



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA
GRUPO DE PSICOBIOLOGIA**

**ANSIEDADE INDUZIDA PELO MODELO DE EMPATIA PARA DOR:
O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO GABA_A- BENZODIAZEPÍNICA NA
MODULAÇÃO DA ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS**

Isabela Miranda Carmona

São Carlos, SP

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA
GRUPO DE PSICOBIOLOGIA**

**ANSIEDADE INDUZIDA PELO MODELO DE EMPATIA PARA DOR:
O PAPEL DA NEUROTRANSMISSÃO GABA_A- BENZODIAZEPÍNICA
NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS**

Isabela Miranda Carmona

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Psicologia para obtenção de título de mestre em Psicologia

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

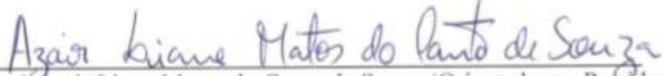
São Carlos, SP

2017


FOLHA DE APROVAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA
COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Isabela Miranda Carmona, 26/05/2017


Prof.^a Dr.^a Azair Liane Matos do Canto de Souza (Orientadora e Presidente)
Universidade Federal de São Carlos/UFSCar


Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara


Prof. Dr. Marcos Hortes Nisihara Chagas
Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Submetida à defesa em sessão pública realizada às 09h
no dia 26/05/2017.

Comissão Julgadora:
Prof.^a Dr.^a Azair Liane Matos do Canto de Souza
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
Prof. Dr. Marcos Hortes Nisihara Chagas

Homologada pela CPG-PPGpsi na
*Reunião no dia ____/____/____

Prof.^a Dr.^a Débora de Hollanda Souza
Coordenadora do PPGpsi

DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus pais José e Suzel que com muito carinho trilharam esse
caminho comigo.*

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a todos os camundongos que participaram desse estudo e contribuíram mais uma vez para o desenvolvimento da neurociência.

À minha família que sempre esteve ao meu lado, que com muito amor e paciência me apoiaram e me deram suporte para acreditar no meu potencial e na minha capacidade. Com essa ajuda foi possível chegar até aqui, estudar e crescer pessoalmente e profissionalmente. Agradeço de coração.

Ao meu grande amor e parceiro de todas as horas, José Augusto P. Cabral, que me acompanhou nessa jornada, me incentivando e sendo meu sustento para os momentos de dúvida, tristeza e desânimo. E da mesma forma, por acreditar em mim e me mostrar outros caminhos que me ajudarão a buscar o sucesso.

À minha orientadora Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza, que me acolheu e me apresentou à neurociência. Com esse vínculo, percebi a minha afinidade pela pesquisa e minha vontade de continuar nesse caminho se fortaleceu a partir da credibilidade e confiança depositados em mim por minha orientadora. Agradeço pela ajuda, pela paciência e pelo seu conhecimento que contribuiu para minha formação tanto pessoal quanto acadêmica.

Á todos meus amigos e companheiros do Laboratório de Psicologia e Aprendizagem (LPA) Carol, Paulo, Aura, Daniela, Lígia, Kairo, Lucas, Amanda, Vitor, Rimenez, Elke, Marília, que sempre estavam dispostos a me ajudar na execução e entendimento do meu trabalho e igualmente a ouvir minhas incertezas e desabafos. Vocês contribuíram com seus conhecimentos e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho. Gostaria de agradecer igualmente aos momentos de risadas e as tardes com bolo que contagiavam meu dia com calorias e felicidades.

Á Lara, técnica do laboratório que me ajudou e ensinou a cuidar dos animais, e sempre estava disponível para me auxiliar no manejo com as fórmulas e métodos para preparar as drogas que utilizei durante o mestrado. Obrigada por me ajudar a concretizar esse trabalho.

Á todos os professores que de uma forma ou de outra, me ajudaram a construir minha formação e minha conduta como psicóloga.

Às minhas amigas, Bruna e Maria Silvia, por serem minhas grandes incentivadoras e motivadoras para que eu seja alguém melhor na vida. Agradeço por serem meu exemplo de determinação, persistência e amor.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Psicologia

EPÍGRAFE

“Só em Deus, ó minha alma, repouse, porque dele vem a minha esperança. Só ele é a minha rocha e a minha salvação, a minha fortaleza: jamais serei abalado!”

(Salmo de Davi, 62(61). Bíblia Sagrada, edição Pastoral, 1991)

CARMONA, M.I. *Ansiedade induzida pelo modelo de empatia para dor: o papel da neurotransmissão GABA_A-benzodiazepínica na modulação da ansiedade em camundongos*. 2017. 68f. Dissertação (Mestrado em Psicologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2017.

RESUMO

A ansiedade é um fenômeno emocional fundamental, imprescindível dentro do repertório afetivo e sua importância para a compreensão dos comportamentos emocionais dos indivíduos impulsionou o desenvolvimento de estudos pré-clínicos que contribuem para o entendimento das bases neurobiológicas envolvidas em sua modulação. Estudos demonstraram o envolvimento do complexo amigdalóide em comportamentos emocionais relacionados a expressão da ansiedade e que ainda os receptores GABA_A-benzodiazepínicos apresentam importante papel na modulação da ansiedade e da nocicepção em modelos animais. A convivência com coespecífico com dor crônica produz aumento da ansiedade no camundongo observador e essas evidências fortalecem o pressuposto de que respostas referentes à ansiedade possibilitam identificar a existência de um comportamento emocional presente entre os animais, caracterizados como comportamentos relacionados à empatia. Este estudo investigou os efeitos da injeção sistêmica e intra-amígdala de midazolam (MDZ), agonista dos receptores GABA_A-benzodiazepínicos, na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Para isso, camundongos machos Suíço-albinos foram alojados em pares durante um protocolo de convivência de 28 dias. Após 14 dias de convívio, um dos animais da dupla foi submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (CNC) ou apenas submetido a uma cirurgia sem constrição do nervo (Sham) e no 28º dia o animal que conviveu com seu coespecífico CNC ou Sham (camundongo observador) foi submetido ao teste no LCE durante cinco minutos. Experimento 1: O camundongo observador recebeu injeção de salina ou midazolam [0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)] e, após 30 minutos, foi submetido ao teste no LCE. Experimento 2: No 23º dia de convivência o sujeito observador foi submetido à cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia na amígdala e no 28º dia recebeu injeção intra-amígdala de MDZ (3 e 30 nmol/0,1µl) cinco minutos antes de ser exposto ao LCE. A análise de variância (ANOVA) de dois fatores seguida pelo *post hoc* de Duncan revelou que o convívio com animal submetido à CNC promoveu aumento de comportamentos relacionados à ansiedade sugerindo a influência que o convívio com a nocicepção gera no parceiro. No experimento 1, o MDZ (1,0 e 2,0 mg/kg) produziu efeito ansiolítico nos animais teste, caracterizado pelo aumento da exploração nos braços abertos e redução dos comportamentos de avaliação de risco, sem prejudicar a atividade locomotora. No experimento 2, igualmente foi observado esse efeito ansiolítico do MDZ (3 e 30 nmol/0,1µl). Os resultados sugerem que os receptores GABA_A-benzodiazepínicos estão envolvidos na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE, evidenciando a participação da neurotransmissão gabaérgica na amígdala na modulação da ansiedade induzida por esse protocolo de convivência com a dor.

Palavras-chave: Ansiedade. Empatia. Midazolam. Camundongos.

CARMONA, M.I. *Anxiogenic-like behaviors by living with a conspecific in neuropathic pain condition are attenuated by injection of midazolam in mice*. 2017. 68f. Dissertation (Master's degree in Psychology) – Federal University of São Carlos, São Carlos. 2017.

ABSTRACT

Anxiety is a fundamental emotional phenomenon, essential within the affective repertoire and its importance for the understanding of the emotional behaviors of the individuals promoted the development of preclinical studies that contribute to the understanding of the neurobiological bases involved in this modulation. Studies have demonstrated the involvement of the amygdaloid complex in emotional behaviors related to anxiety and that GABAA-benzodiazepine receptors play important role in the modulation of anxiety and nociception in animal models. Cohabiting with chronic pain produces an increase in anxiety in the observer mouse, these evidences support that through anxiety-like responses it is possible to observe the existence of emotional behavior present among the animals, characterized as empathy-like behaviors. This study investigated the effects of systemic and intra-amygdala injection of midazolam (MDZ), a GABAA-benzodiazepine receptor agonist, on the modulation of anxiety induced by cohabiting with a cagemate in neuropathic pain in mice exposed to the elevated plus-maze (EPM). For this, male Swiss mice were housed in pairs and after 14 days were divided into two groups: cagemate nerve constriction (CNC), in which one animal from each pair was subjected to sciatic nerve constriction; cagemate sham (Sham), one animal from each pair was subjected to the same surgery but without constriction and in the 28th day, the observer cagemates were submitted to EPM for five minutes. Experiment 1: the observer cagemates received systemic injections of saline or midazolam (0.5, 1.0 or 2.0 mg/kg, intraperitoneal, i.p.) and 30 minutes after were exposed to elevated plus-maze. Experiment 2: In the 23th day, bilateral cannulae were surgically implanted in the amygdala of the observer cagemate and in the 28th day, the observer cagemate received intra-amygdala injections of saline or midazolam (3 e 30 nmol/0,1µl) and 5 minutes after were exposed EPM. Two-way ANOVA followed by post hoc Duncan test revealed that living with a cagemate in neuropathic pain is able to increase anxiety-like behavior in mice, suggesting the influence that cohabiting with nociception causes in the observer cagemate. In the experiment 1, MDZ (1,0 e 2,0 mg/Kg) was able to produces anxiolytic-like effect on the EPM, characterized by increase the open arms exploration and decrease risk assessment-like behaviors, with the absence of significant changes in locomotor activity. In the experiment 2, in the same way MDZ was able to produces anxiolytic-like effect on the EPM. These results suggests that the cohabitation with a CNC induce anxiogenic-like responses in the observer mouse and the GABAA/benzodiazepine receptor complex located within the amygdala participates in modulation of anxiety-induced model of empathy in mice.

Keywords: Anxiety. Empathy. Midazolam. Mice

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Descrição do delineamento experimental referente ao experimento 1: Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).....32
- Figura 2** – Descrição do delineamento experimental referente ao experimento 2: Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1µL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).....33
- Figura 3** – Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) do labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 9-12). *p<0,05 comparado com respectivo grupo CNC-salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo SHAM. Ver tabela 1 para dados complementares35
- Figura 4** – Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto (%TBA) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 9-12). *p<0,05 comparado com respectivo grupo CNC-salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham. Ver tabela 1 para dados complementares36
- Figura 5** – Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados (EBF) do labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 9-12). Ver tabela 1 para dados complementares.....37

Figura 6 – Efeitos da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas (%EBA) e tempo gasto (%TBA) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10). #p<0,05 comparado com respectivo grupo controle (Sham). Ver tabela 3 para dados complementares39

Figura 7 – Efeitos da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados (EBF) do labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10). Ver tabela 3 para dados complementares.....40

Figura 8 – Representação esquemática dos sítios de injeção na amígdala de camundongos. (A) Representação esquemática dos locais de injeção dentro (círculos cheios) ou fora (círculos cinza) da amígdala. Os cortes coronais representados estão entre 1,06 e 2,30 mm em relação ao bregma no atlas de Paxinos e Franklin, 2001. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos. (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando um local de injeção dentro do complexo amigdalóide. De produção da própria autora.41

Figura 9 – Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ L) na amígdala, sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre as porcentagens de entradas (%EBA) do labirinto em cruz elevado. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). *p<0,05 comparado com respectivo grupo CNC-salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham Ver tabela 4 para dados complementares.....42

Figura 10 – Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ L), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto (%TBA) nos braços abertos do labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). *p<0,05 comparado com respectivo grupo CNC-salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham. Ver tabela 4 para dados complementares.....43

Figura 11 – Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1µl), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados (EBF) do labirinto em cruz elevado (LCE). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). Ver tabela 4 para dados complementares.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n= 9-12). #p<0,05 comparado com respectivo grupo controle (Sham).....38

Tabela 2 – Latência de retirada da pata traseira direita nos animais CNC ou Sham no teste de placa quente realizado no 28º dia após seus coespecíficos serem submetidos ao LCE. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n= 75). #p<0,05 comparado com respectivo grupo controle (Sham)38

Tabela 3 – Efeitos da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n= 9). *p<0,05 comparado com respectivo grupo controle (Sham).....40

Tabela 4 – Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ L), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média e \pm erro padrão da média (n= 11-12). *p<0,05 comparado com respectivo grupo controle (Sham); #p<0,05 comparado com respectivo grupo CNC-salina.....45

Tabela 5 – Latência de retirada da pata traseira direita nos animais CNC ou Sham no teste de placa quente realizado no 28º dia após seus coespecíficos serem submetidos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n = 68). *p<0,05 comparado com respectivo grupo controle (Sham)45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

CNC – Grupo com constrição do nervo ciático

EBA – Entradas nos braços abertos

EBF – Entradas nos braços fechados

GABA – Ácido gama-amino-butírico

GABA_A e **GABA_B** – Subtipos de receptores de GABA

i.p. – Intraperitoneal

LCE ou EPM (inglês) – Labirinto em cruz elevado

MDZ – Midazolam

mg/kg – Miligramas/kilogramas

SAP – esticar (Stretched attend postures)

SHAM – Grupo sem constrição do nervo ciático

SNC – Sistema Nervoso Central

TC – Tempo gasto no centro

NaCl – Cloreto de sódio

NS – Não significativo

µl – microlitros

5-HT – serotonina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODO	27
3.1 Sujeitos.....	28
3.2 Ética	28
3.3 Fármacos	28
3.4 Cirurgia Estereotáxica e Microinjeção	29
3.5 Constrição Crônica do Nervo Ciático	30
3.6 Teste da placa quente	30
3.7 Labirinto em cruz elevado (LCE)	30
3.8 Histologia.....	31
3.9 Delineamento Experimental	32
3.9.1 Experimento 1. Avaliação da injeção de midazolam sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.	32
3.9.2 Experimento 2. Avaliação da injeção de midazolam intra-amígdala sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.	32
3.10 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Experimento 1: Efeito do tratamento sistêmico com midazolam sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.	35
4.1.1 Avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade em induzida pela dor crônica em camundongos expostos ao LCE.	39
4.2 Experimento 2: Efeito do tratamento intra-amígdala com midazolam sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.	41
8. DISCUSSÃO	46
9. CONCLUSÃO	53
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	67

1. INTRODUÇÃO

O campo do estudo sobre a empatia vem se consolidando ao longo do tempo e sua relevância para o entendimento das relações entre os indivíduos tornou-se tema de pesquisa em diversas áreas do conhecimento. Nesse sentido, a empatia se configura como fator crucial na vivência emocional e interação social, permitindo que humanos, assim como outras espécies, possam detectar os estados afetivos uns dos outros (GONZALEZ–LIENCRES et al., 2014).

A capacidade de partilhar emoções uns com os outros possibilita prever e compreender seus sentimentos, ações e motivações (SINGER, 2006; BERNHARDT; SINGER, 2012). De acordo com Singer e colaboradores (2004), o estado empático se inicia a partir da observação ou imaginação de outro indivíduo em um determinado estado emocional, ativando automaticamente esse mesmo estado no observador. Esse mecanismo juntamente com a ação do córtex pré-frontal e a compreensão de como as respostas comportamentais são refinadas, poderia explicar os diferentes níveis de empatia em diferentes espécies e em diferentes faixas etárias em indivíduos de uma mesma espécie (PRESTON; DE WALL, 2002).

Dessa forma, estudos revelam que quando um indivíduo observa outro em determinado estado motor, emocional ou perceptivo, terá as mesmas áreas ativadas que as do observado (PRESTON, 2006; MOYA–ALBIOL et al., 2010). Esse processo estaria relacionado a respostas somáticas e autonômicas efetivas, caracterizando o modelo de ação- percepção (PRESTON; DE WAAL, 2002; MOYA–ALBIOL et al., 2010). Por meio desse modelo, a empatia é descrita como um compartilhamento de um estado emocional, a partir da percepção no outro, o sujeito passa a sentir uma experiência similar daquele que observa (PRESTON; DE WALL, 2002; GALLESE et al., 2004).

Com o objetivo de se identificar essas bases biológicas, Singer e colaboradores (2004) investigaram sítios envolvidos na expressão da empatia a partir de estímulos nociceptivos. Os resultados obtidos mostraram que áreas envolvidas na nocicepção, como a insula anterior, córtex cingulado anterior, cerebelo e tronco cerebral, são ativadas igualmente ao receber o estímulo doloroso e durante a observação de um estado doloroso. O alicerce dessas pesquisas neurocientíficas se sucedeu pelo reconhecimento de neurônios espelho, isto é, neurônios visuo-motores situados no giro frontal inferior, lóbulo parietal inferior e no córtex pré-motor e que estão envolvidos na

ativação reflexa que advém da observação de um estado emocional do outro (GALLESE et al, 2004; SHAMAY-TSOORY, 2011; BETTI; AGLIOTI, 2016).

Assim, pode-se sugerir que a empatia é resultado de múltiplos circuitos e processos cerebrais e sensoriais, os quais abrangem desde estruturas mais basais do tronco encefálico até centros corticais mais desenvolvidos sob a perspectiva evolutiva (LANGFORD et al., 2006). Nesse sentido, não existiria uma área específica, mas, áreas que funcionam concomitantemente quando há expressão da empatia de acordo com a situação observada e sentida, ou seja, observar alguém num estado doloroso automaticamente ativará no observador as áreas envolvidas na modulação da dor (PRESTON, 2006).

Pesquisas recentes discorrem que a manifestação da empatia se configura como produto de diversos processos afetivos, cognitivos e comportamentais, os quais se diferem em relação ao contexto, espécies e desenvolvimento (PANKSEPP; LAHVIS, 2011). Zaki e Ochsner (2012), sugeriram a classificação da empatia em três subdivisões, a habilidade de percepção e compressão do estado emocional do outro seria o *mentalizing*; enquanto a capacidade de sentir o que o outro está sentindo, ou seja, compartilhar a experiência, caracteriza o *experience sharing*; e por fim, o *prosocial concern* que se configura como a motivação para amenizar o sofrimento do outro, e dessa forma refletir e agir diante ao estado emocional do outro e à situação.

Essas condições afetivas podem ser observadas sob o aspecto clínico, assim têm sido sugerido que pessoas cuidadoras ou que convivem com um familiar em um estado álgico, exibem respostas de percepção da dor alterada (FLOR et al., 1987; MIASKOWSKI et al., 1997) o que pode estar associado ao processo de empatia. Além disso, algumas pesquisas têm demonstrado outras consequências negativas a cerca da saúde mental e física do cuidador, visto que entre as evidências se caracterizam uma prevalência maior de transtornos psiquiátricos, doenças somáticas, isolamento social, estresse, alteração na saúde clínica geral, e desenvolvimento de sintomas relacionados à ansiedade e depressão (SIEGEL et al., 1991; GIVEN et al., 1993; KURTZ et al., 1995; LEE et al., 2001; FLASKERUD; LEE, 2001; NERI; CARVALHO, 2002; NERI, 2006)

A condição empática foi, por muito tempo, considerada uma capacidade exclusiva do homem. Atualmente é reconhecida em outras espécies, como em roedores diante de seus coespecíficos (PRESTON; DE WAAL, 2002; LANGFORD et al., 2006; 2010; 2011; BARTAL et al., 2011; 2016; MOGIL, 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA, 2015). Tal característica permite a investigação das bases

biológicas da empatia e sua relação com os estados emocionais e comportamentos, proporcionando novas possibilidades de entendimento do caráter emocional e social do ser humano (SINGER et al., 2004; LANGFORD et al., 2006; SINGER; LAMM, 2009; BERNHARDT; SINGER, 2012). Estudos têm sugerido que roedores emitem comportamentos referentes à empatia de forma rudimentar (GRENIER; LÜTHI, 2010), ou seja, suas respostas são moduladas pelo contágio emocional e nesse sentido, os comportamentos exibidos a partir da percepção do outro levaria à ativação do mesmo estado afetivo no observador (PRESTON; DE WALL, 2002; GALLESE et al., 2004; PANKSEPP; LAHVIS, 2011).

Diante dessa particularidade exibida pelos roedores, Langord e colaboradores (2006; 2011), demonstraram que a observação de um coespecífico durante um período álgico pode reduzir ou aumentar respostas nociceptivas no observador de acordo com os comportamentos apresentados pelo observado, assim, camundongos se tornam mais sensíveis à dor quando observam um familiar em sofrimento.

Da mesma forma, comportamentos relacionados à percepção dolorosa foram investigados por nosso grupo de pesquisa. Os estudos foram baseados em um protocolo de convivência durante 14 dias com um coespecífico submetido a dor crônica induzida pela constrição do nervo ciático. Os resultados obtidos mostraram que o convívio é capaz de aumentar a resposta nociceptiva nos animais submetidos ao teste de contorções (PELARIN et al., 2013; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; ZANIBONI et al., 2015; FERRARI; CANTO-DE-SOUZA, 2016).

Outra pesquisa fundamentada na investigação de respostas empáticas em modelos animais investigou o comportamento relacionado à ajuda. Em um experimento controlado (teste de ajuda), ratos que viveram em pares durante 14 dias foram alocados em uma arena, porém, um restrito a um cilindro transparente e o outro livre. A partir dos testes, os autores obtiveram como resultado a resposta do rato livre em libertar seu parceiro de caixa-moradia (coespecífico) (BARTAL et al., 2011). Nesse caso, os autores sugerem que esses comportamentos estão relacionados à uma ação do animal em ajudar, de forma a cessar o sofrimento de seu coespecífico ou o seu próprio em presenciá-lo preso. As respostas observadas neste estudo estão relacionadas a habilidade *prosocial concern*, configurando uma preocupação pró-social exibida pelo comportamento de aliviar o sofrimento sentido pelo outro (PRESTON, 2006; ZAKI; OSCHNER, 2012).

Além desses estudos, evidências igualmente foram descritas sobre respostas relacionadas a ansiedade em protocolos de convivência. Sob esse aspecto, Tomiyoshi e colaboradores (2009), observaram aumento de respostas relacionadas à ansiedade em animais avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE) após coabitarem com um coespecífico inoculado por um tumor. Em diferente contexto, resultados encontrados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o convívio com a dor de seu coespecífico pode aumentar respostas relacionadas à ansiedade em camundongos expostos ao LCE (BAPTISTA- DE-SOUZA, et al., 2015). Esses resultados sugerem que por meio da avaliação de respostas relacionadas à ansiedade geradas pelo convívio, torna-se possível observar a existência de um componente emocional presente entre os animais que influencia seus comportamentos (BARTAL, et al., 2016).

A ansiedade é um estado emocional compartilhado por diferentes espécies de vertebrados, sendo uma emoção fundamental e imprescindível dentro do repertório afetivo (STEIN; BOUWER, 1997). As raízes biológicas da ansiedade estão relacionadas às reações de defesa dos indivíduos perante contextos que representem ameaça ou perigo a sobrevivência, ao bem-estar e à integridade física, permitindo respostas adequadas frente a estímulos ameaçadores (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001; GRAEFF; ZANGROSSI, 2002; GRAY; MCNAUGAHTON, 2000). Geralmente, essas reações de defesa desencadeiam respostas fisiológicas como aumento da frequência respiratória, aceleração do batimento cardíaco, necessidade de micção ou defecação, provocando um estado emocional desconfortante (BRANDÃO, 2004; DELUCIA, 2014). Além disso, outras mudanças fisiológicas podem ajudar o indivíduo a enfrentar situações de ameaça como a estimulação de processos memmônicos, aumento da atenção e da esquiva ou ainda, aumento de comportamentos de confronto (HETEM; GRAEFF 2003; JOELS; PU et al., 2006; RODRIGUES; LeDOUX et al., 2009).

Diferente do medo que se concretiza a partir de situações onde há um perigo real e evidente, a ansiedade está associada a circunstâncias de um perigo em potencial ou incerto (BLANCHARD; BLANCHARD; RODGERS, 1990; GRAEFF, 1989). A eminência de uma situação de risco futuro pode promover respostas de evitação e avaliação de risco, dessa forma, o estímulo aversivo prepara o organismo para um possível contingente estressor (BRANDÃO, 2004; DELUCIA, 2014).

Sob o aspecto evolutivo, a ansiedade é uma resposta necessária para motivar o desempenho e favorecer a adaptação dos indivíduos a uma variedade de estímulos internos e externos que o ameaçam. Porém, essa resposta pode se tornar patológica quando o grau de estimulação for desproporcional às necessidades objetivas da situação externa, caracterizando uma resposta inadequada a um determinado estímulo (BRANDÃO, 2004; DELUCIA, 2014).

Alguns trabalhos têm demonstrado a participação de sistemas neurais envolvidos na modulação da ansiedade e que são recrutados de acordo com a natureza do estímulo apresentado (BRANDÃO et al., 1994; BRANDÃO et al., 2003). Um destes sistemas é conhecido como sistema cerebral aversivo, composto por substância cinzenta periaquedutal dorsal, hipotálamo medial, amígdala e hipófise e envolvido na emissão de respostas incondicionadas como comportamentos de luta e fuga, imobilidade, analgesia, hipertensão, taquicardia e hiperventilação (GRAEFF; GUIMARÃES, 2000). Essas estruturas desempenham um papel essencial na modulação de respostas comportamentais, fisiológicas e no desenvolvimento das reações psicológicas de estados emocionais aversivos (GRAEFF, 1990).

Por outro lado, respostas condicionadas caracterizadas pela inibição comportamental, aumento da atenção seletiva e aumento da vigilância são moduladas pelo sistema de inibição comportamental formado pelo sistema septo-hipocampal e vias noradrenérgicas e serotoninérgicas ascendentes que inervam essas estruturas (GRAY, 1987; GRAY; McNAUGHTON, 2000). Tal estado é identificado como a própria ansiedade e se assemelham a sintomas observados em transtornos de ansiedade (BRAWMAN-MINTZER; LYDIARD, 1997; RODRIGUEZ, 1999).

Dentre as estruturas que compõem esses sistemas, destaca-se uma que funciona como uma conexão entre eles, a amígdala. A amígdala é uma estrutura integrante do sistema límbico e em conjunto com outras do sistema nervoso central (SNC), participa do controle das emoções, sendo amplamente caracterizada pela sua atividade na modulação do comportamento emocional (LEDOUX, 2000; BRANDÃO, 2004). Nesse sentido, a amígdala funciona como uma conexão entre os sistemas sensoriais que enviam a informação sobre os estímulos incondicionados e condicionados até seus núcleos basolateral e lateral, visto que o controle das reações motoras e autonômicas é realizado pelas regiões subcorticais dessa estrutura, ainda particularmente o núcleo central da amígdala é uma conexão fundamental na circuitaria neural subjacente ao condicionamento emocional aversivo (BLANCHARD; BLANCHARD,

1972; LeDOUX et al., 1990; LeDOUX, 2000). Assim, a amígdala está envolvida na interação dos sistemas cerebral aversivo e o de inibição comportamental, influencia a consolidação e a evocação da memória considerando os componentes emocionais envolvidos e dando uma conotação afetiva às percepções (BRANDÃO et al., 2003; McNAUGHTON; CORR, 2004).

De acordo com Nieminem e colaboradores (1992) a estimulação da amígdala promove comportamentos relacionados ao medo e ansiedade, sendo que manipulações experimentais nessa estrutura podem modular respostas ansiogênicas (TREIT et al., 1993). Estudos realizados com ratos submetidos a lesões na amígdala e expostos ao predador, apresentaram redução na emissão de respostas de defesa (BLANCHARD et al., 1971), e diminuição de comportamentos relacionados ao medo por gatos (LeDOUX, 1998). Sob esse contexto, sistemas amigdalóides estão envolvidos na percepção do predador e irão incitar preferencialmente a região dorsomedial do núcleo ventromedial do hipocampo além de outras estruturas do sistema hipotalâmico (CANTERAS, 2003).

A conexão entre o *subiculum* e o núcleo lateral da amígdala sugere uma via onde o processamento da informação contextual no hipocampo pode se comunicar com os mecanismos de controle da resposta emocional da amígdala (PHILLIPS; LeDOUX, 1992). Por meio da entrada de informações do ambiente externo via neocórtex, o complexo amigdalóide capta e conduz sua interpretação ao hipotálamo e à substância cinzenta periaquedutal, que por sua vez, se responsabiliza em emitir as respostas comportamentais de defesa mais adequada (DAVIS, 1992).

Acerca da neurofisiologia da amígdala, dados na literatura descrevem a alto prevalência de interneurônios gabaérgicos nessa estrutura (Young; Kuhar, 1980; GONZALEZ; FILE, 1997). O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e já foram relatados dois subtipos de receptores GABA, o GABA_A e o GABA_B, mais recentemente ainda está sendo investigado o GABA_C (MILLAN, 2003). Com o propósito de identificar os sítios de ligação presentes no GABA_A foram utilizados benzodiazepínicos marcados. Esses receptores possuem o formato de um pentâmero e são compostos por duas subunidades alfa, duas beta e uma gama que envolvem um canal de cloreto, e juntamente com os receptores benzodiazepínicos, constituem um complexo macromolecular que funciona como sítio alostérico (SANGER, 1985; ARGYROPOULOS et al., 1985).

No receptor GABA_A estão localizados um sítio de ligação para o GABA, um para os benzodiazepínicos, um para os barbitúricos, álcool, além de outros (DELUCIA, 2014). Os ligantes benzodiazepínicos geram uma alteração no estado conformacional do receptor, o que promove aumento da afinidade do receptor pelo GABA, resultando numa estimulação da abertura dos canais do GABA_A (GUIDOTTI, 1980; HAEFELY, 1990). A ligação do benzodiazepínico ao sítio alostérico no receptor GABA_A facilita a transmissão GABAérgica e a hiperpolarização da célula, reduzindo a atividade neuronal e modificando estados emocionais por meio de uma ação ansiolítica, sedativa, relaxante muscular e anticonvulsivante (HETEM; GRAEFF, 1997; BRANDÃO, 2004).

Pesquisas têm demonstrado a diminuição de respostas relacionadas à ansiedade após a administração sistêmica em ratos, de agonistas benzodiazepínicos, como o midazolam (CRUZ-MORALES et al., 2002; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002) e intra-amígdala em roedores (HODGES et al., 1987; DAVIS et al., 1992; PESOLD; TREIT, 1995; GONZALEZ et al., 1997; ZANGROSSI; GRAEFF; VIANA, 1999). Em camundongos, foi demonstrado o efeito ansiolítico do midazolam quando microinjetado na amígdala de camundongos expostos ao LCE (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BARBALHO et al., 2009).

Outro aspecto que pode influenciar o efeito dos ligantes ao sítio dos benzodiazepínicos é a ontogenia e a filogenia, visto que pesquisas demonstraram que linhagens de roedores podem ser geradas com diferentes níveis de afinidade aos benzodiazepínicos e ainda esse ligantes podem se diferenciar segundo a composição da subunidade do GABA_A, o que resulta em respostas comportamentais distintas (CLEMENT, 1996).

Tendo em vista que as sinapses gabaérgicas podem influenciar todos os sistemas de neurotransmissão do SNC, alterações na modulação de algum desses sistemas pode ser resultado da ação do efeito de benzodiazepínicos (HETEM; GRAEFF, 1997). Um exemplo de neurotransmissão que pode ser influenciada é a serotoninérgica. Evidências demonstraram que esse mecanismo participa da etiologia, expressão e tratamento de comportamentos relacionados à ansiedade (GRAEFF et al., 1996). A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor amplamente distribuído no SNC, em regiões como a amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal (ARTIGAS, 2013).

Neste sentido, já foi demonstrado a existência de receptores serotoninérgicos pré-sinápticos em neurônios gabaérgicos que fazem conexões com

neurônios isolados da amígdala (KOYAMA et al., 1999, 2000). Os resultados sugerem que para se obter efeitos ansiolíticos as manipulações podem estar associadas aos receptores 5-HT_{1a} pré-sinápticos, em contrapartida, o potencial ansiogênico já estaria relacionado ao receptores pós-sinápticos (JOLAS et al., 1995; ANDREWS et al., 1994). Assim, a serotonina pode agir inibindo o comportamento defensivo ou facilitando de acordo com as regiões encefálicas e dos subtipos de receptores serotoninérgicos envolvidos na modulação (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

Da mesma forma que respostas relacionadas à empatia, modelos animais igualmente têm sido utilizados para a investigação de reações de defesa como a ansiedade. Esses modelos têm o papel de reproduzir um contexto ambiental para ocorrência de respostas de aversão ou desconforto devido à exposição a um ambiente novo ou potencialmente perigoso (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012) e são baseados nas respostas inatas dos animais frente a situações e/ou estímulos aversivos (FILE; MABBUTT; HITCHCOTT, 1990; LISTER, 1990; PELLOW; CHOPIN et al., 1985).

Estudos de Blanchard e Blanchard (1988) e McNaughton e Corr (2004) demonstraram que essas respostas podem ser observadas em roedores pela exposição a espaços abertos, ilustrando um estado similar a ansiedade presente no homem. Um modelo animal amplamente empregado desde a década de 80 é o labirinto em cruz elevado (LCE), esse mostra-se um exemplo de teste utilizado para a investigação de comportamentos relacionados à ansiedade, validado para ratos e camundongos (PELLOW; CHOPIN et al., 1985; LISTER, 1987).

O LCE é um aparato composto por dois braços fechados com paredes laterais unidos ortogonalmente a dois braços abertos, ligados entre si por uma plataforma central e elevados do solo (LISTER, 1987; CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995). Este modelo é embasado na premissa de que a exposição de ratos ou camundongos a uma nova situação pode causar uma motivação exploratória e simultaneamente evocar comportamentos defensivos incitados pela ameaça em potencial, isto resulta num conflito entre esquiva e a aproximação, caracterizando assim, respostas relacionadas à ansiedade nesses animais (RODGERS et al., 1997).

Sob esse aspecto, o modelo é amplamente utilizado para a investigação da neurobiologia dos comportamentos de defesa e na ação de potenciais agentes farmacológicos que possam ser empregados para o tratamento da ansiedade (BRANDÃO, 2004; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Fármacos com ação

ansiolítica, por exemplo, os benzodiazepínicos como o midazolam, podem alterar comportamentos, pois, produzem aumento do tempo de permanência dos roedores aos braços abertos e maior frequência no número de entrada nesses espaços (PELOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994; DE-SOUZA et al., 1998; HOLMES; RODGERS, 1998; MENARD; TREIT, 1999; TEIXEIRA; CAROBREZ, 1999; GRIEBEL et al., 2000; ROSA et al., 2000; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Enquanto fármacos ansiogênicos, como o pentilenotetrazol, aumentam o tempo de permanência e de entradas nos braços fechados, ou seja, aumento da esquivas aos braços abertos (BRANDÃO, 2004).

Diante das evidências descritas na literatura sobre a influência do convívio nas respostas relacionadas à ansiedade, da mesma forma, a participação da amígdala no comportamento emocional e os resultados acerca da neurotransmissão gabaérgica na modulação da ansiedade, consideramos relevante investigar o papel da neurotransmissão gabaérgica na ansiedade induzida pelo modelo animal de empatia para dor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel da neurotransmissão GABA_A-benzodiazepínica na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica por meio da administração sistêmica e intra-amígdala de midazolam em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

a) Avaliar o efeito da administração sistêmica de midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg, i.p.), na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.

b) Avaliar o efeito da administração intra-amígdala de midazolam (3 e 30 nmol/0,1µl), na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Sujeitos

Foram utilizados camundongos machos, da linhagem suíço-albino (9-12 por grupo) com 3 semanas de idade, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Estes animais foram alojados em caixas viveiro (30 x 19 x 13cm, 2 animais por caixa), mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C), e luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas), com livre acesso ao alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste.

3.2 Ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar (CEUA N° 7315090415). Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas e preceitos especificados pela diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

3.3 Fármacos

As drogas utilizadas foram: midazolam (MDZ) [8-cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo(1,5a)(1,4) benzodiazepina (Roche, Brasil)], nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg, intraperitoneal (i.p.) e 3,0 e 30,0 µl intra-amígdala, dissolvido em salina (0,9% de cloreto de sódio (NaCl)); cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p., anestésico; Syntec, Brasil) e xilazina (10 mg/Kg, i.p., relaxante muscular; Vetbrands, Brasil), cetoprofeno (5 mg/kg, i.p., anti-inflamatório) (LU et al., 2004) e ceftriaxona (4 mg/kg, i.p., antibiótico). As doses utilizadas foram selecionadas de acordo com estudos prévios (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014).

3.4 Cirurgia Estereotáxica e Microinjeção

Os camundongos foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100/10mg/kg, i.p.), e submetidos a tricotomia da região da cabeça, e posteriormente, cirurgia estereotáxica (estereotáxico Insight Instruments, Brasil) para a implantação bilateral intracraniana de cânulas-guia (25-gauge x 7 mm; Insight Equipamentos, Brasil) direcionadas a região do complexo amigdalóide, de acordo com as coordenadas em referência ao bregma: AP (anteroposterior) = - 1,1 mm, L (lateral) = $\pm 3,3$ mm e DV (dorsoventral) = -3,0 mm baseadas no atlas de Paxinos e Franklin (2001).

As pontas das cânulas-guia foram deixadas a ± 2 mm acima da estrutura alvo para que a mesma não fosse danificada. Para a fixação das mesmas, foram utilizados uma prótese de resina acrílica autopolimerizável e um parafuso de aço inoxidável preso ao crânio. Um mandril de aço inoxidável (33-gauge; Fishtex®, Brasil) foi colocado dentro das cânulas-guia para impedir possíveis obstruções e contaminação, sendo removido durante os procedimentos no período de teste. Os animais receberam uma injeção de anti-inflamatório cetoprofeno (5mg/kg, i.p.) e antibiótico ceftriaxona (4mg/kg, i.p.), para evitar infecções e auxiliar a recuperação pós-cirúrgica (LU et al., 2004; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014). O período pós-operatório durou entre 4 a 5 dias após a estereotaxia.

Para investigar o papel específico da neurotransmissão GABAérgica na amígdala, os animais receberam injeções de salina ou MDZ cinco minutos antes do teste comportamental. O procedimento de injeção consistiu em: cada animal foi contido manualmente pelo experimentador e uma agulha de injeção (33-gauge) foi inserida dentro da cânula-guia para a infusão da solução intra-amígdala. Cada agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), à microseringa Hamilton (10 μ l). Uma bomba de infusão (Insight BI2000) foi programada para injetar 0,1 μ l de solução durante um período de 60 segundos. O procedimento de injeção consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, infusão da respectiva solução por 60 segundos e permanência da agulha de injeção por 90 segundos, para evitar o refluxo da solução injetada. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções foi usado como parâmetro de confirmação do fluxo de solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008).

3.5 Constrição Crônica do Nervo Ciático

Para reproduzir o modelo de dor crônica, foi utilizado o método proposto por Bennet e Xie (1998), e posteriormente modificado para uso com camundongos (SOMMER; SCHAFERS, 1998). Após anestesia com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), os animais foram submetidos ao procedimento que consiste na secção da fáscia entre o glúteo e bíceps femural e a exposição do nervo ciático direito próximo a sua trifurcação. O tecido ao redor do nervo foi cuidadosamente cortado a uma distância de aproximadamente 8 mm e, posteriormente, a compressão do nervo foi realizada por meio de três ligaduras com fio estéril, não inflamatório e não absorvível, mononylon 6.0 (grupo constrição do nervo ciático, CNC). O outro grupo foi submetido a um procedimento similar, não havendo a constrição do nervo (grupo Sham). Considerando que esse modelo é um dos modelos de indução da dor crônica, Nitanda e colaboradores (2005) demonstraram que os comportamentos relacionados à dor aumentam gradualmente até um pico alcançado por volta do 10º dia após a cirurgia de constrição do nervo ciático.

3.6 Teste da placa quente

O teste de placa quente é caracterizado pelo registro do tempo em que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida a 52°C (LIU et al., 2002) até reagirem ao estímulo térmico, avaliado pelo tempo de latência para retirada ou lambida da pata traseira direita, pata em que foi realizada a constrição (CNC) ou não (Sham). O tempo máximo que o animal permaneceu sobre a placa foi 30 segundos, para evitar lesão nas patas (KURAIISHI et al., 1983).

3.7 Labirinto em cruz elevado (LCE)

O aparato experimental consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados com paredes transparentes (30 x 5 x 15 cm), elevados a 38,5cm do solo por um suporte de madeira (LISTER, 1987). Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz e foram gravados por meio de um sistema de câmera conectada a um computador localizado na sala adjacente a sala de testes. A avaliação dos parâmetros comportamentais foi realizada a

partir da observação das gravações, acompanhada do uso de um software de análise etológica X-Plo-Rat 3.0 (GARCIA et al., 2005).

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

3.8 Histologia

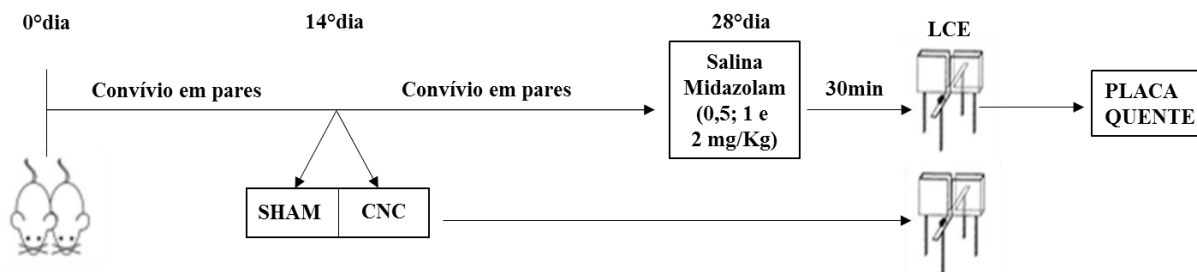
A histologia foi realizada no Experimento 2. Após o término dos experimentos os animais foram submetidos à anestesia com uma solução de cetamina e xilasina (100/10mg/kg, i.p.), e imediatamente após receberam injeção bilateral de 0,1µl de uma solução de 2% de azul de Evans, conforme o procedimento descrito acima para a injeção de drogas. Em seguida, os animais foram decapitados, seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para, posteriormente, serem seccionados em criostato a temperatura de -20°C (LEICA CM 1850, Leica Biosystems, Alemanha). As secções coronais foram avaliadas em microscópio (Olympus BX41, Olympus, Japão) e a visualização da dispersão do azul de Evans indicou os locais das injeções. Os animais cujas injeções não atingiram o complexo amigdalóide foram excluídos da análise estatística. Para os animais que receberam tratamento sistêmico (Experimento 1), ao final dos testes foram eutanasiados em câmara de CO_2 .

3.9 Delineamento Experimental

3.9.1 Experimento 1. Avaliação da injeção de midazolam sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.

Após 21 dias do desmame os animais foram alojados em duplas para a realização do protocolo experimental de 28 dias. No 14º dia um dos animais da dupla foi submetido ao procedimento de cirurgia de constrição do nervo ciático ou não. Após a cirurgia, o camundongo voltou para caixa de convivência com seu respectivo coespecífico. No 28º dia de convivência, os animais (coespecífico observador) receberam administração de salina ou MDZ (0,5, 1 e 2 mg/kg, i.p.), e após 30 minutos foram submetidos individualmente no LCE para avaliação comportamental, por cinco minutos. Os animais que não tinham sido expostos ao LCE, Sham e CNC foram expostos ao teste no LCE, conforme o procedimento descrito acima.

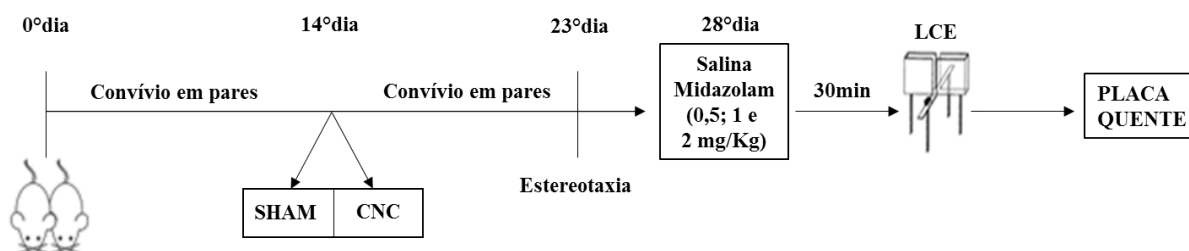
Figura 1. Esquema representativo do período de convívio, cirurgia, injeção e teste no LCE para o Experimento 1. ¹ Figura representativa do labirinto em cruz elevado (LCE).



3.9.2 Experimento 2. Avaliação da injeção de midazolam intra-amígdala sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.

Procedimento semelhante ao Experimento 1, exceto que no 23º dia de convivência os animais testes foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia direcionadas para amígdala. No 28º dia, os animais teste receberam administração intra-amígdala de salina ou MDZ (3 e 30 nmol/0,1µl), 5 minutos antes do teste no LCE.

Figura 2. Esquema representativo do período de convívio, cirurgia, injeção e teste no LCE para o Experimento 2.



3.10 Análise estatística

Os resultados dos Experimentos 1 e 2 foram analisados pela ANOVA de duas vias (Fator 1: convívio e Fator 2: tratamento). Quando os valores de F foram significativos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Duncan.

Os resultados dos grupos Sham e CNC expostos ao LCE e a Placa quente, foram analisados pelo Teste *t* de Student.

Os valores de P menor ou igual a 0,05 foram considerados como significativos.

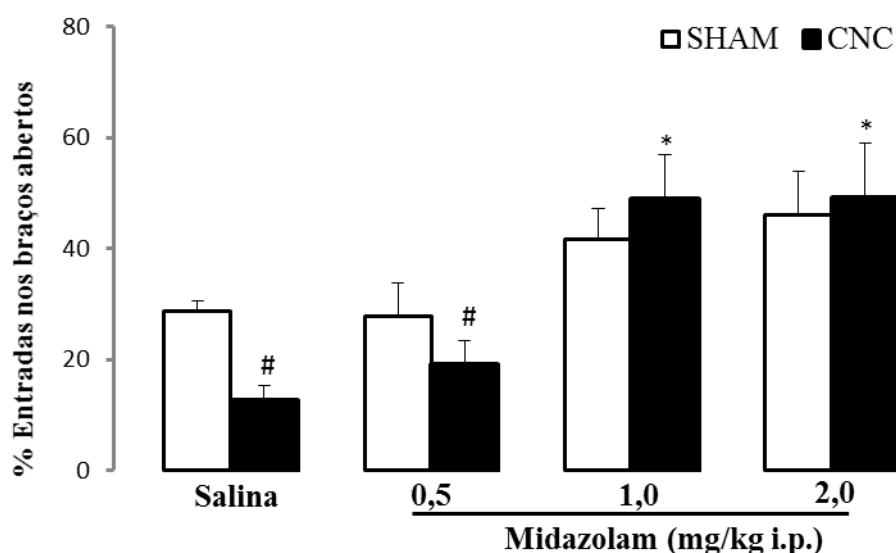
4. RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Efeito do tratamento sistêmico com midazolam sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.

Para realização do experimento 1, 85 camundongos que conviveram com coespecífico submetido à dor crônica foram testados no LCE. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Sham/salina = 12; CNC/salina = 11; Sham/midazolam (0,5 mg/kg) = 11; CNC/midazolam (0,5 mg/kg) = 12; Sham/midazolam (1,0 mg/kg) = 10; CNC/midazolam (1,0 mg/kg) = 11; Sham/midazolam (2,0 mg/kg) = 9; CNC/midazolam (2,0 mg/kg) = 9.

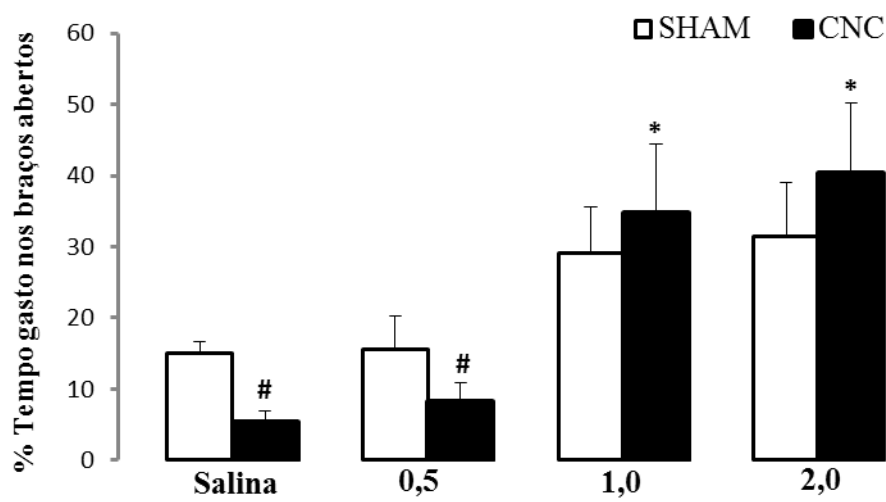
A Figura 3 mostra os efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg, i.p), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) demonstrou para porcentagem nos braços abertos (%EBA) efeito significativo do convívio ($F_{1,77} = 7,94$; $p < 0,05$) e tratamento ($F_{3,77} = 5,40$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para a interação entre convívio e tratamento ($F_{3,77} = 1,33$; $p > 0,05$). Análises posteriores utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan revelaram que os animais que conviveram com o parceiro com constrição no nervo ciático (CNC) tratados com salina e midazolam (0,5 mg/kg), apresentaram diminuição na %EBA quando comparados ao respectivo coespecífico Sham. As injeções de midazolam (1 e 2 mg/kg) aumentaram a % EBA nos animais que conviveram com o coespecífico CNC quando comparados ao respectivo CNC-salina.

Figura 3. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 9-12). * $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo Sham.



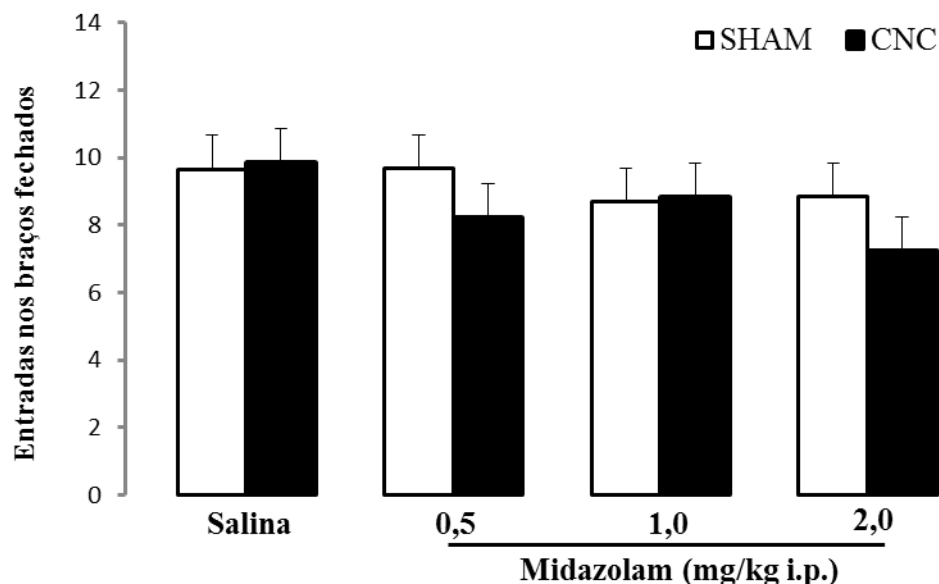
A Figura 4 mostra os efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) demonstrou efeito significativo para porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) no convívio ($F_{1,77} = 7,26$; $p < 0,05$) e tratamento ($F_{3,77} = 3,48$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para a interação entre convívio e tratamento ($F_{3,77} = 1,24$; $p > 0,05$). Comparações posteriores analisadas pelo teste de Duncan revelaram que os animais que conviveram com o parceiro CNC tratados com salina e midazolam (0,5 mg/kg), apresentaram diminuição na %TBA quando comparados ao respectivo coespecífico Sham. As injeções de midazolam (1 e 2 mg/Kg) aumentaram a %TBA nos animais que conviveram com o coespecífico CNC quando comparados ao respectivo CNC-salina.

Figura 4. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 9-12). * $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo CNC-salina. # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo Sham.



A Figura 5 mostra os efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) revelou que para as entradas nos braços fechados (EBF), medida de atividade locomotora, não ocorreu efeito significativo para o convívio ($F_{1,77} = 0,55$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{3,77} = 0,22$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{3,77} = 0,44$; $p > 0,05$).

Figura 5. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados do labirinto. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 9-12).



A Tabela 1 mostra os efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) demonstrou efeito significativo para as medidas espaço-temporais [Total de mergulhos: tratamento ($F_{3,77} = 4,80$; $p < 0,05$); porcentagem de mergulhos protegidos: tratamento $F_{3,77} = 9,56$; $p < 0,05$; e porcentagem de esticar (SAP: stretched attend postures) protegido: $F_{3,77} = 3,74$; $p < 0,05$]. Comparações posteriores utilizando o teste de Duncan revelaram que o midazolam (1,0 mg/Kg) aumentou o total de mergulhos, enquanto midazolam (1 e 2 mg/Kg) diminuiu a porcentagem de mergulhos protegidos nos animais que conviveram com o parceiro CNC quando comparados ao respectivo CNC-salina.

A dose de 2 mg/kg do midazolam diminuiu a porcentagem de SAP protegido nos animais que conviveram com o parceiro CNC quando comparados ao respectivo CNC-salina. Ausência de efeito significativo foi demonstrado para as outras medidas [porcentagem de tempo gasto no centro : convívio ($F_{1,77} = 7,26$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{3,77} = 0,27$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{3,77} = 1,72$; $p > 0,05$); Total de mergulhos: convívio ($F_{1,77} = 0,29$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{3,77} = 0,80$; $p > 0,05$); porcentagem de mergulhos protegidos: convívio ($F_{1,77} = 1,82$; $p > 0,05$) e interação entre

convívio e tratamento ($F_{3,77} = 0,70$; $p > 0,05$); total SAP: convívio ($F_{1,77} = 0,37$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{3,77} = 0,26$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{3,77} = 0,17$; $p > 0,05$); porcentagem de SAP protegido: convívio ($F_{1,77} = 0,87$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{3,77} = 1,21$; $p > 0,05$).

Tabela 1. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1 e 2 mg/kg) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao labirinto

Comportamento	Salina		Midazolam (mg/Kg)					
			0,5		1		2	
	SHAM	CNC	SHAM	CNC	SHAM	CNC	SHAM	CNC
Tempo no centro (%)	24,5 ± 3,0	25,4 ± 3,7	24,2 ± 2,0	21,4 ± 2,8	22,2 ± 2,4	24,2 ± 3,0	28,2 ± 5,5	16,5 ± 1,1
Total mergulhos	31,1 ± 3,5	29,4 ± 3,3	29,0 ± 1,6	25,0 ± 2,7	36,2 ± 3,4	43,7 ± 6,4	37,6 ± 4,0	42,4 ± 6,7*
Mergulho protegido (%)	76,3 ± 3,9	87,2 ± 4,2	61,0 ± 7,5	79,1 ± 6,5	47,0 ± 7,8*	52,7 ± 8,3*	47,1 ± 9,6*	42,5 ± 13,1*
Total SAP	40,6 ± 3,8	45,1 ± 5,1	48,4 ± 4,7	46,0 ± 5,1	41,7 ± 4,7	44,8 ± 6,8	42,2 ± 6,6	46,6 ± 7,2
SAP protegido (%)	74,8 ± 4,8	89,3 ± 3,5	79,2 ± 6,4	88,1 ± 3,9	70,6 ± 6,3	73,0 ± 7,3	69,5 ± 6,2	60,4 ± 10,4*
Imobilidade total	1,1 ± 0,4	2,9 ± 2,1	4,5 ± 1,7	4,6 ± 1,7	16,5 ± 13,9	3,5 ± 1,8	6,6 ± 3,7	1,1 ± 0,8

Os dados representam média ± erro padrão da média (n= 9-12). * $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo controle salina. NS = não significativo.

A Tabela 2 ilustra os resultados sobre a latência de retirada da pata traseira direita nos animais Sham (n = 75) ou CNC (n = 75) no teste de placa quente realizado no 28º dia após os respectivos coespecíficos serem submetidos ao LCE. O teste *t* de Student para grupos independentes revelou que os animais CNC apresentaram diminuição da latência de retirada da pata traseira direita ($t_{147} = 10,42$, $p < 0,05$) em comparação aos animais Sham.

Tabela 2. Latência de retirada da pata traseira direita nos animais Sham ou CNC no teste de placa quente realizado no 28º dia após seus coespecíficos serem submetidos ao LCE.

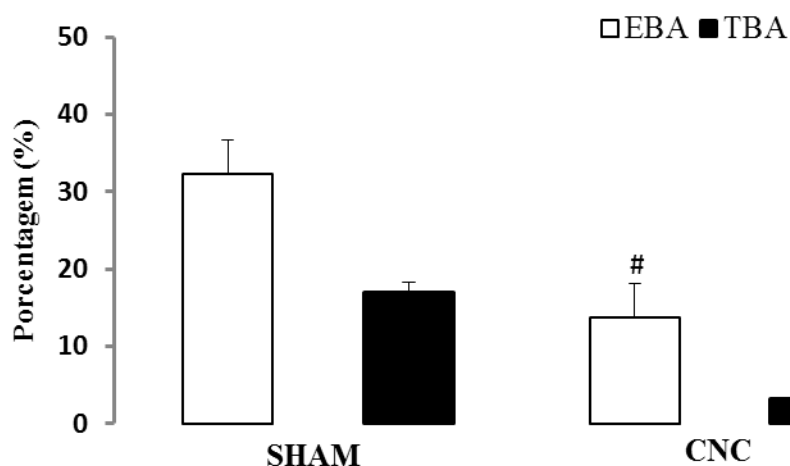
Grupos	Teste de placa quente (s)
SHAM	21,60 ± 0,35
CNC	15,22 ± 0,31 [#]

Os dados representam a média ± erro padrão da média (n= 75 por grupo). [#] $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (Sham).

4.1.1 Avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade em induzida pela dor crônica em camundongos expostos ao LCE.

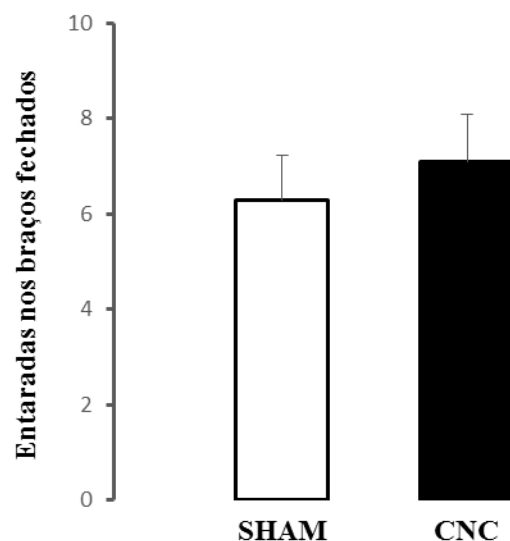
Para avaliar a ansiedade induzida pela constrição do nervo ciático foram utilizados 20 animais (SHAM: n=10; CNC: n=10). A Figura 6 mostra o efeito da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos expostos ao LCE. O Teste *t* de Student mostrou redução significativa da %EBA ($t_{18} = 3,08$; $p < 0,05$) e %TBA ($t_{18} = 3,44$; $p < 0,05$), nos animais CNC comparados ao grupo Sham.

Figura 6. Efeitos da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas e tempo gasto do labirinto. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10). # $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo controle (Sham).



A Figura 7 mostra o efeito da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos expostos ao LCE. O Teste *t* de Student revelou que para as EBF, não ocorreu efeito significativo, demonstrando que a dor crônica não alterou a locomoção nos animais constritos ($t_{18} = -0,61$; $p > 0,05$).

Figura 7. Efeitos da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados do labirinto. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 10).



A Tabela 3 mostra os efeitos da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos expostos ao LCE. A análise do teste *t* demonstrou efeito significativo para porcentagem de mergulhos protegidos ($t_{18} = -3,69$; $p < 0,05$) e para porcentagem de SAP protegido ($t_{18} = -4,35$; $p < 0,05$). Ausência de efeito significativo foi observado em outras medidas [% Tempo gasto no centro (TC): $t_{18} = -0,16$; $p > 0,05$; Total de mergulhos: $t_{18} = 0,91$; $p > 0,05$; Total de SAP: $t_{18} = -0,12$; $p > 0,05$; Total de imobilidade: $t_{18} = 1,0$; $p > 0,05$; e entradas nos braços fechados (EBF): $F_{1,18} = 0,37$; $p > 0,05$].

Tabela 3. Efeitos da dor crônica induzida pela cirurgia de constrição do nervo ciático em camundongos expostos ao LCE.

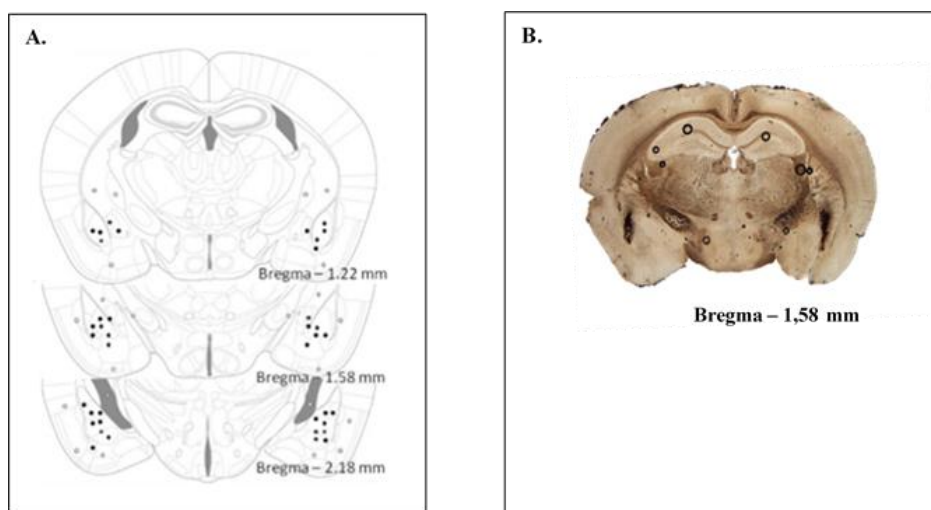
Comportamento	Condição	
	SHAM	CNC
Tempo no centro (%)	41,8 \pm 6,6	43,4 \pm 7,0
Total mergulhos	28,8 \pm 2,3	24,8 \pm 2,8
Mergulho protegido (%)	75,4 \pm 5,8	97,5 \pm 1,0 [#]
Total SAP	40,9 \pm 2,6	41,4 \pm 2,8
SAP protegido (%)	87,5 \pm 2,0	97,2 \pm 0,8 [#]
Imobilidade total	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. [#] $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo controle (Sham). NS = não significativo

4.2 Experimento 2: Efeito do tratamento intra-amígdala com midazolam sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE.

A análise histológica confirmou a canulação positiva na amígdala de 68 camundongos e o índice de acerto de 70% do total de animais utilizados. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Sham/salina = 12; CNC/salina = 11; Sham/midazolam (3 nmol/0,1µl) = 12; CNC/midazolam (3 nmol/0,1µl) = 11; Sham/midazolam (30 nmol/0,1µl) = 12; CNC/midazolam (30 nmol/0,1µl) = 12.

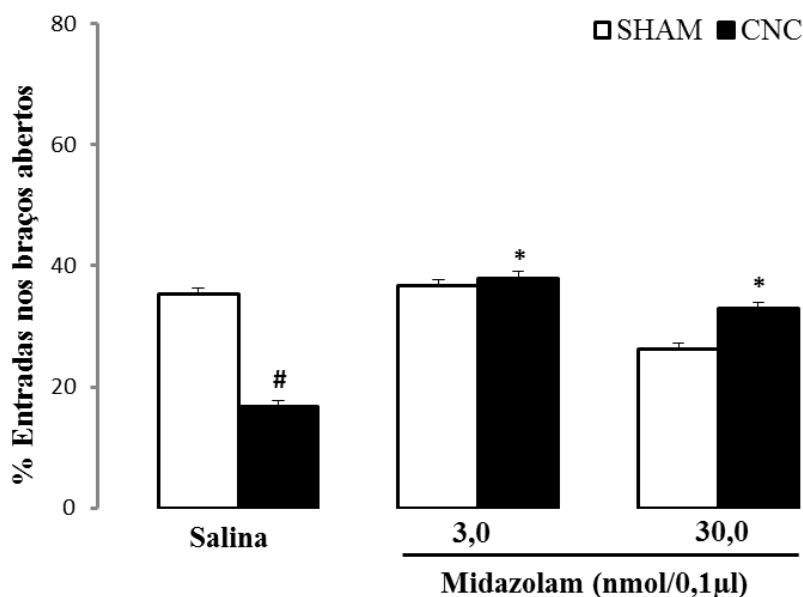
Figura 8. Representação esquemática dos sítios de microinjeção na amígdala de camundongos. (A) Representação esquemática dos locais de microinjeção dentro (círculos cheios) ou fora (círculos cinza) da amígdala. Os cortes coronais representados estão entre 1,22 e 2,18 mm em relação ao bregma no atlas de Paxinos e Franklin, 2001. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos. (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando o local de injeção dentro do complexo amigdalóide.



A Figura 9 demonstra os efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1µl) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) demonstrou efeito significativo para %EBA no tratamento ($F_{2,62} = 3,92$; $p < 0,05$) e para a interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 5,41$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para o convívio ($F_{1,62} = 1,21$; $p > 0,05$). Comparações posteriores utilizando o teste de Duncan revelaram que os animais que conviveram com o coespecífico CNC tratados com salina apresentaram diminuição na %EBA quando comparados aos animais tratados com salina e que conviveram com o coespecífico Sham. As injeções de midazolam (3 e 30

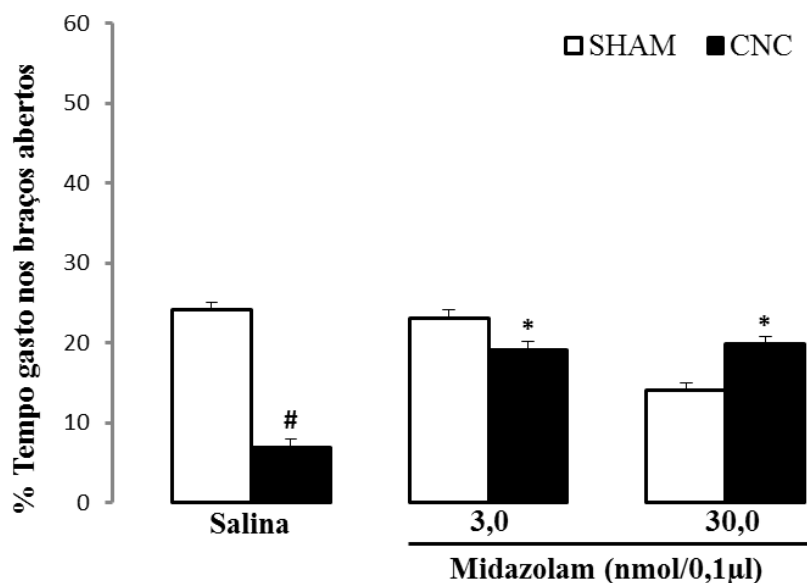
nmol/0,1 μ l) aumentaram a %EBA nos animais que conviveram com o coespecífico CNC quando comparados ao respectivo CNC-salina.

Figura 9. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ l), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). *p<0,05 comparado com respectivo grupo CNC-salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham.



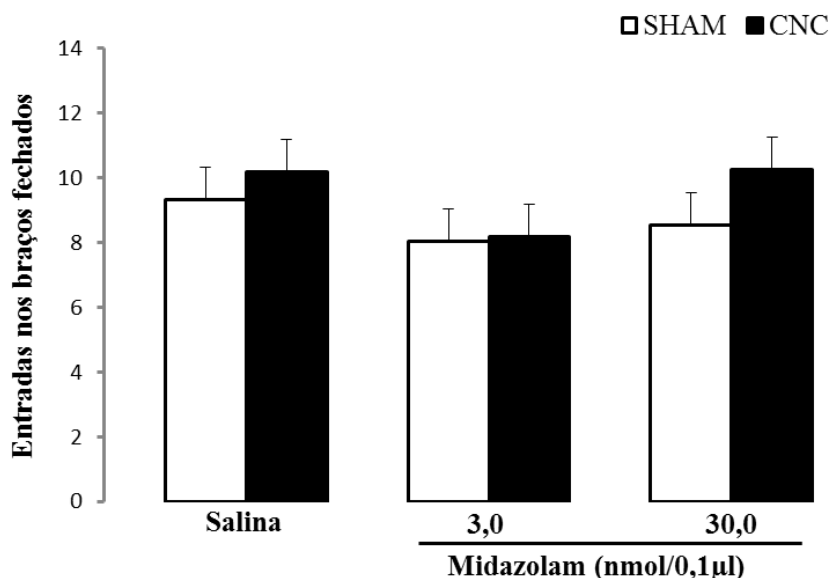
A Figura 10 apresenta os efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ l), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) demonstrou efeito significativo para %TBA na interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 5,49$; $p > 0,05$), sem efeito significativo para o convívio ($F_{1,62} = 3,19$; $p > 0,05$) e para o tratamento ($F_{2,62} = 1,50$; $p > 0,05$). Como houve interação as análises posteriores utilizando o teste de comparações de Duncan demonstraram que os animais que conviveram com o coespecífico CNC tratados com salina apresentaram diminuição na %TBA quando comparados aos animais igualmente tratados com salina e conviveram com o coespecífico Sham. As injeções de midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ L) aumentaram a %TBA nos animais que conviveram com o coespecífico CNC, quando comparados ao respectivo CNC-salina.

Figura 10. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ L), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM (n= 11-12). *p<0,05 comparado com respectivo grupo CNC-salina. #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham.



A Figura 11 ilustra os efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ L), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) revelou que para as EBF, nenhum dos fatores mostrou efeito significativo, convívio ($F_{1,62} = 1,04$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{2,62} = 1,08$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 0,23$; $p > 0,05$).

Figura 11. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ L), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados do labirinto (n= 11-12). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média \pm EPM.



A Tabela 4 mostra os efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ L) intra-amígdala, sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao labirinto. A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) mostrou efeito significativo para as medidas espaço-temporais [%TC: tratamento ($F_{2,62} = 1,61$; $p > 0,05$); % mergulhos protegidos: interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 7,59$; $p < 0,05$); total de SAP: tratamento ($F_{2,62} = 3,47$; $p < 0,05$); % SAP protegido: convívio ($F_{1,62} = 5,04$; $p < 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 5,67$; $p < 0,05$).

A ANOVA de dois fatores (convívio x tratamento) mostrou ausência de efeito significativo para as medidas espaço-temporais [%TC: convívio ($F_{1,62} = 4,80$; $p < 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 3,93$; $p < 0,05$); total de mergulhos: convívio ($F_{1,62} = 0,0008$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{2,62} = 2,47$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 1,26$; $p > 0,05$); % mergulhos protegidos: convívio ($F_{1,62} = 3,38$; $p > 0,05$) e tratamento ($F_{2,62} = 2,86$; $p > 0,05$); total de SAP: convívio ($F_{1,62} = 0,08$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 1,05$; $p > 0,05$); % SAP protegido: tratamento ($F_{2,62} = 1,61$; $p > 0,05$); total de imobilidade: convívio ($F_{1,62} = 2,05$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{2,62} = 1,32$; $p > 0,05$) e interação entre convívio e tratamento ($F_{2,62} = 0,12$; $p > 0,05$)].

O teste de comparações de Duncan mostrou que as doses de midazolam (3 e 30 nmol/0,1µL) diminuíram as porcentagens de tempo gasto no centro, de mergulhos e SAP protegidos, sendo que apenas a dose de 30 nmol/0,1µL diminuiu o total de SAP.

Tabela 4. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (3 e 30 nmol/0,1µL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica em camundongos expostos ao LCE (n= 11-12).

Comportamento	MIDAZOLAM (nmol/0,1µL)					
	Salina		0,3		30	
	SHAM	CNC	SHAM	CNC	SHAM	CNC
Tempo no centro (%)	16,9 ± 2,2	31,3 ± 3,7 [#]	24,6 ± 3,7	22,3 ± 2,2*	17,2 ± 2,3	21,2 ± 2,7*
Total mergulhos	28,1 ± 3,1	27,3 ± 3,7	33,7 ± 4,1	28,5 ± 2,5	20,5 ± 3,4	26,3 ± 3,1
Mergulho protegido (%)	44,6 ± 6,0	88,3 ± 4,0 [#]	49,9 ± 7,8	50,6 ± 7,6*	67,4 ± 7,0	56,5 ± 8,3*
Total SAP	34,8 ± 2,9	39,0 ± 3,3	32,6 ± 4,1	30,8 ± 2,6	29,0 ± 2,4	27,0 ± 2,7*
SAP protegido (%)	76,6 ± 3,5	96,6 ± 1,0 [#]	80,1 ± 4,2	80,8 ± 2,2*	84,0 ± 4,0	82,5 ± 3,6*
Imobilidade total (tempo)	6,0 ± 3,7	2,5 ± 2,3	13,4 ± 11,6	3,5 ± 1,9	20,5 ± 8,4	10,7 ± 4,9

Os dados representam média e ± erro padrão da média. [#]p<0,05 comparado com respectivo grupo controle (Sham); *p<0,05 comparado com respectivo grupo CNC-salina.

A Tabela 5 ilustra os resultados sobre a latência de retirada da pata traseira direita nos animais CNC ou Sham no teste de placa quente realizado no 28º dia após seus coespecíficos serem submetidos ao LCE. O teste *t* de Student para grupos independentes revelou que os animais CNC apresentaram diminuição da latência de retirada da pata traseira direita ($t_{134} = 9,20$; $p < 0,05$) em comparação aos animais Sham.

Tabela 5. Latência de retirada da pata traseira direita nos animais CNC ou Sham no teste de placa quente realizado no 28º dia após seus coespecíficos serem submetidos ao LCE (n=68 por grupo).

Grupos	Teste de placa quente (s)
Sham	21,22 ± 0,48
CNC	15,22 ± 0,43 [#]

Os dados representam média e ± erro padrão da média. [#]p<0,05 comparado com respectivo grupo controle (Sham).

8. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o papel da neurotransmissão GABA_A-benzodiazepínica na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica por meio da administração sistêmica e intra-amígdala de midazolam em camundongos. Os resultados demonstraram que o convívio com animal submetido à constrição do nervo ciático promoveu aumento de comportamentos relacionados à ansiedade sugerindo dessa forma o valor potencial que o convívio com a dor gera no parceiro. O tratamento com midazolam (1,0 e 2,0 mg/kg, Experimento 1) e intra-amígdala (3, 30 nmol/0,1µl, Experimento 2) produziu aumento da porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos, além de diminuir comportamentos de avaliação de risco, reforçando o efeito ansiolítico deste fármaco. Os resultados foram observados na ausência de mudança significativa na atividade locomotora, representada pela frequência de entradas nos braços fechados do labirinto, em ambos os Experimentos 1 e 2.

Para verificar a dor induzida pelo modelo de constrição do nervo ciático, os animais CNC e SHAM foram avaliados no teste de placa quente. Os resultados demonstraram diminuição na latência de retirada da pata nos animais com o nervo constricto (KURAISHI et al., 1983), o que confirma a efetividade do procedimento cirúrgico nos dois experimentos, reforçando outros estudos da literatura com o mesmo modelo de dor crônica (BENNETT; XIE 1988; SOMMER; SCHAFERS, 1998; BAPTISTA-DE-SOUZA et al, 2015).

Recentemente foi demonstrado que estados afetivos podem modular respostas relacionadas à empatia em roedores (SINGER et al., 2004; LANGFORD et al., 2006; LANGFORD et al., 2011), uma vez que foi verificada a redução dessas respostas em ratos que receberam injeções de midazolam e foram expostos ao teste de ajuda. Nesse caso, ao amenizar o estado afetivo relacionado à ansiedade, conseqüentemente foi reduzido o comportamento do rato livre em libertar o seu coespecífico, evidenciando o aspecto emocional presente na motivação desses animais em exibir comportamentos de ajuda e libertar seu parceiro (BARTAL, et al., 2016). Este resultado reforça a hipótese de que a emoção é a base para qualquer tipo de capacidade relacionada à empatia (PANKSEPP; LAHVIS, 2011).

Evidências da literatura têm sido discutidas a respeito das respostas de roedores frente a estados afetivos, pois, demonstraram alterações da resposta de percepção da nocicepção em camundongos quando estes observam um familiar em sofrimento (SINGER et al., 2004; LANGFORD et al., 2006; LANGFORD et al., 2011; MARTIN et al., 2015). Neste contexto, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa encontraram um aumento da

sensibilidade à nocicepção em camundongos submetidos ao protocolo de convívio com um par em dor crônica e submetidos à observação de seu coespecífico no teste de contorções (PELARIN et al., 2013; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; ZANIBONI et al., 2016).

Sob esse aspecto, tendo em vista que respostas nociceptivas podem ser modificadas por situações estressantes (RHUDY; MEAGHER, 2000) pode-se sugerir que o convívio com coespecífico em quadro de dor crônica seria capaz de induzir comportamentos relacionados à ansiedade no parceiro, o que foi confirmado pelo aumento das respostas de ansiedade observadas em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE) (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015). Considerando que a dor crônica pode ser entendida como uma forma de estresse (VACHON-PRESSEAU et al., 2013), recentemente outro estudo realizado por nosso grupo, revelou aumento de comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos quando expostos ao convívio com o parceiro submetido ao estresse crônico de contenção, tais como diminuição das respostas de exploração aos braços abertos do LCE, aumento de comportamentos relacionados à avaliação de risco e de percepção da nocicepção (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2016).

Corroborando com esses achados do nosso grupo, os resultados deste trabalho demonstraram que o convívio com coespecífico em quadro de dor crônica aumenta os comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos expostos ao LCE. Resultado de aumento da ansiedade induzida por fatores estressantes já foi descrito em outro estudo semelhante ao que utilizamos neste trabalho, entretanto o efeito ansiogênico foi produzido pelo convívio com um coespecífico inoculado por um tipo de tumor (TOMIYOSHI et al., 2009). Assim parece razoável sugerir que o tipo de convívio social utilizado neste estudo ou seja, convívio com coespecífico em quadro de dor crônica por 14 dias, fortalece os resultados obtidos anteriormente onde o camundongo observador apresenta aumento da nocicepção (PELARIN et al., 2014; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; ZANIBONI et al., 2016) e da ansiedade (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015), caracterizando a resposta de empatia em camundongos avaliados no labirinto.

O efeito da dor crônica nas respostas relacionadas à ansiedade tem sido demonstrado na literatura (ATTAL et al., 2008; GERRITS et al., 2012; HAANPÄÄ et al., 2009; SIMONS et al., 2014). Nesse contexto, estudos pré-clínicos mostraram o aumento de comportamentos relacionados à ansiedade em roedores submetidos a constrição do nervo ciático (ROESKA et al., 2009; ÇIVI et al., 2016; YALCIN et al., 2011).

Com o propósito de verificar essas respostas no nosso estudo, os animais constrictos foram expostos ao labirinto. A análise comportamental dos animais foi caracterizada pela diminuição de entradas e tempo gasto nos braços abertos do labirinto e aumento de comportamentos de avaliação de risco (mergulho e SAP protegidos), sugerindo o efeito ansiogênico gerado pela dor crônica. Resultado semelhante foi observado nos camundongos submetidos ao estresse crônico, caracterizado pelo aumento de respostas relacionadas à ansiedade quando testados no labirinto (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2016). Sendo assim, os nossos resultados sugerem que além do convívio com a dor crônica, os coespecíficos também estão expostos ao convívio com um parceiro ansioso.

Nesse sentido, pode-se sugerir que os resultados obtidos sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica podem estar intrinsicamente associados ao estado emocional do coespecífico CNC, visto que por meio de mecanismos de ação-percepção, o sujeito passa a experienciar um estado emocional similar daquele que observa (PRESTON; DE WAAL, 2002; MOYA-ALBIOL et al., 2010). Ao expor os animais teste ao labirinto, igualmente foi observado aumento de comportamentos relacionados a ansiedade, ou seja, diminuição das entradas e tempo gastos nos braços abertos do labirinto e aumento das medidas de mergulho e SAP protegidos (RODGERS et al., 1997). Sendo assim, esses resultados contribuem para fortalecer a hipótese sobre influência de estados emocionais nos comportamentos de roedores existência de um componente emocional nos camundongos (BARTAL, et al 2016) pois, o convívio com animal submetido à constrição do nervo ciático promoveu aumento de comportamentos relacionados à ansiedade sugerindo dessa forma o valor que o convívio com a dor e a ansiedade gera no parceiro.

Dentro desse contexto, evidências revelaram a participação da neurotransmissão GABAérgica na modulação da ansiedade e nos processos da dor (Experimento 1). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, e nos receptores GABA_A estão localizados sítios de ligação para o GABA, fármacos benzodiazepínicos, barbitúricos, etanol, anestésicos inalatórios, furosemida, esteróides neuroativos e picrotoxina (DELUCIA, 2014). Os benzodiazepínicos facilitam a neurotransmissão GABAérgica, modulando a abertura dos canais de cloro, isso acontece devido a mudança de conformação do sítio de ligação alostérico, aumentando a afinidade ao receptor GABA_A pelo GABA (HAEFELY, 1990; SMITH, 2001; ATACK, 2005) o que possibilita a hiperpolarização das células, a redução da atividade neuronal e mudança de estados emocionais (SMITH, 2001).

Nesse sentido, pesquisas realizadas com benzodiazepínicos encontraram que a administração sistêmica do midazolam (agonista benzodiazepínico) é capaz de promover efeito ansiolítico em roedores (PELOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994; DE-SOUZA et al., 1998; HOLMES; RODGERS, 1998; MENARD; TREIT, 1999; TEIXEIRA; CAROBREZ, 1999; GRIEBEL et al., 2000; ROSA et al., 2000; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000) e ainda atenuou a hiperalgesia em camundongos expostos ao teste de contorções abdominais (ZANIBONI et al., 2016). Considerando esses achados, o tratamento sistêmico com midazolam (1 e 2 mg/Kg) utilizado no Experimento 1, produziu aumento da porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos, e do total de mergulhos, e diminuição da porcentagem de mergulhos e SAP protegido, caracterizando o efeito ansiolítico. Os resultados foram observados na ausência de mudança significativa na atividade locomotora, representada pela frequência de entradas nos braços fechados do labirinto. Os dados encontrados corroboram com trabalhos anteriores cujo midazolam administrado sistemicamente em ratos e camundongos reduziu respostas relacionadas à ansiedade (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2002; CRUZ-MORALES et al., 2002), aumentando a exploração dos braços abertos do LCE e diminuindo comportamentos de avaliação de risco.

Durante a exposição ao labirinto roedores como por exemplo, ratos (ROSA et al., 2000) e camundongos (HOLMES; RODGERS, 1998), exibem um comportamento exploratório caracterizado por evitação progressiva dos braços abertos e preferência pelos braços fechados do labirinto. Os fármacos benzodiazepínicos e outros compostos ansiolíticos são capazes de modificar este padrão comportamental em roedores, aumentando a porcentagem de entradas e o tempo gasto nos braços abertos do labirinto (PELOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994; DE-SOUZA et al., 1998; HOLMES; RODGERS, 1998; MENARD; TREIT, 1999; TEIXEIRA; CAROBREZ, 1999; GRIEBEL et al., 2000; ROSA et al., 2000; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000). Os trabalhos citados acima foram realizados com animais que conviveram em grupo. Apesar de no nosso estudo os camundongos conviverem em duplas, isso não foi fator limitante para que o agonista dos receptores GABA_A-benzodiazepínicos produzisse o efeito ansiolítico. Ao lado das medidas convencionais, as medidas espaço-temporais, como posturas de esticar o corpo e mergulhar a cabeça, têm sido utilizadas para fornecer dados de avaliação de risco no labirinto (RODGERS; JOHNSON, 1995), estes comportamentos de avaliação de risco são sensíveis aos benzodiazepínicos (HANDLEY, 1991).

A partir dos resultados sobre o tratamento sistêmico, pode-se sugerir o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de dor crônica. Contribuições de diversas pesquisas discorrem sobre a neurotransmissão GABAérgica presente na amígdala (MILLAN, 2003) e que essa estrutura integra um sistema responsável pela emissão de respostas incondicionadas associadas a expressão da ansiedade (BRANDÃO et al., 1994, BRANDÃO et al., 1999). Sob esse aspecto, injeções centrais de benzodiazepínicos podem reduzir comportamentos relacionados à ansiedade em diferentes modelos animais (YOUNG; KUCHAR, 1980; HODGES et al., 1987; ZANGROSSI; GRAEFF, 1994; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009).

Sendo a amígdala uma das estruturas do sistema límbico que participa da modulação das respostas emocionais (BRANDÃO, 2004; LeDOUX, 2000) e de nocicepção (NEUGEBAUER et al., 2004) um estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa, evidenciou a participação da amígdala no protocolo de empatia para dor, pois, ao inativá-la foi observado aumento do número de contorções abdominais nos camundongos em comparação ao seu grupo controle (PELARIN et al., 2013). Tendo em vista que as sinapses gabaérgicas podem influenciar todos os sistemas de neurotransmissão do SNC, alterações na modulação de algum desses sistemas pode ser resultado da ação do efeito de benzodiazepínicos (GRAEFF; HETEM, 1997). Um exemplo é o serotoninérgico, este sistema tem sido implicado na modulação de estímulos aversivos como a ansiedade e a depressão (BIGOS et al., 2008; MURPHY et al., 2009; GODLEWSKA et al., 2012). A amígdala possui todos os subtipos de receptores de 5-HT, os quais são responsáveis na mediação inibitória e excitatória da 5-HT e algumas de suas projeções estão expressas nos interneurônios GABAérgicos e glutamatérgicos (MCDONALD; MASCAGNI, 2007). Pesquisas anteriores observaram que o aumento de liberação de 5-HT na amígdala basolateral pode aumentar respostas relacionadas à ansiedade e medo (JOHNSON et al., 2015).

A vasta literatura acerca dos efeitos do midazolam, o papel da amígdala nos processos emocionais e o resultado encontrado no estudo de Pelarin e colaboradores (2013) impulsionou a investigação dessa estrutura no presente trabalho. Sendo assim, foi observado o efeito ansiolítico promovido pelas duas doses intra-amígdala de midazolam (3 e 30 nmol/0,1µl), caracterizado pelo aumento de entradas e tempo gasto nos braços abertos, diminuição de tempo gasto no centro do aparato e diminuição do total de SAP, % SAP protegido e mergulho protegido. As doses não alteraram a atividade locomotora dos animais, verificada

pela frequência de entradas nos braços fechados. Efeitos ansiolíticos já foram demonstrados após aplicação bilateral de benzodiazepínicos no complexo amigdalóide em diferentes modelos de ansiedade, inclusive o labirinto (MENARD; TREIT, 1999). Outras evidências da literatura apontam para o papel dessa estrutura na modulação de respostas emocionais (GOLDSTEIN et al., 1996; LeDOUX, 2012) e na empatia (SINGER; LAMM, 2009).

Os nossos resultados corroboram com outros estudos que observaram o aumento da exploração aos braços abertos no LCE e diminuição dos comportamentos de avaliação de risco após tratamento intra-amígdala com midazolam (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009) e intra-substância cinzenta periaquedutal em camundongos (REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008). Entretanto, nenhum estudo havia investigado a participação dos receptores GABAérgicos da amígdala na modulação da ansiedade no contexto do modelo de empatia apresentado neste trabalho. Os nossos resultados com a administração bilateral intra-amígdala de midazolam, fortalecem o envolvimento dos receptores GABAérgicos da amígdala na modulação da resposta de ansiedade induzida pelo convívio com o coespecífico com dor crônica em camundongos.

9. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo apóia o entendimento da participação da neurotransmissão gabaérgica na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com a dor crônica, bem como demonstra que por meio de respostas relacionadas à empatia se torna possível investigar alterações comportamentais resultantes da percepção do estado emocional do outro.

Além disso, os resultados sugerem que o tratamento sistêmico e injeções centrais na amígdala de midazolam podem reverter o padrão comportamental ansiogênico presente nos animais submetidos ao protocolo de convivência com a dor, o que contribui para esclarecer o envolvimento dos receptores GABAérgicos da amígdala na modulação da resposta de ansiedade induzida pelo convívio com o coespecífico com dor crônica em camundongos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, N; HOGG, S; GONZALES, L.E; FILE S.E. 5-HT_{1A} receptors in the median raphe nucleus and dorsal hippocampus may mediate anxiolytic and anxiogenic behaviors respectively. **Eur J Pharmacol**, 264: 259-64, 1994.

ARGYROPOULOS, S. V., SANDFORD, J. J., & NUTT, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 2: pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacol Ther**, v. 88, p. 213-227, 2000.

ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacol Ther**, v. 137, p.119–131, 2013.

ATAK JR. The benzodiazepine binding site of GABA(A) receptors as a target for the development of novel anxiolytics. **Expert Opin Investig Drugs**, v.14, n°5, p. 601-18, 2005.

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

BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; NUNCIATO, A.C.; FACHINI, G.; PEREIRA, B.C.; ZANIBONI, C.R.; CANTO-DE-SOUZA, A. Anxiogenic-like effects and hypernociception on cagemate induced by cohabitated with mice under neuropathic pain. **Behav Pharmacol**, v. 26, n° 7, p. 664-672, 2015.

BAPTISTA, D.; BUSSADORI, K.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala in fusion of midazolam: influence of prior test experience. **Brain Res**.v. 1294 p. 29-37, 2009.

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, 2009.

BARTAL, I. B; DECETY, J; MASON, P. Empathy and pro-social behavior in rats. **Science**, v. 334, p.1427-143, 2011.

BARTAL IB, SHAN H, MOLASKY N, MURRAY T, WILLIAMS J, DECETY J, MASON P. Pro-Social Behavior In Rats Requires An Affective Motivation. **Front.Psychol**. doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00850, 2016.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BERNHARDT, B. C.; SINGER, T. The neural basis of empathy. **Annu Rev Neurosci**, v. 35, p. 1-23, 2012.

BERTOGLIO, L.J; CAROBREZ, A.P. Avaliação da resposta de ratos pré-expostos a ambientes com diferentes graus de aversão no labirinto em cruz elevado: efeitos da buspirona e do midazolam. Florianópolis, 2000.

BERTOGLIO L.J, CAROBREZ AP. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** v.72, p.449-455, 2002.

BETTI, V; AGLIOTI, S. M. Dynamic construction of the neural networks underpinning empathy for pain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 63, p. 191-206, 2016.

BIGOS, K.L; POLLOCK, B.G; AIZENSTEIN, H.J; FISHER, P.M; BIES, R.R; HARIRI, A.R. Acute 5-HT reuptake blockade potentiates human amygdala reactivity. **Neuropsychopharmacol**, v.33, p.3221–3225, 2008.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. Defensive reaction in the albino rat. In: ROTH, M.; BURROWS, G.D.; NOYES, R. (ed). Handbook of anxiety, 3rd. ed., Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**, p.351-362, 1971.

BLANCHARD D.C, BLANCHARD R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **J Comp Physiol Psychol**, v. 81, p. 281-290, 1972.

BLANCHARD, R.J., BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu Rev Psychol.** 39, 43–68, 1988.

BLANCHARD, D.C., BLANCHARD, R.J., RODGERS, R.J. Pharmacological and Neural control of anti-predator defense in the rat. **Agressive Behav.** V. 16, p. 165-176, 1990.

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

BRANDÃO, M.L; CARDOSO, S.H; MELO, L.L; MOTTA, V; COIMBRA, N.C. The neural substrate of defensive behavior in midbrain tectum. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 18, p. 339-46, 1994.

BRANDÃO, M. L. et al. Neural organization of different types of fear: implications for the understanding of anxiety. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25, p. 36-41, 2003.

BRANDÃO, M.L. As bases biológicas do comportamento: Introdução à neurociência. São Paulo: E.P.U. 2004.

BRAWMAN-MINTZER, O., LYDIARD, R.B., Biological basis of generalized anxiety disorder. **J Clin Psychiatry**, v. 58, n°3, p.16-25, 1997.

CANTERAS, N.S. Critical analysis of the neural systems organizing innate fear responses. **Rev Bras Psiquiatr**, v.25, p. 21-4, 2003.

CAROBREZ, A.P; BERTOGLIO L.J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior. The elevated plus-maze model 20 years. **Neurosc Biobehav Rev**, v. 29, p.1193-1205, 2005.

CARNEIRO-DE-OLIVEIRA, P.E.; ZANIBONI, C.R.; CARMONA, I.M.; FONSECA, A.J.R; CANTO-DE-SOUZA, A. Anxiogenic-like behavior in mice living with a cagemate submitted to chronic restraint stress. VII Forum on neurobiology of stress and 2nd symposium on serotonin in anxiety and depression, Ribeirão Preto, SP, 2016

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

CLEMENT, Y. Structural and pharmacological aspects of the GABA_A receptor: Involvement in behavioral pathogenesis. **J Physiol Paris**, p. 901-13, 1996.

CRUZ, A.P.M; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. 2012. http://www.nnce.org/Arquivos/Artigos/2012/cruz_et_al_2012.pdf. Accessed in: April 12, 2017.

CRUZ-MORALES S.E, SANTOS N.R, BRANDÃO M.L. One trial tolerance to midazolam is due to enhancement of fear and reduction of anxiolytic-sensitive behaviors in the elevated plus-maze retest in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 72, p. 973-978, 2002.

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

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety, **Trends Pharmacol Sci**, v.13, p.35-41, 1992.

DEAKIN, J.F; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**, v.5, p.305-315, 1991.

DELUCIA, R (Org). Farmacologia integrada. Clube dos Autores, São Paulo, 5^o edição compacta, 2014.

DE-SOUZA M.M, SCHENBERG L., CAROBREZ A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. **Behav Brain Res**, v. 90, p. 157-165, 1998.

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

FLASKERUD, J. H.; LEE, P. Vulnerability to health problems in female informal caregivers of persons with HIV/AIDS and age-related dementias. **J Adv Nurs**, v. 33, p. 60-68, 2001

FILE, S. E; MABBUTT, P. S; HITCHCOTT, P. K. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. **Psychopharmacol** (Berl), v. 102, n°1, p. 98-101, 1990.

FLOR, H.; TURK, D. C.; SCHOLZ, O. B. Impact of chronic pain on the spouse: marital, emotional and physical consequences. **J Psychosom Res**, v. 31, n. 1, p. 63-71, 1987.

GALLESE, V; KEYSERS, C; RIZZOLATTI, G. A Unifying View Of The Basis Of Social Cognition. **Trends Cogn Sci**, v. 8, p. 396-403. 2004.

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

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

GIVEN, C. W.; STOMMEL, M.; GIVEN, B.; OSUCH, J.; KURTZ, M. E.; KURTZ, J. C. The Influence of cancer patients' symptoms and functional states on patients' depression and family caregivers' reaction and depression. **Health Psychol**, v.12, p. 277, 1993.

GODLEWSKA, B.R; NORBURY, R; SELVARAJ, S; COWEN, P.J; HARMER, C.J. Short-term SSRI treatment normalises amygdala hyperactivity in depressed patients. **Psychol Med**, v.42, p. 2609–2617, 2012.

GOLDSTEIN, L. E.; RASMUSSEN, A. M.; BUNNEY, B. S.; ROTH, R. H. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. **J Neurosci**, v. 16, n. 15, p. 4787-98, 1996.

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

GONZALEZ, L.E.; FILE, S.E. A five minute experience in the elevated plus-maze alters the state the benzodiazepine receptor in the dorsal raphe nucleus. **J Neurosc**, v.17, p.1505-1511,1997.

GRAEFF, F. G. Ansiolíticos. In: (Ed.). Drogas psicotrópicas e seu modo de ação. São Paulo: EPU, p.1-83, 1989.

GRAEFF, F.G. Brain defence systems and anxiety. In: ROTH, M.; BURROWS, G.D.;NOYES,R. (ed). Handbook of anxiety, 3rd. ed., Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**, p.307-354, 1990.

GRAEFF, F. G; GUIMARAES, F. S; DE ANDRADE, T. G; DEAKIN J. F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v.54, p. 129–141, 1996.

GRAEFF, F.G; GUIMARÃES, F.S. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: Atheneu, 2000.

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

GRAY, J. A.; MCNAUGAHTON, N. The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system. 2 ed. London: Oxford University Press, 2000.

GRENIER, F.; LUTHI, A. Mouse brains wired for empathy? **Nat Neurosci**, v. 13, n. 4, p.406-8, 2010.

GRIEBEL, G; RODGERS, R.J; PERRAULT, G; SANGER, D.J. The effects of compounds varying in selectivity as 5-HT1A receptor antagonists in three rat models of anxiety **Neuropharmacol**, v.39, p.1848-1857. 2000.

GUIDOTTI, A; BARALDI, M; LEON, A; COSTA, E. Benzodiazepines: a tool to explore the biochemical and neurophysiological basis of anxiety. **Biochem J**, v. 39, p. 3039-3042, 1980.

HAANPÄÄ, M; BACKONJA, M; BENNETT, M; BOUHASSIRA, D; CRUCCU, G; HANSSON, T. et al. Assessment of Neuropathic Pain in Primary Care. *Am J Med*, v.122, p. 13–21, 2009.

HAEFELY, W.E. The GABAA-benzodiazepine receptor: biology and pharmacology. Em: BURROWS, G.D.; ROTH,R.; NOYES,J.R: Handbook of anxiety, v.3. The Neurobiology of anxiety. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, p. 165-188, 1990.

HANDLEY, S.L. Serotonin in animal models of anxiety: the importance of stimulus and response. In: Serotonin, Sleep and mental disorder. Eds C Idzikowski and PJ Cowen Wrightson London, pp 89-115. 1991.

HETEM, L.A.B; GRAEFF, F.B. Ansiedade e transtornos de ansiedade. Rio de Janeiro: Científica Nacional, 1997.

HETEM, L. A. B., GRAEFF, F.G. (Ed.) Transtornos de ansiedade. São Paulo: Editora Atheneu, 191-205, 2003.

HOLMES A, RODGERS R.J. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, p. 971–980, 1998.

HODGES, H, GREEN S, GLENN B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. **Psychopharmacol**, v. 92, p. 491-504, 1987.

JOHNSON P. L., MOLOSH A., FITZ S. D., ARENDT D., DEEHAN G. A., FEDERICI L. M., et al. Pharmacological depletion of serotonin in the basolateral amygdala complex reduces anxiety and disrupts fear conditioning. **Pharmacol Biochem Behav**, v.138, p.174–179, 2015.

JOELS, M., Z. Pu, et al. Learning under stress: how does it work? **Trends Cogn Sci** 10, v.4, p. 152-158, 2006.

JOLAS, T; SCHREIBER, R; LBORTE, A.M; CHASTNET, M; De VRY, J; GLASER, T. et al. Are postsynaptic 5-HT_{1A} receptors involved in the anxiolytic effects of 5-HT_{1A} receptors agonists and their inhibitory effects on the firing of serotonergic neurons in the rat? **J. Pharm Exp Ther**, p. 920-9, 1995.

KOYAMA, S; KUBO, C; RHEE, J-S; AKAIKE, N. Presynaptic serotonergic inhibition of GABAergic synaptic transmission in mechanically dissociated rat basolateral amygdala neurons. **J Physiol**, v. 518, p.525–538, 1999.

KOYAMA, S; MATSUMOTO, N; KUBO, C; AKAIKE, N. Presynaptic 5-HT₃ receptor-mediated modulation of synaptic GABA release in the mechanically dissociated rat amygdala neurons. **J Physiol**, v. 529, p.373–383, 2000.

KURAIISHI, Y., HARADA, Y., ARATANI, S., SATOH, M., TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain res**, v. 273, n°2, p. 245-252, 1983.

KURTZ, M. E; KURTZ, J. C; GIVEN, C. W; GIVEN, B. Relationship of caregiver reactions and depression to cancer patients' symptoms, functional states and depression — a longitudinal view. **Soc Sci Med**, v. 40, p. 837-846, 1995.

LANGFORD, D. J; CRAGER, S. E; SHEHZAD, Z; SMITH, S. B; SOTOCINAL, S. G; LEVENSTADT, J. S; CHANDA, M. L; LEVITIN, D. J; MOGIL, J. S. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. **Science**, v. 312, 2006.

LANGFORD, D.J; BAILEY, A.L; CHANDA, M.L; CLARKE, S.E; DRUMMOND, T.E; ECHOLS, S; GLICK, S; INGRAO, J; KLASSEN-ROSS, T; LACROIX-FRALISH, M.L; MATSUMIYA, L. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nat methods**, v.7, p. 447-9, 2010.

LANGFORD, D. J.; TUTTLE, A. H.; BRISCOE, C.; HARVEY-LEWIS, C.; BARAN, I.; GLEESON, P.; FISCHER, D. B.; BUONORA, M.; STERNBERG, W. F.; MOGIL, J. S. Varying perceived social threat modulates pain behavior in male mice. **J Pain**, v. 12, n. 1, p. 125-32, 2011.

LEE, H. S; BRENNAN, P. F; DALY, B. J. Relationship of empathy to appraisal, depression, life satisfaction, and physical health in informal caregivers of older adults. **Res Nurs Health**, v. 24, p. 44-56, 2001.

LEDOUX, J. E; CICCETTI, P; XAGORARIS, A; ROMANSKI, L. M. The lateral amygdaloid nucleus: Sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **J Neurosci**, v.10, p.1062–1069, 1990.

LEDOUX, J.E. Fear and the Brain: Where Have We Been, and Where Are We Going? **Biol Psychiatry**, v.44, p. 1229-1238, 1998.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci**, v.23, p. 155-184, 2000.

LEDOUX, J.E. Rethinking the emotional brain. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 653-76, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365542> >.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacol**, v. 92, p.180-185, 1987.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther**, v. 46, n° 3, p. 321-40, 1990.

LIU, Z. Y., ZHUANG, D. B., LUNDERBERG, T., & YU, L. C. Involvement of 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. **Neuroscience**, v. 112, p. 399-407, 2002.

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

MARTIN, L. J., HATHAWAY, G., ISBESTER, K., MIRALI, S., ACLAND, E. L., NIEDERSTRASSER, N., STERNBERG, W. F. Reducing social stress elicits emotional contagion of pain in mouse and human strangers. **Curr Biol**, v. 25, p. 326-332, 2015.

MCDONALD, A.J; MASCAGNI, F; GUO, L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: A Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. **Neuroscience** v.71, p.55–75, 1996.

MCNAUGHTON. N; CORR. P.G. A two-dimensional neurophysiology of defense: Fear/Anxiety and Defensive Distance. **Neurosci Biobehav Rev**, 28, p. 285-305, 2004.

MENARD J, TREIT D. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, p. 591–613. 1999.

MURPHY, S.E; NORBURY, R; O’SULLIVAN, U; COWEN, P.J; HARMER, C.J. Effect of a single dose of citalopram on amygdala response to emotional faces. **Br J Psychiatry**, v.194, p.535–540, 2009.

MIASKOWSKI, C.; ZIMMER, E. F.; BARRETT, K. M.; DIBBLE, S. L.; WALLHAGEN, M. Differences in patients' and family caregivers' perceptions of the pain experience influence patient and caregiver outcomes. **Pain**, v. 72, n. 1-2, p. 217-26, 1997.

MILLAN, M.J; BROCCO, M. The Vogel conflict test; procedural aspects, gaminobutyric acid, glutamate and monoamine. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 67-96, 2003.

MOGIL, J.S. Social modulation of and by pain in humans and rodents. **Pain**, v.156, p. 35-41, 2015.

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

NERI, A. L. Qualidade de vida e idade madura. Campinas, SP: Papirus, 2006.

NERI, A. L; CARVALHO, V. A. M. L. O Bem-estar do cuidador: aspectos psicossociais. In:FREITAS, Elizabete Viana de et al. Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro: Koogan, 2002, p.778-790.

NEUGEBAUER, V., WEIDONG, L., GARY, C.B., HAN, J.S. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, vol. 10, n.3, p. 221-234, 2004.

NIEMINEN AL, GORES GJ, BOND JM, IMBERTI R, HERMAN B, AND LEMASTERS JJ. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 115, p.147–155, 1992.

NITANDA, A. et al. Contribution of the peripheral 5-HT 2A receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem Int**, v. 47, n. 6, p. 394-400, Nov 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051396> >.

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

PANKSEPP, J.B; LAHVIS, G.P. Rodent empathy and affective neuroscience. **Neurosci Behav Rev**, 2011.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2º edition. San diego: academic press, 2001.

PELARIN, V.; BAPTISTA, D.; CANTO DE SOUZA, A. Empatia em Camundongos: A Lesão da Amídala com Cloreto de Cobalto (CoCl₂) Reverte a Antinocicepção Induzida pelo Convívio de Camundongos aos Pares. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, 2013, Belo Horizonte. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento.

- PELLOW, S.; CHOPIN, P. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v.14, p.149-167, 1985.
- PESOLD, C.; TREIT, D. The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Res**, v.638, p. 213-221, 1995.
- PHILLIPS, R.G; LeDOUX, J.E. Differential Contribution of Amygdala and Hippocampus to Cued and Contextual Fear Conditioning. **Behav Neurosci**, v.106, p. 274-285, 1992.
- PRESTON, S.D; DE-WAAL, F. B. M. Empathy: its ultimate and proximate bases. **Behav Brain Sci**, v.25, p. 1-20. 2002.
- PRESTON, S.D; A perception-action model for empathy, 2006. Disponível em: <http://www-personal.umich.edu/~preston/Downloads/Preston2007_MI.pdf>.
- REIS, L. M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain Res**, v. 1231, p.93-102, 2008.
- RHUDY, J.L; MEAGHER, M.W.Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. **Pain**, v.84, n°1, p.65-75, 2000.
- ROESKA, K. et al. Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. **Neurosci Lett**, v.464 p.160-164, 2009.
- RODGERS R.J, COLE J.C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S.J., Hendrie, C.A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. Wiley, Chichester, pp. 9-44. 1994.
- RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v.52, p.297-303, 1995b.
- RODGERS, R.J; CAO, J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, p. 289-304, 1997.
- RODRIGUES, S. M.; LEDOUX, J.E. The influence of stress hormones on fear circuitry. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 289-313, 2009.
- RODRIGUEZ, M. L. Efeito de lesão colinérgica específica do núcleo septal medial no comportamento exploratório de ratos no labirinto de cruz elevado em um paradigma teste re-teste. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, SP, Brasil, 1999.
- ROSA V.P; VANDRESSEN N; CALIXTO A.V; KOVALESKI D.F; FARIA, M.S. Temporal analysis of the rat's behavior in the plus-maze: effect of midazolam. **Pharmacol Biochem Behav**, v.67, p.177-182, 2000.

SANGER, D.J. GABA and the behavioral effects of anxiolytic drugs. **Life sci**, v. 36, p.1503-1513, 1985.

SHAMAY-TSOORY S.G. The neural bases for empathy. **Neuroscientist**, v.17, p.18-24, 2011.

SIEGEL, K., RAVEIS, V. H., HOUTS, P., MOR, V. Caregiver burden and unmet patient needs. **Cancer**, v. 68, p. 1131-1140, 1991

SIMONS, L.E; ELMAN, I; BORSOOK, D; Psychological processing in chronic pain: A neural systems approach. **Neurosci Biobehav Rev**, v.39 p. 61-78, 2014.

SINGER, T. The neuronal basis and ontogeny of empathy and mind reading: Review of literature and implications for future research. **Neurosci Biobehav Rev**, v.30, p. 855 – 863, 2006.

SINGER, T.; LAMM, C. The social neuroscience of empathy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1156, p. 81-96, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19338504> >.

SMITH TA. Type A gamma-aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. **Br J Biomed Sci**, v. 58, p.111-21, 2001.

SINGER, T.; SEYMOUR, B.; O DOHERTY, J.; KAUBE, H.; DOLAN, R. J.; FRITH, C.D. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. **Science**, v.303, p.1157-1162, 2004.

SINGER, T.; LAMM, C. The social neuroscience of empathy. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1156, p. 81-96, 2009.

SOMMER, C.; SCHAFERS, M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. **Brain Res**, v. 784, n. 1-2, p. 154-62, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518588> >.

STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. **J Anxiety Disord**, v. 11, n°4, p. 409-29,1997.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M.; MICOV, A. M.; TOMIC, M. A.; KOVACEVIC, J. M.; BOSKOVIC, B. D. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. **Anesthesiology**, v.120, n. 3, p. 737-50, 2014.

TEIXEIRA K.V, CAROBREZ A.P. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rat's performance in the elevated plus-maze task. **Behav Neurosci**, v. 113, p.196-203, 1999.

TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J.A.M. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cagemate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain Behav Immun**, v.23, p. 558–567, 2009.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v.44, p.463-469, 1993.

VACHON-PRESSEAU, E; ROY, M; MARTEL, M.O; CARON, E; MARIN, M.F; CHEN, J; ALBOUY, G; PLANTE, I; SULLIVAN, M.J; LUPIEN, S.J; RAINVILLE, P. The stress model of chronic pain: evidence from basal cortisol and hippocampal structure and function in humans. **Brain**, v. 136, p.815-827, 2013.

YALCIN, I; BARTHAS, F; BARROT, M. Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. **Neurosci Biobehav Rev**, v.47, p.154-64, 2014. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.08.002. Review.

YOUNG, W.S; KUHAR, M.J. Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain. **J Pharmacol Exp Ther**, v.212, p.337-346, 1980.

ZANGROSSI, H; GRAEFF, F.G; VIANA, B.M. Anxiolytic effect of intra amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the elevated T-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, 1999.

ZANIBONI, C; BAPTISTA-DE-SOUZA, D; CANTO-DE-SOUZA, A.L. (330) Effects of midazolam on hipernociception induced by living with coespecific in neuropathic condition in mice. **J Pain**, v.17, p.58, 2016.

ZAKI, J.; OCHSNER, K. N. The neuroscience of empathy: progress, pitfalls and promise. **Nat Neurosci**, v. 15, p. 675-80, 2012.

ANEXO



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Ansiedade induzida pelo modelo de empatia para dor: O papel da neurotransmissão GABAérgica na modulação da ansiedade em camundongos", protocolado sob o CEUA nº 7313090413, sob a responsabilidade de **Isabela Miranda Carmo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com as normas da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.099 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 27/04/2013.

We certify that the proposal "Anxiety-induced model of empathy for pain: The role of GABAergic neurotransmission benzodiazepine in the modulation of anxiety in mice", utilizing 140 Heterogenica mice (140 males), protocol number CEUA 7313090413, under the responsibility of **Isabela Miranda Carmo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human being), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6099 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 04/27/2013.

Finalidade do Projeto: **Pesquisa**

Vigência do Projeto: de **03/2013** a **03/2017** Área: **Psicologia**

Origem: **Sistério Control do UFSCAR**
 Espécie: **Camundongos heterogênicos** sexo: **Machos** Idade: **6 a 8 semanas** fê: **140**
 Linhagem: **Swiss** Peso: **30 a 45 g**

Resumo: A capacidade de compartilhar emoções uma com as outras possibilita gradir e compreender suas ações, ações e motivações, fator relevante para a vivência e interação social. O campo de pesquisa e respeito das respostas empáticas pode ser investigado por meio de modelos animais, em que se observam alterações decorrentes de convivência com um par em quadro de dor crônica. Estas análises sugerem alterações de comportamento devido a essa exposição, e possível intervenção farmacológica podem ser empregadas na redução de tais respostas prejudiciais ao sujeito. Nesse contexto, pode-se caracterizar a ansiedade como um possível resultado dessa convivência. O presente trabalho propõe analisar, mediante o protocolo de empatia em roedores (convivência com um coaparelhado submetido por dor crônica), se a neurotransmissão GABAérgica contribui para a criação de comportamentos relacionados a ansiedade, através da administração sistêmica e intra-amidala do agonista benzodiazepínico (midazolam). Com esse objetivo, o estudo será dividido em dois experimentos. No Experimento 1, os camundongos serão alojados em pares por um período de 28 dias; no 14º dia, um deles passará pelo procedimento cirúrgico de constrição do nervo ciático ou não (grupo sham) e após o procedimento voltará para caixa de convivência com seu respectivo par. No 28º dia de convivência, os animais serão submetidos administração intraperitoneal de agonista benzodiazepínico midazolam, 30 minutos antes do teste no labirinto em cruz clivado, com o objetivo de se investigar se a neurotransmissão GABAérgica contribui para a modulação da ansiedade em camundongos que convivem com um par com dor crônica. No Experimento 2, os procedimentos cirúrgicos e o protocolo serão os mesmos, entretanto, será realizada catectomia para administração intra-amidala do midazolam, com objetivo de averiguar o papel dessa estrutura na modulação da ansiedade induzida pelo modelo de empatia.

Local do experimento: Laboratório de Psicologia e Aprendizagem do UFSCAR

São Carlos, 17 de abril de 2017

Prof. Dr. Luciano Thie Saki Ota
 Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Cleonice das Santas Carvalho
 Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Federal de São Carlos