



**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCAR –  
UNESP**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara  
Laboratório de Neuropsicofarmacologia

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA AMÍDALA NA ANTINOCICEPÇÃO  
INDUZIDA PELO MEDO: ANÁLISES COMPORTAMENTAL,  
IMUNOISTOQUÍMICA E FARMACOLÓGICA**

**Tatiani Sorregotti**

**Araraquara, SP**

**-2017-**

**Tatiani Sorregotti**

**Avaliação do papel da amígdala na antinocicepção induzida pelo medo:  
análises comportamental, imunoistoquímica e farmacológica**

Tese a ser apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Fisiológicas.

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

**Araraquara, SP**

**-2017-**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas


---

**Folha de Aprovação**

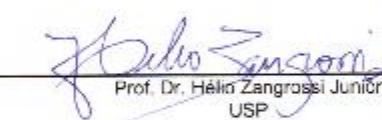
---

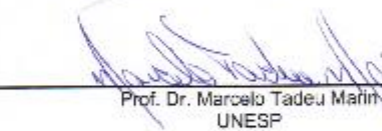
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Tatiani Sorregott, realizada em 30/05/2017:

  
Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza  
UNESP

  
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi  
USP

  
Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari  
UNESP

  
Prof. Dr. Hélio Zangrossi Júnior  
USP

  
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marín  
UNESP

---

*Dedico este trabalho aos meus pais  
e à minha irmã, por me fazerem  
acreditar que tudo daria certo.  
Obrigada pelo incentivo e pelo  
amor!*

### **Agradeço:**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pela orientação, ensinamentos e amizade. Tenho você como um exemplo!

À Ana Claudia Cipriano, pela co-orientação, mesmo não oficial. Obrigada por suas ideias, sugestões e críticas. Obrigada por me fazer enxergar luzes quando o túnel se tornava escuro. Obrigada pela amizade, Ana!

Ao Prof. John Rodgers (Universidade de Leeds, Inglaterra), por suas sugestões, as quais foram indispensáveis para a realização deste trabalho. Thank you for your suggestions!

À Prof. Dra. Débora Colombari e à Mariana Del Rosso de Melo, pela disposição e ajuda inicial com a técnica de imunistoquímica.

Ao Fábio, à Paola, à Paula, ao Paulo e ao Rodrigo, pela paciência e ensinamentos sobre a técnica de imunistoquímica. Obrigada por abrirem as portas do laboratório da USP enquanto estiveram lá. Obrigada, sobretudo, pela amizade e momentos de descontração!

Ao Diego Cardozo Mascarenhas, pelo companheirismo nessa jornada de 12 anos. Obrigada pela companhia durante o estágio treinamento, a iniciação científica, o mestrado e o doutorado. Obrigada pela companhia nos congressos, pela ajuda com o inglês, pelos momentos de descontração. Obrigada por estar presente em (quase) todos os momentos!

À Nathália Santos Costa, pelo apoio técnico em alguns experimentos, apoio emocional de todas as crises, pelos incentivos de sempre. Obrigada por sua valiosa amizade!

Ao Matheus, pelas dicas na cirurgia, amizade e horas de conversas sobre a vida. Obrigada, Caps!

Ao Lucas Canto, pela ajuda na finalização da tese. Obrigada pela paciência, pelas sugestões e pelas dicas com o endnote!

Aos demais, mas não menos importantes, amigos do laboratório (Alice, Bia, Celina, Fer Daher, Gabriel, Gessy, Isabella, Jonas, Johnny, Leandro, Lígia, Lucas – Barreto e Gomes -, Marion, Ricardo e Willian), pelo apoio técnico de alguns, pelos momentos de descontração, pela companhia diária no laboratório e pela amizade de cada um de vocês. Mesmo os que não estão mais no meu convívio diário fizeram parte e, de alguma forma, me ajudaram (Ariela, Joyce, Karina, Tarciso e Vanessa).

À Bete, Rosana e Tirene, pelo excelente trabalho prestado no – e para o – laboratório de Farmacologia, pela assistência aos alunos e, principalmente, pela amizade. Somos privilegiados por termos vocês ao nosso lado!

À Giovana, Sheila, Larissa e Ariani, pela amizade, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração, pela paciência e por todos os valores que aprendi morando com vocês.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição para a leitura desta tese.

Ao Alexandre (UFSCar) e à Cláudia (UNESP), e suas equipes, pela assistência prestada na secretaria da PIPGCF.

À FCFar/UNESP, pelo espaço físico e equipamentos oferecidos para a realização deste trabalho.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF-UFSCar/UNESP), pela oportunidade.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro concedido para desenvolver este trabalho durante meu primeiro ano do doutorado.

À Fapesp (Processo 2014/02956-7), pelo apoio financeiro concedido para desenvolver este trabalho e divulgá-lo em congressos científicos.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da Fapesp.

## Resumo

Camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado aberto (LCEa: 4 braços abertos) exibem intensa resposta antinociceptiva, elevadas concentrações de corticosterona plasmática e comportamentos defensivos. Contudo, substratos e neurotransmissores envolvidos nas respostas antinociceptiva e comportamental eliciadas pela exposição ao LCEa ainda são pouco conhecidos. É possível que o complexo amigdalóide esteja envolvido nestas respostas uma vez que destaca-se como uma das principais regiões encefálicas envolvidas no processamento de estímulos aversivos, nas respostas emocionais relacionadas ao medo e na modulação de dor. O presente estudo investigou se a inativação do complexo amigdalóide, através da microinjeção de cloreto de cobalto, atenuaria a expressão tanto da dor provocada pelo teste de formalina na pata, como da antinociceção e comportamentos defensivos de camundongos, sob estímulo nociceptivo ou não, expostos ao LCEa (Experimento 1). Os resultados mostraram que a inativação do complexo amigdalóide promoveu um efeito antinociceptivo nos animais submetidos ao teste de formalina e expostos a caixa de vidro (ambiente seguro), porém, não alterou a resposta antinociceptiva e reações de defesa induzidos pela exposição ao LCEa (ambiente aversivo). Por outro lado, na ausência do estímulo nociceptivo, a inativação da amígdala promoveu: redução no tempo de permanência dos camundongos nas regiões proximais dos braços do LCEa e na frequência total de SAP (*stretched attend posture*); e aumento na permanência nas extremidades do LCEa e na frequência de mergulhos (*head-dipping*), sugerindo efeito ansiolítico. O Experimento 2 teve como objetivo avaliar a ativação neuronal, através da quantificação de proteína Fos, do complexo amigdalóide de camundongos submetidos ao teste da formalina na pata e de camundongos expostos ao LCEa. O conjunto de resultados desse experimento demonstrou que o estímulo nociceptivo e a exposição ao LCEa promoveram aumento da expressão de células positivas para a proteína Fos no complexo amigdalóide, sobretudo no núcleo basolateral da amígdala (BLA), sem haver diferença significativa entre os hemisférios direito e esquerdo. Visto que o CRF desempenha um papel na mediação de respostas defensivas e antinociceptiva eliciadas por estímulos aversivos, investigamos o papel do antagonista de CRF1 (CP376395) na amígdala na modulação destas respostas eliciadas em camundongos expostos ao LCEa, sob estímulo nociceptivo ou não. Os resultados mostraram que a inibição dos receptores de CRF do tipo 1 da amígdala, sob influência ou não da nociceção, não alterou a antinociceção e os comportamentos defensivos induzidos pela exposição ao LCEa. Os resultados sugerem

que, independente de lateralização e da neurotransmissão CRF-érgica, a amígdala, sobretudo o BLA, tem um papel importante na modulação das respostas nociceptivas induzidas pelo teste de formalina e nas respostas comportamentais de camundongos expostos ao LCEa.

**Palavras-chaves:** labirinto em cruz elevado aberto, camundongos, antinociceção, comportamentos defensivos, amígdala, CRF.



## Abstract

Exposure of rodents to an open elevated plus maze (oEPM, an EPM with all four open arms) elicits antinociceptive responses, high level of plasma corticosterone and defensive behaviors. However, very little is known about the neural substrates and neurotransmitters that modulate the antinociceptive responses and the defensive behavior of oEPM-exposed animals. It is known that the amygdala plays an important role in the modulation of defensive behavior and pain responses. Accordingly, the Experiment 1 investigated the effects of chemical inactivation of the amygdala [through local injection of cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>: a nonspecific synaptic blocker)] on the nociception of mice injected formalin into the right hind paw (nociceptive test) and on the defensive behavior of oEPM-exposed mice. Results showed that the amygdala inactivation induced an antinociceptive response in mice injected formalin into the right hind paw when exposed to the glass-cage (safe situation). However, the antinociceptive response was not altered when mice were exposed to the oEPM (aversive situation). In addition, the mice amygdala inactivation reduced the time spent in the proximal area of the arms as well as the frequency of stretched attend postures (SAP), and increased time spent in the arm ends and the head-dipping frequency, suggesting an anxiolytic-like effect. Experiment 2 assessed the pattern of activation of the basolateral (BLA) and central (CeA) nuclei of the amygdala through quantification of Fos protein expression in mice exposed to the oEPM (aversive situation) or injected with formalin into the right hind paw. Fos-positive labeled cells were bilaterally increased in the amygdaloid complex, particularly in the BLA, compared to the control groups. Whereas the neuropeptide corticotropin-releasing factor (CRF) plays a role in the modulatory system of defensive and antinociceptive responses to aversive situations, the Experiment 3 investigated the effects of intra-amygdala microinjections of CRF1 antagonist (CP376395) on these responses on mice exposed to the oEPM. Results showed that the antinociceptive and defensive responses did not change by the blocked of CRF1 in the amygdala. These results are suggestive that the amygdala (in particular, its BLA nucleus) plays a role in the modulation of nociceptive response induced by formalin test and in the modulation of defensive behaviors in oEPM-exposed mice.

**Keywords:** open elevated plus maze, mice, antinociception, defensive behaviors, amygdala, CRF.

## Sumário

1.Introdução.....	11
2.Objetivos.....	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Animais.....	17
3.2. Cirurgia.....	17
3.3. Drogas utilizadas .....	17
3.4. Administração das drogas.....	18
3.5. Teste de formalina na pata.....	18
3.6. Labirinto em cruz elevado aberto.....	18
3.7. Avaliação das medidas espaço-temporais e complementares.....	19
3.8. Labirinto em cruz elevado fechado.....	19
3.9. Caixa de vidro.....	20
3.10. Histologia.....	20
3.11. Imunoistoquímica.....	20
3.12. Procedimentos.....	21
3.12.1. Experimento 1: Investigação da participação do complexo amidalóide na antinocicepção e reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa.....	21
3.12.1.1. Experimento 1A: Investigação dos efeitos da inativação do complexo amidaloide na nocicepção em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.....	22
3.12.1.2. Experimento 1B: Investigação dos efeitos da inativação do complexo amidaloide na antinocicepção e reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa: influência da dor.....	22
3.12.1.3. Experimento 1C: Investigação dos efeitos da inativação do complexo amidaloide nas reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa.....	22
3.12.2. Experimento 2: Investigação do padrão de ativação da amídala de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa.....	23
3.12.3. Experimento 3: Investigação do envolvimento dos receptores CRF1 da	

amígdala na antinocicepção e reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa.....	23
3.12.3.1.Experimento 3A: Investigação dos efeitos da microinjeção do antagonista de CRF1 (CP376395) na amígdala na nocicepção de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.....	23
3.12.3.2. Experimento 3B: Investigação dos efeitos da microinjeção do antagonista de CRF1 (CP376395) na amígdala na antinocicepção e reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa: influência da dor.....	24
3.12.3.3.Experimento 3C: Investigação dos efeitos da microinjeção do antagonista de CRF1 (CP376395) na amígdala nas reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa.....	24
3.13. Análises estatísticas.....	24
4. Resultados.....	26
4.1. Experimento 1: Papel do complexo amigdaloide na resposta nociceptiva e nas reações de defesa de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa.....	26
4.1.1. Experimento 1A: Atenuação da resposta nociceptiva provocada pela inativação bilateral do complexo amigdaloide em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.....	26
4.1.2. Experimento 1B: Ausência de efeitos da inativação do complexo amigdaloide sobre a antinocicepção e reações de defesa apresentadas por camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo.....	28
4.1.3. Experimento 1C: Efeitos da inativação do complexo amigdaloide nos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa.....	30
4.2. Experimento 2: Padrão de ativação da amígdala: quantificação de células positivas para Fos da amígdala de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa.....	31
4.2.1. Quantificação de células positivas para Fos nos hemisférios direito e esquerdo da amígdala de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa: ausência de lateralização funcional.....	31
4.2.2. Quantificação de células postivas para Fos nos núcleos BLA e CeA da amígdala: aumento da expressão de Fos promovido pelo estímulo nociceptivo e pela exposição ao LCEa. ....	32

4.3. Experimento 3: Avaliação da participação da neurotransmissão CRF-érgica na amígdala nas respostas nociceptiva e reações de defesa de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa.....	34
4.3.1. Experimento 3A: Curva dose-resposta do CP376395, antagonista dos receptores de CRF1, intra-amídala sobre a nocicepção de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.....	34
4.3.2. Experimento 3B: Ausência de efeitos da microinjeção intra-amídala de CP 376395 sobre a antinocicepção e comportamentos defensivos em camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo.....	35
4.3.3. Ausência de efeitos da microinjeção intra-amídala de CP 376395 sobre os comportamentos defensivos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.....	36
5. Discussão.....	38
6. Conclusão.....	46
7. Referências Bibliográficas.....	47

## 1. Introdução

A dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tissular real ou potencial ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano” (Associação Internacional para o Estudo da Dor - IASP, 2006). Embora seja desagradável, a dor é importante para a sobrevivência, pois se trata de um mecanismo de aviso sobre a ocorrência de estímulos lesivos provenientes do meio externo ou do próprio organismo (Lent, 2001).

É importante destacar dois componentes importantes da dor, os quais são processados por substratos neurais envolvidos diretamente com processos cognitivos e afetivos: o componente perceptivo-discriminativo e o componente aversivo-cognitivo-motivacional. O primeiro compreende a identificação do estímulo como doloroso, enquanto o segundo, também denominado reacional, compreende comportamentos defensivos que vão desde a retirada reflexa do membro até respostas emocionais do tipo luta/fuga e geralmente são acompanhados por fortes sensações subjetivas de desconforto (Brandão, 2012). Assim, a dor não deve ser considerada apenas um fenômeno sensorial, mas também envolve o fenômeno emocional.

De forma geral, os estímulos nociceptivos são captados por terminações nervosas livres de fibras de neurônios ganglionares espinais denominadas nociceptores. Estes são responsáveis por transmitir os impulsos nervosos para a medula espinal por meio de dois tipos de fibras sensoriais, cuja classificação é baseada na sua estrutura e velocidade de condução. Enquanto as fibras A $\delta$  são mielinizadas e condutoras rápidas, as fibras C são amielinizadas e de condução lenta. A condução da informação nociceptiva até estruturas superiores do sistema nervoso central se dá por meio das vias ascendentes da dor. Sucintamente, a informação é transmitida através das fibras aferentes primárias para o corno dorsal da medula espinal e, em seguida, para regiões encefálicas via dois canais principais de comunicação: o trato paleoespinotalâmico, de condução lenta, e o trato neoespinotalâmico, de condução rápida. Enquanto a via paleoespinotalâmica, denominada via polissináptica, tem conexões com a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), tálamo, córtex e estruturas límbicas contribuindo para o componente afetivo da dor, a via neoespinotalâmica envia projeções diretamente para o tálamo e córtex sensorial, onde ocorre a percepção da dor, contribuindo para o componente sensorial da dor. Além das vias ascendentes da dor, existe a via

descendente modulatória da dor, cuja ativação pode levar à inibição ou facilitação da dor. Essa via é composta por projeções da MCP para regiões do tronco encefálico, como o bulbo rostral ventromedial (RVM) que, por sua vez, envia projeções para a medula espinal. Uma vez que a MCP também integra impulsos originados em regiões límbicas, fatores como medo, atenção, expectativa, podem regular o processamento da dor, demonstrando o aspecto emocional da dor (D'mello e Dickenson, 2008; Brandão, 2012).

Apesar de a dor ser de suma importância para a sobrevivência dos animais, quando confrontados com ameaças ao seu bem estar, à integridade física ou à sobrevivência, além de exibirem respostas comportamentais (fuga, luta, congelamento, vocalização) e neurovegetativas (taquicardia, hipertensão, defecação), esses normalmente apresentam diminuição da sensibilidade dolorosa ou antinocicepção (Kelly, 1986; Rodgers, 1995).

A inibição da resposta nociceptiva é resultado da ativação do sistema inibitório descendente de modulação da dor. Diante de uma ameaça ou situação aversiva, estruturas encefálicas, como amígdala, córtex cingulado anterior, MCP, são ativadas. Sucintamente, neurônios que partem dessas regiões fazem sinapses inibitórias com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinal impedindo a propagação da informação nociceptiva pelas fibras aferentes primárias, o que resulta na antinocicepção. A analgesia induzida pela estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal foi uma das primeiras evidências sobre a existência desse sistema (Reynolds, 1969). A ativação dessa estrutura mesencefálica inibe neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinal resultando na inibição de respostas comportamentais provocadas pelo estímulo nocivo (Bandler e Keay, 1996).

Uma vez que os estímulos nociceptivos induzem a exibição de uma série de comportamentos recuperativos (ex., lambidas das lesões, repouso, etc.), a antinocicepção apresenta claro valor adaptativo mediante situações aversivas, pois permite ao animal exibir reações defensivas como congelamento, luta e fuga, mesmo que uma injúria tenha ocorrido, aumentando, deste modo, suas chances de sobrevivência (Bolles e Fanselow, 1980).

A inibição da resposta nociceptiva pode ser provocada por estímulos tanto aprendidos como inatos que predizem o perigo. A antinocicepção induzida por estímulos inatos de perigo pode ser evidenciada, por exemplo, quando animais estão diante de um predador (Lester e Fanselow, 1985; Kavaliers, 1988; Lichtman e

Fanselow, 1990); de um ambiente novo (Netto *et al.*, 1987; Torres *et al.*, 2001) ou aberto, como é o caso do labirinto em cruz elevado aberto (LCEa) (Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2005; Cornelio e Nunes-De-Souza, 2009; Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2009; Mendes-Gomes *et al.*, 2011; Sorregotti *et al.*, 2013).

O LCEa é similar ao labirinto em cruz elevado (LCE: 2 braços abertos e 2 braços fechados), porém apresenta os quatro braços abertos, não permitindo ao animal esquivar-se do ambiente ameaçador (braços abertos). Além da intensa resposta antinociceptiva, camundongos expostos ao LCEa também apresentam elevadas concentrações de corticosterona plasmática, um marcador biológico do estresse (Mendes-Gomes *et al.*, 2011), e comportamentos defensivos (Sorregotti *et al.*, 2013), confirmando a natureza aversiva deste ambiente e corroborando evidências anteriores que indicam serem os estados emocionais aversivos dependentes do tipo de estressores aos quais estão associados, isto é, se escapáveis ou não (Henry e Stephens, 1977; Teskey e Kavaliers, 1987; Blanchard *et al.*, 1993; Lovick, 1993).

Embora dados da literatura indiquem a participação de alguns neurotransmissores, como serotonina e GABA, envolvidos na resposta antinociceptiva induzida por aversão (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2009), ainda não está totalmente esclarecido quais substratos e neurotransmissores estão envolvidos na modulação desta resposta. Estudos eletrofisiológicos, comportamentais e bioquímicos apontam a amígdala como um importante sítio de modulação de dor (Lariviere e Melzack, 2000; McNally e Akil, 2002; Greenwood-Van Meerveld *et al.*, 2006; Ulrich-Lai *et al.*, 2006; Ji e Neugebauer, 2007) e uma das principais regiões encefálicas envolvidas no processamento de estímulos aversivos e nas respostas emocionais relacionadas ao medo (exemplos, antinociceção, sobressalto, congelamento, fuga, luta) (Graeff *et al.*, 1993; Davis, 1998; Ledoux, 2000; Leite-Panissi *et al.*, 2003; Leite-Panissi *et al.*, 2004). A amígdala é uma estrutura prosencefálica bilateral composta de núcleos com complexas conexões inter e intranucleares. Esses núcleos estão subdivididos em três principais grupos: o grupo basolateral, que inclui os núcleos lateral, basal e basal acessório; o grupo superficial ou cortical, incluindo os núcleos corticais e o núcleo do trato olfatório lateral; e o grupo centromedial, composto pelos núcleos medial e central (para revisão, ver Sah *et al.*, 2003). Têm-se estabelecido que os subnúcleos basolateral e central desempenham papéis fundamentais na aquisição e expressão de comportamentos relacionados ao medo (Sah *et al.*, 2003).

Embora a amígdala seja uma estrutura bilateral, alguns estudos demonstram haver lateralização funcional desta estrutura em modelos animais e humanos (Baker e Kim, 2004; Carrasquillo e Gereau, 2007; 2008; Ji e Neugebauer, 2009), porém, evidências de lateralização relacionada à dor são conflitantes. Por exemplo, Ji e Neugebauer (2009) demonstraram maior atividade neuronal no núcleo central da amígdala direita no modelo de artrite. Por outro lado, Goncalves e Dickenson (2012) demonstraram atividade neuronal dos hemisférios esquerdo e direito do núcleo central da amígdala igualmente aumentada em ratos submetidos ao modelo de ligação do nervo espinal.

Estudos com lesões da amígdala resultaram na interrupção das respostas emocionais relacionadas ao medo (para uma revisão ver Rosen e Schulkin, 1998). Por exemplo, a lesão química bilateral dos núcleos basolateral ou central da amígdala inibiu a aversão condicionada por lugar induzida por injeção de formalina na pata de ratos (Tanimoto *et al.*, 2003). Ainda neste contexto, Manning e Mayer (1995) demonstraram que a lesão do núcleo central da amígdala atenuou a antinocicepção induzida por morfina em ratos submetidos ao teste de formalina na pata. Assim, é possível que o complexo amidalóide esteja envolvido na antinocicepção e nos comportamentos defensivos induzidos pelo LCEa e que a inativação desta estrutura atenuar estas respostas.

Para mapear substratos neurais de animais expostos a vários tipos de situações experimentais tem sido usada a avaliação imunistoquímica da proteína Fos, produzida pelo gene de expressão imediata c-fos. Neste sentido, a expressão da proteína Fos tem sido identificada em várias estruturas límbicas, incluindo a amígdala, de animais expostos ao LCE (Silveira *et al.*, 1993; Duncan *et al.*, 1996; Linden *et al.*, 2003; Salome *et al.*, 2004). Porém, ainda não existem dados demonstrando o padrão de ativação dos substratos neurais quando camundongos são expostos ao LCEa. No que diz respeito à indução de c-fos por estímulos nociceptivos, existem divergências entre os estudos que mostram o padrão de ativação do complexo amidalóide induzida por formalina na pata. Por exemplo, Nakagawa e colaboradores (2003) demonstraram que a injeção de formalina na pata de ratos aumentou a expressão de RNAm de c-fos nos núcleos lateral e basolateral da amígdala, mas não no central, enquanto Hayashi e colaboradores (2009) demonstraram que a injeção de formalina na pata de camundongos aumentou a expressão de Fos nos núcleos central e basolateral. Por outro lado, Rea e colaboradores (2011) demonstraram que não há diferença significativa na expressão de c-fos no núcleo central da amígdala na nocicepção induzida por formalina. Diante dessas evidências, as



investigações sobre o padrão de ativação da amígdala induzida por formalina na pata e de camundongos expostos ao LCEa parecem relevantes para a compreensão dos processos neurobiológicos envolvidos na antinocicepção induzida por aversão.

A amígdala contém diversos neurotransmissores e respectivos receptores com importantes implicações em estados emocionais (Davis, 1993; Castellano *et al.*, 2003; Mcgaugh, 2004). Dentre os neurotransmissores que desempenham um papel na mediação de respostas defensivas e antinociceptivas eliciadas por estímulos aversivos está o fator de liberação de corticotropina (CRF, do inglês “corticotrophin-releasing factor”) (Lariviere e Melzack, 2000; Carvalho-Netto *et al.*, 2007; Miguel e Nunes-De-Souza, 2011). O CRF é um peptídeo com 41 aminoácidos que ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e outras áreas encefálicas, como amígdala, *locus coeruleus* e MCP (Chen *et al.*, 1992; Carrasco e Van De Kar, 2003; Borelli e Brandao, 2008). Os mecanismos de ação do CRF se dão por sua interação com dois tipos de receptores, o CRF1 e o CRF2, que são acoplados ao sistema de segundos mensageiros via proteína G (Gs/Gq) (Chang *et al.*, 1993; Vita *et al.*, 1993; Lovenberg *et al.*, 1995; Perrin *et al.*, 1995). Resultados do nosso laboratório mostraram que receptores CRF 1, mas não CRF 2, exercem importante papel nos efeitos ansiogênico e antinociceptivo induzidos por CRF na MCP dorsal em camundongos (Miguel e Nunes-De-Souza, 2011). Além disso, Ji e colaboradores (2007) demonstraram que injeções do antagonista CRF 1 NBI27914 no núcleo central da amígdala, mas não do antagonista de CRF 2 astressin, inibem a resposta nociceptiva de ratos submetidos ao modelo de artrite induzida no joelho. Também é conhecido que a exposição de camundongos e ratos a estímulos estressores provoca aumento da liberação de CRF na amígdala (Cummings *et al.*, 1983; Merlo Pich *et al.*, 1995; Rodriguez De Fonseca *et al.*, 1997; Merali *et al.*, 1998; Cipriano *et al.*, 2016). Além disso, a amígdala é um dos maiores sítios extra-hipotalâmicos de receptores CRF 1 e, em menor escala, de CRF 2 (Dautzenberg e Hauger, 2002; Reul e Holsboer, 2002), caracterizando-a como um interessante substrato para os estudos envolvendo a mediação CRF-érgica.

Resultados recentes do nosso laboratório (Sorregotti *et al.*, 2013) demonstraram que camundongos expostos ao LCEa apresentaram comportamentos defensivos caracterizados por esticadas (*stretched attend postures: SAP*) e mergulhos (*head dipping*), os quais mostraram-se sensíveis ao estímulo nociceptivo. Uma vez que o CRF é liberado em resposta a estímulos estressores/aversivos e a amígdala parece ser um

importante substrato neural comum entre estado afetivo e dor (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Meagher *et al.*, 2001; Rhudy e Meagher, 2003; Neugebauer *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2007) é possível que as respostas antinociceptiva e ansiogênica eliciadas pela exposição de camundongos ao LCEa sejam mediadas por liberação endógena desse peptídeo nesta estrutura.

Diante das evidências apontadas acima, é possível que a inativação da amígdala, assim como a inibição da neurotransmissão CRF-érgica, atenua a aversão do LCEa e, portanto, a antinocicepção e os comportamentos defensivos induzidos pela exposição a este aparato. Dessa forma, em conjunto, os experimentos desse estudo são relevantes para a compreensão dos processos neurobiológicos envolvidos na antinocicepção induzida por aversão.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Geral**

Investigar o envolvimento, o padrão de ativação e a neurotransmissão CRFérgica do complexo amigdalóide nas reações de defesa e na antinocicepção induzida pela exposição a uma situação aversiva inata (labirinto em cruz elevado aberto).

### **2.2. Específicos**

- Investigar os efeitos da inativação do complexo amigdalóide na nocicepção em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.

- Investigar os efeitos da inativação do complexo amigdalóide nos comportamentos defensivos e na antinocicepção induzida por aversão em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa.

- Investigar os efeitos da injeção de formalina na pata sobre a marcação de proteína Fos no complexo amigdalóide de camundongos expostos a uma situação controle (caixa de vidro).

- Investigar os efeitos da exposição ao LCEa sobre a marcação de proteína Fos no complexo amigdalóide de camundongos.

- Investigar os efeitos de microinjeções intra-amígdala do antagonista de receptores do tipo 1 de CRF (CP 376395) nos comportamentos defensivos e na antinocicepção induzida por aversão em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos Suíços albinos machos (25-35g), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista, UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 e apagadas às 19:00) e tiveram livre acesso ao alimento e à água, exceto durante os curtos períodos de teste. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara - CEUA nº 14/2014.

#### **3.2. Cirurgia**

A fim de realizar microinjeções de fármacos diretamente no complexo amidalóide, realizou-se cirurgia estereotáxica semelhante ao procedimento descrito por Cornelio e Nunes-De-Souza (2007). Os camundongos receberam implantação intracraniana bilateral de cânulas guia (25 gauge) de 7,0 mm de comprimento, após anestesia com a combinação de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.). As cânulas foram fixadas no crânio do animal com cimento acrílico. No final da cirurgia, os animais receberam pentabiótico (56,7 mg/Kg i.m.) e o antiinflamatório flunixinina (0,5 mg/Kg). A princípio as coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula guia foram baseadas em estudos anteriores (Cornelio e Nunes-De-Souza, 2007; Barbalho *et al.*, 2009) bem como no Atlas de Paxinos e Franklin (2004), sendo posteriormente ajustadas de acordo com os resultados obtidos em testes (Cipriano *et al.*, 2016). Sendo assim, as coordenadas utilizadas foram 1,1 mm posterior ao bregma,  $\pm 3,1$  mm lateral à sutura mediana e 3,4 mm ventral à superfície craniana.

#### **3.3. Drogas utilizadas**

- cloreto de cobalto(II) hexahidratado ( $\text{CoCl}_2$ : bloqueador não seletivo de sinapses) diluído em salina (NaCl 0,9%) na dose de 1mM/0,1 $\mu$ l;
- CP 376395 nas doses de 0,375, 0,75 e 1,5 nmol/0,1 $\mu$ l, como antagonista seletivo de receptores de CRF1.

As doses utilizadas foram baseadas em estudos anteriores (Cipriano *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2016).

### **3.4. Administração das drogas**

A ponta da cânula guia foi posicionada + 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. A injeção dos fármacos foi feita através da inserção de uma agulha (33 gauge) de 8,0 mm de comprimento no interior da cânula guia. A agulha de injeção foi conectada, por meio de um tubo de polietileno (PE-10), a uma microsseringa Hamilton. Após a microinjeção, a agulha de injeção permaneceu por mais 45 segundos no interior da cânula guia e durante todo o procedimento o animal foi contido manualmente pelo experimentador com uso de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmou o fluxo da solução.

### **3.5. Teste de formalina na pata**

O teste de formalina é um modelo amplamente utilizado para avaliar comportamentos nociceptivos em roedores (Abbott *et al.*, 1995). A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva bifásica (Dubuisson e Dennis, 1977). A primeira fase (fásica) é observada nos primeiros 5 minutos, enquanto a segunda fase (tônica) inicia-se depois de 20 minutos da injeção de formalina e dura por volta de 40-50 minutos. A primeira fase é ocasionada predominantemente pela estimulação direta de nociceptores (Le Bars *et al.*, 2001) enquanto a segunda parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico injuriado, com mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinal (Tjolsen *et al.*, 1992; Mccall *et al.*, 1996). No presente estudo, os camundongos foram tratados com 50  $\mu$ L de solução de formalina a 2,5%, injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita.

### **3.6. Labirinto em Cruz Elevado Aberto**

O labirinto em cruz elevado aberto (LCEa) é similar àquele descrito por Lister (1987), contudo, consiste de quatro braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (Figura 1). Cada braço do LCEa foi dividido em duas partes, as quais foram denominadas áreas proximais (10x5cm) e extremidades [união das áreas intermediárias e distais (20x5cm)] em relação ao centro (Sorregotti *et al.*, 2013). Ressalta-se que assim como o LCE padrão, este modelo baseia-se na aversão natural de roedores a espaços abertos.



**Figura 1:** Camundongo exposto ao labirinto em cruz elevado aberto (LCEa)

### 3.7. Avaliação das medidas espaço-temporais e complementares

Foram analisadas as medidas espaço-temporais [tempo em cada região dos braços (centro, regiões proximais e extremidades) e frequência total de entradas], medidas complementares [frequência total de esticadas (*stretched attend posture*- SAP): o animal estica o corpo sem movimentar as patas traseiras e volta à posição inicial; frequência de mergulhos nos braços (*head dipping* – HD): animal estica a cabeça e pescoço para fora do labirinto em direção ao solo; e duração total (em segundos) de andar agachado (*flatback* - FB): animal movimenta-se com o corpo esticado, com o abdômen e tórax em contato com o assoalho do labirinto]; e tempo (em segundos) de lambidas na pata (Blanchard *et al.*, 1993; Dalvi e Rodgers, 1996; Nunes-De-Souza *et al.*, 2002; Borelli e Brandao, 2008; Sorregotti *et al.*, 2013).

Os comportamentos foram gravados e posteriormente avaliados por um observador treinado utilizando o software “X-plo-rat 2005” desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP.

### 3.8. Labirinto em Cruz Elevado Fechado

O LCE fechado (LCEf) é similar àquele descrito por Lister (1987), contudo, consiste de quatro braços com paredes laterais (fechados) (30 x 5 x 15 cm) elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (Figura 2). Este aparato foi utilizado como situação controle do LCEa. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala com baixa iluminação (50 lux, no nível do assoalho do aparato).



**Figura 2:** Labirinto em cruz elevado fechado

### **3.9. Caixa de vidro**

A caixa de vidro (30 x 20 x 25 cm) consiste em um ambiente potencialmente não aversivo (neutro) para os camundongos (Figura 3). Este aparato foi utilizado como situação controle para o registro do tempo de lambidas na pata tratada com formalina.



**Figura 3:** Camundongo exposto à caixa de vidro

### **3.10. Histologia**

Ao final do experimento envolvendo microinjeção, todos os animais foram anestesiados e perfundidos com uma solução de paraformaldeído (4%), seguida pela injeção intra-amídala de uma solução de 1% de azul de metileno. Os animais foram então decapitados, seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para sofrerem seções coronais ao longo do trajeto da cânula com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850). As seções foram inspecionadas com o uso de uma lupa (Leica DM LB) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção.

### **3.11. Imunoistoquímica**

Noventa minutos após os testes, os camundongos foram anestesiados e perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (PBS), seguido por paraformaldeído 4%. Os encéfalos removidos foram pós-fixados em paraformaldeído por 2h e transferidos para solução de sacarose 30% em PBS 4°C. Após 2 dias, os encéfalos foram congelados em gelo seco em pó por 1h e mantidos em -80°C até serem fatiados em fatias coronais de 35µm de espessura no criostato. Cabe ressaltar que foi

feita uma marcação, com uma agulha, no lado direito dos encéfalos com o propósito de investigar a presença ou não de lateralização. As fatias contendo a região encefálica de interesse (amígdala) foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) em PBS e incubadas em solução bloqueadora (soro de cabra 3% e Triton X-100 0,25% dissolvidos em PBS) por uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio as fatias foram incubadas com anticorpo anti-Fos (diluição 1:2000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA; produzido em coelho), em solução bloqueadora por 24 horas, à 4°C. Após essa incubação, as fatias foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (diluição 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS-Tx (Triton X-100 0,25%) e soro de cabra 3%, por 2 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS por 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas por 1 hora em solução de avidina-biotina-peroxidase (ABC Elite kit, PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), Triton X-100 0,5% e PBS. Na sequência, as fatias foram lavadas 3 vezes (10 minutos cada lavagem) e incubadas em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por aproximadamente 7 minutos. Finalmente, foram lavadas 4 vezes (5 minutos cada lavagem), transferidas para solução de PBS e montadas em lâminas gelatinizadas. Após a secagem, as lâminas foram hidratadas em água destilada e, em seguida, desidratadas em gradiente seriado de titulações crescentes de etanol (30%, 60%, 90%, 95% e 100%) e xilol (LabSynth, São Paulo, Brasil). Por fim, foram cobertas com Permount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MA, EUA) e lamínulas.

A imunomarcção de Fos foi capturada através de uma câmera acoplada a um microscópio (Zeiss Axioskop 2). Foram capturadas 4 imagens por hemisfério [denominados D (direito) e E (esquerdo)] por camundongos e as células positivas para Fos foram contadas utilizando o programa Axio Vision Rel., versão 4.8. O valor de células positivas para cada animal representa a média das 4 imagens.

### **3.12. Procedimentos**

#### **3.12.1. Experimento 1: Investigação da participação do complexo amidalóide na antinociceção e reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa.**

### **3.12.1.1. Experimento 1A: Investigação dos efeitos da inativação do complexo amigdalóide na nociceção em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.**

Cinco dias após a cirurgia de implante de cânula na amígdala, os camundongos foram tratados com formalina injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita. Após 15 minutos da injeção de formalina, os animais receberam microinjeção bilateral de salina ou cloreto de cobalto e, após 10 minutos, foram expostos à caixa de vidro por 10 minutos para registro do tempo (em segundos) de lambidas na pata a fim de investigar os efeitos da inativação da amígdala na nociceção.

### **3.12.1.2. Experimento 1B: Investigação dos efeitos da inativação do complexo amigdalóide na antinociceção e reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa: influência da dor.**

O protocolo do Experimentos 1B foi semelhante ao Experimento 1A, exceto que, ao invés de serem expostos à caixa de vidro, os animais foram expostos ao LCEa: cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os camundongos receberam formalina na superfície dorsal da pata traseira direita e, 15 minutos depois, cada animal recebeu salina ou cloreto de cobalto intra-amígdala. Dez minutos após a injeção intra-amígdala, todos os animais foram expostos ao LCEa por 10 minutos para avaliação do tempo de lambidas na pata e das medidas espaço-temporais e complementares (para detalhes, ver seção 3.7).

### **3.12.1.3. Experimento 1C: Investigação dos efeitos da inativação do complexo amigdalóide nas reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa.**

O protocolo do Experimentos 1C foi semelhante ao Experimento 1B, exceto que os animais não receberam formalina na pata antes de serem expostos ao LCEa: cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os camundongos receberam salina ou cloreto de cobalto intra-amígdala. Dez minutos após a injeção intra-amígdala, todos os animais foram expostos ao LCEa por 10 minutos para avaliação das medidas espaço-temporais e complementares (para detalhes, ver seção 3.7).



### **3.12.2. Experimento 2: Investigação do padrão de ativação da amígdala de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa.**

Com o propósito de investigar o padrão de ativação da amígdala quando camundongos são submetidos ao teste de formalina na pata ou são expostos ao LCEa, foi realizado o Experimento 2. Ainda, este experimento foi delineado para avaliar eventuais diferenças na ativação neuronal na amígdala localizada nos hemisférios esquerdo e direito, bem como do envolvimento dos diferentes subnúcleos amigdalóides: núcleos central e basolateral.

Após 10 dias de habituação [conduzida pela manipulação diária dos animais e exposição a caixa de vidro ou LCEf (Martinez et al., 2008)], os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: grupos 1 e 2, animais receberam (grupo 1) ou não (grupo 2) injeção de formalina na pata e foram expostos a caixa de vidro (ambiente potencialmente não aversivo) por 35 minutos; grupos 3 e 4, animais foram expostos ao LCEa (grupo 3) ou LCEf (grupo 4) por 10 minutos. Noventa minutos após o teste, todos os animais foram perfundidos e os encéfalos removidos e processados para a imunistoquímica de Fos.

Paralelamente a esses grupos, a fim de se investigar o padrão de ativação basal de Fos, foi adicionado um grupo (basal), cujos animais foram retirados da caixa moradia e imediatamente perfundidos, os encéfalos removidos e processados para a imunistoquímica de Fos.

### **3.12.3. Experimento 3: Investigação do envolvimento dos receptores CRF1 da amígdala na antinocicepção e reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa.**

#### **3.12.3.1. Experimento 3A: Investigação dos efeitos da microinjeção do antagonista de CRF1 (CP376395) na amígdala na nocicepção de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.**

Cinco a sete dias após a cirurgia de implante de cânula na amígdala, os camundongos foram tratados com 50 µl de solução de formalina a 2,5%, injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita. Após 15 minutos da injeção de formalina, os animais receberam microinjeção de salina ou CP376395 (antagonista de receptor CRF1) e, após 10 minutos, foram expostos a caixa de vidro por

10 minutos para registro do tempo (em segundos) de lambidas na pata. Com este visou-se obter uma curva dose-resposta do CP 376395, nas doses 0,375, 0,75 e 1,5 nmol.

### **3.12.3.2. Experimento 3B: Investigação dos efeitos da microinjeção do antagonista de CRF1 (CP376395) na amídala na antinociceção e reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa: influência da dor.**

O protocolo do Experimento 3B foi semelhante ao Experimento 3A, exceto que, ao invés de serem expostos à caixa de vidro, os animais foram expostos ao LCEa: cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os camundongos receberam formalina na superfície dorsal da pata traseira direita e, 15 minutos depois, cada grupo recebeu salina ou CP376395 na dose 1,5 nmol/0,1 µl (obtida previamente). Dez minutos após a injeção intra-amídala, todos os animais foram expostos ao LCEa por 10 minutos para avaliação do tempo de lambidas e das medidas espaço-temporais e complementares.

### **3.12.3.3. Experimento 3C: Investigação dos efeitos da microinjeção do antagonista de CRF1 (CP376395) na amídala nas reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa.**

O protocolo do Experimentos 3C foi semelhante ao Experimento 3B, exceto que os animais não receberam formalina na pata antes de serem expostos ao LCEa: cinco dias após a cirurgia estereotáxica, os camundongos receberam salina ou CP376395 na dose 1,5 nmol/0,1 µl (obtida previamente). Dez minutos após a injeção intra-amídala, todos os animais foram expostos ao LCEa por 10 minutos para avaliação das medidas espaço-temporais e complementares.

## **3.13. Análises Estatísticas**

Inicialmente todos os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene.

### **Experimento 1A:**

Para a análise do efeito da inativação da amídala sobre o tempo total de lambidas na pata de camundongos submetidos ao teste de formalina e sobre tempo registrado a cada 2 minutos foram utilizados o teste *t* de Student e a ANOVA bifatorial para medidas repetidas (fator 1: tratamento; fator 2: tempo), respectivamente.

Para a análise do efeito da inativação uni ou bilateral da amígdala sobre o tempo de lambidas na pata de animais submetidos ao teste de formalina foi utilizada a ANOVA unifatorial (fator tratamento).

#### **Experimentos 1B e 1C:**

Para análise do efeito da inativação do complexo amígdaloide na antinocicepção e comportamentos defensivos de camundongos submetidos ou não ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa foi utilizado o teste *t* de Student.

#### **Experimento 2:**

Para análise da marcação média de Fos ( $\text{mm}^2$ ) nos hemisférios direito e esquerdo do complexo amígdaloide de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e de camundongos expostos ao LCEf ou ao LCEa foi utilizada a ANOVA bifatorial [fator 1 - condição: basal, caixa de vidro, formalina, LCEf ou LCEa; fator 2 - hemisfério: direito (D) ou esquerdo (E)].

Para análise do padrão de ativação dos núcleos CeA e BLA foi utilizada a ANOVA bifatorial [fator 1 - condição: basal, caixa de vidro, formalina, LCEf ou LCEa; fator 2 - núcleo: basolateral (BLA) ou central (CeA)].

#### **Experimento 3A:**

Para análise do efeito das diferentes doses do antagonista de CRF1 (CP 376395 nas doses 0,375, 0,75 e 1,5 nmol) na nocicepção (tempo total de lambidas na pata) de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos a caixa de vidro foi utilizada a ANOVA unifatorial (fator tratamento).

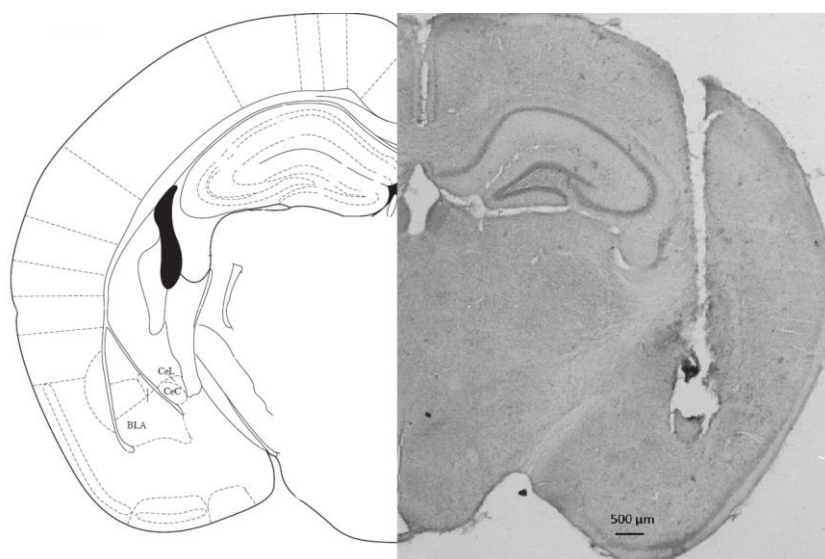
#### **Experimentos 3B e 3C:**

Para análise do efeito da dose 1,5 nmol de CP 376395 na amígdala sobre a antinocicepção e comportamentos defensivos de camundongos submetidos ou não ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa foi utilizado o teste *t* de Student.

Nos casos aonde foram detectadas diferenças pela ANOVA, a análise prosseguiu com o teste post hoc de comparações múltiplas de Duncan. Valores de *p* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

#### 4. Resultados

Todos os sítios de injeção foram confirmados pela análise histológica dos cortes da amígdala. A Figura 4 mostra uma representação esquemática (esquerda) e uma fotomicrografia (direita) de um sitio de injeção na amígdala de um camundongo representativo. As secções ocorreram a 1.10 mm anterior ao bregma (Paxinos e Franklin, 2001).

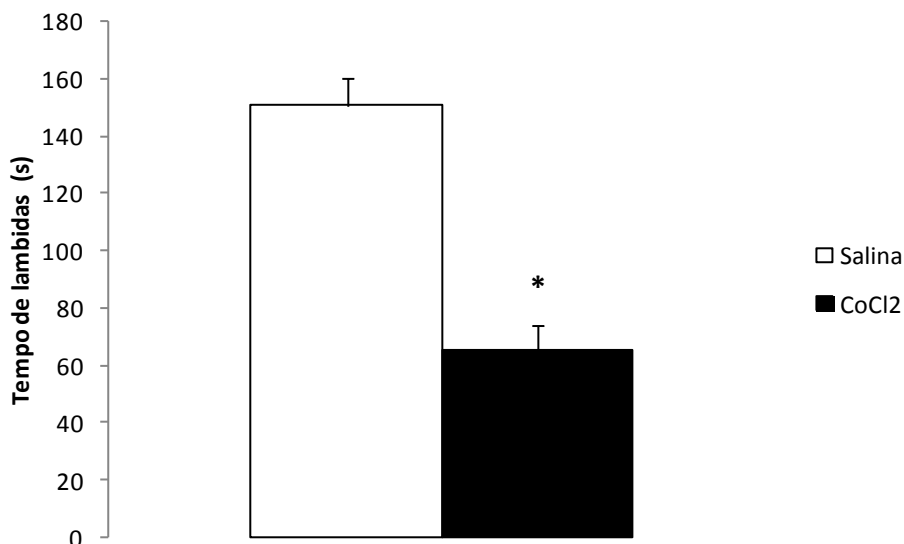


**Figura 4:** Representação esquemática (esquerda) e fotomicrografia de uma secção coronal (direita) mostrando um sítio de injeção na amígdala de um camundongo representativo.

#### 4.1. Experimento 1: Papel do complexo amigdalóide na resposta nociceptiva e nas reações de defesa de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa.

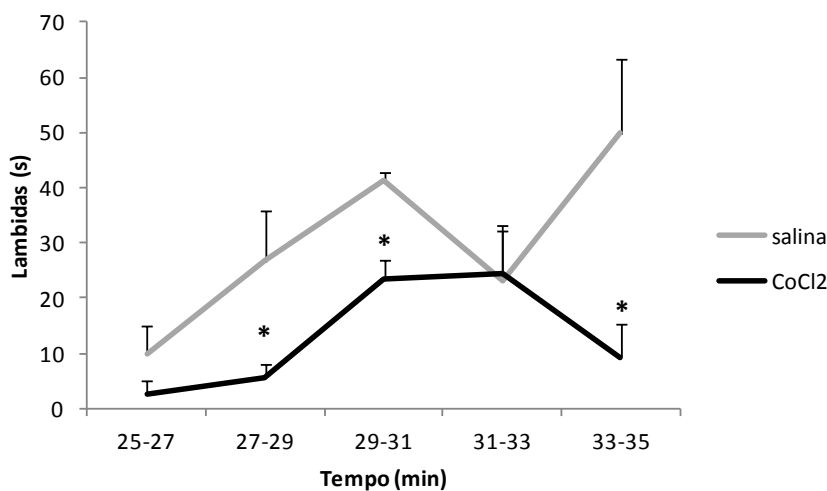
##### 4.1.1. Experimento 1A: Atenuação da resposta nociceptiva provocada pela inativação bilateral do complexo amigdalóide em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.

A Figura 5 mostra o efeito da inativação do complexo amigdalóide sobre o tempo total de lambidas de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos a caixa de vidro (ambiente seguro). O teste  $t$  de Student revelou que a inativação da amígdala diminuiu significativamente o tempo total de lambidas na pata [ $t_{(8)} = 6,69$ ;  $p < 0,01$ ].



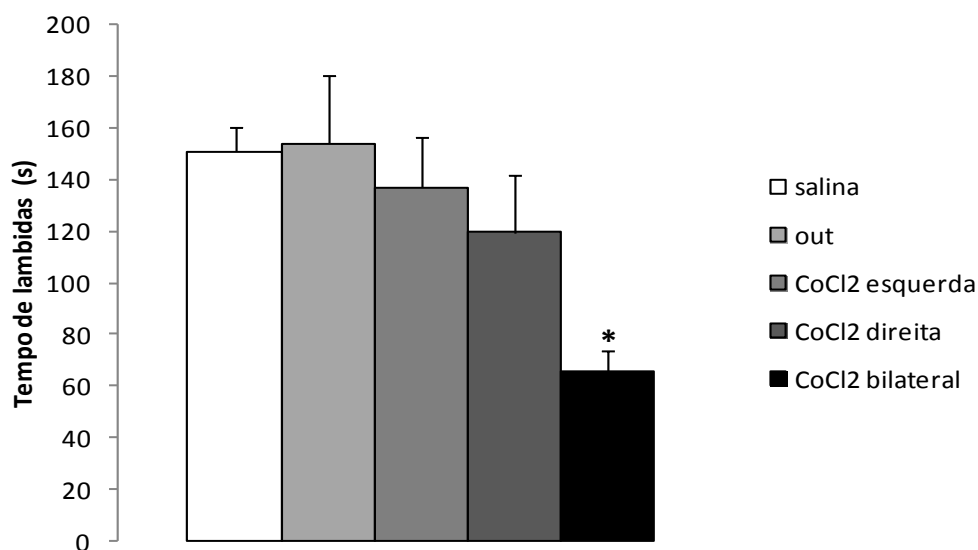
**Figura 5:** Efeito da inativação do complexo amidoalóide sobre o tempo de lambidas na pata tratada com formalina 2,5%. \* $p < 0,01$  versus salina. Barras = média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).  $N = 5$

O efeito da inativação do complexo amidoalóide sobre tempo de lambidas, registrado em intervalos de 2 minutos, de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata expostos a caixa de vidro (ambiente seguro) pode ser observado na Figura 6. A ANOVA bifatorial para medidas repetidas (fator 1: tratamento; fator 2: tempo) revelou efeitos significativos para tratamento [ $F_{1,8} = 44,81$ ,  $p < 0,01$ ] e tempo [ $F_{4,32} = 3,75$ ,  $p < 0,05$ ], mas não para interação tratamento x tempo [ $F_{4,32} = 2,10$ ,  $p > 0,05$ ]. O teste de Duncan indicou que a inativação da amígdala promove uma diminuição no tempo de lambidas da pata pelos camundongos nos tempos 27 a 31 minutos e 33 a 35 minutos.



**Figura 6:** Curva temporal do efeito da inativação do complexo amidoalóide sobre o tempo de lambidas na pata tratada com formalina 2,5%. Os dados são representados em intervalos de 2 minutos. \* $p < 0,05$  versus salina. Barras = média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).  $N = 5$ .

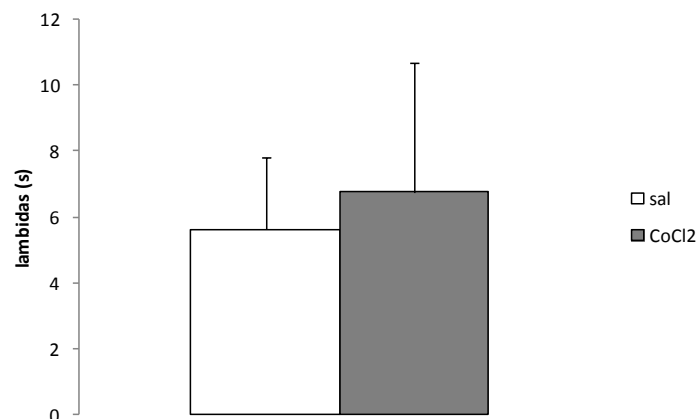
Na Figura 7 observa-se o tempo total de lambidas de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e que receberam salina ou  $\text{CoCl}_2$  intra-amídala uni/bilateralmente. Os resultados também mostram o grupo “out”, cujas injeções acertaram bilateralmente outras regiões, que não a amídala. A ANOVA unifatorial mostrou que apenas o grupo que teve a inativação bilateral do complexo amigdaloide apresentou uma diminuição significativa do tempo total de lambidas [ $F_{4,20}=3,79$ ,  $p<0,01$ ].



**Figura 7:** Efeito da inativação uni ou bilateral da amídala sobre o tempo de lambidas na pata de animais submetidos ao teste de formalina. \* $p<0,05$  versus todos os grupos. Barras = média  $\pm$  EPM (erro padrão da média).  $N = 5$  para grupos salina,  $\text{CoCl}_2$  bilateral e  $\text{CoCl}_2$  amídala direita;  $N=6$  para grupo out;  $N=4$  para  $\text{CoCl}_2$  amídala esquerda.

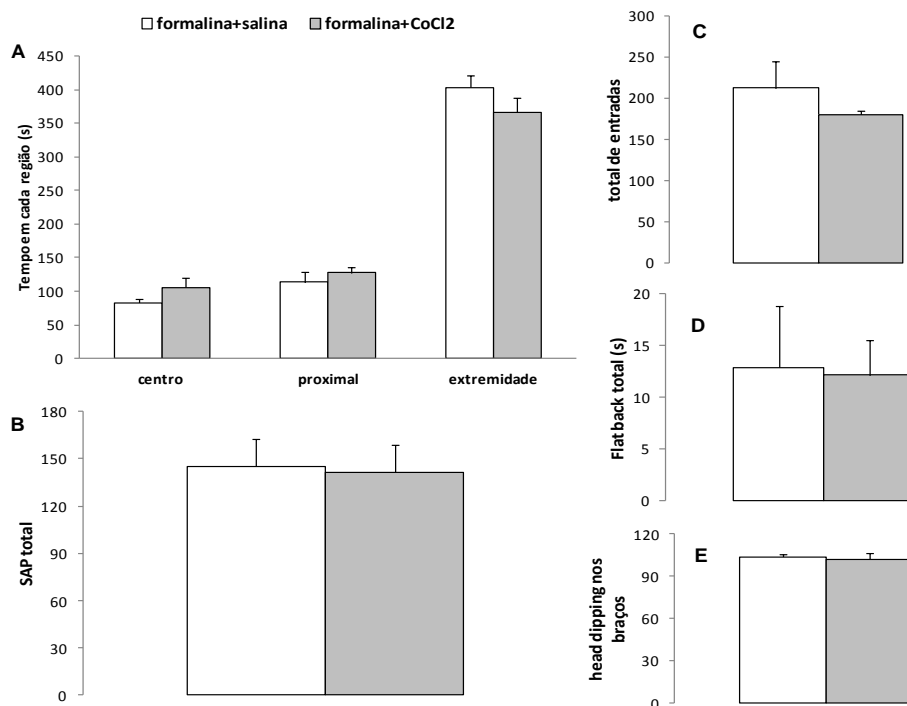
#### 4.1.2. Experimento 1B: Ausência de efeitos da inativação do complexo amigdaloide sobre a antinociceção e reações de defesa apresentadas por camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo.

A Figura 8 ilustra o efeito da inativação do complexo amigdaloide sobre a nociceção (tempo de lambidas na pata) de camundongos submetidos ao teste de formalina e expostos ao LCEa. O test  $t$  de Student não revelou efeitos significativos do tratamento com  $\text{CoCl}_2$  na antinociceção induzida por aversão em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa [ $t_{(7)} = 0,45$ ;  $p>0,05$ ].



**Figura 8:** Ausência de efeito da inativação do complexo amigdaloide na antinocicepção induzida por aversão em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa. Barras = média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). N = 5 para grupo salina; N=6 para grupo CoCl<sub>2</sub>.

Os efeitos da inativação da amígdala sobre os comportamentos defensivos de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa pode ser observada através da Figura 9. O test *t* de Student não revelou efeitos significativos do tratamento com CoCl<sub>2</sub> nas reações de defesa induzidas pela exposição de camundongos ao LCEa [tempo de permanência no centro  $t_{(9)} = -1,42$ ; áreas proximais  $t_{(9)} = -0,82$  e extremidades do LCEa  $t_{(9)} = 1,24$  (A); frequência de SAP total  $t_{(9)} = 0,15$  (B); total de entradas  $t_{(9)} = 1,07$  (C); flatback total  $t_{(9)} = 0,11$  (D) e head dipping no braços  $t_{(9)} = 0,06$  (E)].

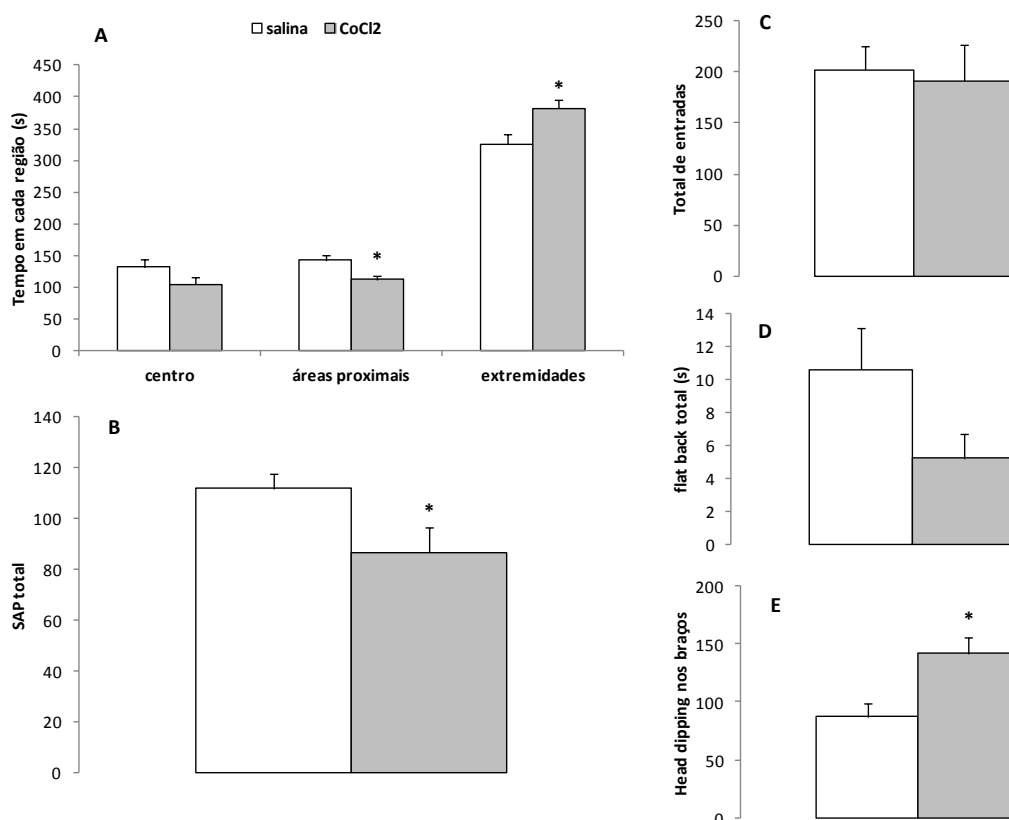


**Figura 9:** Ausência de efeito do tratamento do CoCl<sub>2</sub> sobre o tempo de permanência no centro, nas áreas proximais e extremidades do LCEa (A), frequência de SAP (B); total de entradas (C);

tempo total de flatback (D) e head dipping nos braços (E) de camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo. Barras = média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). N = 5 para grupo salina; N=6 para grupo CoCl<sub>2</sub>.

#### 4.1.3. Experimento 1C: Efeitos da inativação do complexo amigdaloide nos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa.

A Figura 10 mostra os efeitos do tratamento com CoCl<sub>2</sub> sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa. O teste *t* de Student revelou que a inativação da amígdala diminuiu o tempo de permanência dos animais nas áreas proximais do LCEa [ $t_{(17)} = 2,97$ ;  $p < 0,05$ ; Fig. 10A], assim como a frequência total de SAP [ $t_{(17)} = 2,17$ ;  $p < 0,05$ ; Fig. 10B]. Além disso, o tratamento com CoCl<sub>2</sub> promoveu um aumento do tempo em que os animais permaneceram nas extremidades do LCEa [ $t_{(17)} = -2,60$ ;  $p < 0,05$ ; Fig. 10A] e de head dipping nos braços [ $t_{(17)} = -3,06$ ;  $p < 0,05$ ; Fig. 10E]. A análise estatística não revelou efeitos significativos ( $p > 0,05$ ) para o tempo gasto centro do LCEa (Fig.10A) e tempo total de flatback (Fig.10D).



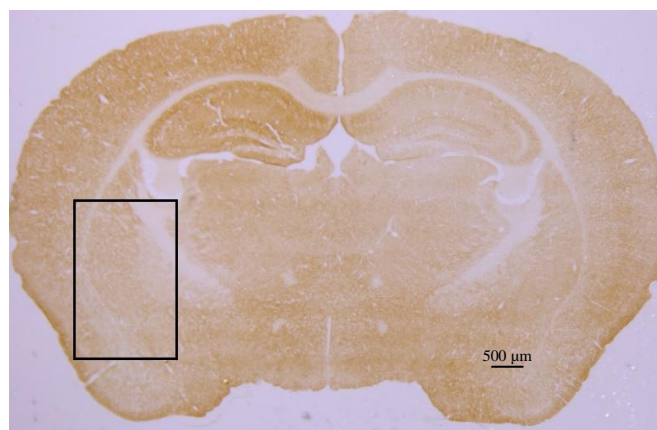
**Figura 10:** Efeitos da inativação da amígdala sobre os comportamentos defensivos [tempo de permanência no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (A); frequência de SAP total (B); total de entradas (C); flatback total (D); e head dipping nos braços (E)] de camundongos expostos ao LCEa. Barras = média  $\pm$  EPM. N = 11 para grupo salina; N= 8 para grupo CoCl<sub>2</sub>; \* $p < 0,05$  versus salina.



## 4.2. Experimento 2: Padrão de ativação da amígdala: quantificação de células positivas para Fos da amígdala de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa.

### 4.2.1. Quantificação de células positivas para Fos nos hemisférios direito e esquerdo da amígdala de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa: ausência de lateralização funcional.

A Figura 11 mostra um corte representativo do encéfalo, indicando o complexo amigdaloide, onde foram quantificadas as células positivas para Fos.



**Figura 11:** Corte representativo do complexo amigdaloide, onde foram quantificadas as células positivas para a proteína Fos.

A marcação média de Fos ( $\text{mm}^2$ ) nos hemisférios direito (D) e esquerdo (E) do complexo amigdaloide de camundongos submetidos (grupo formalina) ou não (grupo caixa de vidro) ao teste de formalina na pata, e de camundongos expostos ao LCEf ou ao LCEa pode ser observada na Tabela 1. Além desses quatro grupos, há um grupo basal, cujos animais não receberam formalina nem foram expostos aos labirintos. A ANOVA bifatorial revelou diferenças significativas na marcação de células positivas para Fos para o fator condição ( $F_{4,74} = 6,51$ ;  $p < 0,05$ ). Porém, não mostrou diferenças significativas para o fator hemisfério ( $F_{1,74} = 0,34$ ;  $p > 0,05$ ) e interação condição x hemisfério ( $F_{4,74} = 0,02$ ;  $p > 0,05$ ). O teste de Duncan mostrou que os animais submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa tiveram ativação da proteína Fos igualmente aumentada nos dois hemisférios quando comparados aos grupos basal, caixa de vidro e LCEf.

Tabela 1: Número de células positivas para Fos (mm<sup>2</sup>) nos hemisférios direito e esquerdo da amígdala de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata (grupo formalina), e de camundongos expostos à caixa de vidro, ao LCEf ou ao LCEa. O grupo basal não recebeu formalina ou foi exposto aos labirintos.

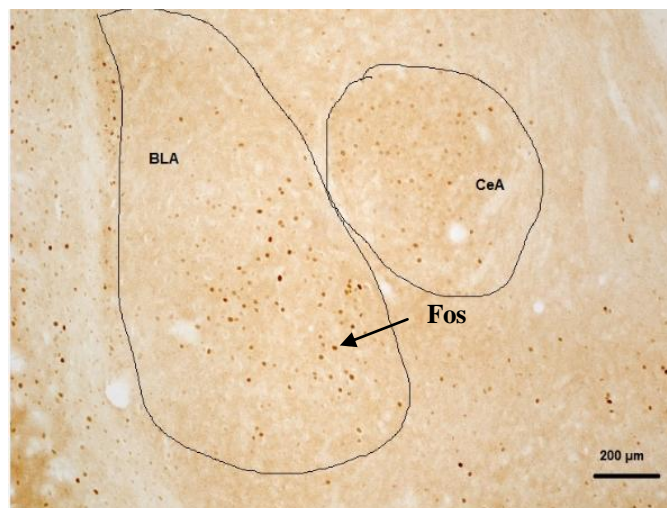
Grupos	Hemisférios	Fos/mm <sup>2</sup>
Basal (n=9)	Esquerdo	83,74±15
	Direito	95,87±22
Caixa de vidro (n=7)	Esquerdo	91,79±13
	Direito	99,54±19
LCEf (n=8)	Esquerdo	80,95±15
	Direito	87,77±18
Formalina (n=8)	Esquerdo	169,98*±26
	Direito	184,07*±37
LCEa (n=9)	Esquerdo	137.84*±18
	Direito	139.24*±14

\*p<0.05 versus hemisférios direito e esquerdo dos grupos basal, caixa de vidro e LCEf.

#### 4.2.2. Quantificação de células positivas para Fos nos núcleos BLA e CeA da amígdala: aumento da expressão de Fos promovido pelo estímulo nociceptivo e pela exposição ao LCEa.

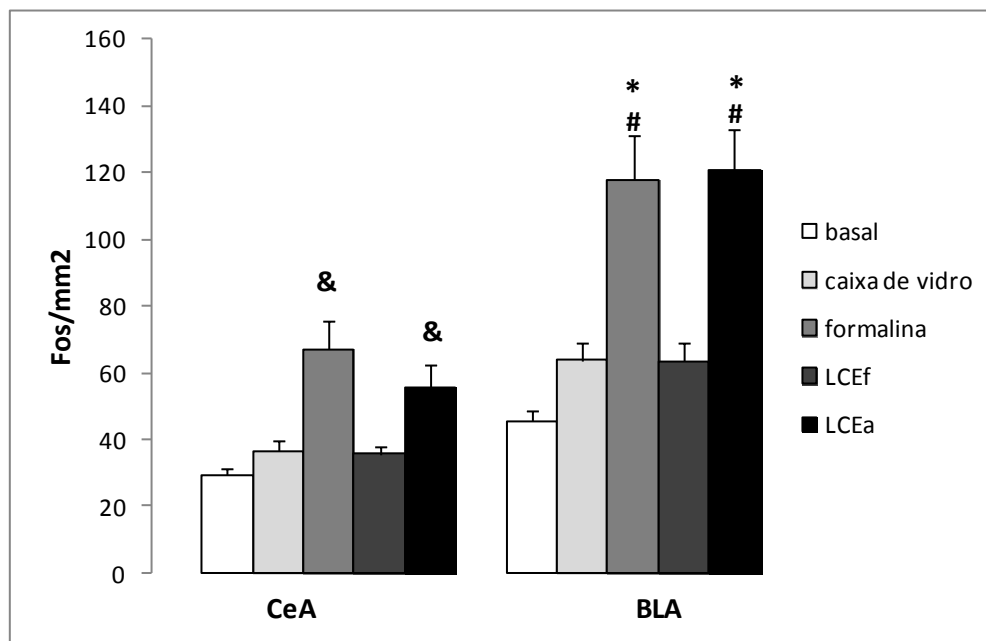
Uma vez que não houve diferença de ativação entre os hemisférios direito e esquerdo da amígdala, para quantificar as células positivas nos núcleos BLA e CeA foi considerado o número total de células positivas para Fos.

A Figura 12 mostra um corte representativo do complexo amidalóide, indicando os núcleos BLA e CeA da amígdala de camundongos, onde foram quantificadas as células positivas para Fos.



**Figura 12:** Corte representativo da amígdala, indicando os núcleos basolateral (BLA) e central (CeA) da amígdala de camundongos, onde foram quantificadas as células positivas para Fos.

A Figura 13 ilustra células positivas para a proteína Fos (mm<sup>2</sup>) nos núcleos basolateral (BLA) e central (CeA) da amígdala de camundongos do grupo basal, de camundongos submetidos (grupo formalina) ou não (grupo caixa de vidro) ao teste de formalina na pata, e de camundongos expostos ao LCEf ou ao LCEa. A ANOVA bifatorial [fator 1 - condição: basal, caixa de vidro, formalina, LCEf ou LCEa; fator 2 - núcleo: basolateral (BLA) ou central (CeA)] revelou efeitos significativos para os fatores condição ( $F_{4,76} = 20,19$ ,  $p < 0,05$ ), núcleo ( $F_{1,76} = 54,16$ ,  $p < 0,05$ ) e interação condição x núcleo ( $F_{4,76} = 3,09$ ,  $p < 0,05$ ). O teste de Duncan mostrou que os animais submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa apresentaram um aumento do número de células positivas para Fos nos núcleos CeA e BLA quando comparados aos demais grupos, sendo que esse aumento foi significativamente maior para o núcleo BLA.

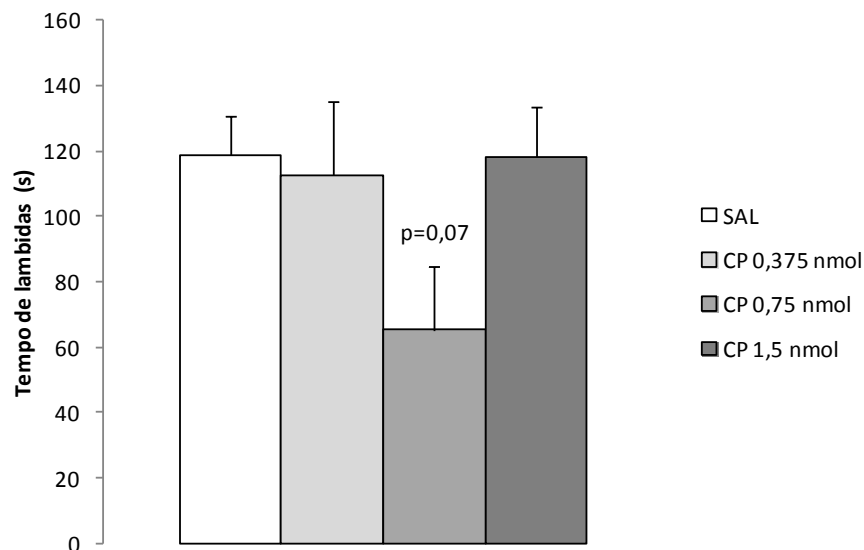


**Figura 13:** Células positivas para a proteína Fos nos núcleos central (CeA) e basolateral (BLA) da amígdala de camundongos do grupo basal; expostos a caixa de vidro; submetidos ao teste de formalina na pata; expostos ao labirinto em cruz elevado fechado (LCEf) ou aberto (LCEa). \* $p < 0,05$  versus grupo CeA; # $p < 0,05$  versus todos os grupos; & $p < 0,05$  versus basal, caixa de vidro e LCEf (CeA).

#### 4.3. Experimento 3: Avaliação da participação da neurotransmissão CRF-érgica na amígdala nas respostas nociceptiva e reações de defesa de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa.

##### 4.3.1. Experimento 3A: Curva dose-resposta do CP376395, antagonista dos receptores de CRF1, intra-amídala sobre a nociceção de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata.

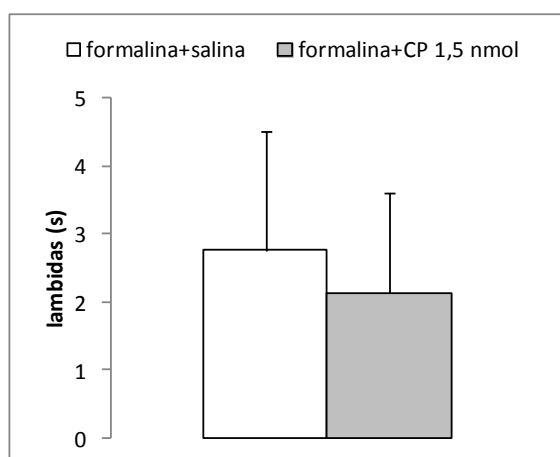
A Figura 14 mostra os efeitos das doses 0,375, 0,75 e 1,5 nmol de CP376395 intra-amídala na nociceção de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos a caixa de vidro. A ANOVA unifatorial não revelou diferenças significativas das doses 0,375, 0,75 e 1,5 nmol no tempo de lambidas na pata ( $F_{3,34} = 1,74$ ,  $p = 0,18$ ).



**Figura 14:** Avaliação dos efeitos da microinjeção intra-amídala do antagonista dos receptores de CRF1, CP376395, sobre o tempo de lambidas (s) na pata de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos a caixa de vidro (ambiente seguro). Barras = média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). N = 6 para os grupos salina e CP 0,75 nmol; N=8 para os grupos CP 0,375 e CP 1,5 nmol.

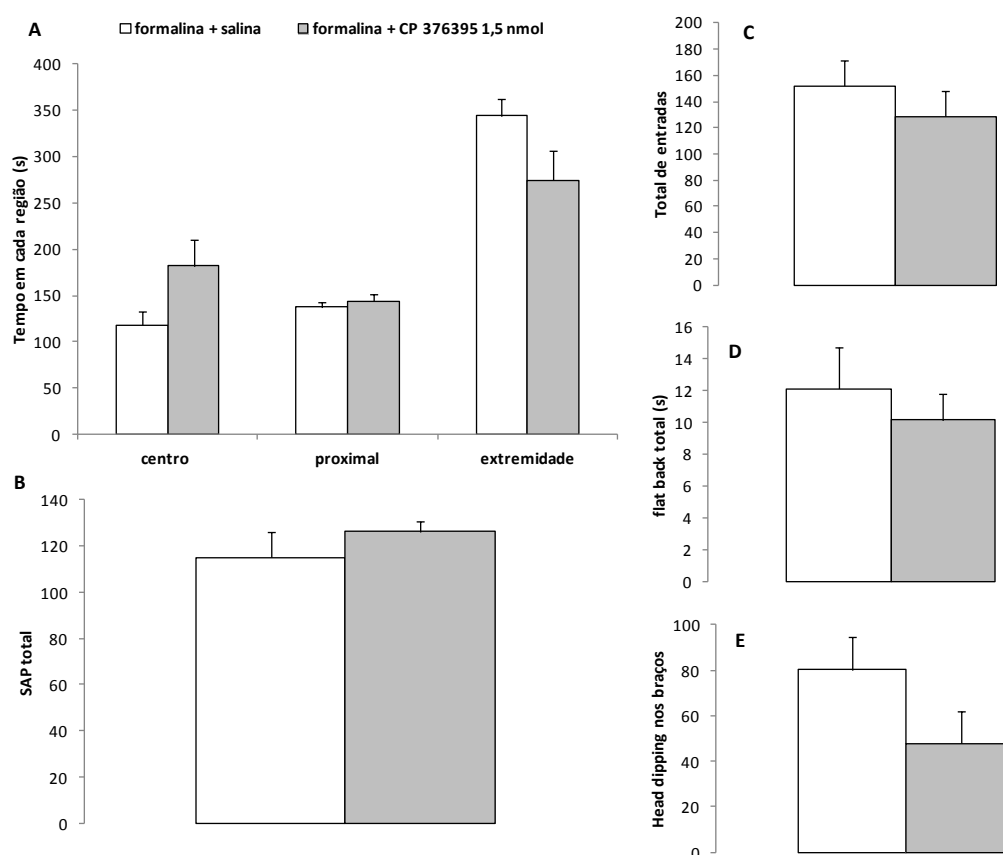
#### 4.3.2. Experimento 3B: Ausência de efeitos da microinjeção intra-amídala de CP 376395 sobre a antinociceção e comportamentos defensivos em camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo.

A Figura 15 ilustra a ausência de efeitos da microinjeção intra-amídala de CP 376395 na dose de 1,5 nmol sobre a antinociceção de camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo.



**Figura 15:** Ausência de efeito da microinjeção de CP376395 intra-amídala na antinociceção induzida por aversão em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa. Barras = média  $\pm$  EPM (erro padrão da média). N = 6 para grupo salina; N=7 para grupo CP 1,5 nmol.

Os efeitos do bloqueio de receptores de CRF1 da amígdala sobre os comportamentos defensivos apresentados por camundongos expostos ao LCEa, sob estímulo nociceptivo, estão ilustrados na Figura 16. O test *t* de Student não revelou efeitos significativos do tratamento com  $\text{CoCl}_2$  em nenhum dos comportamentos avaliados em camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo [tempo de permanência no centro  $t_{(11)} = -1,96$ ; áreas proximais  $t_{(11)} = -0,66$  e extremidades do LCEa  $t_{(11)} = -1,86$  (A); frequência de SAP total  $t_{(11)} = -0,93$  (B); total de entradas  $t_{(11)} = 0,85$  (C); flatback total  $t_{(11)} = 0,63$  (D) e head dipping no braços  $t_{(11)} = 1,62$  (E)].

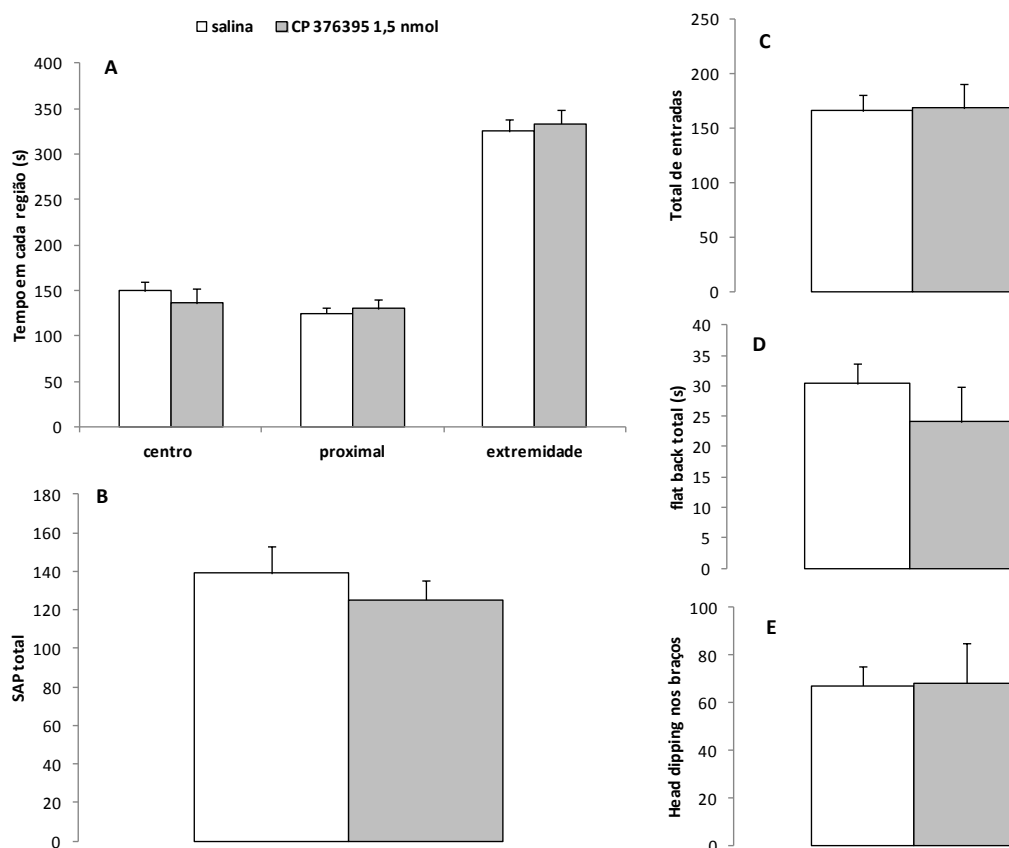


**Figura 16:** Ausência de efeitos da microinjeção intra-amígdala de CP376395 na dose 1,5 nmol sobre os comportamentos defensivos [tempo de permanência no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (A); frequência de SAP total (B); total de entradas (C); flatback total (D) e head dipping no braços (E)] de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa. Barras = média  $\pm$  EPM. N = 6 para o grupo formalina+salina; N=7 para grupo formalina+CP 1,5 nmol.

#### 4.3.3. Ausência de efeitos da microinjeção intra-amígdala de CP 376395 sobre os comportamentos defensivos apresentados por camundongos expostos ao LCEa.

A Figura 17 mostra a ausência de efeitos do tratamento com CP 376395 sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa. O test *t* de Student não

revelou efeitos significativos do tratamento com CP 376395 em nenhum dos comportamentos avaliados em camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo [tempo de permanência no centro  $t_{(10)} = 0,66$ ; áreas proximais  $t_{(10)} = -0,42$  e extremidades do LCEa  $t_{(10)} = -0,40$  (A); frequência de SAP total  $t_{(10)} = 0,78$  (B); total de entradas  $t_{(10)} = -0,08$  (C); flatback total  $t_{(10)} = 0,93$  (D) e head dipping no braços  $t_{(10)} = -0,062$  (E)].



**Figura 17:** Ausência de efeitos da microinjeção intra-amídala de CP376395 na dose 1,5 nmol sobre os comportamentos defensivos [tempo de permanência no centro, áreas proximais e extremidades do LCEa (A); frequência de SAP total (B); total de entradas (C); flatback total (D) e head dipping no braços (E)] de camundongos expostos ao LCEa. Barras = média  $\pm$  EPM. N = 6.

## 5. Discussão

A busca por um modelo animal para o estudo da neurobiologia da antinocicepção induzida pelo medo nos levou ao emprego do labirinto em cruz elevado aberto, uma versão modificada do labirinto em cruz elevado. Além da intensa resposta antinociceptiva, camundongos expostos ao LCEa também apresentam elevadas concentrações de corticosterona plasmática (Mendes-Gomes *et al.*, 2011) e comportamentos defensivos (Sorregotti *et al.*, 2013), confirmando a natureza aversiva deste ambiente. Entretanto, a modulação da resposta antinociceptiva ainda não está totalmente esclarecida. Assim, nosso objetivo principal foi de avaliar substratos e neurotransmissores subjacentes a antinocicepção desencadeada pela exposição de camundongos a situações ameaçadoras ou de perigo. Evidências da literatura mostram que o complexo amigdalóide é uma das principais regiões encefálicas envolvidas no processamento de estímulos aversivos, nociceptivos e nas respostas emocionais relacionadas ao medo (Lariviere e Melzack, 2000; Ledoux, 2000; Sah *et al.*, 2003). Sendo assim, fez-se relevante avaliar o papel desse substrato sobre a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa (situação aversiva).

O presente estudo compreendeu a realização de três experimentos. O Experimento 1 investigou, primeiramente, o efeito da inativação da amígdala, através da administração de cloreto de cobalto, sobre a nocicepção de camundongos submetidos ao teste de formalina na pata (Experimento 1A). Em seguida, investigou também o efeito da inativação da amígdala sobre a antinocicepção e comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo (Experimento 1B) ou não (Experimento 1C). O Experimento 2 investigou o padrão de ativação neuronal dos hemisférios direito e esquerdo do complexo amigdalóide, através da quantificação de proteína Fos, em camundongos submetidos ao teste da formalina na pata ou expostos ao LCEa. Em seguida, também avaliou a marcação de proteína Fos nos núcleos central (CeA) e basolateral (BLA) da amígdala diante do estímulo nociceptivo, bem como durante a exposição ao LCEa. Por fim, o Experimento 3 investigou a participação dos receptores CRF1 da amígdala, através da administração intra-amigdalóide do antagonista de CRF1 CP376395, na nocicepção (Experimento 3A) e nas reações de defesa de camundongos submetidos (Experimento 3B) ou não (Experimento 3C) ao teste de formalina na pata e expostos ao LCEa.



Os resultados do Experimento 1A demonstraram que a inativação do complexo amígdaloide promoveu uma diminuição da resposta nociceptiva nos animais submetidos ao teste de formalina e expostos a caixa de vidro (ambiente seguro), uma vez que diminuiu significativamente o tempo total de lambidas na pata (Figura 5). Além disso, esse efeito foi independente do tempo no qual a resposta nociceptiva foi avaliada (Figura 6) e somente ocorreu quando as injeções acertaram a amígdala bilateralmente (Figura 7). Esses resultados sugerem que a amígdala participa da modulação da resposta nociceptiva induzida pelo teste de formalina na pata.

É bem descrito na literatura que amígdala pode ativar as vias modulatórias descendentes da dor em resposta a estímulos aversivos (Rhudy e Meagher, 2003; Minami, 2009). Sendo assim, uma vez que a injeção de formalina na pata é um evento aversivo [por exemplo, promove aversão condicionada por lugar (Tanimoto et al., 2003)], sua resposta é predominantemente facilitada pelo sistema descendente (Vanegas e Schaible, 2004). Diante dessas evidências, podemos sugerir que a injeção de formalina ativaria a amígdala facilitando o processo nociceptivo e a sua inativação pelo  $\text{CoCl}_2$  promoveria a antinocicepção devido a ativação das vias inibitórias descendentes da dor. Considerando que o efeito antinociceptivo ocorreu apenas para injeções bilaterais, pode-se sugerir que não há lateralização funcional da amígdala envolvida na dor eliciada pela injeção de formalina na pata, ou seja, é necessário a inativação bilateral desse substrato para que a antinocicepção ocorra.

O Experimento 1B avaliou o efeito da inativação da amígdala sobre a antinocicepção e sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo (Figuras 8 e 9). Nossa hipótese inicial era de que a antinocicepção eliciada pela exposição ao LCEa era devido a ativação da amígdala e, portanto, a sua inativação atenuaria o efeito antinociceptivo e os comportamentos defensivos. Os resultados do presente estudo demonstraram que a resposta antinociceptiva (Figura 8) e os comportamentos defensivos (Figura 9) induzidos pela exposição ao LCEa não foram alterados pela inativação bilateral do complexo amígdaloide. Tal ausência de efeito nos leva a sugerir que a amígdala pode não estar envolvida na mediação da inibição de dor induzida pela exposição ao LCEa. Porém, evidências na literatura indicam o envolvimento dessa estrutura na mediação da antinocicepção induzida por diferentes situações aversivas. Por exemplo, a lesão eletrolítica bilateral do CeA atenuou a analgesia induzida por situações aversivas, como

exposição ao gato e choque nas patas (Fox e Sorenson, 1994). Além disso, Helmstetter e Bellgowan (1993) demonstraram que a lesão eletrolítica do complexo amídalóide bloqueou a hipoalgesia condicionada no teste de retirada da cauda em ratos. Neste mesmo sentido, a antinocicepção exibida por camundongos submetidos ao teste de contorções abdominais e confinados nos braços abertos do LCE foi bloqueada pela administração intra-amídala do benzodiazepínico midazolam (Baptista et al., 2009; Nunes-de-Souza, 2000).

As evidências contrárias aos nossos resultados podem ser justificadas pelas diferenças nos procedimentos experimentais, como tipo de lesão/inativação da amídala (reversível ou irreversível), natureza do estímulo (incondicionado ou condicionado) e teste nociceptivo (somático ou visceral), uma vez que alguns fatores influenciam na ativação do sistema defensivo diante de uma situação aversiva, como a possibilidade de escape, a natureza do evento estressor ou se o estímulo é condicionado ou incondicionado (Brandão et al., 2003). Desta forma, considerando que a amídala modula a nocicepção no ambiente protegido [(caixa de vidro) - ver Experimento1A], mas não no ambiente aversivo (LCEa), podemos sugerir que sua função na modulação da nocicepção é dependente da situação em que o animal se encontra.

Ainda, é bem descrito na literatura que a amídala é composta por subnúcleos que apresentam diferentes funções (Sah et al., 2003; Minami, 2009) e apresenta interconexões com áreas corticais, subcorticais e tronco encefálico, além de conexões intranúcleos. Enquanto o CeA recebe informações, predominantemente nociceptivas, da medula espinal e tronco encefálico e é considerado uma região de “output” (Neugebauer, 2015), o BLA recebe informações sensoriais (por exemplo, nociceptivas) de áreas talâmicas e corticais que são processadas e transmitidas para o CeA e, então, para regiões do tronco encefálico, como a matéria cinzenta periaquedutal. Além disso, o BLA também apresenta conexões recíprocas com o córtex prefrontal medial e hipocampo ventral levando à exibição de respostas defensivas (Sah *et al.*, 2003; Knapska *et al.*, 2007; Neugebauer, 2015; Tovote *et al.*, 2015). Considerando que a lesão da MCP não alterou a resposta antinociceptiva de camundongos expostos ao LCEa (Mendes-Gomes et al., 2011), podemos sugerir que a comunicação top down CeA-MCP tem menor participação para os efeitos da exposição ao LCEa e que a antinocicepção exibida por camundongos expostos ao LCEa é modulada por outras estruturas.

Sendo assim, é importante destacar que outras estruturas do sistema defensivo podem modular a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa. Por exemplo, lesões excitotóxicas do córtex cingulado anterior e do núcleo leito da estria terminal atenuaram as respostas nociceptivas induzidas pela injeção de formalina na pata (Minami, 2009). Portanto, faz-se relevante investigar o papel de outras estruturas pertencentes ao sistema defensivo na modulação da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa.

O Experimento 1C, que avaliou o efeito da inativação da amígdala sobre os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa na ausência do estímulo nociceptivo, demonstrou que os camundongos que receberam  $\text{CoCl}_2$  intra-amígdala permaneceram mais tempo nas extremidades do LCEa (Figura 10A) e exibiram maior frequência de head-dipping (Figura 10E) quando comparados aos animais que receberam salina. A inativação da amígdala também promoveu uma redução do tempo em que os animais permaneceram nas áreas proximais do LCEa (Figura 10A) e redução da frequência total de SAP (Figura 10B), além de não ter alterado a frequência total de entradas. Resultados prévios do nosso laboratório demonstraram que camundongos tratados com o ansiolítico alprazolam exibiram menor frequência de SAP e aumento de head-dipping quando expostos ao LCEa (Sorregotti *et al.*, 2013). Ainda, quando realizados no LCE, redução de SAP e aumento de head-dipping podem ser interpretados como atenuação da ansiedade (Cole e Rodgers, 1995; Fernandez Espejo, 1997). Assim, considerando que a inativação da amígdala alterou esses comportamentos, podemos sugerir que, na ausência do estímulo nociceptivo, a amígdala modula comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa. Nossos resultados corroboram estudos prévios que mostraram que lesões do complexo amidaloide reduziram as medidas de ansiedade no labirinto em T elevado (Bueno *et al.*, 2005; Herdade *et al.*, 2006) e no teste de transição claro-escuro (Mchugh *et al.*, 2004; Bueno *et al.*, 2005).

É importante considerar que as conexões com outros substratos e as conexões intra-núcleos da amígdala determinam as respostas eliciadas de acordo com a via ativada. Por exemplo, enquanto a ativação da via BLA-CeA resulta em ansiólise, a ativação da via BLA-hipocampo ventral resulta em ansiogênese (Knapska *et al.*, 2007; Sah *et al.*, 2003; Tovote *et al.*, 2015). Sendo assim, uma vez que a inativação da amígdala promoveu respostas do tipo ansiolíticas em camundongos expostos ao LCEa, podemos sugerir que a exposição de camundongos a esta situação aversiva pode estar ativando a via BLA-hipocampo ventral.

De forma geral, os resultados do Experimento 1 sugerem que a amígdala participa da modulação dos comportamentos defensivos induzidos pela exposição ao LCEa somente quando não há influência da dor, uma vez que, sob ação da formalina, o efeito ansiolítico promovido pela inativação desta estrutura foi prejudicado. Esses dados corroboram resultados da literatura que mostraram que o estímulo nociceptivo da formalina prejudicou os efeitos ansiolíticos da lesão bilateral da MCP dorsal, assim como os efeitos da injeção intra-MCP de midazolam (Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2005; Mendes-Gomes *et al.*, 2011).

Cabe ressaltar que no Experimento 1 não foi possível especificar quais subnúcleos amigdalóides foram inativados, uma vez que a amígdala é uma estrutura relativamente pequena, principalmente em camundongos. Sendo assim, foram consideradas todas as microinjeções que acertaram quaisquer subnúcleos da amígdala. Contudo, os resultados do Experimento 2, em que avaliamos a marcação de proteína Fos nos diferentes subnúcleos da amígdala, possibilitou observar quais porções desta estrutura são ativadas diante do estímulo nociceptivo bem como na condição de exposição ao LCEa.

O conjunto de resultados do Experimento 2 demonstrou que o estímulo nociceptivo (formalina na pata) e a exposição ao LCEa promoveram um aumento da expressão de células positivas para a proteína Fos no complexo amigdalóide, sem haver diferença significativa entre os hemisférios direito e esquerdo (Tabela 1). Esses resultados corroboram aqueles obtidos no Experimento 1A, em que somente a inativação bilateral da amígdala foi capaz de promover um efeito antinociceptivo em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata e expostos a um ambiente seguro (caixa de vidro).

Os resultados do Experimento 2 também demonstraram que o estímulo nociceptivo e a exposição ao LCEa aumentaram a expressão de Fos nos núcleos CeA e BLA. Entretanto, esse aumento foi significativamente mais expressivo no BLA (Figura 12). É importante destacar que a dor (por exemplo, a provocada pela injeção de formalina na pata) apresenta dois componentes, o sensorial e o afetivo-emocional, e que o BLA recebe informações polimodais [por exemplo, estímulos olfatório, nociceptivos e aversivos (Knapska *et al.*, 2007)], onde são integradas e processadas para executar diferentes respostas. Considerando que o BLA apresentou maior atividade neuronal do que o CeA e que a injeção de formalina na pata além de ser um estímulo nociceptivo,

também é um estímulo aversivo, assim como a exposição ao LCEa, podemos sugerir que as informações nociceptiva e aversiva provocadas pela injeção de formalina na pata e pela exposição ao LCEa são integradas no BLA e, por isso, ambos os estímulos resultam no aumento da expressão de Fos, sobretudo neste núcleo.

No mesmo sentido, Hayashi *et al.* (2009) demonstraram que a injeção de formalina na pata aumentou a expressão de Fos nos núcleos CeA e BLA da amígdala de camundongos e, ainda, elevada expressão de c-Fos foi observada no BLA de ratos expostos ao LCE (para uma revisão ver Knapska *et al.*, 2007), indicando que essa estrutura está envolvida no processamento da dor e de estímulos aversivos. Por outro lado, Nakagawa e colaboradores (2003) demonstraram que os núcleos basolateral e central contribuíram de forma diferente para a indução de Fos no teste de formalina na pata e no teste de contorções abdominais. Enquanto a injeção intraplantar de formalina aumentou a expressão de Fos no núcleo basolateral, mas não no núcleo central da amígdala, a injeção intraperitoneal de ácido acético promoveu o efeito oposto. Essas evidências podem ser justificadas pelo fato de que a natureza do estímulo nociceptivo influencia as respostas defensivas e as vias que são ativadas. Enquanto a injeção de formalina é um estímulo somático e a informação sensorial parece ser transmitida através da via espino-tálamo-cortico-amidaloide para o BLA e, então, para o CeA, a injeção de ácido acético é um estímulo visceral cuja informação sensorial parece ser transmitida através das vias espino-parabraquio-amidaloide e núcleo do trato solitário-amidaloide diretamente para o CeA (Minami, 2009).

É descrito na literatura que o aumento de células positivas para Fos pode ocorrer diante de novos estímulos, por exemplo, um ambiente novo (Day *et al.*, 2001). Neste sentido, considerando que no presente experimento os animais foram habituados no LCE fechado e testado no LCEa, poderia surgir a dúvida se o aumento da expressão de Fos nos animais expostos a este aparato foi devido a aversividade do LCEa ou à novidade. Desta forma, alguns animais foram testados para avaliar esta questão e os resultados obtidos sugerem que, embora exista o componente da novidade, o aumento de células positivas para Fos quando camundongos são expostos ao LCEa é devido à sua aversividade (dados não mostrados).

Diante dessas evidências, a técnica de imunoistoquímica para Fos foi importante para confirmar os resultados que mostraram que o núcleo BLA apresenta maior ativação em relação ao CeA e ausência de diferença funcional entre os hemisférios desse

substrato em camundongos submetidos ao teste de formalina na pata ou expostos ao LCEa.

Visto que a injeção de formalina na pata de camundongos e a exposição ao LCEa aumentam a expressão de células positivas para Fos no complexo amídalóide, indicando que este substrato está ativo nestas situações, e o CRF desempenha um papel na mediação de respostas defensivas e antinociceptiva eliciadas por estímulos aversivos (Carvalho-Netto *et al.*, 2007; Lariviere e Melzack, 2000; Miguel e Nunes-de-Souza, 2011), o Experimento 3 investigou o papel do antagonista de CRF1, CP376395, na modulação das respostas antinociceptiva e comportamental provocadas por camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo ou não. Nossa hipótese inicial era de que a antinocicepção e as reações de defesa eliciadas pela exposição ao LCEa eram devidos à liberação de CRF na amídala e, portanto, o bloqueio da neurotransmissão CRF-érgica atenuaria o efeito antinociceptivo e os comportamentos defensivos.

Os resultados demonstraram que a resposta antinociceptiva (Figura 15) e os comportamentos defensivos (Figura 16) de camundongos expostos ao LCEa, sob estímulo nociceptivo, não foram alterados pela inibição dos receptores de CRF1 do complexo amídalóide, sugerindo que a neurotransmissão CRF-érgica, via receptores do tipo 1, parece não modular estas respostas. Esses resultados corroboram aqueles obtidos através do Experimento 1B, em que a inativação da amídala não alterou a resposta antinociceptiva e os comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa sob estímulo nociceptivo, indicando que a amídala pode não estar envolvida na mediação da inibição de dor induzida pela exposição ao LCEa. Considerando que o CRF tem efeito dual em neurônios da amídala, uma vez que baixas concentrações de CRF facilitam o processamento nociceptivo via receptores CRF 1, enquanto altas concentrações levam à antinocicepção mediada através de receptores CRF 2 (Ji e Neugebauer, 2007), a ausência de efeito nos leva a sugerir que os receptores do tipo 2 de CRF poderiam estar envolvidos na mediação da inibição de dor induzidas pela exposição ao LCEa. Além disso, não podemos descartar a possibilidade da participação de outras estruturas encefálicas enquanto os animais estão no LCEa sob estimulação nociceptiva concomitante.

Considerando que o Experimento 1C mostrou o envolvimento da amídala nos comportamentos defensivos de camundongos expostos ao LCEa quando não há

influência da nocicepção e que a microinjeção de antagonista de CRF1 (0,75nmol) na amígdala de camundongos atenuou os comportamentos defensivos induzidos pelo LCE (Cipriano *et al.*, 2016), era esperado que a inibição de receptores do tipo 1 de CRF na amígdala também atenuasse as reações de defesas de camundongos expostos ao LCEa. Porém, o presente estudo demonstrou, através do Experimento 3C, que a microinjeção do CP376395, na dose 1,5 nmol, não alterou as medidas comportamentais avaliadas no LCEa na ausência da nocicepção (Figura 17), sugerindo que esse receptor pode não estar envolvido com a modulação tônica dos comportamentos eliciadas pela exposição ao LCEa. Cabe ressaltar que o estado emocional do LCEa parece ser um pouco diferente do LCE, uma vez que os animais não têm oportunidade de se esquivar do ambiente potencialmente aversivo (braços abertos). Além disso, a dose utilizada no presente estudo foi diferente (1,5 nmol) daquela que atenuou os comportamentos no LCE. Diante dessas evidências, podemos sugerir que a neurotransmissão CRF-érgica, via receptor 1 de CRF, parece não participar da modulação das respostas antinociceptiva e comportamentais eliciadas pela exposição ao LCEa. Sendo assim, torna-se interessante investigar o papel de outros neurotransmissores envolvidos nas respostas induzidas pela exposição ao LCEa.

## **6. Conclusão**

Os resultados obtidos até o momento indicam que, independentemente da lateralização e da neurotransmissão CRF-érgica, a amígdala, sobretudo o núcleo basolateral, tem um papel importante na modulação das respostas nociceptivas induzidas pelo teste de formalina e nas respostas comportamentais de camundongos expostos ao LCEa. Considerando que a inativação da amígdala não promoveu alteração nos comportamentos avaliados no LCEa concomitante ao estímulo nociceptivo, as respostas induzidas pela exposição a este labirinto podem também estar sendo moduladas por outras estruturas com conexões com o BLA, como o córtex pré-frontal medial ou hipocampo ventral, o que requer futuras investigações.



## 7. Referências Bibliográficas

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, n. 1, p. 91-102, Jan 1995. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7715946> >.

BAKER, K. B.; KIM, J. J. Amygdalar lateralization in fear conditioning: evidence for greater involvement of the right amygdala. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 1, p. 15-23, Feb 2004. ISSN 0735-7044 (Print) 0735-7044 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14979779> >.

BANDLER, R.; KEAY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Prog Brain Res**, v. 107, p. 285-300, 1996. ISSN 0079-6123 (Print) 0079-6123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782526> >.

BAPTISTA, D. et al. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. **Brain Res**, v. 1294, p. 29-37, Oct 19 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635465> >.

BARBALHO, C. A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Res**, v. 1267, p. 65-76, Apr 24 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19268657> >.

BLANCHARD, D. C. et al. Subordination stress: behavioral, brain, and neuroendocrine correlates. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 113-21, Dec 20 1993. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136039> >.

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 291, 1980.

BORELLI, K. G.; BRANDAO, M. L. Effects of ovine CRF injections into the dorsomedial, dorsolateral and lateral columns of the periaqueductal gray: a functional role for the dorsomedial column. **Horm Behav**, v. 53, n. 1, p. 40-50, Jan 2008. ISSN 0018-506X (Print) 0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920596> >.

BRANDÃO, M. L. **Psicofisiologia**. 3. Atheneu, 2012. ISBN 9788538802730. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=REVmLwEACAAJ> >.

BUENO, C. H.; ZANGROSSI, H., JR.; VIANA, M. B. The inactivation of the basolateral nucleus of the rat amygdala has an anxiolytic effect in the elevated T-maze and light/dark transition tests. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 11, p. 1697-701, Nov

2005. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258641> >.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 235-72, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600714> >.

CARRASQUILLO, Y.; GEREAU, R. W. T. Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. **J Neurosci**, v. 27, n. 7, p. 1543-51, Feb 14 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17301163> >.

CARRASQUILLO, Y.; GEREAU, R. W. T. Hemispheric lateralization of a molecular signal for pain modulation in the amygdala. **Mol Pain**, v. 4, p. 24, Jun 23 2008. ISSN 1744-8069 (Electronic) 1744-8069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573207> >.

CARVALHO-NETTO, E. F. et al. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. **Behav Brain Res**, v. 176, n. 2, p. 222-9, Jan 25 2007. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095103> >.

CASTELLANO, C. et al. Cannabinoids and memory: animal studies. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**, v. 2, n. 6, p. 389-402, Dec 2003. ISSN 1568-007X (Print) 1568-007X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14683467> >.

CHANG, C. P. et al. Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. **Neuron**, v. 11, n. 6, p. 1187-95, Dec 1993. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8274282> >.

CHEN, M. F.; CHIU, T. H.; LEE, E. H. Noradrenergic mediation of the memory-enhancing effect of corticotropin-releasing factor in the locus coeruleus of rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 17, n. 2-3, p. 113-24, May-Jul 1992. ISSN 0306-4530 (Print) 0306-4530 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438640> >.

CIPRIANO, A. C.; GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. CRF receptor type 1 (but not type 2) located within the amygdala plays a role in the modulation of anxiety in mice exposed to the elevated plus maze. **Horm Behav**, v. 81, p. 59-67, May 2016. ISSN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060334> >.

COLE, J. C.; RODGERS, R. J. Ethological comparison of the effects of diazepam and acute/chronic imipramine on the behaviour of mice in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 3, p. 473-8, Nov 1995. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8545461> >.

CORNELIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 178, n. 1, p. 82-9, Mar 12 2007. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17207863> >.

CORNELIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? **Physiol Behav**, v. 96, n. 3, p. 440-7, Mar 02 2009. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059275> >.

COSTA, N. S. et al. Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? **Neuropharmacology**, v. 108, p. 82-90, Sep 2016. ISSN 1873-7064 (Electronic) 0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27079841> >.

CUMMINGS, S. et al. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. **J Neurosci**, v. 3, n. 7, p. 1355-68, Jul 1983. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345725> >.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth**, v. 101, n. 1, p. 8-16, Jul 2008. ISSN 1471-6771 (Electronic) 0007-0912 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18417503> >.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 128, n. 4, p. 380-97, Dec 1996. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8986009> >.

DAUTZENBERG, F. M.; HAUGER, R. L. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 2, p. 71-7, Feb 2002. ISSN 0165-6147 (Print) 0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830263> >.

DAVIS, M. Pharmacological analysis of fear-potentiated startle. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 3, p. 235-60, Mar 1993. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257926> >.

DAVIS, M. Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? **Biol Psychiatry**, v. 44, n. 12, p. 1239-47, Dec 15 1998. ISSN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861467> >.

DAY, H. E. et al. Environmental novelty differentially affects c-fos mRNA expression induced by amphetamine or cocaine in subregions of the bed nucleus of the stria terminalis and amygdala. **J Neurosci**, v. 21, n. 2, p. 732-40, Jan 15 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160452> >.

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**, v. 4, n. 2, p. 161-74, Dec 1977. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/564014> >.

DUNCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res**, v. 713, n. 1-2, p. 79-91, Mar 25 1996. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8724978> >.

FERNANDEZ ESPEJO, E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behav Brain Res**, v. 86, n. 1, p. 105-12, Jun 1997. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9105588> >.

FOX, R. J.; SORENSON, C. A. Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. **Brain Res**, v. 648, n. 2, p. 215-21, Jun 20 1994. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7922536> >.

GONCALVES, L.; DICKENSON, A. H. Asymmetric time-dependent activation of right central amygdala neurones in rats with peripheral neuropathy and pregabalin modulation. **Eur J Neurosci**, v. 36, n. 9, p. 3204-13, Nov 2012. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22861166> >.

GRAEFF, F. G. et al. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 123-31, Dec 20 1993. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136040> >.

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. et al. Long-term expression of corticotropin-releasing factor (CRF) in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in response to an acute colonic inflammation. **Brain Res**, v. 1071, n. 1, p. 91-6, Feb 03 2006. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423333> >.

HAYASHI, T. et al. Intracerebroventricular fluvoxamine administration inhibited pain behavior but increased Fos expression in affective pain pathways. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 91, n. 3, p. 441-6, Jan 2009. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18817806> >.

HELMSTETTER, F. J.; BELLGOWAN, P. S. Lesions of the amygdala block conditional hypoalgesia on the tail flick test. **Brain Res**, v. 612, n. 1-2, p. 253-7, May 28 1993. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8330203> >.

HENRY, J. P.; STEPHENS, P. M. **Stress, health, and the social environment : a sociobiologic approach to medicine**. New York: Springer-Verlag, 1977. xii, 282 p. ISBN 0387902937.

HERDADE, K. C. et al. Effects of medial amygdala inactivation on a panic-related behavior. **Behav Brain Res**, v. 172, n. 2, p. 316-23, Sep 25 2006. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806522> >.

Ji, G. et al. Pain-related anxiety-like behavior requires CRF1 receptors in the amygdala. **Mol Pain**, v. 3, p. 13, Jun 05 2007. ISSN 1744-8069 (Electronic) 1744-8069 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550594> >.

Ji, G.; NEUGEBAUER, V. Differential effects of CRF1 and CRF2 receptor antagonists on pain-related sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala. **J Neurophysiol**, v. 97, n. 6, p. 3893-904, Jun 2007. ISSN 0022-3077 (Print) 0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17392412> >.

Ji, G.; NEUGEBAUER, V. Hemispheric lateralization of pain processing by amygdala neurons. **J Neurophysiol**, v. 102, n. 4, p. 2253-64, Oct 2009. ISSN 1522-1598 (Electronic) 0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625541> >.

KAVALIERS, M. Brief exposure to a natural predator, the short-tailed weasel, induces benzodiazepine-sensitive analgesia in white-footed mice. **Physiol Behav**, v. 43, n. 2, p. 187-93, 1988. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3145512> >.

KELLY, D. D. **Stress-induced analgesia**. New York, N.Y.: New York Academy of Sciences, 1986. 449 p. ISBN 0897663292 0897663306 (pbk.) 0077-8923.

KNAPSKA, E. et al. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. **Physiol Rev**, v. 87, n. 4, p. 1113-73, Oct 2007. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17928582> >.

LARIVIERE, W. R.; MELZACK, R. The role of corticotropin-releasing factor in pain and analgesia. **Pain**, v. 84, n. 1, p. 1-12, Jan 2000. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601667> >.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 597-652, Dec 2001. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11734620> >.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v. 23, p. 155-84, 2000. ISSN 0147-006X (Print) 0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845062> >.

LEITE-PANISSI, C. R.; BRENTGANI, M. R.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 10, p. 1571-9, Oct 2004. ISSN 0100-

879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448880> >.

LEITE-PANISSI, C. R.; COIMBRA, N. C.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. **Brain Res Bull**, v. 60, n. 1-2, p. 167-78, Apr 15 2003. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12725905> >.

LENT, R. **Cem bilhoes de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. Atheneu, 2001. ISBN 9788538801023. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=Y76TQwAACAAJ> >.

LESTER, L. S.; FANSELOW, M. S. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. **Behav Neurosci**, v. 99, n. 4, p. 756-9, Aug 1985. ISSN 0735-7044 (Print) 0735-7044 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3843739> >.

LICHTMAN, A. H.; FANSELOW, M. S. Cats produce analgesia in rats on the tail-flick test: naltrexone sensitivity is determined by the nociceptive test stimulus. **Brain Res**, v. 533, n. 1, p. 91-4, Nov 12 1990. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2085738> >.

LINDEN, A. M. et al. Increased c-Fos expression in the centromedial nucleus of the thalamus in metabotropic glutamate 8 receptor knockout mice following the elevated plus maze test. **Neuroscience**, v. 121, n. 1, p. 167-78, 2003. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946709> >.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110839> >.

LOVENBERG, T. W. et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 3, p. 836-40, Jan 31 1995. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7846062> >.

LOVICK, T. A. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. **Prog Neurobiol**, v. 40, n. 5, p. 631-44, May 1993. ISSN 0301-0082 (Print) 0301-0082 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8484005> >.

MANNING, B. H.; MAYER, D. J. The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the rat tail-flick test. **J Neurosci**, v. 15, n. 12, p. 8199-213, Dec 1995. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613754> >.

MCCALL, W. D.; TANNER, K. D.; LEVINE, J. D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neurosci Lett**, v. 208, n. 1, p. 45-8, Apr 12 1996. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8731171> >.

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu Rev Neurosci**, v. 27, p. 1-28, 2004. ISSN 0147-006X (Print) 0147-006X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217324> >.

MCHUGH, S. B. et al. Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. **Behav Neurosci**, v. 118, n. 1, p. 63-78, Feb 2004. ISSN 0735-7044 (Print) 0735-7044 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14979783> >.

MCNALLY, G. P.; AKIL, H. Role of corticotropin-releasing hormone in the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in the behavioral, pain modulatory, and endocrine consequences of opiate withdrawal. **Neuroscience**, v. 112, n. 3, p. 605-17, 2002. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12074902> >.

MEAGHER, M. W.; ARNAU, R. C.; RHUDY, J. L. Pain and emotion: effects of affective picture modulation. **Psychosom Med**, v. 63, n. 1, p. 79-90, Jan-Feb 2001. ISSN 0033-3174 (Print) 0033-3174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11211069> >.

MENDES-GOMES, J. et al. Corticosterone does not change open elevated plus maze-induced antinociception in mice. **Horm Behav**, v. 60, n. 4, p. 408-13, Sep 2011. ISSN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798262> >.

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**, v. 1047, n. 1, p. 97-104, Jun 14 2005. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893297> >.

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**, v. 203, n. 2, p. 180-7, Nov 05 2009. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410607> >.

MERALI, Z. et al. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. **J Neurosci**, v. 18, n. 12, p. 4758-66, Jun 15 1998. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614249> >.

MERLO PICH, E. et al. Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. **J Neurosci**, v. 15, n. 8, p. 5439-47,

Aug 1995. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7643193> >.

MIGUEL, T. T.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic and antinociceptive effects induced by corticotropin-releasing factor (CRF) injections into the periaqueductal gray are modulated by CRF1 receptor in mice. **Horm Behav**, v. 60, n. 3, p. 292-300, Aug 2011. ISSN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21723867> >.

MINAMI, M. Neuronal mechanisms for pain-induced aversion behavioral studies using a conditioned place aversion test. **Int Rev Neurobiol**, v. 85, p. 135-44, 2009. ISSN 0074-7742 (Print) 0074-7742 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19607966> >.

MYERS, D. A. et al. Corticosterone implants to the amygdala and type 1 CRH receptor regulation: Effects on behavior and colonic sensitivity. **Behavioural Brain Research**, v. 161, n. 1, p. 39-44, 6/3/ 2005. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432805000744> >.

NAKAGAWA, T. et al. Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats. **Neurosci Lett**, v. 344, n. 3, p. 197-200, Jul 03 2003. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12812839> >.

NETTO, C. A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. **Behav Neural Biol**, v. 48, n. 2, p. 304-9, Sep 1987. ISSN 0163-1047 (Print) 0163-1047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3675522> >.

NEUGEBAUER, V. Amygdala pain mechanisms. **Handb Exp Pharmacol**, v. 227, p. 261-84, 2015. ISSN 0171-2004 (Print) 0171-2004 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25846623> >.

NEUGEBAUER, V. et al. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, v. 10, n. 3, p. 221-34, Jun 2004. ISSN 1073-8584 (Print) 1073-8584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15155061> >.

NUNES-DE-SOUZA, R. L. et al. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 150, n. 3, p. 300-10, Jun 2000. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923758> >.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Res**, v. 927, n. 1, p. 87-96, Feb 08 2002. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11814435> >.



PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Compact 2nd. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 012547640X (alk. paper). Disponível em: < Publisher description <http://www.loc.gov/catdir/description/els041/2003113435.html> Table of contents <http://www.loc.gov/catdir/toc/els041/2003113435.html> >.

PERRIN, M. et al. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 7, p. 2969-73, Mar 28 1995. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7708757> >.

REA, K.; ROCHE, M.; FINN, D. P. Modulation of conditioned fear, fear-conditioned analgesia, and brain regional c-Fos expression following administration of muscimol into the rat basolateral amygdala. **J Pain**, v. 12, n. 6, p. 712-21, Jun 2011. ISSN 1528-8447 (Electronic) 1526-5900 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459678> >.

REUL, J. M.; HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. **Curr Opin Pharmacol**, v. 2, n. 1, p. 23-33, Feb 2002. ISSN 1471-4892 (Print) 1471-4892 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11786305> >.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, n. 3878, p. 444-5, Apr 25 1969. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4887743> >.

RHUDY, J. L.; MEAGHER, M. W. Negative affect: effects on an evaluative measure of human pain. **Pain**, v. 104, n. 3, p. 617-26, Aug 2003. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927634> >.

RODGERS, R. J. Neuropharmacological aspects of adaptive pain inhibition in murine "victims" of aggression. **Aggressive Behavior**, v. 21, n. 1, p. 29-39, 1995.

RODRIGUEZ DE FONSECA, F. et al. Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2050-4, Jun 27 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197270> >.

ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychol Rev**, v. 105, n. 2, p. 325-50, Apr 1998. ISSN 0033-295X (Print) 0033-295X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9577241> >.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 803-34, Jul 2003. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843409> >.

SALOME, N. et al. Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. **Biol**

**Psychiatry**, v. 55, n. 7, p. 715-23, Apr 01 2004. ISSN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039000> >.

SILVEIRA, M. C.; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 56, n. 1, p. 115-8, Jul 30 1993. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8397853> >.

SORREGOTTI, T. et al. Ethopharmacological analysis of the open elevated plus-maze in mice. **Behav Brain Res**, v. 246, p. 76-85, Jun 01 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23470900> >.

TANIMOTO, S. et al. Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical somatic and visceral pains in rats. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 2343-50, Oct 2003. ISSN 0953-816X (Print) 0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14622196> >.

TESKEY, G. C.; KAVALIERS, M. Aggression, defeat and opioid activation in mice: influences of social factors, size and territory. **Behav Brain Res**, v. 23, n. 1, p. 77-84, Jan 1987. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3030355> >.

TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, Oct 1992. ISSN 0304-3959 (Print) 0304-3959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1454405> >.

TORRES, I. L. et al. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 2, p. 241-4, Feb 2001. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11175500> >.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LUTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 317-31, Jun 2015. ISSN 1471-0048 (Electronic) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25991441> >.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain. **Physiol Behav**, v. 88, n. 1-2, p. 67-76, Jun 15 2006. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16647726> >.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 46, n. 3, p. 295-309, Nov 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15571771> >.

VITA, N. et al. Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. **FEBS Lett**, v. 335, n. 1, p. 1-5,

Nov 29 1993. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243652>>.