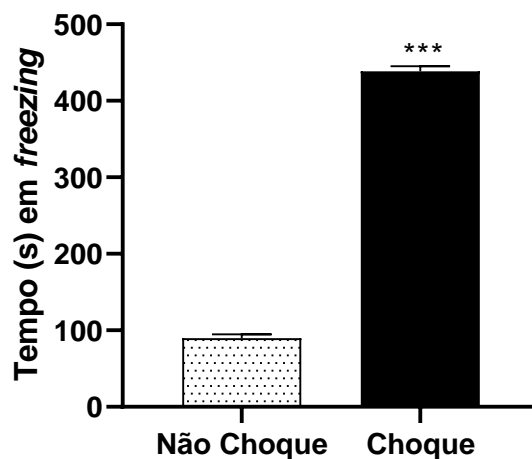
A seguir serão apresentados os resultados comportamentais obtidos no cronograma experimental 3, referente aos animais que foram expostos e não expostos ao choque, retidos e isolados socialmente por 14 e dias.

- Experimento 3

6.2.1 Análise do tempo em *freezing*

No 14^o dia após o choque, os animais foram reexpostos à caixa de choque sem receber choque, sendo avaliados quanto ao comportamento de *freezing* por 10 minutos. O gráfico abaixo demonstra um maior tempo em *freezing* dos animais que foram expostos ao choque quando comparados aos animais não expostos ao choque.

Figura 22 - Avaliação do tempo em *freezing* dos animais expostos e não expostos ao choque no período de retenção de 14 dias.



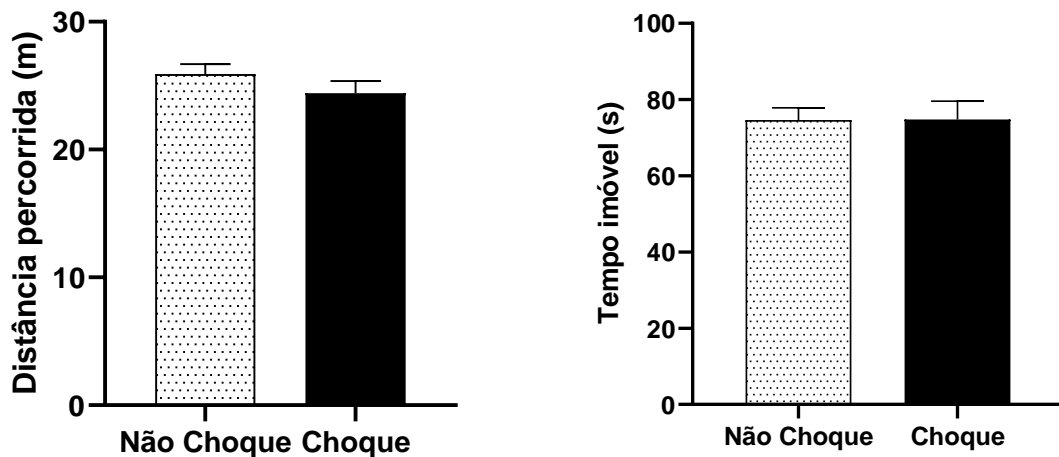
FONTE: DA AUTORA

Nota: Avaliação do tempo em *freezing* (reexposição).*** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.2.2 Campo Aberto

A figura 23 demonstra o desempenho comportamental dos animais expostos e não expostos ao choque no teste de campo aberto. Foram avaliados os parâmetros de distância percorrida (em metros) e tempo de imóvel (em segundos). Não foram observadas diferenças estatísticas no parâmetro de distância percorrida no grupo de animais expostos ao choque quando comparados ao grupo de animais não expostos ($p>0,05$). Semelhantemente, no parâmetro de tempo de imobilidade, não houveram diferenças estatísticas do grupo choque quando comparado ao grupo não choque ($p>0,05$).

Figura 23 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de campo aberto na distância percorrida e tempo de imobilidade no período de retenção de 14 dias



FONTE: DA AUTORA

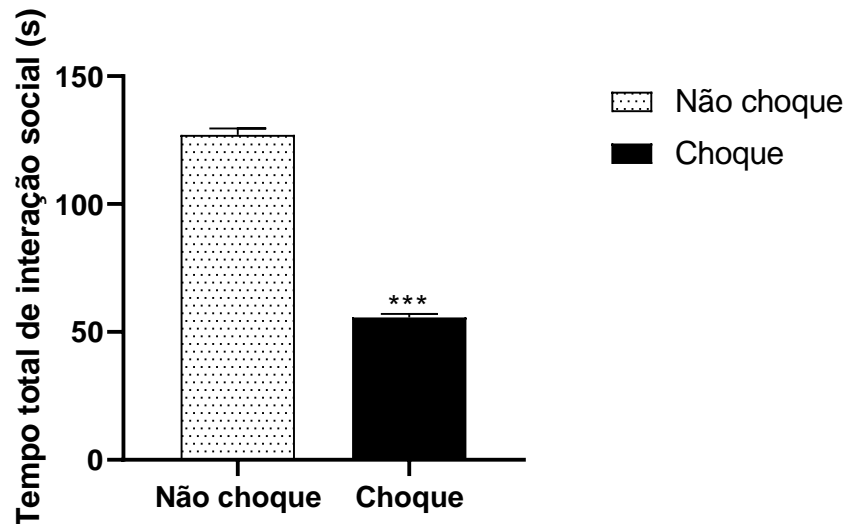
Nota: Influência da exposição ao choque no desenvolvimento da PTSD no teste de Campo Aberto. A: Avaliação do tempo de imobilidade; B: Avaliação da distância percorrida. * $p<0,05$ quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.2.3 Interação Social

A figura 24 representa a avaliação comportamental de animais expostos e não expostos ao choque no teste de interação social. O comportamento de interação dos animais teste foi avaliado quando os mesmos interagem ou não com animais intrusos de aproximadamente 100 gramas menores que eles. Foram avaliados parâmetros *following* e *sniffing* e somados os parâmetros resultando em um tempo de interação

total. Foi observado uma redução do tempo de interação total ($p < 0,001$) nos animais expostos ao choque quando comparados ao grupo de animais não expostos ao choque.

Figura 24 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de interação social



FONTE: DA AUTORA

Nota: Influência da exposição ao choque no desenvolvimento da PTSD no teste de Interação Social. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Não Choque. Os dados representam a média \pm SEM de 24 animais por grupo. (animais posteriormente divididos em 6 grupos de 8 animais)

6.2.4 Teste de formalina após a administração intratecal de salina ou fluoxetina ou desipramina avaliados a cada 5 minutos por 60 minutos

O teste de formalina foi realizado após a administração intratecal de salina ou fluoxetina ou desipramina. As figuras abaixo correspondem à avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque no teste de formalina, sendo avaliados a cada 5 minutos, por 60 minutos totais no parâmetro de reflexo de retirada da pata pela contabilização do número de *flinches*. A figura 25 mostra o número de *flinches* dos animais nos tempos de 0 a 5, 5 a 10, 10 a 15 e 15 a 20, 20 a 25, 25 a 30. A figura 26 é referente aos tempos de 30 a 35, 35 a 40, 40 a 45, 45 a 50, 50 a 55 e 55 a 60 minutos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L respectivamente).

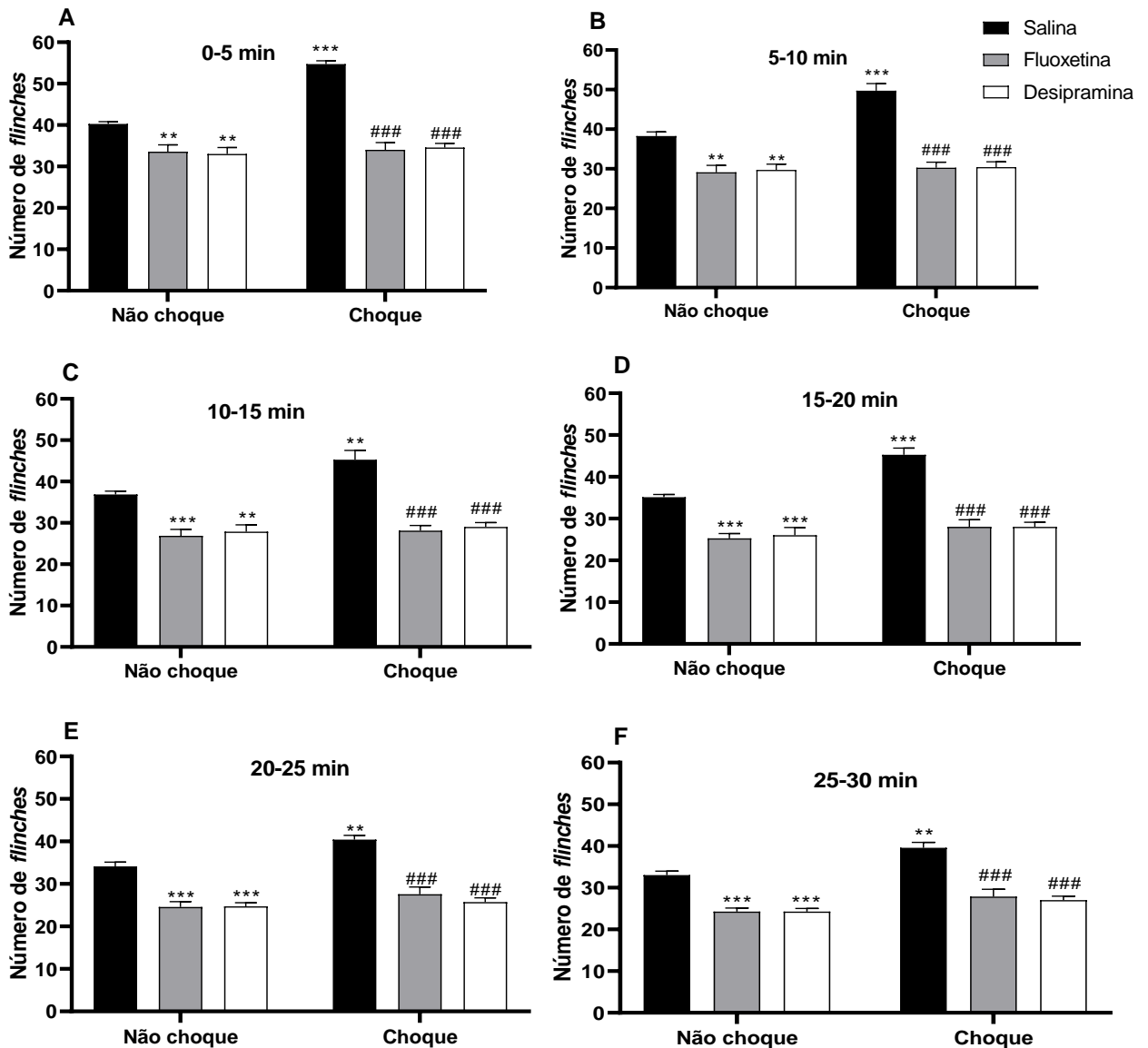
No tempo de 0 a 5 minutos, os animais do grupo não choque tratados com fluoxetina e desipramina apresentaram uma redução do número de *flinches* ($p < 0,01$)

e ($p < 0,01$), quando comparados ao grupo não choque salina. Em contrapartida, os animais do grupo choque salina apresentaram um aumento do número de *flinches* ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo não choque salina. Os grupos choque fluoxetina e choque desipramina, demonstraram uma diminuição do número de reflexo de retirada da pata ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo choque salina.

Esse perfil comportamental se manteve semelhante em todos os tempos de 5 em 5 minutos até 60 minutos. De **0 a 5 minutos** o fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina) é: $F_{(1,37)} = 27,39$, $p < 0.0001$; fator choque: $F_{(2,37)} = 77,46$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 18,81$, $p < 0.0001$; De **5 a 10 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 13,57$, $p < 0.0007$; fator choque: $F_{(2,37)} = 62,08$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 8,65$, $p < 0.0008$; De **10 a 15 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 8,97$, $p < 0.0049$; fator choque: $F_{(2,37)} = 53,92$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 4,04$, $p < 0.0258$; De **15 a 20 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 18,99$, $p < 0.0001$; fator choque: $F_{(2,37)} = 62,86$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 5,37$, $p < 0.0090$; De **20 a 25 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 13,34$, $p < 0.0008$; fator choque: $F_{(2,37)} = 69,77$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 2,74$, $p < 0.0772$; De **25 a 30 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 21,22$, $p < 0.0001$; fator choque: $F_{(2,37)} = 57,13$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 1,61$, $p < 0.2134$; De **30 a 35 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 11,38$, $p < 0.0018$; fator choque: $F_{(2,37)} = 44,24$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 2,06$, $p < 0.1406$; De **35 a 40 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 10,77$, $p < 0.0023$; fator choque: $F_{(2,37)} = 45,91$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 2,79$, $p < 0,0738$; De **40 a 45 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 10,49$, $p < 0.0025$; fator choque: $F_{(2,37)} = 42,12$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 1,56$, $p < 0.2307$; De **45 a 50 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 20,88$, $p < 0.0001$; fator choque: $F_{(2,37)} = 60,87$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 3,76$, $p < 0.0325$; De **50 a 55 minutos**: fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 14,21$, $p < 0.0006$; fator choque: $F_{(2,37)} = 56,04$, $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 5,44$, $p < 0.0084$; De **55 a 60 minutos**: fator

tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 13,75$, $p < 0.0007$; fator choque: $F_{(2,37)} = 77$ $p < 0.0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2,37)} = 9,46$, $p < 0.0005$;

Figura 25 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina sob retenção de 14 dias nos tempos de 0 a 5, 5 a 10, 10 a 15 e 15 a 20, 20 a 25 e 25 a 30 minutos.

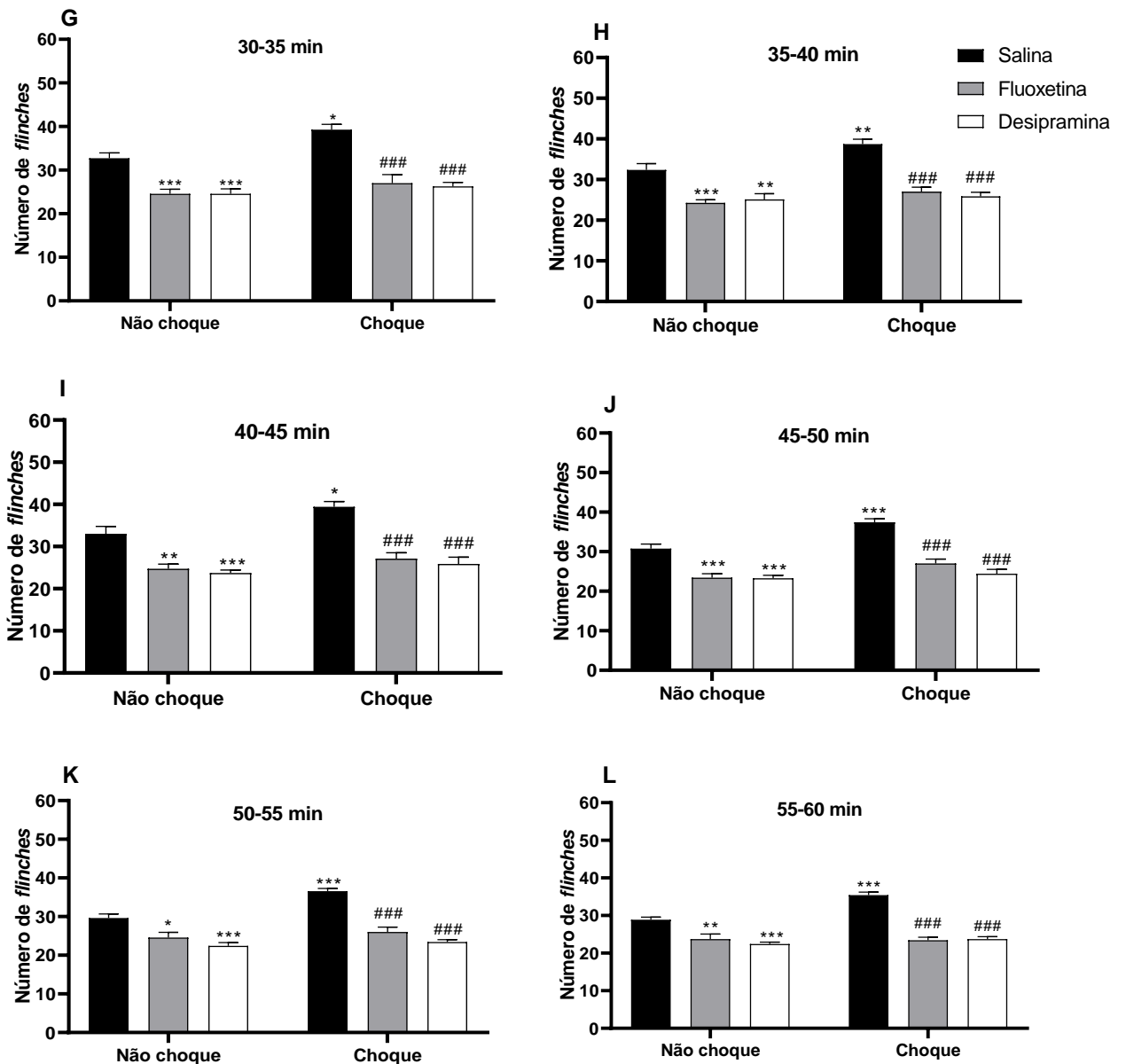


FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD no teste de formalina. **A: número de flinches no tempo de 0 a 5 minutos**, caracterizando a primeira fase. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. **B: número de flinches no tempo de 5 a 10 minutos**. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. **C: número de flinches no tempo de 10 a 15 minutos**. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. **D: número de flinches no tempo de 15 a 20 minutos**, caracterizando o início da segunda fase. *** $p < 0,001$ e $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. **E: número de flinches no tempo de 20 a 25 minutos**. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando

comparado ao grupo choque salina. **F: número de *flinches* no tempo de 25 a 30 minutos.** *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

Figura 26 - Avaliação dos animais expostos e não expostos ao choque submetidos ao teste de formalina sob retenção de 14 dias nos tempos de 30 a 35, 35 a 40, 40 a 45, 45 a 50, 50 a 55 e 55 a 60 minutos



FONTE: DA AUTORA

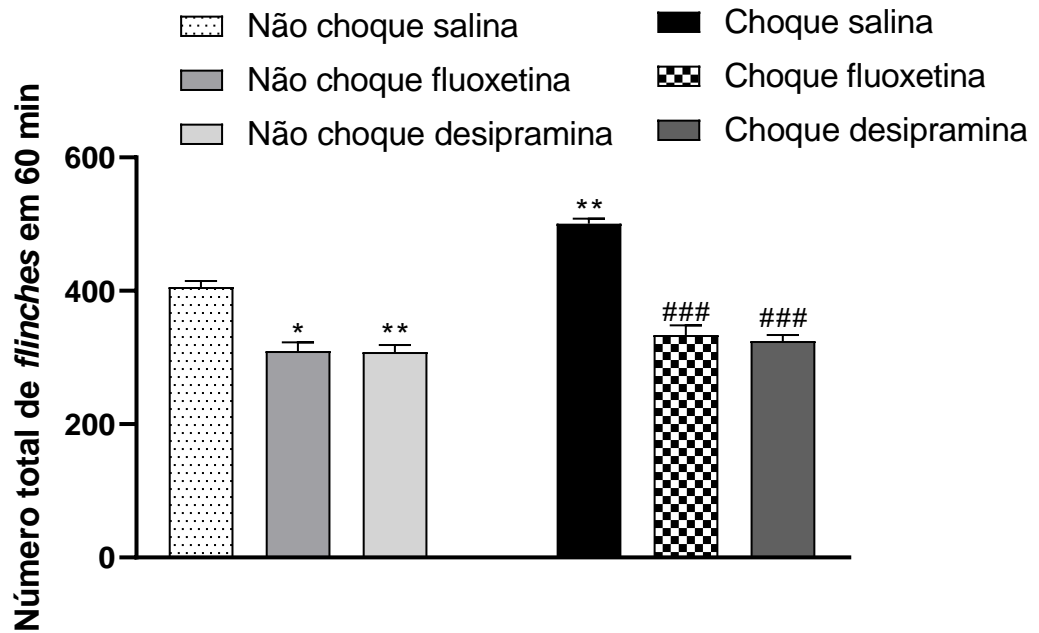
Nota: Efeitos da PTSD no teste de formalina **G: número de *flinches* no tempo de 30 a 35 minutos.** *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. **H: número de *flinches* no tempo de 35 a 40 minutos.** *** $p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. **I: número de *flinches* no tempo de 40 a 45 minutos.** *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. **J: número de *flinches* no tempo de 45 a 50 minutos.** *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não choque salina.

$p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina **K: número de *flinches* no tempo de 50 a 55 minutos.** *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. **L: número de *flinches* no tempo de 55 a 60 minutos.** *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.2.5 Teste de formalina após a administração intratecal de salina ou fluoxetina ou desipramina avaliados por 60 minutos totais

A figura abaixo corresponde ao número total de reflexos de retirada da pata demonstrada pelo número de *flinches* dos animais expostos e não expostos ao choque, tratados previamente com salina ou fluoxetina ou desipramina. Os animais do grupo não choque fluoxetina e desipramina apresentaram uma diminuição do número de *flinches* quando comparados ao grupo não choque salina (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) respectivamente. O grupo de animais choque salina por sua vez, apresentou um aumento do número de *flinches* quando comparado ao grupo não choque salina ($p < 0,01$). Os grupos choque fluoxetina e choque desipramina apresentaram uma diminuição do número de *flinches* quando comparados ao grupo choque salina (### $p < 0,001$). Fator tratamento (salina, fluoxetina ou desipramina): $F_{(1,37)} = 25,99$, $p < 0,0001$; fator choque: $F_{(2,37)} = 103,1$ $p < 0,0001$; fator interação choque x tratamento: $F_{(2, 37)} = 8,09$, $p < 0,0012$;

Figura 27 - Tempo total de *flinches* dos animais expostos e não expostos ao choque durante 60 minutos no teste de formalina



FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD no teste de formalina: número total de *flinches* durante 60 minutos. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não choque salina. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo choque salina. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

6.3 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO NÚCLEO DORSAL DA RAFE, *LOCUS COERULEUS* E CORNO DORSAL DA MEDULA ESPINAL

Abaixo serão apresentadas as figuras relacionadas às avaliações imuno-histoquímicas do Núcleo Dorsal da Rafe, Locus Coeruleus e medula espinal de animais com e sem PTSD.

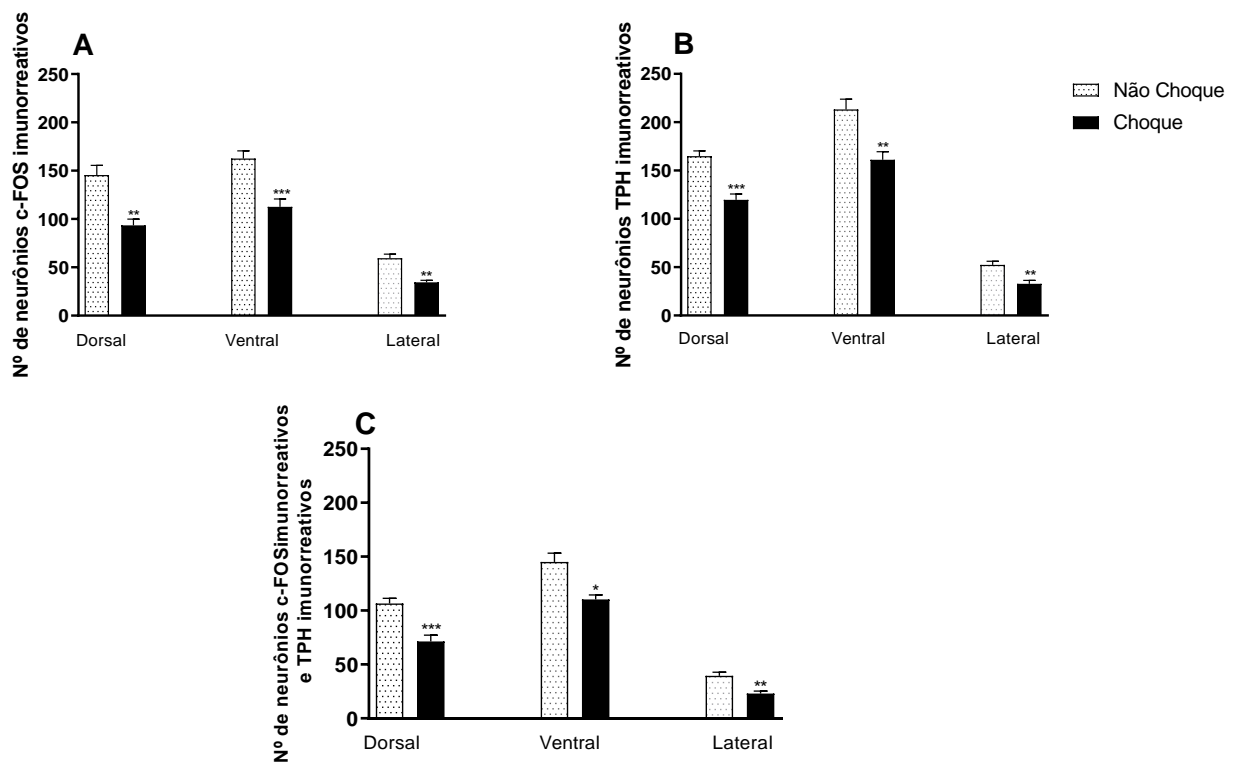
6.3.1 Avaliação da atividade serotoninérgica no Núcleo Dorsal da Rafe

A figura abaixo representa a análise imuno-histoquímica dos animais dos grupos não choque e choque sob retenção de 14 dias após o teste de formalina. Foi analisada a região do Núcleo Dorsal da Rafe, a qual foi dividida em 3 subregiões: dorsal, ventral e lateral para a contabilização dos neurônios ativados (imunorreativos).

Os animais do grupo choque apresentaram uma diminuição do número de neurônios c-FOS imunorreativos, TPH imunorreativos e duplas marcações

imunorreativas na região dorsal (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$), ventral (*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$) e lateral (** $p < 0,01$) respectivamente quando comparados ao grupo não choque. Logo em seguida, observa-se as fotomicrografias representativas no Núcleo Dorsal da Rafe dos grupos não choque e choque.

Figura 28 - Representação gráfica imuno-histoquímica referente à expressão de células Triptofano Hidroxilase (TPH) imunorreativas, expressão de c-FOS e duplas marcações no Núcleo Dorsal da Rafe nas porções dorsal, ventral e lateral de ratos dos grupos não choque e choque após 90 minutos do teste de formalina

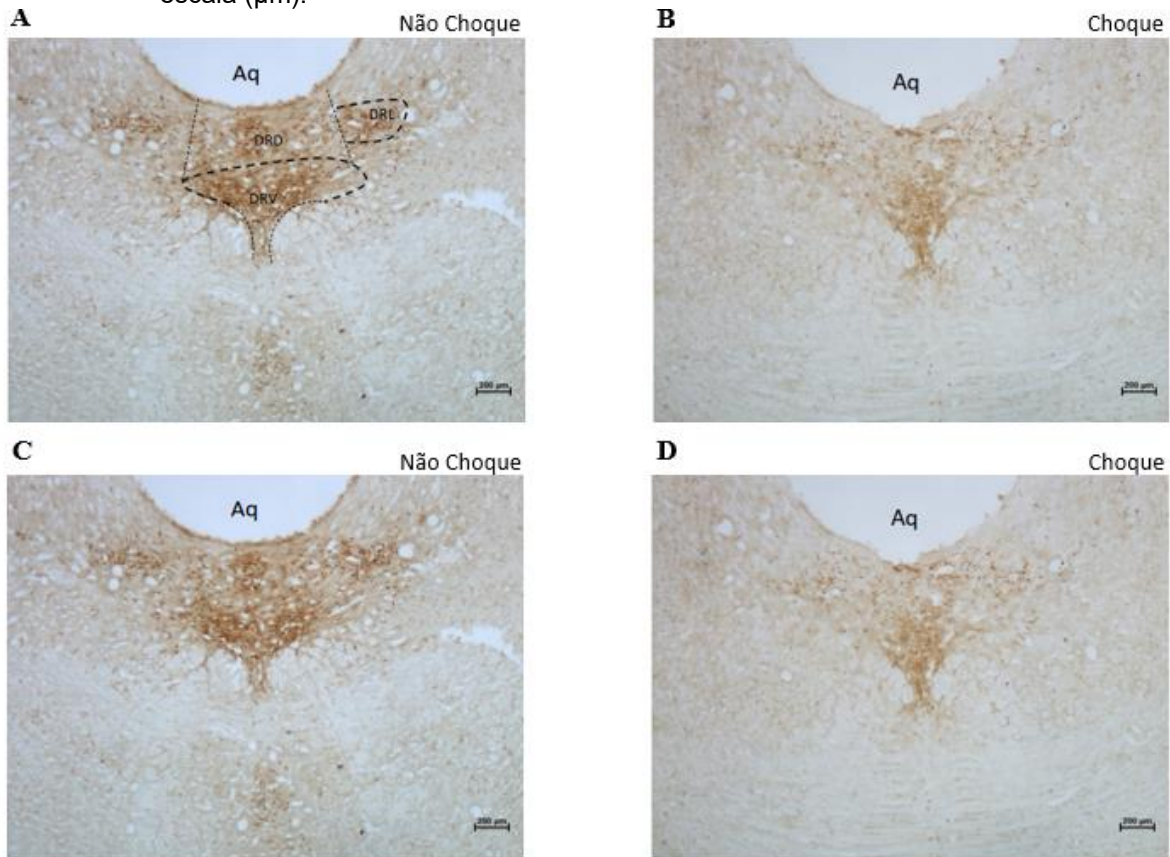


FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD após 14 dias de retenção sobre a ativação de neurônios TPH imunorreativos (A), ativação de c-FOS (B) e duplas marcações (C) no núcleo dorsal da rafe nas porções dorsal, lateral e ventral. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparados ao controle não choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

A próxima figura é referente às fotomicrografias representativas demonstrando a imunorreatividade da proteína c-FOS

Figura 29 - Fotomicrografias representativas demonstrando a imunorreatividade de c-Fos (núcleos marrons escuros), neurônios TPH imunorreativos e TPH/c-Fos imunorreativos no Núcleo Dorsal da Rafe de ratos do grupo Não Choque (controle) e Choque (animais com PTSD) avaliados 90 minutos após o teste de formalina. 4V: quarto ventrículo cerebral. Barra: escala (μm).



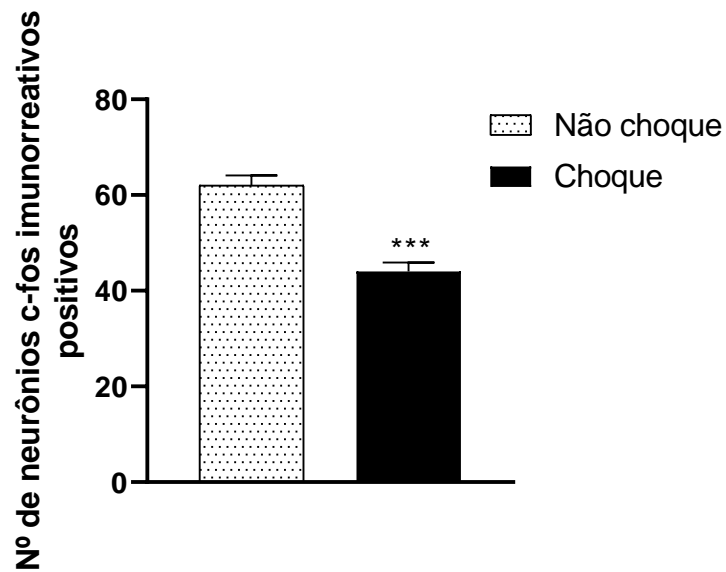
FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD após 14 dias de retenção sobre a ativação de neurônios TPH imunorreativos, c-FOS e duplas marcações no núcleo dorsal da rafe nas porções dorsal, lateral e ventral. A: demarcação das áreas analisadas do grupo Não Choque. B: demarcação das áreas analisadas do grupo Choque. C: fotomicrografia representativa do grupo Não Choque. D: fotomicrografia representativa do grupo Choque

6.3.2 Avaliação da atividade noradrenérgica no *Locus Coeruleus*

A figura abaixo representa a análise imuno-histoquímica dos animais do grupo não choque e choque sob retenção de 14 dias após o teste de formalina. Após analisar a região do *Locus Coeruleus*, observou-se uma diminuição do número de c-FOS imunorreativas ($***p < 0,001$) no grupo choque quando comparado ao grupo não choque. A imagem sequencial refere-se às fotomicrografias representativas do *Locus Coeruleus*.

Figura 30 - Avaliação imunohistoquímica da expressão de células c-FOS imunorreativas positivas na região do *Locus Coeruleus*

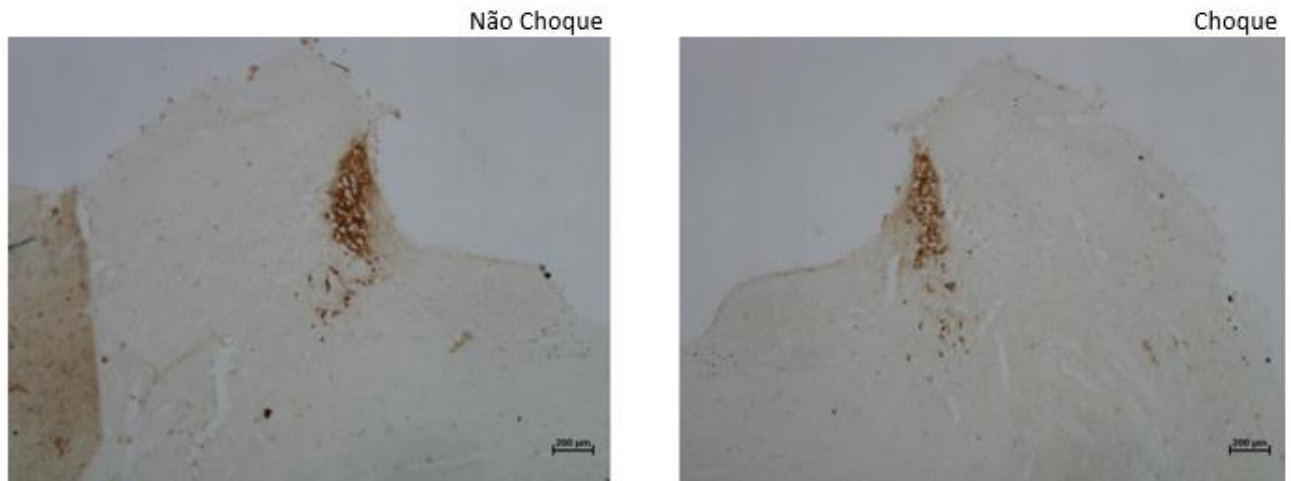


FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD após 14 dias de retenção sobre a ativação de neurônios c-fos imunorreativos positivos no *Locus Coeruleus*. ***p < 0,001 quando comparados ao controle não choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

A próxima figura refere-se à Fotomicrografias representativas mostrando a imunorreatividade de c-Fos/de neurônios TH no *Locus Coeruleus*.

Figura 31 - Fotomicrografias representativas mostrando a imunorreatividade de c-Fos/de neurônios TH no *Locus Coeruleus* de ratos do grupo Não Choque (controle) e Choque (animais com PTSD) avaliados 90 minutos após o teste de formalina. Barra: escala (μm).



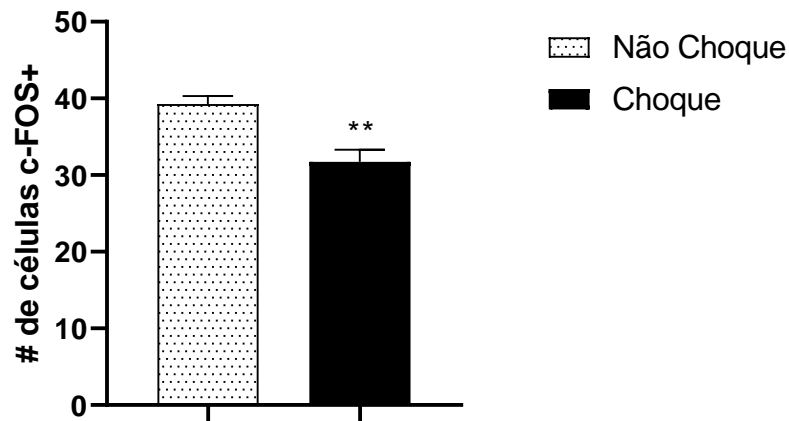
FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD após 14 dias de retenção sobre a ativação de neurônios c-fos imunorreativos positivos no *Locus Coeruleus*.

6.3.3 Avaliação da ativação neuronal através de c-FOS no corno dorsal da medula espinal

A figura seguinte representa a análise imuno-histoquímica dos animais do grupo não choque e choque sob retenção de 14 dias após o teste de formalina no corno dorsal da medula espinal. Verificou-se que os animais do grupo choque apresentaram uma diminuição da ativação neuronal representada pela proteína c-FOS (** $p < 0,01$) quando comparados ao grupo não choque. A próxima figura, portanto, refere-se às fotomicrografias representativas da região citada dos grupos não choque e choque.

Figura 32 - Avaliação imunohistoquímica da expressão de c-FOS nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal

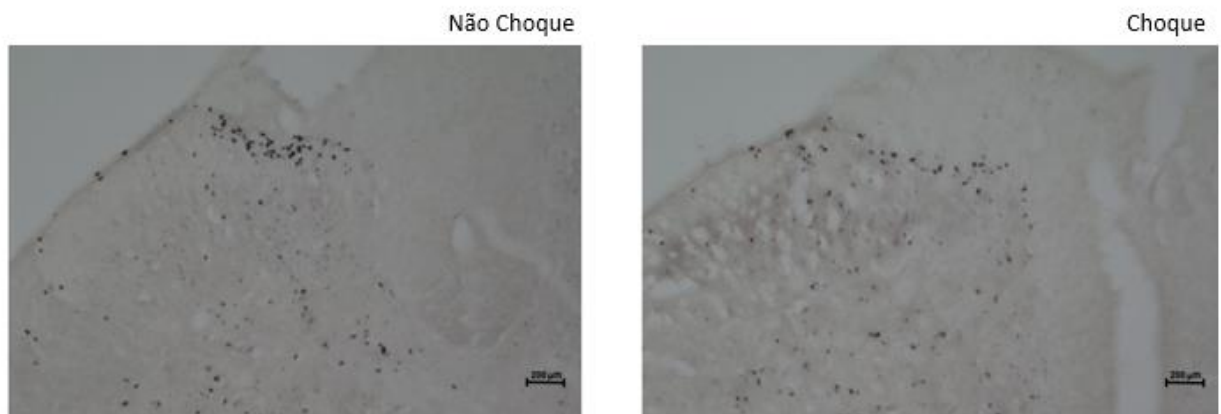


FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD após 14 dias de retenção sobre a ativação da ativação neuronal por c-FOS nas lâminas I e II no corno dorsal da medula espinal. ** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo não choque. Os dados representam a média \pm SEM de 8 animais por grupo.

A figura seguinte é referente às fotomicrografias representativas da proteína c-FOS no corno dorsal da medula espinal.

Figura 33 - Fotomicrografias representativas mostrando a imunorreatividade de c-Fos nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal de ratos do grupo Não Choque (controle) e Choque (animais com PTSD) avaliados 90 minutos após o teste de formalina. Barra: escala (μ m).



FONTE: DA AUTORA

Nota: Efeitos da PTSD após 14 dias de retenção sobre a ativação de neurônios c-fos imunorreativos no corno dorsal da medula espinal.

7 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, foi visto que a PTSD foi capaz de promover mudanças comportamentais como diminuição da interação social, aumento no tempo de permanência nos braços fechados frente ao teste de labirinto em cruz elevado, prejuízos no processo de aquisição de novas memórias e aumento da sensibilização resultando em redução do limiar nociceptivo. Esse conjunto de dados demonstrou o desenvolvimento da desordem de acordo com as manifestações clínicas citadas anteriormente.

Os sintomas característicos da PTSD também foram observados em um estudo de Zhu *et al*, (2017) utilizando um protocolo semelhante de indução da desordem por choques elétricos, demonstrando que a mesma está associada à alterações fisiológicas no processamento de novas informações, alterações cognitivas, incapacidade funcional, diminuição na interação social e aumento das respostas cardiovasculares.

Existem alguns modelos de indução da PTSD bem estabelecidos, sendo que todos eles envolvem a exposição a um agente estressor, como os choques inescapáveis combinados ao isolamento social, exposição ao odor de gato, exposição a predadores envolvendo confrontos e a exposição a diversas situações estressantes combinadas, como o SPS (*single prolonged stress*), que envolve, por exemplo, o nado forçado prolongado, contensão e exposição ao éter até a perda da consciência. Sendo assim, o modelo de indução do PTSD por choques aleatórios inescapáveis, associado ao isolamento social demonstrou grande relevância, pois permitiu avaliar o comportamento relacionado ao evento traumático sem possíveis variáveis relacionadas a outros tipos de estresse, sendo um modelo aceito, validado e bem estabelecido na literatura (GIRARDI, 2013).

Sendo assim, nossos resultados reforçam o modelo translacional da indução do choque associado ao isolamento social, capaz de mimetizar alterações cognitivas e emocionais duradouras dessa desordem crônica (SUN, R. *et al*, 2016).

Em nosso estudo, utilizamos o isolamento social após os choques inescapáveis. Esse processo é de extrema importância, visto que a falta de suporte social durante o processamento do trauma contribui para o desenvolvimento da desordem. Em um estudo semelhante em que a PTSD foi induzida por choques inescapáveis ou exposição ao odor de gatos em outro grupo, os sintomas não foram

observados quando os animais foram alojados socialmente, o que mostra que o alojamento social tem a capacidade de atenuar a disfunção sensorial provocada nos animais expostos ao choque, destacando assim o efeito do desenvolvimento da patologia quando associada ao isolamento social com o objetivo de manter intacta a memória ligada ao trauma (BERARDI, *et al.*, 2014).

Para a confirmação do desenvolvimento da PTSD e a fim de avaliar a evolução da desordem, foram realizados os testes comportamentais. O comportamento em *freezing* foi avaliado com o objetivo de observar se a memória ligada ao trauma manteve-se de fato, intacta. Esse comportamento também conhecido como congelamento, é definido como a interrupção de movimento, exceto o movimento respiratório e eriçamento dos pêlos (arrepio), demonstrando resposta ao medo e atividade em alerta, quando o animal é exposto a situações de medo ou estresse (AMARAL, V.; GOMES, K.; SOUZA, R., 2010).

Reafirmando esse conceito, Saur, L. *et al.*, (2017) observaram que o comportamento em *freezing* indica uma sensação de horror intenso ou ameaça imediata, sendo que esse comportamento sugere que os animais desenvolveram ansiedade de longa duração. Além disso, a avaliação do comportamento em *freezing* ligado ao contexto foi realizada para verificar a retenção de memória ao longo do período avaliado (CHEN, Y. *et al.*, 2012).

Observa-se, portanto em nosso estudo, um aumento do tempo em *freezing* (avaliado em segundos) dos animais expostos ao choque, quando comparados ao grupo de animais não expostos ao choque durante a reexposição. Esse comportamento foi observado em todos os tempos de retenção associado ao isolamento social em 7, 14 e 21 dias, nos grupos experimentais 1 e 2, demonstrando ativação da memória ligada ao contexto, assim como em estudos de Zhu, R. *et al* (2017), no qual animais com PTSD foram induzidos com choques elétricos inescapáveis apresentando também um aumento do tempo em *freezing* quando reexpostos ao trauma. Garcia, G. *et al* (2018) também observaram essa resposta comportamental de aumento do tempo em *freezing* em animais induzidos com choques associados à contenção.

Simultaneamente, foram avaliados no momento da reexposição, o número de bolos fecais. Um número de bolos fecais aumentado, demonstra ativação do sistema nervoso autônomo em resposta à situações de medo e/ou ansiedade, assim como “luta ou fuga”, que traduz uma reação fisiológica a algo ameaçador ou aterrorizante

(McEWEN, 2000). Observamos em nosso estudo que os animais expostos ao choque obtiveram um número maior de bolos fecais quando comparados aos animais não expostos, avaliados no momento da reexposição.

Corroborando com nosso estudo, McFadden; Hooker (2019) em um estudo com PTSD em roedores, demonstraram que quando os animais são expostos a situações semelhantes ao trauma, há um aumento do número de bolos fecais, sendo este um parâmetro indicativo de ansiedade e expectativas negativas relacionadas ao evento traumático. A quantificação de bolos fecais não é uma medida primordial para avaliação de ansiedade em estresses aversivos, entretanto, quando combinada a outros fatores como a avaliação do tempo em *freezing* e avaliações comportamentais, torna-se uma medida complementar na avaliação do estresse (ZHANG, 2015).

De acordo com as avaliações comportamentais realizadas, o teste de labirinto em cruz elevado foi realizado com objetivo de verificar o comportamento tipo ansioso dos animais. Em nosso estudo, foi possível observar um aumento do tempo de permanência nos braços fechados no grupo de animais expostos ao choque e isolados socialmente por 7, 14 e 21 dias, demonstrando comportamento tipo ansioso, característico de animais que apresentam a PTSD. Da mesma forma, Girardi (2013) observou um aumento do número de entradas nos braços fechados em um estudo com animais que desenvolveram PTSD através de um protocolo de indução por choques elétricos inescapáveis. Zhang *et al* (2015) também observaram um aumento do número de entradas nos braços fechados em animais com PTSD induzidos com *Single Prolonged Stress*, quando comparados aos seus controles.

Além disso, nós também avaliamos o comportamento dos animais frente ao teste de campo aberto. Esse teste permite avaliar a atividade locomotora de roedores, e foi realizado com este objetivo. (PRUT; BELZUNG 2003; VILELA; SONCINI; GIUSTI-PAIVA, 2009). Sabe-se que situações que envolvem o estresse podem alterar de alguma forma essa atividade. Na literatura, a relação entre o estresse e a mobilidade ainda é um pouco controversa. Em nosso estudo, no teste de campo aberto nos períodos de retenção de 7 e 14 dias não foi observado diminuição da mobilidade e alteração da distância percorrida em animais expostos e não expostos ao choque, assim como em estudo de Garcia, G. *et al* (2018) em que animais foram expostos ao choque inescapável em uma câmara com jatos de ar (*blast-exposure*) por 3 dias consecutivos e então avaliados quanto ao desenvolvimento do PTSD. Também, em um estudo de Zhang *et al* (2015), foi observado que animais que apresentaram

PTSD induzida por SPS não apresentaram mudanças comportamentais nesse teste quando comparados a animais não estressados. Contudo, em nosso estudo, animais sob o tempo de retenção de 21 dias apresentaram uma diminuição da distância percorrida e aumento do tempo de imobilidade quando expostos ao choque, comparados aos animais não expostos, ao passo que, nesse ponto, nosso estudo corroborou com estudo de Wang, M. *et al* (2018), quando este demonstrou que os animais com PTSD induzidos pelo modelo de *Single Prolonged Stress* (SPS), apresentaram também uma diminuição da distância percorrida (em metros) durante a avaliação do teste. Dessa forma, em nosso modelo estudado, parece haver uma relação entre o tempo do intervalo de retenção e a redução da atividade exploratória dos animais.

Katz *et al.*, (1981), em outro estudo, observou que o estresse não ligado ao trauma aumentou a atividade exploratória dos animais no teste de campo aberto, enquanto a exposição ao estresse crônico diminuiu a atividade de locomoção no mesmo teste. É relevante destacar que nosso estudo é um dos únicos que apresenta a avaliação do teste de campo aberto em períodos de retenção diferentes em animais que desenvolveram PTSD.

Em estudos com PTSD na pesquisa clínica ou experimental, um parâmetro comum para verificar se o animal ou indivíduo desenvolveu a desordem, é a redução da interação social. Nesse teste, observa-se o comportamento do animal a ser avaliado quando este é colocado no aparato de campo aberto com um animal não familiar. Nossos resultados demonstram que o choque pode impactar negativamente em interações sociais. Foi observada uma redução do tempo total de interação social em todos os intervalos de retenção estudados (7, 14 e 21 dias), contribuindo para o desenvolvimento da desordem.

Corroborando com esses dados, o trabalho de Berardi, *et al* (2014); Trezza; Campolongo (2013) também observaram uma redução da interação social em animais com PTSD, além de afirmar que o teste permite não somente avaliar possíveis alterações emocionais de animais traumatizados, como promover a mimetização da sintomatologia de humanos sensibilizados. Frijtag *et al* (2000) em um protocolo de exposição animal a um predador, também demonstrou que animais expostos apresentaram diminuição no contato e exploração ativa de outros ratos em relação aos animais não estressados, como também reportado na literatura previamente

(CHRISTIANSON *et al.*, 2008; MAIER; MINOR, 1993; SHORT; MAIER, 1993; SIEGMUND; WOTJAK, 2007).

Sabe-se que em animais com PTSD, a memória ligada ao contexto e /ou ao trauma está bem estabelecida através do estresse e impacto gerados pela experiência traumática. Contudo, esse estresse pode gerar déficits e prejuízos de memória não relacionada ao trauma com ênfase na memória de reconhecimento de objetos e memória espacial (GIRGENTI. *et al*, 2018).

Vasterling, *et al.* (1998) e Bremner, *et al.* (2004) sugerem que o estado de hipervigilância provocado pela repetição ao trauma pode levar a prejuízos na consolidação de memórias. Na pesquisa clínica, veteranos de guerra em testes neuropsicológicos, apresentaram menor desempenho em tarefas de atenção e memória, com deficiências relativas na aquisição de novas informações e maior sensibilidade a interferências retroativas. Saur, (2017) elucidou que existem alterações neurofisiológicas funcionais que envolvem estruturas como o córtex pré-frontal, hipocampo e amígdala, além de alterações nos circuitos preexistentes. É conhecido que essas estruturas são responsáveis pela aquisição e consolidação de memórias, bem como a plasticidade de neurônios envolvidos nesses processos. Diante disso, Bremner *et al.* (2003) ressaltaram que o hipocampo está envolvido na codificação e reconhecimento de memórias episódicas e pistas ambientais ligadas ao contexto, como aquelas presentes durante o aprendizado e a extinção do medo.

Nossos resultados demonstraram nos testes de memória de curta e longa duração que os animais com PTSD exploraram mais o objeto familiar (antigo) e menos o objeto novo, apresentando um menor índice de reconhecimento. Corroborando com nosso estudo, Alquraa, L. *et al.* (2019) observou que animais com PTSD induzidos por *Single Prolonged Stress* no teste de avaliação da memória espacial, também demonstraram prejuízos e maior número de erros tanto para memória de curta quanto de longa duração.

Adicionalmente, outros estudos já realizados em pesquisas clínicas também reforçam prejuízos de atenção e processos mnemônicos relacionados ao PTSD (BREMNER, *et al*, 1993; SUTKER *et al.*, 1995; UDDO *et al* 1993; Yehuda *et al*, 1995).

Considera-se portando que os estudos envolvendo a avaliação de memórias não ligadas ao trauma e sua relação com o PTSD ainda são escassos, embora exista uma evidência de que a exposição à estresses agudos e crônicos diante de um agente estressor podem levar à alterações notáveis induzindo mudanças comportamentais e

eventos de neuroplasticidade que afetam a memória (MUSSAZI; TORNESE; POPOLI, 2018).

Assim como outros tipos de estresses crônicos, a neurobiologia do PTSD envolve alterações funcionais de *feedbacks* hormonais, principalmente glicocorticóides liberados em função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), resultando em um aumento na reatividade neuroendócrina aos estressores (GIRARDI, 2013). Em nosso estudo, com o objetivo de observar a participação do eixo HPA, o peso da glândula adrenal foi avaliado.

Essa glândula, como parte do eixo HPA e do sistema simpato-adreno-medular, é uma estrutura essencial com função reguladora da resposta ao estresse. Quando sobrecarregada por secretar uma grande quantidade de glicocorticóides, esta estrutura gera uma hipertrofia, ampliando seu tamanho. A estrutura complexa da glândula reflete na complexidade dos estressores aos quais está respondendo. Portanto, cada região anatômica corresponde à produção de diferentes hormônios esteróides, como mineralocorticóides e glicocorticóides, os quais estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas. (BERGER, *et al.*, 2019).

Em nosso estudo, foi observado que o peso das glândulas adrenais aumentou em animais que desenvolveram o PTSD em todos os tempos de retenção (7, 14 e 21 dias). Corroborando com nossos resultados, Wilson, *et al* (2013) induziram o PTSD em ratos pela exposição a um predador, em um regime de estresse psicossocial por 31 dias, observaram que o peso da glândula adrenal em animais que desenvolveram a desordem foi maior em relação àqueles do grupo controle, inferindo que a resposta ao estresse deveu-se à hipertrofia glandular e aumento de sua densidade, através de um fenômeno de maior regulação, também chamado de *upregulated*.

Diante disso, foi demonstrada que a PTSD não é apenas um transtorno mental, mas uma condição que envolve múltiplos sistemas.

Até aqui, portanto, mediante o protocolo utilizado, foi observado que os choques inescapáveis com intensidade de 0,8 mA e 2 segundos de duração nas patas, seguido por isolamento social e retenção de 7, 14 ou 21 dias foi um protocolo eficaz para a indução da PTSD para o propósito desse estudo.

Já foi visto que a PTSD de acordo com sua cronicidade, é um fator de risco de alto impacto capaz de desencadear patologias psicossociais como a ansiedade e depressão. Sabendo que nessas patologias os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico prejudicados, sugere-se que indivíduos com PTSD também

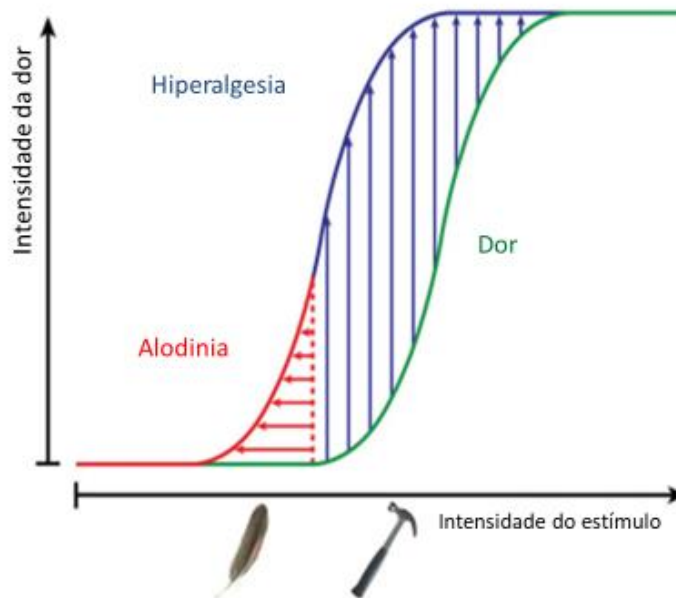
apresentem um déficit nesses sistemas, podendo afetar outras vias cerebrais como a via descendente modulatória da dor (LEE, *et al.*, 2018). Essa via, quando modulatória, é amplamente mediada por vias monoaminérgicas que inibem ou facilitam a transmissão de informações nociceptivas a nível do corno dorsal da medula espinal. Existe então uma relação entre o PTSD e a dor, visto que pelas evidências apresentadas, ambos processos envolvem os neurotransmissores serotonina e noradrenalina. Juntas, essas informações contribuem para elucidar a fisiopatologia de várias síndromes dolorosas, permitindo com que alvos de tratamentos farmacológicos sejam mais eficazes (BENARROCH, 2008).

Em estudos clínicos, os transtornos emocionais e psicológicos como o estresse crônico estão associados também à síndromes dolorosas e miofasciais como a fibromialgia, nevralgias e dores envolvendo a fáscia muscular, entretanto não se sabe claramente se a instalação primordial vem das desordens psiquiátricas ou das síndromes miofasciais (BRENNSTUHL; TARQUINIO; MONTEL., 2015; RAVN., *et al.*, 2018).

Estudos demonstram que estresses agudos promovem analgesia, como é o caso da contenção observada em roedores. Antagonicamente, o estresse crônico causa exacerbação da sensibilidade à dor através de um fenômeno chamado de hiperalgesia por estresse (IMBE; IWAI-LIAO; SENBA, 2006; VOGT, 2005; YAMASHITA *et al.*, 2013).

A hiperalgesia e alodinia diferem-se clínica e fisiologicamente. A alodinia mecânica é uma sensação dolorosa causada por estímulos inócuos como toque leve que anteriormente não causavam dor. Existem muitos mecanismos subjacentes envolvidos nesse processo, sendo que alguns deles se baseiam em alterações na mecanotransdução, excitabilidade sensorial dos neurônios e ações de mediadores inflamatórios, além de alterações em algumas conexões do Sistema Nervoso Central (EIJKELKAMP, N.; WOOD, J. 2015). A distinção fenotípica entre hiperalgesia e alodinia está esquematicamente demonstrada na figura abaixo:

Figura 31 - distinção fenotípica entre hiperalgesia e alodinia



FONTE: modificado de LOLIGNIER, S., EIJKELKAMP, N., WOOD, J. 2015

Em nosso estudo, as respostas de alodinia e hiperalgesia foram bem representadas frente aos testes nociceptivos realizados. Foi então observada uma redução no limiar nociceptivo de animais com PTSD quando comparados aos seus respectivos controles.

As respostas animais frente a um estímulo doloroso foram demonstradas através de comportamentos estereotipados de *flinch* (sacudida ou pequeno tremor da pata ou região afeta). Entretanto outras respostas reflexas também podem ser observadas como lambidas e mordidas no local afetado. Outros comportamentos também são manifestados, como contorções abdominais no teste de contorções induzidas por ácido acético, retirada da cauda no teste de *tail flick* ou placa quente e permanência por tempo prolongado em uma posição ou decúbito (HUNZIKER, M. H. L., 2010).

Para avaliar as respostas nociceptivas frente ao desenvolvimento da PTSD, foram realizados os testes de formalina e de Von Frey utilizando filamentos.

Nosso estudo evidenciou que no teste de formalina os animais expostos ao choque sob retenção de 7, 14 e dias 21 e isolamento social apresentaram um aumento nos reflexos de retirada da pata, demonstrando redução do limiar nociceptivo.

Corroborando com nosso estudo, em um estudo de Vilela, F.C *et al* (2017), observou-se que animais submetidos a um outro modelo de estresse crônico, também

apresentaram redução no limiar nociceptivo quando comparados à animais controle (não submetidos ao estresse) nos testes de formalina, Von Frey eletrônico e placa quente.

No teste de Von Frey com filamentos de diferentes densidades, os animais expostos ao choque, mesmo na avaliação basal apresentaram um limiar menor do que os não expostos ao choque, demonstrando que o desenvolvimento do PTSD promoveu uma alteração no limiar nociceptivo. De modo semelhante, após 3 horas da administração de carragenina, os animais que receberam carragenina por via intraplantar, apresentaram um limiar menor do que os animais administrados com salina intraplantar, demonstrando a ação álgica da carragenina, como em estudos de Yshikawa, M.; Aono, Y.; Saigusa T. (2017) que também utilizaram a substância.

Nossos resultados permitem-nos esclarecer que a PTSD induzida por choque per se altera a resposta nociceptiva demonstrada pela redução do limiar nociceptivo e aumento de respostas de *flinches* em animais que receberam choque e desenvolveram a PTSD.

Diante das evidências apresentadas, o estresse parece aumentar a sensibilidade à dor resultando em hiperalgesia e alodinia induzidas. Em experimentos com roedores Sun, R. *et al*, (2016) induziu o PTSD em um modelo de *Single Prolonged Stress* (SPS) e avaliou a o limiar mecânico nociceptivo no teste de Von Frey eletrônico demonstrando em seu estudo que a exposição ao SPS produziu alodinia e comportamento preditivo de ansiedade.

Corroborando ainda com nossos estudos, Durand; Standifer; Zhang, (2015), induziram a PTSD através de um modelo de *Single Prolonged Stress* (SPS) e avaliaram os animais após 7, 9, 12, 14, 18 e 21 dias de retenção através dos testes de Von Frey eletrônico e Hargreaves, verificando, portanto, os limiares mecânicos e térmicos, e observaram que os animais com PTSD tiveram aumento da sensibilidade nociceptiva frente a ambos os testes. Qi, J. *et al*, (2016) também observou uma resposta parecida de redução do limiar mecânico no teste de Von Frey onde animais com PTSD induzidos por SPS foram administrados com CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) - uma substância capaz de provocar respostas álgicas na pata dos animais também demonstraram redução do limiar nociceptivo quando comparados ao grupo de animais não submetidos ao estresse.

Nos estudos citados acima, a nocicepção mostrou-se aumentada, embora os mecanismos para que isso ocorresse ainda não tenham sido estabelecidos. Além

disso, ao nosso conhecimento não há na literatura estudos elucidando os principais mecanismos pelos quais o limiar nociceptivo está alterado na fisiopatologia da PTSD.

Em nosso estudo, ratos que desenvolveram a PTSD apresentaram um aumento do número de *flinches* no teste de formalina durante os 60 minutos avaliados, demonstrando que esses animais apresentaram maior sensibilidade à nocicepção química induzida pela formalina quando comparados com seu grupo controle. Sendo assim, investigamos a atividade de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos em animais com e sem PTSD. Sabe-se que a PTSD é conhecida por desencadear doenças psicossomáticas como depressão e ansiedade, podendo provocar déficits no sistema serotoninérgico e reduzir ligações dos transportadores 5-HT na amígdala (PETROVICK, Z., *et al.*, 2019). Entretanto, os estudos sobre animais com PTSD e sua relação com a sensibilidade à dor e a via descendente modulatória da dor ainda são escassos, destacando a relevância desse estudo.

Avaliamos e exploramos, portanto os mecanismos envolvidos na via descendente modulatória da dor e a atividade de algumas monoaminas como a serotonina e a noradrenalina, as quais, atuando via diferentes tipos de receptores, participam ativamente do processo de modulação nos nociceptores aferentes e da excitabilidade de neurônios no corno dorsal da medula espinal, atuando como coadjuvantes do processo endógeno de analgesia na via descendente modulatória da dor. Sendo assim, essas monoaminas exercem um papel fundamental em diversos tipos de dor como inflamatória e neuropática, constituindo alvos farmacológicos importantes (BENARROCH, E., 2008).

A Desordem do Estresse Pós Traumático, sendo um tipo de estresse crônico, tem o potencial de alterar e modificar a expressão de neurônios serotoninérgicos no Núcleo Dorsal da Rafe, córtex pré frontal medial e neurônios 5-HT. Nos modelos animais de indução ao estresse como o modelo SPS (*Single Prolonged Stress*), há alterações neuronais e alterações funcionais em alguns receptores de neurônios serotoninérgicos, incluindo níveis alterados de serotonina que aparentam ser uma característica neuroquímica do PTSD (LEE, B., *et al.*, 2018). Juntas, essas evidências nos permitem esclarecer que o estresse crônico foi capaz de modular negativamente atividades serotoninérgicas e noradrenérgicas nas áreas estudadas que compõem a via descendente modulatória da dor, e isso se refletiu no aumento da sensibilidade à dor nos testes de formalina e Von Frey com filamentos.

Nossos resultados moleculares demonstraram que a PTSD reduziu o número de neurônios TPH imunorreativos, neurônios c-Fos imunorreativos e neurônios com dupla marcação c-Fos/TPH nas porções dorsal, ventral e lateral do Núcleo Dorsal da Rafe e reduziu também o número de neurônios c-Fos/neurônios TH imunorreativos no *Locus Coeruleus*. A tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima que sintetiza catecolaminas como noradrenalina, adrenalina e dopamina, assim como triptofano hidroxilase (TPH), que catalisa e participa da conversão do triptofano em serotonina. Intrinsecamente, o TPH determina a concentração de serotonina, que está intimamente relacionada com o desenvolvimento de depressão e alguns mecanismos de ação de fármacos anti depressivos. Neurônios TH imunorreativos estão localizados principalmente no núcleo da zona reticular lateral, núcleo reticular rostroventrolateral (RVL), núcleo do trato solitário (SOL), *Locus Coeruleus* (LC), subdivisão ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal (vlPAG), assim como neurônios TPH imunorreativos estão localizados predominantemente no Núcleo Dorsal da Rafe. Todas estas regiões, exceto a RVL e SOL, são consideradas como origens do sistema descendente inibitório, que utiliza predominantemente noradrenalina (NA) e 5-hidroxitriptamina (5-HT) como neurotransmissores. As evidências anatômicas e fisiológicas têm mostrado que estes núcleos, diretamente ou indiretamente projetam-se para o corno dorsal da medula espinal nas lâminas superficiais e no núcleo do trato solitário (SOL), formando circuitos intrínsecos que modulam informações e transmissões nociceptivas (HAN, F.; LI, Y-Q.; ZHANG., 2003).

Dessa forma, analisamos através da técnica de imunohistoquímica a expressão de c-fos em neurônios do corno dorsal da medula espinal 90 minutos após o teste de formalina. Observamos diante disso, uma menor ativação neuronal na mesma região de animais com PTSD quando comparados à animais que não apresentaram a desordem. As projeções descendentes do Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus* liberam serotonina e noradrenalina respectivamente no corno dorsal da medula e podem reduzir a liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato e substância P nas fibras aferentes primárias, como mecanismo de modulação da resposta nociceptiva (CHEN , Q. *et al.*, 2019).

Sabe-se que o corno dorsal da medula espinal e gânglio da raiz dorsal são estruturas que contém neurônios e enovelamentos de neurônios inibitórios e excitatórios. Os estímulos nociceptivos agudos, ativam neurônios aferentes primários, que compõem as fibras A e C, as quais fornecem entrada para as lâminas I e II da

medula. A lâmina I é composta por grande parte de neurônios de projeção, enquanto os interneurônios e neurônios que arborizam compõem as lâminas II e III. Os interneurônios podem ser inibitórios ou excitatórios. Os inibitórios, classificados ainda como de primeira e segunda ordem a partir de suas localizações, morfologia, atividade eletrofisiológica e neuroquímica, exercem funções modulatórias nas informações sensoriais (MOTOJIMA, Y., *et al.*, 2017). A serotonina e noradrenalina liberadas pelo Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus*, ligam-se a receptores de interneurônios inibitórios, estimulando assim a liberação de neurotransmissores inibitórios como o GABA, que hiperpolariza os neurônios dos tratos espinotalâmico e retinoespinotalâmico. Esses interneurônios também podem liberar outros neurotransmissores, como acetilcolina (ACh) e opióides que atuam em seus receptores muscarínicos no caso de receptores Ach, e mu, kappa e delta (μ , κ e δ , respectivamente) no caso de opióides, que também inibem a atividade dos neurônios de primeira ordem. Finalmente, 5-HT e NA podem exercer seus efeitos sobre a modulação da via descendente modulatória da dor, agindo diretamente nos receptores pós-sinápticos reduzindo a resposta nociceptiva (BENARROCH, 2008).

Portanto, a redução de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos ou disfunções nesses sistemas podem causar uma redução ou supressão da via descendente modulatória e um desbalanço neurotransmissor, facilitando a resposta e amplificação da dor via mecanismos centrais (Blasco-Serra *et al.*, 2015).

Partindo do pressuposto de que animais com PTSD apresentam um quadro clínico característico, com manifestações e comportamentos tipo ansiosos e tipo depressivos, e que o estresse crônico por si só é capaz de alterar os sistemas serotoninérgicos e noradrenérgicos, destaca-se que nosso estudo foi o primeiro a pesquisar nesse modelo de indução da PTSD que a mesma altera a sensibilidade dolorosa e os sistemas serotoninérgico e noradrenérgico. Sendo assim, foi realizada uma abordagem farmacológica para determinar se o aumento da disponibilidade de 5-HT ou noradrenalina impediria o desenvolvimento de alterações provocadas pela PTSD. Para isso, pré-tratamos os animais com PTSD com um inibidor de recaptação 5-HT ou noradrenalina antes do teste de formalina. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com um inibidor de recaptação 5-HT e um inibidor da recaptação de NA impediram o aumento da sensibilidade dolorosa no teste de formalina. Diante dos dados do presente trabalho, é possível sugerir que o aumento da disponibilidade de

5-HT e noradrenalina na fenda sináptica pode estimular a ativação das vias descendentes modulatórias, reduzindo a resposta à dor.

O mecanismo de ação da fluoxetina e desipramina (antidepressivos utilizados no tratamento farmacológico desse estudo), já está bem estabelecido. É conhecido que ambos atuam no tratamento de doenças psicossomáticas e desordens psicológicas como transtornos de ansiedade e depressão inibindo seletivamente ou não, impedindo a recaptação dos mesmos na fenda sináptica, como mencionado anteriormente acima. Adicionalmente, esses antidepressivos também constituem a escolha para o tratamento de alguns tipos de dor como a dor neuropática e inflamatória (HEARN, L., *et al.*, 2014). Sendo assim, a fluoxetina e desipramina atuam duplamente como alvos farmacológicos: tratando a PTSD e a dor. É importante mencionar que assim como a fluoxetina e desipramina, outros inibidores de recaptação são utilizados no tratamento da PTSD. Dentre eles é possível citar a sertralina, paroxetina e venlafaxina, as quais também tem demonstrado eficácia reduzindo os sintomas da desordem. Ainda assim, fluoxetina e desipramina são os antidepressivos de primeira escolha para o tratamento de desordens psicológicas crônicas como o caso da PTSD (SAREEN, J., 2014).

Com base nos dados apresentados que vão de encontro com as escassas evidências presentes na literatura, os antidepressivos podem aumentar a ação das monoaminas presentes na via descendente modulatória da dor, alterando o processamento nociceptivo através da sua atividade sináptica prolongada, aumentando dessa forma a inibição descendente que se projeta na medula espinal (JANN; SLADE, 2007; USUNOFF, *et al.*, 2006; VILLEMURE; SCHWEINHARDT, 2010).

8 CONCLUSÃO

Conclui-se que os choques elétricos inescapáveis seguidos por isolamento social foram capazes de induzir a PTSD, comprovado pelo aumento do tempo em *freezing*, aumento no tempo de permanência nos braços fechados no teste de labirinto em cruz elevado, diminuição da interação social e prejuízo na consolidação de memórias não relacionadas ao trauma. Diante da comprovação do desenvolvimento da PTSD, conclui-se que a desordem foi capaz de aumentar a sensibilidade à dor através da redução da atividade de neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos no Núcleo Dorsal da Rafe e *Locus Coeruleus* respectivamente, e através da diminuição da expressão da proteína c-Fos no corno dorsal da medula espinal.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, A. L., CORTRIGHT, D.N., MCCARSON, K.E. Formalin - or adjuvant-induced peripheral inflammation increases neurokinin-1 receptor gene expression in the mouse. **Brain Res**, Rainbow Boulevard, Kansas City, v.961, p.147–152, 2003.
- AMARAL, V., GOMES, K., SOUZA, R. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Hormones and Behavior**, São Carlos – SP, Brasil, v. 57, p.128–133, 2010.
- AMDEKAR, S., et al. Anti-Inflammatory Activity of Lactobacillus on Carrageenan-Induced Paw Edema in Male Wistar Rats. **International Journal of Inflammation**, João Pessoa – PB, Brasil, v.2012, p01-06, 2012.
- ALQURAA, L. et al. Omega-3 Fatty Acids Prevent Post-Traumatic Stress Disorder-Induced Memory Impairment. **Biomolecules**, Irbid - Jordan, v.9, p.1-12, 2019.
- ASMUNDSON, G.J.G., et al. PTSD and the experience of pain: research and clinical implications of shared vulnerability and mutual maintenance models. **Can J Psychiatry**, Regina, Saskatchewan, v.47, p.930–937, 2002.
- BATISTA, K.M.; BIANCHI, E. R. F. Estresse do enfermeiro em uma unidade de emergência **Rev Latino-am Enfermagem**; São Paulo, Brasil, v.14, p.534-539, 2006.
- BLASCO-SERRA A. et al. Depressive-like symptoms in a reserpine-induced model of fibromyalgia in rats. **Physiol Behav**, Valencia, Espanha v.151, p.456-462, 2015.
- BENARROCH, E. Descending monoaminergic pain modulation. **Neurology**, Rochester, Minnesota, v.71, p. 217-221, 2008.
- BERARDI, A. et al. An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, Texas, EUA, v. 8, p. 1-12, Abr, 2014.
- BERGER, I., et al. The adrenal gland in stress – adaptation on a cellular level. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, Londres, Reino Unido, v.190, p.198-206, 2019.
- BORTOLATO, M. et al. Anxiolytic-Like Properties of the Anandamide Transport Inhibitor AM404. **Neuropsychopharmacology**, California, EUA, v.31, p. 2652–2659, 2006.
- BRENNSTUHL, M., TARQUINIO, C., MONTEL, S. Chronic Pain and PTSD: Evolving Views on Their Comorbidity. **Perspectives in Psychiatric Care**, Metz, França, v.51, p.295–304, 2015.
- BRENMER, J. D. et al., Deficits in short-term memory in post traumatic stress disorder. **American Journal of Psychiatry**, EUA, v.150, p. 1015-1019, 1993.

BREMNER, J. D., et al. Deficits in verbal declarative memory function in women with childhood sexual abuse-related posttraumatic stress disorder. **J Nerv Ment Dis**, Atlanta, Georgia, v.192, p. 643-649, 2004.

BREMNER, J. D., et al. Cortisol response to a cognitive stress challenge in posttraumatic stress disorder (PTSD) related to childhood abuse. **Psychoneuroendocrinology**, Atlanta, Georgia v.28, p.733-750, 2003.

BUGA, A. M. et al. Up-regulation of serotonin receptor 2B mRNA and protein in the peri-infarcted area of aged rats and stroke patients. **Oncotarget**, Russia, v. 7, n. 14, p. 415-430, 2016.

CALIXTO, A. V. et al., Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, Campinas – São Paulo, Brasil, v. 55, p. 37-42, 2001.

CHAPLAN, S.R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, San Diego, California, v.53, p. 55-63, 1994.

CHRISTIANSON, J.P., et al. The role of prior stressor controllability and the dorsal raphé nucleus in sucrose preference and social exploration. **Behav Brain Res**, Colorado, EUA, v.193, p.87– 93, 2008.

CHEN, Y. et al. Different Regional Gray Matter Loss in Recent Onset PTSD and Non PTSD after a Single Prolonged Trauma Exposure. **Plos One**, Shaanxi, China, v.7, p.1-8, 2012.

CHEN, Q., HEINRICHER, M.M. Descending Control Mechanisms and Chronic Pain. **Curr. Rheumatol. Rep.** 13. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s11926-019-0813-1>, 2019, acesso em 31. ago. 2019.

DA SILVA, J. R.; DA SILVA, M. L.; PRADO, W. A. Electroacupuncture at 2/100 hz activates antinociceptive spinal mechanisms different from those activated by electroacupuncture at 2 and 100 hz in responder rats. **Evid Based Complement Alternat Med**, Ribeirão Preto - São Paulo, Brasilv. 3162, p. 205-210, 2013.

DASKALAKIS, N., YEHUDA, R., DIAMOND, D. Animal models in translational studies on PTSD. **Psychoneuroendocrinology**, Nova Iorque, EUA, v.38, p.1895—1911, 2013.

FILE, S., HYDE, F. A Test of Anxiety that Distinguishes Between the Actions of Benzodiazepines and Those of Other Minor Tranquilisers and of Stimulants. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, EUA, v.11, pp. 65-69, 1979.

FILE, S. E. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. **Behavioural Brain Research**, Londres, v. 125, p. 151–157, 2001.

FRIJTAG, V. J. C. et al. Defeat followed by individual housing results in long-term impaired reward- and cognition-related behaviours in rats. **Behav Brain Res**, EUA, v.117, p.137-146, 2000.

GARCIA, G. et al. PTSD-Related Behavioral Traits in a Rat Model of Blast-Induced mTBI Are Reversed by the mGluR2/3 Receptor Antagonist BCI-838. **eNeuro**. Rússia, v.5, p.1-15, 2018.

GIRGENTI, M. et al. Molecular and Cellular Effects of Traumatic Stress: Implications for PTSD. **Curr Psychiatry Rep**. EUA, p.1-19, 2018.

GIRARDI, C. et al. Contextual exploration previous to an aversive event predicts long-term emotional consequences of severe stress. **Front. Behav. Neurosc**. São Paulo, Brasil, v. 7, p.1-8, 2013.

GOLDMAN, N., et al. Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture. **Nat Neurosci**. v.13,p.883-888, 2010.

GONG, N. et al. Activation of Spinal Glucagon-Like Peptide-1 Receptors Specifically Suppresses Pain Hypersensitivity. **The Journal of Neuroscience**, Nova Iorque, EUA, v.34, p.5322–5334, 2014.

HAN, F., ZHANG, Y-L., LI, Y-Q. Fos expression in tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat brainstem after visceral noxious stimulation: an immunohistochemical study. **World J Gastroenterol**, China, v., p.1045-1050, 2003.

HEARN, L., et al. Desipramine for neuropathic pain in adults (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, Reino Unido, v.9, p1-33, 2014.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, Bergen, Noruega, v. 30, n. 1, p. 103-14, 1987.

HUNZIKER, M. H. L. Comportamento de dor: análise funcional e alguns dados experimentais. **Temas em Psicologia**. Brasil, v.18, n.2, p.327 – 333, 2010.

IMBE, H., IWAI-LIAO, Y, SENBA, E. Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. **Frontiers in Bioscience**, Hirakata City, Japão v. 11, p. 2179-2192, Set, 2006.

JANN, M.W., SLADE, J.H. Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression. **Pharmacotherapy**. Atlanta, Georgia, v.27, p.1571-1587, 2007.

JI, R. R.; STRICHARTZ, G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. **Science Signaling**, Boston - Massachusetts, EUA, v.14, p.252-262, 2004.

JONG, M. et al. Effects of Mindfulness-Based Cognitive Therapy on Body Awareness in Patients with Chronic Pain and Comorbid Depression, **Frontiers in psychology**, Londres, Reino Unido, v.7, p1-13, 2016.

KANDEL, E. R. E J. H. SCHWARTZ. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. **Science**, Illinois, EUA, v.218, p. 433-443, 1982.

KATZ, R. J., ROTH, K. A. CARROLL, B. J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. **Neurosci Biobehav Rev.** Michigan, EUA, n.5, v.2, p. 247-51, 1981.

KLAUMANN, P. R., WOUK, A. F. P. F., SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, São Paulo, Brasil, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

LAFER, B; VALLADA FILHO, H. P. Genética e fisiopatologia dos transtornos depressivos. **Rev. Bras. Psiquiatria**, São Paulo, Brasil, v. 21, p. 12-17, 1999.

LAWTHER, A. et al. Anxiogenic drug administration and elevated plus-maze exposure in rats activate populations of relaxin-3 neurons in the nucleus incertus and serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. **Neuroscience** (2015). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience>, acesso em 05. maio. 2015.

LEE, B. et al. Tetramethylpyrazine reverses anxiety-like behaviors in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Korean J Physiol Pharmacol**, Seoul, Korea, v.22, p.525-538, 2018.

LIU, L. et al. Chronic stress increases pain sensitivity via activation of the rACC–BLA pathway in rats. **Experimental Neurology**, Chengdu, China, v.313, p.109–123, 2019.

LOLIGNIER, S., EIJKELKAMP, N., WOOD, J. Mechanical Allodynia. **Eur J Physiol**, EUA, v.467, p.133–139, 2015.

MAIER, S.F., MINOR, T.R. Dissociation of interference with the speed and accuracy of escape produced by inescapable shock. **Behav. Neurosci**, Colorado, EUA, v.107, p.139–146, 1993.

MANUAL DIAGNÓSTICO E ESTATÍSTICO DE TRANSTORNOS MENTAIS - 5ª EDIÇÃO , AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013.

McFADDEN, S., HOOKER, B. Comparing Perika St. John's Wort and Sertraline for Treatment of Posttraumatic Stress Disorder in Mice. **Journal of Dietary Supplements**, Macomb, EUA, v.10, p:1-10, 2019.

McWENN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Res**, Nova Iorque, EUA, n.886, v.1-2, p.172-189, 2000.

MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, Santiago, Chile, v. 32, n. 4, p.194-200, 1994.

MERSKEY, N. B. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms prepared by the International Association for the Study of Pain.. **IASP Press**; Seattle 2nd ed, v.11, p.177-189, 1994.

- MOTOJIMA, Y., et al. Comparison of the induction of *c-fos*-eGFP and Fos protein in the rat spinal cord and hypothalamus resulting from subcutaneous capsaicin or formalin injection. **Neuroscience**, Kitakyushu, Japão, v.356, p.64-77, 2017.
- MILLER BJ, BUCKLEY P, SEABOLT W, MELLOR A, KIRKPATRICK B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: Clinical status and antipsychotic effects. **Biol. Psychiatry**, Texas, EUA, v.70, p663–671, 2011.
- MUNRO, G. Pharmacological assessment of the rat formalin test utilizing the clinically used analgesic drugs gabapentin, lamotrigine, morphine, duloxetine, tramadol and ibuprofen: Influence of low and high formalin concentrations. **European Journal of Pharmacology**, Ballerup, Dinamarca, v. 605, p.95–102, 2009.
- MURAI, N., et al. Relationship between serotonin transporter occupancies and analgesic effects of AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, and duloxetine in reserpine-induced myalgia rats. **Neuroscience**, Ibaraki, Japão, v.289, p. 262-269, 2015.
- MUSSAZI, L., TORNESE, P., POPOLI, N. What Acute Stress Protocols Can Tell Us About PTSD and Stress-Related Neuropsychiatric Disorders. **Frontiers in Pharmacology**, Milão, Itália, v.9, p.1-13, 2018.
- NAVARRO-MATEU F, et al. Meta-analyses of the 5-HTTLPR polymorphisms and post-traumatic stress disorder. **PLOS ONE**, Murcia, Espanha, v.8, p.662-627, 2013.
- NOLDUS, L. P. J. J.; J. SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. J. EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**. EUA, v. 33, n. 3, p. 398-414, 2001.
- PACE, T. HEIM, C. A short review on the psychoneuroimmunology of posttraumatic stress disorder: From risk factors to medical comorbidities. **Brain, Behavior, and Immunity**, Atlanta, Georgia, v.25, p. 6–13, 2011.
- PAPIR-KRICHELI, D. et al. Behavioral effects of receptor specific substance P agonist. **Pain**, EUA, v. 31, p. 263-276, 1987.
- PHIFER, J. et al. Pain symptomatology and pain medication use in civilian PTSD. **PAIN**, Atlanta, Georgia, v.152, 2233–2240, 2011.
- PETROVICK, Z., et al. The association between serotonin transporter polymorphism, platelet serotonin concentration and insomnia in non-depressed veterans with Posttraumatic Stress Disorder. **Psychiatria Danubina**, Rússia, v.31, n.1, p. 78-87, 2019.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, Tours, França, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

- QI, J. et al. Crosstalk between Activated Microglia and Neurons in the Spinal Dorsal Horn Contributes to Stress induced Hyperalgesia. **Scientific Reports**, Jinan, China, p1-12, 2016.
- QUINTERO, L. et al. Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Carolina do Norte, EUA, v.67, p.449-458, 2000.
- RAJA, S. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, Rússia, v.0, p1-7, 2020.
- RAVN, S. et al. The role of posttraumatic stress symptoms on chronic pain outcomes in chronic pain patients referred to rehabilitation. **Journal of Pain Research**, Odense, Dinamarca, v.11 p.527–536, 2018.
- RASSNICK, S. et al. Injection of corticotropin-releasing hormone into the *b* or foot shock increases neuronal fos expression. **Neuroscience**, Rússia, v. 85, n. 1, pp. 259–268, 1998.
- ROSSIGNOL, D.A., FRYE, R.E. A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: Immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. **Mol. Psychiatry**, Rússia, v.17, p. 389–401, 2012.
- SAREEN, J. Posttraumatic Stress Disorder in Adults: Impact, Comorbidity, Risk Factors, and Treatment. **Can J Psychiatry**, Manitoba, Canadá, v.59, p.460-472, 2014.
- SAUR, L. **Estresse pós-traumático e tratamento com cetamina em ratos wistar: análise comportamental, histofisiológica, bioquímica e neurometabólica**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2017.
- SIEGMUND, A., WOTJAK, C.T. A mouse model of post traumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. **J. Psychiatr. Res**, Rússia, v.41, p.848–860, 2007.
- SCHESTATSKY, S., et al. Historical evolution of the concept of posttraumatic stress disorder **Rev Bras Psiquiatr**, Rússia, v.25, p.8-11, 2003.
- SHORT, K. R., MAIER, S. F. Stressor controllability, social interaction and benzodiazepine systems. **Pharmacol. Biochem. Behav**, Rússia, v.45, p.827–835, 1993.
- SHUJA, K. et al. COVID-19 PANDEMIC AND IMPENDING GLOBAL MENTAL HEALTH IMPLICATIONS. **Psychiatria Danubina**, Shanghai, China, v.32, n. 1, p 32-35, 2020.

- SREBRO, D. et al. Nitric Oxide Synthase Modulates the Antihyperalgesic Effect of the NMDA Receptor Antagonist MK-801 on Carrageenan-Induced Inflammatory Pain in Rats. **Tohoku J. Exp. Med**, Rússia, v. 234, p.287-293, 2014.
- STAM, R. PTSD and stress sensitisation: A tale of brain and body Part 2: Animal models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Utrecht, Holanda, v. 31 p.558–584, 2007.
- SUN, R. et al. Hippocampal activation of microglia may underlie the shared neurobiology of comorbid posttraumatic stress disorder and chronic pain. **Molecular Pain**, Russia, v.12, p.1-13, 2016.
- SUTKER, P. B. et al. Memory, attention and executive deficits in POW survival: Contributing biological and psychological factors. **Neuropsychology**, Russia, v.9, p.118-125, 1995.
- TORRES, I. et al. Effect of drugs active at adenosine receptors upon chronic stress-induced hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, Porto Alegre, RS, Brasil, v.481 p.197– 201, 2003.
- TREZZA, V; CAMPOLONGO, P. The endocannabinoid system as a possible target to treat both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD). **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, Roma, Itália, v. 7, p. 1-5, Ago, 2013.
- UDDO, M. et al., Memory and attention in combat-related post-traumatic stress disorder (PTSD). **Journal of Psychopathology and Behaviour Assessments**, New Orleans, Louisiana, EUA, v. 15, p.43-52.
- USUNOFF, K.G. et al. Functional neuroanatomy of pain. **Adv. Anat. Embryol. Cell Biol**, Rússia, v.181, p.1-11, 2006.
- VALLE, F. P. Effects of strain, sex and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, Illinois, EUA, v. 83, n.1, p. 103-111, 1970.
- VASTERLING, J. J. et al. Attention and memory dysfunction in posttraumatic stress disorder. **Neuropsychology**, New Orleans, Louisiana, EUA, v.12, p.25-133, 1998.
- VIANA, M. B. et al., The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Ribeirão Preto – São Paulo, Brasil, v. 49, n. 3, p. 549-554, 1994.
- VINDEGAARD, N., BENROS, M. COVID-19 pandemic and mental health consequences: Systematic review of the current evidence. **Brain, Behavior, and Immunity**, Copenhagen, Dinamarca, v.5, p.1-12, 2020.
- VILELA, F.C.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **J Ethnopharmacol**. Alfenas – MG, Brasil, v. 124, n. 2, p. 325-327, 2009.

VILELA, F. C. **Efeito antinociceptivo, antidepressivo e ansiolítico das partes aéreas de *Sonchus oleraceus*, L.** 2009. 92f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais. 2009.

VILLEMURE, C., SCHWEINHARDT, P. Supraspinal pain processing: distinct roles of emotion and attention. **Neuroscientist**, Montreal, Canadá, v.16, p.276-284, 2010.

VOGT, B. A. Pain and Emotion Interactions in Subregions of the Cingulate **Nat Rev Neurosci**, Rússia, n.6, v.7, p.533–544, 2005.

WANG, M. et al. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition on the development of post-traumatic stress disorder in rats. **Molecular Medicine Reports**, Wuhan, China, v.17 p.4925-4932, 2018.

WANG, S. et al. Effects of Oxytocin on Fear Memory and Neuroinflammation in a Rodent Model of Posttraumatic Stress Disorder. **Int. J. Mol. Sci**, EUA, v.19, p.3848-3863, 2018.

WILGENFELD, K. et al. Effect of current and lifetime posttraumatic stress disorder on 24-hour urinary catecholamines and cortisol: results from the mind your heart study. **Psychoneuroendocrinology**, Rússia, v. 52, p. 81-92, Fev, 2016.

WILSON, C.B. et al. Inflammation and Oxidative Stress Are Elevated in the Brain, Blood, and Adrenal Glands during the Progression of Post-Traumatic Stress Disorder in a Predator Exposure Animal Model. **Inflammation and Oxidative Stress in PTSD, Plos One**, Louisiana, EUA, v.8, p.1-10, 2013.

WYNN, G. Complementary and Alternative Medicine Approaches in the Treatment of PTSD. **Curr Psychiatry Rep**, Bethesda, EUA, v.17, p. 1-7, 2015.

YEHUDA, R. et al. Post Traumatic Stress Disorder. **Nature**. Nova Iorque, EUA, v.1, p.2-22, 2015.

YEHUDA, R. et al. Learning and memory in combat veterans with post traumatic stress disorder. **American Journal of Psychiatry**, Nova Iorque, EUA v.152, p.137-139, 1995.

YSHIKAWA, M., AONO, Y., SAIGUSA T. Role of orexin receptor subtypes in the inhibitory effects of orexin-A on potassium chloride-induced increases in intracellular calcium ion levels in neurons derived from dorsal root ganglion of carrageenan-treated rats. **Journal of Oral Science**, Rússia, v. 59, n. 4, 557-564, 2017.

YAMASHITA, H. et al. Stress-induced modulation of nociceptive responses in the rat anterior cingulate cortex. **Journal of Integrative Neuroscience**, Rússia, v. 12, n.2, p.235-246, 2013.



ZHANG, Y., DURAND, C., STANDIFER, C. Nociceptin/orphanin FQ peptide receptor antagonist JTC-801 reverses pain and anxiety symptoms in a rat model of post-

traumatic stress disorder. **British Journal of Pharmacology**, Pequim, China, v.172 p. 571–582, 2015.

ZHU, R. et al. Propranolol can induce PTSD-like memory impairments in rats. **Brain and Behavior**, Guangzhou, China, p.1-14, 2017.

ANEXOS

Anexo A - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA);

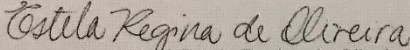
	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG <small>Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299-1063</small>	
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL		

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do PTSD sobre as respostas nociceptivas: participação da via descendente inibitória da dor", registrada com o nº 50/2016, sob a responsabilidade de Fabiana Cardoso Vilela Giusti, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em reunião de 22/11/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 22/11/2016 a 15/02/2020	
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico	
Nº de animais	432	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 30 de novembro de 2016.


 Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
 Coordenadora CEUA-UNIFAL