

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LETÍCIA APARECIDA FERREIRA

**O PAPEL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL VENTRAL NO
CONTROLE DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS
POR NEUROPATIA EM RATOS**

ALFENAS/MG
2017

LETÍCIA APARECIDA FERREIRA

**O PAPEL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL VENTRAL NO
CONTROLE DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS
POR NEUROPATIA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde da Universidade Federal Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Neurociência e Comportamento.

Orientadora: Prof. Dra. Josie Resende Torres da Silva

ALFENAS/MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Ferreira, Letícia Aparecida.

O papel do córtex pré-frontal medial ventral no controle das respostas cardiovasculares induzidas por neuropatia em ratos / Letícia Aparecida Ferreira. -- Alfenas, MG, 2017.

63 f.

Orientador: Josie Resende Torres da Silva.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Córtex Pré-Frontal. 2. Hiperalgesia. 3. Sistema Cardiovascular.
I. Silva, Josie Resende Torres da. II. Título.

CDD-573.1


LETÍCIA APARECIDA FERREIRA

"O PAPEL DO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL VENTRAL NO CONTROLE DAS
RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR NEUROPATIA EM RATOS."

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

Aprovado em: 05/09/2017


Profa. Dra. Josie Resende Torres da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Ângelo Piva Biagini
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia
-UFC

Assinatura: 

Profa. Dra. Juliana Bassalobre Carvalho Borges
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
- UNIFAL-MG

Assinatura: 

DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Oscar Ferreira e Leila Maria Machado Ferreira, com toda minha gratidão por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida. Ao meu tio e padrinho Lione Cruz Machado, que infelizmente não pode estar presente neste momento. Sei que de seu lugar olha por mim, se alegrando com minhas vitórias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e nunca me deixar fraquejar diante todas as dificuldades, mostrando o quanto sou forte. A Nossa Senhora Aparecida por me proteger e nunca me abandonar.

A minha orientadora Profa. Dra. Josie Resende Torres da Silva, pela confiança, transmitir seus conhecimentos e principalmente, por exigir de mim muito mais do que eu supunha ser capaz de fazer. Muito Obrigada por tudo, pela paciência, pela amizade e pelos ensinamentos que levarei para sempre.

A minha família, meus pais José Oscar Ferreira e Leila Maria Machado Ferreira, minhas irmãs Andreza e Josie, meu cunhado Edson, minha sobrinha Lívia Maria. Sei que eles não mediram esforços para que isso se realizasse, sem a compreensão, ajuda e confiança deles nada disso seria possível. A minha tia e madrinha Lenilda e a minha tia Lindamir, que me apoiam e sempre estão ao meu lado me incentivando.

Ao Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes, pela oportunidade ao longo deste período, ensinamentos e pelas palavras de incentivo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Lourenço da Silva, pelo incentivo, se mostrando sempre disposto a ajudar.

A minha amiga Isabella de Paula Ribeiro Argolo, que muitas vezes durante esses dois anos de mestrado eu compartilhei momentos de tristezas, alegrias, conquistas, angústias e ansiedade, mas que independente da situação sempre esteve ao meu lado me apoiando e principalmente me ajudando. Obrigada por ter ficado ao meu lado nas horas que eu mais precisei.

A todos do Laboratório de Neurofarmacologia FMRP-USP, pela recepção, colaboração, companheirismo, sempre dispostos a ajudar em todos os dias que estive no laboratório. Em especial a Daniela Lescano, que nunca mediu esforços para me ajudar, sempre me alegrando e apoiando, mesmo diante todas as dificuldades.

As amigas de pós graduação, Izabela Breda, Angélica, Nayara, por todos os momentos compartilhados, amizade e companheirismo. Obrigada por estarem sempre do meu lado, me dando força, sorrisos e conselhos. A Julia Parisi, pelos conhecimentos compartilhados e que desde o início me incentivou. A minha amiga

Maisa Cardoso, por participar sempre de maneira positiva de todos os momentos da minha vida, me aconselhando e incentivando.

A banca pelos ensinamentos, conhecimentos e apontamentos essenciais.

Por fim, a todos amigos que cruzaram este caminho especial e participaram ativamente deste processo, seja por uma oração, ou uma palavra de consolo. Serei eternamente grata!

RESUMO

O córtex pré-frontal medial ventral (vCPFM) é uma estrutura do sistema límbico envolvida na modulação de respostas autonômicas. As modificações fisiológicas e estruturais em neurônios deste núcleo estão relacionadas à hiperalgesia induzida pela neuropatia. O estudo teve como objetivo avaliar a participação do vCPFM nas alterações cardiovasculares induzidas pela neuropatia em ratos. Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando entre 160-180g. Eles foram submetidos a cirurgia para indução de neuropática, após sete dias foi realizado a estereotaxia para o implante da cânula no vCPFM para injeção do Cloreto de Cobalto (CoCl₂). A cirurgia para a canulação da artéria femoral foi feita cinco dias após a estereotaxia e um dia após foi realizado os testes nociceptivos para avaliação da Frequência cardíaca (FC) e Pressão arterial média (PAM). Foram usados os estímulos inócuos térmico ("Cold"), mecânico ("Brush"), pontual ("VonFrey") e os estímulos nocivos térmico ("Heat") e mecânico ("Pin"). Assim, avaliado sua FC e PAM. Os valores da FC e PAM aumentaram pela estimulação nociceptiva e os achados do presente estudo demonstram que esse comportamento é dependente do tipo de estimulação. O estímulo térmico inócuo, utilizando o método de esfriamento por acetona "Cold", não é capaz de gerar dor em animais falso-operados, dessa forma, também é esperado que não afete a FC e a PAM. Usando o modelo de estimulação inócua pontual com o método de "Von Frey" ou dinâmica com o método de "Brush", em animais falso operados, as amplitudes de PAM e FC foram pequenas, consistente com a baixa intensidade desses estímulos que não conseguem gerar nocicepção e dor. O estímulo nocivo mecânico "Pin" aumentou a PAM e FC. Já resposta térmica nociva "Heat" provocou um aumento sustentado da FC e também foi capaz de fornecer uma resposta cardiovascular maior do que a estimulação mecânica. Os resultados sugeriram que o envolvimento do vCPFM é importante nas respostas cardiovasculares requeridas nas respostas hiperalgésicas induzidas por estímulos nocivos e inócuos em modelo de neuropatia por ligadura de nervo.

Palavras chave: Córtex pré-frontal medial ventral, hiperalgesia, alterações cardiovasculares

ABSTRACT

The medial ventral prefrontal cortex (vCPFM) is a structure of the limbic system involved in the modulation of autonomic responses. The physiological and structural changes in the neurons of this nucleus are related to hyperalgesia induced by neuropathy. The aim of this study was to evaluate the participation of vCPFM in cardiovascular alterations induced by neuropathy in rats. Male Wistar rats weighing 160-180g were used. They underwent surgery to induce neuropathy, after seven days stereotaxy was performed for cannula implantation in vCPFM for injection of Cobalt Chloride (CoCl₂). The surgery for cannulation of the femoral artery was done 5 days after stereotactic and one day after the nociceptive tests were performed to evaluate the Heart Rate (HR) and Mean Blood Pressure (MAP). Innovative thermal stimuli ("Cold"), mechanical ("Brush"), punctual ("VonFrey") and the thermal stimuli ("Heat") and mechanical stimuli ("Pin") were used. Thus, assessed their HR and MAP. The HR and MAP values were increased by nociceptive stimulation and the findings of the present study demonstrate that this behavior is dependent on the type of estimate. The innocuous thermal stimulus, the "cold" acetone cooling method, is not able to generate pain in false-operated animals, so it is also expected to not affect HR and MAP. Using the real-time estimation model with the "Von Frey" method or dynamic with the "Brush" method, in false-operated animals, such as MAP and HR amplitudes were small, consistent with a low intensity of originals that can not Generate nociception and pain. The noxious mechanical stimulus "Pin" increased MAP and HR. It is already recommended that "Heat" caused a sustained increase in HR and was also able to provide a greater cardiovascular response than mechanical stimulation. The results suggested that vCPFM involvement is important in the cardiovascular responses required in the hyperalgesic responses induced by harmful and innocuous stimuli in a model of nerve ligation neuropathy.

Key Words: medial ventral prefrontal cortex, hyperalgesia, cardiovascular alterations

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: NERVO CIÁTICO EXPOSTO	18
FIGURA 2: AMARRAÇÃO DO NERVO CIÁTICO.....	18
FIGURA 3: SUTURA DA PELE.....	19
FIGURA 4: IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA GUIA NO VCPFM.....	20
FIGURA 5: IMPLANTAÇÃO DO CATETER A ARTÉRIA FEMORAL	21
FIGURA 6: DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO	27

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO TÉRMICO INÓCUO (“COLD”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.	29
GRÁFICO 2: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA FREQUÊNCIA CARDÍACA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO TÉRMICO INÓCUO (“COLD”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES... ..	31
GRÁFICO 3: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO MECÂNICO INÓCUO PONTUAL (“VON FREY”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.	33
GRÁFICO 4: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA FREQUÊNCIA CARDÍACA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO MECÂNICO INÓCUO PONTUAL (“VON FREY”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.	35
GRÁFICO 5: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO INÓCUO DINÂMICO (“BRUSH”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.	37
GRÁFICO 6: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA FREQUÊNCIA CARDÍACA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO INÓCUO DINÂMICO (“BRUSH”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.	39
GRÁFICO 7: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO NOCIVO MECÂNICO (“PIN”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.	41
GRÁFICO 8: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA FREQUENCIA CARDÍACA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO NOCIVO MECÂNICO (“PIN”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.	43
GRÁFICO 9: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO NOCIVO TÉRMICO (“HEAT”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.....	45

GRÁFICO 10: CURVAS INTENSIDADE-DURAÇÃO DO EFEITO CARDIOVASCULAR NA
FREQUENCIA CARDÍACA, PRODUZIDO APÓS APLICAÇÃO DE ESTÍMULO
NOCIVO TÉRMICO (“HEAT”) EM TRÊS MOMENTOS DIFERENTES.....47

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

vCPFM	Córtex Pré-frontal medial ventral
CoCl ₂	Cloreto de Cobalto
FC	Frequência cardíaca
PAM	Pressão arterial média
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
S1	Córtex somatossensorial primário
S2	Córtex somatossensorial secundário
CCA	Córtex cingulado anterior
CPF	Córtex Pré-frontal
SNAs	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
SNAp	Sistema Nervoso Autônomo Parassimpático
PL	Prélimbico
IL	Infralímbico
CPFM	Córtex Pré-frontal medial
CPFL	Córtex Pré-frontal Lateral
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
DP	Dorso peduncular
PA	Pressão arterial
CCI	Injúria por Constrição Crônica do nervo Ciático (<i>Chronic constriction injury</i>)
SAL	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido nítrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
3	JUSTIFICATIVA	15
4	OBJETIVOS	16
4.1	OBJETIVO GERAL	16
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5	METODOLOGIA	17
5.1	ANIMAIS	17
5.2	MODELO DE DOR NEUROPÁTICA	17
5.3	TÉCNICA DE IMPLANTE DE CÂNULA GUIA NO vCPFM.....	19
5.4	DROGAS	20
5.5	MICROINJEÇÃO DE DROGAS NO vCPFM	22
5.6	CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL E REGISTRO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR.....	22
5.7	DETERMINAÇÃO ANATÔMICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO DE DROGA NO VCPFM.....	22
5.8	DETERMINAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À ESTIMULAÇÃO SENSORIAL	23
5.8.1	Estimulação térmica inócua (“Cold”)	23
5.8.2	Estimulação mecânica inócua pontual (“Von Frey”)	24
5.8.3	Estimulação mecânica inócua dinâmica (“Brush”)	24
5.8.4	Estimulação mecânica nociva (“Pin”)	24
5.8.5	Estimulação térmica nociva (“Heat”)	24
5.9	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
5.10	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	26
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
7	RESULTADOS PRELIMINARES	28
7.1	PARTICIPAÇÃO DO vCPFM NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTÍMULO TÉRMICO INÓCUO (“COLD”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA.....	30
7.1.1	Avaliação dos efeitos da estimulação térmica inócua (“Cold”) sobre a pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM	30

7.1.2	Avaliação dos efeitos da estimulação térmica inócua (“Cold”) sobre a frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM.....	30
7.2	PARTICIPAÇÃO DO vCPFM NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS ESTÍMULO MECÂNICO INÓCUO PONTUAL (“VON FREY”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA.....	31
7.2.1	Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica inócua pontual ("VonFrey") sobre a pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM.....	32
7.2.2	Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica inócua pontual ("VonFrey") sobre a frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM.....	33
7.3	PARTICIPAÇÃO DO vCPFM NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS ESTÍMULO MECÂNICO INÓCUO (“BRUSH”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA	35
7.3.1	Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica inócua ("Brush") sobre a pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM	35
7.3.2	Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica inócua ("Brush") sobre a frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM.....	37
7.4	PARTICIPAÇÃO DO CPFMV NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTÍMULO MECÂNICO NOCIVO (“PIN”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA.....	39
7.4.1	Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica nociva (“Pin”) na pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM	39
7.4.2	Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica nociva (“Pin”) na frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM.....	41
7.5	PARTICIPAÇÃO DO CPFMV NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTÍMULO TÉRMICO NOCIVO (“HEAT”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA	44
7.5.1	Avaliação dos efeitos da estimulação térmica nociva (“Heat”) na pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM	44
7.5.2	Avaliação dos efeitos da estimulação térmica nociva (“Heat”) na frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM.....	45

8	DISCUSSÃO.....	48
9	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	Error! Bookmark not defined.

1 INTRODUÇÃO

A dor constitui um sintoma de alerta do organismo pela detecção de estímulos físicos, mecânicos e químicos nocivos. Ela proporciona rapidamente ao sistema nervoso um aviso para o início de respostas de proteção adequadas para minimizar as lesões (FEIN, 2011). Em 1994, o comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da dor (IASP) definiu a dor como uma experiência em que quase todos os seres humanos vivenciam, que pode ser conceituada como “experiência sensitiva e emocional desagradável decorrente ou descrito em termos de lesões teciduais reais e potenciais” (ONOFRE *et al.*, 2009). Esta associada à redução de qualidade de vida fisiológica, psicológica e socialmente, com presença de sintomas, como a ansiedade, depressão e/ou insônia (DWORKIN *et al.* 2010).

Ela pode ser classificada como dor aguda ou crônica, dependendo de seu tempo de duração. Normalmente, é considerada crônica quando ela tem duração ou se repete por mais de três a seis meses. As categorias de dor são definidas de forma variável com base na localização percebida (dor de cabeça), etiologia (dor de câncer) ou no sistema anatômico primariamente afetado, como a dor neuropática (TREEDE *et al.*, 2015).

Segundo a IASP, a dor crônica é definida como “dor causada por lesão ou doença do sistema somatossensorial”. O sistema nervoso somatossensorial fornece informações em relação ao corpo incluindo a pele, órgãos, músculo-esqueléticos e viscerais. A dor neuropática pode ser espontânea ou evocada, como uma resposta aumentada a um estímulo doloroso (hiperalgesia) ou uma resposta dolorosa ao estímulo normalmente não doloroso (alodinia) (FINNERUP *et al.*, 2015). O diagnóstico de dor neuropática requer uma história de lesão do sistema nervoso, por exemplo, acidente vascular cerebral, trauma de nervo, ou neuropatia diabética, e distribuição anatômica plausível da dor (TREEDE *et al.*, 2015).

Estudos mostraram redes corticais e subcorticais que são ativadas pela dor, incluindo regiões sensoriais, límbicas e associativas. As áreas cerebrais mais comumente ativadas por estímulos nocivos em estudos de imagem do cérebro humano são o córtex somatossensorial primário (S1), córtex somatossensorial secundário (S2), córtex cingulado anterior (CCA), ínsula, córtex pré-frontal (CPF), tálamo e cerebelo (APKARIN *et al.*, 2005). A dor crônica estimula o Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAs) e Parassimpático (SNAP), atuando diretamente na

alteração cardiovascular (HAKIM A *et al.*, 2017). Isto porque, a sinalização dolorosa ocorre também, pela mediação da inervação autonômica desde o corno posterior da medula ao SNAs, ativando, assim, resposta de frequência cardíaca e pressão arterial aumentada (MOLTNER *et al.*, 1990). Outras estruturas realizam a modulação cardiovascular, assim como os centros bulbares, o hipotálamo e regiões específicas do córtex cerebral, dando ênfase ao CPF (DAMPNEY, 1994; VERBERNE e OWENS, 1998).

O CPF é uma região do sistema límbico com função essencial na cognição, emoção e memória (DEL ARCO; MORA, 2008). Além disso, este está relacionado a um processo hiperalgésico evidenciado no estudo de Metzl e colaboradores (2009), por suas modificações fisiológicas e estruturais, através de um modelo de ligadura de um nervo. Esta estrutura pode ser dividida em Córtex Pré-frontal Medial (CPFM) e Córtex Pré-frontal Lateral (CPFL), na região medial e lateral, respectivamente. (SESACK *et al.*, 1989; GROENEWEGEN, 1988). Entretanto, a influência cardiovascular é exercida somente pelo CPFM em sua porção ventral (vCPFM) (BURNS & WYSS, 1985; TAVARES *et al.*, 2004).

As alterações cardiovasculares, como excitação, estresse, taquicardia, aumento da pressão arterial média e inibição baroreflexa são mediadas pelo CPFM, mais evidentemente no vCPFM., que compreende Córtex pré-límbico (PL) e Infralímbico (IL). As evidências indicam que a modulação simpática cardíaca e a pressão arterial ocorrem através da modulação do vCPFM, tendo como exemplo o envolvimento de uma reação de defesa e/ou medo (RESSTEL *et al.*, 2006). Kretz (1984) mostrou em um ensaio in vivo que a administração de Cloreto de Cobalto (CoCl_2) em tecido cortical de roedores tem a propriedade de bloquear a pós-sinapse, sendo esse bloqueio uma consequência da inibição da liberação pré-sináptica de neurotransmissores na fenda sináptica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A dor pode ser conceituada como “experiência sensitiva e emocional desagradável decorrente ou descrito em termos de lesões teciduais reais e potenciais” (ONOFRE *et al.*, 2009). Ela contribui fisiologicamente no controle de equilíbrio do corpo, a homeostase, sendo alerta em relação ao perigo do organismo, e liberando sinais importantes para detecção de doenças (BASBAUM *et al.*, 2009). Assim, estabelecendo situações com limiares específicos e organizados, sensibilizando sistemas, como sinal de alerta, e protegendo o indivíduo contra futuras lesões. Esta auto-preservação do corpo, tem o potencial de evitar que uma certa manifestação dolorosa evolua para doença debilitante, como inflamação, infecção viral e outras condições dolorosas (WOLKERSTORFER *et al.*, 2016).

Sendo assim, a palavra dor é determinada para a sensação dolorosa em experiências humanas, devido ao fato da mesma sofrer influências ambientais. Já em animais, o componente fisiológico da dor é chamado de nocicepção, pela ausência de comportamento externo. A nocicepção participa de uma via, ocorrendo nela o processamento doloroso, evidenciando mecanismos periféricos e centrais, como a transdução, transmissão, modulação e percepção, de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo (FERREIRA *et al.*, 2009). Este processo compreende complexas atividades neuronais, do sistema nervoso periférico e sistema nervoso central, sendo inicialmente detectados no sistema somatossensorial. Os receptores de sinalização captam a informação externa e compartilham essa informação dolorosa, tal processo é chamado de transdução.

Tal processo ocorre de início no sistema somatossensorial, sendo detectadas complexas atividades neuronais, do sistema nervoso periférico e sistema nervoso central. A partir disto, ocorre a transdução nociceptiva, onde os receptores de sinalização captam a informação externa e compartilham essa informação. Conseqüentemente, ocorrem alterações no limiar de transdução aferente, caracterizada pela sensibilização periférica, que são responsáveis pela hiperalgesia primária na região da lesão tecidual (GARRY *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2016). Após o processo de transdução, a informação passa por um processo de transmissão, que ocorre por fibras aferentes primárias. Essas fibras formam conexões diretas ou indiretas com uma das três populações de neurônios de corno dorsal da medula,

que são eles: neurônios de projeção, que participam da transmissão pela medula espinhal até centros supraespinhais superiores; neurônios proprioespinais que interconectam vários segmentos da medula espinhal; interneurônios, que podem ser excitatórios ou inibitórios. (KLAUMANN *et al.*, 2008).

Na medula espinhal, acontece a identificação do estímulo transmitido, processo chamado de modulação da dor. Tal estímulo pode ser nocivo ou não, ocorrendo sinapses com neurônios de segunda ordem e a liberação de neurotransmissores, como glutamato e substância P, para as modulações se caracterizarem como excitatórias ou inibitórias (LIU *et al.*, 1997). Posteriormente, essa informação nociceptiva passa aos centros superiores, pelos tratos espinotalâmico ou espinoreticulotalâmico em direção ao tálamo, o qual redicionará essa informação ao córtex somatossensorial, que irá processar o estímulo e determinar a intensidade e localização dolorosa, caracterizando a dor (MILLAN, 2002). Quando a dor é decorrente de uma resposta normal e previsível de trauma, como lesões químicas, térmicas ou mecânicas, ela é considerada aguda. Já a dor crônica pode ser subdividida em dor crônica nociceptiva, quando resultantes de danos nos tecidos, como no caso de câncer ou osteoartrite e a dor neuropática crônica, que está associada a uma anormalidade funcional do sistema nervoso (WOLKERSTORFER *et al.*, 2016).

A dor neuropática é resultante de lesões que acometem o sistema nervoso periférico de maneira direta, a medula espinhal. Decorrente as lesões, os estímulos passam a ser percebidos como sensação dolorosa, devido ao aumento da sensibilidade dolorosa (SELTZER *et al.*, 1999; BARON & BINDER, 2004). Essas alterações no sistema nervoso geram uma permanência no envio de sinais de dor, sendo prejudicial até se tornar patológica. Isto acontece devido a formação de neuromas, que geram excitabilidade dos potenciais de ação que conduz o influxo sensorial, levando à características dolorosas (DEVOR, 2006; LIU *et al.*, 2001). Geralmente ela é acompanhada por uma resposta autonômica complexa, mediada tanto pelo simpático e alterações parassimpáticas (DUBIN, 2000; TERKELSEN *et al.*, 2005; BURTON *et al.*, 2009). Uma exigência fundamental na investigação da dor em animais é a interpretação de comportamentos que são assumidos ou desencadeados pela percepção da dor. Embora os movimentos reflexos sejam comumente mais usados como uma forma de avaliar a dor em modelos animais, a validade desta abordagem ainda é incerta (VIERCK, 2005; LE BARS *et al.*, 2001).

No entanto, a intensidade da dor não está relacionada com a quantidade de danos ou sintomas, podendo ela persistir por muito tempo, pelos danos teciduais, mesmo ela sendo solucionada (WOLKERSTORFER et al., 2016). Dentre os sintomas da dor neuropática está a hiperalgesia, que decorre das alterações centrais ou espinhais e a sensibilização continuada dos nociceptores. A dor espontânea e a alodinia (sensação dolorosa por estímulos não nocivos) também está presente na dor neuropática, ocorrendo pela plasticidade neuronal, onde uma fibra tátil ou proprioceptiva responde como nociceptor (BARON; BINDER, 2004; BASBAUM et al., 2009; WALL; GUTNICK, 1974).

Para a investigação da dor no animal é necessário a interpretação dos comportamentos assumidos ou desencadeados pela percepção da dor, essas suposições são feitas com base em inferências (KREGEL et al., 1992). Com isso, seria mais preciso a utilização de medidas fisiológicas como um dado adicional e quantificável para a interpretação da sensação dolorosa em animais. Tal estratégia teve início nos estudos de Sherrington e Woodworth (1904), nos quais a nocicepção foi percebida após a estimulação cutânea que produziu reações somato-motoras que incluíram movimentos que simulam a expressão de certos estados afetivos. Estes comportamentos foram acompanhados de elevação da pressão arterial e foram chamados de reflexos pseudoafetivos.

Há uma interação entre o sistema cardiovascular e de regulação da dor, como por exemplo, a relação entre a pressão arterial e a percepção da dor (BRUEHL & CHUNG, 2004). Diversas experimentações em seres humanos acordados apoiam a visão de que tanto a frequência cardíaca e a pressão arterial são aumentadas pela ativação do sistema de projeção da dor (MAIXNER et al., 1990; NORDIN & FAGIUS, 1995; TASSORELLI et al., 1995; KEMPPAINEN et al., 2001). Estímulos nocivos que são claramente dolorosos em seres humanos também aumentam a FC e a PAM em animais anestesiados (ABRAM et al., 1983; NAGASAKA & YAKSH, 1995; NORDIN & FAGIUS, 1995; NASON JR & MASON, 2004; ISHIDE et al., 2005) e acordados (RIGAUD et al., 2011).

Diversos mecanismos reguladores cardiovasculares atuam isoladamente ou combinadamente, com o objetivo final de garantir um adequado volume sanguíneo circulante e pressão arterial e venosa sistêmicas estáveis, dentro dos limites fisiológicos estabelecidos. Sendo que, o volume sanguíneo e a pressão circulatória são as duas variáveis hemodinâmicas que se constituem nos alvos finais da

regulação cardiovascular (DONOGHUE et al., 1982; SPYER, 1982; GUYENET, 2006).

Centros bulbares são os responsáveis pela manutenção do tônus pressórico geral e pelo controle da pressão sanguínea pelos mecanismos reflexos cardiovasculares, como o barorreflexo, quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar (DAMPNEY, 1994; SAPRU, 2002). Além dos centros bulbares, estruturas suprabulbares também estão envolvidas na regulação do sistema cardiovascular. Estruturas mesencefálicas, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP); e estruturas prosencefálicas incluindo o hipotálamo, núcleos da amígdala, regiões específicas do córtex como, por exemplo, o CPF (DAMPNEY, 1994; VERBERNE e OWENS, 1998).

O CPF é uma estrutura de prosencéfalo, anatomicamente dividida em CPFL e CPFM (LEONARD, 1969, KRETTEK & PRICE, 1977; SARTER & MARKOWITSCH, 1984; GROENEWEGEN, 1988; SESACK et al., 1989). O vCPFM compreende o córtex PL, córtex IL e córtex dorso penduncular (DP) (GROENEWEGEN, 1988, ZILLES E WREE, 1985; PAXINOS & WATSON, 1997). O vCPFM é uma área do sistema límbico, que é capaz de facilitar as respostas autonômicas e emocionais que ocorrem durante situações estressantes (RESSTEL et al., 2006b; LISBOA et al., 2010). Ele está envolvido na modulação de respostas autonômicas, exercendo influência no sistema cardiovascular em ratos (VERBENE E OWENS, 1998, RESSTEL E CORREA. 2006b). Além disso, modificações fisiológicas e estruturais em neurônios deste núcleo estão relacionadas à hiperalgesia induzida por ligadura de nervo (METZL et al., 2009) e artrite em ratos (JI & NEUGEBAUER, 2011). A influência do CPFM sobre o sistema cardiovascular ocorre principalmente via vCPFM (BURNS & WYSS, 1985; TAVARES et al., 2004)

Reforçando a hipótese de que o vCPFM modularia o sistema cardiovascular durante exposição a estímulos estressantes, tais como na reação de defesa, é descrito que a exposição de ratos ao modelo de labirinto em cruz elevado, a protocolos de condicionamento usando choque nas patas (modelo do medo condicionado), à aplicação de jatos de ar no focinho, ao nado forçado ou ao estresse de restrição induzem expressão de proteína fos em neurônios do vCPFM (IMAKI et al., 1993; BECK & FIBIGER, 1995, CULLINAN et al., 1995; DUNCAN et al., 1996). Além disso, outro estudo tem mostrado que o vCPFM pode modular o aumento da pressão arterial (PA) e da FC evocados pelo medo condicionado ao contexto

(RESSTEL et al., 2006, 2008a). Assim, pode-se atribuir ao vCPFM uma atuação modulatória no sistema cardiovascular durante eventos aversivos, levando a alterações na pressão arterial e frequência cardíaca.

Estudos demonstram que o CoCl₂ tem sido usado para causar inibição temporária de áreas selecionadas do cérebro, reduzindo a taxa de cálcio pré-sináptica e interferindo na liberação de neurotransmissores, levando ao bloqueio funcional sináptico (KRETZ R, 1984; LOMBER, 1999). Um estudo feito por Resstel (2004) indicou que a micro injeção bilateral de CoCl₂ no vCPFM de ratos reduz o aumento nas PAM e FC, afirmando a modulação das respostas cardiovasculares pelo vCPFM.

Considerando então, que o vCPFM é capaz de modular o sistema cardiovascular e que a FC e PAM são aumentadas pela ativação do sistema de projeção da dor (MAIXNER et al., 1990; NORDIN & FAGIUS, 1995; TASSORELLI et al., 1995; KEMPPAINEN et al., 2001), este estudo evidencia a participação do vCPFM nas alterações cardiovasculares induzidas pela dor neuropática em ratos.

3 JUSTIFICATIVA

Estímulos nocivos que são claramente dolorosos em seres humanos também aumentam a FC e a PA em modelos animais. Embora o vCPFM seja capaz de modular o sistema cardiovascular, a participação deste núcleo em modelos de dor ainda não está esclarecida na literatura. Desta forma, novos estudos são necessários a fim de identificar a participação do vCPFM no controle das respostas reflexas cardiovasculares em animais com dor neuropática.

4 OBJETIVOS

Abaixo seguem os objetivos gerais e específicos do estudo.

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a participação do vCPFM nos efeitos cardiovasculares induzidos por diferentes estímulos, inócuos e nocivos, após indução de hiperalgesia por modelo de ligadura de nervo em ratos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito do vCPFM nas alterações da FC e PAM após estímulo inócuo térmico com o método “*Cold*” em animais neuropáticos.

Investigar o efeito do vCPFM nas alterações da FC e PAM após estímulo inócuo mecânico com o método “*Brush*” em animais neuropáticos.

Investigar o efeito do vCPFM nas alterações da FC e PAM após estímulo inócuo pontual com o método “*VonFrey*” em animais neuropáticos.

Investigar o efeito do vCPFM nas alterações da FC e PAM após estímulo nocivo mecânico com o método “*Pin*” em animais neuropáticos.

Investigar o efeito do vCPFM nas alterações da FC e PAM após estímulo nocivo térmico com o método “*Heat*” em animais neuropáticos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo seguem os materiais e métodos utilizados ao longo da pesquisa.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 160-180g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados no biotério do próprio laboratório e mantidos em caixas de polipropileno (39x32x17cm) com até quatro animais, sob ciclo claro/escuro de 12/12h, a uma temperatura aproximada de 25°C e água e comida *ad libitum* a vontade. Os experimentos foram realizados segundo as normas que regulamentam aspectos éticos da utilização de animais de laboratório elaborados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP. (Protocolo número: 040/2016).

5.2 MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

O modelo experimental de neuropatia utilizado nesse estudo consiste na amarração do nervo ciático em quatro pontos, realizando a constrição crônica do nervo ciático (CCI) (BENNET; XIE, 1988). Antes da cirurgia os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Sigma-Aldrich, USA; 2,5%, 1ml para 100g). O nervo ciático foi exposto unilateralmente (FIGURA 1) na região abaixo do glúteo direito e ligado com quatro amarrações com fio de seda separados por 2mm (FIGURA 2). A musculatura e a pele sobre os nervos foram suturados, com padrão de três amarrações (FIGURA 3).

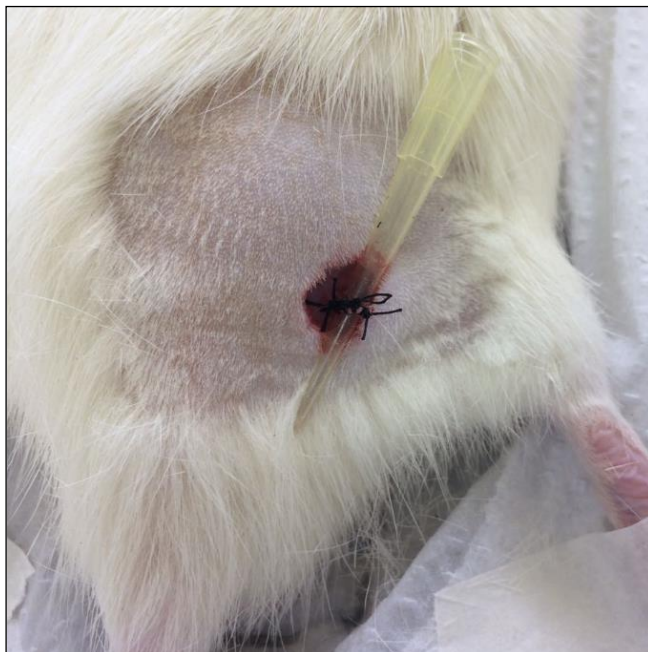
No grupo controle (*Sham*), para a cirurgia CCI, o nervo ciático foi somente exposto, sem constrições do nervo ciático. Ao final, a incisão cirúrgica foi fechada conforme a Figura 3. Os animais foram mantidos em recuperação durante sete dias, até a cirurgia de estereotaxia.

Figura 1- Nervo Ciático Exposto.



Fonte: do autor.

Figura 2- Amarração do Nervo Ciático



Fonte: do autor.

Figura 3- Sutura da Pele



Fonte: do autor.

5.3 TÉCNICA DE IMPLANTE DE CÂNULA GUIA NO vCPFM

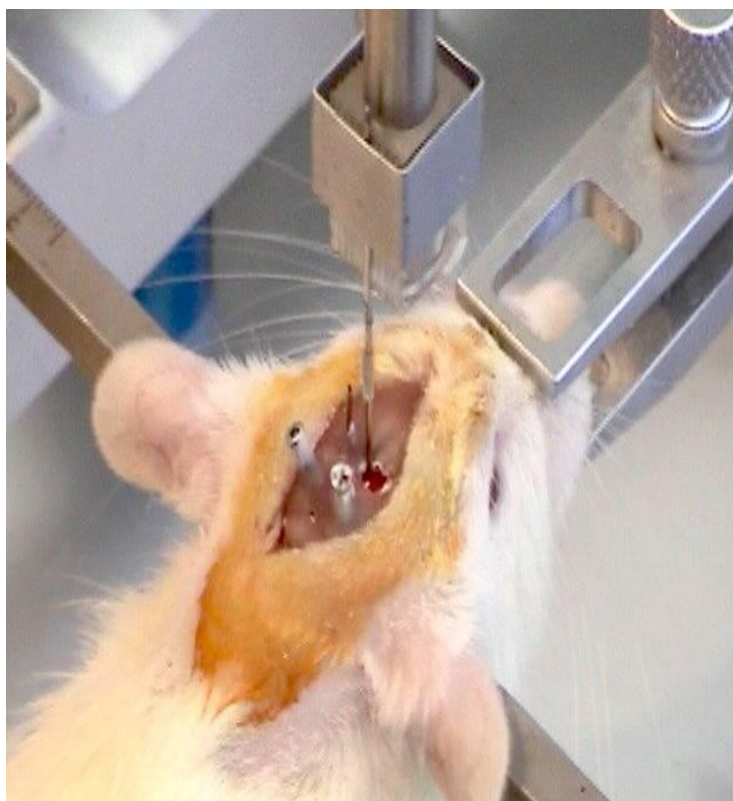
Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (Sigma-Aldrich, USA; 2,5%, 1ml para 100g). Após tricotomia na cabeça, os animais foram adaptados em um estereotáxico (Stoelting, USA) e a calota craniana foi exposta por uma incisão na pele, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. A limpeza da região foi feita utilizando-se solução salina e água oxigenada 10%. Todas as coordenadas tiveram como referência os parâmetros do Atlas de Paxinos & Watson (1986), ajustados ao peso do animal. A torre do estereotáxico foi posicionada em um ângulo de 23 graus; as coordenadas da antero-posterior: +3,4 mm em relação ao bregma; a lateral: +2,6 mm a partir da sutura média; a vertical: -3,3 mm em relação à cúpula do crânio.

Duas cânulas de aço inoxidável, de 11 mm de comprimento e 0,55 mm de diâmetro externo, foram introduzidas e direcionadas ao vCPFM bilateral do animal por meio de dois orifícios, feitos com uma broca odontológica (FIGURA 4). As cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica autopolimerizável. Um mandril,

de 0,2 mm de diâmetro foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma durante o período de recuperação do animal.

Como medida profilática, cada animal recebeu por via intramuscular 0,3mL de pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth, BR), além disso, foi administrado 0,3 mL de analgésico Banamine (Schering-Plough S/A-Brasil) 2,5 mg/mL/Kg, por via subcutânea, para reduzir a dor pós-cirúrgica.

Figura 4- Implantação da cânula guia no vCPFM.



Fonte: do autor.

5.4 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL E REGISTRO DA ATIVIDADE CARDIOVASCULAR

O animal foi anestesiado com Tribromoetanol (Sigma-Aldrich, USA; 2,5%, 1ml para 100g). Um cateter foi implantado na artéria femoral do lado esquerdo do animal para registro da pressão arterial (FIGURA 5). Os cateteres utilizados foram

constituídos de um segmento de polietileno PE-10 (3-4 cm) soldado a um outro seguimento PE-50 (12-13 cm), preenchidos com anticoagulante (heparina a 0,3% em salina) e obstruídos em sua terminação externa com um pino de metal. Uma vez implantado, A extremidade do cateter foi exteriorizada na região escapular no dorso do rato, sendo fixado por linha de sutura.

O registro basal da atividade cardiovascular (PAM e FC) do animal foi realizado 1 dia após o procedimento para a implantação da cânula na artéria femoral, permitindo sua recuperação dos efeitos do anestésico.

Os animais foram mantidos em caixas individuais durante o período pós-operatório e de registro da PAM e FC. O cateter heparinizado, foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador de sinais (AECAD E 04P), por sua vez conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Power Lab, USA). Foram registrados a PAM e a FC e os dados foram apresentados e analisados estatisticamente como Δ PAM e Δ FC.

Figura 5 – Implantação do cateter na artéria femoral.



Fonte: do autor.

5.5 DROGAS

- Veículo Salina - NaCl - a 0,9% - 0,2µL/lado.
- Cloreto de cobalto (II) hexahidratado (CoCl₂), (Aldrich Chemical Co. Inc., Milwaukee, WI, EUA. – 98% - 0,2µL/lado.

5.6 MICROINJEÇÃO DE DROGAS NO vCPFM.

A injeção foi feita por meio de uma agulha injetora 1mm mais longa do que a cânula-guia, sendo esta agulha injetora conectada a uma seringa de 10 µL (Hamilton 701-RN, EUA) por meio de um fio de polietileno (PE-10, Clay-Adams, EUA). As drogas foram injetadas em um volume de 0,2 µL. A agulha foi mantida por mais 30 segundos no interior da cânula para evitar refluxo. Cada animal recebeu apenas 0,2 µL da droga ou da salina bilateral e foi submetido ao experimento 10 minutos após a injeção.

5.7 DETERMINAÇÃO ANATÔMICA DOS SÍTIOS DE INJEÇÃO DE DROGA NO VCPFM

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com uretana 25% (10mL/Kg; i.p) antes de iniciar-se a perfusão. Foram injetados 0,2 µL de corante azul de Evan a 1% bilateralmente no vCPFM, para evidenciar o sítio de injeção na área. Em seguida, os ratos foram submetidos à abertura do tórax para a exposição do coração, uma incisão foi feita na aurícula direita para o escoamento do sangue e do perfusado e uma agulha para perfusão foi então introduzida no ventrículo esquerdo. A perfusão foi realizada inicialmente com 2 mL de salina, seguida por 2 mL de solução tamponada de formalina a 10%.

Posteriormente, o cérebro foi retirado da caixa craniana e pós-fixado em solução de perfusão. No dia seguinte, o cérebro foi seccionado em cortes frontais de

40 µm de espessura, utilizando um criostato (modelo CM 1900, LEICA, Alemanha) e corados com acetato de cresil violeta 0,5% (ACROS ORGANICS, USA) diluído em uma solução de etanol a 20%. Os cortes foram analisados utilizando o Atlas de Paxinos & Watson (1986) como referência. Animais que apresentarem injeções fora do vCPFM foram excluídos das análises seguintes.

5.8 DETERMINAÇÃO DAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES À ESTIMULAÇÃO SENSORIAL

As respostas da FC e PAM à estimulação cutânea plantar, inócua e nociva, foram medidas utilizando métodos previstos para a análise sensoriais. Os testes foram realizados após os procedimentos cirúrgicos (14 dias após o CCI, 7 dias após implante da cânula no vCPFM e 1 dia após a canulação da femoral). Todos os testes foram realizados por apenas um investigador e com os animais individualmente colocados em caixas acrílicas medindo 23x20x18 cm dispostas sobre uma mesa com assoalho de grade de aço não maleável com 5 mm² de espaço entre a malha. Todos os estímulos foram aplicados na superfície plantar da pata posterior direita e os estímulos do teste foram somente aplicados depois que o animal não exibiam mais atividade exploratória. As modalidades de teste estão descritas abaixo, e os testes nociceptivos foram realizados entre 8:00 e 17:00 h.

5.8.1 Estimulação térmica inócua (“Cold”)

O método escolhido é o da acetona, que foi aplicado uma gota de acetona na superfície plantar lateral das patas, na distribuição do nervo sural. Em seres humanos, este teste cria uma sensação de frescor não dolorosa (CHOI et al., 2004).

5.8.2 Estimulação mecânica inócua pontual (“Von Frey”)

A avaliação da hipernocicepção mecânica em ratos foi realizada como previamente descrito (VIVANCOS et al., 2004). Este método utiliza-se de um anestesiômetro, composto de um transdutor de pressão ligado a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor é adaptado a uma ponteira de 0,5 mm² que estimula diretamente a pata do animal. O experimentador é treinado a aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual provoca uma resposta de flexão característica com retirada da pata.

5.8.3 Estimulação mecânica inócua dinâmica (“*Brush*”)

Uma escova de cabelo com pelo de camelo de 8mm de largura foi aplicada longitudinalmente ao longo do centro da pata com uma taxa de cerca de 2 cm/s. A força máxima, quando medido em escala de análise usando uma escova semelhante é de cerca de 2g.

5.8.4 Estimulação mecânica nociva (“*Pin*”)

A ponta de uma agulha 22g de anestesia espinal foi aplicada na região central plantar da pata com força suficiente para recuar a pele, mas não perfurá-la. (HOGAN et al., 2004).

5.8.5 Estimulação térmica nociva (“*Heat*”)

O limiar nociceptivo térmico em ratos foi realizado como previamente descrito (HARGREAVES et al., 1988). Os animais foram colocados em compartimentos de acrílico individuais posicionados sobre uma superfície de vidro especial, que permite a passagem de forma homogênea da luz e do calor. Vinte minutos foi utilizado para

adaptação dos animais ao ambiente. Após esse período, a fonte de luz infravermelho, colocada sob a pata traseira direita do animal, foi acionada juntamente com cronômetro eletrônico, até que o animal retire a pata e, a fonte de luz e o relógio pare automaticamente.

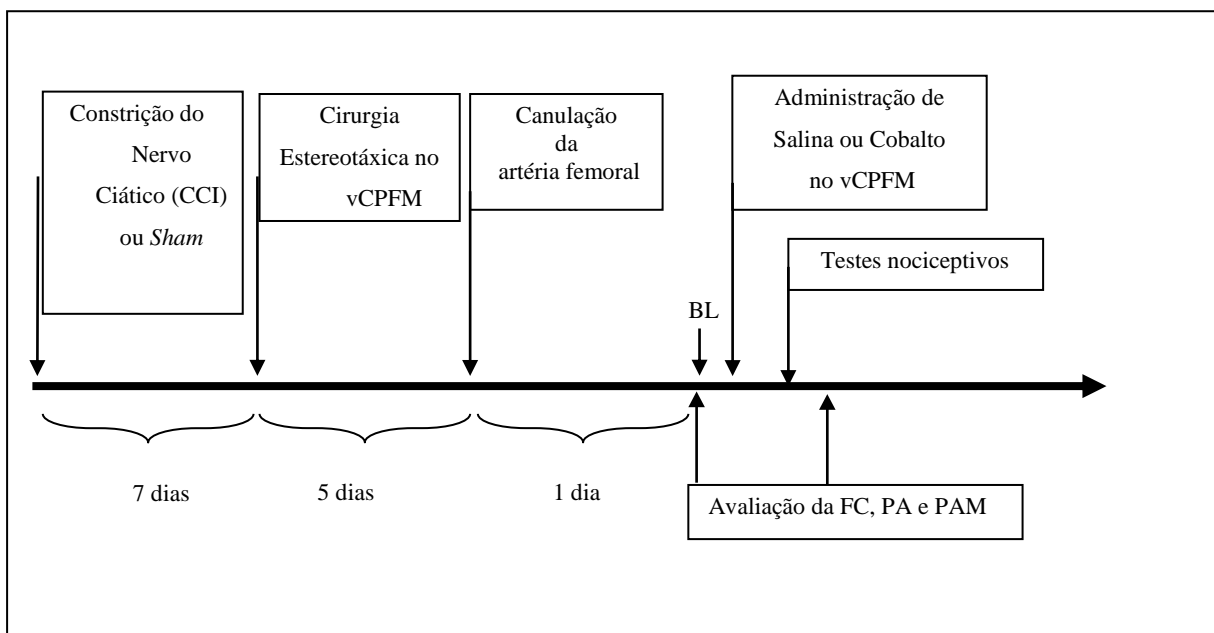
5.9 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 4 grupos para cada teste nociceptivo realizado e 4 subgrupos dentro de cada grupo. Para a Estimulação térmica inócua (“*Cold*”) foram utilizados 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de CoCl_2 no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de Cloreto de Cobalto no vCPFM. Para a Estimulação Mecânica Inócua Pontual (“*Von Frey*”) foram utilizados 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de CoCl_2 no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de Cloreto de Cobalto CoCl_2 no vCPFM. Para a Estimulação mecânica inócua dinâmica (“*Brush*”) foram utilizados 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de Cloreto de Cobalto CoCl_2 no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de CoCl_2 no vCPFM. Para a Estimulação mecânica nociva (“*Pin*”) foram utilizados 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de CoCl_2 no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de CoCl_2 no vCPFM. Para a Estimulação térmica nociva (“*Heat*”) foram utilizados 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais *Sham* neuropáticos e com administração de CoCl_2 no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de salina no vCPFM, 5 animais neuropáticos e com administração de CoCl_2 no vCPFM.

5.10 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O protocolo experimental descrito a seguir teve como objetivo estudar a participação do vCPFM em ratos submetidos a testes sensoriais nocivos e não-nocivos em animais com hiperalgesia persistente por modelo de CCI ou controle *Sham* operados. Após a cirurgia de neuropatia ou *Sham* operados, de implante de cânula no vCPFM, o reflexo cardiovascular foi estudado verificando a resposta reflexa da FC e da PAM frente a estímulos mecânicos inócuos, estímulo mecânico nocivo e estímulos térmicos de calor e frio. A figura 1 demonstra o delineamento do estudo, que seguiu a seguinte sequência: após cirurgia de ligadura de nervo na pata direita ou *Sham* operados, de implante de cânula no vCPFM, implante na artéria femoral e injetado CoCl_2 ou salina no vCPFM, os animais tiveram suas PAM e FC avaliadas (Basal 1 a 5 – BL, Tempos -5, -4, -3, -2 e -1), e foram submetidos a diferentes estímulos inócuos e nocivos (Tempo 0) e suas PA e FC avaliadas a cada 5 minutos (Tempo 1, 2, 3 e 4). Foram submetidos novamente aos estímulos inócuos e nocivos (Tempo 5) e novamente suas PAM e FC avaliadas a cada 5 minutos (Tempo 6, 7, 8 e 9). Por fim, novamente, foram submetidos aos estímulos inócuos e nocivos (Tempo 10) e as suas PAM e FC avaliadas a cada 5 minutos (Tempo 11 e 12). Dessa forma, foi demonstrado as alterações provocadas por estímulos inócuos e nocivos em animais hiperalgésicos ou não (*sham* operados), assim como, a participação do vCPFM na mediação dessas respostas.

Figura 6- Delineamento experimental do estudo.



Nota: No primeiro dia foi realizada a cirurgia para constrição do nervo ciático. Após sete dias foi realizado a cirurgia para colocação da cânula no vCPFM. Depois de cinco dias foi feito a canulação da artéria femoral para registrar as atividades cardiovasculares. Um dia após foi realizado a administração de salina ou CoCl_2 no vCPFM.

Fonte: do autor

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada modalidade de estímulo, três valores foram registrados durante uma única sessão do teste, subtraiu-se a PAM ou valor da FC em intervalos de 60s dos valores obtidos na linha de base estabelecida anteriormente, obtendo-se o ΔPAM e ΔFC . Estes três valores de ΔPAM e ΔFC foram calculados para cada animal e foram utilizados nas análises estatísticas. Os resultados de ΔPAM e ΔFC foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias com tratamento como principal fator e o tempo como medida repetida.

Em caso de interação significativa entre os fatores foi realizado o pós-teste de Bonferroni para comparar os tratamentos em cada tempo. Todos os testes estatísticos foram realizados assumindo-se o nível de significância de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 PARTICIPAÇÃO DO vCPFM NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTÍMULO TÉRMICO INÓCUO (“COLD”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA

7.1.1 Avaliação dos efeitos da estimulação térmica inócua (“Cold”) sobre a pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI e dez pelo SHAM e tiveram sua PAM avaliada antes e após estimulações mecânicas inócuas pontuais (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração de salina (SAL) ou COCL 2 no vCPFM.

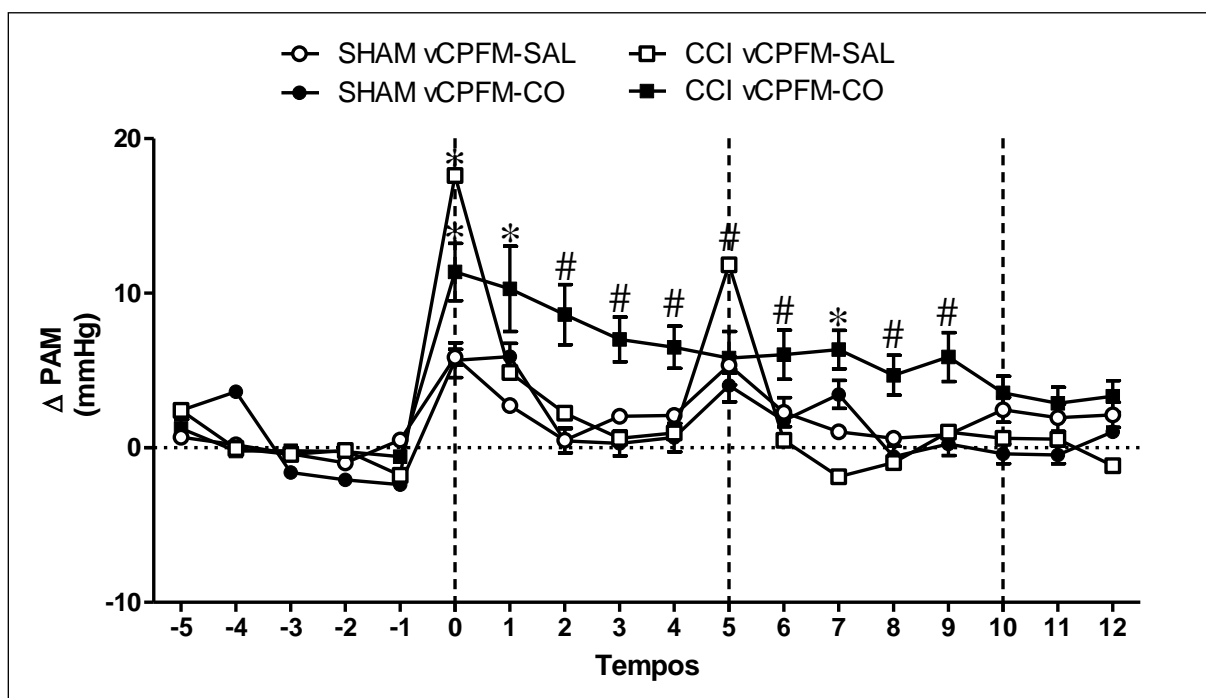
Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no Δ PAM no período basal e em todo o período avaliado (todos os tempos). Os animais do grupo SHAM vCPFM-CoCl₂ também apresentaram pequenas variações não significativas no Δ PAM no período basal e em todo o período avaliado (todos os tempos).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no Δ PAM no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação (tempo 0), apresentaram aumento significativo no Δ PAM que retornaram ao basal somente após 10 minutos (tempo 2). Uma nova variação no Δ PAM foi obtida no segundo estímulo (tempo 5), ainda diferente significativamente do grupo SHAM vCPFM-SAL, retornando ao estado basal após 5 minutos (tempo 6). Neste grupo, após a terceira estimulação, não houve aumento no Δ PAM (tempo 10) se mantendo nos minutos finais (tempos 11 e 12).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-CoCl₂ na primeira estimulação (tempo 0), apresentaram aumento significativo no Δ PAM que retornaram ao basal após 5 minutos (tempo 1). Uma nova variação no Δ PAM foi obtida no segundo estímulo (tempo 5), com maior intensidade do que no grupo CCI vCPFM-SAL e uma redução após 5 minutos (tempo 6). Após a terceira estimulação, houve aumento no Δ PAM (tempo 10) seguido de nova redução nos minutos finais (tempos 11 e 12).

As curvas obtidas no Gráfico 1 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,16}=3,735$ e tempo ($F_{17,272}=4,795$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo $F_{51,272}=2,135$.

Gráfico 1- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na pressão arterial média, produzido após aplicação de estímulo inócua térmica ("cold") em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; $CoCl_2$, pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Os pontos representam média do $\Delta \pm$ E.P.M. de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor

7.1.2 Avaliação dos efeitos da estimulação térmica inócua ("Cold") na frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI ou SHAM e tiveram sua FC avaliada antes e após estimulações térmicas inócuas (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração de SAL ou $CoCl_2$ no vCPFM.

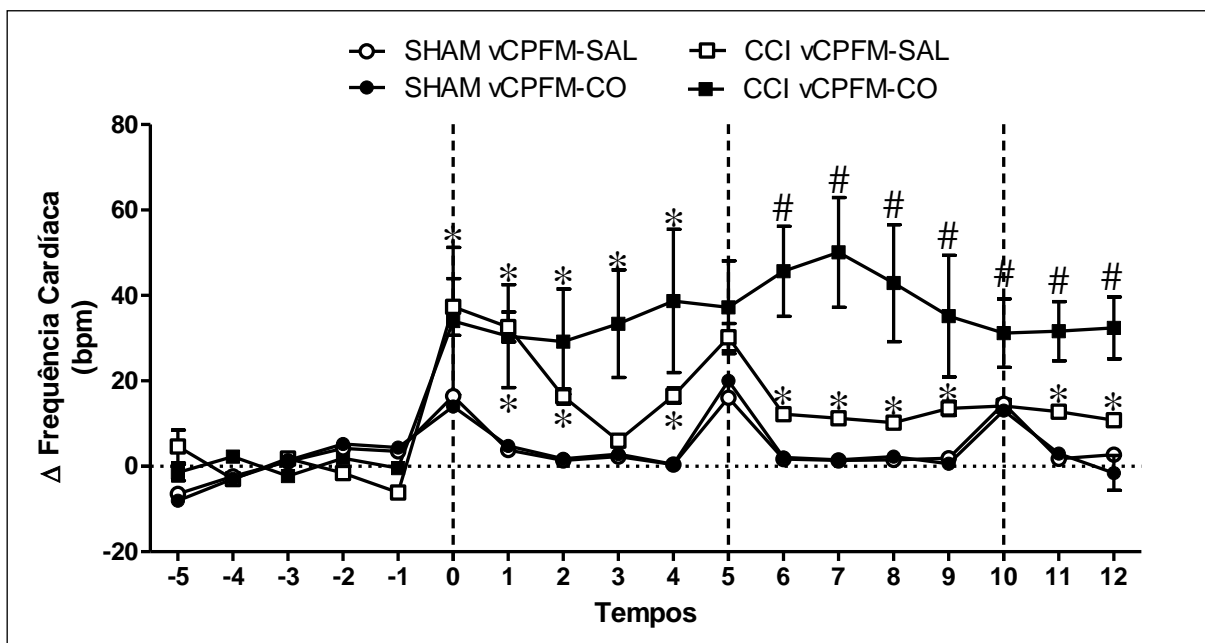
Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔFC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação (tempo 0) apresentaram aumento no ΔFC que retornaram ao basal logo após 5 minutos (tempo 1). Uma nova variação no ΔFC foi obtida no segundo estímulo (tempo 5) e retorno ao basal logo após 5 minutos (tempo 6). Após o terceiro estímulo (tempo 10), houve um novo aumento no ΔFC e retorno ao basal logo após 5 minutos (tempo 11). Os animais do grupo SHAM vCPFM- CoCl₂ apresentaram as mesmas variações do grupo SHAM vCPFM-SAL.

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔFC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação (tempo 0), apresentaram aumento significativo no ΔFC que retornaram ao basal somente após 15 minutos (tempo 3, com aumento da variação no tempo 4). Um novo aumento no ΔFC foi obtido no segundo estímulo (tempo 5), com a mesma intensidade do que no estímulo anterior, não retornando ao estado basal. Também não houve um novo aumento na presença do terceiro estímulo (tempo 10).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM- CoCl₂ apresentaram aumento significativo do ΔFC no tempo 0, porém sem o retorno aos estados basais após a segunda (tempo 5) e a terceira (tempo 10) estimulação.

As curvas obtidas no Gráfico 2 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,16}=14,788$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{17,272}=12,739$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{51,272}= 3,424$; $p < 0,001$).

Gráfico 2- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na frequência cardíaca, produzido após aplicação de estímulo inócua térmico ("cold") em três momentos diferentes



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CoCl₂, pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Os pontos representam média do $\Delta \pm$ E.P.M. de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. (P < 0,05).

Fonte: do autor

7.2 PARTICIPAÇÃO DO CPFMV NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTÍMULO MECÂNICO INÓCUO PONTUAL ("VON FREY") EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA

7.2.1 Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica inócua pontual ("Von Frey") na pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI ou SHAM e tiveram sua PAM avaliada antes e após estimulações mecânicas inócuas pontuais (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração de SAL ou CoCl_2 no vCPFM.

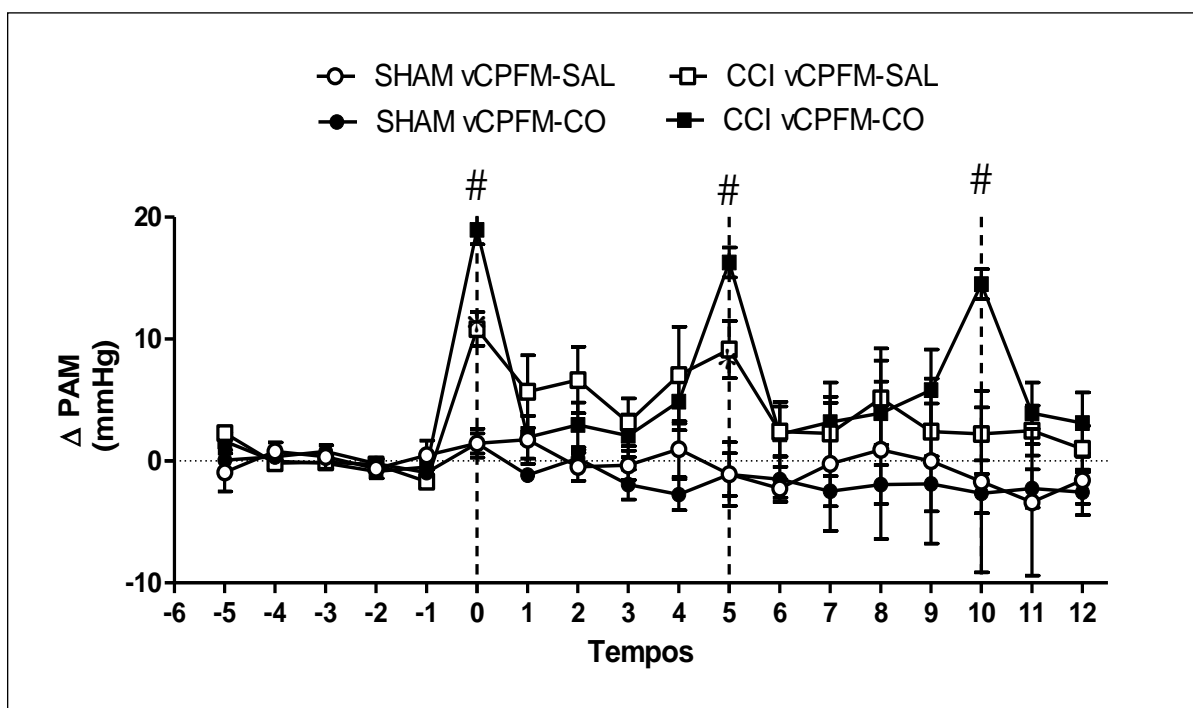
Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no Δ PAM no período basal e em todo o período avaliado (todos os tempos). Os animais do grupo SHAM vCPFM- CoCl_2 apresentaram pequenas variações não significativas no Δ PAM no período basal e em todo o período avaliado (todos os tempos).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no Δ PAM no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação (tempo 0), apresentaram aumento significativo no Δ PAM sem retorno ao basal após 20 minutos (tempo 1 a 4). Uma nova variação no Δ PAM foi obtida no segundo estímulo (tempo 5), com a mesma intensidade do que no estímulo anterior e retorno ao basal no tempo seguinte (tempo 6) sem alteração da variação nos minutos seguintes (tempos 6 a 12) mesmo após a terceira estimulação (tempo 10).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM- CoCl_2 na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento significativo no Δ PAM que retornaram ao basal após 5 minutos (tempo 1). Uma nova variação no Δ PAM foi obtida no segundo estímulo (tempo 5), maior do que no grupo CCI vCPFM-SAL e uma redução após 5 minutos (tempo 6). Após a terceira estimulação, houve aumento no Δ PAM (tempo 10) seguido de nova redução nos minutos finais (tempos 11 e 12).

As curvas obtidas no Gráfico 3 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,16}=3,735$ e tempo ($F_{17,272}=4,795$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo $F_{51,272}=2,135$.

Gráfico 3- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na pressão arterial média, produzido após aplicação de estímulo inócua pontual (“*von frey*”) em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CoCl_2 , pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Os pontos representam média do $\Delta \pm$ E.P.M. de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor.

7.2.2 Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica inócua pontual (“*Von Frey*”) na frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI ou SHAM e FC avaliada antes e após estimulações mecânicas inócua pontuais (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração de SAL ou CoCl_2 no vCPFM.

Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no Δ FC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Não houve variação no Δ FC no período observado (tempos 0 a 12). Os animais do grupo SHAM

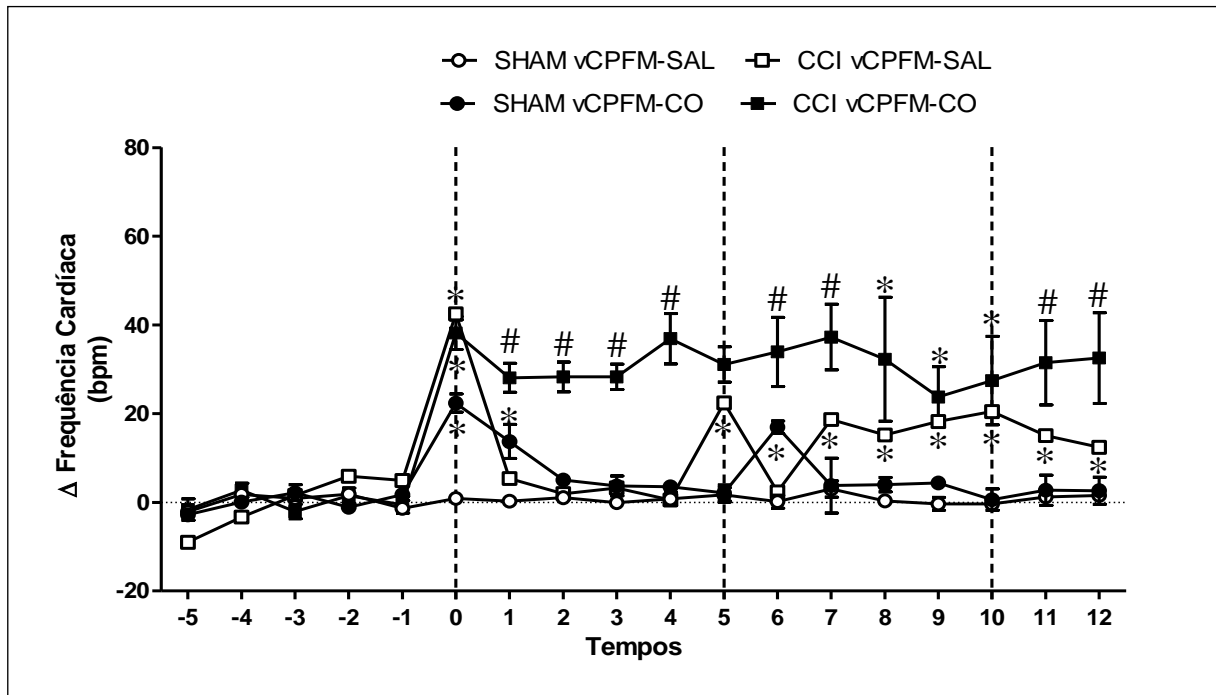
vCPFM- CoCl₂ apresentaram variações significativas no ΔFC somente após a primeira estimulação (tempo 0) retornando ao basal após dez minutos e apresentando uma nova variação no ΔFC somente no tempo 6, sem relação aos estímulos seguintes (tempo 5 e 10).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔFC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento significativo na ΔFC que retornaram ao basal somente após 5 minutos (tempo 1). Uma nova variação no ΔFC foi obtida no segundo estímulo (tempo 5), retornando ao estado basal após 5 minutos (tempo 6) e aumentando novamente no tempo 7 e permanecendo aumentado até o tempo 12.

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-CoCl₂ apresentaram aumento significativo do ΔFC no tempo 0, que se manteve aumentado durante o restante do período de observação (tempos 1 a 12) e não tiveram aumento com os demais estímulos.

As curvas obtidas no Gráfico 4 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,15} = 10,567$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{17,255} = 16,473$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{51,255} = 5,205$; $p < 0,001$).

Gráfico 4- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na frequência cardíaca, produzido após aplicação de estímulo inócua pontual (“von frey”) em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CoCl_2 , pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Seta representa o momento da pré-administração de SAL ou COCL_2 no vCPFM. Os pontos representam média do $\Delta \pm \text{E.P.M.}$ de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor.

7.3 PARTICIPAÇÃO DO CPFMV NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTÍMULO MECÂNICO INÓCUO DINÂMICO (“BRUSH”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA

7.3.1 Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica inócua dinâmica (“Brush”) na pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI ou SHAM e tiveram sua PAM avaliada antes e após estimulações mecânicas inócuas dinâmicas (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração de SAL ou CoCl_2 no vCPFM.

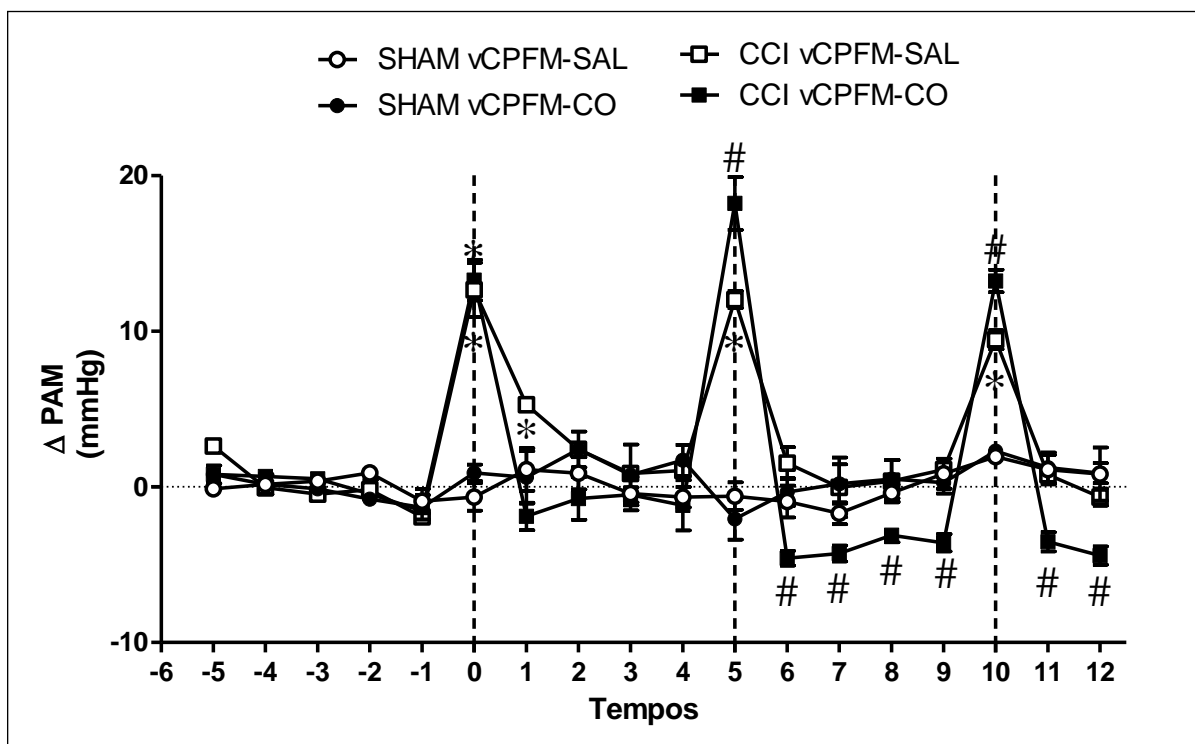
Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔPAM no período basal e em todo o período avaliado (todos os tempos). Os animais do grupo SHAM vCPFM- CoCl_2 apresentaram pequenas variações não significativas no ΔPAM no período basal e em todo o período avaliado (todos os tempos).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔPAM no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação (tempo 0), apresentaram grande aumento significativo no ΔPAM que retornaram ao basal após 15 minutos (tempo 3). Uma nova variação no ΔPAM foi obtida no segundo estímulo (tempo 5), com a mesma intensidade do que no estímulo anterior e retorno ao basal no tempo seguinte (tempo 6). Após a terceira estimulação, houve aumento no ΔPAM (tempo 10) seguido de retorno ao basal nos minutos finais (tempos 11 e 12).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM- CoCl_2 na primeira estimulação (tempo 0), apresentaram grande aumento significativo no ΔPAM que retornaram ao basal após 5 minutos (tempo 1). Uma nova variação no ΔPAM foi obtida no segundo estímulo (tempo 5), com maior intensidade do que no grupo CCI vCPFM-SAL e uma redução pós estimulação no ΔPAM , ficando abaixo do grupo CCI vCPFM-SAL (nos tempos 6, 7, 8 e 9). Após a terceira estimulação, houve aumento no ΔPAM (tempo 10) seguido de nova redução nos minutos finais (tempos 11 e 12).

As curvas obtidas no Gráfico 5 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,15} = 13,191$, $p < 0,001$) e tempo ($F_{17,255} = 41,944$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo $F_{51,255} = 17,124$; $p < 0,001$).

Gráfico 5- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na pressão arterial média, produzido após aplicação de estímulo inócuo dinâmico (“brush”) em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CoCl_2 , pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Seta representa o momento da pré-administração de SAL ou COCL_2 no vCPFM. Os pontos representam média do $\Delta \pm$ E.P.M. de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor.

7.3.2 Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica inócua dinâmica (“Brush”) na frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI (CCI) ou falso operados (SHAM) e tiveram sua frequência cardíaca (FC) avaliada antes e após estimulações mecânicas inócuas dinâmicas (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração de SAL ou CoCl_2 no vCPFM.

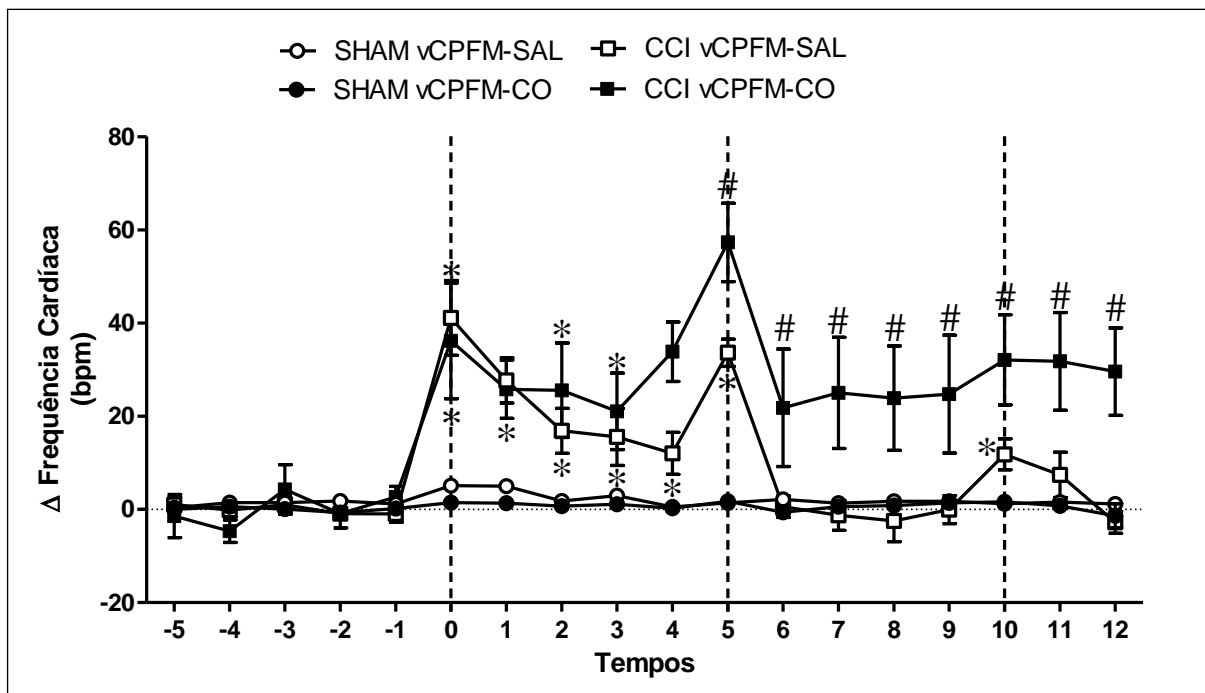
Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL e do grupo SHAM vCPFM- CoCl₂ não apresentaram variações significativas no ΔFC em todo o tempo avaliado.

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔFC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação (tempo 0), apresentaram aumento significativo na ΔFC e não houve retorno ao basal após 20 minutos (tempo 1 a 4). Uma nova variação no ΔFC foi obtida no segundo estímulo (tempo 5), na mesma intensidade do que no estímulo anterior, retornando ao estado basal após 5 minutos (tempo 6). Neste grupo, houve um pequeno aumento na variação do ΔFC após novo estímulo (tempo 10) e manutenção das variações próximas ao basal nos minutos finais (tempo 11 e 12).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM- CoCl₂ apresentaram aumento significativo do ΔFC no tempo 0, porém sem o retorno aos estados basais após 20 minutos da estimulação (tempos 1, 2, 3 e 4, no tempo 4 diferente significativamente do SHAM vCPFM-SAL). Um novo estímulo (tempo 5) produziu variação significativamente maior em relação ao grupo CCI vCPFM-SAL. Também é observado o não retorno ao basal (nos tempos 6, 7, 8 e 9) que se manteve com a mesma variação nos tempos finais, mesmo na presença de um novo estímulo (tempo 10).

As curvas obtidas no Gráfico 6 foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,16} = 22,735$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{17,272} = 9,180$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{51,272} = 3,921$; $p < 0,001$).

Gráfico 6- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na frequência cardíaca, produzido após aplicação de estímulo inócuo dinâmico (“brush”) em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CoCl_2 , pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Seta representa o momento da pré-administração de SAL ou COCL_2 no vCPFM. Os pontos representam média do $\Delta \pm \text{E.P.M.}$ de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor.

7.4 PARTICIPAÇÃO DO CPFMV NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTÍMULO MECÂNICO NOCIVO (“PIN”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA

7.4.1 Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica nociva (“Pin”) na pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI (CCI) ou falso operados (SHAM) e tiveram sua pressão arterial média (PAM) avaliada antes e após estimulações mecânicas nocivas (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração SAL ou CoCl_2 no vCPFM.

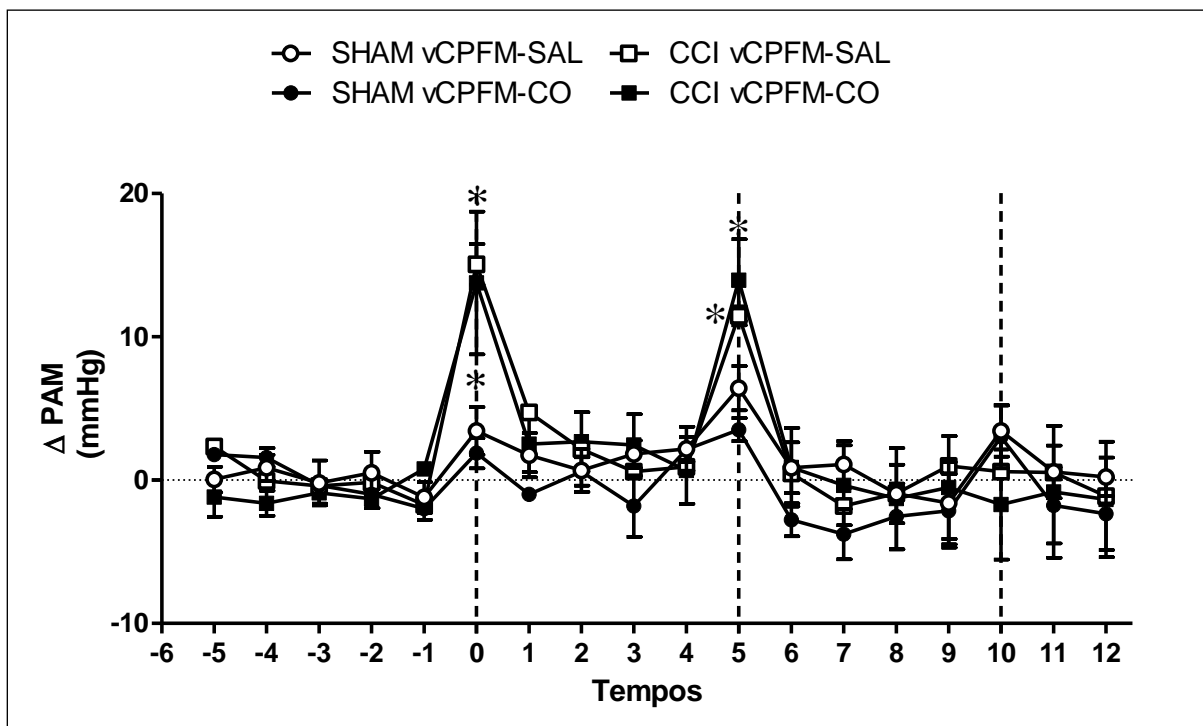
Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔPAM no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento no ΔPAM que retornaram ao basal logo após 10 minutos (tempo 2). Uma nova variação no ΔPAM foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5), com maior intensidade do que no tempo anterior, retornando ao estado basal após 5 minutos (tempo 6). Finalmente, após a terceira estimulação nociva, houve um novo aumento no ΔPAM (tempo 10) que retornou ao basal em cinco minutos (tempo 11) e se manteve nos cinco minutos finais (tempo 12). Os animais do grupo SHAM vCPFM- CoCl_2 apresentaram pequenas variações não significativas no ΔPAM no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento no ΔPAM que retornaram ao basal logo após 5 minutos (tempo 1). Uma nova variação no ΔPAM foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5), com uma redução significativa após 5 minutos (tempo 6). Após a terceira estimulação nociva, houve um novo aumento no ΔPAM (tempo 10) que retornou ao basal em cinco minutos (tempo 11) e se manteve nos cinco minutos finais (tempo 12).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔPAM no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram grande aumento significativo no ΔPAM que retornaram ao basal somente após 10 minutos (tempo 2). Uma nova variação no ΔPAM foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5), com a mesma intensidade do que no estímulo anterior, ainda diferente significativamente do grupo SHAM vCPFM-SAL, retornando ao estado basal após 5 minutos (tempo 6). Neste grupo, após a terceira estimulação nociva, não houve aumento no ΔPAM (tempo 10) se mantendo nos minutos finais (tempos 11 e 12).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-CO apresentaram os mesmos padrões de variações do grupo CCI vCPFM-SAL. Um aumento significativo do ΔPAM nos tempos 0 e 5 e o retorno aos estados basais após a estimulação.

As curvas obtidas foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,16} = 0,745$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{17,272} = 16,399$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{51,272} = 2,641$; $p < 0,001$).

Gráfico 7 - Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na pressão arterial média, produzido após aplicação de estímulo nocivo mecânico (“pin”) em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CoCl₂, pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Os pontos representam média do $\Delta \pm$ E.P.M. de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor.

7.4.2 Avaliação dos efeitos da estimulação mecânica nociva (“Pin”) na frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI (CCI) ou falso operados (SHAM) e tiveram sua frequência cardíaca (FC) avaliada antes e após estimulações mecânicas nocivas (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração de SAL ou CoCl_2 no vCPFM.

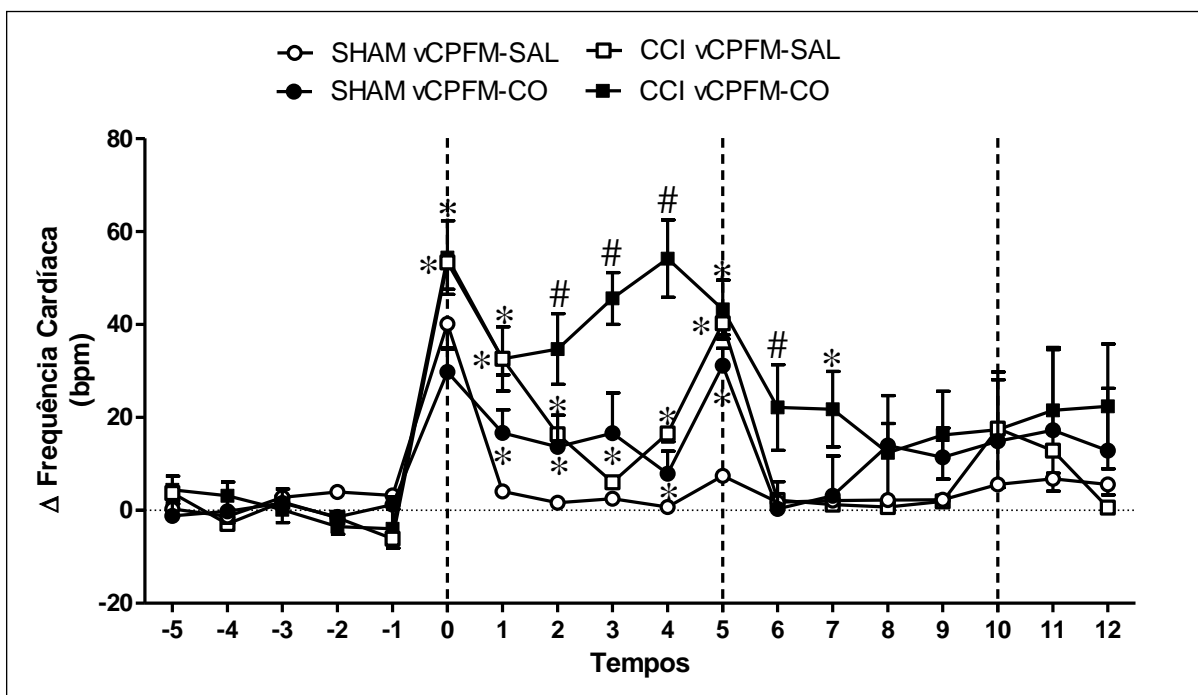
Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔFC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento no ΔFC que retornaram ao basal logo após 5 minutos (tempo 1). Uma nova variação muito menor no ΔFC foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5), e se manteve durante os minutos finais, mesmo com uma nova estimulação nociva (tempo 10). Os animais do grupo SHAM vCPFM- CoCl_2 apresentaram pequenas variações não significativas no ΔFC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento no ΔFC , que não retornaram ao basal nos minutos seguintes (tempos 1, 2, 3 e 4). Uma nova variação no ΔFC foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5) na mesma intensidade do estímulo anterior, com uma redução significativa após 5 minutos (tempo 6) retornando a estados de variação maior nos minutos finais porém não significativo em relação ao grupo SHAM vCPFM-SAL.

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔFC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram grande aumento significativo na ΔFC que retornaram ao basal somente após 15 minutos (tempo 3, com aumento da variação no tempo 4). Uma nova variação no ΔFC foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5), a mesma intensidade do que no estímulo anterior, diferente significativamente do grupo SHAM vCPFM-SAL, retornando ao estado basal após 5 minutos (tempo 6). Neste grupo, houve um aumento na variação do ΔFC após o tempo 8, que se manteve mesmo na presença de um novo estímulo nocivo (tempo 10).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM- CoCl_2 apresentaram aumento significativo do ΔFC no tempo 0, porém sem retorno aos estados basais após a estimulação (tempos 1, 2, 3 e 4). Um novo estímulo (tempo 5) não produziu variação em relação ao grupo não operado (SHAM vCPFM-SAL e SHAM vCPFM-CO). Após o retorno ao basal (tempo 6) se manteve com a mesma variação nos tempos finais, mesmo na presença de um novo estímulo nocivo (tempo 10).

As curvas obtidas foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,16} = 3,089$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{17,272} = 26,253$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{51,272} = 3,442$; $p < 0,001$).

Gráfico 8- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na frequência cardíaca, produzido após aplicação de estímulo nocivo mecânico (“pin”) em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CoCl_2 , pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Seta representa o momento da pré-administração de SAL ou CO no vCPFM. Os pontos representam média do $\Delta \pm \text{E.P.M.}$ de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor.

7.5 PARTICIPAÇÃO DO CPFMV NO CONTROLE DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS POR ESTÍMULO TÉRMICO NOCIVO (“HEAT”) EM ANIMAIS COM HIPERALGESIA NEUROPÁTICA

7.5.1 Avaliação dos efeitos da estimulação térmica nociva (“Heat”) na pressão arterial média de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI (CCI) ou falso operados (SHAM) e tiveram sua pressão arterial média (PAM) avaliada antes e após estimulações térmicas nocivas (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração SAL ou CoCl_2 no vCPFM.

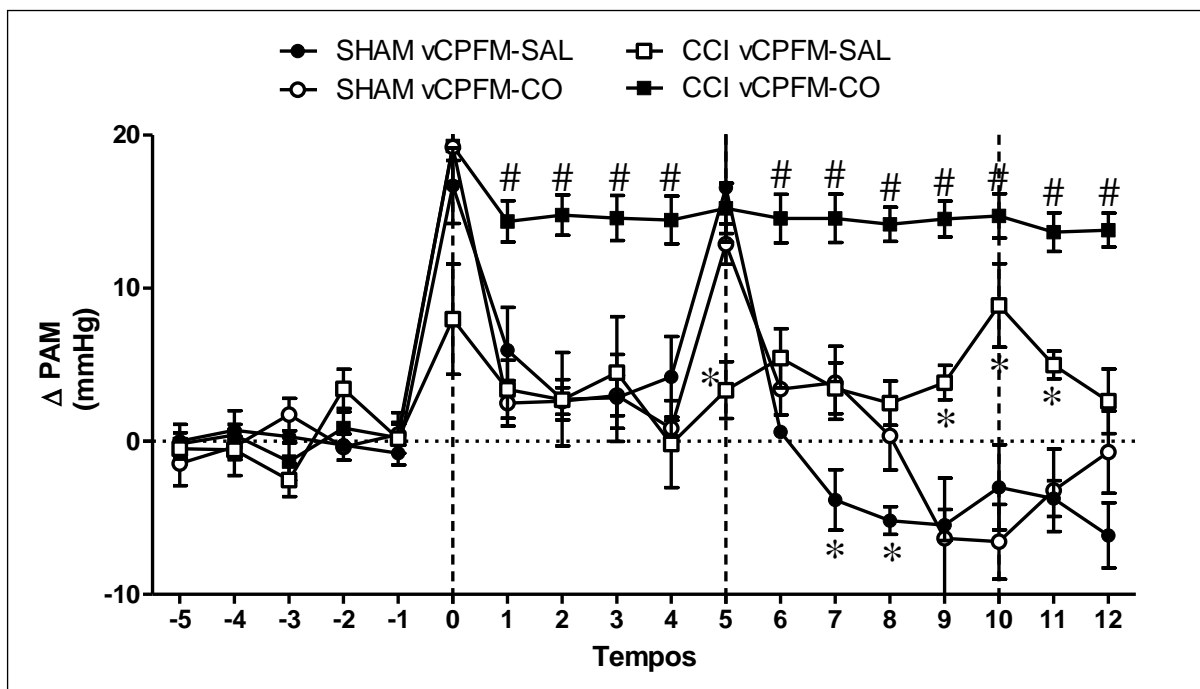
Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔPAM no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento no ΔPAM que retornaram ao basal logo após 10 minutos (tempo 2). Uma nova variação no ΔPAM foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5), com uma redução da variação do ΔPAM abaixo do estado basal vinte minutos após (tempo 9). Após a terceira estimulação nociva (tempo 10), houve um retorno dos valores do ΔPAM ao basal. Os animais do grupo SHAM vCPFM- CoCl_2 apresentaram na primeira estimulação nociva (tempo 0) e na segunda estimulação (tempo 10) um comportamento semelhante ao grupo SHAM vCPFM-SAL, no entanto após a segunda estimulação houve uma redução do valor do ΔPAM abaixo dos valores basais no tempo 7, dez minutos antes do grupo SHAM vCPFM-SAL, e que se manteve abaixo durante os minutos finais.

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔPAM no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0) apresentaram aumento significativo no ΔPAM que retornaram ao basal somente após 10 minutos (tempo 2). Uma nova variação no ΔPAM não foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5), com subsequente manutenção dos valores até o tempo 9. No terceiro estímulo (tempo 10), houve um novo aumento do ΔPAM com retorno aos valores basais após dez minutos (tempo 12).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM- CoCl_2 apresentaram aumento no ΔPAM após o primeiro estímulo nocivo (tempo 0) que se manteve aumentado em todo o período observado (tempos 1 a 12).

As curvas obtidas foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,16} = 46,806$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{17,272} = 23,515$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{51,272} = 6,656$; $p < 0,001$).

Gráfico 9- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na pressão arterial média, produzido após aplicação de estímulo nocivo térmico ("heat") em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CoCl₂, pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Seta representa o momento da pré-administração de SAL ou CO no vCPFM. Os pontos representam média do $\Delta \pm$ E.P.M. de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor.

7.5.2 Avaliação dos efeitos da estimulação térmica nociva ("Heat") na frequência cardíaca de ratos neuropáticos e a participação do vCPFM

Neste experimento dez animais foram operados pelo modelo de CCI (CCI) ou falso operados (SHAM) e tiveram sua frequência cardíaca (FC) avaliada antes e após estimulações térmicas nocivas (tempos 0, 5 e 10) com pré-administração de SAL ou CoCl₂ no vCPFM.

Os animais do grupo SHAM vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no Δ FC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento no Δ FC que retornaram ao

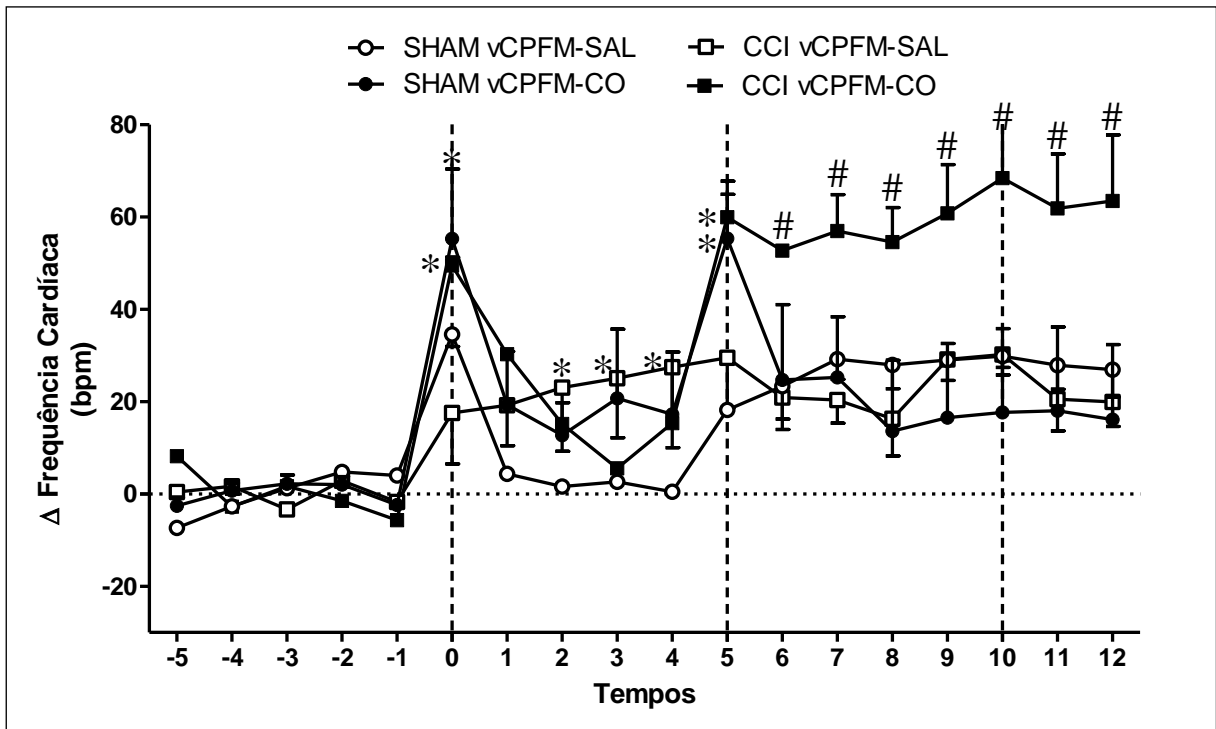
basal logo após 5 minutos (tempo 1). Uma nova variação no ΔFC foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5) e se manteve durante os minutos finais, mesmo com uma nova estimulação nociva (tempo 10). Os animais do grupo SHAM vCPFM- CoCl_2 na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento no ΔFC , que retornou ao basal somente quinze minutos após (tempo 3). Uma nova variação no ΔFC foi obtida no segundo estímulo nocivo (tempo 5) na mesma intensidade do estímulo anterior, com uma redução após 5 minutos (tempo 6) porém não retornou ao estado basal nos minutos seguintes (tempo 8 a 12) mesmo após a terceira estimulação (tempo 10).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM-SAL apresentaram pequenas variações não significativas no ΔFC no período basal (tempos -5, -4, -3, -2, e -1). Na primeira estimulação nociva (tempo 0), apresentaram aumento significativo na ΔFC sem o retorno ao basal nos minutos seguintes (tempo 1 a 12) mesmo com as estimulações nocivas seguintes (tempo 5 e 10).

Os animais do grupo neuropático CCI vCPFM- CoCl_2 apresentaram aumento significativo do ΔFC no tempo 0, uma redução quinze minutos após (tempo 3) e um novo aumento após a segunda estimulação (tempo 5) que se manteve nos minutos seguintes (tempo 6 a 12).

As curvas obtidas foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,13} = 1,522$; $p < 0,001$) e tempo ($F_{17,221} = 20,682$; $p < 0,001$) e demonstraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{51,221} = 2,979$; $p < 0,001$).

Gráfico 10- Curvas intensidade-duração do efeito cardiovascular na frequência cardíaca, produzido após aplicação de estímulo nocivo térmico (“heat”) em três momentos diferentes.



Nota: No eixo X se encontram os tempos, separados por 5 minutos, em um total de 60 minutos após o primeiro estímulo (Tempo 0). Os valores dos tempos -5, -4, -3, -2 e -1 representam a avaliação basal. Os valores dos tempos 0, 5 e 10 representam o momento do estímulo. SHAM, grupo de animais falso operados; CCI, grupo de animais neuropáticos; SAL, pré-administração de salina; CO, pré-administração de cloreto de cobalto. vCPFM, córtex pré frontal medial ventral. Seta representa o momento da pré-administração de SAL ou CoCl_2 no vCPFM. Os pontos representam média do $\Delta \pm \text{E.P.M.}$ de 5 animais. (*) diferente do grupo SHAM vCPFM-SAL; (#) diferente de todos os grupos. ($P < 0,05$).

Fonte: do autor.

8 DISCUSSÃO

O vCPFM facilita as respostas autonômicas e emocionais durante situações de estresse, e participa da sinalização e processamento da dor, que medeia componentes afetivos, de resposta preditiva a estímulos nocivos (LAGATTA et al., 2015; DE NOVELLIS et al., 2011; CORDEIRO et al., 2015). Dentre estas manifestações dolorosas, incluímos a dor crônica, particularmente a dor neuropática, que resulta de doenças que acometem o sistema nervoso periférico (SELTZER et al., 1999).

O estímulo nociceptivo, com conseqüente sinalização periférica e aumento de receptores nas regiões IL e PL do vCPFM, atua diretamente na atividade simpática revelando um comportamento cardiovascular, como aumento da PAM e FC (GIORDANO et al., 2011; FAZALBHOY et al., 2012). Embora a regulação da função cardiovascular pela ativação sensorial seja evidente, clinicamente, durante manipulações cirúrgicas de rotina, há poucos trabalhos que caracterizam essa relação para os estímulos que são comumente usados para testes nociceptivos. Os valores da FC e PAM tendem a aumentar pela estimulação nociceptiva e nossos achados demonstram que esse comportamento é dependente do tipo de estimulação.

O estímulo térmico inócuo, utilizando o método de esfriamento por acetona – “Cold”, não foi capaz de gerar dor em animais falso-operados, dessa forma, também é esperado que não afeta a FC e a PAM. O que torna interessante o fato dos animais falso-operados apresentarem aumento da FC e PAM quando submetidos a esse tipo de estímulo. A explicação para tal fato pode estar em alguma sensação estranha percebida pelo animal que desencadeie nele aversão ou medo pelo esfriamento. Está bem estabelecido que o resfriamento cutâneo não doloroso local, pode induzir vasoconstrição global e elevação da PAM e FC (RIGAUD et al., 2011), que pode ser a influência predominante sobre o controle vasomotor nas condições do nosso estudo. Os animais CCI apresentaram maior sensação e conseqüentemente maior resposta cardiovascular e aumento da FC e PAM, isto devido a alodinia, presente na dor neuropática.

Com a administração de CoCl_2 , promovendo o bloqueio do vCPFM, o padrão de resposta foi semelhante ao *Brush* e *Von Frey* com aumento sustentado da FC

pelo período observado, que como explicado anteriormente, pode ter ocorrido pela diminuição do controle do baroreflexo pelo vCPFM. Usando o modelo de estimulação inócua pontual com o método de “*Von Frey*” ou dinâmica com o método de “*Brush*”, em animais falso operados, as amplitudes de PAM e FC foram pequenas, consistente com a baixa intensidade desses estímulos que não conseguem gerar nocicepção e dor. Já nos animais CCI ocorreu aumento da FC e da PAM, visto que o método é de pressão crescente da pata e apesar de não ser utilizado com frequência nos testes de hiperalgesia neuropática (VIVANCOS et al., 2004). Um fato interessante foi que a administração de CoCl_2 gerou uma manutenção nas respostas cardiovasculares durante os estímulos mecânicos inócuos. O que pode ser sugerido é que no processo de neuropatia, o estímulo que antes era inócuo passe a ser interpretado mais complexamente no SNC e que o vCPFM controle o baroreflexo. Quando o córtex é bloqueado, o baroreflexo se torna aumentado, levando a um aumento na FC e redução da PAM.

Assim, neste modelo hiperalgésico, os animais que sofreram constrição do nervo ciático apresentaram aumento da FC e PAM, durante os estímulos “*Brush*” e “*VonFrey*”, quando comparados àqueles falsos operados, e ao grupo salina, demonstrado, também, pelo estudo de Rigaud e colaboradores em 2011, que realizaram uma cirurgia de ligadura do nervo espinhal (SNL) com efeitos nociceptivos. A avaliação do limiar mecânico foi determinada pela técnica de “*VonFrey*” filamentos, observando a elevação cardiovascular. Esta comparação - SHAM e CCI - demonstrou, assim, uma estimulação que não nociiva em um animal falso-operado se torna intensa em um animal que apresenta hiperalgesia neuropática.

A resposta térmica nociva é a capaz de promover uma resposta cardiovascular maior do que a estimulação mecânica, como observado em um estudo de Cunha e colaboradores em 2007, que demonstrou que o disparo de neurônios aferentes primários e sua transmissão e interpretação, pelo Sistema Nervoso Central (SNC), é maior em estimulações térmicas do que mecânicas nocivas, assim como a sua despolarização associadas à repetição de estímulos térmicos, que ocasiona um aumento das respostas cardiovasculares (CUNHA et al., 2007). Isso pode justificar o aumento sustentado da FC nos animais submetidos ao estímulo térmico nocivo (“*Heat*”).

Estudos anteriores demonstraram que o estímulo plantar de calor podem produzir uma depressão geral do PAM e FC, mesmo nos animais controle (RIGAUD et al., 2011). No entanto, diversos estudos demonstram que o aquecimento pode provocar um efeito cardíaco e pressor sustentado (ABRAM et al., 1983; ISHIDE et al., 2005; NAGASAKA et al., 1995). A justificativa para tal diferença é o método de estimulação. Quando permitimos a livre movimentação dos animais, este pode retirar a pata do local de aplicação e minimizar a exposição à estimulação acima do limiar nociceptivo. Notavelmente, observamos também uma resposta cardiovascular de depressão mediante aquecimento plantar repetido. A aplicação de calor não-nocivo em pequenas áreas de pele tem sido reconhecida como um supressor da atividade simpática e indutor de vasodilatação sistêmica (RIGAUD et al., 2011), e esta termorregulação poderia ser responsável pelas influências cardiovasculares durante o teste do estímulo nocivo térmico. Uma possível explicação para esta resposta depressora tardia decorre da ativação seletiva de fibras C nociceptivas lentamente com o aquecimento progressivo da pele (VIVANCOS et al., 2004). Em contraste com a estimulação de fibras A-delta, tais como a causada por estímulos mecânicos puntiformes ou aquecimento rápido (p. ex. teste de retirada da cauda), a estimulação preferencial de fibras tipo C por aquecimento lento ativa uma resposta que inclui depressão cardiovascular (CUNHA et al., 2007).

A interpretação de nossas observações cardiovasculares durante estimulação mecânica nociva parece simples. A aplicação de uma agulha com o método “*Pin*” aumenta a PAM e FC, similar aos relatos anteriores que utilizavam estimulação mecânica nociva sustentada (RIGAUD et al., 2011; ABRAM et al., 2005). A geração de um maior aumento da FC sugere que este comportamento é nociceptiva, que é compatível com a observação recente de que este comportamento está associado seletivamente com aversão em um modelo condicionado (WU et al., 2010). Como era esperado também, uma estimulação que já é nociva em um animal falso-operado se torna mais agressiva em um animal que já apresenta sensibilização neuropática. De forma diferente dos outros estímulos, o vCPFM parece não influenciar os comportamentos cardiovasculares nos animais CCI, visto que o seu bloqueio com cobalto não alterou a FC e a PAM.

Mais uma vez, a justificativa para esse comportamento é possível pelo já citado aumento dos disparos dos aferentes primários ocasionados pelo comportamento nocivo (CUNHA et al., 2007), com diminuição dos limiares

nociceptivos periféricamente, liberação de mediadores químicos que facilitam o processo doloroso, associado ao aumento do disparo do segundo neurônio na medula e brotamento (TOMINAGA et al., 1998). Todo esse processo, aumenta ainda mais a percepção dolorosa que pode ocasionar aumento da resposta cardiovascular sistêmica, FC e PAM, em somatória à participação do vCPFM.

O importante achado do presente trabalho é a influência do vCPFM nestas respostas cardiovasculares evocadas pelos estímulos nocivos nos animais neuropáticos. O bloqueio do núcleo, retirando sua influência sobre o sistema cardiovascular levou a um aumento importante nas respostas de FC e PAM, principalmente ao estímulo nocivo térmico, assim como a sua manutenção elevada por todo o período observado. O CPF tem sido associado a diversos processos emocionais, cognitivos, atencionais, entre outros (VERTES, 2006). A grande magnitude relativa do CPF de humanos presumidamente indica que o córtex é o substrato para funções cognitivas de ordem superior (FUSTER, 2008). Até o momento, existe uma vasta literatura descrevendo o papel do vCPFM no componente cognitivo das emoções, utilizando principalmente modelos de condicionamento. Entretanto, poucos autores têm abordado o papel dessa estrutura, tanto no âmbito cognitivo como no emocional, em modelos de dor. Trabalhos anteriores mostraram a participação de receptores N-metil D-Aspartato (NMDA), produção de óxido nítrico (NO) e ativação de guanilato ciclase no vCPFM na modulação cardíaca em respostas bradicárdicas e taquicárdicas. Dessa forma, é demonstrada a influência do vCPFM na atividade barorreflexa cardíaca que pode ser importante durante adaptações cardiovasculares observadas em situações de ameaça, como a dor (FERREIRA-JUNIOR et al., 2013).

Dessa forma, este trabalho apresenta a influência de estímulos cutâneos inócuos e nocivos em animais falso-operados e neuropáticos submetidos ao modelo de CCI. Demonstrando ainda, pela primeira vez, a influência do vCPFM no controle das funções cardiovasculares reflexas induzidas pelos estímulos que são capazes de induzir comportamentos dolorosos nos animais.

9 CONCLUSÃO

O estímulo térmico inócuo “*Cold*”, com a administração de CoCl_2 promovendo o bloqueio do vCPFM, causou o aumento sustentado das respostas cardiovasculares, que, pode ter ocorrido pela diminuição do controle do baroreflexo pelo vCPFM.

O estímulo inócuo pontual “*Von Frey*”, com a administração de CoCl_2 gerou aumento da FC, sugerindo que o vCPFM controle o baroreflexo. Quando o córtex é bloqueado, o baroreflexo se torna aumentado, levando a um aumento na FC e redução da PAM.

O estímulo inócuo dinâmico “*Brush*”, com a administração de CoCl_2 gerou aumento da FC, sugerindo que o vCPFM controle o baroreflexo. Quando o córtex é bloqueado, o baroreflexo se torna aumentado, levando a um aumento na FC e redução da PAM.

O estímulo mecânico nocivo “*Pin*”, com administração de CoCl_2 não gerou alterações na FC e a PAM.

O estímulo térmico nocivo “*Heat*”, com a administração de CoCl_2 promoveu aumento sustentado da FC. Gerando uma resposta cardiovascular maior do que as estimulações anteriores.

Os resultados sugerem que o envolvimento do vCPFM é importante nas respostas cardiovasculares requeridas nas respostas hiperalgésicas induzidas por estímulos nocivos e inócuos em modelo de neuropatia por ligadura de nervo.

REFERÊNCIAS

ABRAM, S. E.; KOSTREVA, D. R.; HOPP, F. A.; KAMPINE, J. P. Cardiovascular responses to noxious radiant heat in anesthetized cats. **Am J Physiol**, v. 245, p. 576–80, 1983.

APKARIAN AV, BUSHNELL MC, TREEDE RD, ZUBIETA JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **Eur J Pain**, v. 9, p. 463–484, 2005.

BARON, R.; BINDER, A. How neuropathic is sciatica? The mixed pain concept. **Orthopade**, v. 33, p. 568-575, 2004.

BRUEHL S, CHUNG OY. Interactions between the cardiovascular and pain regulatory systems: an updated review of mechanisms and possible alterations in chronic pain. **Neurosci Biobehav Ver**, v. 28, p. 395-414, 2004.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BECK, C. H.; FIBIGER, H. C. Conditioned fear-induced changes in behavior and in the expression of the immediate early gene c-Fos: with and without diazepam pretreatment. **J. Neurosci**, v. 15, P. 709-720, 1995.

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.

BURNS, S. M.; WYSS; J. M. The involvement of anterior cingulate cortex in blood pressure control. **Brain Res**, v. 340, p. 71-77, 1985.

BURTON, A. R.; BIRZNIEKS, I.; BOLTON, P. S.; HENDERSON, L. A.; MACEFIELD, V. G. Effects of deep and superficial experimentally induced acute pain on muscle sympathetic nerve activity in human subjects. **J Physiol**, v. 587, p.183–93, 2009.

CORDEIRO MATOS S, ZHANG Z, SEGUELA P. Peripheral Neuropathy Induces HCN Channel Dysfunction in Pyramidal Neurons of the Medial Prefrontal Cortex. **J Neurosci**, v. 23, p. 13244-56, 2015.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; BATTAGLIA, D. F.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. **Neuroscience**, v. 64, p. 477-505, 1995.

CUNHA, T.M., VERRI JR., W.A., POOLE, S., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H.. Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals. **Immune and Glial Regulation of Pain, IASP Press**, p. 67–83, 2007.

DAMPNEY, R. A.; Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, p. 323-64, 1994.

DE NOVELLIS,, DANIELA VITA, LUISA GATTA, LIVIO LUONGO, GIULIA BELLINI, MARIA DE CHIARO, ISA MARABESE, DARIO SINISCALCO, SERENA BOCCCELLA, FABIANA MAIONE. The blockade of the transient receptor potential vanilloid type 1 and fatty acid amide hydrolase decreases symptoms and central sequelae in the medial prefrontal cortex of neuropathic rats. **Molecular Pain**, v. 7, p.7, 2011.

DEL ARCO A, MORA F. Prefrontal cortex-nucleus accumbens interaction: in vivo modulation by dopamine and glutamate in the prefrontal cortex. **Pharmacol Biochem Behav.** V. 90(2), p. 226-35, 2008.

DEVOR, M.; Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **J Pain**, v. 7, p. 3-12, 2006.

DONOGHUE, S.; GARCIA, M.; JORDAN, D.; SPYER, K. M. Identification and brainstem projections of aortic baroreceptor afferent neurones in nodose ganglia of cats and rabbits. **J Physiol**, v. 322, p. 337-352, 1982.

DUBIN, D. Rapid interpretation of EKG's: na interactive course (cover publishing); 2000.

DUNCAN, G. E.; KNNAP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res**, v. 713, p. 79-91, 1996.

DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 85, p. S3–S14, 2010.

FAZALBHOY A, BIRZNIEKS I, MACEFIELD VG. Individual differences in the cardiovascular responses to tonic muscle pain: parallel increases or decreases in muscle sympathetic nerve activity, blood pressure, and heart rate. **Exp Physiol**, v. 97, p. 1084–1092, 2012.

FEIN, A. **Nociceptores**: As células que sentem dor. Dor On Line, 2011. Disponível em: < <http://www.dol.inf.br/nociceptores>>. Acesso em: 19 abril 2017.

FERREIRA, S.H. et al. Dor Inflamatória. In Dor - Princípio e prática. São Paulo: **Artmed**, 2009.

FERREIRA-JUNIOR NC, FEDOCE AG, ALVES FH,CORREA FM,RESSTEL LB. Medial prefrontal cortex endocannabinoid system modulates baroreflex activity through CB(1) receptors. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 302, p. 876-85, 2012.

FINNERUP NB, HAROUTOUNIAN S, KAMERMAN P, BARON R, BENNETT DL, BOUHASSIRA D, CRUCCU G, FREEMAN R, HANSSON P, NURMIKKO T, RAJA SN, RICE AS, SERRA J, SMITH BH, TREEDE RD, JENSEN TS. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**, v. 157(8), p. 1599-606, 2016.

FUSTER J. M. The Prefrontal Cortex. Amsterdam: **Elsevier**. 2008.

GARRY, E.M.; JONES, E.; FLEETWOOD-WALKER, S.M. Nociception in vertebrates: key receptor participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 2, p. 216-224, 2004.

GEMES G, RIGAUD M, DEAN C, HOPP FA, HOGAN QH, SEAGARD J. Baroreceptor reflex is suppressed in rats that develop hyperalgesia behavior after nerve injury. **Pain**, v. 146, p. 293-300, 2009.

GIORDANO C, CRISTINO L, LUONGO L, SINISCALCO D, PETROSINO S, PISCITELLI F. TRPV1-dependent and -independent alterations in the limbic cortex of neuropathic mice: impact on glial caspases and pain perception. **Cereb Cortex**, v. 22, p. 2495–2518, 2011.

GROENEWEGEN, H. J. Organization of the afferent connections of the medio dorsal thalamic nucleus in the rat, related to the medio dorsal-prefrontal topography. **Neuroscience**, v. 24, p. 379-431, 1988.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, p. 335-346, 2006.

HAKIM A, DE WANDELE I, O'CALLAGHAN C, POCINKI A, ROWE P. Chronic fatigue in Ehlers Danlos syndrome Hypermobility type. **Am J Med Genet Part C Semin Med Genet**, v. 175(1), p. 175-180, 2017.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77-88, 1988.

HOGAN, Q.; SAPUNAR, D.; MODRIC-JEDNACAK, K.; MC CALLUM, J. B. Detection of neuropathic pain in a rat model of peripheral nerve injury. **Anesthesiology**, v. 101, p. 476-87, 2004.

IMAKI, T.; SHIBASAKI, T.; HOTTA, M.; DEMURA, H. Intra cerebro ventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in

brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. **Brain Res**, v. 9, p. 114-125, 1993.

ISHIDE, T.; AMER, A.; MAHER, T. J.; ALLY, A. Nitric oxide within periaqueductal gray modulates glutamatergic neurotransmission and cardiovascular responses during mechanical and thermal stimuli. **Neurosci Res**, v. 51, p. 93-103, 2005.

JI, G.; NEUGEBAUER, V. Pain-related deactivation of medial prefrontal cortical neurons involves mGluR1 and GABA_A receptors. **J Neurophysiol**, v.106, p. 2642–2652, 2011.

KEMPPAINEN, P.; FORSTER, C.; HANDWERKER, H. O. The importance of stimulus site and intensity in differences of pain-induced vascular reflexes in human orofacial regions. **Pain**, v: 91, p. 331-338, 2001.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KREGEL KC, SEALS DR, CALLISTER R. Sympathetic nervous system activity during skin cooling in humans: relationship to stimulus intensity and pain sensation. **J Physiol** 454:359-71, 1992.

KRETTEK, J. E.; PRICE, J. L. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. **J. Comp. Neurol**, v. 171, p. 157-191, 1977.

KRETZ, R. Local cobalto injection: a method to discriminate pre synaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **J. Neurosci. Methods**, v. 11, p. 129–135, 1984.

LAGATTA DC, N C FERREIRA-JUNIOR AND L B M RESSTEL. Medial prefrontal cortex TRPV1 channels modulate the baroreflex cardiac activity in rats. **Br J Pharmacol**, v. 172(22), p. 5377–5389, 2015.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEE, M.; MANDERS, T. R.; EBERLE, S. E.; SU, C.; D'AMOUR, J.; YANG, R.; LIN, H. Y.; DEISSEROT, K.; FROEMKE, R. C.; WANG, J. Activation of corticostriatal circuitry relieves chronic neuropathic pain. **J Neurosci**, v. 35, p. 5247-5259, 2015.

LEONARD, C. M. The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections. **Brain Res**, v. 12, p. 321-343, 1969.

LIU, C.N.; RABER, P.; ZIV-SEFER, S.; DEVOR, M.; Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype. **Neuroscience**, v. 105, p. 265-75, 2001.

LISBOA SF, REIS DG, DA SILVA AL, CORREA FM, GUIMARAES FS, RESSEL LB. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 13, p. 1163-73, 2010.

LOMBER SG. The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. **J Neurosci Methods**, v. 86, p. 109–117, 1999.

MAIXNER, W.; GRACELY, R. H.; ZUNIGA, J. R.; HUMPHREY, C. B.; BLOODWORTH, G. R. Cardiovascular and sensory responses to forearm ischemia and dynamic hand exercise. **Am J Physiol**, v. 259, p. 1156-1163, 1990.

METZ, A. E.; YAU, H. J.; CENTENO, M. V.; APKARIAN, A. V.; MARTINA, M. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. **Proc Natl Acad Sci**, v. 106, p. 2423-2428, 2009.

MILLAN, M. J.; Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

MOLTNER A, HOLZL R, STRIAN F. Heart rate changes as an autonomic component of the pain response. **Pain**, v. 43, p. 81–9, 1990.

NAGASAKA, H.; YAKSH, T. L. Effects of intrathecal mu, delta, and kappa agonists on thermally evoked cardiovascular and nociceptive reflexes in halothane-anesthetized rats. **Anesth Analg Mar**, v. 80, p. 437-443, 1995.

NORDIN, M.; FAGIUS, J. Effect of noxious stimulation on sympathetic vasoconstrictor outflow to human muscles. **J Physiol**, v. 489, p. 885-894, 1995.

ONOFRE, A. N.; COSTA, C. M.; SIQUEIRA, J. T.; TEIXEIRA, M. J. Dor princípios e práticas. **Artmed**, p. 764-778, 2009.

ONGUR D, PRICE J L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans, **Cereb. Cortex**, v. 10(3), p. 206–219, 2000.

RESSTEL, L. B.; FERNANDES, K. B.; CORRÊA, F. M. Medial pre frontal córtex modulation of the baro reflex parasympathetic component in the rat. **Brain Research**, v. 1015, p. 136-144, 2004.

RESSTEL LB, JOCA SR, GUIMARAES FG, CORREA FM. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 143(2), p. 377-85, 2006.

RESSTEL LB, CORREA FM, GUIMARAES FS. The expression of contextual fear conditioning involves activation of an NMDA receptor-nitric oxide pathway in the medial prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v.18, p. 2027–2035, 2008

RIGAUD, M.; GEMES, G.; ABRAM, S. E.; DEAN, C.; HOPP, F. A.; STUCKY, C. L.; EASTWOOD, D.; TARIMA, S.; SEAGARD, J; HOGAN, Q. H. Pain tests provoke modality-specific cardiovascular responses in awake, unrestrained rats. **Pain**, v. 152, p. 274-84, 2011.

SAPRU, H. N. Glutamate circuits in selected medullo-spinal areas regulating cardiovascular function. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 29, p. 491-496, 2002.

SARTER, M.; MARKOWITSCH, H. J. Collateral innervation of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. **J. Comp. Neurol**, v. 224 p. 445-460, 1984.

SCHEUREN R, DUSCHEK S, SCHULZ, SUTTERLIN S, ANTON F. Blood pressure and the perception of illusive pain. **Psychophysiology**, v. 53(8), p. 1282-91, 2016.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205-218, 1999.

SESACK, S. R.; DEUTCH, A. Y.; ROTH, R. H.; BUNNEY, B. S. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracttracing study with Phaseolus vulgaris leucoag glutinin. **J. Comp. Neurol**, v. 290, p. 13-242, 1989.

SHERRINGTON CS, Woodworth RS. A pseudaeffective reflex and its spinal path. **J Physiol**, v. 31, p. 234-43, 1904.

SPYER, K. M. Central nervous integration of cardiovascular control. **J Exp Biol**, v.28, p. 100:109, 1982.

TASSORELLI, C.; MICIELI, G.; OSIPOVA, V.; ROSSI, F.; NAPPI, G. Pupillary and cardiovascular responses to the cold-pressor test. **J Auton Nerv Syst**, v. 55, p. 45-49, 1995.

TAVARES, R. T.; ANTUNES- RODRIGUES, J.; CORRÊA, F. M. A. Pressor effects of electrical stimulation of the medial prefrontal cortex in un anesthetized rats. **J. Neurosci. Res**, v.77, p. 613-620, 2004.

TREEDE RD, RIEF W, BARKE A, AZIZ Q, BENNETT MI, BENOLIEL R, COHEN M, EVERS S, FINNERUP NB, FIRST MB, GIAMBERARDINO MA, KAASA S, KOSEK E, LAVAND'HOMME P, NICHOLAS M, PERROT S, SCHOLZ J, SCHUG S, SMITH BH,

SVENSSON P, VLAWEYEN JW, WANG SJ. A classification of chronic pain for ICD-11. **Pain**, v. ,156, p. 1003–7, 2015.

TERKELSEN, A. J.; MOLGAARD, H.; HANSEN, J.; ANDERSEN, O. K.; JENSEN, T. S. Acute pain increases heart rate: differential mechanisms during restand mental stress. **Auton Neurosci**, v. 121, p. 101–109, 2005.

TOMINAGA M, CATERINA MJ, MALMBERG AB, ROSEN TA, GILBERT H, SKINNER K, RAUMANN BE, BASBAUM AI, JULIUS D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple painproducing stimuli. **Neuron**, V. 21, P. 531-43, 1998

VERBENE, A. J.; OWENS, N. C. Cortical modulation of the cardiovascular system. **Prog Neurobiol**, v. 54, p. 149-168, 1998.

VERTES R. P. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. **Neuroscience**. v. 142, p. 1-20, 2006.

VIERCK, C. Animal models of pain. In: MC MAHON, S.; KOLTZENBURG, M. editors. Wall and Melzack's Text book of Pain. Amsterdam: **Elsevier Churchill Living stone**, p. 175-185, 2005.

VIVANCOS, G. G.; VERRI, W. A.; CUNHA, T. M, SHIVO, I. R.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, p. 391-399, 2004.

WALL, P.D.; GUTNICK, M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. **Exp Neurol**, v. 43(3), p. 580-93, 1974.

WOLKERSTORFER, A.; HANDLER, N.; BUSCHMANN, H. New approaches to treating pain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 1103–1119, 2016.

ZILLES, K.; WREE A. Cortex: area and laminar structure. In: **The Rat Nervous System**, Ed. G. Paxinos. Academic Press: New York, p. 649-685, 1985.

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



FMRP
65 anos USP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*O papel do córtex pré-frontal medial ventral no controle das respostas cardiovasculares induzidas por neuropatia em ratos*", registrado com o número **040/2016**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Leonardo Resstel Barbosa Moraes**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, 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 da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de maio de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 160 ratos Wistar machos pesando 180g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/05/2017 a 01/09/2018.

We certify that the Protocol nº 040/2016, entitled "*The role of ventromedial prefrontal cortex in control of cardiovascular responses induced neuropathy in rats*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/29/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum *Chordata*, subphylum *Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 160 male Wistar rats weighing 180g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 09/01/2018.

Ribeirão Preto, 29 de maio de 2017


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CÉUA - FMRP - USP