



PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS CONVÊNIO UFSCar/UNESP



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
LABORATÓRIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA

**Papel dos receptores vaniloides TRPV1 da matéria cinzenta
periaquedutal na ansiedade e na antinocicepção induzida pelo
medo em camundongos.**

Diego Cardozo Mascarenhas

Araraquara – SP
-2013-

Diego Cardozo Mascarenhas

Papel dos receptores vaniloides TRPV1 da matéria cinzenta periaquedutal na ansiedade e na antinocicepção induzida pelo medo em camundongos.

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Ciências Fisiológicas como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Araraquara – SP
-2013-

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M395pr

Mascarenhas, Diego Cardozo.

Papel dos receptores vaniloides TRPV1 da matéria cinzenta periaquedutal na ansiedade e na antinocicepção induzida pelo medo em camundongos / Diego Cardozo Mascarenhas. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
65 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Ansiedade. 2. Antinocicepção. 3. Vaniloides. 4. Matéria cinzenta periaquedutal. 5. Camundongos. I. Título.

CDD: 615.78 (20ª)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Diego Cardozo Mascarenhas

Dia 03/05/2013

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza.....

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães.....

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi.....

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza
Orientador

*Dedico esse trabalho a minha família,
pelos ensinamentos e incentivo dados,
e por me encorajar sempre nas minhas escolhas!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, nosso senhor, por me abençoar e não me deixar desanimar em momentos difíceis.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza por me aceitar em seu laboratório e tornar possível a realização desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos ao apoio, incentivo e ensino dispensados ao longo desses anos. Agradeço também a amizade construída nesse tempo, pois além de um grande pesquisador, o Ricardo é um exemplo como pessoa. Tenho muita admiração por ele!

Agradeço a Dra. Karina Santos Gomes, pelo imensurável ensinamento, colaboração e, sobretudo, amizade. A Karina fez com que eu realmente gostasse de pesquisa. Meu muito obrigado.

À banca examinadora pela solicitude em ler e contribuir com esse trabalho.

À banca da qualificação, cujas sugestões foram de grande valia para o trabalho.

Aos meus familiares, minha mãe Maria das Graças, meu pai Luiz Alberto e irmã Daniele, por estarem sempre presentes e por terem construído em mim um alicerce forte, além de terem mostrado que não há nada mais importante do que a família.

A todos os outros familiares, tios, tias, primos, primas e avós, pelo apoio e por todo o amor dedicado.

A Prof. Dra. Cleopatra e Prof. Dr. Carlos pela amizade e apoio durante esses anos no laboratório de farmacologia.

Às técnicas do laboratório, Elizabete e Rosana, e à secretária Tirene, pela amizade e excepcional dedicação aos alunos da farmacologia, sem as quais esse trabalho não teria sido concluído. Sinto-me privilegiado de poder contar com essas excelentes profissionais!

Aos amigos Ana Claudia, Tarciso Tatiani, Ludimila, Matheus (Capiou), Kelciane, Vanessa, Joyce, Yara, Josi, Ligia, Fábio (Quasy), Paula (Pupu), Paulo (Paulão), Rodrigo (Vampeta), Sheila e Javier pelo apoio em qualquer tipo de situação, companhia, risadas e descontração durante a convivência diária no laboratório. To Rosalie Heilig, thank you so much for the friendship, although we spent few months in each other's company I can state she is a dear friend of mine!

A Cristiane Feriato da Silva e Josiane Canaã, por todo ensinamento e amizade construídos na época da Farmácia Escola. Foi um privilégio poder trabalhar com essas excelentes profissionais farmacêuticas!

Aos colegas de profissão, Azair, Rimenez, Lucas Canto de Souza, Daniela, Eduardo, Patrícia de Paula, Padua, Lucas Albrechet, Chico, pela descontração e amizade.

A Mara (UNESP) e ao Alexandre (UFSCar), secretários do PIPGCF, pela excelente assistência prestada.

Aos funcionários da FCFar/UNESP pelo apoio prestado durante o projeto, em especial aos funcionários do Biotério e da Seção de Transportes.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À FCFar/UNESP, pelo espaço físico e as condições laboratoriais, necessários para realização adequada desse projeto.

Ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, pela ótima estrutura e por viabilizar a realização desse projeto de mestrado.

Ao PADC/FCFar, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro concedido, o qual foi de suma importância na realização do projeto.

Aos camundongos utilizados nesse projeto, cujas vidas foram essenciais para a pesquisa realizada.

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	04
1. INTRODUÇÃO	07
1.1. Reações de defesa.....	08
1.2. Medo e ansiedade.....	09
1.3. Substratos neurais do medo/ansiedade.....	10
1.4. Dor.....	12
1.4.1. Conceitos e neurofisiologia.....	12
1.4.2. Antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade.....	14
1.5. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	16
1.6. Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP).....	17
1.6.1. Organização anatômica e funcional da MCP.....	17
1.7. A neurotransmissão vaniloide.....	18
1.7.1. Vaniloides e a dor.....	18
1.7.2. Vaniloides e a ansiedade/medo.....	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Sujeitos.....	24
3.2. Fármacos.....	24
3.3. Aparatos.....	24
3.4. Análise comportamental.....	24

3.5. Cirurgia e administração de fármacos.....	25
3.6. Teste de formalina na pata.....	26
3.7. Procedimentos.....	27
3.8. Histologia.....	28
3.9. Estatística.....	29
4. RESULTADOS.....	30
4.1.1. Experimento I.....	31
4.1.2. Experimento II.....	33
4.1.3. Experimento III.....	35
4.1.4. Experimento IV.....	37
4.1.5. Experimento V.....	38
4.1.6. Experimento VI.....	39
4.1.7. Experimento VII.....	40
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

RESUMO

Quando confrontado com situações de medo os roedores apresentam respostas comportamentais (ex., luta, fuga, imobilidade e vocalização) e neurovegetativas (taquicardia, hipertensão e defecação) que caracterizam as reações de defesa. Em geral, essas respostas são acompanhadas de antinocicepção. A exposição de animais ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) resulta num repertório de reações de defesa e antinocicepção, uma vez que os braços abertos do LCE representam uma ameaça a roedores. Vários estudos têm investigado o substrato neural e a neurotransmissão envolvidos na neurobiologia da antinocicepção induzida por situações aversivas, e muitos têm destacado a participação da porção dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPd) mesencefálica. Vários mediadores com um papel importante na modulação do medo/ansiedade e da nocicepção vem sendo estudados e, mais recentemente, a partir da descoberta do receptor TRPV1 (*Transient Receptor Potential Vanilloid type-1*), os compostos vaniloides, que são agonistas desse canal iônico, vêm ganhando destaque. Todavia, é incerto o papel desses compostos na modulação dessas emoções, uma vez que ainda existem resultados contraditórios na literatura a respeito dos seus efeitos. Entretanto, através da utilização de ferramentas genéticas e farmacológicas, os vaniloides aparecem como um alvo interessante no estudo da neurobiologia da ansiedade e da dor. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o papel desses compostos vaniloides na modulação do medo/ansiedade bem como na antinocicepção induzida por ambiente aversivo. Os animais foram submetidos à microinjeção do agonista vaniloide capsaicina intra-MCPd (0, 0,01, 0,1 ou 1 nmol) que, na dose de 1 nmol, reduziu a nocicepção avaliada pelo teste da formalina, e aumentou a ansiedade avaliada pelo teste do LCE. A microinjeção do antagonista capsazepina intra-MCPd (0, 10, 30 ou 60 nmol) não provocou efeito algum na ansiedade avaliada pelo LCE. No entanto, a dose de 60 nmol mimetizou os efeitos da capsaicina, promovendo antinocicepção avaliada pelo teste da formalina, sugerindo um papel tônico dos vaniloides na dor. De maneira interessante, foi possível demonstrar a especificidade dos receptores TRPV1, uma vez que, camundongos submetidos ao prévio tratamento intra-MCPd com uma dose de capsazepina desprovida de efeito *per se* (30 nmol) na ansiedade e nocicepção, tiveram o efeito pró-aversivo e antinociceptivo da capsaicina revertidos completamente e de maneira seletiva. Por fim, essa mesma dose de capsazepina (30 nmol) foi capaz de atenuar a antinocicepção induzida pelo ambiente aversivo do LCE todo aberto (LCEa: quatro braços abertos). Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem um papel importante dos compostos vaniloides na

modulação das reações de defesa e antinocicepção. Ainda, os efeitos pró-aversivos e antinociceptivos da capsaicina se devem primariamente a ativação seletiva dos TRPV1, e por fim, o antagonista capsazepina é capaz de atenuar a antinocicepção induzida pela situação aversiva do LCEa.

ABSTRACT

When confronted with fear situations rodents exhibit behavioral (e.g., fight, flight, immobility and vocalization) and neurovegetative (tachycardia, hypertension and defecation) responses that characterize the defense reactions. In general, these responses are accompanied by antinociception. The exposure of animals to the paradigm of the Elevated Plus Maze (EPM) results in a repertoire of defensive responses and antinociception, since the open arms of the EPM represents a threat to rodents. Several studies have investigated the neural substrate involved in the neurotransmission and neurobiology of aversive situations-induced antinociception, and many have highlighted the involvement of the dorsal portion of periaqueductal gray matter (dPAG). Several mediators which play an important role in modulation of fear/anxiety and nociception states, has been studied and, recently, with the discovery of TRPV1 receptor (Transient Receptor Potential vanilloid type-1), vanilloid compounds, which are agonists of this ion channel, are gaining prominence. It is unclear the role played by these compounds in the modulation of these emotions, since there are some conflicting results in the literature regarding its effects. However, through the use of genetic and pharmacological tools, the vanilloid compounds appear as an interesting target in an attempt to elucidate the neurobiology of pain and anxiety. Thus, the present study aimed to investigate the role of these vanilloid compounds in the modulation of fear/anxiety as well as aversive environment-induced antinociception. Animals were submitted to the agonist capsaicin microinjection intra-dPAG (0, 0.01, 0.1 or 1 nmol) which in the dose of 1 nmol reduced nociception assessed by the formalin test, and increased anxiety assessed by EPM test. Antagonist capsazepine microinjection intra-dPAG (0, 10, 30 or 60 nmol) did not cause any effect on anxiety assessed by EPM. However, the dose of 60 nmol mimicked the capsaicin effects, promoting antinociception assessed by the formalin test, suggesting a tonic role of vanilloids in pain. Interestingly, it was demonstrated the TRPV1 receptor specificity, since mice submitted to capsazepine prior treatment intra-dPAG at dose devoid of effect *per se* effect (30 nmol) in anxiety and nociception, had the pro-aversive and antinociceptive capsaicin effect completely and selectively reversed. Finally, this same capsazepine dose (30 nmol) was able to attenuate the aversive environment-induced antinociception elicited by the fully open EPM (oEPM: four open arms). Altogether, our results suggest an important role played by the vanilloid compounds in the modulation of defense reactions and antinociception. Also, the pro-aversive and antinociceptive effects of capsaicin are primarily due to selective activation of TRPV1, and finally, the antagonist capsazepine is able to

attenuate the oEPM-induced antinociception, a maze derived from the EPM apparatus which elicits more aversion.

1. INTRODUÇÃO

1.1. REAÇÕES DE DEFESA

Historicamente, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade teve início nos relatos de Darwin (reeditado em 1965), em sua obra, “A expressão das emoções no homem e nos animais”, a qual apontou o caminho, seguido em nosso século pela Etologia, de buscar o valor adaptativo dos processos comportamentais e psicológicos. *“O homem tendo outros animais como ancestrais compartilha com estes suas emoções básicas” (adaptado dos estudos de Charles Darwin).*

Do ponto de vista evolucionário, o medo e a ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e que se originam nas reações de defesa que os animais exibem diante de ameaças que podem comprometer sua integridade física ou a própria sobrevivência (DEAKIN; GRAEFF, 1991). O homem compartilha com os animais essas emoções básicas (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004) de modo que, segundo Schmitt e Kapezinski (2004), a ansiedade pode ser apontada como uma emoção responsável pela sobrevivência da espécie humana. Quando o medo e a ansiedade superam níveis considerados de normalidade, interferindo com o cotidiano do indivíduo, passam a ser consideradas patologias do sistema de defesa humano. Portanto, numa perspectiva evolutiva, a investigação do comportamento defensivo em vários mamíferos (como os roedores) é de crucial importância para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes aos estados de medo e ansiedade (GRAY; MACNAUGHTON, 2000; BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002).

Nesse sentido, podem ser citadas como situações que eliciam reações comportamentais e autonômicas de defesa: o ataque de um predador, um confronto com indivíduo da mesma espécie, estímulos nociceptivos e ambientais aversivos, tais como altura excessiva, iluminação intensa, tempestades, incêndios, exposição a lugares novos. Diante dessas situações, a estratégia defensiva adotada depende de fatores como a característica e familiaridade do ambiente, a proximidade do estímulo, as experiências anteriores em situações semelhantes e a posição do indivíduo na hierarquia social do seu grupo (ADAMS, 1979; MARKS, 1994; apud ZANGROSSI; GRAEFF, 2004, p.57).

De acordo com essas características, Caroline e Robert Blanchard (1990) propuseram que os animais utilizam quatro estratégias comportamentais básicas: fuga, imobilidade, ataque defensivo e submissão. Dessa forma, mediante uma ameaça potencial ou incerta (p. ex. reexposição ao ambiente em que o animal esteve frente a um

predador ou contato com objetos com seu odor), ratos e camundongos exibem exploração cautelosa em direção à fonte de perigo. Esses comportamentos refletem hesitação e avaliação de risco, sendo caracterizados por repetidas tentativas de aproximação, seguidas da esquiva ao estímulo aversivo. Já diante de uma ameaça distal, o animal tende a exibir respostas de esquiva ou imobilidade. A fuga é a estratégia comportamental adotada quando existe uma rota de saída ou quando o predador mantém-se a certa distância. Quando a fuga não acontece, o animal tende a permanecer imóvel, pois ao exibir a resposta de congelamento, pode diminuir a probabilidade de ser visto pelo predador. No entanto, quando o predador está muito próximo, ou já em contato com a presa, tentativas descontroladas e não direcionadas de fuga ou resposta de agressão defensiva (posturas de ameaça e mordidas ao predador) podem ser os recursos defensivos mais eficazes em inibir a ação predatória (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001).

1.2. MEDO E ANSIEDADE

O medo e a ansiedade são estados emocionais correlacionados, qualificados subjetivamente como não prazerosos e desagradáveis, acompanhados por sentimento de apreensão e insegurança e um conjunto de alterações comportamentais, fisiológicas e cognitivo-subjetivas (GRAEFF, 1990).

Lader (1981) atribuiu como causa principal da ansiedade a expectativa de um perigo iminente e indefinido, porém sem que uma ameaça real seja identificada, ou quando existente, considerada como desproporcional à intensidade da emoção. Graeff (1990) cita como uma das raízes principais da ansiedade o sentimento de medo, por ser encontrado praticamente em todas as espécies e que tem como função sinalizar e preparar o organismo para situações de ameaça ou perigo. A diferença entre os dois estados emocionais pode ser caracterizada em relação aos estímulos e/ou situações que os desencadeiam, de forma que o medo surgiria diante de situações claras e evidentes de ameaça e perigo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (BLANCHARD et al., 1990).

1.3. SUBSTRATOS NEURAI DO MEDO/ANSIEDADE

Os principais substratos neurais que processam essas emoções estão contidos em dois importantes constructos teóricos. São eles o sistema cerebral de defesa (SCD) e o sistema de inibição comportamental (SIC). O primeiro constructo foi fundamentado com os trabalhos de Hess e Brügger (1943), os quais demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial em gatos eliciou respostas defensivas de luta e fuga, acompanhadas de alterações neurovegetativas, de forma semelhante às respostas eliciadas em um confronto com um predador. Os seguidores de Hess realizaram a exploração sistemática do sistema nervoso do gato, confirmando os achados descritos em 1943 e adicionando novas estruturas (amígdala e matéria cinzenta periaquedutal) de onde se pôde obter a reação de defesa afetiva por estimulação elétrica. Dessa forma, o hipotálamo medial, amígdala e matéria cinzenta periaquedutal foram agrupadas hierarquicamente compondo o sistema cerebral de defesa (para uma revisão, ver DEAKIN; GRAEFF, 1991, BRANDÃO et al, 2003; HETEM; GRAEFF, 2003). Já o construto do sistema de inibição comportamental foi proposto inicialmente nos anos 60 pelo psicólogo britânico Jeffrey Gray, o qual postulava que a ansiedade seria devida à ativação do SIC por determinadas classes de estímulos ambientais (sinais de punição ou frustração, estímulos ameaçadores inatos e novidade), resultando na inibição comportamental, e aumento do nível de vigilância e atenção em animais de laboratório. Revisando uma extensa literatura sobre o efeito de lesões cerebrais e administração de drogas ansiolíticas em animais de laboratório sob diversas condições experimentais, Gray concluiu que as alterações comportamentais produzidas por lesão do sistema septo-hipocampal eram as que mais se aproximavam das produzidas por substâncias ansiolíticas clássicas. Dessa forma, propôs que o sistema septo-hipocampal seria o principal substrato neural do SIC e que as drogas ansiolíticas aliviarão a ansiedade porque prejudicariam o seu funcionamento (GRAY; MCNAUGHTON, 1982).

Gray e McNaughton (2000) publicaram a segunda edição do livro intitulado *The Neuropsychology of anxiety*, no qual revisaram e integraram os construtos teóricos do SIC e do SCD, o que resultou em importantes mudanças conceituais, que serão sucintamente apresentadas a seguir. De acordo com a análise etoexperimental proposta pelo casal Robert e Caroline Blanchard, Gray & McNaughton (2000) adicionaram componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de recompensa (frustração) como eliciadores de ansiedade.

Esses autores também realçam a importância da existência do conflito esquiva-aproximação e da direção da resposta para a distinção entre medo e ansiedade. Assim, quando a situação permite aproximação ao estímulo aversivo, caracterizando um conflito entre aproximação e evitação, os comportamentos observados (inibição comportamental e avaliação de risco) estariam relacionados à ansiedade. Por outro lado, quando a situação oferece somente as estratégias de defesa do tipo esquiva ativa e fuga, os comportamentos estariam relacionados com o medo.

Em suma, a principal função do sistema septo-hipocampal passou a ser a de detectar conflitos entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo. A primeira seria gerada no chamado “sistema cerebral de aproximação” (SCA), representado pelo sistema mesolímbico, que inclui estruturas organizadas hierarquicamente, como o núcleo acumbente, que é inervado principalmente pelo sistema dopaminérgico. A função desse sistema é incentivar a busca de fontes de satisfação de necessidades biológicas, como alimento, abrigo e sexo. Essa visão é consistente com o envolvimento do SCA em situações apetitivas como na facilitação de processos de recompensa, omissão de punição e uma série de respostas que incluem a aproximação a fontes de sinais seguros (IKEMOTO; PANKSEPP, 1999, apud MCNAUGHTON; CORR, 2004). A segunda seria gerada no sistema de fuga/luta/congelamento (SFLC), representado por uma hierarquia de estruturas (representadas nos extremos do eixo rostrocaudal pelo córtex prefrontal e matéria cinzenta periaquedutal, respectivamente) que mediarão respostas de afastamento, como esquiva e fuga, de fontes de perigo inato ou aprendido. Quando uma situação induz ambas as tendências apresentadas acima pelo SCA e SFLC, configura-se o conflito do tipo aproximação-evitação, que ativaria o SIC, gerando ansiedade. É importante ressaltar que além do sistema septo-hipocampal, a amígdala também faz parte do substrato neural do SIC. Enquanto o primeiro estaria mais relacionado com o aspecto cognitivo (hesitação e dúvida) a amígdala contribuiria com os aspectos afetivos e neurovegetativos da ansiedade, na qual o SIC aumentaria o alerta (GRAY; MCNAUGHTON, 2000). O papel do SIC pode então ser resumido como não só o de inibir o comportamento de evitação e aproximação, mas também de aumentar o alerta e a atenção, eliciando, por exemplo, comportamentos mediados pelo septo-hipocampo como a avaliação de risco, que compreende uma exploração vigorosa e extensiva para coletar informações necessárias para o equilíbrio do balanço a favor da aproximação (se

a ameaça for percebida em menor magnitude do que inicialmente) ou a evitação (se a ameaça for percebida em maior magnitude, comparada a percepção inicial).

1.4. DOR

1.4.1. CONCEITOS E NEUROFISIOLOGIA

A palavra dor é utilizada para descrever uma variedade muito ampla de sensações e experiências emocionais associadas, desde uma injúria sofrida em decorrência de um corte ou de uma pequena queimadura, até as sensações anormais das síndromes neuropáticas (CERVERÓ, 2000). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (1979), a dor pode ser definida como uma “experiência emocional e sensorial desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão” (BOND, 2006). Entretanto, a dor tem um significado individual e sofre influência de experiências anteriores que não envolvem somente a transdução de estímulos nocivos, mas também de seu processamento cognitivo e emocional (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; JULIUS; BASBAUM, 2001). Sendo assim, existem mecanismos modulatórios atuando em regiões como as terminações nervosas livres, o corno dorsal da medula espinal e em estruturas supraespinais (MILLAN, 1999).

Em face dessas evidências, a dor não pode ser entendida como um simples fenômeno sensitivo. Dessa forma, a dor tem sido considerada como consistindo de dois principais componentes: o perceptivo-discriminativo, que permite ao indivíduo reconhecer o estímulo como doloroso e localizá-lo numa determinada região do corpo, e o aversivo-cognitivo-motivacional, que compreende uma série de respostas defensivas que vão desde a retirada de um membro até respostas emocionais complexas como a luta e a fuga, visando a autopreservação imediata (BASBAUM; FIELDS, 1984).

Sucintamente, os mecanismos neurofisiológicos da dor incluem a ativação de receptores fisiológicos, denominados nociceptores, amplamente encontrados na pele, mucosas, membranas, tecidos conjuntivos de órgãos viscerais, ligamentos e cápsulas articulares (ALMEIDA; ROINZENBLATT; TUFIK, 2004). Os receptores correspondem a terminações nervosas livres e representam a parte mais distal de um neurônio aferente de primeira ordem (TILLMAN et al., 1995a; TILLMAN et al., 1995b;

SLUGG; MEYER; CAMPBELL, 2000). As fibras dos neurônios aferentes primários podem ser classificadas com base em seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução: fibras do tipo A δ , dentre as mielinizadas, a mais fina (2-6 μm de diâmetro) e rápidas condutoras de sinais nociceptivos (12-30 m/s) e fibras do tipo C, amielínicas, mais finas (0,4-1,2 μm de diâmetro) e de condução mais lenta (0,5-2,0 m/s). Enquanto a ativação do primeiro tipo de fibra está associada à sensação de dor descrita como cortante e bem localizada, a ativação de fibras do tipo C promove uma sensação de queimação e sem localização precisa (LE BARS et al., 2001).

Uma série de eventos influencia o processamento da dor. Dentre eles, a interação entre receptor e neurotransmissor nas sinapses presentes no corno dorsal da medula espinal tem recebido destaque. A conexão entre as fibras aferentes primárias e os neurônios de segunda ordem envolve a liberação de vários neurotransmissores, dentre eles, glutamato, substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) (BAUMANN; STRICKLAND, 2008). Após interações diretas ou indiretas com neurônios de projeção do corno dorsal da medula espinal, os axônios de neurônios de segunda ordem constituem fascículos que formam feixes ou vias que transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas encefálicas como matéria cinzenta periaquedutal (MCP), formação reticular, hipotálamo, tálamo e complexo amigdalóide (BROOKS; TRACEY, 2005; MILLAN, 1999). Dessa forma, após uma lesão, a dor é transmitida até o corno dorsal através das fibras aferentes primárias, de onde é conduzida até o encéfalo através de vias ascendentes (MELLO; DICKENSON, 2008).

As vias ascendentes, que apesar de complexas, podem ser resumidas em: trato espinotalâmico, trato espinomesencefálico, trato espinoparabraquial, trato espinohipotálamico e trato espinoreticular (para uma revisão ver MILLAN, 1999).

O trato espinotalâmico consiste na via ascendente nociceptiva mais proeminente na medula espinal, na qual estão compreendidos neurônios nociceptivos específicos e de faixa dinâmica ampla das lâminas I, V e VI do corno dorsal. Esses axônios projetam-se para o lado contralateral da medula espinal e ascendem pelo sistema ântero-lateral, até regiões talâmicas, de onde se projetam até o córtex onde ocorre a percepção nociceptiva. A estimulação elétrica do trato espinotalâmico resulta em sensação de dor, enquanto a lesão dessas fibras (processo conhecido como cordotomia ântero-lateral) resulta em marcante redução na sensibilidade à dor no lado oposto ao da lesão. O trato espinomesencefálico compreende axônios de neurônios originados nas lâminas I e V. As projeções percorrem o quadrante ântero-lateral da medula espinal e terminam na

formação reticular mesencefálica, matéria cinzenta periaquedutal (via trato espinianoanular) e camadas profundas do colículo superior (via trato espinotectal). O maior alvo do trato espinomesencefálico é o núcleo parabraquial (PB) da ponte, uma região que exerce um papel importante na integração das respostas autonômicas, cardiovasculares e motivacionais a dor.

O trato espinorreticular compreende neurônios que se originam nas lâminas VII e VIII, que ascendem no quadrante ântero-lateral da medula espinal e terminam em estações sinápticas de diversos núcleos da formação reticular da medula e ponte, hipotálamo e tálamo.

Estudos de marcação retrógrada demonstraram a existência de projeções da medula espinal para o hipotálamo (BURSTEIN et al, 1996). O trato espinohipotálamico é composto de fibras de neurônios que ascendem contralateralmente para inervar o tálamo e hipotálamo. No entanto, projeções colaterais são também enviadas para a região do quiasma óptico, na qual decussam e descendem para inervar o hipotálamo ipsilateralmente. Há também projeções para outras regiões prosencefálicas (ex. núcleo septal, pálido e núcleo acumbente), tálamo e regiões límbicas, como amígdala, septo e estriado (MILLAN, 1999 e CRAIG; DOSTROVSKY, 2001).

Enquanto mecanismos ascendentes processam a transmissão da dor para estruturas superiores do sistema nervoso central (SNC), vias inibitórias descendentes seguem o percurso oposto e levam a inibição da nocicepção em nível medular. O estudo dos mecanismos supramedulares e medulares envolvidos na inibição da dor tem sido de elevado interesse desde a descoberta de que a ativação de estruturas límbicas, como a MCP, leva a atenuação da nocicepção.

1.4.2. ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MEDO/ANSIEDADE

Um dos principais desafios na compreensão do fenômeno da antinocicepção induzida por estímulos aversivos envolve identificar os mecanismos e sistemas neurobiológicos periféricos e, sobretudo, centrais, envolvidos no seu processamento.

Evidências de que sistemas descendentes podem modular seletivamente a dor foram primeiramente reportadas por Reynolds (1969), através da descoberta da analgesia produzida por estimulação de estruturas encefálicas, que desencadeava supressão específica de comportamentos eliciados por estímulos nocivos. Assim como em roedores, esse tipo de antinocicepção em humanos pode ser produzido pela

estimulação elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal (MCP). Esse fato é consistente com a visão de que essas regiões, bem como suas funções são homólogas em uma variedade ampla de espécies. Descobertas subsequentes demonstraram que a MCP é parte de um circuito do sistema nervoso central que controla a transmissão nociceptiva em nível da medula espinhal. Os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula são seletivamente inibidos pela estimulação da MCP e lesões no funículo dorsolateral, que bloqueiam ambas as inibições dos neurônios do corno dorsal e das respostas reflexas diante de um estímulo nocivo (BANDLER; KEAY, 1996).

Apesar de a dor ser uma sensação importante para a manutenção da vida de muitos animais, quando esses são confrontados com ameaças ao seu bem-estar, à integridade física ou à sobrevivência, além de exibirem respostas comportamentais (fuga, luta, congelamento, vocalização), neurovegetativas (taquicardia, hipertensão, defecação) e neuroendócrinas (secreção de corticosterona), normalmente apresentam diminuição da sensibilidade dolorosa ou antinocicepção (MILLAN, 1999; KELLY, 1986; RODGERS, 1995). A antinocicepção apresenta claro valor adaptativo, pois permite ao animal exibir reações defensivas tais como congelamento, luta e fuga, mesmo que uma injúria tenha ocorrido, aumentando assim, suas chances de sobrevivência (BOLLES; FANSELOW, 1980). Assim, a antinocicepção é considerada como parte do repertório de reações de defesa, e, portanto, a investigação do comportamento defensivo em vários mamíferos (como os roedores) é de crucial importância para a compreensão dos mecanismos neurobiológicos subjacentes aos estados de medo/ansiedade e antinocicepção (GRAY; MACNAUGHTON, 2000; BLANCHARD et al., 2001; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002).

Em determinadas situações, os estados de medo e ansiedade podem também influenciar a magnitude da resposta do indivíduo aos estímulos nociceptivos, acarretando em hiper (MAIONE et al., 2006; CORNÉLIO et al., 2011) ou hiponocicepção (MENDEZ-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; 2009; CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009).

A inibição da resposta nociceptiva pode ser provocada por estímulos que predizem o perigo, tanto de natureza aprendida quanto inata. Por exemplo, Rodgers e Randall (1986) demonstraram a ocorrência de analgesia condicionada em camundongos colocados num ambiente onde haviam sido previamente atacados em interações intra-específicas. Por outro lado, a antinocicepção induzida por estímulos inatos de perigo pode ser evidenciada quando o animal é exposto a um predador (LESTER;

FANSELOW, 1985; KAVALIERS, 1988), a um novo ambiente (NETTO; SIEGFRIED; IZQUIERDO, 1987; TORRES et al., 2001), ou a uma situação de perigo potencial, como o labirinto em cruz elevado (LCE), que se baseia na aversão natural de roedores a espaços abertos (PELLOW et al., 1985).

1.5. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O LCE é derivado do labirinto em X elevado, originalmente proposto por Handley e Mithani (1984), tendo sido posteriormente validado por métodos farmacológicos, fisiológicos e comportamentais para o estudo de ansiedade em ratos (PELLOW et al., 1985) e para camundongos (LISTER, 1987; STEPHENS et al., 1986). Este modelo é frequentemente usado para avaliar a ansiedade bem como o potencial ansiolítico e ansiogênico de drogas e permite investigar a influência do medo sobre a nocicepção (CONCEIÇÃO et al., 1992; LEE; RODGERS, 1990; PELLOW et al., 1985; STEPHENS et al., 1986; TAUKULIS; GOGGIN, 1990; GOMES E NUNES-DE-SOUZA 2009; MENDES-GOMES E NUNES-DE-SOUZA 2009; MIGUEL E NUNES-DE-SOUZA 2008). Assim, Lee e Rodgers (1990) demonstraram que a exposição de camundongos ao LCE elicia reações comportamentais defensivas e produz antinocicepção avaliada pelo teste de retirada da cauda (*tail-flick test*), um teste que avalia o reflexo espinal.

Em experimentos realizados em nosso laboratório, camundongos expostos ao LCE padrão não exibem marcante redução da resposta nociceptiva, verificada pelo teste de formalina na pata, um teste de dor fásica utilizado com o propósito de estudar dor de natureza inflamatória. No entanto, quando confinados nos braços abertos do LCE padrão (LCEp) (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000) ou expostos a um LCE todo aberto (LCEa: com quatro braços abertos) (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; 2009) foi observada antinocicepção de elevada magnitude. Embora os braços abertos do LCE sejam a principal fonte de ameaça eliciadora de antinocicepção, o emprego do confinamento em cada compartimento do aparelho dificulta a avaliação concomitante de comportamentos tais como locomoção, exploração da extremidade dos braços, avaliação de risco (ex., esticamentos do corpo ou stretched attended postures - SAP) e mergulhos da cabeça em direção ao solo (head dipping - HD). No confinamento não existe a possibilidade de fuga do animal, o que pode desencadear a ativação de

mecanismos de defesa diferentes daqueles envolvidos na exploração total do LCE. Dessa forma, a exposição a um labirinto com todos os braços abertos - LCEa (condição aversiva) e a um labirinto com todos os braços fechados - LCEf (condição controle) permite um melhor controle da situação experimental.

1.6. MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (MCP)

As reações de defesa são orquestradas pelo sistema cerebral de defesa e processadas por regiões encefálicas tais como a amígdala, o hipotálamo e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP). A MCP vem ganhando destaque no estudo do processamento da informação dolorosa pelo fato de projetar sinapses excitatórias para o bulbo rostral ventromedial (RVM), que por sua vez manda projeções inibitórias para o corno dorsal da medula espinal, inibindo os feixes ascendentes que levam a informação da percepção dolorosa para estruturas supraespinhais, participando assim de maneira importante na neurofisiologia da dor (para uma revisão ver BASBAUM; FIELDS, 1984; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

1.6.1. Organização anatômica e funcional da MCP

A MCP é uma estrutura que circunda o aqueduto mesencefálico, sendo dividida anatômica e funcionalmente ao longo do eixo rostrocaudal em quatro colunas, denominadas de acordo com a posição em relação ao aqueduto, em dorsomedial (MCPdm), dorsolateral (MCPdl), lateral (MCPl) e ventrolateral (MCPvl) (CARRIVE, 1993; BANDLER E SHIPLEY, 1994). Tal condição sugere que essa estrutura esteja interligada a um grande número de circuitos neurais responsáveis pela modulação e coordenação de muitas funções fundamentais para a sobrevivência do organismo. De fato, a MCP está envolvida com a modulação de reações de defesa relacionadas ao medo e a ansiedade, processamento de informação dolorosa, controle motor e cardiovascular (para uma revisão ver BEHBEHANI, 1995).

Na presente dissertação, o foco principal foi o papel da porção dorsal da MCP (MCPd), que compreende as colunas dorsolateral e dorsomedial, na organização do comportamento defensivo e antinocicepção em camundongos. Nesse contexto, a estimulação química ou elétrica da MCP dorsolateral e lateral causa vigorosa atividade

somatomotora, alterações neurovegetativas, além de analgesia de curta duração mediada por mecanismos não opióides (BEHBEHANI, 1995; KEAY et al., 2001; MORGAN, 1991).

1.7. A NEUROTRANSMISSÃO VANILOIDE

Mediadores centrais com participação conhecida na neurobiologia das reações de defesa são cada vez mais estudados, refletindo-se num crescente número de publicações. No entanto, a descoberta de novas substâncias e receptores vem ganhando destaque nos últimos anos e tem sido alvo de esforços para a compreensão de suas participações em processos neurobiológicos. Nesse sentido, vale destacar os endocanabinoides e mais recentemente os vaniloides, que se mostraram intimamente relacionados entre si.

Os receptores vaniloides TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid*) pertencem a uma grande família de canais de cátions não seletivos (CATERINA et al., 1997). Eles podem ser ativados periféricamente pela elevação da temperatura, diminuição do pH, ou centralmente, por ligantes exógenos como a capsaicina, o ingrediente que confere à pimenta vermelha o sabor picante (SZALLASI; BLUMBERG, 1999; VAN DER STELT; DI MARZO, 2004). Existem também ligantes endógenos, por exemplo, a anadamida (AEA), que inicialmente fora denominada endocanabinoide, é capaz de ativar os receptores TRPV1. Sucintamente, enquanto a administração intra-MCPd de baixas doses de AEA estimula preferencialmente os receptores canabinoides CB1 (receptores metabotrópicos inibitórios), em altas doses, este endocanabinoide ativa receptores vaniloides TRPV1 (receptores ionotrópicos excitatórios) (MOREIRA; AGUIAR; GUIMARÃES, 2007). Os receptores TRPV1 são expressos em várias regiões encefálicas relacionadas à ansiedade e à dor, incluindo a MCP (MEZEY; TÓTH; CORTRIGHT et al., 2000; McGARAUGHTY; CHU; BITNER et al., 2003), aonde podem modular a liberação de glutamato (PALAZZO et al., 2002; XING E LI, 2007).

1.7.1. Vaniloides e a dor

O papel do receptor de TRPV1 na dor tem sido objeto de vários estudos (para revisão ver MAIONE; PALAZZO; DI MARZO et al., 2006), e seu papel fundamental

na nociceção e hiperalgesia foi confirmado em camundongos nocaute para receptores TRPV1 (CATERINA et al., 2000; DAVIS et al., 2000). A expressão de TRPV1 em estruturas supraespinais dos circuitos modulatórios de dor, como a MCP, bulbo ventromedial rostral (RVM), locus coeruleus (LC) e tálamo (MEZEY; TÓTH et al., 2000; CRISTINO; DI MARZO, et al., 2006; MAIONE et al., 2006), sugere a sua participação nas vias descendentes e ascendentes no processamento da dor.

Com efeito, os estudos iniciais realizados por Palazzo et al. (2002) sobre o papel putativo de receptores TRPV1 localizados no circuito inibitório descendente nociceptivo na MCP-RVM mostraram que microinjeções de capsaicina na MCPd aumentam a latência das respostas nociceptivas térmica em ratos, um efeito bloqueado por antagonistas de receptores NMDA e metabotrópicos do glutamato (mGlu) (PALAZZO et al., 2002). O efeito analgésico da capsaicina foi bloqueado com o pré-tratamento com o antagonista dos receptores TRPV1, capsazepina, que, na dose utilizada, não teve efeito por si só na latência da resposta nociceptiva. Curiosamente, ambos antagonistas dos receptores mGlu(1) e mGlu(5) bloquearam o efeito da capsaicina. Da mesma forma, o pré-tratamento com um antagonista do receptor NMDA e com um bloqueador de canal de sódio voltagem dependente, os quais inibem liberação de glutamato, também bloquearam completamente o efeito da capsaicina (PALAZZO et al., 2002).

Dados discrepantes foram relatados em um estudo posterior, realizado por McGaraughty et al. (2003), em que a capsaicina injetada na MCPdl provocou diminuição da latência do reflexo de retirada da cauda (teste de água quente) em animais acordados e estimulou atividade de células *ON* pró-nociceptivas no RVM de ratos anestesiados. Neste caso, um efeito analgésico da capsaicina foi observado apenas após o efeito inicial pró-nociceptivo em ratos, e foi atribuído a uma dessensibilização de receptores vaniloides.

Xing e Li (2007) relataram uma ação regulatória do receptor TRPV1 na ativação de sinapses glutamatérgica e GABAérgica na MCPdl. Ao aumentar a liberação de glutamato na MCP, a capsaicina ampliou a frequência de potenciais excitatórios dos neurônios da MCPdl. Estes dados sugerem um mecanismo pelo qual TRPV1 modula a atividade neuronal através de sinapses glutamatérgicas da MCPdl, uma vez que o efeito da capsaicina foi bloqueado por antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA de glutamato (XING; LI, 2007).

1.7.2. Vaniloides e a ansiedade/medo

Poucos estudos têm investigado o papel do TRPV1 no medo e ansiedade, sobretudo em camundongos. A administração sistêmica de capsazepina, um antagonista TRPV1, produziu efeitos ansiolíticos em ratos submetidos ao LCE (KASCKOW; MULCHAHEY; GERACIOTI JR, 2004).

Estudos demonstraram que camundongos nocaute para receptores TRPV1 apresentaram diminuição da ansiedade no LCE e no teste claro-escuro (MARSCH; FOELLER; RAMMES et al., 2007).

O fato de a anandamida (AEA) e o canabidiol (CBD) também se ligarem aos receptores TRPV1 (MOREIRA et al., 2009; VAN DER STELT; DI MARZO, 2004; MARINELLI; DI MARZO; FLORENZANO et al., 2007), poderia ajudar a explicar as curvas dose-resposta em forma de sino geralmente encontrada com esses compostos sobre os seus efeitos na ansiedade. Ainda, a capsazepina produziu efeitos ansiolíticos tanto no LCE quanto no teste de Vogel. Já a capsaicina mimetizou estes resultados, o que pode ser atribuído à sua capacidade de rapidamente dessensibilizar os canais (TERZIAN et al., 2009). Em conjunto, os resultados de Terzian et al. (2009) sugerem que, enquanto a estimulação de receptores CB1 parece inibir as respostas aversivas na MCPdl, a ativação dos receptores TRPV1 poderia facilitá-las. Assim, CB1 e TRPV1 podem ter funções opostas na modulação de comportamentos relacionados aos estados de ansiedade nessa região mesencefálica.

Como observado nos estudos anteriores, vários resultados na literatura acerca da participação dos vaniloides na nocicepção foram obtidos utilizando-se testes como o da retirada da pata e o da retirada da cauda (*tail flick*), caracterizando a importância dos receptores TRPV1 na modulação descendente da dor. No entanto, até o momento nenhum estudo havia sido realizado com o intuito de investigar o papel desse receptor na modulação descendente da nocicepção pela exposição a situações ameaçadoras. Nesse mesmo sentido, existem poucos estudos mostrando o papel dos compostos vaniloides na modulação de respostas de medo, sobretudo em camundongos. Dessa maneira, o presente estudo teve a finalidade de colaborar com a compreensão do papel dos mecanismos vaniloides da MCPd na neurobiologia do medo/ansiedade, bem como da dor, através da injeção central intra-MCPd de agonista e/ou antagonista de receptores TRPV1 em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

- O propósito do presente estudo foi o de investigar a participação dos receptores vaniloides (TRPV1) da MCPd na modulação de reações de defesa (ansiedade/medo) e também na antinocicepção induzida pelo medo em camundongos.

2.2. Objetivos específicos:

- Investigar os efeitos de injeções intra-MCPd de capsaicina e capsazepina, agonista e antagonista de receptores TRPV1, respectivamente, sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE (Experimentos I e II);
- Demonstrar a especificidade dos receptores TRPV1 na modulação do medo/ansiedade, através do pré-tratamento intra-MCPd com capsazepina seguida pela capsaicina em camundongos expostos ao LCE (Experimento III);
- Investigar os efeitos de injeções intra-MCPd de capsaicina e capsazepina sobre o comportamento de camundongos submetidos ao teste da formalina e expostos a um ambiente neutro (Experimentos IV e V);
- Demonstrar a especificidade dos receptores TRPV1 na modulação da dor, através do pré-tratamento intra-MCPd com capsazepina seguida pela capsaicina em camundongos submetidos ao teste da formalina e expostos a um ambiente neutro (Experimento VI);
- Investigar os efeitos da capsazepina intra-MCPd em camundongos submetidos ao teste de formalina na antinocicepção induzida pela exposição ao LCE aberto (Experimento VII).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Sujeitos.

Camundongos Suíços albinos machos, pesando entre 23-33g. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07h00min) e tiveram livre acesso ao alimento e a água, exceto durante os curtos períodos de teste no LCE. Os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética local (CEUA / FCFar, Universidade Estadual Paulista, resolução 14/2011).

3.2. Fármacos.

Foram utilizados o agonista de receptores TRPV1 capsaicina (Tocris Bioscience) nas doses de 0,01, 0,1 ou 1 nmol, e o seu antagonista, capsazepina (Tocris Bioscience), nas doses de 10, 30 ou 60 nmol. O volume final da microinjeção foi de 0,2 μL . As drogas, devido à sua baixa hidrossolubilidade, foram diluídas em 100% de DMSO (dimetilsulfóxido), que foi utilizado como veículo.

3.3. Aparatos.

Foram utilizados o Labirinto em Cruz Elevado padrão (LCEp), uma caixa de vidro (21 x 30 x 25 cm) e os LCE aberto e fechado (LCEa e LCEf: aparatos derivados do LCEp).

O LCEp é similar àquele descrito por Lister (1987). O aparato é feito de madeira e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm), unidos ortogonalmente a dois braços fechados com paredes de vidro (30 x 5 x 15 cm), elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira.

O LCEa possui as mesmas dimensões que o LCEp, exceto pela presença dos quatro braços abertos, a fim de criar um ambiente aversivo ao animal. Como situação controle, foi utilizado o LCE fechado (LCEf), que possui as mesmas dimensões que o LCEp, exceto com os quatro braços fechados.

3.4. Análise comportamental.

Todos os experimentos foram filmados através de um aparato filmadora/DVD/TV integrados. Os comportamentos dos experimentos I, II e III (ver a seguir) foram avaliados pela análise dos DVDs, por um observador treinado, usando o programa X-plorat 3.0 (desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Silvo Morato, FFCLRP-

USP). Os comportamentos analisados no LCEp envolveram os parâmetros convencionais: frequência 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) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Esses dados foram usados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas: $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$; Tempo: $[\text{tempo no compartimento}/300] \times 100$). Além das medidas espaço-temporais, foram também registradas as medidas complementares, como frequências de comportamentos de avaliação de risco [mergulhar (movimento exploratório da cabeça ultrapassando o assoalho do braço aberto do LCE - do inglês Head-Dipping) e esticar (postura exploratória na qual o animal estende o corpo, retraindo-o em seguida para voltar à posição original - do inglês Stretched Attend Postures)] e também levantamentos (elevação do corpo apoiando-se nas patas traseiras). Os comportamentos de avaliação de risco foram analisados tanto em compartimentos protegidos (Mergulhar protegido - MP/ Esticar protegido - EP), que compreendem os braços fechados e a plataforma central do LCE, quanto em espaços desprotegidos (Mergulhar - M/ Esticar - E), que compreendem os braços abertos do LCE. O parâmetro levantamento (L) só pode ser realizado em espaço que tenha paredes para o animal se apoiar (RODGERS; JOHNSON 1995; ESPEJO, 1997).

Nos experimentos IV, V, VI e VII (ver a seguir), envolvendo a resposta nociceptiva em camundongos expostos a situação de medo (LCEa), os comportamentos foram avaliados pela análise dos DVDs, por um observador treinado, usando um cronômetro. Os animais expostos tanto a caixa de vidro quanto ao LCEa ou LCEf tiveram o registro da nocicepção através da medida do tempo de lambida na pata (vide item 3.6.).

3.5. Cirurgia e administração de fármacos.

Os animais receberam implante unilateral de cânulas-guia (26-gauge) de 7 mm de comprimento, após anestesia com cetamina + xilazina (100 mg/Kg + 10 mg/Kg). As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico, através das coordenadas estereotáticas definidas pelo atlas de Franklin e Paxinos (1997). O implante das cânulas-guia na MCPd foi baseada nas seguintes coordenadas estereotáticas: 4,1 mm posterior ao bregma, 1,4 mm lateral à linha média, 2,3 mm ventral a superfície craniana, num ângulo de 26°. A extremidade da cânula-guia foi

posicionada 1,0 mm dorsal à estrutura alvo (MCPd). Para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação, foi inserido um estilete (mandril) na cânula-guia. Ao final da cirurgia os animais receberam 0,1 mL de pentabiótico (Pentabiótico Veterinário – Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) pela via intramuscular na dose de 56,7 mg/kg. A analgesia pós-operatória foi provida pelo acréscimo de paracetamol (200 mg/mL) à água, durante 48h, numa razão de 0,2 mL de paracetamol: 250 mL de água (concentração final = 0,16 mg/mL) (MESSIER; ÉMOND; ETHIER, 1999).

A injeção intra-MCPd das soluções foi realizada pela introdução de uma agulha de injeção (33-gauge) de 8 mm de comprimento dentro de cada cânula-guia. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10) a uma microseringa de Hamilton. As soluções foram injetadas com auxílio de uma bomba de infusão (BI 2000, INSIGHT Equipamentos), a qual foi programada para injetar as soluções numa razão de 0,2 μ L/45 segundos. O volume máximo de cada microinfusão foi de 0,2 μ L. O procedimento de microinjeção consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, infusão da solução, permanência da agulha de injeção por 60 segundos após o término das injeções e inserção do mandril, enquanto o animal foi contido gentilmente pelo experimentador com o uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno confirmou o fluxo da solução.

3.6. Teste da formalina na pata.

A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva bifásica (DUBUISSON; DENNIS, 1977). A primeira fase (fásica) é observada nos primeiros 5 minutos, enquanto a segunda fase (tônica) inicia-se depois de 25 minutos da injeção de formalina e dura por volta de 30-40 minutos. Essas duas fases envolvem diferentes mecanismos de nociceção. A primeira fase é ocasionada predominantemente pela ativação de fibras C, enquanto a segunda fase parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico injuriado, com mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinal. Essas mudanças funcionais, análogas ao mecanismo de potencialização a longo prazo, devem-se, provavelmente, à atividade neural contínua produzida durante a primeira fase, pois sua atenuação, quando por exemplo o animal é exposto ao estresse, resulta em hipoalgesia na fase tônica (VACCARINO; MAREK; LIEBESKIND, 1992).

3.7.Procedimentos.

Todos os experimentos foram realizados 5 dias após a cirurgia estereotáxia, e os animais foram levados à sala experimental 1 hora antes do início do teste, para habituação. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala com baixa iluminação (1 x 60 W).

Experimento I: Microinjeção do agonista capsaicina intra-MCPd.

Nessa etapa, os animais, receberam a microinjeção intra-MCPd de capsaicina (0, 0,01, 0,1 ou 1 nmol) e, após 10 minutos, foram expostos ao LCEp para registro das medidas espaço-temporais e complementares (vide item “análise comportamental” descrito acima), durante 5 minutos.

Experimento II: Microinjeção do antagonista capsazepina intra-MCPd.

Nessa etapa, os animais, receberam a microinjeção intra-MCPd de capsazepina (0, 10, 30 ou 60 nmol) e, após 10 minutos, foram expostos ao LCEp para registro das medidas espaço-temporais e complementares durante 5 minutos.

Experimento III: Avaliação dos efeitos da injeção intra-MCPd de capsazepina (30 nmol) sobre os efeitos da injeção local de capsaicina (1 nmol).

Nessa etapa, os animais, receberam a microinjeção intra-MCPd de capsazepina (30 nmol) e, após 10 minutos, de capsaicina (1 nmol). Após 10 minutos, foram expostos ao LCEp para registro das medidas espaço-temporais e complementares durante 5 minutos.

Experimento IV: Microinjeção do agonista capsaicina intra-MCPd.

Nessa etapa, os animais, receberam a injeção de formalina (50µL) e 15 minutos em seguida foram submetidos à microinjeção intra-MCPd de capsaicina (0, 0,01, 0,1 ou 1 nmol). Após 10 minutos do tratamento, durante a fase tônica da formalina, foram expostos a uma caixa de vidro para registro do tempo de lambidas por 10 minutos (Figura 1).

Experimento V: Microinjeção do antagonista capsazepina intra-MCPd.

Nessa etapa, os animais, receberam a injeção de formalina e 15 minutos em seguida foram submetidos à microinjeção intra-MCPd de capsazepina (0, 10, 30 ou 60 nmol). Após 10 minutos do tratamento, durante a fase tônica da formalina, foram expostos a uma caixa de vidro para registro do tempo de lambidas por 10 minutos (Figura 1).

Experimento VI: Avaliação dos efeitos da injeção intra-MCPd de capsazepina (30 nmol) sobre os efeitos da injeção local de capsaicina (1 nmol).

Nessa etapa, os animais, receberam a injeção de formalina, e imediatamente após a fase fásica foram submetidos ao pré-tratamento de veículo ou capsazepina (30 nmol). Após 15 minutos do início do teste, os animais foram submetidos ao tratamento com capsaicina (1 nmol) ou veículo, e após 10 minutos, durante a fase tônica da formalina, foram expostos a uma caixa de vidro para registro do tempo de lambidas por 10 minutos (Figura 1).

Experimento VII: Avaliação dos efeitos da injeção intra-MCPd de capsazepina (30 nmol) na antinocicepção induzida pelo ambiente aversivo (LCEa).

Nessa etapa, os animais, receberam novamente a injeção de formalina e 15 minutos em seguida foram submetidos à microinjeção intra-MCPd de capsazepina (30 nmol) ou veículo. Passados mais 10 minutos os animais foram expostos ao LCE aberto ou fechado para o registro do tempo de lambidas por 10 minutos (Figura 1).

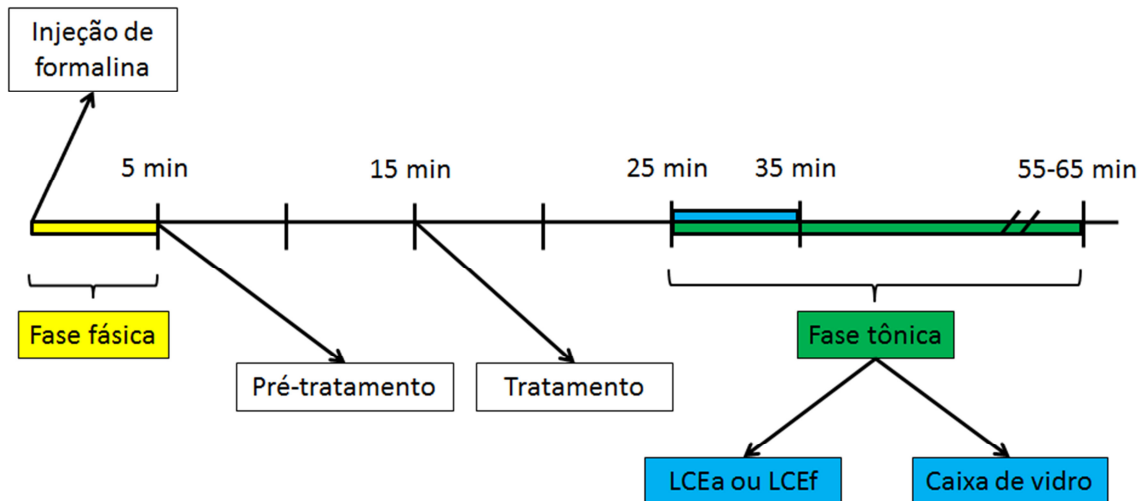


Figura 1: Desenho esquemático mostrando as fases do teste da formalina e os tempos de microinjeção no pré-tratamento e tratamento.

3.8. Histologia.

Após o término dos experimentos, todos os animais receberam injeção de uma solução de 1% de azul de Evans na MCPd, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de fármacos (item 3.5.). Em seguida, os animais sofreram eutanásia em uma

câmara de CO₂, foram decapitados e tiveram seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente sofrerem secções coronais ao longo do trajeto da cânula com o uso de um criostato (Leica CM 1850). As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DMLB) e a visualização da dispersão do azul de Evans foi considerada indicativa do local da injeção.

3.9. Estatística.

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de Levene. Nos casos em que se caracterizaram a heterogeneidade das variâncias, os resultados foram convertidos em Log de base 10. Posteriormente, os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA unifatorial nos experimentos I, II, IV e V (fator: tratamento) e bifatorial nos experimentos III, VI e VII (Exp.III e VI – fator 1: pré-tratamento / fator 2: tratamento; Exp.VII – fator 1: tratamento / fator 2: LCE). Nos casos de valores significantes de *P*, foram realizadas comparações post-hoc múltiplas de Duncan. Valores de *P* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1.1. Experimento I: Efeito ansiogênico da capsaicina intra-MCPd em camundongos expostos ao LCEp.

Histologia

A Figura 2 mostra (A) uma representação esquemática de um encéfalo de camundongo fundamentado no atlas de Franklin e Paxinos (2007), indicando os sítios de infusão de drogas na MCPd, e (B) uma seção coronal da região mesencefálica de um sujeito representativo, mostrando um sítio de injeção na MCPd de um camundongo.

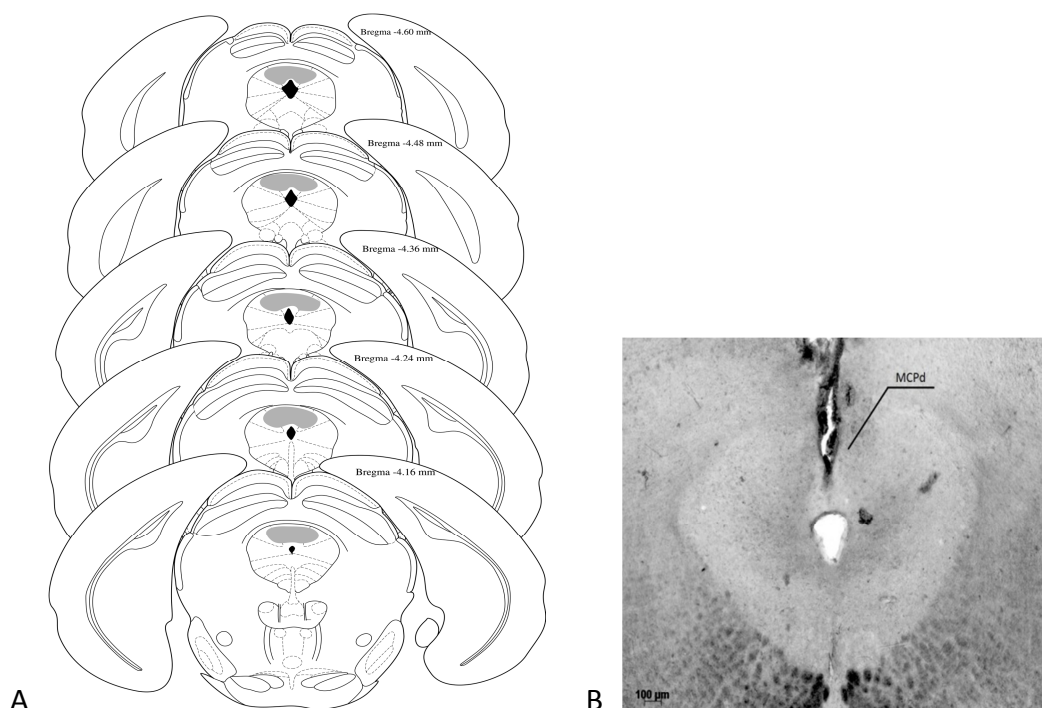


Figura 2: (A) representação esquemática de sítios de microinfusão (área cinza) na MCPd de camundongos. (B) fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando um sítio de injeção na MCPd de um camundongo. As secções ocorreram a 4,1 mm do bregma.

A Figura 3 mostra os efeitos da microinjeção intra-MCPd de capsaicina (0,01; 0,1 ou 1 nmol) ou veículo sobre os índices de ansiedade e locomoção dos camundongos expostos ao LCE. A ANOVA unifatorial revelou significância para o fator tratamento tanto para porcentagem de entradas como para porcentagem de tempo nos braços abertos (%EA: $F_{4,35}=4,81$; %TA: $F_{4,35}=6,01$; $p<0,05$). Não houve significância para o índice de locomoção (entradas nos braços fechados - BF: $F_{4,35}=1,67$; $p>0,05$). A análise post hoc confirmou redução na exploração dos braços abertos do LCE (%EA e %TA) do grupo que recebeu capsaicina intra-MCPd nas doses de 0,1 e 1 nmol em comparação

ao grupo veículo ($p < 0,05$). Os animais que receberam a dose ativa de capsaicina e tiveram a histologia negativa (fora da MCPd) foram reunidos no grupo “FORA”. Esse grupo não foi diferente em comparação ao grupo veículo em nenhum parâmetro registrado.

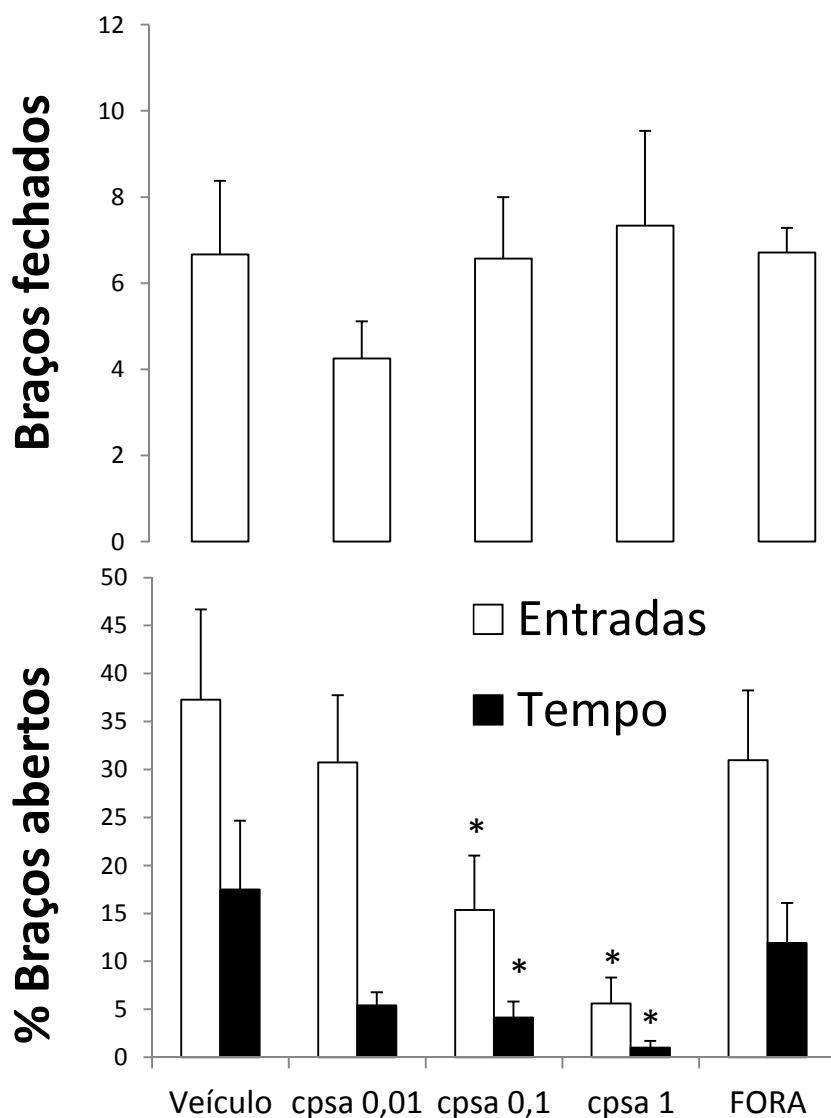


Figura 3: Efeitos da microinjeção intra-MCPd de capsaicina ou veículo sobre os índices de locomoção e ansiedade registrados em camundongos expostos ao LCE. N=7-9. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. Animais que receberam doses ativas de capsaicina (0,1 e 1 nmol) foram analisados juntos em um grupo “FORA”.

A Figura 4 mostra as medidas complementares exibidas pelos camundongos submetidos à microinjeção de capsaicina. A ANOVA unifatorial revelou significância para o fator tratamento nos parâmetros esticar ($F_{4,35}=3,05$; $p < 0,05$) e mergulhar ($F_{4,35}=3,35$; $p < 0,05$). A análise post hoc confirmou diferença significativa nos grupos

tratados com capsaicina em relação ao grupo veículo para o parâmetro esticar e dos grupos tratados com as maiores doses de capsaicina (0,1 e 1 nmol) em relação ao grupo veículo para o parâmetro mergulhar. A análise de variância para esticar protegido indicou apenas uma tendência, sem, contudo, alcançar valores significativos de p ($p=0,1$).

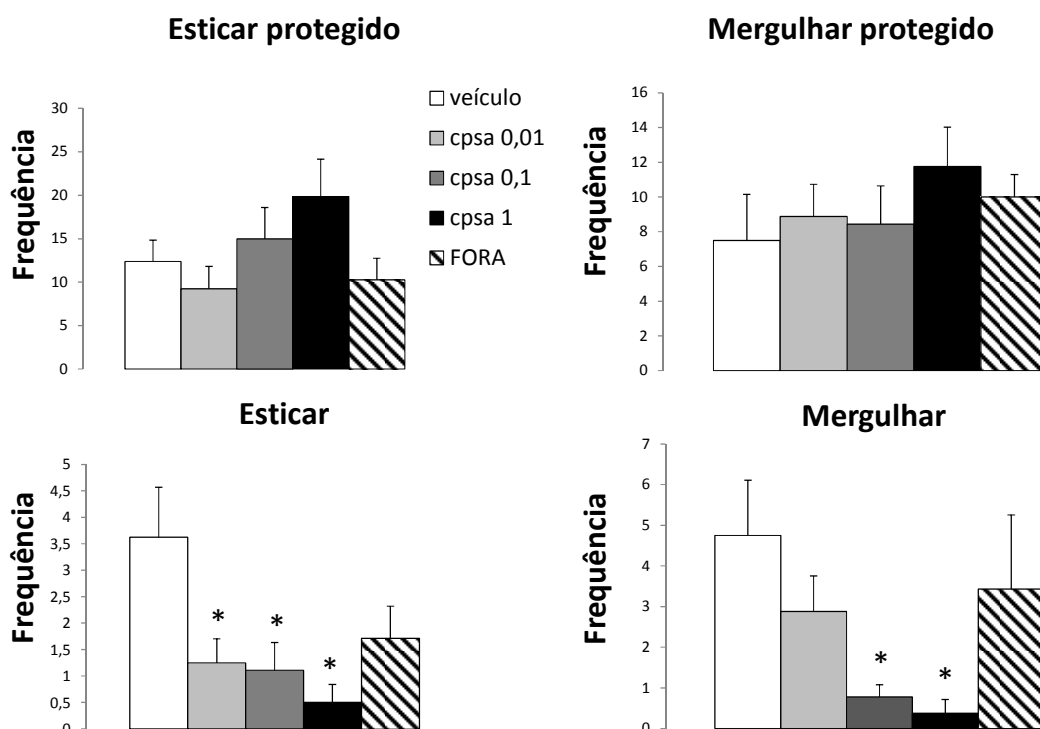


Figura 4: Efeitos da microinjeção intra-MCPd de capsaicina ou veículo nas medidas complementares exibidas pelos camundongos expostos ao LCE. $N=7-9$. $*p<0,05$ comparado ao grupo veículo. Animais que receberão doses ativas de capsaicina (0,1 e 1 nmol) foram analisados juntos em um grupo “FORA”.

4.1.2. Experimento II: Ausência de efeitos da capsazepina intra-MCPd sobre o comportamento de camundongos expostos ao LCE padrão (LCEp).

A Figura 5 mostra os efeitos da microinjeção intra-MCPd de capsazepina (10, 30 ou 60 nmol) ou veículo sobre os índices de locomoção e ansiedade de camundongos expostos ao LCE. A ANOVA unifatorial não revelou quaisquer significâncias para os índices de ansiedade analisados (maior valor de $F_{3,23} \leq 0,85$; $p > 0,05$), bem como para locomoção (entradas BF: $F_{3,23} = 0,43$; $p > 0,05$).

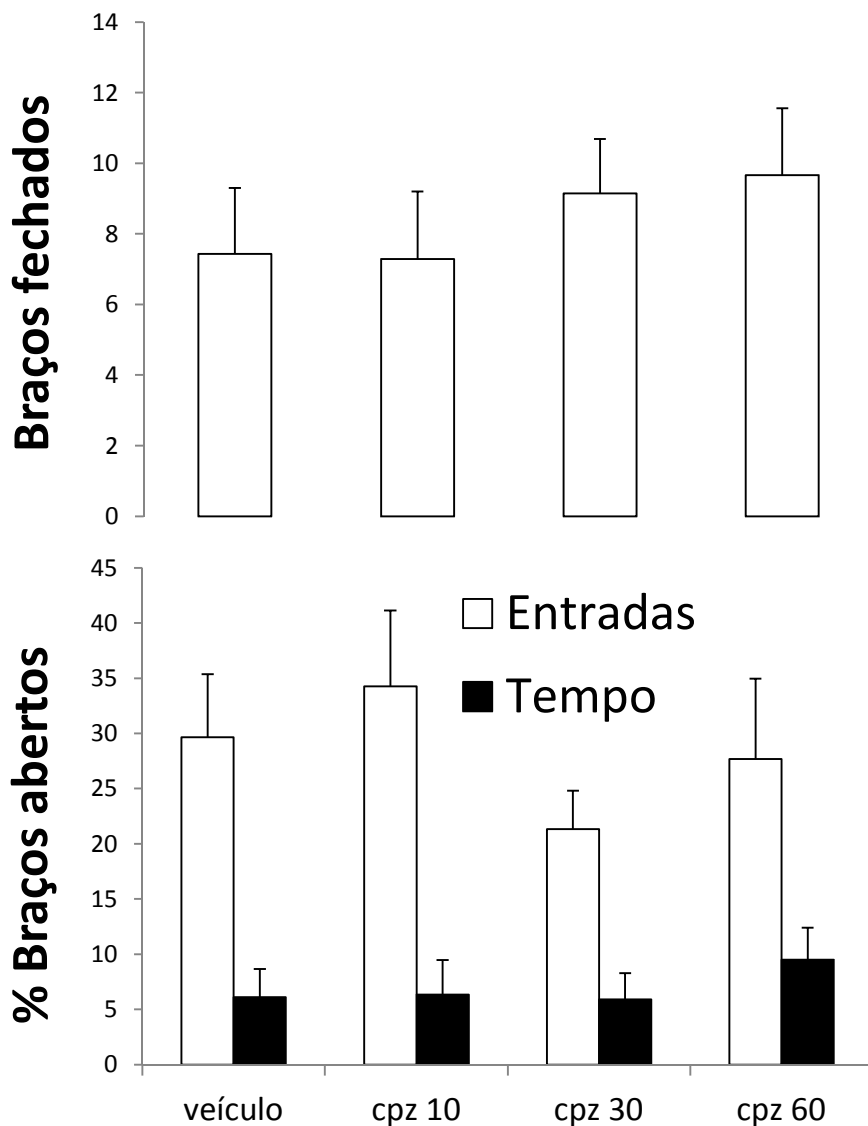


Figura 5: Efeitos da microinjeção intra-MCPd de capsazepina ou veículo sobre os índices de locomoção e ansiedade registrados em camundongos expostos ao LCE. N=6-7.

A Tabela 1 mostra as medidas complementares exibidas pelos camundongos submetidos à microinjeção de capsazepina. A ANOVA unifatorial não revelou quaisquer significâncias para os parâmetros analisados (maior valor de $F_{3,23} \leq 1,10$; $p > 0,05$).

Tabela 1: Ausência de efeitos (media \pm EPM) da capsazepina (intra-MCPd 10; 30 ou 60 nmol/0,2 μ L) no comportamento de camundongos expostos ao LCE. n=6-7.

Comportamento	Veículo	Capsazepina (nmol/0,2 μ L)		
		10	30	60
Esticar protegido	12 \pm 2,58	23 \pm 6,69	13,29 \pm 2,94	10,67 \pm 2,37
Esticar	2 \pm 0,65	2,57 \pm 1,41	2,71 \pm 1,39	2 \pm 0,73
Mergulhar protegido	8,28 \pm 1,64	11,57 \pm 2,81	10,71 \pm 2,77	10,67 \pm 1,49
Mergulhar	3,28 \pm 1,06	2,42 \pm 1,25	1,57 \pm 0,42	3,83 \pm 1,44

4.1.3. Experimento III: Bloqueio dos efeitos ansiogênicos da capsaicina (1 nmol) pela capsazepina (30 nmol) intra-MCPd.

A Figura 6 mostra os efeitos nos índices de ansiedade e locomoção de camundongos que foram submetidos à microinjeção intra-MCPd prévia de capsazepina (30 nmol ou veículo) seguindo pela capsaicina (veículo ou 1 nmol) e expostos ao LCE. A escolha das doses empregadas nessa etapa foi baseada nos resultados das curvas anteriores (Figuras 2 e 4). Dessa forma, foi utilizada a dose de 1 nmol do agonista capsaicina; a dose do antagonista capsazepina, desprovida de efeito *per se*, foi de 30 nmol. A ANOVA bifatorial para %EA revelou significância para o fator tratamento e a interação entre fatores [tratamento: $F_{1,25}=6,55$; interação $F_{1,25}=13,42$; $p<0,05$], bem como ausência de significância para o fator pré-tratamento ($F_{1,25}=4,18$; $p>0,05$). A análise post hoc confirmou que enquanto os grupos cpz-veic e veic-cpsa reproduziram os resultados obtidos nas Figuras 2 e 4 (efeitos ansiogênico e ausência de efeito, respectivamente, em comparação ao veículo, $p<0,05$), o grupo cpz-cpsa teve o efeito ansiogênico da capsaicina bloqueado pela injeção prévia do antagonista capsazepina ($p<0,05$). A ANOVA bifatorial para %TA revelou significância para o pré-tratamento e interação entre os fatores [pré-tratamento: $F_{1,25}=8,05$; interação $F_{1,25}=7,72$; $p<0,05$] e ausência de efeito para o fator tratamento ($F_{1,25}=3,09$, $p>0,05$). O teste post hoc revelou

os mesmo resultados encontrados na %EA. A ANOVA bifatorial para BF revelou significância para a interação entre os fatores ($F_{1,25}=7,04$; $p<0,05$) e ausência de efeitos para pré-tratamento e tratamento (maior valor de $F_{1,25}=0,87$; $p>0,05$). A análise post hoc apontou diferenças entre o grupo tratado com veic-cpsa em relação ao grupo veic-veic.

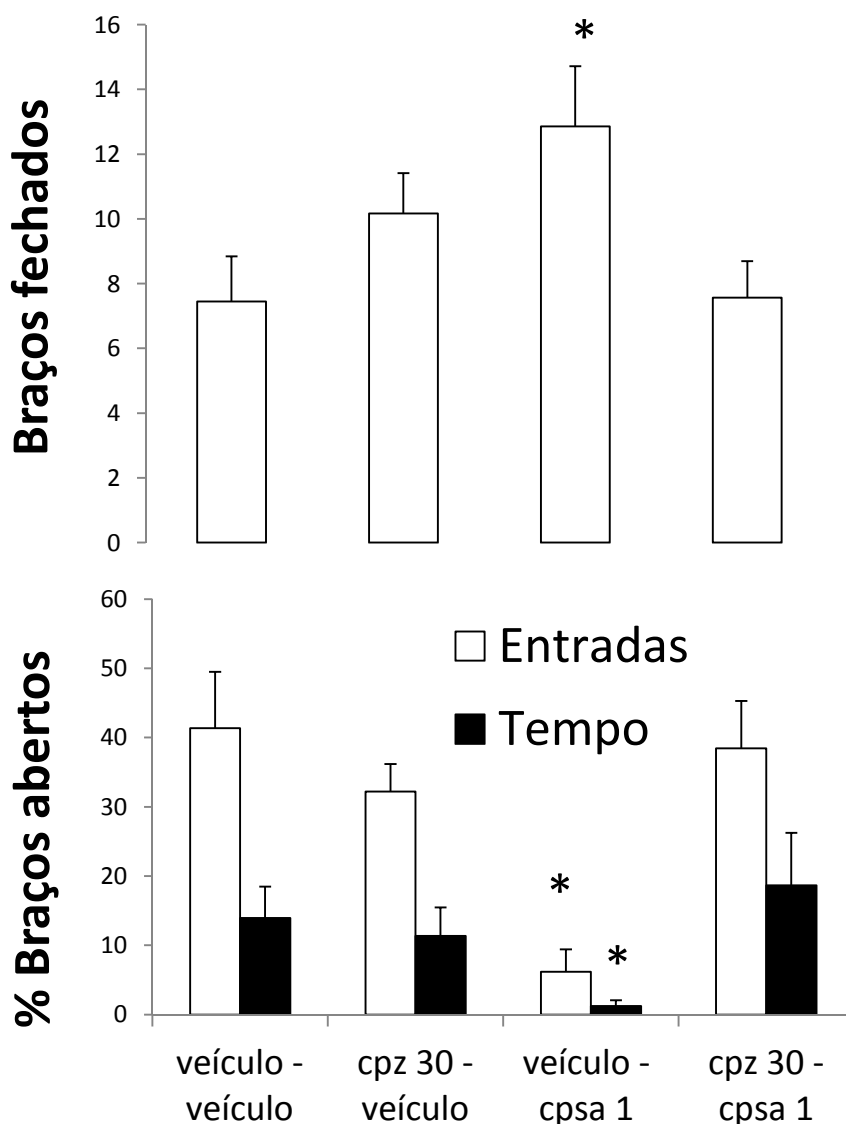


Figura 6: Efeitos das microinjeções de capsaicina e/ou capsazepina intra-MCPd sobre os índices de locomoção e ansiedade registrados em camundongos expostos ao LCE. N=6-9. * $p<0,05$ comparado aos grupos veículo-veículo e cpz 30-cpsa 1.

A Figura 7 mostra as medidas complementares exibidas pelos camundongos submetidos à microinjeções prévias de capsazepina (30 nmol e veículo) seguida pela capsaicina (veículo ou 1 nmol). A ANOVA bifatorial não revelou efeitos significantes para esticar, esticar protegido e mergulhar protegido (maior valor de $F_{1,25}=2,96$,

$p > 0,05$). Entretanto, a mesma análise mostrou interação entre os fatores para mergulhar ($F_{1,25}=12,34$, $p < 0,05$) e um efeito não significativo pra o pré-tratamento e tratamento ($F_{1,25}=1,72$ and $F_{1,25}=1,90$, respectivamente; $p > 0,05$). O teste post hoc confirmou uma diminuição na frequência de mergulhar para o grupo veículo-capsaicina versus veículo-veículo ($p < 0,05$). De maneira interessante, o pré-tratamento com capsazepina (30 nmol) bloqueou completamente tal efeito ($p < 0,05$ comparado com veículo-capsaicina).

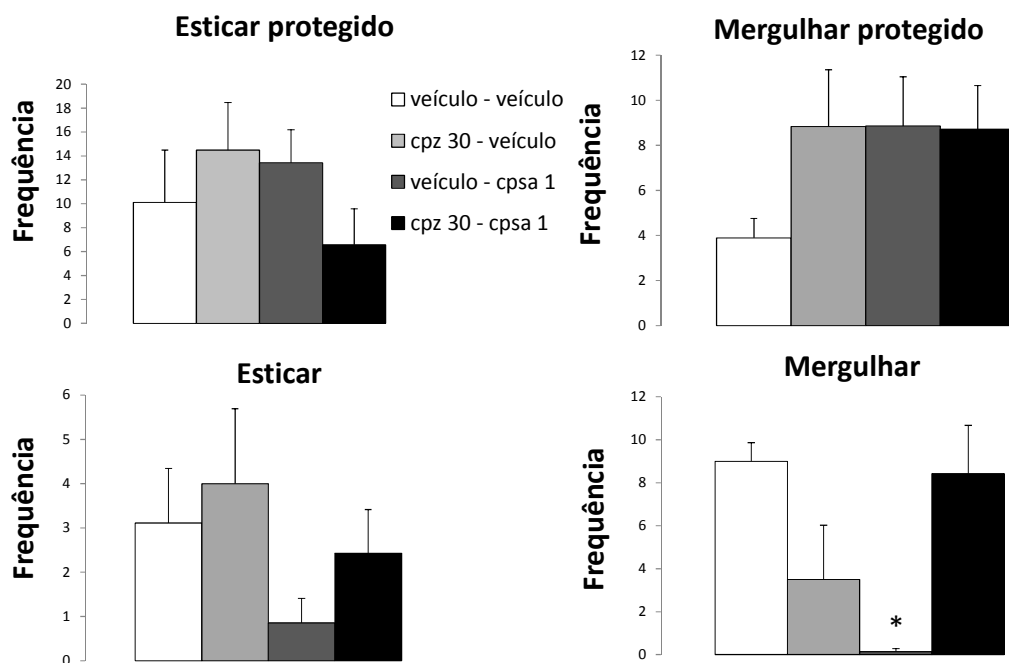


Figura 7: Efeitos das microinjeções combinadas intra-MCPd nas medidas complementares exibidas pelos camundongos expostos ao LCE. N=6-9. * $p < 0,05$ comparado aos grupos veículo-veículo e cpz 30-cpsa 1.

4.1.4. Experimento IV: Efeito antinociceptivo da capsaicina intra-MCPd.

A Figura 8 mostra os efeitos da microinjeção de capsaicina (0,01; 0,1 ou 1 nmol) ou veículo no tempo de lambidas na pata de camundongos submetidos ao teste da formalina. A ANOVA unifatorial mostrou significância para o fator tratamento no tempo de lambida ($F_{3,14}=10,31$; $p < 0,05$). A análise post hoc confirmou uma diferença entre o grupo tratado com capsaicina na dose de 1 nmol em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).

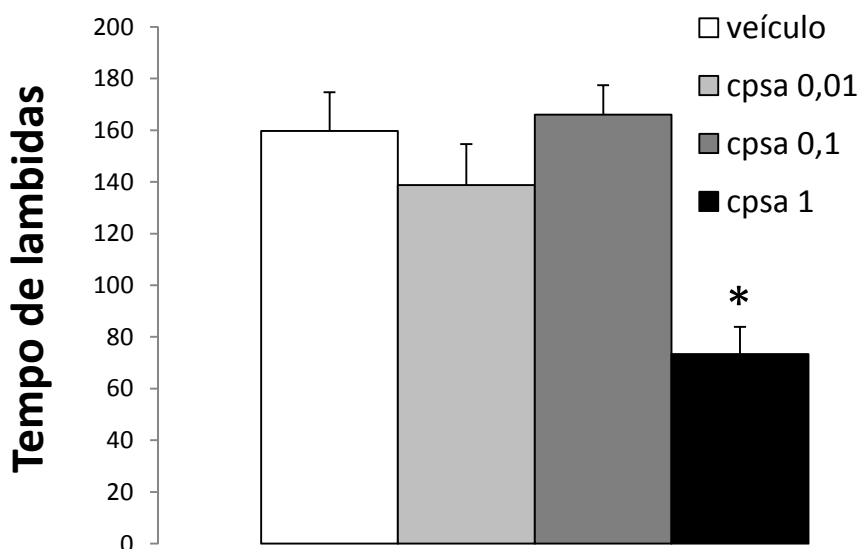


Figura 8: Efeitos da microinjeção intra-MCPd de capsaicina ou veículo no tempo de lambidas nas patas registrados em camundongos submetidos ao teste da formalina. N=4-5. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

4.1.5. Experimento V: Efeito antinociceptivo da capsazepina intra-MCPd.

A Figura 9 mostra os efeitos da microinjeção de capsazepina (10, 30 ou 60 nmol) ou veículo no tempo de lambidas na pata de camundongos submetidos ao teste da formalina. A ANOVA unifatorial mostrou significância para o fator tratamento no tempo de lambida ($F_{3,16}=4,34$; $p < 0,05$). O teste post hoc apontou diferenças entre o grupo tratado com capsazepina na dose de 60 nmol em relação aos outros grupos ($p < 0,05$).

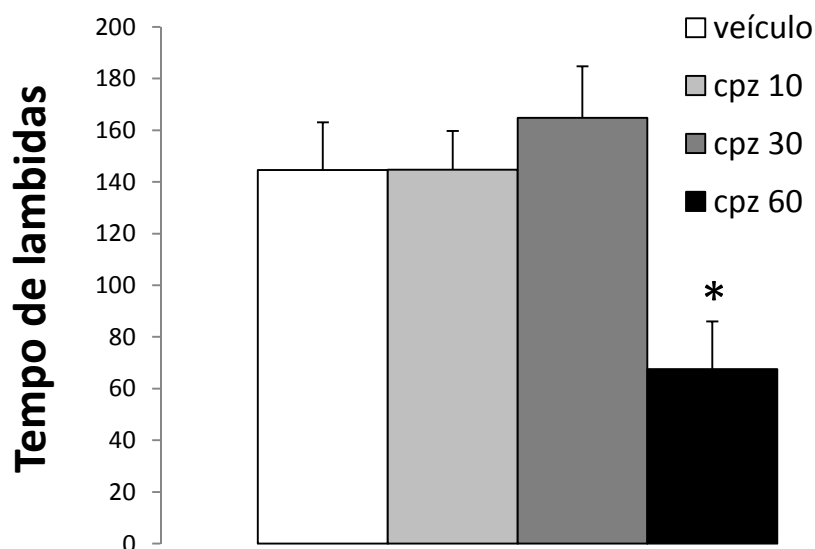


Figura 9: Efeitos da microinjeção intra-MCPd de capsazepina ou veículo no tempo de lambidas nas patas registrados em camundongos submetidos ao teste da formalina. N=4-7. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

4.1.6. Experimento VI: Bloqueio do efeito antinociceptivo da capsaicina (1 nmol) pela capsazepina (30 nmol) injetadas na MCPd.

A Figura 10 resume os efeitos da microinjeção prévia intra-MCPd de capsazepina (veículo ou 30 nmol) seguida de capsaicina (veículo ou 1 nmol) no tempo de lambidas na pata de camundongos submetidos ao teste da formalina e expostos a uma caixa de vidro. A ANOVA bifatorial revelou significância para o fator 1 – pré-tratamento ($F_{1,16}=25,19$; $p < 0,05$), para o fator 2 – tratamento ($F_{1,16}=12,13$; $p < 0,05$) e também para a interação entre os fatores ($F_{1,16}=8,78$; $p < 0,05$). O teste post hoc confirmou que os grupos capsazepina-veículo e veículo-capsaicina reproduziram os resultados das curvas dose resposta, ausência de efeito e efeito antinociceptivo comparado com o grupo controle, respectivamente, ($p < 0,05$). Além disso, o efeito antinociceptivo da capsaicina foi bloqueado pela injeção prévia de capsazepina numa dose desprovida de efeito *per se* ($p < 0,05$).

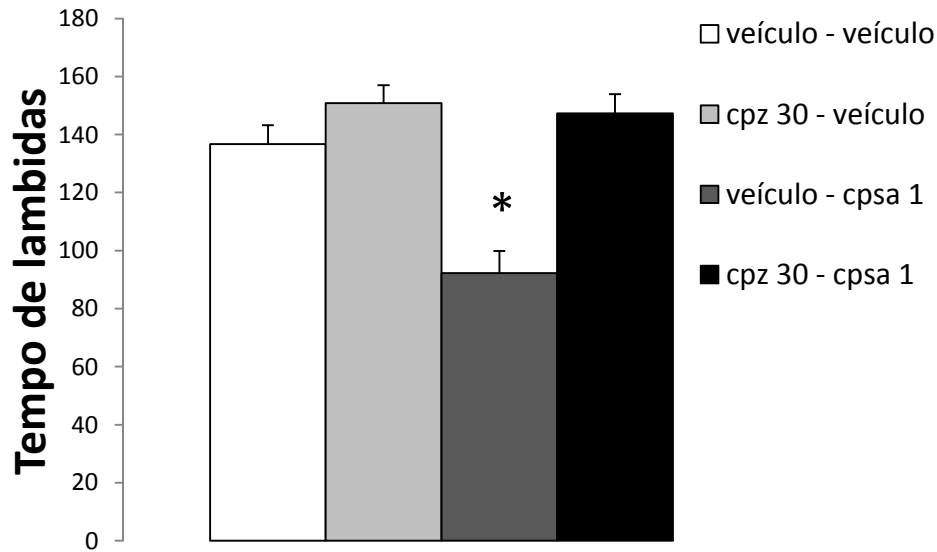


Figura 10: Efeitos da microinjeção prévia intra-MCPd de capsazepina (veículo ou 30 nmol) seguida de capsaicina (veículo ou 1 nmol) no tempo de lambidas na pata registrado em camundongos submetidos ao teste da formalina. N=4-6. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

4.1.7. Experimento VII: Atenuação da antinociceção induzida pelo ambiente aversivo (LCEa) pela injeção prévia de capsazepina (30 nmol) intra-MCPd.

A Figura 11 representa os efeitos da capsazepina 30 nmol ou veículo na antinociceção eliciada pela exposição ao LCE aberto. A ANOVA bifatorial revelou significância para o fator 1 – tratamento ($F_{1,13}=296,19$; $p < 0,001$), para o fator 2 – labirinto ($F_{1,13}=1359,34$; $p < 0,001$), bem como para a interação entre os fatores ($F_{1,13}=325,03$; $p < 0,001$). O teste post hoc de Duncan revelou diferenças no tempo de lambida entre os grupos expostos ao LCEa vs. LCEf ($p < 0,05$). Além disso, o grupo tratado com capsazepina 30 nmol e exposto ao LCEa mostrou uma atenuação na resposta antinociceptiva em comparação ao grupo veículo também exposto ao LCEa ($p < 0,001$).

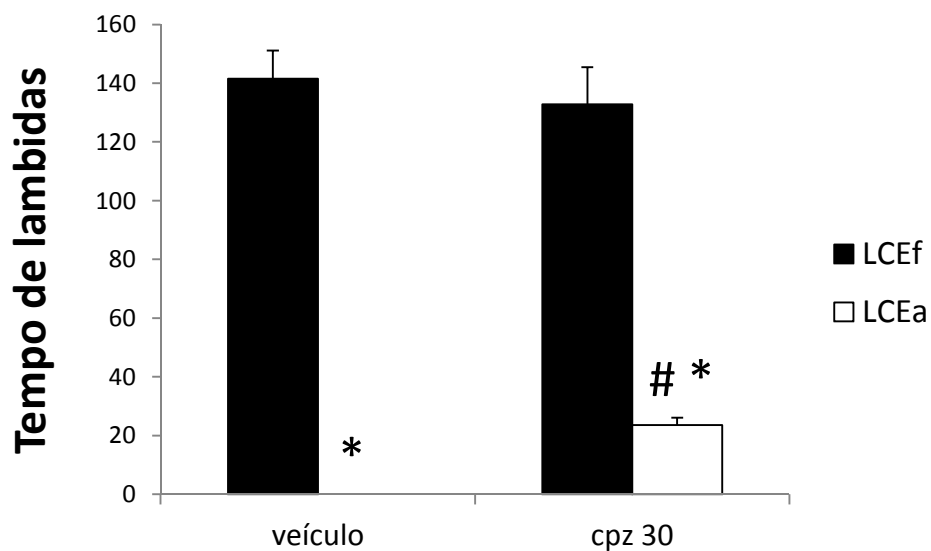


Figura 11: Efeitos da microinjeção intra-MCPd de capsazepina ou veículo no tempo de lambida na pata registrado em camundongos submetidos ao teste da formalina expostos ao LCE aberto ou fechado. N=4-5. * $p < 0,001$ comparado ao grupo exposto ao LCE fechado. # $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo exposto ao LCE aberto.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo reporta os resultados obtidos na investigação dos efeitos da facilitação e bloqueio da transmissão vaniloide na MCPd de camundongos submetidos ao teste de ansiedade do LCE e ao teste da formalina. Nesse último caso, os animais foram expostos (i) a uma caixa de vidro; (ii) ao LCEa ou LCEf. Em suma, a ativação dos receptores TRPV1, através de microinjeções intra-MCPd de capsaicina, foi capaz de provocar um efeito antinociceptivo e pró-aversivo nos camundongos submetidos ao teste de dor da formalina e de ansiedade do LCE, respectivamente. Já o bloqueio dos receptores vaniloides, através de microinjeções locais de capsazepina no mesmo sítio, curiosamente mimetizou o efeito antinociceptivo da capsaicina, diminuindo a percepção da dor em camundongos submetidos ao teste da formalina, e não alterou as medidas de ansiedade avaliada nos animais expostos ao LCE. O antagonismo dos efeitos antinociceptivos e pró-aversivos da capsaicina, através de microinjeções prévias de capsazepina no mesmo sítio, numa dose desprovida de efeito *per se*, foi capaz reverter ambos os efeitos. Somando-se a isso, a capsazepina atenuou a antinocicepção de elevada magnitude provocada pela exposição de camundongos ao LCEa e previamente submetidos ao teste da formalina.

A injeção intra-MCPd de capsaicina apresentou um perfil do tipo dose-resposta, produzindo um efeito pró-aversivo dose dependente em camundongos expostos ao LCE. Alguns estudos na literatura vêm tentando elucidar a neurobiologia dos compostos vaniloides e relatam uma diminuição da ansiedade através do emprego de diferentes abordagens, como manipulações genéticas para a produção de animais nocaute para receptores TRPV1 ou farmacológicas, com o emprego de antagonistas dos mesmos receptores. Uma investigação detalhada sobre o comportamento de camundongos nocaute para receptores TRPV1 revelou um fenótipo ansiolítico no LCE e no teste claro-escuro (MARSCH et al., 2007). Em linha com esses resultados, a administração sistêmica (KASCKOW et al., 2004) e intra-MCP (TERZIAN et al., 2009) do antagonista TRPV1, capsazepina, resultou num efeito ansiolítico em ratos. Em apoio a esses achados, o presente estudo mostrou que a ativação dos receptores TRPV1, com injeções intra-MCPd do agonista vaniloide capsaicina, produziu um efeito pró-aversivo em animais expostos ao LCE. No entanto, contrastando esta hipótese, estão os resultados obtidos por Terzian e colaboradores (2009), os quais observaram que a microinjeção de capsaicina na MCPd atenuou o comportamento defensivo de ratos expostos ao LCE. Esses autores sugeriram que esses resultados discrepantes poderiam

estar associados à rápida capacidade de dessensibilização dos receptores TRPV1 (TERZIAN et al., 2009).

A ativação dos receptores TRPV1, através do emprego da capsaicina intra-MCPd em camundongos, mostrou que esse canal é importante na modulação de estados emocionais como medo/ansiedade, dado que sua ativação produziu um efeito ansiogênico robusto, corroborado pela análise das medidas complementares (etograma). Neste contexto, a microinjeção de capsaicina intra-MCPd reduziu a frequência de mergulhar e esticar, bem como houve uma tendência em aumentar o esticar protegido ($p=0,10$). Fernández Espejo (1997) agrupou esses comportamentos de acordo com sua relevância para a compreensão dos estados de ansiedade, e revelou que entradas nos braços abertos, bem como mergulhar, mergulhar protegido e esticar protegido são os melhores indicadores de ansiedade no LCE. Ainda, as entradas nos braços abertos e os comportamentos desprotegidos se relacionam positivamente, enquanto mergulhar protegido e esticar protegido de forma negativa com as entradas nos braços abertos (FERNÁNDEZ-ESPEJO, 1997). De fato, o presente estudo demonstrou que, os comportamentos desprotegidos vão ao encontro da diminuição da exploração dos braços abertos, bem como uma tendência de aumento do esticar protegido, caracterizando assim um efeito ansiogênico (Exp.I).

Ainda sobre os efeitos da capsaicina, a microinjeção intra-MCPd desse agonista TRPV1 resultou num efeito antinociceptivo na maior dose (1 nmol). Em linha com os atuais resultados, alguns estudos também apontaram um efeito analgésico da capsaicina, nos quais microinjeções intra-MCPd (STAROWICZ et al., 2007) e intra-MCPd (PALAZZO et al., 2002) desse agonista aumentaram a latência das respostas nociceptivas térmicas em ratos. Além disso, ambos os trabalhos mostraram que a ativação desses receptores levam a um aumento na liberação de glutamato, constatado tanto pela técnica de microdiálise (STAROWICZ et al., 2007) quanto pelo bloqueio do efeito analgésico utilizando antagonistas de receptores metabotrópicos e ionotrópicos de glutamato (PALAZZO et al., 2002). De fato, fisiologicamente, o mecanismo de ação desses canais não seletivos de cátions, os quais fazem parte de uma família de receptores do tipo TRPV (*Transient Receptors Potential Vanilloids*), o receptor TRPV1, representa um caminho crucial de entrada de íons Ca^{2+} em células excitáveis, e são responsáveis por promoverem uma diminuição no limiar de despolarização daquela fibra nervosa. Portanto, em nível fisiológico, a facilitação dessa excitabilidade aumenta a liberação de glutamato que por sua vez aumenta a taxa de disparos daquela população

de neurônios que se projetam para células *OFF* (células responsáveis por inibir o processamento da dor) do RVM e são responsáveis pela inibição descendente da informação dolorosa (McGARAUGHTY et al., 2003; STAROWICZ et al., 2007).

Torna-se importante destacar, que a ativação de receptores TRPV1 leva a uma dessensibilização do canal em nível periférico (PATWARDHAN et al., 2006; AKOPIAN et al., 2009; PALAZZO et al., 2012; AMBROSINO et al., 2012; TAKECHI et al., 2013) e em nível central (McGARAUGHTY et al., 2003; TERZIAN et al., 2009). Se assim, os efeitos encontrados com a capsaicina na ansiedade (Exp.I) e na dor (Exp.IV) supostamente deveriam ser anti-aversivos e hiperalgésicos, entretanto a dessensibilização, embora não avaliada no presente estudo, parece não ter ocorrido com o uso do agonista. O fenômeno da dessensibilização é observado quando uma extensiva quantidade de capsaicina (pelo menos 10 vezes maior do que a usada nesse estudo) ativa os receptores vaniloides (PALAZZO et al., 2008). De fato, pesquisadores já demonstraram dessensibilização do receptor TRPV1 em experimentos envolvendo dor física, quando a capsaicina foi infundida na MCPd. Nesse contexto, ratos que receberam capsaicina (10 nmol) intra-MCPd e que foram submetidos ao teste de retirada da cauda (ou *tail-flick*) apresentaram um efeito hiperalgésico, atribuído à dessensibilização do canal, seguido de analgesia tardia (McGARAUGHTY et al., 2003). Na ansiedade, outros pesquisadores supuseram uma dessensibilização desse canal com a utilização de capsaicina na mesma dose do presente estudo (1 nmol), em ratos submetidos ao LCE (TERZIAN et al., 2009). Terzian e colaboradores relataram um efeito ansiolítico da capsaicina infundida intra-MCPd em ratos, e atribuíram tal resultado a capacidade de dessensibilização desse canal, embora nenhum experimento tenha sido realizado para comprovar tal hipótese. Entretanto, a administração desse agonista na dose de 1 nmol no presente estudo, produziu um efeito ansiogênico e analgésico. Embora o presente estudo também não contemplou experimentos específicos para avaliar a dessensibilização dos receptores TRPV1, dados na literatura nos levam a crer que tal fenômeno não ocorreu, corroborando Palazzo e colaboradores (2008), os quais observaram que baixas doses do agonista não dessensibilizam o receptor vaniloide (PALAZZO et al., 2008).

A administração intra-MCPd do antagonista vaniloide capsazepina não revelou um perfil ansiolítico nas doses utilizadas, corroborando um resultado prévio na literatura mostrando ausência de efeitos da capsazepina administrada sistemicamente em ratos submetidos ao LCE (Rodgers et al., 2010). Entretanto, nossos resultados não

corroboram resultados prévios da literatura que mostraram efeitos ansiolíticos da capsazepina (TERZIAN et al., 2009; CAMPOS; GUIMARÃES 2009; CASAROTTO et al., 2012). Aguiar e colaboradores (2009) mostraram que ratos que receberam a capsazepina no córtex pré-frontal exibiram comportamentos compatíveis com efeitos ansiolíticos no teste de Vogel e no LCE. Ainda, corroborando esses resultados, Terzian e colaboradores (2009) observaram os mesmos efeitos, porém com a administração de capsazepina intra-MCPd. Embora corroborando os resultados de Rodgers e colaboradores (2010), as discrepâncias entre os nossos resultados e os encontrados por outros autores que mostraram efeito ansiolítico, podem estar relacionadas às diferenças nos aparatos/condições experimentais utilizadas, na espécie de animais, e até a possibilidade de modulações diferentes na sinalização TRPV1 em ratos e camundongos. Neste contexto, Nunes-de-Souza e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição da enzima de síntese de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase (NOS), resulta em efeitos ansiolíticos somente quando o modelo de ansiedade utilizado se mostra potencialmente mais aversivo ao animal (como por exemplo pelo emprego de um modelo baseado na interação presa-predador). Portanto, no presente estudo, o papel desempenhado pelo bloqueio de receptores TRPV1 pode também depender da magnitude ou natureza do estímulo aversivo, dado que respostas defensivas induzidas pela exposição ao LCE não sejam sensíveis ao bloqueio dos receptores TRVP1 com o emprego da capsazepina, ou seja, a experiência aversiva no LCE parece não ser suficiente para induzir uma liberação de endovaniloides na MCP de camundongos. Talvez o emprego de um teste com características mais aversivas, tal como um paradigma envolvendo confronto presa(camundongo)-predador(rato), resulte num efeito antiaversivo da capsazepina em camundongos, porém tal hipótese necessita de investigação futura. Em linha com esses resultados, a análise do etograma não revelou quaisquer significâncias dos grupos tratados com capsazepina em relação ao veículo, o que corrobora a ausência de efeitos da microinjeção de capsazepina intra-MCPd em camundongos.

Ainda sobre os efeitos da capsazepina, a infusão desse antagonista mimetizou os efeitos encontrados com a capsaicina (1 nmol) na dor, em que a microinjeção na maior dose (60 nmol) de capsazepina intra-MCPd revelou um efeito antinociceptivo. Não existem evidências na literatura dando suporte ao atual resultado, porém, algumas hipóteses podem explicar tal achado. Como o uso de um antagonista foi capaz de produzir um efeito antinociceptivo, pode-se sugerir que existe uma modulação tônica vaniloide nos substratos da dor, uma vez que o bloqueio dos receptores TRPV1 na

MCPd levou a um efeito analgésico. Nossa hipótese se baseia na suposta presença desses receptores TRPV1 em interneurônios inibitórios que eventualmente participariam da inibição das células *OFF* do RVM na MCPd de camundongos. Fisiologicamente, esses interneurônios, possivelmente GABAérgicos (PALAZZO et al., 2008), inibiriam a neurotransmissão das células *OFF* do RVM, facilitando a percepção da dor. Porém, através do bloqueio dos receptores vaniloides, essa inibição deixaria de acontecer, e conseqüentemente as células *OFF* estariam novamente excitáveis e inibiriam a entrada de informação nociceptiva. Essa teoria baseia-se na neurofisiologia das vias que processam a informação dolorosa (MILLAN, 1999; PALAZZO et al., 2008) e precisam de mais experimentos a fim de verificar sua validade. Uma possibilidade de testá-la seria através da utilização de um antagonista de receptores GABAérgicos previamente a administração de capsazepina. Devido ao tempo de vigência desse estudo, não foi possível realizar esse experimento.

Com o intuito de confirmar a especificidade do efeito pró-aversivo e antinociceptivo da capsaicina, delineamos um experimento que consistiu no emprego de uma dose de capsazepina (30 nmol) desprovida de efeito *per se*, na ansiedade e na dor, previamente a uma dose de capsaicina (1 nmol) que resultou num efeito ansiogênico (Exp.I) e antinociceptivo (Exp.IV). Em linha com as curvas dose respostas, os tratamentos com o agonista e antagonista resultaram em efeito pró-aversivo/antinociceptivo e ausência de efeitos, respectivamente. Além disso, os resultados foram consistentes em demonstrar o bloqueio dos efeitos pró-aversivo e antinociceptivo da capsaicina intra-MCPd na dose de 1 nmol, através do tratamento prévio no mesmo sítio com uma dose de capsazepina desprovida de efeito *per se* (30 nmol). Esse resultado corrobora outro estudo mostrando um bloqueio do efeito ansiogênico da capsaicina administrada por via intracerebroventricular (ICV) através de uma dose de capsazepina também desprovida de efeito por si só no comportamento de camundongos expostos ao teste de interação social (MANNA; UMATHE, 2011). Esses resultados são sugestivos de que os efeitos ansiogênico e analgésico da capsaicina se devem primariamente à ativação de receptores TRPV1.

A análise etológica corroborou os resultados encontrados, uma vez que houve uma redução do comportamento de mergulhar em linha com a redução das entradas nos braços abertos (parâmetros que se relacionam positivamente), no grupo tratado com veículo e capsaicina. Essa redução foi bloqueada pelo tratamento prévio com capsazepina (30 nmol).

Por fim, o último experimento do presente estudo teve a finalidade de colaborar na elucidação do papel dos receptores vaniloides na modulação do fenômeno conhecido como antinocicepção induzida por medo. A administração intra-MCPd de casazepina, na mesma dose desprovida de efeito *per se* encontrada na curva dos seus efeitos na ansiedade, foi capaz de atenuar a antinocicepção de elevada magnitude observada em camundongos expostos ao LCEa. Ao encontro do presente estudo, resultados do nosso laboratório mostraram que a administração intratecal de N-metil-D-aspartato (NMDA - 0,4 nmol) bloqueou parcialmente a antinocicepção induzida pela exposição de camundongos ao LCEa, quando comparado ao grupo controle (FABRINI-SANTOS, 2010). Nesse caso, esses resultados indicam um papel de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA da medula espinal na inibição da antinocicepção induzida pelo medo (FABRINI-SANTOS, 2010). Nosso resultado, porém, confirma um papel da capsazepina em facilitar a nocicepção, pelo menos parcialmente, provocada pela injeção de formalina na pata em animais submetidos ao mesmo modelo.

É conhecido na literatura que os estados de medo/ansiedade ativam a MCP, que possui neurônios inibitórios descendentes responsáveis por inibir o processamento da informação dolorosa no nível da medula espinal através do sistema inibitório descendente (BOLLES; FANSELOW, 1980; RODGERS 1995; WALL; MELZACK, 2006). Assim, é possível que a exposição de camundongos ao LCEa tenha ativado os substratos de medo/ansiedade, levando a uma antinocicepção de elevada magnitude (presentes resultados; MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005, 2009). Porém, como demonstrado neste estudo, a capsazepina, possivelmente por atenuar o componente aversivo do LCEa, revelou o comportamento de dor eliciado pela prévia injeção de formalina na pata do animal. Em outras palavras, a aversividade provocada pelo modelo do LCEa é, em parte, atenuada, e portanto, os animais passam a ter a percepção dolorosa novamente. Como discutido anteriormente, a administração intra-MCPd de capsazepina em animais expostos ao LCEp, não corroborou resultados prévios da literatura em que esse antagonista revelou efeitos compatíveis com ansiólise (TERZIAN et al., 2009; CAMPOS; GUIMARÃES 2009; CASAROTTO et al., 2012), porém foi sugerido que talvez as respostas defensivas eliciadas pela exposição ao LCEp sejam insensíveis ao bloqueio dos TRPV1, e que talvez a utilização de um modelo mais aversivo revelaria os efeitos desse antagonista. Nesse contexto, o LCEa utilizado nesse último experimento, é potencialmente mais aversivo que o LCEp, por algumas razões: (i) o ambiente aversivo do LCEa elicia uma antinocicepção de maior magnitude

comparada com o LCEp em camundongos expostos a três testes de nocicepção, o teste de *tail-flick*, de formalina e de contorções abdominais (GOMES; 2005); (ii) Sorregotti e colaboradores (2013), recentemente realizaram uma análise etofarmacológica dos comportamentos defensivos eliciado pelo LCEa e mostraram que esses comportamentos são atenuados pela injeção i.p. de alprazolam, um benzodiazepínico (BZD) mais potente que o diazepam, o qual atenuou de maneira discreta tais comportamentos (SORREGOTTI, et al. 2013). Já o diazepam, é capaz de atenuar essas respostas defensivas em animais expostos ao LCEp, sugerindo que o LCEa é potencialmente mais aversivo que o LCEp. Nesse sentido, corroborando nossa hipótese de que um modelo potencialmente mais aversivo revelaria os efeitos ansiolíticos da capsazepina, a antinocicepção eliciada pela utilização do LCEa foi parcialmente revertida possivelmente por um efeito anti-aversivo da capsazepina.

6. CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, os resultados sugerem que, (i) tanto na ansiedade como na dor os receptores TRPV1 da MPCd têm um papel importante no processamento nas reações de defesa, (ii) ainda, esses efeitos são devidos, primariamente, a ativação seletiva de receptores vaniloides e, por fim, (iii) o antagonismo desses canais reverte de maneira parcial a antinocicepção provocada pela exposição ao LCEa, uma situação mais aversiva do que o LCEp.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.F. Brain mechanisms for offense, defense and submission. **Behav Brain Sci.** Amsterdam, v.2, p.200-241, 1979.

AGUIAR, D.C.; TERZIAN, A.L.; GUIMARÃES, F.S.; MOREIRA, F.A. Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. **Psychopharmacology (Berl.)** Berlin, v.205, p.217-225, 2009.

AKOPIAN, A.N.; RUPAREL, N.B.; JESKE, N.A.; PATWARDHAN, A.; HARGREAVES, K.M.; Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antinociception and antihyperalgesia. **Trends Pharmacol Sci.** Amsterdam, v.30, n.2, p.79-84, 2009.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.** Amsterdam, v.1000, p.40-56, 2004.

AMBROSINO, P.; SOLDOVIERI, M.V.; RUSSO, C.; TAGLIALATELA, M. Activation and desensitization of TRPV1 channels in sensory neurons by the PPAR α agonist palmitoylethanolamide. **Br J Pharmacol.** London, v.168, n.6, p.1430-1444, 2013.

BANDLER, R.; KEAY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. In: HOLSTEGE, G.; BANDLER, R.; SAPER, C. (Eds). **Prog Brain Res.** Amsterdam, 1996, v.107, p.285-300.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in midbrain periaqueductal gray: modules of emotional expression? **Trends Neurosci.** New York, v.17, n.9, p.379-389, 1994.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control system: brainstem spinal pathways and endorphin circuits. **Annu Ver Neurosci.** Palo Alto, v.7, p.309-338, 1984.

BAUMANN, T.J.; STRICKLAND, J. Pain Management. In: DIPIRO, J.T; TALBERT, R.L; YEE, C.G; POSEY, L.M. **Pharmacotherapy “A Pathophysiologic Approach**. 7th ed. The Macgraw-Hill Companies: USA, 2008, p.989.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**. New York, v.46, n.6, p.575-605, 1995.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; RODGERS, R.J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Aggress Behav**. New York, v.16, p.165-176, 1990.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**. Fayetteville, v.25, n.3, p.205-218, 2001.

BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behav Brain Sci**. Amsterdam, v.3, p.291-322, 1980.

BOND, M. R. Psychiatry disorders and pain. In: McMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK’S Textbook of pain**. 5th ed. Churchill: Elsevier 2006.

BRANDÃO, M. L.; TRONCOSO, A. C.; SILVA, M. A. S.; HUSTON, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **Eur. J. Pharmacol**. Amsterdam, v.463, p.225-233, 2003.

BROOKS, J.; TRACEY, I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. **J Anat**. London, v.207, p.19-33, 2005.

BURSTEIN, R.; FALKOWSKY, O.; BORSOOK, D.; STRASSMAN, A. Distinct lateral and medial projections of the spinothalamic tract of the rat. **J. Compar. Neurol.** Philadelphia, v.373, p.549-574, 1996.

CAMPOS, A.C.; GUIMARÃES, F.S. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** Oxford, v.33, p.1517-1521, 2009.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional significance and neuronal organization. **Behav Brain Res.** Amsterdam, v.58, n.1-2, p.27-47, 1993.

CASAROTTO, P.C.; TERZIAN, A.L.; AGUIAR, D.C.; ZANGROSSI, H.; GUIMARÃES, F.S.; WOTJAK, C.T. et al. Opposing Roles for Cannabinoid Receptor Type-1 (CB1) and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel (TRPV1) on the Modulation of Panic-Like Responses in Rats. **Neuropsychopharmacology.** New York, v.37, p.478-486, 2012.

CATERINA, M.J.; LEFFLER, A.; MALMBERG, A.B.; MARTIN, W.J.; TRAFTON, J.; PETERSEN-ZEITZ, K.R. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science.** New York, v.288, p.306-313, 2000.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature.** London, v.389, n.6653, p. 816–824, 1997.

CERVERO, F. Neurobiología del dolor. **Revista de Neurología.** Barcelona, v.30, n.6, p.551-555, 2000.

CONCEIÇÃO, I.M.; MAIOLINI, JR. M.; MATTIA, N.; VITAL, M.A.; SANTOS, B.R.; SMAILI, S. et al. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Braz J Med Biol Res.** Ribeirão Preto, v.25, n.8, p.831-834, 1992.

CORNÉLIO, A.M.; MENDES-GOMES, J.; FUGIMOTO, J.S.; MORGAN, M.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Environmentally induced antinociception and hyperalgesia in rats and mice. **Brain Res.** Amsterdam, v.1415, p.56-62, 2011.

CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? **Physiol Behav.** Oxford, v.96, n.3, p.440-447, 2009.

CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Differential projections of thermoreceptive and nociceptive lamina I trigeminothalamic and spinothalamic neurons in the cat. **J Neurophysiol.** Washington, v.86, n.2, p.856-870, 2001.

CRISTINO, L.; de PETROCELLIS, L.; PRYCE, G.; BAKER, D.; GUGLIELMOTTI, V.; Di MARZO, V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. **Neuroscience.** Oxford, v.139, p.1405-1415, 2006.

DARWIN, C. **The expression of emotion in man and animals.** Chicago: The University of Chicago Press, 1965.

DAVIS, J.B.; GRAY, J.; GUNTHORPE, M.J.; HATCHER, J.P.; DAVEY, P.T.; OVEREND, P. et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. **Nature.** London, v.405, p.183-187, 2000.

DEAKIN, J. F. W; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **J. Psychopharmacol.** Oxford, v.5, n.4, p.305-315, 1991.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** Amsterdam, v.4, p.161-174, 1977.

FABRINI-SANTOS, Y. **Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no cornodorsal da medula espinal na antinociceção induzida pelo medo.** 2010. 59f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Araraquara, São Paulo, 2010.

FERNÁNDEZ ESPEJO, E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behav Brain Res.** Amsterdam, v.86, p.105-112, 1997.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central Nervous System Mechanisms of pain modulation. In: MCMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **Wall and Melzack's textbook of pain.** 5th edition, Churchill Livingstone: Elsevier, 2006, p. 125-142.

GEWEHR, C.; DA SILVA, M.A.; DOS SANTOS, G.T.; ROSSATO, M.F.; DE OLIVEIRA, S.M.; DREWES, C.C et al. Contribution of peripheral vanilloid receptor to the nociception induced by injection of spermine in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** Phoenix, v.99, n.4, p.775-781. 2011.

GOMES, K.S. **Expressão de Proteína Fos na Investigação do Substrato Neural da Antinociceção Induzida pelo Medo.** 2010. 69f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Araraquara, São Paulo, 2010.

GOMES, K.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** Oxford, v.33, n.7, p.1261-1269, 2009.

GRAEFF, F. G.; ZANGROSSI, JR. H. Animal models of anxiety. In: D'HAENEN.; DEN BOER, J.A.; WILLER, P. Eds. **Biolog Psychiatr.** John Willer & Sons Ltd. 2002, p.1-15.

GRAEFF, F.G. Brain defense system and anxiety. In: ROTH, M.; BURROWS, G. D.; NOYES, R. (eds.) Handbook of anxiety, Vol 3, **Elsevier Science Publisher**, Amsterdam, 1990, p.307-354.

GRAY, J.A. & McNAUGAHTON, N. (Eds.) ***The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system***. 2.ed. London: Oxford University Press, 2000.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonist in a maze-exploration model of “fear-motivated behaviour”. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, Berlin, v. 327, p. 1-5, 1984.

HESS, W.R.; BRÜGGER, M. Das subkortikale zentrum der affectiven abwerreaktion. **Helv. Physiol.Pharmacol. Acta**. v.1, p.33-52, 1943.

HETEM, L.A.B. & GRAEFF, F.G. (Eds). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 107-132.

IKEMOTO, S.; PANKESEPP, J. The role of nucleus acumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. **Brain Res. Brain Res. Rev.** Amsterdam, v.31, p.6-41, 1999. *apud* McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci. Biobeh. Rev.** Fayetteville, v.28, p.285-305, 2004.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. London, v.413, p.203-210, 2001.

KASCKOW, J.W.; MULCHAHEY, J.J.; GERACIOT Jr, T.D. Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviours. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**. Oxford, v.28, n.2, p.291–295, 2004.

KAVALIERS, M. Brief exposure to a natural predator, the short-tail weasel, induces benzodiazepines sensitive antinociception in white-footed mice. **Physiol Behav.** New York, v.43, n.2, p.187-193, 1988.

KEAY, K.A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neurosci Biobehav Res.** Fayetteville, v.25, n.7-8, p.669-678, 2001.

KELLY, D.D. **Stress induced analgesia**, New York: NY Academy of Sciences, v.467, 1986.

LADER, M.H. Clinical anxiety and the benzodiazepines. In: Neuropharmacology of Central Nervous System and Behavioral Disorders. Palmer GC, ed., **Academyc Pres.** New York, p.225-241, 1981.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.** Baltimore, v.53, n.4, p.597-632, 2001.

LEE, C.; RODGERS, R.J. Antinociceptive effects of plus-maze exposure: influence of opiates receptor manipulations. **Psychopharmacology (Berl)**. Berlin, v.102, n.4, p.507-513, 1990.

LESTER, L.S.; FANSELOW, M.S. Exposure to a cat produces opioid antinociception in rats. **Behav Neurosci.** Washington DC, v.99, n.4, p.756-759, 1985.

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

MAIONE, S.; STARROWICZ, K.; PALAZZO, E.; ROSSI, F.; Di MARZO, V. The endocannabinoid and endovanilloid systems and their interactions in neuropathic pain. **Drug Dev. Res.** New York, v.67, p.339-354, 2006.

MAIONE, S.; BISOGNO, T.; de NOVELLIS, V.; PALAZZO, E.; CRISTINO, L.; VALENTI, M. et al. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. **J Pharmacol Exp Ther.** Baltimore, v.316, n.3, p.969-982, 2006.

MARKS, I.M.; NESSE, R.M. Fear and fitness: an evolutionary analysis of anxiety disorders. **Ethol Sociobiol.** New York, v.15, p.247-261, 1994.

MANNA, S.S., UMATHE, S.N. Transient receptor potential vanilloid 1 channels modulate the anxiolytic effect of diazepam. **Brain Res.** Amsterdam, v.1425, p.75-82, 2011.

MARCSH, R.; FOELLER, E.; RAMMES, G.; BUNCK, M.; KÖSSL, M.; HOLSBOER, F. et al., Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptordeficient mice. **J. Neurosci.** Baltimore, v.27, n.4, p.832-839, 2007.

MARINELLI, S.; Di MARZO, V.; FLORENZANO, F.; FEZZA, F.; VISCOMI, M.T.; VAN DER STELT, M. et al., N-arachidonoyl-dopamine tunes synaptic transmission onto dopaminergic neurons by activating both cannabinoid and vanilloid receptors. **Neuropsychopharmacology.** New York, v.32, n.2, p.298-308, 2007.

McGARAUGHTY, S.; CHU, K.L.; BITNER, R.S.; MARTINO, B.; KOUHEN, R.E.; HAN, P. et al., Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. **J. Neurophysiol.** Washington, v.90, n.4, p.2702-2710, 2003.

MELLO, R.D.; DICKENSON A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth.** London, v.101, p.8-16, 2008.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Res.** Amsterdam, v.1047, n.1, p.97-104, 2005.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation. **Behav Brain Res.** Amsterdam, v.203, n.2, p.180-187, 2009.

MESSIER, C.; ÉMOND, S.; ETHIER, K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** Phoenix, v.63, n.2, p.313-318, 1999.

MEZEY, É.; TÓTH, Z.E.; CORTRIGHT, D.N.; ARZUBI, M.K.; KRAUSE, J.E.; ELDE, R. et al., Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** Washington, DC, v.97, n.7, p.3655–3660, 2000.

MIGUEL, T.T., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Anxiogenic-like effects induced by NMDA receptor activation are prevented by inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the periaqueductal gray in mice. **Brain Res.** Amsterdam, v.1240, p.39-46, 2008.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.** Oxford, v.57, n.1, p.1-164, 1999.

MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; CAMPOS, A.C.; LISBOA, S.F.; TERZIAN, A.L.; RESSTEL, L.B. et al., Antiaversive Effects of Cannabinoids: Is the Periaqueductal Gray Involved? **Neural Plast.** Patrington, 2009, Article ID 625469, 11 pages.

MOREIRA, F.A.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic-like effect of cannabinoids injected into the rat dorsolateral periaqueductal gray. **Neuropharmacology**. Oxford, v.52, n.3, p.958-965, 2007.

MORGAN, M.M. Differences of antinociception evoked from dorsal and ventral regions of the caudal periaqueductal gray matter. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York, Plennun Press; 1991, p. 139-150.

NETTO, C.A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rat: effects of concurrent and post-training stressful stimulation. **Behav Neural Biol**, New York, v.48, n.2, p.304-309, 1987.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; da COSTA, M.; FORNARI, R.V.; GRAEFF, F.G.; PELÁ, I.R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology (Berl)**. Berlin, v.50, n.3, p.300-310, 2000.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; MIGUEL, T.T.; GOMES, K.S.; FUGIMOTO, J.S.; MENDES-GOMES, J.; AMARAL, V.C.S. et al. Role of nitric oxide in the periaqueductal gray in defensive behavior in mice: influence of prior local N-methyl-D-aspartate receptor activation and aversive condition. **Psychol Neurosci**. Rio de Janeiro, v.3, p.59-66, 2010.

PALAZZO, E.; LUONGO, L.; DE NOVELLIS, V.; ROSSI, F.; MARABESE, I.; MAIONE, S. Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development. **Curr Opin Pharmacol**. Oxford, v.12, n.1, p.9-17, 2012.

PALAZZO, E.; de NOVELLIS, V.; MARABESE, I.; CUOMO, D.; ROSSI, F.; BERRINO, L., et al., Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. **Eur. J. Pharmacol**. Amsterdam, v.439, n.1-3, p.69-75, 2002.

PALAZZO, E.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. **Mol. Cell. Endocrinol.** Amsterdam, v.286, p.79-83, 2008.

PATWARDHAN, A.M.; JESKE, N.A.; PRICE, T.J.; GAMPER, N.; AKOPIAN, A.N.; HARGREAVES, K.M. The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Washington, DC, v.103, n.30, p.11393-11398, 2006.

PAXINOS, G.; FRANKLING, K.B.J. The mouse brain instereotaxic coordinates. San Diego: **Academic Press**, 2nd edition, 2001

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. **J Neurosci Methods.** Amsterdam, v.14, p.149-167, 1985.

REYNOLDS, D. V. Surgery in rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. **Science.** New York, v.164, p.444-445, 1969.

RODGERS, R.J. Neuropharmacological Aspects of Adaptive Pain Inhibition in Murine "Victims" of Aggression. **Aggress Behav.** New York, v.21, p.29-39, 1995.

RODGERS, R.J.; BICKERDIKE, P.A.; DINGLEY, H.K. Lack of effect of capsazepine, a TRPV1 receptor antagonist, on benzodiazepine-sensitive emotional behaviour in the mouse elevated plus-maze. **J Psychopharmacol.** Oxford, v.24, n.3, A76, TG15, 2010.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav.** Phoenix, v.52, p.297-303, 1995.

RODGES, R.J.; RANDALL, J.I. Resident's Scent: a critical factor in acute analgesic reaction in defeat experience in male mice. **Physiol Behav.** New York, v.37, n.2, p.317-322, 1986.

SCHMITT, R.; KAPEZINSKI, F. Transtorno de ansiedade generalizada. In: HETEM, L.A.B; GRAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.265-283.

SLUGG, R.M.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Response of cutaneous A- and C-fiber nociceptors in the monkey to controlled-force stimuli. **J Neurophysiol**. Washington, v.83, n.4, p.2179-2191, 2000.

SORREGOTTI, T.; MENDES-GOMES, J.; RICO, J.L.; RODGERS, R.J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. **Behav Brain Res**. Amsterdam v.246, p.76-85, 2013.

STAROWICZ, K.; MAIONE, S.; CRISTINO, L.; PALAZZO, E.; MARABESE, I.; ROSSI, F. Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. **J Neurosci**. Baltimore, v.27, n.50, p.13739-13749, 2007.

STEPHENS, D. N.; MELDRUM, B. S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C.; GRUTSNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology (Berl)**, Berlin v.90, n.2, p.166-169, 1986.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol Rev**. Baltimore, v.51, n.2, p.159–212, 1999.

TAKECHI, K.; CARSTENS, M.I.; KLEIN, A.H.; CARSTENS, E. The Antinociceptive and Antihyperalgesic Effects of Topical Propofol on Dorsal Horn Neurons in the Rat. **Anesth Analg**, Cleveland, 2013. [Epub ahead of print]

TAUKULIS, H. K; GOGGIN, C. E. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. **Behav. Neural Biol**. New York, v.53, n.2. p.205-216, 1990.

TERZIAN, A.L.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S.; MOREIRA, F.A. Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. **Eur Neuropsychopharmacol.** Amsterdam, v.19, n.3, p.188-195, 2009.

TILLMAN, D.B., TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: estimates of receptor depth and threshold. **J Physiol.** London, v.485, p.753-765 1995a.

TILLMAN, D.B., TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: correlation with pain threshold in humans. **J Physiol.** London, v.485, p.767-774 1995b

TORRES, I.L.; VASCONCELLOS, A.P.; SILVEIRA CUCCO, S.N.; DALMAZ, C. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. **Braz J Med Biol Res.** Ribeirão Preto, v.34, n.2, p.241-244, 2001.

VACCARINO, A.L.; MAREK, P.; STERNBERG, W.; LIEBESKIND, J.C. NMDA receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia in the formalin test. **Pain.** Amsterdam, v.50, p.119-123, 1992.

VAN DER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids: putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **Eur J Biochem.** Berlin v.271, n.10, p.1827-1834, 2004.

XING, J.; LI, J. TRPV1 receptor mediates glutamatergic synaptic input to dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) neurons. **J Neurophysiol.** Washington, v.97, p.503-511, 2007.

ZANGROSSI, JR. H; GRAEFF, F. G. Modelos animais. In: HETEM, L.A.B; GRAEFF, F. G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade.** São Paulo: Atheneu, 2004, p.55-73.