



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS - CECH
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA - PPGPSi
LINHA 3: NEUROCIÊNCIA COMPORTAMENTAL E COGNITIVA
GRUPO DE PSICOBIOLOGIA

**A INATIVAÇÃO QUÍMICA DO CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR E DA ÍNSULA
REVERTE A ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO MODELO DE
EMPATIA INDUZIDA PELA NOCICEPÇÃO**

Giovana Benassi Cezar

São Carlos, SP

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS – CECH
PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA - PPGPsi
LINHA 3: NEUROCIÊNCIA COMPORTAMENTAL E COGNITIVA
GRUPO DE PSICOBIOLOGIA**

**A INATIVAÇÃO QUÍMICA DO CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR E DA ÍNSULA
REVERTE A ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO MODELO DE
EMPATIA INDUZIDA PELA NOCICEPÇÃO**

Giovana Benassi Cezar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Psicologia. Linha 3: Neurociência Comportamental e Cognitiva da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Psicologia.

Orientação: Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

São Carlos, SP

2020

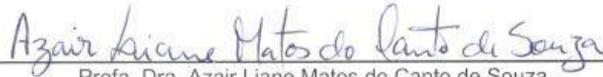


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Educação e Ciências Humanas
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Giovana Benassi Cezar, realizada em 05/03/2020:



Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
UFSCar



Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira
UFSCar



Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

DEDICATÓRIA

Ao meu avô, que me apoiou até o fim.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à minha família por me darem fé e força necessária para enfrentar todos os obstáculos.

À Profª. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza, pela orientação científica, amizade e dedicação.

À banca examinadora, pela atenção dispensada para leitura desse trabalho.

Aos amigos do LPA, que me apoiaram nessa trajetória.

À secretaria do PPGPsi pelo apoio e dedicação ao programa.

À CAPES (001, 88887187389/2018-00), pelo auxílio financeiro disponibilizado na execução deste estudo.

Cezar, G.B. (2020). *A inativação química do córtex cingulado anterior e da ínsula reverte a ansiedade em camundongos expostos ao modelo de empatia induzida pela nocicepção*. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 60pp.

Resumo

A empatia é expressa pela capacidade em captar sinais emocionais em outros indivíduos, sendo um fator crucial na vivência emocional e interação social, permitindo que humanos, assim como outras espécies, possam detectar os estados afetivos alheios. Neste sentido, estudos recentes têm demonstrado que o convívio com o animal com dor crônica produz aumento da nocicepção e ansiedade no parceiro, ou seja, no observador. Esses resultados fortalecem o pressuposto de que respostas referentes à ansiedade possibilitam identificar a existência de respostas emocionais, o que pode estar relacionado à empatia. Evidências apontam para a participação do córtex cingulado anterior (CCA) e da ínsula na modulação da ansiedade. Entretanto, nenhum estudo avaliou se estas estruturas participam do aumento de ansiedade observado em camundongos que convivem com o parceiro com dor crônica. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da inativação reversível do CCA e da ínsula na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Para isso, camundongos Suíços machos (n=10-12/grupo), no 21º dia após o nascimento, foram alojados em pares para estabelecer familiaridade. No 14º dia de convívio, um dos animais da dupla foi submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (NC) ou à cirurgia sem constrição do nervo (Sham). No 23º dia, os animais observadores foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante bilateral de cânulas-guia direcionadas ao CCA (Experimento 1) ou na ínsula (Experimento 2). No 28º dia, os coespecíficos observadores (CNC e CS) que conviveram com respectivos grupos NC e Sham, receberam injeções bilaterais intra-CCA ou intra-ínsula de solução salina ou cloreto de cobalto (CoCl₂), bloqueador sináptico reversível e não seletivo, e após cinco minutos foram submetidos ao LCE. O teste t para amostras independentes mostrou que nos Experimentos 1 e 2, os camundongos NC submetidos ao teste de placa quente apresentaram diminuição da latência de retirada da pata quando comparados aos camundongos Sham. A análise de variância (ANOVA) de dois fatores seguida pelo teste de Duncan revelou que o convívio com camundongos com nocicepção produziu aumento da resposta de ansiedade avaliada no LCE, confirmando resultados anteriores da literatura. A inativação química reversível do CCA e da ínsula produziu aumento da porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos, sem alterar as entradas nos braços fechados do labirinto. Corroborando com estes resultados, os comportamentos de avaliação de risco, tais como porcentagens de tempo gasto no centro, mergulho protegido, esticar protegido e total de esticar no experimento 1; e porcentagens de mergulho e esticar protegido e total de mergulho e de esticar, no experimento 2, foram diminuídos. Os resultados sugerem que a inativação do CCA e da ínsula reverte o aumento da ansiedade induzida em camundongos pelo modelo de empatia para a nocicepção. Além disso, indicam que essas estruturas são essenciais para a exibição de comportamentos ansiosos induzidos por contágio emocional, avaliados por meio da convivência com animais submetidos à dor neuropática.

Palavras-chave: Córtex cingulado anterior, ínsula, ansiedade, empatia, camundongo.

Cezar, G.B. (2020). *Chemical inactivation of the anterior cingulate cortex and insula reverse anxiety in mice exposed to the model of empathy induced by nociception*. Master's thesis, Graduate Program in Psychology, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP. 60pp.

ABSTRACT

Empathy is characterized by the ability to recognize and respond to the emotional signals of others, being a crucial factor in the emotional experience and social interaction, allowing humans, as well as other species, to detect affective states of others. In this sense, recent studies have shown that cohabitation with an animal with chronic pain induces increased nociception and anxiety in the partner, that is, in the observer. These results reinforce the assumption that responses related to anxiety make it possible to identify the existence of emotional responses, which may be related to empathy. Evidence has suggested the involvement of the anterior cingulate cortex (ACC) and insula in the modulation of anxiety. However, no study has evaluated whether these structures participate in the increased anxiety factor observed in mice living with their partner with chronic pain. Thus, the aim of this study was to investigate the effects of reversible inactivation of ACC and insula on the modulation of anxiety induced by the empathy model in mice exposed to the elevated plus-maze (EPM). For this, male Swiss mice (n = 10-12/group), 21 days after birth, were housed in pairs to establish familiarity. On the 14th day of cohabitation, one of the animals of the pair underwent surgery for sciatic nerve constriction (NC) or surgery without nerve constriction (Sham). On the 23rd day, cagemates were submitted to stereotactic surgery for implantation of guide cannulas directed to the CCA (experiment 1) or to the insula (experiment 2). On the 28th day, cagemates (CNC and CS) that lived with their respective NC and Sham groups received bilateral intra-CCA or intra-insular saline or cobalt chloride (CoCl₂) (reversible and non-selective synaptic blocker) injections, and after five minutes they were exposed to the EPM. The t test for independent samples showed that in Experiments 1 and 2, the NC mice submitted to the hot plate test showed decreased paw withdrawal latency when compared to the Sham mice. The two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan test revealed that cohabitation with nociception mice produced an increased anxiety response in observers, confirming previous results in the literature. The chemical inactivation of the CCA and the insula produced an increased percentage of entries and time spent in the open arms, without altering the entries in the closed arms of the LCE. Furthermore, it also decreased the display of risk assessment behaviors, such as percentage of time in the center, percentage of head-dipping and percentage of protected stretched attend postures and total of stretched attend postures in experiment 1; and in experiment 2, decreased the percentage of head-dipping and protected stretched attend postures, and the total of head-dipping and stretched attend postures, which suggests a decrease in anxiety-like behaviors. The results suggest that the inactivation of the CCA and the insula reverses the display of anxiety-like behaviors in mice submitted to the empathy model evaluated in the LCE. In addition, they indicate that these structures are essential for the display of anxious behaviors induced by emotional contagion, assessed through cohabitation with animals subjected to neuropathic pain.

Keywords: Anterior cingulate cortex, insula, anxiety, empathy, mouse.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema representativo do período de convívio, cirurgia, injeção e teste no labirinto em cruz elevado (LCE) para os experimentos 1 (injeção intra-córtex cingulado anterior) e 2 (injeção intra-ínsula)26
- Figura 2** - Representação esquemática dos sítios de injeção no córtex cingulado anterior de camundongos. (A) Representação esquemática dos locais de injeção dentro (círculos cheios) ou fora (círculos cinza) do córtex cingulado anterior (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando o local de injeção (setas) dentro do córtex cingulado anterior28
- Figura 3** - Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CS. CS = camundongos que conviveram com os animais Sham. CNC = camundongos que conviveram com os animais que passaram pela constrição do nervo ciático 30
- Figura 4** - Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (% TBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CS. CS = camundongos que conviveram com os animais Sham. CNC = camundongos que conviveram com os animais que passaram pela constrição do nervo ciático.....31
- Figura 5** - Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica, em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). CS = camundongos que conviveram com os animais Sham. CNC = camundongos que conviveram com os animais que passaram pela constrição do nervo ciático.....32
- Figura 6** - Representação esquemática dos sítios de injeção na ínsula de camundongos. (A) Representação esquemática dos locais de injeção dentro (círculos cheios) ou fora (círculos cinza) do córtex cingulado anterior (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando o local de injeção (setas) dentro da ínsula34
- Figura 7** - Efeitos da administração intra-ínsula de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10-11). * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CS. CS = camundongos que conviveram com os animais Sham. CNC = camundongos que conviveram com os animais que passaram pela constrição do nervo ciático.....36
- Figura 8** - Efeitos da administração intra-ínsula de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) do LCE. As barras representam os valores das médias

e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10-11). *p<0,05 comparado ao respectivo grupo CNC-salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo CS. CS = camundongos que conviveram com os animais Sham. CNC = camundongos que conviveram com os animais que passaram pela constrição do nervo ciático.....37

Figura 9 - Efeitos da administração intra-ínsula de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica, em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10-11). CS = camundongos que conviveram com os animais Sham. CNC = camundongos que conviveram com os animais que passaram pela constrição do nervo ciático.....38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Grupos experimentais (observadores) formados para o Experimento 1 e 226
- Tabela 2** - Grupos experimentais (Sham e NC) formados para o Experimento 1 e 227
- Tabela 3** - Latência de retirada da pata traseira direita nos animais Sham e NC avaliados no teste de placa quente no 28° dia após seus coespecíficos serem submetidos ao LCE. Os dados representam a média ± erro padrão da média (n= 23/grupo). *p<0,05 comparado ao grupo controle (Sham)29
- Tabela 4** - Efeitos da administração de salina ou CoCl₂ (1 mM/0,1 µL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. Os dados representam média ± erro padrão da média (n= 11-12). *p<0,05 comparado ao respectivo grupo CNC-salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo CS. CS = camundongos que conviveram com os animais Sham. CNC = camundongos que conviveram com os animais que passaram pela constrição do nervo ciático.....33
- Tabela 5** - Latência de retirada da pata traseira direita nos animais Sham e NC avaliados no teste de placa quente no 28° dia após seus coespecíficos serem submetidos ao LCE. Os dados representam a média ± erro padrão da média (n= 20-22/grupo). *p<0,05 comparado ao grupo controle (Sham)35
- Tabela 6** - Efeitos da administração de salina ou CoCl₂ (1 mM/0,1 µL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. Os dados representam média ± erro padrão da média (n= 10-11). *p<0,05 comparado ao respectivo grupo CNC- salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo CS. CS = camundongos que conviveram com os animais Sham. CNC = camundongos que conviveram com os animais que passaram pela constrição do nervo ciático.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

BMI – Bicuculina metiodeto

CCA – Córtex cingulado anterior

CNC – Observador que conviveu com o camundongo com constrição no nervo ciático

CNQX – 6-ciano-7- nitroquinoxalina-2,3-diona

CoCl₂ – Cloreto de cobalto

CS – Observador que conviveu com o camundongo sem constrição no nervo ciático

EBA – Entradas nos braços abertos

EBF – Entradas nos braços fechados

GABA – Ácido gama-amino-butírico

i.p. – Intraperitoneal

LCE – Labirinto em cruz elevado

mg/kg – Miligramas/kilogramas

NC – Camundongo com constrição no nervo ciático

NaCl – Cloreto de sódio

SAP – Esticar (Stretched attend postures)

SHAM – Camundongo sem constrição no nervo ciático

TC – Tempo gasto no centro

μl – Microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivos Específicos.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Sujeitos	21
3.2. Ética.....	21
3.3. Fármacos.....	21
3.4. Cirurgia estereotáxica e injeção	22
3.5. Constrição Crônica do Nervo Ciático	23
3.6. Teste da placa quente	23
3.7. Labirinto em cruz elevado (LCE)	24
3.8. Histologia.....	25
3.9. Delineamento Experimental	25
3.10. Análise Estatística	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Experimento 1. Efeito da inibição reversível do córtex cingulado anterior com cloreto de cobalto (CoCl ₂) na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nocicepção em camundongos.	28
4.2. Experimento 2. Efeito da inibição reversível da ínsula com cloreto de cobalto (CoCl ₂) na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nocicepção em camundongos.	34
5. DISCUSSÃO.....	40
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIA	49
8. ANEXO	57

1. INTRODUÇÃO

As bases neurais da empatia

Estudos relacionados à empatia e os circuitos neurais subjacentes a essa capacidade vêm se consolidando no decorrer do tempo e a relevância em entender como percebemos, compreendemos e sentimos aquilo que outros indivíduos experienciam tornou-se alvo de investigação em diversas áreas do conhecimento. A capacidade de compartilhar emoções uns com os outros se configura como fator fundamental para a vivência emocional e interação social, permitindo que humanos, assim como outras espécies, possam detectar os estados afetivos alheios (GONZALEZ–LIENCRES et al., 2014). Neste sentido, é importante considerar que o indivíduo seja capaz de perceber não somente suas emoções, mas também daqueles que convivem ao seu redor, a fim de viabilizar e aperfeiçoar a sobrevivência da espécie (PRESTON; DE WAAL, 2002).

Segundo Singer e colaboradores (2004), o estado empático tem início a partir da observação ou imaginação de outro indivíduo em um determinado estado emocional, ativando esse mesmo estado no observador. Isso implica que diante da observação de um estado motor ou emocional de um indivíduo irá ativar algumas das mesmas estruturas e processos neurais no observador como quando este desenvolve esta mesma ação ou experimenta essa mesma emoção (PRESTON, 2007; MOYA–ALBIOL et al., 2010).

Em virtude de que humanos, assim como animais, apresentam comportamentos relacionados aos seus comuns, Preston e de Waal (2002) propuseram um modelo que incorpora pontos teóricos e empíricos sobre empatia, denominado de Modelo de Percepção-Ação. Diante desse modelo, a empatia é descrita como um compartilhamento de um estado emocional, no qual, a partir da percepção no outro, o sujeito passa a sentir uma experiência similar daquele que observa, sendo que essa representação compartilhada estaria associada às respostas somáticas e

autonômicas (PRESTON; DE WAAL, 2002; SINGER et al, 2004; MOYA-ALBIOL et al., 2010).

O alicerce dessas pesquisas se sucedeu pelo reconhecimento de neurônios espelho, isto é, um conjunto de neurônios visuo-motores situados no giro frontal inferior, lóbulo parietal inferior e no córtex pré-motor, que estão envolvidos na ativação reflexa que advém da observação do outro (GALLESE et al, 2004; SHAMAY-TSOORY, 2011; BETTI; AGLIOTI, 2016). Diante disso, foi sugerido que o sistema de neurônios espelho é particularmente adequado para fornecer o mecanismo relacionado à empatia motora, imitação e contágio emocional (SHAMAY-TSOORY, 2011; BERNHARDT; SINGER, 2012).

Estudos apontam que a empatia não está somente atrelada à capacidade de compartilhar emoções, mas também está relacionada à capacidade de entender os pensamentos, desejos e sentimentos do outro (SHAMAY-TSOORY, 2011). Neste sentido, evidências mostram que a empatia possui dois componentes: o emocional e o cognitivo (DAVIS, 1980; SHAMAY-TSOORY, 2011). O sistema emocional engloba o contágio emocional, reconhecimento emocional e o compartilhamento da dor e o cognitivo abarca a teoria da mente e “mentalizing” como subtipos, que se refere à capacidade de fazer inferências a respeito dos estados mentais cognitivos e afetivos do outro (PANKSEPP et al., 2011; SHAMAY-TSOORY, 2011).

Pesquisas nessa área do conhecimento vêm demonstrando que indivíduos com transtorno de personalidade borderline e do espectro autista, apresentam dissociação entre os componentes emocional e cognitivo, no qual sujeitos que são mais afetados no campo emocional, ainda possuem capacidade relacionada a processos cognitivos, sugerindo que os sistemas podem funcionar separadamente, com possíveis evidências da existência de ambos. Sob esse aspecto, ressalta-se que cada resposta de empatia pode evocar correspondentes emocionais e/ou cognitivos, dependendo do contexto social no qual o indivíduo está inserido (SHAMAY-TSOORY, 2011).

Essa resposta emocional básica e fundamental é produto de múltiplos processos e circuitos cerebrais, envolvendo desde estruturas mais basais do tronco encefálico até centros corticais mais superiores e recentes de um ponto de vista evolutivo (PANKSEPP et al., 2011; SHAMAY-TSOORY, 2011; BERNHARDT; SINGER, 2012).

Com o objetivo de se identificar essas bases biológicas, Singer e colaboradores (2004) investigaram sítios envolvidos na expressão da empatia a partir de estímulos nociceptivos. Os resultados obtidos revelaram que a experiência empática não envolve toda rede relacionada à dor, que é comumente referida como a matriz de dor, mas apenas áreas associadas à dimensão afetiva da experiência da dor. A dor é descrita na literatura como uma experiência sensorial e emocional, sendo considerada multidimensional e subjetiva. Embora a dor aguda possa ser protetora e adaptativa, a dor crônica é frequentemente uma doença debilitante (YALCIN et al, 2014).

O desenvolvimento da dor crônica está associado à plasticidade sináptica, alterações no sistema nervoso central e em várias áreas neurais que modulam a dor, acarretando alterações estruturais e funcionais em algumas estruturas do sistema nervoso central, como o córtex cingulado anterior (CCA), ínsula, amígdala, hipocampo, entre outras estruturas (YANG; CHANG, 2019). Sob esse aspecto, o CCA e a ínsula são áreas igualmente ativadas ao receber o estímulo doloroso e ao observar esse mesmo estado doloroso (SINGER et al., 2004).

Além disso, estudos apontam que o CCA está correlacionado aos processos atencionais e avaliativos associados à situações dolorosas (JACKSON et al., 2005), assim como a memorização de informações relacionadas à dor que é importante para evitar danos futuros para sobrevivência (BORNHOVD et al., 2002), enquanto que a ínsula está mais envolvida na intensidade do estímulo e à predição da dor, bem como é uma estrutura relacionada ao processamento de informações interoceptivas (PAULUS; STEIN, 2006).

No entanto, enquanto os mecanismos neurobiológicos, vias e estruturas que modulam o componente sensorial da dor têm sido amplamente explorados, aqueles envolvidos nos componentes afetivo-emocional da dor são menos conhecidos (LANGFORD et al., 2006; BORSOOK; BECERRA, 2009; NEUGEBAUER et al., 2009).

Empatia em modelos animais

Uma quantidade crescente de trabalhos sugere que mesmo as formas mais avançadas de empatia em humanos podem ser estudadas sobre formas mais básicas. Sob esse ponto de vista, a ciência básica utiliza modelos animais para melhor entendimento dos componentes centrais da empatia, proporcionando uma compreensão mais rica e profunda da empatia em humanos (PRESTON; DE WAAL, 2002). A partir disso, há evidências de que roedores possuem os pré-requisitos necessários para expressar empatia emocional, pelo fato de serem animais sociais, capazes de aprender com os outros e agir de acordo com os estímulos emocionais de seus coespecíficos (LANGFORD et al., 2006; PANKSEPP et al., 2011).

Da mesma forma, Sivaselvachandran e colaboradores (2018) reforçam que os modelos de empatia com roedores não só fornecem uma estrutura sólida para compreensão dessa capacidade, bem como, propiciam investigar as estruturas e os circuitos neurais relacionados à empatia (SIVASELVACHANDRAN et al., 2018).

No âmbito das pesquisas pré-clínicas tem-se demonstrado que a familiaridade entre os animais, ou seja, a convivência em pares é capaz de alterar a resposta nociceptiva em camundongos observadores. Esses trabalhos evidenciaram que ao observar um coespecífico com dor pode aumentar ou diminuir a sensibilidade à nocicepção no camundongo observador, demonstrando a capacidade empática em roedores (LANGFORD et al., 2006; LANGFORD et al., 2011; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015).

Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa com o objetivo de verificar a participação do córtex cingulado anterior (CCA) e a ínsula na modulação das respostas nociceptivas pelo modelo de empatia, demonstrou que inativação química dessas estruturas com cloreto de cobalto, produziu ausência de alteração (CCA) ou diminuição (ínsula) do número de contorções abdominais nos coespecíficos. Esses resultados sugerem que as estruturas investigadas apresentam papel modulatório distinto nos diferentes componentes da dor e da empatia, além de confirmar que camundongos apresentam a capacidade de expressar empatia frente a um coespecífico com dor crônica (PELARIN et al., 2014).

Empatia em humanos

Estudos tem demonstrado o efeito da dor crônica em respostas relacionadas à ansiedade (ATTAL et al., 2008; HAANPÄÄ et al., 2009; GERRITS et al., 2012; SIMONS et al., 2014). Tais evidências revelam que as respostas de dor podem estar associadas à manifestação de distúrbios afetivos, como depressão maior e transtorno de ansiedade generalizada (DEMYTTENAERE et al., 2007; ELMAN et al., 2013; YALCIN; BARROT, 2014).

Sob o aspecto clínico, foi observado que cuidadores ou indivíduos que convivem com um familiar em um estado álgico, apresentam respostas de percepção da dor alterada (FLOR et al., 1987; MIASKOWSKI et al., 1997) o que pode sugerir relação ao processo empático. Posteriormente, outra pesquisa mostrou outros impactos negativos sobre a saúde mental e física dos cuidadores e familiares tais como, transtornos psiquiátricos, doenças somáticas, isolamento social, estresse, alterações na saúde clínica em geral e, principalmente, sintomas relacionados à depressão e ansiedade mais prevalentes nessa população (DEL CASTILLO et al, 2007).

Sob um aspecto evolutivo, a ansiedade é considerada um estado emocional presente em diversas espécies, sendo uma emoção fundamental e imprescindível dentro do repertório afetivo

(STEIN; BOUWER, 1997). Esse indicador emocional, além de ser uma resposta necessária para motivar o desempenho, favorece a adaptação dos indivíduos a uma variedade de estímulos internos e externos que o ameaçam. No entanto, essa resposta pode se tornar patológica quando em excesso, caracterizando assim, uma resposta inadequada a um determinado estímulo (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; PEREIRA, 1997; BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; GRAY; MCNAUGAHTON, 2000; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002; MCNAUGAHTON; CORR, 2004; GRAEFF, 2007).

Dentre as estruturas do sistema nervoso central que participam da regulação da ansiedade, como o córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo e o striatum ventral e outras estruturas que estão interconectadas (DAVIDSON et al., 2000; MCNAUGHTON; CORR, 2004), destaca-se a participação do CCA e do córtex insular.

Nesse contexto, estudos de neuroimagem em humanos observaram aumento da atividade do CCA em pacientes com transtornos de ansiedade (OSUCH et al., 2000; MOCHCOVITCH et al., 2014; ZHUO, M., 2016) e lesões nessa estrutura produziram efeito ansiolítico (HAY et al., 1993). Da mesma forma, há também evidências de alterações no cortex insular relacionadas aos transtornos de ansiedade, demonstrando um aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral no córtex insular bilateral (RAUCH et al., 1997; PAULUS; STEIN, 2006).

Ainda que já tenha sido descrito na literatura a respeito do funcionamento dessas áreas na ansiedade (CRAIG, 2002; PAULUS; STEIN, 2006; STRAUBE, et al, 2009; BOEHME et al., 2013) e dimensão afetiva da experiência e observação da dor (SINGER et al., 2004), são poucas evidências de quais vias e estruturas estariam envolvidas na modulação da ansiedade pela empatia pela nocicepção.

Empatia, nocicepção e ansiedade

Sob este aspecto, pesquisas buscam esclarecer as bases da empatia e a sua relação com os diferentes estados emocionais e respostas comportamentais em modelos animais (SINGER et al., 2004; LANGFORD et al., 2006). Pesquisas pré-clínicas mostraram um aumento significativo de comportamentos relacionados à ansiedade em roedores submetidos à constrição do nervo ciático (ROESKA et., 2009; YALCIN et al., 2014; ÇIVI et al., 2016) ou após convívio com um coespecífico inoculado por um tumor (TOMIYOSHI et al., 2009).

Estudos realizados no nosso grupo de pesquisa utilizando o protocolo de convivência com um coespecífico submetido a dor crônica induzida pela constrição do nervo ciático mostraram que esse convívio é capaz de produzir hipernocicepção nos animais submetidos ao teste de contorções abdominais (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; FERRARI; CANTO-DE-SOUZA, 2016; ZANIBONI et al., 2016; ZANIBONI et al., 2018), e aumentar respostas relacionadas à ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE) (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; CARMONA; CANTO-DE-SOUZA, 2017). Além disso, nosso grupo mostrou aumento da nocicepção e de comportamentos do tipo ansioso avaliados no LCE em camundongos que conviveram com um par submetido a um protocolo de estresse crônico de contenção (CARNEIRO-DE-OLIVEIRA et al., 2017).

O LCE é utilizado como modelo animal (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005) para o estudo de respostas semelhantes a ansiedade descritas em humanos (GRAY; MCNAUGAHTON, 2000; GRAEFF, 2007). O aparato foi desenvolvido a partir do trabalho de Montgomery (1958), validado para o uso com ratos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985) e camundongos (LISTER, 1987). O labirinto é composto por dois braços fechados com paredes laterais unidos ortogonalmente a dois braços abertos, ligados entre si por uma plataforma central e elevados do solo (LISTER, 1987; CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995). A aversão natural de roedores a espaços abertos (TREIT et al., 1993) tornam

o teste sensível para avaliar outros comportamentos tais como, movimentos de esticar o corpo sem se locomover ou comportamentos de mover a cabeça em direção ao solo, como os mergulhos (RODGERS et al., 1997), o que ilustra um estado similar da ansiedade presente no homem. A utilização de braços fechados transparentes no LCE possibilita melhor observação dos efeitos ansiolíticos e ansiogênicos em roedores, sem comprometer a atividade locomotora geral do animal (WALL; MESSIER, 2000).

Os principais índices de ansiedade avaliados no LCE compreendem medidas espaço-temporais dos braços abertos (% de entradas e de tempo gasto nos braços abertos), e atividade locomotora, avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (LISTER, 1987; FILE, 1992; CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Outros comportamentos e posturas relacionadas ao padrão defensivo de avaliação de risco também são registrados, como as frequências de mergulhar (movimento exploratório com a cabeça/ombros para fora dos braços abertos) e esticar (stretched attend - SAP: postura exploratória caracterizada pelo corpo do animal estendido para frente, depois retrai à posição original sem locomoção efetiva, resposta associada à avaliação de risco) e imobilidade (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; RODGERS et al., 1992; CRUZ et al., 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995; GRIEBEL et al., 1997; MCNAUGHTON; CORR, 2004).

Investigação do papel do CCA e Ínsula

De acordo com as evidências da literatura apresentadas acima, permanece desconhecido o papel do córtex cingulado anterior e da ínsula na modulação da ansiedade induzida em camundongos pelo modelo de empatia pela nocicepção. Tal produção de conhecimento é relevante para investigação das lacunas não preenchidas no campo da empatia, bem como, dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na modulação social da ansiedade. Além disso, modelos comportamentais robustos podem revelar circuitos neurais subjacentes específicos, refinando

ainda mais a compreensão dos estados afetivo-emocional da dor, assim como poderá contribuir para o desenvolvimento de modelos experimentais que expliquem disfunções psicossociais, como exemplo, habilidade de empatia prejudicada, que pode ser identificada em autistas, borderline e até mesmo, na psicopatia (BLAIR, 2005; MOGIL, 2006; DZIOBEK et al., 2011; SHAMAY-TSOORY, 2011).

Sob esse aspecto, além dos achados na literatura e diante de resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa sobre a influência do convívio com a nocicepção nas respostas relacionadas à ansiedade em camundongos (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; CARMONA; CANTO-DE-SOUZA, 2017), foi utilizado, neste estudo, o protocolo de empatia induzido pela nocicepção, no qual, um dos animais da dupla foi submetido a um modelo de dor crônica. O modelo de contração do nervo ciático (BENNETT; XIE, 1988), é considerado um dos métodos experimentais mais utilizado na investigação sobre dor neuropática, que é descrita como um dos tipos de dor crônica (BARDIN et al., 2000; SOUSA et al., 2016).

Para acessar o possível papel das estruturas aqui estudadas, foi realizada a inibição reversível com cloreto de cobalto (CoCl_2), um inibidor sináptico dos canais de cálcio voltagem dependente (RESSTE et al, 2006; RESSTEL et al, 2008; CRESTANI et al., 2010). O CoCl_2 é um cátion bivalente que se dissocia em cobalto e cloreto. Desta forma, biologicamente, o cobalto ocupa o lugar do cálcio no canal, produzindo inibição não-seletiva das sinapses na membrana neuronal pré-sináptica, consequentemente impedindo a transmissão sináptica, sem afetar as fibras de passagem (KRETZ, 1984).

Levando em consideração o papel dessas estruturas na modulação da nocicepção e das emoções, sugerimos que a inativação do CCA e da ínsula pode reverter o aumento de ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nocicepção em camundongos.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Investigar o papel do córtex cingulado anterior e da ínsula na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nocicepção em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar se a inibição reversível do córtex cingulado anterior com cloreto de cobalto (CoCl_2) reverte a ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nocicepção em camundongos;
- Avaliar se a inibição reversível da ínsula com cloreto de cobalto (CoCl_2) reverte a ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nocicepção em camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sujeitos

Foram utilizados 176 camundongos da linhagem suíço-albino, machos, com desmame de 21 dias, pesando entre 38g a 44g na data do teste, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais foram mantidos no biotério setorial do laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA) e alojados em duplas, em caixas viveiro (30 x 19 x 13cm, 2 animais por caixa), mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C) e luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas) com livre acesso a água e alimento, exceto durante as breves sessões de teste.

3.2. Ética

O projeto foi aprovado pela à Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar (CEUA N° 3400210118), que segue as normas e preceitos especificados pela diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (ANEXO).

3.3. Fármacos

As drogas utilizadas foram: cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p., anestésico; Syntec, Brasil) e xilazina (10 mg/kg, i.p., relaxante muscular; Vetbrands, Brasil), cetoprofeno (5 mg/kg, i.p., anti-inflamatório) (LU et al., 2004), ceftriaxona (4 mg/kg, i.p., antibiótico) e cloreto de cobalto (CoCl_2 ; Sigma, St. Louis, Missouri, USA), na dose de 1 mM/0,1 μL (CRESTANI et al., 2010), dissolvido em salina (0,9% NaCl).

3.4. Cirurgia estereotáxica e injeção

Os camundongos foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100/10mg/kg, i.p.). Posteriormente, foram submetidos à tricotomia da região da cabeça e cirurgia estereotáxica (estereotáxico Insight Instruments, Brasil) para a implantação bilateral intracraniana de cânulas-guia (25-gauge x 7 mm; Insight Equipamentos, Brasil), as quais foram direcionadas ao córtex cingulado anterior: AP = + 1,0 mm, L= 0,2 mm e DV= 1,3 mm ou ínsula: AP = + 1,4 mm, L= 2,75 mm e DV= -2,5 mm, em relação ao bregma de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001).

As pontas das cânulas-guia foram posicionadas a $\pm 1,0$ mm dorsal à estrutura alvo. Para a fixação das mesmas, foi utilizada uma prótese de resina acrílica autopolimerizável e um parafuso de aço inoxidável preso ao crânio. Um mandril de aço inoxidável (33-gauge; Fishtex®, Brasil) foi colocado dentro de cada cânula-guia para impedir possíveis obstruções e contaminação, sendo removido durante os procedimentos no período de teste.

Os animais receberam uma injeção de anti-inflamatório cetoprofeno (5mg/kg, i.p.) e antibiótico ceftriaxona (4mg/kg, i.p.), para evitar infecções e auxiliar a recuperação pós-cirúrgica (Lu et al., 2004; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014).

Para investigar o papel específico do córtex cingulado anterior e da ínsula os animais receberam injeções de salina ou de cloreto de cobalto, cinco minutos antes do teste comportamental. O procedimento de injeção consistiu em conter manualmente o animal e inserir a agulha de injeção (33-gauge) dentro da cânula-guia para a infusão da solução. Cada agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), à microsseringa Hamilton (10 μ L). Uma bomba de infusão (Insight BI2000) foi programada para injetar 0,1 μ L de solução durante um período de 60 segundos. O procedimento de injeção consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, infusão da respectiva solução por 60 segundos e permanência da agulha de injeção por mais 90 segundos, para evitar o refluxo da solução injetada. O movimento

de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções foi parâmetro de confirmação do fluxo de solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008).

3.5. Constrição Crônica do Nervo Ciático

Para reproduzir o modelo de dor crônica, foi utilizado o método proposto por Bennet e Xie (1998), e posteriormente modificado para uso com camundongos (SOMMER; SCHAFERS, 1998). Após anestesia com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), os animais foram submetidos ao procedimento que consiste na secção da fáscia entre o glúteo e bíceps femural e a exposição do nervo ciático direito próximo a sua trifurcação. O tecido ao redor do nervo foi cuidadosamente cortado a uma distância de aproximadamente 8 mm e, posteriormente, a compressão do nervo foi realizada por meio de três ligaduras com fio estéril, não inflamatório e não absorvível, mononylon 6,0 (grupo constrição do nervo ciático, NC). O outro grupo foi submetido a um procedimento similar, não havendo a constrição do nervo (grupo Sham).

3.6. Teste da placa quente

O teste de placa quente se caracteriza pelo registro do tempo em que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida a 52°C (Liu et al., 2002) até reagirem ao estímulo térmico, avaliado pela latência para retirada da pata traseira direita, pata em que foi realizada a constrição do nervo (NC) ou não (Sham). O tempo máximo que o animal pode permanecer sobre a placa foi de 30 segundos, para evitar lesão (KURAIISHI et al., 1983).

3.7. Labirinto em cruz elevado (LCE)

O aparato experimental (Foto 1) consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados com paredes transparentes (30 x 5 x 15 cm), elevados a 38,5cm do solo por um suporte de madeira (LISTER, 1987). Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz e gravados por meio de um sistema de câmera conectada a um computador localizado na sala adjacente a sala de testes. A avaliação dos parâmetros comportamentais se deu a partir da observação das gravações, acompanhada do uso de um software para análise comportamental X-Plo-Rat 3.0 (GARCIA et al., 2005).

Para análise comportamental foram avaliadas: a frequência total de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço), a porcentagem de entrada nos braços abertos [(aberto/total) X 100] e de tempo gasto no braço aberto; os tempos de permanência nos braços fechados e na parte central do labirinto [(tempo/300) X 100] (LISTER, 1987). Outros parâmetros comportamentais foram avaliados, tais como: as frequências de mergulhar (movimento exploratório com a cabeça/ombros para fora dos braços abertos) e esticar (stretched attend - SAP: postura exploratória caracterizada pelo corpo do animal estendido para frente, depois retrai à posição original sem locomoção efetiva, resposta associada à avaliação de risco) e imobilidade. Os braços fechados e o centro são áreas consideradas protegidas e braços abertos áreas desprotegidas do labirinto (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

Foto 1: Foto do labirinto em cruz elevado (LCE).



Fonte: Laboratório de Psicologia e Aprendizagem

3.8. Histologia

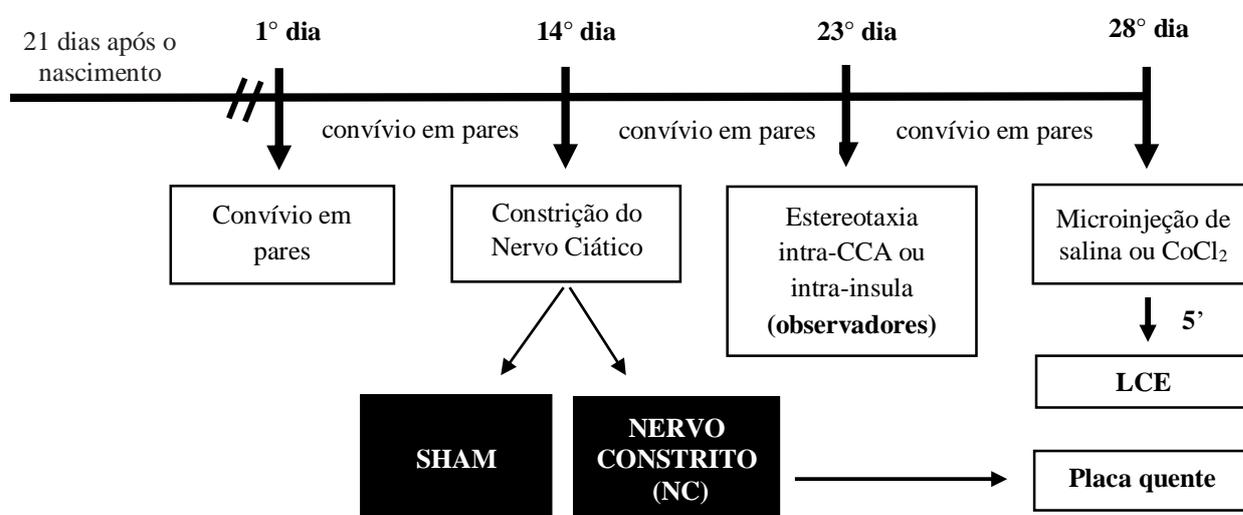
Após o término dos experimentos, os animais observadores foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilasina (100/10mg/kg, i.p.) e, em seguida, receberam injeção bilateral de 0,1µL de uma solução de 2% de azul de Evans, conforme o procedimento descrito acima para a injeção de drogas. Os animais foram decapitados, seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para, posteriormente, serem seccionados em criostato a temperatura de – 20°C (LEICA CM 1850, Leica Biosystems, Alemanha). As secções foram inspecionadas por meio de um microscópio (Olympus BX41, Olympus, Japão) e a visualização da dispersão do azul de Evans indicou o local da injeção. Os animais cujas injeções não atingiram as estruturas em estudo foram excluídos da análise estatística.

3.9. Delineamento Experimental

Após 21 dias do nascimento, os animais foram alojados em duplas para a realização do protocolo experimental de 28 dias. No 14º dia um dos animais da dupla foi submetido ao procedimento de cirurgia de constrição do nervo ciático (animais NC) ou não (animais Sham). Após a cirurgia, o camundongo voltou para a caixa de convivência com seu respectivo coespecífico (parceiro de caixa moradia). No 23º dia de convivência, os observadores, ou seja, os animais que conviveram com camundongos com constrição no nervo ciático (CNC) ou sem constrição do nervo (CS) foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia direcionadas para o córtex cingulado anterior (**experimento 1**) ou ínsula (**experimento 2**). No 28º dia de convivência, esses animais receberam injeções bilaterais no córtex cingulado anterior ou ínsula de salina ou CoCl₂ (1 mM/0,1 µL), e após cinco minutos foram submetidos individualmente no LCE para avaliação comportamental, por cinco minutos.

Ainda no 28° dia, os animais NC e Sham foram submetidos ao teste de placa quente para registro de latência de retirada da pata direita traseira, conforme procedimento descrito no item 3.6.

Figura 1. Esquema representativo do período de convívio, cirurgia, injeção e teste no labirinto em cruz elevado para os experimentos 1 (injeção intra-córtex cingulado anterior) e 2 (injeção intra-ínsula).



As tabelas 1 e 2 representam o número total de camundongos distribuídos nos grupos experimentais 1 e 2, CCA e ínsula respectivamente.

Tabela 1. Grupos experimentais (observadores) formados para o Experimento 1 e 2.

Experimento	Estrutura	CS-salina	CS-CoCl ₂	CNC- salina	CNC- CoCl ₂
1	CCA	n=12	n=11	n=11	n=12
2	Ínsula	n=10	n=10	n=11	n=11

Os números representam o total de camundongos que foram utilizados por grupo. CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl₂= cloreto de cobalto.

Tabela 2. Grupos experimentais (Sham e NC) formados para o Experimento 1 e 2.

Experimento	Estrutura	Sham	NC
1	CCA	n=23	n=23
2	Ínsula	n=20	n=22

Os números representam o total de camundongos que foram utilizados por grupo.
CCA= córtex cingulado anterior; NC= camundongo com constrição do nervo ciático.

3.10. Análise Estatística

Os resultados dos Experimentos 1 e 2 foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores (Fator 1: convívio e Fator 2: tratamento). Para casos de interação significativa, os efeitos únicos dos fatores foram analisados pela ANOVA, seguidos pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

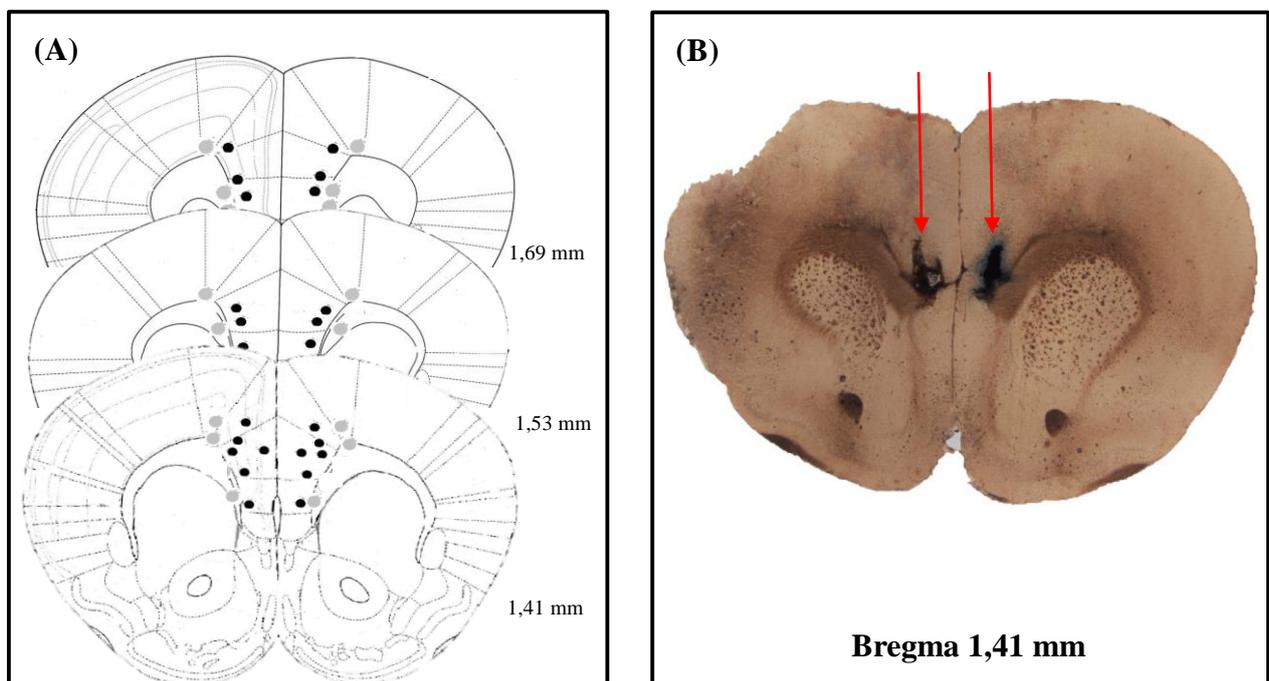
Os resultados dos Experimentos 1 e 2 do teste da placa quente foram analisados pelo teste *t* de Student. Valores de *p* menor ou igual a 0,05 foram considerados como significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1. Efeito da inibição reversível do córtex cingulado anterior com cloreto de cobalto (CoCl₂) na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nociceção em camundongos.

A análise histológica confirmou a canulação positiva no córtex cingulado anterior de 46 camundongos e o índice de acerto em média 65% do total de animais utilizados. Os cortes coronais representados estão entre 1,41 e 1,69 mm em relação ao bregma conforme o atlas de Paxinos e Franklin, 2019. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos, como demonstra a figura 2.

Figura 2. Representação esquemática dos sítios de injeção no córtex cingulado anterior de camundongos. (A) Representação esquemática dos locais de injeção dentro (círculos cheios) ou fora (círculos cinza) do córtex cingulado anterior; (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando o local de injeção (setas) dentro do córtex cingulado anterior (Bregma 1,41 mm).



A Tabela 3 mostra os resultados sobre a latência de retirada da pata traseira direita dos animais Sham (n = 23) ou NC (n = 23) avaliados no teste de placa quente no 28º dia após os respectivos observadores (CS e CNC) serem submetidos ao LCE. O teste *t* de Student para grupos independentes revelou que os animais NC apresentaram diminuição da latência de retirada da pata traseira direita ($t_{46} = 12,18$, $p < 0,05$) em comparação aos animais Sham.

Tabela 3. Latência de retirada da pata traseira direita nos animais Sham e NC avaliados no teste de placa quente no 28º dia após seus coespecíficos serem submetidos ao LCE. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n= 23/grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (Sham). NC= camundongos com constrição no nervo ciático.

Teste de placa quente	Sham	NC
Latência de retirada da pata direita (s)	19,69 \pm 0,58	10,43 \pm 0,48*

Quanto aos observadores, 46 camundongos que conviveram com os animais submetidos à dor crônica (CNC) ou não (CS) foram testados no LCE. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: CS/salina = 12; CNC/salina = 11; CS/CoCl₂ = 11; CNC/ CoCl₂ = 12.

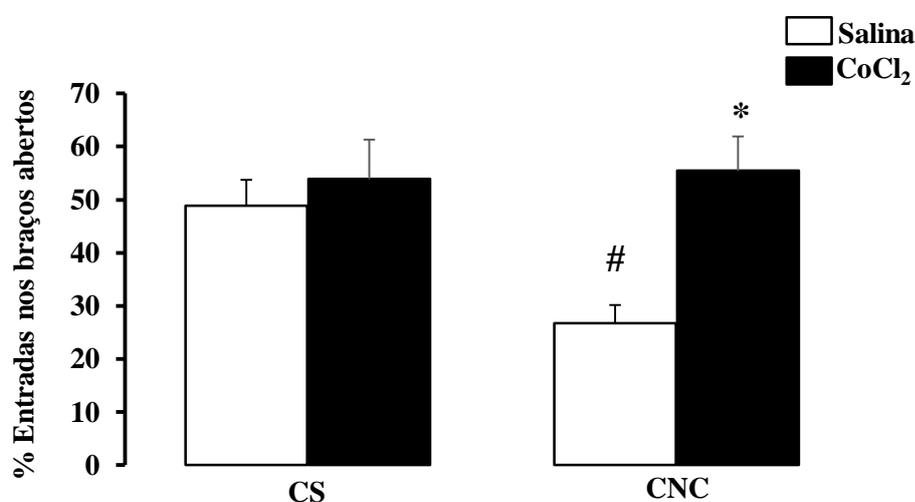
A Figura 3 mostra os efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl₂ (1mM/0,1 μ L) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com o coespecífico com dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) demonstrou que na porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) houve efeito significativo para o tratamento ($F_{1,42} = 8,58$; $p < 0,05$) e para a interação entre convívio e tratamento ($F_{1,42} = 4,18$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para o convívio ($F_{1,42} = 3,16$; $p = 0,08$).

Apesar de não ter sido demonstrado efeito significativo do convívio, a ANOVA mostrou efeito da interação entre os fatores, permitindo a realização do teste de comparações múltiplas de Duncan para as análises posteriores, as quais revelaram que os animais que conviveram com o parceiro com constrição no nervo ciático (CNC) tratados com salina, apresentaram diminuição

na %EBA quando comparados ao respectivo CS-salina, demonstrando o efeito do convívio. Em relação ao tratamento, os animais que conviveram com o parceiro com constrição no nervo ciático (CNC) e que receberam CoCl_2 , apresentaram aumento na %EBA quando comparados ao respectivo CNC-salina, caracterizando diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade.

Figura 3. Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). * $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CS.

CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl_2 = cloreto de cobalto.



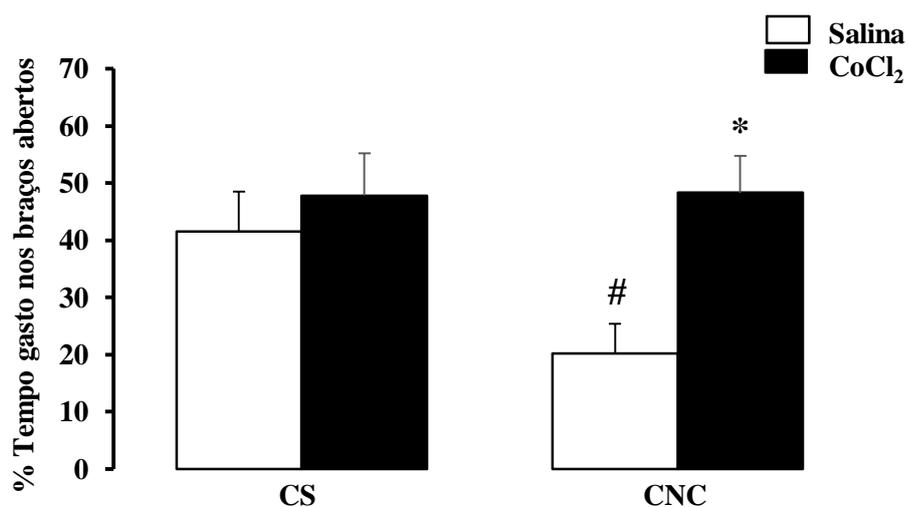
A Figura 4 mostra os efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) revelou que para a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA), ocorreu efeito

significativo para o tratamento ($F_{1,42} = 5,93$; $p < 0,05$), sem alterar a condição ($F_{1,42} = 2,17$; $p > 0,05$) e a interação entre condição e tratamento ($F_{1,42} = 2,37$; $p = 0,06$).

Apesar de não ter sido demonstrado efeito significativo do convívio, o valor de p na interação entre condição e tratamento ($p = 0,06$) foi muito próximo à 0,05, o que permitiu a realização do teste de comparações múltiplas de Duncan. A partir disso, foi observado que os animais que conviveram com o parceiro com constrição no nervo ciático (CNC) tratados com salina, diminuíram o tempo gasto nos braços abertos quando comparados ao respectivo CS-salina. A administração bilateral de CoCl_2 no CCA, produziu aumento da %TBA quando comparados ao respectivo CNC-salina, caracterizando diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade.

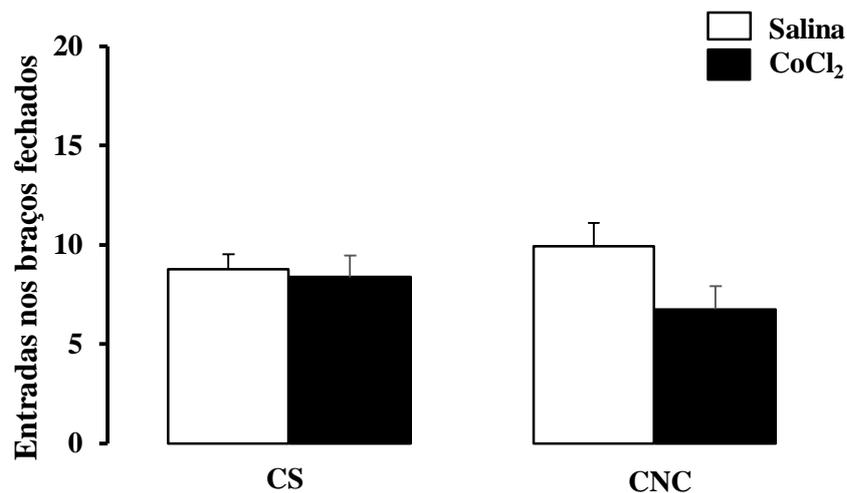
Figura 4. Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (% TBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM ($n = 11-12$). * $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CS.

CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl_2 = cloreto de cobalto.



A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) revelou que para as entradas nos braços fechados (EBF), medida de atividade locomotora, não ocorreu efeito significativo para o convívio ($F_{1,42} = 0,04$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,42} = 2,68$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,42} = 1,70$; $p > 0,05$), como apresentado na Figura 5.

Figura 5. Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica, em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM ($n = 11-12$). CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl_2 = cloreto de cobalto.



A Tabela 4 mostra os efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) revelou efeito significativo para as medidas espaço-temporais, tais como porcentagem de tempo gasto no centro (% TC) [tratamento ($F_{1,42} = 6,97$; $p < 0,05$)]; porcentagem de mergulhos protegidos (%MergP) [tratamento ($F_{1,42} = 9,09$; $p < 0,05$)]; total de esticar (TSAP)[tratamento ($F_{1,42} = 5,72$;

p<0,05) e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,42} = 7,83$; p<0,05)]; porcentagem de esticar protegido (%SAP)[interação entre convívio e tratamento ($F_{1,42} = 4,03$; p<0,05)].

No entanto, mostrou ausência de efeito significativo para %TC [convívio ($F_{1,42} = 0,06$; p>0,05), e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,42} = 1,66$; p>0,05)]; total de mergulhos [convívio ($F_{1,42} = 0,3$; p>0,05), tratamento ($F_{1,42} = 0,09$; p>0,05), e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,42} = 1,14$; p>0,05)]; %MergP [convívio ($F_{1,42} = 2,42$; p>0,05), e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,42} = 1,00$; p>0,05)]; TSAP [convívio ($F_{1,42} = 2,23$; p>0,05)]; %SAP [convívio ($F_{1,42} = 3,03$; p>0,05) e tratamento ($F_{1,42} = 3,68$; p>0,05)].

Comparações posteriores utilizando o teste de Duncan revelaram que o CoCl_2 intra-CCA diminuiu significativamente a porcentagem de tempo gasto no centro do LCE, a porcentagem de mergulhos protegidos, o total e porcentagem de SAP protegido nos animais que conviveram com o parceiro CNC, quando comparados ao respectivo CNC-salina. O tratamento com salina mostrou aumento da porcentagem de SAP protegido somente para os animais que conviveram com os animais NC comparados aos que conviveram com o Sham.

Tabela 4. Efeitos da administração de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL) intra-CCA sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. Os dados representam média \pm erro padrão da média (n= 11-12). * p<0,05 comparado com respectivo grupo controle salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo CS.

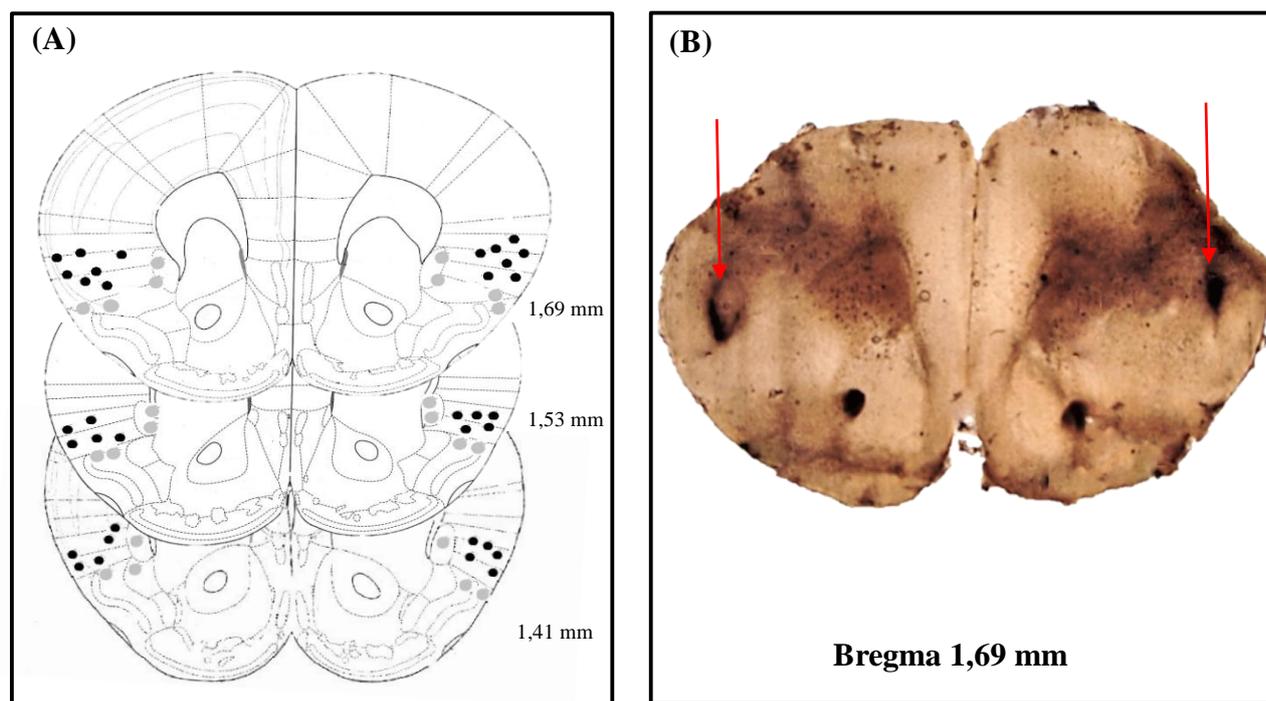
CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl_2 = cloreto de cobalto.

Comportamento	CS		CNC	
	Salina	CoCl_2	Salina	CoCl_2
Tempo no centro (%)	23,5 \pm 3,5	19,6 \pm 2,5	28,1 \pm 2,7	16,5 \pm 2,7*
Total mergulhos	33,2 \pm 3,9	39,9 \pm 5,6	35,6 \pm 3,7	32,0 \pm 5,5
Mergulho protegido (%)	39,5 \pm 9,0	21,2 \pm 8,3	62,7 \pm 9,3	26,2 \pm 9,3*
Total SAP	16,8 \pm 2,2	18,0 \pm 2,5	29,1 \pm 3,7	14,2 \pm 2,7*
SAP protegido (%)	49,0 \pm 9,4	49,7 \pm 7,5	81,5 \pm 5,0#	47,4 \pm 10,8*

4.2. Experimento 2. Efeito da inibição reversível da ínsula com cloreto de cobalto (CoCl₂) na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nociceção em camundongos.

A análise histológica referente à ínsula confirmou canulação positiva para 42 camundongos, com o índice de acerto foi de em média 75% do total de animais utilizados. Os cortes coronais representados estão entre 1,69 e 1,41 mm em relação ao bregma conforme o atlas de Paxinos e Franklin, 2019. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática dos sítios de injeção no córtex cingulado anterior de camundongos. (A) Representação esquemática dos locais de injeção dentro (círculos cheios) ou fora (círculos cinza) do córtex cingulado anterior; (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando o local de injeção (setas) dentro da ínsula (Bregma 1,69 mm).



A Tabela 5 mostra os resultados sobre a latência de retirada da pata traseira direita dos animais Sham (n = 20) ou NC (n = 22) avaliados no teste de placa quente no 28º dia após os respectivos observadores (CS e CNC) serem submetidos ao LCE. O teste *t* de Student para grupos

independentes revelou que os animais NC apresentaram diminuição da latência de retirada da pata traseira direita ($t_{46} = 13,82$, $p < 0,05$) em comparação aos animais Sham.

Tabela 5. Latência de retirada da pata traseira direita nos animais Sham e NC avaliados no teste de placa quente no 28º dia após seus coespecíficos serem submetidos ao LCE. Os dados representam a média \pm erro padrão da média ($n = 20-22/\text{grupo}$). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (Sham). NC = camundongos com constrição no nervo ciático.

Teste de placa quente	Sham	NC
Latência de retirada da pata direita (s)	20,15 \pm 0,65	9,18 \pm 0,54*

Para realização do Experimento 2, 42 camundongos que conviveram com os animais submetidos à dor crônica (CNC) ou não (CS) foram testados no LCE. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: CS/salina = 10; CNC/salina = 11; CS/CoCl₂ = 10; CNC/CoCl₂ = 11.

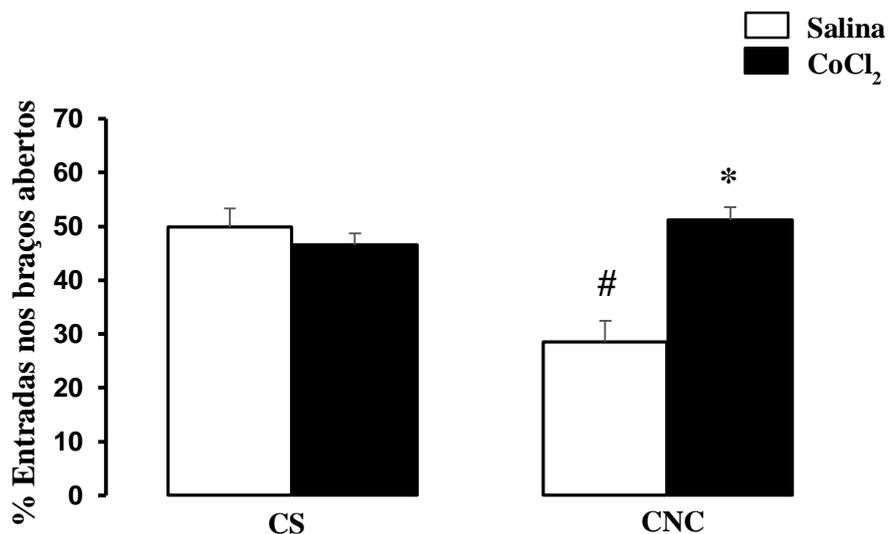
A Figura 7 mostra os resultados obtidos por meio da avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica e a partir dos efeitos da administração intra-ínsula de salina ou CoCl₂ (1 mM/0,1 μ L). Segundo a ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento), houve efeito significativo para o convívio ($F_{1,38} = 7,33$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 9,92$; $p < 0,05$) e para interação entre convívio e tratamento ($F_{1,38} = 17,92$; $p < 0,05$) na porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA).

O teste de comparações múltiplas de Duncan mostrou que os camundongos tratados com salina que conviveram com o parceiro com constrição no nervo ciático (NC), apresentaram diminuição na %EBA quando comparados com os que conviveram com os animais Sham (CS) e que também receberam salina. Quanto ao tratamento, foi observado que os animais que conviveram com o parceiro com dor crônica (CNC) e que receberam CoCl₂ (1 mM/0,1 μ L)

apresentaram aumento significativo na %EBA quando comparados ao respectivo CNC-salina, caracterizando diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade.

Figura 7. Efeitos da administração intra-ínsula de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10-11). * $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CS.

CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl_2 = cloreto de cobalto.



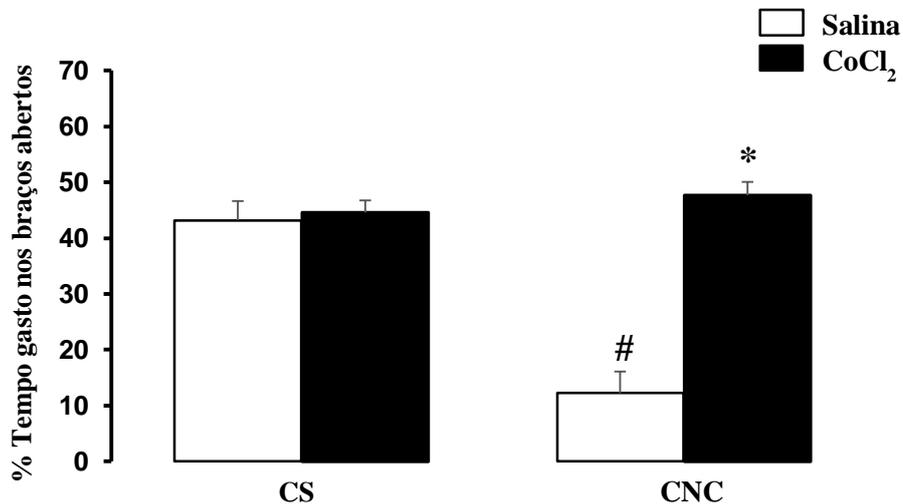
Quanto à porcentagem de entradas nos braços abertos (%TBA), a ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) demonstrou efeito significativo no convívio ($F_{1,38} = 10,13$; $p < 0,05$), no tratamento ($F_{1,38} = 17,84$; $p < 0,05$) e na interação entre convívio e tratamento ($F_{1,38} = 15,19$; $p < 0,05$), como apresentado na Figura 8.

Análises posteriores utilizando o teste de Duncan revelaram que a %TBA diminuiu nos animais que conviveram com o parceiro com constrição no nervo ciático tratados com salina, quando comparados ao respectivo CS-salina. A administração bilateral intra-ínsula com CoCl_2 ,

produziu aumento significativo da %TBA quando comparados ao respectivo CNC-salina, caracterizando diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade.

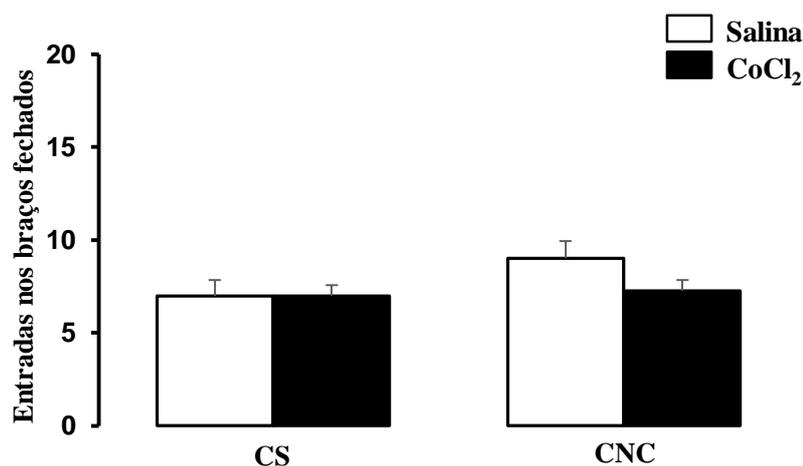
Figura 8. Efeitos da administração intra-ínsula de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10-11). * $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CS.

CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl_2 = cloreto de cobalto.



A ANOVA de duas vias mostrou que para as entradas nos braços fechados (EBF), medida de atividade locomotora, não ocorreu efeito significativo para o convívio ($F_{1,38} = 2,25$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 1,30$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,38} = 1,30$; $p > 0,05$), como apresentado na Figura 9.

Figura 9. Efeitos da administração intra-ínsula de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica, em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10-11). CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl_2 = cloreto de cobalto.



A Tabela 6 demonstra os efeitos da administração intra-ínsula de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) revelou efeito significativo para as medidas espaço-temporais, como porcentagem de tempo gasto no centro (%TC) [tratamento ($F_{1,38} = 4,50$; $p < 0,05$)]; total de esticar (TSAP)[tratamento ($F_{1,38} = 8,32$; $p < 0,05$)]; porcentagem de esticar protegido (%SAP)[convívio ($F_{1,38} = 21,68$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 21,95$; $p < 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,38} = 18,01$; $p < 0,05$)]; total de mergulho [convívio ($F_{1,38} = 9,85$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 10,52$; $p < 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,38} = 7,28$; $p < 0,05$)]; porcentagem de mergulho protegido (%MergP) [convívio ($F_{1,38} = 24,21$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 16,41$; $p < 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,38} = 19,56$; $p < 0,05$)].

Assim como, houve ausência de efeito significativo na %TC [convívio ($F_{1,38} = 0,86$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{1,38} = 0,31$; $p > 0,05$)]; TSAP [convívio ($F_{1,38} = 0,28$; $p > 0,05$) e interação ($F_{1,38} = 0,04$; $p > 0,05$)].

Análises posteriores utilizando o teste de Duncan revelaram que a administração com CoCl_2 diminuiu significativamente o total e a porcentagem de mergulhos protegidos no LCE, o total e porcentagem de SAP protegido nos animais que conviveram com o parceiro CNC, quando comparados ao respectivo CNC-salina. O tratamento com salina mostrou aumento no total e na porcentagem de mergulhos protegidos e na porcentagem de SAP protegido somente para os animais que conviveram com os animais NC comparados aos que conviveram com o Sham.

Tabela 6. Efeitos da administração de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL) intra-ínsula sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. Os dados representam média \pm erro padrão da média ($n = 10-11$). * $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo controle salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo CS.

CCA= córtex cingulado anterior; CS= observador que conviveu com o camundongo sham; CNC= observador que conviveu com o camundongo com constrição do nervo ciático; CoCl_2 = cloreto de cobalto.

Comportamento	CS		CNC	
	Salina	CoCl_2	Salina	CoCl_2
Tempo no centro (%)	19,1 \pm 3,1	14,5 \pm 2,1	23,5 \pm 3,4	15,6 \pm 2,7
Total mergulhos	23,2 \pm 2,5	21,7 \pm 1,9	39,2 \pm 3,6#	22,9 \pm 2,4*
Mergulho protegido (%)	25,3 \pm 5,9	27,3 \pm 3,8	74,8 \pm 4,9#	30,3 \pm 5,9*
Total SAP	22,4 \pm 2,2	16,7 \pm 1,3	24,0 \pm 1,7	17,3 \pm 2,8*
SAP protegido (%)	45,3 \pm 7,2	43,3 \pm 4,3	86,8 \pm 2,5#	45,2 \pm 3,6*

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da inibição reversível com cloreto de cobalto do córtex cingulado anterior e da ínsula na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela nocicepção em camundongos. Os resultados demonstraram que a convivência com animal submetido à constrição do nervo ciático produziu aumento de comportamentos relacionados à ansiedade conforme foi demonstrado em outros trabalhos (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; CARMONA; CANTO-DE-SOUZA, 2017).

Entretanto, foi observado que a inibição reversível com CoCl_2 do córtex cingulado anterior e da ínsula reverteu a ansiedade induzida pelo convívio com o coespecífico constrito, demonstrando efeito ansiolítico. Apesar da análise estatística não ter apresentado efeito significativo do convívio para os índices de ansiedade avaliados após a administração intra-CCA de CoCl_2 , ocorreu interação entre os fatores (convívio x tratamento), demonstrando que o efeito de reversão da ansiedade foi observado apenas nos animais que conviveram com o coespecífico em quadro de dor crônica. Esses resultados são semelhantes aos observados em estudos do nosso grupo de pesquisa, os quais utilizaram o mesmo modelo de empatia e também observaram alterações comportamentais somente nos animais que conviveram com o coespecífico com constrição do nervo ciático (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; CARMONA; CANTO-DE-SOUZA, 2017; ZANIBONI et al., 2018).

Para verificar a nocicepção induzida pela constrição do nervo ciático, os animais com o nervo ciático constrito (NC) e Sham nos experimentos 1 e 2, foram avaliados no teste de placa quente. Os resultados mostraram diminuição significativa na latência de retirada da pata direita traseira dos animais NC quando comparados aos animais Sham, demonstrando a efetividade do procedimento cirúrgico na produção de nocicepção (BENNETT; XIE, 1988; SOMMER; SCHAFERS, 1998). Tais resultados vão ao encontro de outros estudos que utilizaram o mesmo

modelo de dor crônica que também avaliaram o aumento da resposta nociceptiva dos animais constrictos quando expostos ao teste da placa quente (BAPTISTA-DE-SOUZA et al, 2015; CARMONA; CANTO-DE-SOUZA, 2017; ZANIBONI et al., 2018; TAVARES et al., 2018).

Estudos no âmbito da empatia em modelos animais são recentes, assim como pesquisas que mostram alterações no coespecífico a partir do modelo de empatia pela nocicepção. Evidências da literatura demonstram hipernocicepção após convívio com par em quadro de dor crônica (LANGFORD et al, 2006; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; ZANIBONI et al., 2018; TAVARES et al., 2018).

Além de alterações na nocicepção, nosso grupo observou que o convívio com coespecífico em quadro de dor crônica aumenta os comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos expostos ao LCE (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; CARMONA; CANTO-DE-SOUZA, 2017). Nesse sentido, os resultados do presente estudo mostrou diminuição significativa na porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos e aumento de outros comportamentos de avaliação de risco tais como SAP e mergulho protegido, nos grupos que conviveram com o animal constricto e foram tratados com salina, o que representa aumento significativo de comportamentos do tipo ansioso.

Ainda sobre a influência do convívio nas emoções, um estudo realizado por Tomiyoshi e colaboradores (2009) demonstrou que o convívio com um coespecífico inoculado por um tipo de tumor, aumentou comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no LCE. Assim como, um estudo realizado pelo nosso grupo observou aumento de comportamentos do tipo ansioso avaliados no mesmo aparato, no entanto, em camundongos que conviveram com o coespecífico submetido à um protocolo de estresse crônico (CARNEIRO-DE-OLIVEIRA et al., 2017).

Sob este aspecto, sugere-se que o convívio com coespecífico submetido à um protocolo de dor crônica produz aumento da nocicepção e de comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos observadores, o que é apresentado na literatura como respostas relacionadas à

empatia (PELARIN et al., 2014; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; CARMONA; CANTO-DE-SOUZA, 2017; ZANIBONI et al., 2018; TAVARES et al., 2018).

Nesse contexto, outras pesquisas têm buscado identificar alterações nos mecanismos neurobiológicos da empatia em roedores. Para investigar o papel específico de determinadas estruturas na modulação da empatia promovida pela convivência com o par submetido ao modelo de dor crônica, foi realizada a inibição reversível com CoCl_2 da ínsula e córtex cingulado anterior (CCA). Os resultados mostraram que inativação do CCA não alterou, enquanto a inativação da ínsula diminuiu o número de contorções abdominais nos coespecíficos, sugerindo um papel modulatório distinto dessas estruturas nos componentes da dor e da empatia pela nocicepção (PELARIN et al., 2014).

A participação do CCA e da ínsula nas vias da dor já foi descrita em estudos anteriores, embora os componentes associados à dimensão afetiva da experiência da dor são pouco explorados. No entanto, uma série de evidências apoiam que estas estruturas desempenham um papel crucial nas respostas empáticas de sofrimento, aversão, dor e outras emoções como a ansiedade (SINGER et al., 2004; PAULUS e STEIN, 2006; SINGER e LAMM, 2009; SHAMAY-TSOORY, 2011).

No âmbito das pesquisas clínicas, um estudo revelou que indivíduos com lesões na ínsula, resultantes de remoção cirúrgica de gliomas, apresentaram percepção prejudicada diante da observação da dor em outro (GU et al., 2012). Em um contexto similar, outra pesquisa mostrou que indivíduos que apresentam dificuldade em identificar e descrever seus próprios estados emocionais, condição denominada como alexitimia, apresentavam lesões no córtex insular em comparação ao grupo controle ao tentar avaliar seus próprios sentimentos ou de outros (CHAU et al., 2018). Sob este aspecto, um estudo metanalítico mostrou evidências em relação a participação tanto da ínsula, quanto do CCA, por meio de ressonância magnética funcional, nos processos emocionais da empatia pela dor (GU et al., 2013).

Com objetivo de integrar os principais avanços e descobertas recentes em relação ao papel do CCA nos componentes emocionais da nocicepção, Xião e Zhang (2018) realizaram uma revisão, com enfoque em pesquisas básicas apresentando os mecanismos neurais do CCA que estão envolvidos tanto na dor crônica quanto na ansiedade, sugerindo que a ativação do CCA é necessária para codificar e processar as emoções relacionadas à dor, como por exemplo a ansiedade (WEI e ZHUO, 2001; XU et al., 2008; TOYODA et al., 2009; KIM et al., 2011; LI et al., 2012; KOGA et al., 2015; TSUDA et al., 2017; XIÃO e ZHANG, 2018).

Neste aspecto, foi demonstrado o papel do CCA a partir da administração do midazolam, agonista benzodiazepínico que atua na neurotransmissão gabaérgica, em ratos submetidos às sessões de teste e reteste no LCE. Os resultados mostraram que o midazolam intra-CCA produziu efeito ansiolítico, aumentando a atividade exploratória dos ratos nos braços abertos, sem alterar a ansiedade avaliada durante a reexposição ao labirinto. No entanto, os comportamentos de avaliação de risco, tais como SAP, mergulho e exploração das extremidades dos braços abertos foram sensíveis durante as duas sessões, indicando efeito ansiolítico em ambas condições. A análise de imunistoquímica mostrou que o CCA foi sensível à ação ansiolítica do midazolam em ambas situações, sugerindo que essa área é um importante sítio de ação ansiolítica benzodiazepínica (ALBRECHET-SOUZA et al., 2009).

No Experimento 1, observamos que a administração de CoCl_2 intra-CCA aumentou a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos, assim como, diminuiu os comportamentos relacionados à avaliação de risco, tais como, porcentagem de tempo gasto no centro, porcentagem de mergulhos protegidos, total e porcentagem de SAP protegido nos animais CNC quando comparados aos respectivos animais tratados com salina.

Considerando as devidas proporções nas diferenças entre o tipo de espécie de roedor e as metodologias empregadas, os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os resultados

apresentados por Albrechet-Souza e colaboradores (2009), visto que ambos sugerem que o CCA está envolvido nos comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. O midazolam, agonista dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do SNC, atua facilitando a neurotransmissão GABAérgica, modulando a abertura dos canais de cloro, aumentando a afinidade ao receptor GABA_A pelo GABA (HAEFELY, 1990; SMITH, 2001; ATACK, 2005), facilitando a hiperpolarização celular e consequentemente reduzindo a atividade neuronal e a mudança de estados emocionais (SMITH, 2001), como por exemplo diminuição da ansiedade.

De forma semelhante, o bloqueio dos canais de cálcio voltagem dependente realizado com a administração de cloreto de cobalto intra-CCA neste estudo, produziu resultado semelhante aquele observado por Albrechet-Souza e colaboradores (2009), ou seja, diminuição da ansiedade avaliada no LCE em roedores. Levando em consideração a evidência apresentada acima, podemos sugerir que a neurotransmissão GABA_A-benzodiazepínica possa estar participando das respostas de ansiedade avaliadas no labirinto e induzidas pelo convívio com o coespecífico com dor crônica. Entretanto, novos estudos necessitam ser realizados para confirmar a hipótese apresentada.

No contexto clínico, estudos também mostraram alterações no funcionamento do CCA na modulação da ansiedade, demonstrando aumento significativo da atividade nessa área em pacientes diagnosticados com transtorno de ansiedade (OSUCH et al., 2000; MOCHCOVITCH et al., 2014; ZHUO, M., 2016). Em contrapartida, evidências mostraram que lesões nesta estrutura podem promover efeitos ansiolíticos (HAY et al., 1993).

Embora pesquisas demonstrem a participação do CCA na modulação da ansiedade, pouco se explora as estruturas e mecanismos envolvidos no componente afetivo-emocional da empatia pela nocicepção. Na tentativa de esclarecer essa modulação, um estudo recente demonstrou que ratos submetidos à observação da nocicepção induzida pelo choque nas patas de seus

coespecíficos, apresentaram ativação de neurônios espelhos emocionais no CCA, definidos como neurônios que respondem amplamente à observação e experiência de uma emoção. Ainda, a pesquisa avaliou a inativação dessa estrutura com mucimol (agonista GABA_A), e foi possível observar redução de congelamento desencadeado socialmente, sem comprometer o congelamento para sinais de perigos não sociais. Diante dessas evidências, os autores sugerem que o CCA é uma área necessária para acontecer o contágio emocional (CARRILLO et al., 2019).

Assim como para o CCA, estudos sugerem que a ínsula também desempenha um papel importante na fisiopatologia dos distúrbios relacionados à ansiedade. Sob esse aspecto, uma revisão discutiu sobre a participação da ínsula nas respostas de ansiedade e mostrou que indivíduos propensos à ansiedade demonstram um sinal de previsão interoceptivo alterado, isto é, manifestam uma detecção aumentada com relação a diferença entre o estado corporal observado e esperado. Como consequência, o aumento do sinal de previsão de um estado corporal desencadeia um aumento de comportamentos ansiosos, no qual, o estudo sugere que a ínsula desempenhe um papel fundamental nesse processo (PAULUS; STEIN, 2006). Além disso, estudos observaram um aumento significativo do fluxo sanguíneo cerebral no córtex insular bilateral em pacientes com transtornos de ansiedade (RAUCH et al., 1997; PAULUS; STEIN, 2006).

Recentemente, com o objetivo de investigar o papel da ínsula na ansiedade em roedores, pesquisadores utilizaram um antagonista competitivo dos receptores de glutamato, o CNQX, para inibir a neurotransmissão glutamatérgica nessa estrutura, antes de avaliar os comportamentos relacionados à ansiedade utilizando o LCE. A administração de CNQX na ínsula produziu aumento no tempo gasto nos braços abertos quando comparado aos animais controle, sugerindo efeito ansiolítico. Em contraste, a microinjeção do antagonista do receptor GABA, BMI, induziu efeito ansiogênico em ratos avaliados no LCE (MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019).

Levando em consideração os estudos apresentados, pode-se sugerir que a ínsula esteja envolvida na modulação da ansiedade e que a neurotransmissão glutamatérgica possa estar atuando nas respostas de ansiedade, embora necessite de mais pesquisas para verificar tal hipótese. Além disso, os nossos resultados (Experimento 2) com a inibição reversível desta região, produziu aumento de comportamentos indicativos de diminuição da ansiedade em roedores e de comportamentos relacionados à avaliação de risco, tais como o total e porcentagem de mergulho e SAP protegido nos animais CNC, quando comparados aos camundongos tratados com salina.

Ainda sobre a ínsula, evidências do nosso grupo de pesquisa demonstraram o papel dessa estrutura e da neurotransmissão gabaérgica na modulação social da dor induzida pela convivência com o camundongo submetido à constrição do nervo ciático (ZANIBONI et al, 2018). A função do córtex insular nos coespecíficos observadores foi avaliada pela inativação com CoCl_2 , e a participação da neurotransmissão gabaérgica foi avaliada pela administração sistêmica e intra-ínsula de midazolam em camundongos expostos ao teste de contorções abdominais. Os resultados demonstraram que o convívio com o animal submetido a dor crônica aumentou as respostas nociceptivas, enquanto que o midazolam sistêmico reverteu este efeito no camundongo observador. Entretanto, quando a administração foi intra-ínsula, não produziu alteração na resposta nociceptiva, sugerindo que os receptores GABAA-benzodiazepínicos da ínsula não participam da modulação dessa resposta nociceptiva. Além disso, a inativação da ínsula com CoCl_2 reverteu essa resposta, o que sugere a participação dessa estrutura na modulação da empatia pela nocicepção, bem como para a ansiedade, como observado nos resultados obtidos neste trabalho.

Assim, alguns estudos demonstram a participação do CCA e da ínsula na modulação da empatia e ansiedade, do mesmo modo sugerem o envolvimento de possíveis neurotransmissores envolvidos nessas modulações (ALBRECHET-SOUZA et al., 2009; ZANIBONI et al, 2018;

MÉNDEZ-RUETTE et al., 2019). Além disso, achados anteriores demonstraram conexões densas entre essas estruturas (PRICE, 2000; XIÃO; ZHANG, 2018). Especificamente, Paulus e Stein (2006) sugeriram que as informações interoceptivas são processadas na ínsula e que tais informações são retransmitidas para o CCA, que, como parte do sistema executivo central, está relacionado à avaliação e planejamento de ações, assim como, à processos atencionais, sugerindo que o CCA avalie o sinal de previsão interoceptivo para indicar a necessidade do uso de recursos atencionais para ajustar o comportamento (BOTVINICK et al., 2004; PAULUS; STEIN, 2006).

No entanto, nenhum estudo havia investigado o papel do CCA e da ínsula na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia para nocicepção. Diante dos resultados apresentados neste estudo, pode-se observar que a inativação dessas estruturas produziu efeito ansiolítico em camundongos avaliados no LCE, indicando que tanto o CCA como a ínsula são essenciais para a exibição de comportamentos ansiosos induzidos por contágio emocional, avaliados por meio da convivência com o coespecífico submetido à dor crônica.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo concluímos:

- O convívio com camundongos com nocicepção produziu aumento da resposta de ansiedade avaliada no LCE.
- Estas estruturas, CCA e ínsula, são essenciais para a exibição de comportamentos ansiosos induzidos por contágio emocional, avaliados por meio da convivência com animais submetidos à dor neuropática.

REFERÊNCIA

ALBRECHET-SOUZA; L., BORELLI, K. G.; CARVALHO, M. C.; BRANDAO, M. L. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 387-397, 2009.

ATTAL, N; FERMANIAN, C; FERMANIAN, J; LANTERI-MINET, M; ALCHAAR, H., BOUHASSIRA, D. Neuropathic pain: are there distinct subtypes depending on the etiology or anatomical lesion? **Pain**, p. 343-53, 2008.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; NUNCIATO, A.C.; FACHINI, G.; PEREIRA, B.C.; ZANIBONI, C.R.; CANTO-DE-SOUZA, A. Anxiogenic-like effects and hypernociception on cagemate induced by cohabitated with mice under neuropathic pain. **Behavioural Pharmacology**, v. 26, nº 7, p. 664-672, 2015.

BARDIN, L.; SCHMIDT, J.; ALLOUI, A.; ESCHALIER, A. Effect of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats. **European journal of pharmacology**, v. 409, n. 1, p. 37-43, 2000.

BARTAL, I.B.; SHAN, H.; MOLASKY, N.; MURRAY, T.; WILLIAMS, J.; DECETY, J.; MASON, P. Pro-Social Behavior In Rats Requires An Affective Motivation. **Frontiers in Psychology**, 2016.

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, n. 1, p. 87-107, 1988.

BERNHARDT, B. C.; SINGER, T. The neural basis of empathy. **Annual Review of Neuroscience**, v. 35, p. 1-23, 2012.

BETTI, V; AGLIOTI, S. M. Dynamic construction of the neural networks underpinning empathy for pain. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**, v. 63, p. 191-206, 2016.

BLAIR, R. J. R. Responding to the emotions of others: dissociating forms of empathy through the study of typical and psychiatric populations. **Consciousness and cognition**, v. 14(4), p. 698-718, 2005.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review of Neuroscience**, 39, 43–68, 1988.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, p. 205-18, 2001.

BOEHME, S.; RITTER, V.; TEFIKOW, S.; STANGIER, U.; STRAUSS, B.; MILTNER, W. H.; STRAUBE, T. Brain activation during anticipatory anxiety in social anxiety disorder. **Social cognitive and affective neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 1413-1418, 2013.

BORNHÖVD, K. et al. Painful stimuli evoke different stimulus–response functions in the amygdala, prefrontal, insula and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study. **Brain**, v. 125, n. 6, p. 1326-1336, 2002.

BORSOOK, D.; BECERRA, L. Emotional pain without sensory pain—dream on? **Neuron**, v. 61, n. 2, p. 153-155, 2009.

BOTVINICK, M. M.; COHEN, J. D.; CARTER, C. S. Conflict monitoring and anterior cingulate cortex: an update. **Trends in cognitive sciences**, v. 8, n. 12, p. 539-546, 2004.

BUSHNELL, M. C.; CEKO, M.; LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 7, p. 502-11, 2013.

CARMONA, I.M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Ansiedade induzida pelo modelo de empatia para dor: o papel da neurotransmissão GABA_A-benzodiazepínica na modulação da ansiedade em camundongos. 2017.

CARNEIRO-DE-OLIVEIRA, P.E.; ZANIBONI, C.R.; CARMONA, I.M.; FONSECA, A.J.R.; CANTO-DE-SOUZA, A. Preliminary behavioral assessment of cagemates living with conspecifics submitted to chronic restraint stress in mice. **Neuroscience Letters**, v.657, p.204–210, 2017.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29: p. 1193–1205, 2005.

CARRILLO, M., HAN, Y.; MIGLIORATI, F.; LIU, M.; GAZZOLA, V.; KEYSERS, C. Emotional mirror neurons in the rat's anterior cingulate cortex. **Current Biology**, v. 29, n. 8, p. 1301-1312, 2019.

CHAU, A.; ZHONG, W.; GORDON, B.; KRUEGER, F.; GRAFMAN, J. Anterior insula lesions and alexithymia reduce the endorsements of everyday altruistic attitudes. **Neuropsychology**, v. 117, p. 428-439, 2018.

CIVI, S; EMMEZ, G; DERE, A.V; BÖRCEK, O. A; EMMEZ, H. Effects of quercetin on chronic constriction nerve injury in an experimental rat model. **Acta Neurochirurgica**, 158 p.959-965, 2016.

CRAIG, A. D. How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. **Nature reviews neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 655, 2002.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; CORREA, F. M.; GUIMARAES, F. S.; JOCA, S. R. Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. **Behavioral and Brain Functions**, v. 6, p. 30, 2010.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, p.171-176, 1994.

DAVIDSON, R. J.; PUTNAM, K. M; LARSON, C. L. Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation--a possible prelude to violence. **Science**, 289(5479), 591-594, 2000.

DAVIS, M. H. A multidimensional approach to individual differences in empathy. **JSAS Catalog of Selected Documents in Psychology**, v. 10, p. 85, 1980.

DEL CASTILLO, O. I. A. R.; MORALES-VIGIL, T.; VÁZQUEZ-PINEDA, F.; SÁNCHEZ-ROMÁN, S.; RAMOS-DEL RÍO, B.; GUEVARA-LÓPEZ, U. Sobrecarga, ansiedad y depresión

en cuidadores primarios de pacientes con dolor crónico y terminales. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 46, n. 5, p. 485-494, 2008.

DEMYTTENAERE, KOEN et al. Mental disorders among persons with chronic back or neck pain: results from the World Mental Health Surveys. **Pain**, v. 129, n. 3, p. 332-342, 2007.

DZIOBEK, I., PREIBLER, S., GROZDANOVIC, Z., HEUSER, I., HEEKEREN, H. R., ROEPKE, S. Neuronal correlates of altered empathy and social cognition in borderline personality disorder. **Neuroimage**, v. 57(2), p. 539-548, 2011.

ELMAN I., BORSOOK D., VOLKOW N. D. Pain and suicidality: insights from reward and addiction neuroscience. **Progress in Neurobiology**. 2013; 109:1–27.

FERRARI P.D; CANTO-DE-SOUZA, A. Role of 5-HT₃ receptors in the modulation of nociceptive response in mice subjected to the model of empathy for pain. In: Buenos Aires. 2nd FALAN congress. 2016.

FILE, S. E. Behavioral detection of anxiolytic action. **Experimental approaches to anxiety and depression**, 1992.

FLOR, H.; KERNS, R. D.; TURK, D. C. The role of spouse reinforcement, perceived pain, and activity levels of chronic pain patients. **Journal of psychosomatic research**, v. 31, n. 2, p. 251-259, 1987.

GALLESE, V; KEYSERS, C; RIZZOLATTI, G. A unifying view of the basis of social cognition. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 8, p. 396-403. 2004.

GARCIA, A.M.; CARDENAS F.P., MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behaviour in the elevated plus-maze. **Physiology e Behavior**, v. 85, p. 265-270, 2005.

GERRITS, M.M; VOGELZANGS, N.; VAN OPPEN, P.; VAN MARWIJK H.W.; VAN DER HORST, H.; PENNINX, B.W. Impact of pain on the course of depressive and anxiety disorders. **Pain**, v.153, p.429-436, 2012.

GONZALEZ-LIENCRES, C.; JUCKEL, G.; BRÜNE, M.; Emotional contagion in mice: The role familiarity. **Behavioural Brain Research**, v. 203, p. 16-21, 2014.

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.29, suppl.1, p.s3-s6, 2007.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, H. Animal models of anxiety disorders. In: D'HAENEN, H.; DEN BOER, J. A., et al (Ed.). *Biological Psychiatry*. Chichester: John Wiley & Son Ltd., cap. 19, p.880-889, 2002.

GRAY, J. A.; McNAUGHTON, N. *The neuropsychology of anxiety*. 2nd edition. Oxford: Oxford University Press; 2000.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R.J.; PERRAULT, G.; SANGER, D.J. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 57, n. 4, p. 817-827, 1997.

GU, X.; HOF, P.R.; FRISTON, K.J.; FAN, J. Anterior insular cortex is necessary for empathetic pain perception. **Brain**, v. 135, n. 9, p. 2726-2735, 2012.

- GU, X.; HOF, P.R.; FRISTON, K.J.; FAN, J. Anterior insular cortex and emotional awareness. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 15, p. 3371-3388, 2013.
- HAANPÄÄ, M; BACKONJA, M; BENNETT, M; BOUHASSIRA, D; CRUCCU, G; HANSSON, T. *et al.* Assessment of Neuropathic Pain in Primary Care. **The American Journal of Medicine**, v.122, p. 13–21, 2009.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of “fear” – motivated behaviour. Naunyn-Scmiedeberg’s. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.
- HAY, P.; SACHDEV, P.; CUMMING, S.; SMITH, J. S.; LEE, T.; KITCHENER, P.; MATHESON, J. Treatment of obsessive-compulsive disorder by psychosurgery. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 87, n. 3, p. 197-207, 1993.
- HOEHN-SARIC, R; MCLEOD, D. R.; FUNDERBURK, F.; KOWALSKI, P. Somatic symptoms and physiologic responses in generalized anxiety disorder and panic disorder: An ambulatory monitor study. **Archives of General Psychiatry**, v. 61, n. 9, p. 913-921, 2004.
- JACKSON, P. L.; MELTZOFF, A. N.; DECETY, J. How do we perceive the pain of others? A window into the neural processes involved in empathy. **Neuroimage**, v. 24, n. 3, p. 771-779, 2005.
- JORDAN, E. G.; MOGIL, J. S. Mice, pain, and empathy. **Science**, v.314 (5797), p. 253, 2006.
- KIM, S. S.; WANG, H.; LI, X.Y.; CHEN, T.; ZHUO, M. Neurabin in the anterior cingulate cortex regulates anxiety-like behavior in adult mice. **Molecular brain**, v. 4, n. 1, p. 6, 2011.
- KOGA, K.; LIU, M. G.; QIU, S.; SONG, Q.; O'DEN, G.; CHEN, T.; ZHUO, M. Impaired presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of Fmr1 knock-out mice. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 5, p. 2033-2043, 2015.
- KRETZ, R. Local cobalto injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **Neuroscience Methods**, v.11, n. 2, p. 129-35, Jun 1984.
- KURASHI, Y., HARADA, Y., ARATANI, S., SATOH, M., TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**, v. 273, n°2, p. 245-252, 1983.
- LANGFORD, D. J.; CRAGER, S. E.; SHEHZAD, Z.; SMITH, S. B.; SOTOCINAL, S. G.; LEVENSTADT, J. S.; CHANDA, M. L.; LEVITIN, D. J.; MOGIL, J. S. Social 17 modulation of pain as evidence for empathy in mice. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1967-70, 2006.
- LI, F. *et al.* Anterior cingulate cortical lesion attenuates food foraging in rats. **Brain research bulletin**, v. 88, n. 6, p. 602-608, 2012.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p.180-185, 1987.
- LIU, Z. Y., ZHUANG, D. B., LUNDERBERG, T., e YU, L. C. Involvement of 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. **Neuroscience**, v. 112, p. 399-407, 2002.

LU, W. L.; ZHANG, Q.; ZHENG, L.; WANG, H.; LI, R. Y.; ZHANG, L. F.; SHEN, W. B.; TU, X. D. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen beta- cyclodextrin inclusion complexes in animals. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1515-20, 2004.

McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropharmacology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 285-305. 2004.

MÉNDEZ-RUETTE, M.; LINSAMBARTH, S. A.; MORAGA-AMARO, R.; QUINTANA DONOSO, D.; MÉNDEZ, L.; TAMBURINI, G. G.; STEHBERG, J. The role of the rodent Insula in Anxiety. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 330, 2019.

MIASKOWSKI, C.; ZIMMER, E. F.; BARRETT, K. M.; DIBBLE, S. L.; WALLHAGEN, M. Differences in patients' and family caregivers' perceptions of the pain experience influence patient and caregiver outcomes. **Pain**, v. 72, n. 1-2, p. 217-226, 1997.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, p. 254-260, 1958.

MOCHCOVITCH, M. D.; DA ROCHA FREIRE, R. C.; GARCIA, R. F; NARDI, A. E. A systematic review of fMRI studies in generalized anxiety disorder: evaluating its neural and cognitive basis. **Journal of Affective Disorders**, v. 167, p. 336-342, 2014.

MOYA-ALBIOL, L.; HERRERO, N.; BERNAL, M. C. The neural bases of empathy. **Rev Neurol**, v. 50, p. 89-100, 2010.

NEUGEBAUER, V.; GALHARDO, V.; MAIONE, S.; MACKEY, S. C. Forebrain pain mechanisms. **Brain research reviews**, v. 60, n. 1, p. 226-242, 2009.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; FORNARI, R.V.; COSTA, M.; PELÁ, I.R.; GRAEFF, F.G. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**.150, p.300-310, 2000.

OSUCH, E. A.; KETTER, T. A.; KIMBRELL, T. A.; GEORGE, M. S.; BENSON, B. E.; HERSCOVITCH, M. W. W.; POST, R. M.. Regional cerebral metabolism associated with anxiety symptoms in affective disorder patients. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 10, p. 1020-1023, 2000.

PANKSEPP, J. B.; LAHVIS, G. P. Rodent empathy and affective neuroscience. **Neuroscience and Biobehavior Review**, v. 35, n. 9, p. 1864-75, 2011

PAULUS, M. P.; STEIN, M. B. An insular view of anxiety. **Biological psychiatry**, p. 60(4), v. 383-387, 2006.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2001.

PELARIN, V; CANTO DE SOUZA, A. Empatia em camundongos: avaliação do papel da amígdala, insula e córtex cingulado anterior na nocicepção em camundongos expostos ao teste de contorções abdominais. 2014.

- PELLOW, S.; CHOPIN, P. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Neuroscience Methods**, v.14, p.149-167, 1985.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-67, 1985.
- PEREIRA M.E.C. Mudanças no conceito de ansiedade. In: Hetem, LAB, Graeff FG. Transtornos de Ansiedade. São Paulo: **Editora Científica Nacional Ltda**, p. 13-47. 1997.
- PRESTON, Stephanie D. A perception-action model for empathy. **Empathy in mental illness**, p. 428-447, 2007.
- PRESTON, Stephanie D.; DE WAAL, Frans BM. Empathy: Its ultimate and proximate bases. **Behavioral and brain sciences**, v. 25, n. 1, p. 1-20, 2002.
- RAUCH, Scott L. et al. The functional neuroanatomy of anxiety: a study of three disorders using positron emission tomography and symptom provocation. **Biological psychiatry**, v. 42, n. 6, p. 446-452, 1997.
- REIS, L. M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain Research**, v.1231, p.93-102, 2008.
- RESSTEL, L. B.; JOCA, S. R.; GUIMARÃES, F. G.; CORRÊA, F. M. Involvement of medial prefrontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v.143, p.377-85, 2006.
- RESSTEL L. B.; SOUZA R. F.; GUIMARÃES F. S. Anxiolytic-like effects induced by medial prefrontal cortex inhibition in rats submitted to the Vogel conflict test. **Physiology Behavior**, v. 93, p. 200-5, 2008.
- RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289–304, 1997.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry e Behavior**, v.52, p.297-303, 1995.
- ROESKA, K.; CECI, A.; TREEDE, R. D.; DOODS, H. Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. **Neuroscience Letters**, v.464 p.160-164, 2009.
- SANGER, D. J. GABA and the behavioral effects of anxiolytic drugs. **Life sciences**, v. 36, n. 16, p. 1503-1513, 1985.
- SHAMAY-TSOORY, S. G. The neural bases for empathy. **Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 18-24, 2011.
- SIMONS, L.E; ELMAN, I; BORSOOK, D; Psychological processing in chronic pain: A neural systems approach. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**, v.39 p. 61-78, 2014.

- SINGER, T.; LAMM, C. The social neuroscience of empathy. **National Academy of Science**, v. 1156, p. 81-96, 2009.
- SINGER, T.; SEYMOUR, B.; O DOHERTY, J.; KAUBE, H.; DOLAN, R. J.; FRITH, C.D. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. **Science**, v.303, p.1157-1162, 2004.
- SIVASELVACHANDRAN, S.; ACLAND, E. L.; ABDALLAH, S.; MARTIN, L. J. Behavioral and mechanistic insight into rodent empathy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 91, p. 130-137, 2018.
- SOMMER, C.; SCHAFERS, M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. **Brain Research**, v. 784, n. 1-2, p. 154-62, 1998.
- SOUSA, A.M.; LAGES, G. V.; PEREIRA, C. L.; SLULLITEL, A. Experimental models for the study of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, Sup. 1, p. S27-30, 2016.
- STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. **Journal Anxiety Disorders**, v. 11, n^o4, p. 409-29, 1997.
- STEPANOVIC-PETROVIC, R. M.; MICOV, A. M.; TOMIC, M. A.; KOVACEVIC, J. M.; BOSKOVIC, B. D. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. **Anesthesiology**, v.120, n. 3, p. 737-50, 2014.
- STRAUBE, Thomas et al. Dynamic activation of the anterior cingulate cortex during anticipatory anxiety. **Neuroimage**, v. 44, n. 3, p. 975-981, 2009.
- TAVARES, L. R.R.; BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; CANTO-DE-SOUZA, A. Activation of 5-HT_{2C} (but not 5-HT_{1A}) receptors in the amygdala enhances fear-induced antinociception: Blockade with local 5-HT_{2C} antagonist or systemic fluoxetine. **Neuropharmacology**, v. 135, p. 376-385, 2018.
- TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J.A.M. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cagemate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.23, p. 558–567, 2009.
- TOYODA, Hiroki; ZHAO, Ming-Gao; ZHUO, Min. Enhanced quantal release of excitatory transmitter in anterior cingulate cortex of adult mice with chronic pain. **Molecular pain**, v. 5, n. 1, p. 4, 2009.
- TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry e Behavior**, v.44, p. 463-469, 1993.
- TSUDA, M.; KOGA, K.; CHEN, T.; ZHUO, M. Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex. **Journal of neurochemistry**, v. 141, n. 4, p. 486-498, 2017.

- WALL, P. M.; MESSIER, C. Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 3, p. 233-244, 2002.
- WALL, P.M.; MESSIER, C. Ethological confirmatory factor analysis of anxiety-like behaviour in the murine elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, v. 114, p. 199–212, 2000.
- WEI, F.; ZHUO, M. Potentiation of sensory responses in the anterior cingulate cortex following digit amputation in the anaesthetised rat. **The Journal of Physiology**, v. 532, n. 3, p. 823-833, 2001.
- WILTGEN, B. G.; ZHOU, M.; CAI, Y.; BALAJI, J.; KARLSSON, M. G.; PARIVASH, S. N.; SILVA, A. J. The hippocampus plays a selective role in the retrieval of detailed contextual memories. **Current Biology**, v. 20, n. 15, p. 1336-1344, 2010.
- XIAO, X.; ZHANG, Y. A new perspective on the anterior cingulate cortex and affective pain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 90, p. 200-211, 2018.
- XU, H.; WU, L. J.; WANG, H.; ZHANG, X.; VADAKKAN, K. I.; KIM, S. S.; ZHUO, M. Presynaptic and postsynaptic amplifications of neuropathic pain in the anterior cingulate cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 29, p. 7445-7453, 2008.
- YALCIN, I.; BARROT, M. The anxiodepressive comorbidity in chronic pain. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 2014; 27(5): 520–527.
- YALCIN, I.; BARTHAS, F.; BARROT, M. Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. **Neuroscience e Biobehavioral Reviews**, v.47, p.154-64, 2014.
- YANG, S.; CHANG, M. C. Chronic Pain: Structural and Functional Changes in Brain Structures and Associated Negative Affective States. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3130, 2019.
- ZANIBONI, C.; BAPTISTA-DE-SOUZA, D; CANTO-DE-SOUZA, A. Effects of midazolam on hipernociception induced by living with coespecific in neurophatic condition in mice. **Pain**, v.17, p.58, 2016.
- ZANIBONI C.; PELARIN, V.; BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; CANTO-DE-SOUZA, A. Empathy for pain: Insula inactivation and systemic treatment with midazolam reverses the hiperalgesia induced by cohabitation with a pair in chronic pain condition. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, p. 278, 2018.
- ZHUO, M. Neural mechanisms underlying anxiety–chronic pain interactions. **Trends in neurosciences**, v. 39, n. 3, p. 136-145, 2016.

ANEXO

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do papel do córtex cingulado anterior e da ínsula na modulação da ansiedade induzida em camundongos pelo modelo de empatia", protocolada sob o CEUA nº 3400210118, sob a responsabilidade de **Giovana Benassi Cezar** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 23/04/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the role of the anterior cingulate cortex and the insula in the modulation of the anxiety induced in mice by the model of empathy", utilizing 224 Heterogenics mice (224 males), protocol number CEUA 3400210118, under the responsibility of **Giovana Benassi Cezar** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 04/23/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2018** a **03/2020**

Área: **Psicologia**

Origem: **Biotério Central da UFSCAR**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **6 a 8 semanas**

N: **224**

Linhagem: **suiço-albino**

Peso: **35 a 50 g**

Resumo: A empatia é expressa pela capacidade em captar sinais emocionais em outros indivíduos. Tal capacidade se configura como fator crucial na vivência emocional e interação social, permitindo que humanos, assim como outras espécies, possam detectar os estados afetivos alheios. Estudos vêm sendo desenvolvidos para o esclarecimento acerca da modulação social da ansiedade em roedores, comportamento este relacionado à empatia. Neste sentido, recentemente foi demonstrado que camundongos submetidos ao protocolo de empatia para dor apresentam aumento de comportamentos ansiosos, avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). A ansiedade é um estado emocional, sendo considerada imprescindível no repertório afetivo. O LCE é um modelo amplamente utilizado para a avaliação da ansiedade em roedores. Pesquisas demonstram a participação de sistemas neurais envolvidos na modulação da ansiedade, entre eles o córtex cingulado anterior e a ínsula, que também estão presentes na avaliação das respostas de empatia. Diante do exposto, sugere-se ser relevante o estudo para investigação acerca da empatia, bem como dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na modulação social da ansiedade. Neste contexto, o objetivo deste trabalho será avaliar o papel do córtex cingulado anterior e da ínsula na modulação da ansiedade induzida em camundongos por um modelo de empatia para a dor. Para isso, camundongos machos da linhagem Suíço, após 21 dias do desmame serão alojados em duplas para a realização do protocolo experimental de 28 dias. No 14º dia um dos animais da dupla será submetido ao procedimento de cirurgia de constrição do nervo ciático. Após a cirurgia, o camundongo voltará para a caixa de convivência com seu respectivo coespecífico (observador). No 23º dia de convivência os animais observadores serão submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia direcionadas às estruturas citadas. No 28º dia de convivência, os animais (observadores) receberão injeções bilaterais nas estruturas alvo de salina ou cloreto de cobalto, que produz a inativação reversível da estrutura, e serão submetidos individualmente por cinco minutos ao teste no LCE para avaliação comportamental.

Local do experimento: Laboratório de Psicologia da Aprendizagem da UFSCAR

São Carlos, 14 de maio de 2018