



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

Caroline Riberti Zaniboni

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES GABAA-
BENZODIAZEPÍNICOS DA ÍNSULA NA NOCICEPÇÃO DE
CAMUNDONGOS QUE CONVIVERAM COM COESPECÍFICO EM
CONDIÇÃO DE DOR CRÔNICA**

São Carlos
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

Caroline Riberti Zaniboni

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES GABAA-
BENZODIAZEPÍNICOS DA ÍNSULA NA NOCICEPÇÃO DE
CAMUNDONGOS QUE CONVIVERAM COM COESPECÍFICO EM
CONDIÇÃO DE DOR CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia, Linha 3: Neurociência Comportamental e Cognitiva, para obtenção do título de mestre em Psicologia.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Azair Liane Matos do Canto de Souza

São Carlos
2017



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA

COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Riberti Zaniboni

São Carlos, 17/03/2017

Azair Liane Matos do Canto de Souza

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

Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Prof.^a Dr.^a Christie Ramos Andrade Leite-Panissi
Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto

Marcos Hortes Nisihara Chagas

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

Submetida à defesa em sessão pública
realizada às 09h no dia 17/03/2017.

Comissão Julgadora:

Prof.^a Dr.^a Azair Liane Matos do Canto de Souza

Prof.^a Dr.^a Christie Ramos Andrade Leite-Panissi

Prof. Dr. Marcos Hortes Nisihara Chagas

Homologada pela CPG-PPGPsí na

____.ª Reunião no dia ____/____/____

Prof.^a Dr.^a Elizabeth Joan Barham

Coordenadora do PPGPsí

Aos meus pais, Patricia e Waldir.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais maravilhosos, **Patricia e Waldir**, pela paciência, amor incondicional, cuidado e todo o suporte necessário. Obrigada, amores da minha vida, sem vocês nada disso seria possível!

Ao meu namorado de toda a vida, companheiro e melhor amigo, **Luis Fernando**, pela paciência (eu sei que não foi fácil), incentivo, cuidado, “cosquinhas” e por sempre acreditar mais em mim do que eu mesma. Obrigada por fazer parte da minha vida e cuidar tão bem de mim, meu amor!

Às minhas **filhinhas de 4 patas** pelos lambeijos de final de semana. Obrigada por me mostrarem a importância da simplicidade e esse amor que só vocês têm.

À minha **família** toda e também aos meus **sogros e cunhado** por me mostrarem a importância da união e sempre apoiarem minhas aventuras, mesmo sem às vezes nem entendê-las.

Aos **amigos e amigas** que a vida me presenteou, de Itapira ou do mundo, pelos melhores momentos e risadas.

Aos **amigos e agregados do LPA**, por tudo. Vocês são essenciais e sempre farão parte da minha vida. Obrigada pela paciência, gordices, risadas gostosas, ensinamento e, principalmente, pela amizade. Devo muito desse trabalho a vocês, pois também acreditam sempre mais em mim do que eu mesma. Obrigada do fundo do coração, vocês são incríveis. Eu vou morrer de saudades!

À técnica e amiga querida **Lara**, pelo apoio em meus experimentos e amizade quando mais precisei.

À minha orientadora da vida, **Azair**, por me acompanhar desde o começo dessa caminhada, pela paciência, atenção e todo o ensinamento. Tenho muito orgulho da mulher que você é. Você é meu espelho e base de tudo que alcancei nesta aventura acadêmica e de tudo que ainda tenho pela frente! Obrigada por ter construído este laboratório apaixonante e pelas as oportunidades a mim cedidas!

À **Dani**, especialmente pela co-orientação e amizade. Você sempre incentivou e acreditou em mim! Sua pupila é muito grata por tudo, inclusive pelos dois anjinhos, Arthur e Francisco, que nos acalmava e trazia muita felicidade no nosso dia-a-dia. Obrigada, Dani!

Ao **PPGPSI, Marinéia** e todos os **professores** maravilhosos da Psicologia da UFSCar, minha raiz profissional.

Aos **Membros da banca examinadora**, pela atenção na leitura e colaboração para com este trabalho. Obrigada!

*Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP** (Processo nº 2015/11908-9), pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.*

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

ZANIBONI, C.R; CANTO-DE-SOUZA, A. Avaliação do papel dos receptores GABA_A-benzodiazepínicos da ínsula na nocicepção de camundongos que conviveram com coespecífico em condição de dor crônica. 17/03/2017. 60 Folhas. Dissertação – UFSCAR – Universidade Federal de São Carlos.

RESUMO

Dor é uma experiência subjetiva, multifatorial, emocional e um processo de alto valor adaptativo. Há evidências de que a resposta neural da percepção da dor é similar à resposta neural da observação da dor, o que caracteriza um processo empático. O número de indivíduos acometidos com dores crônicas é considerado alto e com baixa eficácia de tratamento no mundo e o convívio prolongado com pessoas que sofrem de dores crônicas pode promover danos psicológicos e fisiológicos aos cuidadores. Neste sentido, compreender o processo de modulação social da dor se mostra necessário diante da abrangência do tema e de sua característica evolucionista, pois contribui para a evolução da espécie humana e fortalecimento da convivência em sociedade. Sabe-se que empatia é uma resposta emocional básica e produto de diversos circuitos cerebrais. Estudos recentes têm demonstrado esta capacidade em roedores, principalmente frente a uma situação de dor. Estudo do nosso grupo demonstrou que a convivência em pares é capaz de alterar a resposta nociceptiva em camundongos e que provavelmente os mesmos circuitos cerebrais modulatórios da empatia para a dor podem modular a própria dor, sendo a ínsula uma das estruturas cerebrais envolvidas neste processo. Ainda, há evidências de que a ínsula pode modular respostas nociceptivas via receptores GABA_A-Benzodiazepínicos, entretanto, as bases neurais deste processo não estão bem estabelecidas. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica e o papel dos receptores GABA_A-Benzodiazepínicos da ínsula na modulação da resposta nociceptiva em camundongos que conviveram com coespecífico submetido a um modelo de dor crônica. Camundongos machos Suíço-albinos foram alojados em pares e, após 14 dias de convívio, um animal do par foi submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (CNC), indução da dor crônica, ou não (Sham) e conviveram por mais 14 dias. Foram realizados dois experimentos, no primeiro, no 28º dia o animal que conviveu com o par em quadro de dor crônica recebeu salina ou midazolam [0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg, subcutâneos (s.c.)], agonista benzodiazepínico, e foram submetidos ao teste de contorções abdominais para avaliação da nocicepção [ácido acético 0,6% intraperitoneal (i.p.)] (Experimento 1). No segundo, no 23º dia o camundongo que conviveu com o animal CNC ou animal Sham foi submetido a uma cirurgia estereotáxica da ínsula, e, no 28º dia, ao mesmo teste de nocicepção após injeção intra-ínsula de salina ou midazolam (3,0 e 30 nmol/0,1 µl) (Experimento 2). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores (convívio x tratamento), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos nos dois experimentos. Nos Experimentos 1 e 2, o convívio com um animal em quadro de dor crônica foi capaz de aumentar o número de contorções no parceiro. No Experimento 1, o midazolam na maior dose (2,0 mg/kg, s.c.) reverteu a hipernocicepção induzida pelo convívio, sugerindo o envolvimento desta neurotransmissão no processo de modulação social da nocicepção em camundongos. Entretanto, no Experimento 2 nenhuma das doses de midazolam intra-ínsula alterou a resposta nociceptiva, o que sugere que os receptores GABA_A-Benzodiazepínicos da ínsula não estão modulando o efeito hipernociceptivo induzido pelo convívio com o parceiro em quadro de dor crônica.

Palavras-chave: Modulação Social da Dor. Camundongos. Insula. Midazolam. Empatia

ZANIBONI, C.R; CANTO-DE-SOUZA, A. Avaliação do papel dos receptores GABA_A-benzodiazepínicos da ínsula na nocicepção de camundongos que conviveram com coespecífico em condição de dor crônica. 17/03/2017. 60 Folhas. Dissertação – UFSCAR – Universidade Federal de São Carlos.

ABSTRACT

Empathy for pain is the ability to feel other's pain and recent studies suggest this capacity between rodents. GABAergic system has receptors in brain structures involved in emotional processes as the insula, which is known to play a role in modulation of pain and empathy. The present study investigated the role of Benzodiazepine-GABA_A system and insula's Benzodiazepine-GABA_A receptors on social modulation of pain induced by cohabiting with a mouse submitted to a neuropathic pain model. The role of GABA system was assessed by systemic treatment of midazolam (MDZ) (0.5, 1.0, 2.0 mg/kg), a GABA_A agonist (Exp. 1) and the role of GABA_A receptors of insula by MDZ microinjections (3 and 30 nmol/0.1 µl) in the structure (Exp. 2). Male Swiss mice (n=8-10/group) (Ethics: CEUA/UFSCar N° 47520904) were housed in pairs and after 14 days were divided into two groups: cagemate nerve constriction (CNC), in which one animal of each pair was subjected to sciatic nerve constriction and cagemate sham (CS), one animal from each pair was subjected to the same surgery but without constriction. On Experiment 1, in the 28th day of cohabiting, the observer cagemate, who lived with a CS or CNC, received injections of saline or midazolam (0.5, 1.0 and 2.0 mg/kg, subcutaneous, s.c) and, 30 minutes after, were submitted to the writhing test for 5 minutes to evaluate nociception. In Experiment 2, the protocol was the same, but in 23th day of cohabiting, each observer cagemate was surgically implanted with guide cannula bilaterally in the insula. In the 28th day, the observer cagemate received intra-insula injections of saline or midazolam (3 or 30nmol/0.1 µl) and after 10 minutes was submitted to writhing test. In both experiments, two-way ANOVA followed by post hoc Duncan test revealed that the number of writhes was higher in CNC animals than the CS animals ($P < 0.05$). In Experiment 1, the higher dose of midazolam (2.0 mg/kg) decreased the number of writhes induced by living with a pair in neuropathic pain ($P < 0.05$), but this response was not changed by intra-insula midazolam ($P < 0.05$, Experiment 2). Results suggest that cohabitation in pairs with chronic pain condition induces hypernociception and benzodiazepine-GABA_A system is possibly involved in the social modulation of pain, but not mechanisms located within the insula.

Keywords: Social Modulation of Pain, Insula, Mice, midazolam, Benzodiazepine-GABA_A system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Controle descendente da dor.....	13
Figura 2: Vista lateral do córtex insular do hemisfério cerebral esquerdo de humanos.....	19
Figura 3: Representação gráfica da localização estrutural da insula em cérebro de camundongo.....	20
Figura 4: Esquema de ligação de um benzodiazepínico no receptor GABA _A	21
Figura 5: Sequência de procedimentos empregados no Experimento 1.....	30
Figura 6: Sequência de procedimentos empregados no Experimento 2.....	31
Figura 7: Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg, s.c.) sobre a nocicepção avaliada em animais que conviveram em par com coespecífico submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (n= 10-13). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais sem camundongos alojados em duplas nos grupos Sham e CNC. #P<0,05 em comparação com o respectivo grupo Sham. *P<0,05 em relação ao CNC salina.....	35
Figura 8: (A) Secções coronais representando alguns dos sítios de injeção na ínsula de camundongos. Os círculos preenchidos representam as áreas de infusão da droga nas estruturas-alvo. Os círculos vazados representam sítios de injeção fora da estrutura-alvo (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). O número de círculos é inferior ao número de acertos devido à sobreposição dos acertos. (B) Fotomicrografia de secção coronal de um sujeito representativo demonstrando um sítio de injeção na ínsula.....	37
Figura 9: Efeitos da injeção intra-ínsula de salina ou midazolam (3 e 30nmol/0,1 µl) sobre a nocicepção em animais que conviveram em par com coespecífico submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais em camundongos alojados em duplas nos grupos Sham e CNC (n=6-9). #p < 0,05 em comparação ao respectivo grupo Sham.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Total de camundongos avaliados no Experimento 1.....	31
Tabela 2: Total de camundongos avaliados no Experimento 2.....	32
Tabela 3: Teste da Placa Quente no Experimento 1.....	36
Tabela 4: Total de camundongos canulados na Ínsula no Experimento 2.....	36
Tabela 5: Teste da Placa Quente no Experimento.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Dor e emoção	12
1.2. Modulação social da dor	14
1.3. Empatia	15
1.4. Bases neurais da empatia	18
1.5. Ínsula.....	18
1.6. Sistema gabaérgico	20
1.7. Modelos animais de modulação social da nocicepção.....	22
2.0 OBJETIVOS	24
2.2. Objetivos específicos	25
3.0 MATERIAL E MÉTODO	26
3.1. Sujeitos.....	27
3.2. Fármacos	27
3.3. Constrição do nervo ciático	27
3.4. Teste da placa quente	28
3.5. Cirurgia estereotáxica	28
3.6. Microinjeção	28
3.7. Teste para avaliação da nocicepção.....	29
3.8. Delineamento experimental	29
3.8.1. Experimento 1.	30
3.8.2. Experimento 2.	31
3.9. Histologia.....	32
3.10. Ética	32
3.11. Análise estatística.....	33
4.0 RESULTADOS	34
4.1. Experimento 1	35
4.2. Experimento 2.....	36
5.0 DISCUSSÃO	39
6.0 CONCLUSÃO.....	46
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO 1.....	56
ANEXO 2.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOR E EMOÇÃO

Dor é um processo de difícil compreensão e definição, principalmente devido a seu caráter subjetivo, multidimensional e emocional (BASBAUM; FIELDS, 1984; PLOGHAUS et al., 2003; MOGIL, 2015). Por ser um tema de difícil definição e que envolve bastante preocupação, a associação Internacional para o estudo da dor (IASP) caracterizou a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual ou potencial” (IASP, 2012).

A experiência de dor tem caráter multifatorial e subjetivo, pois sua sensação e percepção são variáveis de acordo com o indivíduo (MELZACK et al., 1991). Esta natureza multifatorial permite ao indivíduo a ativação de componentes perceptivos, sensoriais, afetivo-emocionais e cognitivos na experiência de dor para possível identificação e localização dos estímulos (BASBAUM; FIELDS, 1984; PLOGHAUS et al., 2003). A identificação do estímulo ou situação nociva promove função de alerta ao indivíduo e, conseqüentemente, a auto-preservação, pois desencadeia respostas defensivas adequadas à situação, caracterizando alto valor adaptativo deste processo (BASBAUM; FIELDS, 1984; MELZACK et al., 1991; PLOGHAUS et al., 2003).

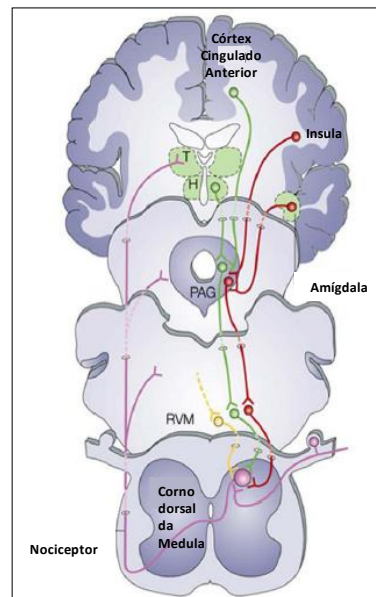
Neste contexto, a dor envolve a ativação de vias particulares do sistema nervoso central, como as medulares ou supra-medulares, relacionadas também a processos afetivos e cognitivos. Devido à complexidade destas vias, foram propostos dois componentes relacionados ao processamento da dor: perceptivo-discriminativo, o qual identifica o estímulo nocivo e o localiza no corpo, e o aversivo-cognitivo-comportamental, que inclui a capacidade de emitir uma resposta adequada ao estímulo nociceptivo por meio de repertórios envolvendo aprendizagem e memória (BRANDÃO, 2004).

No sentido fisiológico, há receptores sensoriais especializados para a detecção de estímulos nocivos e ou lesões teciduais. Estes receptores sensoriais são denominados nociceptores e são especializados em responder a estímulos nocivos térmicos, mecânicos e/ou químicos (BRANDÃO, 2004; MACHADO, 2006). Estes são caracterizados de acordo com o diâmetro e velocidade de condução do estímulo. Há dois tipos de fibras de condução nociceptivas, A-delta, de maior diâmetro e velocidade de condução mais rápida, responsável pela dor cortante e bem localizada. E as fibras C, de menores diâmetro e velocidade de condução mais lenta, que são polimodais (WILLIS, 1985; MILLAN, 1999; BRANDÃO, 2004; MELZACK et al., 1991).

Após uma lesão, a sensação de dor é transmitida pelas fibras para o corno dorsal da medula espinal e, posteriormente, conduzida para o encéfalo por projeções ascendentes (MILLAN, 1999). As projeções ascendentes são responsáveis pela transmissão da resposta de dor para estruturas do sistema nervoso central (SNC), como hipotálamo, amígdala, substância cinzenta periaquedutal (SCP), insula, córtex cingulado anterior (CCA) e tálamo, as quais recebem os impulsos e processam os estímulos de acordo com sua função particular, como por exemplo, proporcionar algum tipo de emoção, atenção ou relacioná-los com memórias (NEUGEBAUER et al., 2009). Dentre as vias ascendentes da dor, a espinotalâmico, espinoreticular e a espinomesencefálico são consideradas as de maior importância na transmissão da informação nociceptiva (WILLIS, 1985).

Em conjunto com o processamento das vias ascendentes, vias descendentes inibitórias caminham inversamente proporcionando assim a inibição da nocicepção. E, além desse sistema inibitório, há também um facilitatório (BOLLES; FANSELOW, 1980). Enquanto as projeções ascendentes enviam a informação nociceptiva para as estruturas encefálicas, as inibitórias descendentes levam a inibição da resposta dolorosa até a medula espinal (KELLY, 1982; RODGERS, 1995; FIELDS, 2004).

Figura 1. Controle descendente da dor. Fields modificado, 2004.



O sistema inibitório da dor é também de extrema importância para a manutenção da vida e pode ser ativado pelas estruturas límbicas. Neste sentido, dor e emoção possuem uma relação de reciprocidade e há fortes evidências de que emoções aversivas, como

medo ou estresse, podem inibir ou diminuir a sensibilidade à dor (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009; MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2009; BAPTISTA et al., 2012).

Há também as substâncias responsáveis pela sensibilização dos nociceptores e, mediando o processo da dor, os denominados neurotransmissores (RANG ET AL., 2003). Estes são responsáveis pela comunicação entre neurônios e, dentre os diversos neurotransmissores envolvidos na modulação da dor, pode-se citar a substância P, o glutamato e o GABA (ácido gama-aminobutírico) (FIELDS, et al., 1991; RANG ET AL., 2003).

1.2. MODULAÇÃO SOCIAL DA DOR

Há evidências de que a resposta neural da própria percepção da dor é similar à resposta neural da observação de um coespecífico recebendo um estímulo doloroso (SINGER et al., 2004; SHAMAY-TSOORY, 2011). As estruturas CCA e ínsula são mais ativadas durante a observação, mas também são ativadas diante da própria percepção de dor, o que sugere que o compartilhamento de dor parece abranger regiões relacionadas à primeira experiência de dor do indivíduo (SINGER et al., 2004; SHAMAY-TSOORY, 2011, BUSHNELL et al., 2013).

Além disso, a ínsula e o CCA são as áreas bastante envolvidas no componente afetivo-emocional da dor e possuem papel central em respostas relacionadas aos diversos tipos de emoções (SINGER et al., 2004; PAULUS; STEIN, 2006; SINGER; LAMM, 2009; SHAMAY-TSOORY, 2011). Foi demonstrada a ativação destas regiões cerebrais em sujeitos que observaram imagens de outras pessoas com expressões de dor, o que pode confirmar a participação destas áreas na modulação social da dor (MORRISON, 2004; BOTVININCK, 2005; GODINHO, 2012).

Este processo de modulação social da dor pode ser nomeado de empatia para dor e considerado uma adaptação evolutiva, pois a identificação da possível ação dolorosa pode possibilitar proteção, por meio de possível evitação do estímulo. Além disso, também exerce função pró-social, pois pode proporcionar necessidade de ajuda diante da observação do sofrimento do outro (PLOGHAUS et al., 2003; SHAMAY-TSOORY, 2011, BERNHARDT; SINGER, 2012). Recentemente alguns trabalhos têm se voltado a desenvolver modelos animais para a investigação das diferentes formas de empatia e circuitos neurais envolvidos (BERNHARDT; SINGER, 2012; MARTIN et al., 2014; BETTI; AGLIOTI, 2016).

1.3. EMPATIA

O processo de empatia tem sido estudado desde a década de 80 e esta curiosidade advém da crescente valorização das relações pessoais no mundo atual (DAVIS, 1980; LANGFORD et al., 2006; PANKSEPP et al., 2011; BARTAL et al., 2011; ZAKI; OCHSNER, 2012). No entanto, ainda há muito interesse e divergências sobre o tema e, além disso, não há uma definição universalmente aceita, apenas um consenso de que todas as formas de empatia envolvem a capacidade de entender o outro emocionalmente (PRESTON, DE WAAL, 2002; BLAIR, 2005, SHAMAY-TSOORY, 2011, BERNHARDT; SINGER, 2012).

Alguns estudos propõem que este processo é baseado em um mecanismo de percepção-ação (PRESTON, WAAL, 2002; LANGFORD et al., 2006). Neste, a percepção de um estado emocional, motor ou perceptivo em um indivíduo ativa o mesmo substrato neural em outro indivíduo, o que possibilita a experiência emocional semelhante, sem necessidade de contato ou processo associativo/cognitivo ou resposta afetiva apropriada à situação do outro (PRESTON, WAAL, 2002; SHAMAY-TSOORY, 2011; BERNHARDT; SINGER, 2012; HOFFMAN, 2002).

Acredita-se que seres humanos dominam os processos de competição entre as espécies, devido às habilidades interpessoais de cooperar e entender o outro, pois são mais fracos, lentos e menores que muitas outras espécies (ZAKI; OCHSNER, 2012). Deste modo, a habilidade de entender o próprio estado emocional e o dos outros indivíduos é essencial para formação de sociedades, manutenção do equilíbrio emocional e de fortes relações sociais, além de ser importante para sobrevivência da espécie (OCHSNER et al., 2004; LANGFORD et al, 2006; SHAMAY-TSOORY, 2011).

Há diversas definições e vertentes sobre este processo, porém consideramos uma divisão em dois sistemas: emocional e cognitivo (DAVIS, 1980; SHAMAY-TSOORY, 2011; ZAKI; OCHSNER, 2012). O sistema emocional envolve a capacidade de experimentar reações afetivas ao observar a experiência de outro e até mesmo compartilhar com este sentimento, denominado contágio emocional. Já o sistema cognitivo envolve teoria da mente e mentalização, capacidade de fazer inferências a respeito dos estados mentais cognitivos e afetivos do outro (SHAMAY-TSOORY, 2011; PANKSEPP et al., 2011). Além disso, Preston e De Waal, 2002 argumentaram que empatia é uma subcategoria de um fenômeno que inclui

contágio emocional, simpatia, empatia cognitiva e comportamento de ajuda (PRESTON, WAAL, 2002).

Estudos demonstraram que sujeitos com transtornos psiquiátricos diversos possuem dissociação entre o sistema emocional e cognitivo, principalmente com deficiências no campo emocional (BERNHARDT; SINGER, 2012, BLAIR, 2005). No entanto, portadores destes transtornos ainda possuem capacidade de tomada de perspectiva, o que pode sugerir uma possível evidência para a existência dos dois sistemas que funcionam independentemente (BERNHARDT; SINGER, 2012). Assim, respostas de empatia podem evocar correspondentes emocionais ou cognitivos, dependendo do contexto (SHAMAY-TSOORY, 2011).

Empatia é resposta emocional básica e fundamental para o comportamento altruístico (LANGFORD et al; 2006) e produto de vários processos e circuitos cerebrais. Envolve desde estruturas mais basais do tronco encefálico até centros corticais superiores e recentes, de um ponto de vista evolutivo (SHAMAY-TSOORY, 2011; PANKSEPP et al., 2011; BERNHARDT; SINGER, 2012).

Diante das evidências, para a existência do processo de empatia não é necessário que se tenha completamente desenvolvido estruturas cerebrais superiores (PRESTON, WAAL, 2002; SHAMAY-TSOORY, 2011). Nesse sentido, acredita-se que bebês recém-nascidos reagem ao estresse de outros bebês na maternidade com a reação denominada choro contagioso, considerada precursora de empatia em seres humanos (SIMNER, 1971; HOFFMAN, 2002). Levando em consideração esta linha de pensamento, pode ser que haja a possibilidade de ocorrência deste processo em outros animais não primatas superiores (PRESTON; DE WAAL; 2002).

Por muitos anos empatia foi considerada exclusiva de primatas superiores, por ser substrato da inteligência emocional, que envolve o substrato cognitivo (OCHSNER et al., 2004; LANGFORD et al., 2006; SHAMAY-TSOORY, 2011). Entretanto, há evidências de que roedores possuem os pré-requisitos necessários para a expressão de empatia emocional, pois são animais sociais, capazes de aprender com os outros e agir de acordo com os estímulos emocionais de seus coespecíficos (LANGFORD et al., 2006; PANKSEPP et al., 2011). Desta forma, há trabalhos que demonstram a necessidade da familiaridade entre os indivíduos para que ocorra resposta empática (LANGFORD et al., 2006; BARTAL et al., 2011).

Evidências de formas mais básicas de empatia, como em roedores e outros animais, são cruciais para as descobertas de mecanismos neurobiológicos e genéticos do processo e ainda, para a possibilidade de novas intervenções terapêuticas e farmacológicas com o uso de modelos animais para o tratamento de transtornos caracterizados por déficits na empatia (LANGFORD et al, 2006; MOGIL; 2007; DECETY et al, 2015).

Sob este aspecto, é importante ressaltar que denominação de dor, caracterizada pelo aspecto subjetivo que envolve a ativação de componentes afetivo-emocionais, é adequado ao homem e não a outros animais, pois, devido a impossibilidade de comunicação verbal as evidências sobre este componente emocional ainda não são claras (BASBAUM; FIELDS, 1984; LE BARS ET AL., 2001). No entanto, há claras evidências sobre a existência de mecanismos nociceptivos-sensoriais em outros animais, portanto nocicepção pode ser um termo mais adequado quando se refere à modelos animais (MELZACK et al., 1991; LE BARS et al., 2001).

Modelos animais são empregados em pesquisas pré-clínicas devido à similaridade de alguns mecanismos com os da espécie humana. Geralmente são utilizados com a finalidade de avaliação de segurança e eficácia de novas drogas e, além disso, para a elucidação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos nos transtornos mentais, com a investigação de neurotransmissões e estruturas cerebrais envolvidas (GRAEFF; GUIMARÃES, 2012; BAPTISTA-DE-SOUZA, 2015). No caso deste estudo, um modelo animal foi utilizado para uma investigação mais completa de uma capacidade crucial para a sobrevivência em sociedade.

Langford e colaboradores em 2006 demonstraram que camundongos alojados em duplas apresentavam, diante de um estímulo doloroso, aumento da resposta nociceptiva apenas diante da observação de um coespecífico que também recebia um estímulo doloroso. Não apresentavam este aumento após observação do coespecífico sem dor e nem diante de um camundongo sem familiaridade. Também foi evidenciado que quando camundongos observavam o parceiro recebendo estímulo nociceptivo, estes apresentavam resposta semelhante à do parceiro, mesmo quando o estímulo recebido era diferente. Este comportamento se repetiu em diferentes intensidades e com tipos diferentes de estímulos, sugerindo influência bidirecional deste tipo de comportamento (LANGFORD et al., 2006).

No estudo mencionado, foi demonstrado que roedores são capazes de reconhecer e responder à nocicepção de um coespecífico e que a sensibilidade nociceptiva pode ser alterada por fatores sociais. Esses resultados sugerem que camundongos possuem

respostas semelhantes à empatia frente à nocicepção, principalmente se possuem familiaridade com o outro (LANGFORD et al., 2006).

Neste mesmo sentido, estudo desenvolvido pelo nosso grupo de estudo demonstrou hiperalgesia e aumento de comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos que conviveram por um período de 28 dias com um coespecífico em condição de dor crônica (BAPTISTA-DE-SOUZA et al, 2015).

1.4. BASES NEURAIS DA EMPATIA

O interesse das neurociências por este processo advém da descoberta dos neurônios espelho, caracterizado por uma classe de neurônios visuo-motores encontrada no giro frontal inferior, lóbulo parietal inferior e no córtex pré-motor e estão envolvidos na ativação reflexa que ocorre após observação do estado emocional do outro (GALLESE et al, 2004; SHAMAY-TSOORY, 2011; BETTI; AGLIOTI, 2016). Acredita-se, portanto que estes neurônios estão diretamente envolvidos no contágio emocional, substrato da empatia e são de grande importância para entender ações, intenções e estados mentais de outros indivíduos (GALLESE et al, 2004; BERNHARDT; SINGER, 2012; BETTI; AGLIOTI, 2016).

As bases neurais da empatia não estão completamente definidas, da mesma forma que em outras psicopatologias e processos, portanto diversos estudos recentes têm investigado este aspecto (SINGER et al, 2004; NEUMANN; WESTBURY, 2011; GONZALEZ-LIENCRES et al, 2013; CANTO-DE-SOUZA et al., 2014; BARTAL et al, 2016). Estudos recentes demonstram estruturas neurais ativadas durante a observação do coespecífico em quadro de dor e, dentre elas, as mais ativadas são a amígdala, CCA e ínsula (SINGER et al., 2004; OSBORN, 2010; SHAMAY-TSOORY, 2011; BERNHARDT; SINGER, 2012).

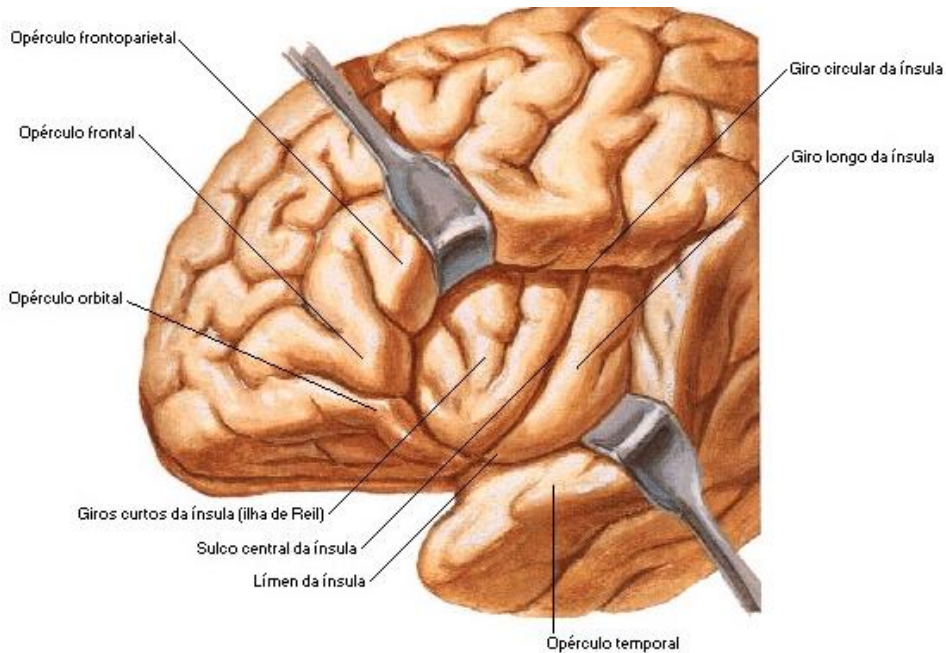
1.5. ÍNSULA

O córtex insular está localizado no centro do hemisfério cerebral e possui diversas interconexões com outras áreas como: somato-sensoriais primárias e secundárias, córtex cingulado anterior, amígdala, córtex pré-frontal, giro temporal superior, polo temporal, córtex órbita-frontal, dentre outras. Funcionalmente está envolvida no processamento da sensação visceral, função vestibular, atenção, dor, emoções, comportamento verbal, contudo, o papel desta estrutura nos processos emocionais ainda está em constante investigação (NAGAI et al, 2007; FIELDS, 2004; SINGER; LAMM, 2009).

Figura 2.

ínsula

NETTER,
H.. Atlas
anatomia
2ed. porto
Artmed,



Lobo da
Fonte:
Frank
de
humana.
alegre:
2000.

Disponível em: <http://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-nervoso/telencefalo/>

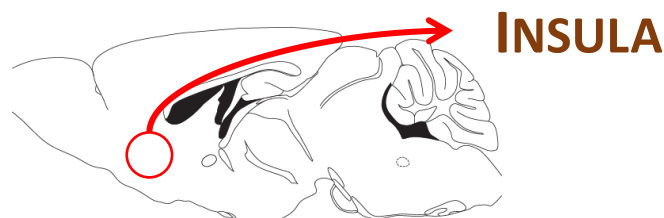
Devido às conexões com outras áreas, lesões nesta estrutura tem relação com déficits no processamento somato-sensorial, gustativo e vestibular e na resposta a estímulos dolorosos. Além dos prejuízos sensoriais, também há forte relação com prejuízos cognitivos em vários domínios neuropsicológicos como, por exemplo, memória e linguagem (SINGER; LAMM, 2009; SHAMAY-TSOORY, 2011). Há também atividade aumentada ou diminuída da estrutura em transtornos como esquizofrenia, alimentares, ansiedade, autismo e de dores crônicas (GASQUOINE, 2014).

O papel da ínsula na modulação da dor diante de respostas emocionais foi demonstrado em estudos que utilizaram ressonância magnética em humanos (CHUA et al., 1999; SINGER et al., 2004; NAGAI et al., 2007; SINGER; LAMM, 2009; SHAMAY-TSOORY, 2011). Também já foi avaliado o papel desta estrutura na modulação da dor e ansiedade em ratos (OHARA et al., 2003; JASMIN et al., 2004), bem como, na antecipação da dor (WISE et al., 2007; AUPPERLE et al., 2011).

Resultados do nosso grupo demonstraram que a inativação da ínsula com cloreto de cobalto produziu diminuição do número de contorções abdominais, apenas após convívio com o par em quadro de dor crônica, uma condição emocional. Foi sugerido que inibir esta região impossibilitou o controle da mesma sobre a nocicepção, possivelmente porque ocorreu uma disfunção entre os componentes cognitivos, emocionais e nocifensivos da

dor, o que demonstra a importância da estrutura nos componentes emocionais (PELARIN et al., 2014; CANTO-DE-SOUZA et al., 2014).

Figura 3. Representação gráfica da localização estrutural da insula em cérebro de camundongo. Fonte: Pelarin, 2014.



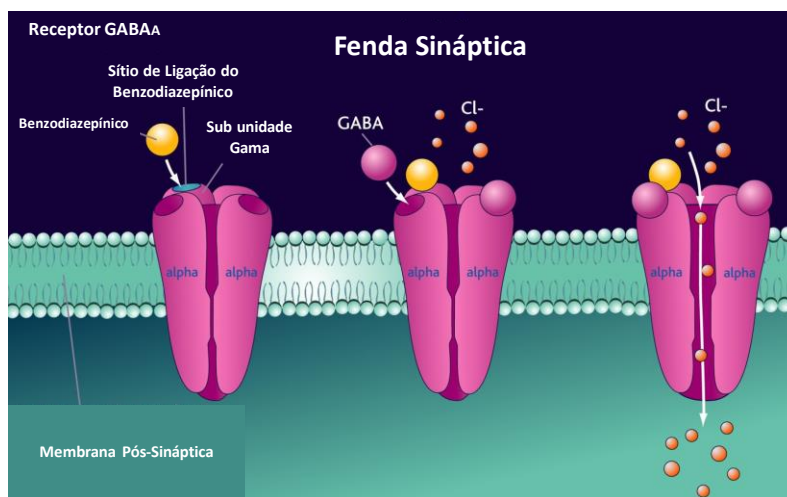
1.6. SISTEMA GABAÉRGICO

Os sistemas neurotransmissores envolvidos especificamente no processo de empatia para a dor ainda não estão bem estabelecidos (MOGIL, 2015). Porém, dentre os envolvidos no aspecto emocional da dor, podemos destacar o GABA (Ácido Gama Amino-Butírico) (WATSON, 2016, YOWTAK et al., 2013).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do encéfalo dos mamíferos e possui receptores localizados em estruturas envolvidas nos processos emocionais e de dor, como a ínsula e amígdala (WATSON, 2016, YOWTAK et al., 2013, BUSHNELL, 2013). Há dois tipos de receptores para o GABA: GABA_A e GABA_B, sendo o primeiro responsável pela ligação dos benzodiazepínicos (SANGER; 1985). O receptor GABA_A é pentamérico, constituído por duas subunidades alfa, duas beta e uma gama, envolvidos de um canal de cloro, os quais, juntamente com os receptores benzodiazepínicos (BZD), constituem um complexo macromolecular, funcionando como sítio alostérico (SANGER, 1985; ARGYROPOULOS et al, 1985; SIEGHART et al., 1999a).

Os benzodiazepínicos são fármacos que se ligam ao GABA_A e promovem depressão seletiva do sistema nervoso central (SNC), através de uma mudança no estado conformacional do receptor, produzindo aumento da afinidade do receptor pelo GABA, ou seja, são capazes abrirem canais do GABA_A interagindo com qualquer sítio do receptor. Quando o GABA ativa os receptores GABA_A é capaz de provocar aumento da condutância dos canais de cloreto e, conseqüentemente, hiperpolarização da membrana, o que reduz a probabilidade da geração do potencial de ação, provocando assim depressão do SNC (GUIDOTTI, 1980; HAEFELY, 1990).

Figura 4. Esquema de ligação de um benzodiazepínico no receptor $GABA_A$ (CNSfórum.com Modificado)



Os fármacos benzodiazepínicos são ansiolíticos muito conhecidos e utilizados na clínica e em modelos animais (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; NUNES-DE-SOUZA et al, 2012) e, além disso, possuem outros efeitos como: hipnótico, anticonvulsivante e relaxante muscular (SIEGHART, 1999b; SMITH; RISKIN, 1991; NUNES-DE-SOUZA et al, 2012).

Os receptores $GABA_A$ -Benzodiazepínicos estão presentes em diversas estruturas do SNC envolvidas com a modulação emocional e nos processos de empatia e dor, como por exemplo; amígdala e ínsula (SHAMAY-TSOORY, 2011; WATSON, 2016). A administração de agonistas de receptores $GABA_A$ -benzodiazepínicos, como midazolam e lorazepam, resultou na diminuição da atividade da amígdala e da ínsula em estudos clínicos (PAULUS et al., 2005; WISE et al., 2007). Além disso, outros estudos demonstraram que estes receptores são ativados na antecipação de um estímulo doloroso e menos ativados em psicopatologias; como estresse pós-traumático e ansiedade (MALIZIA et al., 1998; OHARA et al.,2003; PAULUS et al., 2005; CAMERON et al., 2007; WISE et al., 2007; AUPPERLE et al., 2011).

O midazolam é um agonista benzodiazepínico, ou seja, funciona como um facilitador desta neurotransmissão e é bastante utilizado na clínica por desempenhar, além dos efeitos típicos de um benzodiazepínico, efeito anestésico e possuir ação rápida no organismo (REVES et al., 1985; NORDT; CLARK, 1991; WISE et al., 2007; NUNES-DE-SOUZA et al, 2000). Portanto, pode ser utilizado também com analgésico (REVES et al., 1985; WISE et al., 2007; NUNES-DE-SOUZA et al, 2000).

Neste sentido, estudo recente demonstrou que o midazolam pode diminuir o aspecto emocional no âmbito do comportamento pró-social, pois foi observado que ratos tratados com midazolam não desempenhavam a tarefa de ajudar o coespecífico em contenção (BARTAL et al., 2016). Estes autores sugerem que este comportamento seja dependente de emoção, o que foi prejudicado pelo efeito do fármaco.

1.7. MODELO ANIMAL DE MODULAÇÃO SOCIAL DA NOCICEPÇÃO

Visto que grande parte dos estudos que avaliam o papel de estruturas neurais e neurotransmissores envolvidos na modulação da dor são realizados em voluntários humanos (MALIZIA et al., 1998; OHARA et al., 2003; PAULUS et al., 2005; CAMERON et al., 2007; WISE et al., 2007; AUPPERLE et al., 2011), estudos com roedores, como camundongos, para a investigação dos mecanismos neurobiológicos do processo se mostram boa ferramenta, pois são animais sociais, capazes de aprender com os outros e desempenham comportamentos semelhantes à empatia (JORGAN; MOGIL, 2006; LANGFORD et al., 2006; BARTAL et al., 2011; PANKSEPP, LAHVIS, 2011).

O conhecimento da neurobiologia de um processo cognitivo é muito importante para entendê-lo de forma mais ampla (ANDREASEN, 1997; SIEGEL et al., 1991; BRANDÃO, 2005; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012), pois possibilita o desenvolvimento de tratamentos farmacológicos que atuam diretamente nas neurotransmissões envolvidas e ainda, de psicoterapias direcionadas às características que são afetadas pelo processo, como por exemplo, habilidades sociais, ansiedade e sentimentos relacionados à dor do outro (VACHON, 2015; SINGH et al., 2016). Além disso, também pode promover possibilidades de avaliação e reabilitação neuropsicológica das funções afetadas diante de lesões nas estruturas cerebrais envolvidas (ESLINGER et al., 2002).

Desta forma, há diversas maneiras de avaliar respostas nociceptivas em roedores, sendo o teste de contorções abdominais uma delas (VANDER WENDE; MARGOLIN, 1957). O teste de contorções abdominais pode ser realizado após aplicação intraperitoneal de uma substância irritante como o ácido acético (0,6%) (estímulo nociceptivo), que produz contorções nos roedores. A dor pode ser facilmente mensurada através de registros do número de contorções abdominais, de fácil visualização ao experimentador (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009; LANGFORD et al., 2011).

Estudos com modelos animais já demonstraram a modulação social sobre a nocicepção diante da observação de coespecífico com dor (SINGER et al., 2004;

LANGFORD et al., 2006; 2011; MARTIN et al., 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015). Entretanto, evidenciar estes comportamentos após convívio prolongado com coespecífico com dor pode ser interessante, no sentido de que pesquisas com cuidadores, familiares e profissionais da saúde que convivem diariamente com pacientes nestas situações demonstram influências diretas na saúde, como aumento de quadros depressivos e ansiosos e sensibilidade à dor (SIEGEL et al., 1991; GIVEN et al., 1993; KURTZ et al., 1995; LEE et al., 2001; FLASKERUD; LEE, 2001).

Neste sentido, o estudo aqui proposto busca esclarecer algumas lacunas não preenchidas no campo do processo da modulação emocional da dor, bem como investigação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos neste fenômeno (SHAMAY-TSOORY, 2011; BERNHARDT; SINGER, 2012). Além disso, se mostra interessante para a contribuição de modelos experimentais de disfunções psicossociais, como, por exemplo, de habilidade de empatia prejudicada, evidenciada em alguns transtornos psiquiátricos (BLAIR, 2005; JORDAN; MOGIL, 2006; SHAMAY-TSOORY, 2011; DZIOBEK et al., 2011; MARTIN et al., 2014).

Diante da investigação de patologias relacionadas à modulação social da dor, encontrar as estruturas e neurotransmissões que participam deste processo pode ser fator importante para refinar os modelos animais utilizados nas pesquisas e conhecer os possíveis efeitos de fármacos que estejam atuando nestas áreas (SHAMAY-TSOORY, 2011; BERNHARDT; SINGER, 2012). Além disso, o número de indivíduos acometidos com dores crônicas é considerado alto no mundo e a eficácia dos tratamentos ainda é baixa (JORDAN; MOGIL, 2006; BUSHNELL et al., 2013), assim evidências demonstram que estes indivíduos sofrem mais pelas consequências relacionadas à emoção e cognição do que pela dor em si (PLOGHAUS et al., 2003).

Conforme as evidências apresentadas acima, as bases neurais da modulação social da dor não estão bem estabelecidas e não se conhece exatamente quais as neurotransmissões e circuitos cerebrais envolvidos no processo. Desta forma, diante das evidências apontadas acima é possível propor uma possível participação do sistema GABAérgico, especificamente os receptores GABA_A-benzodiazepínicos da ínsula, na modulação da nocicepção em camundongos submetidos ao convívio com par em condição de dor crônica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a participação de mecanismos GABAA-Benzodiazepínicos da ínsula na nocicepção e na empatia promovida pela convivência com o par submetido a um modelo de dor crônica em camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da injeção sistêmica de midazolam, agonista dos receptores GABA_A-benzodiazepínicos, na modulação da nocicepção induzida pelo ácido acético na empatia promovida pela convivência com o par submetido a um modelo de dor crônica em camundongos.

Avaliar o efeito da injeção intra-ínsula de midazolam na modulação da nocicepção induzida pelo ácido acético na modulação da empatia promovida pela convivência com o par submetido a um modelo de dor crônica em camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. SUJEITOS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem suíço-albino, 08 a 12 por grupo, com idade entre 6-8 semanas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Estes animais foram agrupados em gaiolas coletivas (30 x 19 x 13cm, 2 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) 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. FÁRMACOS

Foram utilizados:

- Cloridrato de cetamina (100 mg/Kg, i.p., anestésico; Syntec, Brasil)
- Xilazina (10 mg/Kg, i.p., relaxante muscular; Vetbrands, Brasil);
- Cetoprofeno (5,0mg/Kg, i.p., anti-inflamatório).
- Ceftriaxona (4 mg/Kg, i.p., antibiótico)
- Midazolam (MDZ) [8-cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazol (1,5a) (1,4) benzodiazepina (ROCHE, Brasil)], nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/Kg (Injeção sistêmica) e 3,0 e 30 nmol/0,1µl (Injeção intra-ínsula), dissolvido em salina (0,9% de cloreto de sódio (NaCl).

As doses utilizadas foram selecionadas de acordo com estudos prévios (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; LU et al., 2004; BAPTISTA et al. 2009; STEPANOVIC-PETROVIC et al. 2014).

3.3. CONSTRIÇÃO DO NERVO CIÁTICO

Para reproduzir o modelo de dor crônica, foi utilizado o método de Bennet e Xie (1998) modificado para camundongos (SOMMER; SCHAFERS, 1998). Após anestesia com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) foi realizada uma secção da fáscia entre o glúteo e bíceps femural para exposição do nervo ciático direito próximo a sua trifurcação. Após o corte do tecido ao redor, em uma distância de aproximadamente 8mm, foi realizada a compressão do nervo através de três ligaduras com fio estéril não inflamatório mononylon 6.0.

Os comportamentos relacionados à dor aumentam ao longo dos dias e o pico é atingido no 10º dia após a constrição (NITANDA et al, 2005).

3.4. TESTE DA PLACA QUENTE

Ao término do protocolo experimento, o teste da placa quente foi utilizado para medida da nocicepção crônica nos animais com o nervo constricto ou Sham. A medida consistiu no registro do tempo de retirada da pata traseira direita de uma placa aquecida a 52°C (LIU et al., 2002). O tempo máximo que o animal permaneceu sobre a placa quente foi de 30 segundos, para evitar lesões nas patas (KURAISHI et al., 1983).

3.5. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Após anestesia com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100 mg/Kg e 10 mg/kg, i.p.), os animais foram submetidos à cirurgia para implantação bilateral intracraniana de cânulas-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento. Estas foram fixadas com resina acrílica no crânio do animal.

De acordo com o atlas de Paxinos e Franklin, 2001, as coordenadas estereotáxicas para implantação das cânulas-guia na ínsula foram: anteroposterior (AP) = + 0.80 mm, Lateral (L) = +4 mm e dorsoventral (DV) = -2.7 mm, em relação ao bregma. A ponta da cânula-guia foi posicionada \pm 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. Após este procedimento, foram inseridos mandris feitos aço dentro das cânulas-guia, para evitar problemas com obstrução e para redução de descontaminação (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008).

Os animais permaneceram em recuperação por 5 dias para posteriormente serem submetidos ao teste comportamental.

3.6. MICROINJEÇÃO

Este procedimento consiste na introdução do fármaco na estrutura encefálica. Uma agulha de injeção com o comprimento ultrapassando 1,0 mm da ponta da cânula-guia (33-gauge) é conectada a uma microseringa Hamilton (10 μ l) e a um tubo de polietileno (PE-10) em uma bomba de infusão (Insight BI2000). A bomba de infusão foi programada, no presente estudo, para injetar 0,1 μ l de solução do fármaco na estrutura cerebral por um período de 60 segundos.

O procedimento foi realizado nas seguintes etapas: remoção do mandril da estrutura, inserção da agulha de injeção medindo 1,0mm a mais que a cânula-guia e injeção do fármaco por 60 segundos. A agulha foi contida por mais 30 segundos na estrutura para evitar possível refluxo da solução e o movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno

antes, durante e depois das injeções confirmou o fluxo da solução (NUNES-DE-SOUZA, et al., 2000; REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008).

Esta etapa foi executada neste estudo em dois momentos: 5 minutos antes do teste de nocicepção, para injeções bilaterais de salina ou midazolam e após decapitação para injeção de azul de metileno.

3.7. TESTE PARA AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO

O teste de contorções abdominais foi utilizado para avaliação da nocicepção. Conforme descrito por Vander Wende e Margolin (1956), foram observadas “severas contrações da musculatura abdominal, acompanhada por contorções que se estendem por todo o corpo e para os membros traseiros”. As contorções abdominais foram induzidas por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6% (10 ml/kg) (VANDER WENDE; MARGOLIN, 1956; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; LANGFORD et al., 2006).

3.8. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram alojados em pares nas caixas-viveiro 21 dias pós-nascimento (fase de desmame) e dois grupos foram formados:

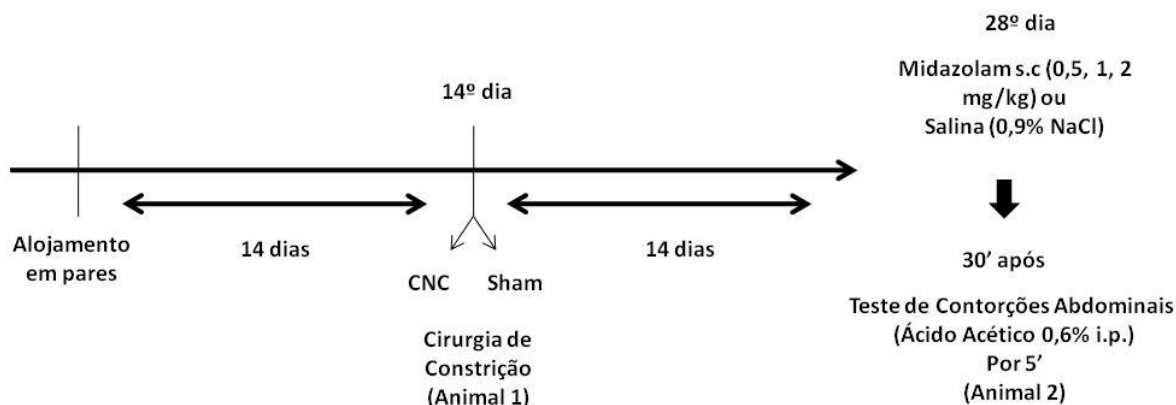
Grupo Constrição Nervo Ciático - Após 14 dias de convivência, um dos animais de cada par foi submetido à constrição do nervo ciático, conforme procedimento descrito acima.

Grupo Sham– Após 14 dias de convivência, um dos animais de cada par foi submetido a procedimento cirúrgico semelhante ao de constrição do nervo ciático, porém apenas com exposição do mesmo, sem a constrição.

Os grupos formados acima foram submetidos aos seguintes experimentos:

3.8.1. EXPERIMENTO 1. Avaliação dos efeitos da injeção de midazolam sobre os índices de nocicepção em camundongos expostos ao teste de contorções abdominais, após convívio com coespecífico submetido à condição de dor crônica.

Figura 5. Sequência de procedimentos empregados no Experimento 1.



Aos 21 dias após o nascimento (desmame), os animais foram alojados em pares nas caixas viveiro para estabelecimento de familiaridade (LANGFORD et al, 2006; BARTAL et al., 2011). Após 14 dias de convivência, um dos animais de cada par foi submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (Animal 1, CNC) ou não (Animal 1, Sham) e retornou à caixa viveiro com o coespecífico (Animal 2).

No dia do teste (28º dia de convívio), foram administradas injeções subcutâneas (s.c.) de salina ou midazolam (MDZ) (0,5, 1,0 e 2,0 mg/Kg) no animal 2 e, 25 minutos após, receberam injeção de ácido acético 0,6% (i.p.) e permaneceram em gaiola individual até o início das contorções abdominais ou até no máximo 5 minutos. Após o início das contorções, retornaram para a caixa de convívio com o parceiro (Animal 1) e foram submetidos ao teste de contorções abdominais para avaliação da nocicepção (Figura 5).

O teste de contorções foi filmado durante 5 minutos por uma câmera acoplada a um computador e o número de contorções abdominais foi registrado pelo programa X-PLO-RAT 2005, versão 1.1.0 (GARCIA et al., 2005). Os sujeitos que não contorceram antes ou durante o teste foram excluídos do estudo.

Ao final dos experimentos, os animais (Animal 1) com constrição do nervo ciático ou não, CNC e Sham, foram submetidos ao teste da placa quente para confirmação da hiperalgesia induzida pelo procedimento cirúrgico.

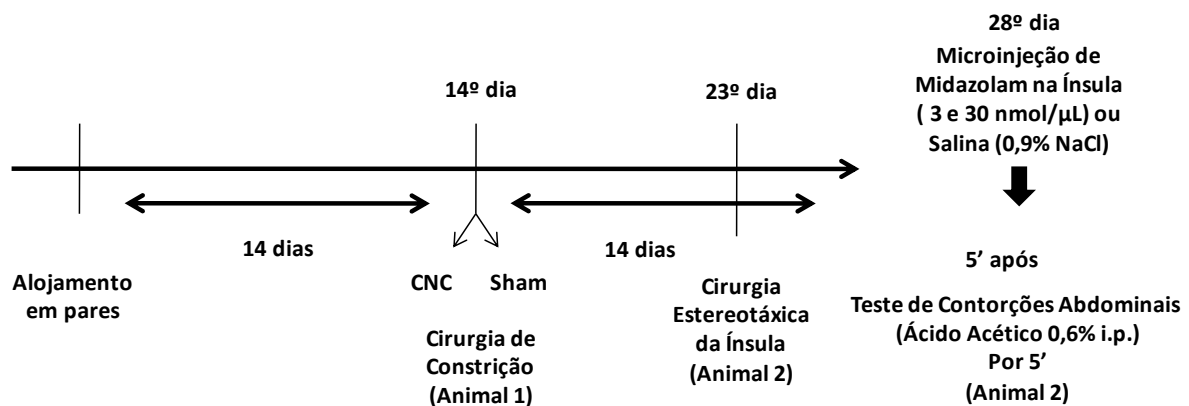
Tabela 1. Total de camundongos avaliados no Experimento 1

Tratamento (mg/Kg, i.p.)	Convívio			
	Sham	n Total	CNC	n Total
Salina	n = 13	26	n = 10	20
MDZ 0,5	n = 12	24	n = 10	20
MDZ 1,0	n = 10	20	n = 11	22
MDZ 2,0	n = 12	24	n = 12	24

Os números representam o total de camundongos utilizados por grupo nas duplas (Sham ou CNC) para avaliação no Experimento 1. CNC= constrição do nervo ciático; n Total= soma do animal Sham ou CNC (animal 1) mais o respectivo coespecífico (Animal 2).

3.8.2. Experimento 2. Avaliação dos efeitos da injeção intra-ínsula de midazolam sobre os índices de nocicepção em camundongos expostos ao teste de contorções abdominais após convívio com coespecífico submetido a um modelo de dor crônica.

Figura 6. Sequência de procedimentos empregados no Experimento 2.



Os protocolos de convivência e constrição do nervo foram realizados na mesma sequência descrita no Experimento 1, no entanto, neste experimento, no 23º dia de convívio os animais que conviveram com o par CNC ou Sham (Animal 2), foi submetido à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia na ínsula (**item 3.5**) (**Figura 6**).

No dia do teste (28º dia), o Animal 2 de cada par recebeu injeções bilaterais intra-ínsula de salina ou midazolam (3,0nmol e 30 nmol/0,1μl) e, em seguida, injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% (i.p). Após o início das contorções ou até no máximo 5 minutos, foram submetidos ao teste de contorções abdominais, conforme descrito no Experimento 1 (**Figura 5, item 3.8.1**). O número de contorções foi registrado e analisado também conforme descrito no Experimento 1.

Ao final do experimento, os animais em condição de dor crônica foram submetidos ao teste da placa quente para confirmação da hiperalgesia induzida pelo procedimento cirúrgico, como descrito no Experimento 1.

Também ao final do experimento, os animais submetidos ao teste de nocicepção (Animal 2) foram sacrificados para retirada dos encéfalos e realização da histologia para confirmação dos sítios de injeção (**item 3.9**).

Tabela 2. Total de camundongos avaliados no Experimento 2

Tratamento (nmol/0,1µl)	Convívio			
	Sham	n Total	CNC	n Total
Salina	n = 9	18	n = 10	20
MDZ 3	n = 8	16	n = 10	20
MDZ 30	n = 10	20	n = 10	20

Os números representam o total de camundongos utilizados por grupo nas duplas (Sham ou CNC) para avaliação no Experimento 1. CNC= constrição do nervo ciático; n Total= soma do animal Sham ou CNC (animal 1) mais o respectivo coespecífico (Animal 2).

3.9. HISTOLOGIA

Após o término do Experimento 2, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente) e submetidos à injeção bilateral de 0,1µl de solução de 1% de azul de metileno para marcação do sítio de injeção, conforme procedimento de injeção descrito no **item 3.6**. Após as injeções, os animais foram decapitados para remoção do encéfalo.

Os encéfalos foram armazenados em recipientes com solução de formalina (10%) e, posteriormente, seccionados em sentido coronal ao longo do trajeto das cânulas com o uso de um micrótomo (LEICA cm1850). As secções foram analisadas por um microscópio óptico (Olympus BX41TF) e a dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção, de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

3.10. ÉTICA

O projeto foi submetido e aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos – CEUA/UFSCar (nº 475209041). Os experimentos seguiram as normas e preceitos da Diretriz Brasileira para o cuidado e a

utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo conselho nacional de controle de experimentação animal – CONCEA (**Anexo 1**).

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram analisados para homogeneidade pelo teste de Levene. Os dados do Experimento 1 e 2, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de dois fatores (FATOR 1: convívio e FATOR 2: tratamento) e, para casos de significância, pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Os dados do teste da placa quente foram analisados pelo teste *t* de Student. Valores de *p* menor ou igual a 0,05 foram considerados como significativos.

4. RESULTADOS

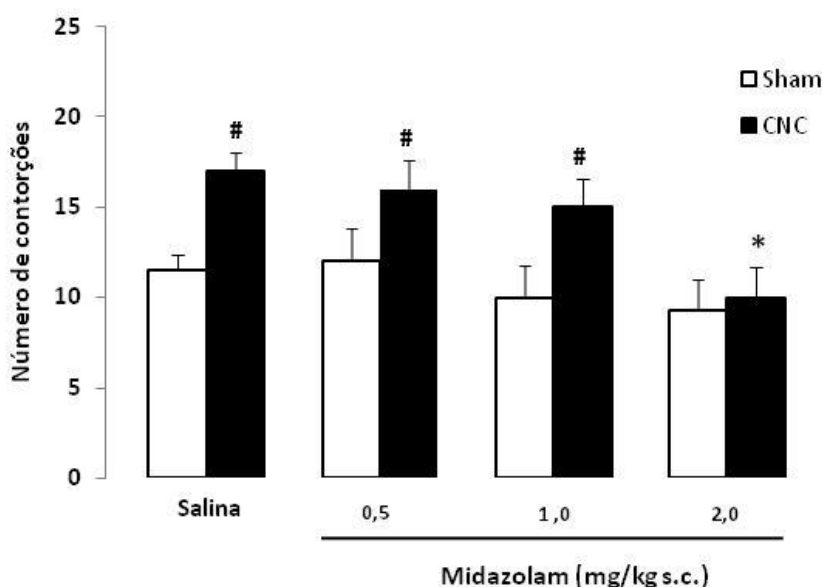
4.1. Experimento 1. Avaliação dos efeitos da injeção de midazolam sobre os índices de nocicepção em camundongos expostos ao teste de contorções abdominais, após convívio com coespecífico submetido à condição de dor crônica.

A análise de variância de dois fatores (ANOVA) (Convívio x Tratamento) mostrou efeito estatisticamente significativo para o convívio ($F_{(1,82)} = 13,38$; $p < 0,05$), para o tratamento ($F_{(3,82)} = 4,10$; $p < 0,05$) e nenhum efeito significativo para a interação convívio e tratamento ($F_{(3,82)} = 1,11$; $p > 0,05$).

Sobre o convívio, a análise de comparações múltiplas de Duncan mostrou que os animais que conviveram com o parceiro com constrição do nervo ciático, representados nas figuras pelo grupo CNC, apresentaram maior número de contorções abdominais, exceto para a maior dose de midazolam (2,0 mg/kg), quando comparados com os animais que conviveram com um coespecífico sem constrição, representados pelo grupo Sham no gráfico (**Figura 7**).

Para o tratamento, o post-hoc de Duncan mostrou diferença significativa do número de contorções nos animais do grupo CNC que receberam administração sistêmica de midazolam na maior dose (2mg/kg), quando comparado ao respectivo grupo salina. As outras doses do fármaco (0,5 e 1,0 mg/kg) não produziram alterações no número de contorções dos animais e nenhuma das doses de midazolam interferiu com o número de contorções no grupo Sham, quando comparado à salina (**Figura 7**).

Figura 7. Efeitos da injeção de salina ou midazolam (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg, s.c.) sobre a nocicepção em animais que conviveram em pares com coespecífico submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (grupo CNC) ou não (grupo Sham) (n= 10-13). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais dos grupos Sham e CNC. #P<0,05 em comparação com o respectivo grupo Sham. *P<0,05 em relação ao CNC salina.



Para a avaliação da nocicepção dos animais submetidos à constrição do nervo ciático (CNC) ou não (Sham), o teste *t* de Student mostrou diminuição da latência de retirada da pata direita nos animais do grupo CNC ($t_{(27)} = -5,9$, $p < 0,05$), em relação aos animais Sham. Esta diferença estatística confirma a hipernocicepção induzida pela constrição do nervo ciático (**Tabela 3**).

Tabela 3. Teste da Placa Quente no Experimento 1.

Grupos	Latência de retirada da pata (s)
Sham	24,26 ± 1,01
CNC	15,35 ± 1,11*

Registro da latência de retirada da pata direita (Animal 1).

Os valores representam a Média ± EPM (n= 14-15).

*p < 0,05 comparado ao grupo Sham

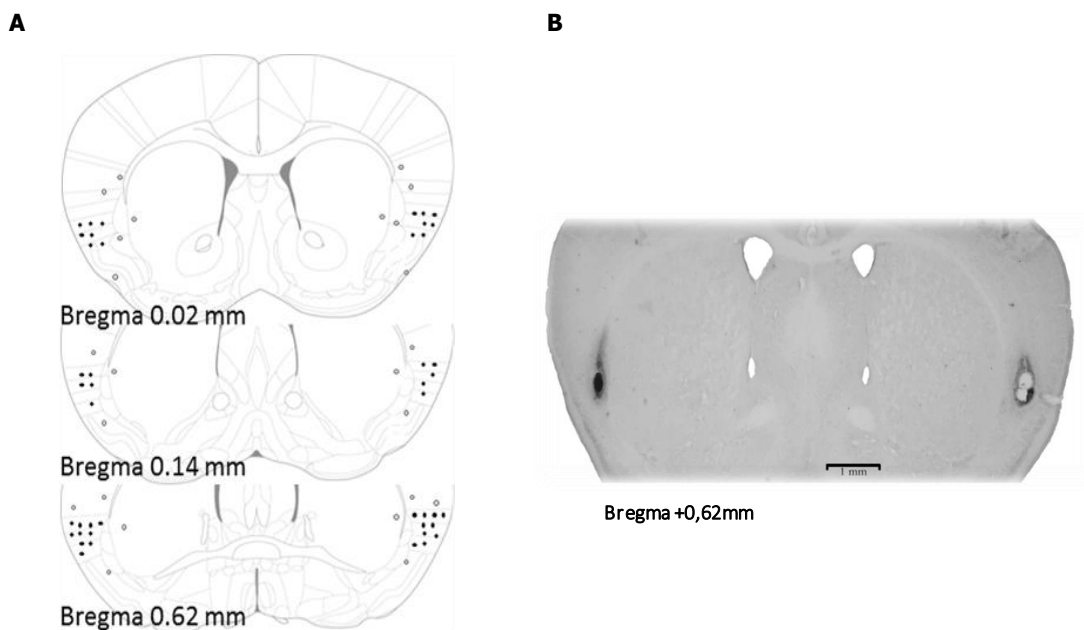
4.2. Experimento 2. Avaliação dos efeitos da injeção intra-ínsula de midazolam sobre os índices de nocicepção em camundongos expostos ao teste de contorções abdominais, após convívio com coespecífico submetido ao quadro de dor crônica.

As análises histológicas confirmaram que 57 camundongos foram canulados na ínsula conforme distribuição da **Tabela 4**.

Tabela 4. Total de camundongos canulados no Experimento 2.

Tratamento (mg/Kg, i.p.)	Convívio	
	Sham	CNC
Salina	n = 9	n = 10
MDZ 3	n = 8	n = 10
MDZ 30	n = 10	n = 10

Figura 8. **A.** Secções coronais representativas de alguns dos sítios de injeção na ínsula de camundongos. Os círculos preenchidos representam as áreas de infusão da droga nas estruturas-alvo e os círculos vazados representam sítios de injeção fora da estrutura-alvo (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). O número de círculos é inferior ao número de acertos devido à sobreposição dos acertos. **B.** Fotomicrografia da secção coronal do encéfalo de um sujeito representativo confirmando o sítio de injeção na ínsula.

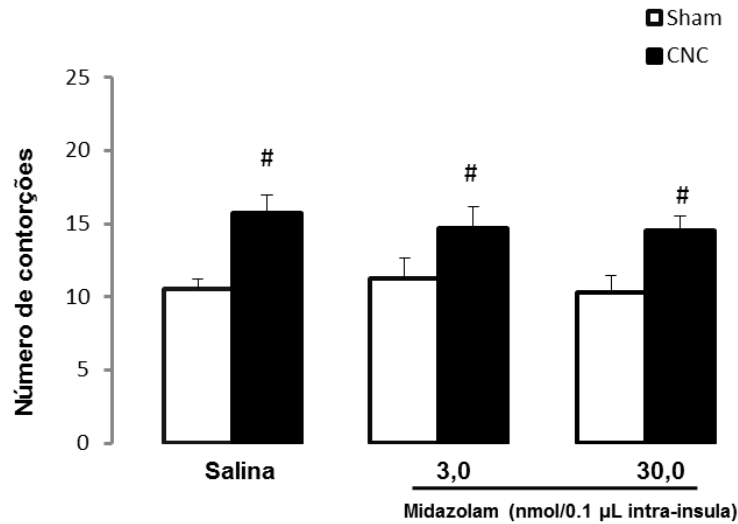


A ANOVA de dois fatores (Convívio x Tratamento) mostrou efeito significativo para o convívio ($F_{(1,39)} = 10,32$; $p < 0,05$), ausência de efeito significativo para o tratamento ($F_{(2,39)} = 0,17$; $p > 0,05$) e para a interação entre convívio e tratamento ($F_{(2,39)} = 0,37$; $p > 0,05$).

Comparações posteriores com post-hoc de Duncan demonstraram que o número de contorções abdominais dos animais que conviveram com o parceiro com constrição no nervo ciático (grupo CNC) é estatisticamente maior, em todas as condições, quando comparados aos animais que conviveram com um coespecífico Sham.

O post-hoc mostrou que nenhuma das doses de midazolam (3 e 30nmol) alterou o número de contorções nos grupos CNC e Sham, quando comparados aos respectivos grupos salina (**Figura 9**).

Figura 9. Efeitos da injeção bilateral intra-ínsula de salina ou midazolam (3 e 30nmol/0,1µl) sobre a nocicepção em animais que conviveram em par com coespecífico submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (grupo CNC) ou não (grupo Sham). As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais em camundongos alojados em duplas dos grupos Sham e CNC (n=8-10). #p < 0,05 em comparação ao respectivo grupo Sham.



Sobre a medida de nocicepção crônica no animal submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (CNC) ou não (Sham), o teste *t* de Student mostrou diminuição da latência de retirada da pata direita nos animais CNC ($t_{(44)} = -12,8$, $p < 0,05$) em relação aos animais Sham, confirmando hipernocicepção induzida pela constrição do nervo ciático (Tabela 5).

Tabela 5. Teste da Placa Quente no Experimento 2

Grupos	Latência de retirada da pata (s)
Sham	23,09 ± 0,80
CNC	9,82 ± 0,65*

Registro da latência de retirada da pata direita (Animal 1)

Os valores representam a Média ± EPM (n = 14=15)

* p < 0,05 comparado ao grupo Sham

5. DISCUSSÃO

Nos resultados dos Experimentos 1 e 2 foi observado hipernocicepção nos camundongos submetidos ao convívio com um coespecífico em quadro de dor crônica, a qual foi revertida após tratamento com midazolam sistêmico na maior dose 2mg/kg (Experimento 1). Entretanto, as injeções bilaterais de midazolam intra-ínsula (3,0 e 30 nmol) não reverteram o aumento do número de contorções abdominais nos camundongos submetidos ao convívio com o coespecífico em quadro de dor crônica (Experimento 2).

Para confirmar se o convívio ocorreu com animais em quadro de nocicepção crônica com 14 dias de constrição do nervo ciático, foi avaliado, ao final dos experimentos, a latência de retirada da pata direita do Animal 1 no Teste da placa quente (Tabelas 3 e 4), o qual confirmou diminuição na latência de retirada da pata nos animais com o nervo constricto (KURAISHI et al., 1983), (Experimentos 1 e 2), reforçando outros estudos da literatura com o mesmo modelo de dor crônica (BENNETT; XIE 1988; SOMMER; SCHAFERS, 1998; BAPTISTA-DE-SOUZA et al, 2015).

Os estudos no âmbito da empatia em modelos animais são muito recentes, assim como os demais estudos que investigaram a modulação social da nocicepção em roedores (LANGFORD et al, 2006; 2011; MARTIN; MOGIL, 2014; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; MARTIN et al, 2015). Especificamente, já foi descrita a existência da transmissão da nocicepção entre camundongos coespecíficos (LANGFORD et al, 2006) e hipernocicepção após convívio com par em quadro de dor crônica (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015), ambos após um período de tempo suficiente para estabelecimento de familiaridade. Portanto, os resultados do presente estudo corroboram com os achados na literatura e confirmam a necessidade de um período mínimo de familiaridade entre os animais para que o efeito nociceptivo seja observado (LANGFORD et al., 2006; BEN-AMI BARTAL et al., 2011; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015).

Além dos efeitos encontrados na nocicepção após convívio prolongado com um par em quadro de dor crônica, já foi demonstrado aumento de comportamentos relacionados à ansiedade no mesmo protocolo utilizado no presente estudo (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; CARMONA et al., 2016), fortalecendo os efeitos do convívio no comportamento. No entanto, considerando que dores crônicas podem desencadear aumento nos níveis de estresse, o convívio com um coespecífico em quadro de dor crônica também poderia levar a um tipo de estresse social (ULRICH-LAI et al., 2006; VACHON-PRESSEAU et al., 2013).

Achados da literatura descrevem que o estresse pode afetar a nocicepção de duas formas, pela atenuação ou aumento (COSTA et al., 2005, COUTINHO et al., 2002; TRAMULLAS, 2012; CARMONA et al., 2016) e, com o objetivo de verificar se outro tipo de estresse seria capaz de alterar a resposta nociceptiva em coespecíficos, estudos recentes do nosso grupo de pesquisa observaram aumento da nocicepção e de comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos que conviveram com um par submetido à um protocolo de 14 dias de estresse crônico de contenção (CARNEIRO-DE-OLIVEIRA et al., 2016; CARMONA et al., 2016).

Eventos estressantes promovem ativação do eixo HPA (Hipotalâmico–Pituitária–Adrenal) e este produz e libera corticosterona, hormônio do estresse em animais (ULRICH-LAI et al., 2006; BUCHANAN et al., 2012; VACHON-PRESSEAU et al., 2013; LIU et al., 2013). O aumento da nocicepção após convívio prolongado com o parceiro com nervo injuriado poderia ser considerado resultado de alterações no eixo HPA, promovidas pelo estresse social. Contudo, resultados em camundongos, demonstraram não haver diferença nos níveis de corticosterona, após o convívio prolongado com par em quadro de dor crônica por 28 dias (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015), protocolo igual ao utilizado neste estudo.

Ainda sob este aspecto, estudo anterior demonstrou que a redução do estresse foi capaz de promover contágio emocional da dor em camundongos sem familiaridade e também que a indução de estresse reverteu este efeito (MARTIN et al., 2015). Desta forma é possível sugerir que o efeito hipernociceptivo induzido por este modelo provavelmente não se deva ao aumento do estresse, mas sim a um comportamento relacionado ao contágio emocional da dor, considerado um comportamento evolutivo precursor da empatia em roedores (PRESTON; DE WAAL, 2011; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015).

Fortalece esta hipótese estudo realizado com ratos, o qual demonstrou que os animais que se engajaram mais no comportamento pró-social de ajuda apresentavam (BARTAL et al., 2016). Portanto, considerando as evidências da literatura, sugerimos que os efeitos acerca do contágio emocional entre roedores não podem ser explicados apenas como uma resposta mediada pelo eixo HPA (MARTIN et al., 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; BARTAL et al., 2016).

Como mencionado, há estudos que investigam as alterações comportamentais relacionadas com a modulação social da nocicepção e comportamento pró-social em animais, porém pouco ou nada se sabe sobre as bases neurais deste comportamento (SHAMAY-

TSOORY, 2011; MARTIN et al., 2015; MOGIL, 2015), o que caracterizou o objetivo do presente estudo.

Levando em consideração que indivíduos que sofrem de dores crônicas possuem desequilíbrios de sistemas de neurotransmissores em algumas estruturas encefálicas (BUSHNELL, 2013, WATSON, 2016), estudos com humanos sugerem que este desequilíbrio pode também estar presente em sujeitos que convivem com pacientes que apresentam dores crônicas, devido à manifestação de comportamentos, como aumento da ansiedade, depressão e sensibilização da dor em familiares, cuidadores e profissionais da saúde - como enfermeiros (SCHULZ; SHERWOOD, 2008; LUMLEY et al., 2011). É possível sugerir que estas alterações também ocorreram em camundongos no protocolo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015).

Diante do exposto, no presente estudo foi investigado o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica na modulação social da nocicepção devido à relação desta neurotransmissão com a própria percepção de dor e na modulação de outros processos emocionais (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; WATSON, 2016). Ainda, foi investigado se são os receptores GABA_A da ínsula que modulam este tipo de nocicepção. Para a execução do primeiro objetivo, avaliação do envolvimento da neurotransmissão GABAérgica na modulação social da nocicepção, os animais que conviveram com um coespecífico em quadro de dor crônica ou não (Sham) foram tratados sistemicamente com midazolam nas doses de 0,5, 1,0 e 2,0mg/kg.

Os resultados do Experimento 1 demonstraram diminuição do número de contorções abdominais após administração sistêmica da maior dose de midazolam (2,0 mg/kg) apenas nos animais que conviveram com par em dor crônica, comparado com os animais que receberam salina, o que pode propor evidências sobre a participação desta neurotransmissão no processo de empatia para a dor.

Outros estudos já demonstram a diminuição da nocicepção produzida por este fármaco, entretanto o teste foi realizado diretamente nos animais após aplicação do estímulo, sem considerar a influência emocional sobre a nocicepção avaliada no modelo utilizado (CHIBA et al, 2009).

No entanto, foi demonstrado recentemente que o tratamento com midazolam (2mg/kg), atenuou ou bloqueou o comportamento de ajuda em ratos coespecíficos, um comportamento caracterizado no estudo por contágio emocional, substrato da empatia (BARTAL et al., 2016). Os resultados mencionados fortalecem a participação da modulação

GABAérgica no contágio emocional e também a relevância do aspecto emocional para a ocorrência destes comportamentos em animais, além de reforçar os resultados obtidos no presente estudo.

É importante salientar que as três doses de midazolam (0,5, 1,0 e 2,0 mg/kg) utilizadas no presente estudo não interferiram na atividade locomotora do animal e foram pré-estabelecidas em estudo anterior (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).

Levando em consideração os resultados obtidos neste estudo, podemos sugerir, portanto, que o midazolam, quando administrado sistemicamente, diminuiu seletivamente a nocicepção induzida socialmente pelo convívio, provavelmente pela retirada do aspecto emocional produzida pelo modelo, pois os efeitos não foram observados no grupo que conviveu com os animais Sham, sem influência emocional sobre a nocicepção.

Conforme descrito em outros trabalhos, o midazolam, além dos efeitos analgésicos, também exerce efeito ansiolítico (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; NUNES-DE-SOUZA et al., 2012). Recentemente, também foi demonstrado diminuição de comportamentos relacionados à ansiedade após administração por via intraperitoneal de midazolam (1,0 e 2,0 mg/kg) em camundongos que conviveram com um par em condição de dor crônica e foram submetidos ao labirinto em cruz elevado (CARMONA et al., 2016). Estes dados, em conjunto com os resultados do Experimento 1, confirmam os achados sobre os efeitos analgésicos e ansiolíticos promovidos pelo fármaco diante de influência emocional no modelo que utilizamos.

Considerando que o GABA é um importante neurotransmissor inibitório do SNC e possui receptores localizados em estruturas envolvidas nos processos emocionais e de dor, como a amígdala e ínsula (WATSON, 2016, YOWTAK et al., 2013, BUSHNELL, 2013), realizamos o Experimento 2, para a investigar o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica da ínsula na empatia para dor.

Estudos de neuroimagem têm demonstrado o papel crucial da ínsula na empatia e na dor em humanos (CHUA et al., 1999; SINGER et al., 2004; SINGER; LAMM, 2009; SHAMAY-TSOORY, 2011; WATSON, 2016). E ainda, a ínsula, por ser uma estrutura de integração entre o sistema límbico e centros corticais superiores, exerce influência sobre o controle descendente da dor organizando a intensidade e a sensação dolorosa (GEBHART, 2004; SINGER; LAMM, 2009).

Lesões ou inativação da ínsula foram capazes de promover analgesia em ratos (JASMIN et al., 2003), portanto é possível propor que a inibição desta região poderia

interferir na modulação emocional da dor, necessária para uma situação de contágio emocional em animais (BARTAL et al., 2016). Neste sentido, estudo do nosso grupo observou a diminuição do número de contorções abdominais após inativação da ínsula com cloreto de cobalto (CoCl_2) em camundongos que conviveram com coespecífico em quadro de dor crônica, o que pode fortalecer o papel desta estrutura na modulação da influência emocional na nocicepção (PELARIN et al., 2014).

Uma possível explicação para o resultado obtido com a diminuição do número de contorções abdominais em camundongos que conviveram com coespecífico em quadro de dor crônica, após inativação da ínsula com COCl_2 (PELARIN et al., 2014), encontra apoio nas evidências de que talvez seja necessário a integridade das neurotransmissões envolvidas no aspecto emocional da dor, como a serotoninérgica, dopaminérgica, GABAérgica e ou glutamatérgica (FIELDS, 2004; STARR et al., 2009; WATSON, 2016), para que a ínsula desempenhe o seu papel de modulação emocional da nocicepção, o que deixou de ocorrer com o bloqueio por COCl_2 .

Estudos anteriores já mostraram que o midazolam é capaz de produzir efeitos ansiolíticos e de diminuição da nocicepção quando administrado em diferentes estruturas do SNC (GRAEFF; GUIMARÃES, 1999; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008; BAPTISTA, et al., 2009; BARBALHO et al., 2009; NUNES-DE-SOUZA et al., 2012). Entretanto, microinjeções intra-ínsula de midazolam (3 e 30 nmol/0,1 μ l) não produziram alterações na nocicepção do parceiro que conviveu com o coespecífico em quadro de dor crônica, permanecendo a manutenção do efeito hipernociceptivo (Experimento 2).

Apesar do midazolam ao exercer seu efeito de agonista nos receptores GABA-benzodiazepínicos da ínsula não ter produzido alteração na resposta nociceptiva avaliada neste modelo, não significa que a estrutura não tenha um papel modulatório sobre a nocicepção.

Neste contexto, estudo com humanos demonstrou uma relação entre analgesia induzida por placebo e diminuição de empatia para a dor associada à redução de expressão da ínsula, o que foi avaliado por neuroimagem em sujeitos expostos ao modelo de estimulação elétrica na mão (RÜTGEN et al., 2015). Além deste, outro estudo demonstrou que o uso de um analgésico conhecido, paracetamol, também promoveu, além da diminuição da dor, diminuição da empatia para a dor (MISCHKOWSKI et al., 2016). O mecanismo de ação do paracetamol não é bem definido, porém há evidências de que tenha ação em várias neurotransmissões e reduz atividade no CCA e na ínsula (DEWALL, 2010), acrescentando

evidências sobre a participação da ínsula no processo de empatia para a dor (SINGER et al., 2004; SHAMAY-TSOORY, 2011). Há evidências que suportam a hipótese de que o processo de empatia para a dor ativa os mesmos circuitos neurais envolvidos na primeira experiência de dor (SINGER et al., 2004; RÜTGEN et al., 2015).

Recentemente foi demonstrado aumento de hiperalgesia térmica e alodinia mecânica em ratos expostos ao modelo de constrição do nervo ciático, após a alteração das neurotransmissões excitatórias e inibitórias da ínsula. Mais especificamente, o aumento de glutamato ou diminuição de GABA endógeno promoveram aumento da sensibilidade à dor em animais que sofriam de dor crônica (WATSON, 2016).

Considerando o resultado de WATSON (2016), e tomando as devidas precauções, talvez a avaliação da nocicepção no camundongo coespecífico (observador), medida pelo número de contorções abdominais (dor aguda), realizada no nosso estudo seja devido ao aumento de glutamato ou diminuição de GABA endógeno, promovendo aumento da sensibilidade à dor no camundongo coespecífico. Como o aumento do GABA, desencadeado pela administração do midazolam intra-ínsula, não foi suficiente para reverter a hipernocicepção neste estudo, falta investigar em futuros trabalhos o papel da modulação glutamatérgica da ínsula neste modelo.

Outra possibilidade a ser considerada é que talvez a modulação deste processo nociceptivo via sistema GABAérgico não seja controlada pela ínsula, mas por outras estruturas, como amígdala ou CCA, as quais também são conhecidas por modular os aspectos emocionais de ansiedade e dor (SHAMAY-TSOORY, 2011; SINGER et al., 2004).

Os resultados do presente estudo e os achados de Bartal e colaboradores (2016) sugerem que há envolvimento do sistema GABAérgico no processo de modulação social da nocicepção e empatia (BARTAL et al., 2016). No entanto, ainda não se sabe quais estruturas e outras neurotransmissões podem estar envolvidas neste processo, hipótese que necessita de investigação futura.

Considerando que a empatia é crucial para a vida social, torna-se evidente que o estabelecimento das bases neurais envolvidas nesta resposta pode promover conhecimento mais robusto sobre o próprio processo da empatia e possibilitar tratamento para indivíduos que sofrem de transtornos com empatia diminuída (PRESTON; DE WAAL, 2002; SHAMAY-TSOORY, 2011). Portanto, estudos adicionais nesta área são necessários para o estabelecimento das vias de neurotransmissões e estruturas encefálicas que participam da influência emocional sobre a nocicepção.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados deste estudo, pode-se concluir que:

O número de contorções abdominais dos camundongos que conviveram com parceiro em quadro de dor crônica, em ambos os experimentos, foi significativamente maior que dos animais que conviveram com o coespecífico Sham, demonstrando hipernocicepção induzida pelo convívio.

No Experimento 1, somente a maior dose de midazolam (2,0 mg/kg) reverteu a hipernocicepção induzida pelo convívio com o par em quadro de dor crônica, sugerindo que a neurotransmissão GABAérgica parece estar envolvida nesse tipo de modulação social da dor.

No Experimento 2, nenhuma das doses de midazolam (3 ou 30nmol) intra-ínsula foi capaz de alterar a hipernocicepção, sugerindo que os receptores GABA-Benzodiazepínicos localizados na ínsula não estão participando da modulação da nocicepção induzida pelo modelo utilizado.

Portanto, diante dos resultados obtidos neste trabalho sugerimos que novos estudos serão necessários para esclarecer quais neurotransmissões e estruturas do sistema nervoso central podem participar da modulação social da dor em camundongos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREASEN, N. C. Linking mind and brain in the study of mental illnesses: a project for a scientific psychopathology. **Science**, v. 275(5306), p. 1586-1593, 1997.

ARGYROPOULOS, S. V., SANDFORD, J. J., & NUTT, D. J. The psychobiology of anxiolytic drugs: Part 2: pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacology & therapeutics**, v. 88(3), p. 213-227, 2000.

AUPPERLE, R. L., RAVINDRAN, L., TANKERSLEY, D., FLAGAN, T., STEIN, N. R., SIMMONS, A. N., PAULUS, M. P. Pregabalin influences insula and amygdala activation during anticipation of emotional images. **Neuropsychopharmacology**, v. 36(7), p. 1466-1477, 2011.

BAPTISTA D., BUSSADORI K., NUNES-DE-SOUZA R.L., CANTO-DE-SOUZA A. Blockade of fear induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. *Brain research*. v. 1294, p. 29-37, 2009.

BAPTISTA, D.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Activation of 5-HT_{2C} receptors in the dorsal periaqueductal gray increases antinociception in mice exposed to the elevated plus-maze. **Behavioural brain research**, v. 235(1), p.42-47, 2012.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D., NUNCIATO, A. C., PEREIRA, B. C., FACHINNI, G., ZANIBONI, C. R., CANTO-DE-SOUZA, A. Mice undergoing neuropathic pain induce anxiogenic-like effects and hypernociception in cagemates. **Behavioural pharmacology**, v. 26 (2), p. 664-672, 2015

BARTAL I.B., SHAN H., MOLASKY N.M., MURRAY T.M., WILLIAMS J.Z., DECETY J., MASON P. Anxiolytic treatment impairs helping behavior in rats. **Frontiers in Psychology**, p.1-14, v.7. 2016.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual review of neuroscience**, v. 7(1), p. 309-338, 1984.

BEN-AMI BARTAL, I.; DECETY, J.; MASON, P. Empathy and pro-social behavior in rats. **Science**, v. 334, n. 6061, p. 1427-30, 2011.

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

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

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

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

BOLLES, R. C., FANSELOW, M. S. PDR-a multi-level model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 3(02), p. 315-323, 1980.

BOTVINICK, M., JHA, A. P., BYLSMA, L. M., FABIAN, S. A., SOLOMON, P. E., PRKACHIN, K. M. Viewing facial expressions of pain engages cortical areas involved in the direct experience of pain. **Neuroimage**, v. 25(1), p. 312-319, 2005.

BRANDÃO, M.L. Mecanismos básicos e aspectos motivacionais da dor. In (Ed.). *As Bases biológicas do comportamento: Introdução à neurociência*. 2005.

BRANDÃO, M. L. *As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência*. 2005.

BUCHANAN, T.W., BAGLEY, S.L.; STANSFIELD, R.B.; PRESTON, S.D. The empathic, physiological resonance of stress. **Social neuroscience**, v. 7(2), p.191-201, 2012.

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

CAMERON, O. G.; HUANG, G. C.; NICHOLS, T.; KOEPPE, R. A.; MINOSHIMA, S.; ROSE, D.; FREY, K. A. Reduced γ -Aminobutyric acid A–Benzodiazepine binding sites in

insular cortex of individuals with panic disorder. **Archives of general psychiatry**, v. 64(7), p. 793-800, 2007.

CANTO-DE-SOUZA, A., PELARIN, V., BAPTISTA-DE-SOUZA, D. Role of amygdala, insula and anterior cingulate cortex in the modulation of nociceptive response and pain empathy in mice (654.21). Em: **44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience 2014**, Washington D.C., E.U.A.

CARMONA, I.M., BAPTISTA-DE-SOUZA, D., A. CANTO-DE-SOUZA. Anxiogenic-like behaviors induced by living with a conspecific in neuropathic pain condition are attenuated by systemic injection of midazolam in mice, **The Journal of Pain**, v. 17, p. S58-S59, 2016.

CARMONA, I.M., CARNEIRO-DE-OLIVEIRA, P.E., ZANIBONI, C.R., FONSECA, A.J.R., CANTO-DE-SOUZA, A. Hypernociception induced by cohabitation with a cagemate submitted chronic restraint stress. Em: **VII Forum on neurobiology of stress and 2nd symposium on serotonin in anxiety and depression**, Ribeirão Preto, SP, 2016.

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. Em: **VII Forum on neurobiology of stress and 2nd symposium on serotonin in anxiety and depression**, Ribeirão Preto, SP, 2016.

CHIBA, S., NISHIYAMA, T., YOSHIKAWA, M., YAMADA, Y. The antinociceptive effects of midazolam on three different types of nociception in mice. **Journal of pharmacological sciences**, v.109(1), p.71-77, 2009.

CHUA, P., KRAMS, M., TONI, I., PASSINGHAM, R., DOLAN, R.A. functional anatomy of anticipatory anxiety. **Neuroimage**.v.9(6), p. 563-571, 1999.

COSTA, A., SMERALDI, A., TASSORELLI, C., GRECO, R., NAPPI, G. Effects of acute and chronic restraint stress on nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. **Neuroscience letters**, v. 383(1), p.7-11, 2005.

COUTINHO S.V., PLOTSKY P.M., SABLAD M., MILLER J.C., ZHOU H., BAYATI A.I., MCROBERTS J.A., MAYER E.A. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. **American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology**, v 282(2) p. G307-16, 2002.

DAVIS, M.H.A. Multidimensional Approach to Individual Differences in Empathy. **JSAS Catalog of Selected Documents in Psychology**, v. 10, p. 85, 1980.

DECETY J, BARTAL IB-A, UZEFOVSKY F, KNAFO-NOAM A. Empathy as a driver of prosocial behavior: highly conserved neurobehavioral mechanisms across species. **Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences**, v. 371, p. 20150077, 2016.

DEWALL, C.N., MACDONALD, G., WEBSTER, G.D., MASTEN, C.L., BAUMEISTER, R.F., POWELL, C., COMBS, D., SCHURTZ, D.R., STILLMAN, T.F., TICE, D.M., EISENBERGER, N.I. Acetaminophen reduces social pain: Behavioral and neural evidence. **Psychological science**, v. 21(7), p.931-937, 2010.

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

ESLINGER, P.J., PARKINSON, K., SHAMAY, S.G. Empathy and social emotional factors in recovery from stroke. **Current opinion in neurology**, v. 15(1), p.91-97, 2002.

FIELDS, H.L., HEINRICHER, M.M., MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review of Neuroscience**, v. 14(1), p.219-245, 1991.

FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Nature Reviews neuroscience**, v. 5, p. 565-75, 2004.

FLASKERUD, J. H., LEE, P. Vulnerability to health problems in female informal caregivers of persons with HIV/AIDS and age related dementias. **Journal of Advanced Nursing**, v. 33(1), p. 60-68, 2001.

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

GARCIA, A. M. CARDENAS, F. P. MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology & Behavior**, v. 85, n. 3, p. 265-70, 2005.

GASQUOINE, P.G. contributions of the insula to cognition and emotion. **Neuropsychology review**, v. 24(2), p.77-87, 2014.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27(8), p. 729-737, 2004.

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 Psychology**, v. 12(4), p. 277, 1993.

GODINHO, F., FAILLENOT, I., PERCHET, C., FROT, M., MAGNIN, M., & GARCIA LARREA, L. How the pain of others enhances our pain: searching the cerebral correlates of 'compassional hyperalgesia'. **European Journal of Pain**, v. 16(5), p. 748-759, 2012.

GONZALEZ-LIENCRES, C., JUCKEL, G., TAS, C., FRIEBE, A., BRÜNE, M. Emotional contagion in mice: the role of familiarity. **Behavioural brain research**, v. 263, p. 16-21, 2014

GRAEFF, F.G., GUIMARAES, F.S. **Fundamentos de Psicofarmacologia**. São Paulo, editora Ateneu, 1999.

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

GUIMARÃES, F.S. Modelos experimentais de doenças mentais. **Rev ABPAPAL**, v. 15(4), p.149-52, 1993.

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.

HOFFMAN, M. How automatic and representational is empathy, and why. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 25(1), p. 38-39, 2002.

IASP Taxonomy Working Group. (2012). Classification of chronic pain.

JASMIN, L., RABKIN, S. D., GRANATO, A., BOUDAH, A., OHARA, P. T. Analgesia and hyperalgesia from gaba-mediated modulation of the cerebral cortex. **Nature**, v. 424, p. 316-20, 2003.

JASMIN, L., GRANATO, A., OHARA, P. T. Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: A tract tracing study in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 468(3), p. 425-440, 2004.

JORDAN, E. G., MOGIL, J. S. Mice, pain, and empathy. **Science**, v. 314(5797), p. 253, 2006.

Kelly, D.D. Part VIII. Psychopharmacological and Biological Effects of Opioid Peptides In Animals: THE ROLE OF ENDORPHINS IN STRESS:INDUCED ANALGESIA. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 398(1), p.260-271, 1982.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **J neurosci methods**, v.11, p.129-35, 1984.

KURASHI, Y., HARADA, Y., ARATANI, S., SATOH, M., TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain research**, v. 273(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. **Social Science & Medicine**, v. 40(6), 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, n. 5782, p. 1967-70, 2006.

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. **The Journal of pain**, v. 12(1), p. 125-32, 2011.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53(4), p. 597-652, 2001.

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. **Research in nursing & health**, v. 24(1), p. 44-56, 2001.

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(2), p. 399-407, 2002.

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

LUMLEY M.A., COHEN J.L., BORSZCZ G.S., CANO A.; RADCLIFFE A.M., PORTER L.S., SCHUBINER H., KEEFE F.J. Pain and emotion: a biopsychosocial review of recent research. **Journal of Clinical Psychology**, v. 67(9), p. 942-68, 2011.

MACHADO, A.B.M. Nervos em geral – Terminações nervosas – nervos espinhais. In (Ed.). **Neuroanatomia Funcional**. p. 105-113, São Paulo, 2006.

MALIZIA, A. L., CUNNINGHAM, V. J., BELL, C. J., LIDDLE, P. F., JONES, T., & NUTT, D. J. Decreased brain GABAA-benzodiazepine receptor binding in panic disorder: preliminary results from a quantitative PET study. **Archives of General Psychiatry**, v. 55(8), p. 715-720, 1998.

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. **Current Biology**, v. 25(3), p. 326-332, 2015.

MARTIN, L. J., TUTTLE, A. H., MOGIL, J. S. The interaction between pain and social behavior in humans and rodents. Em: **Behavioral Neurobiology of Chronic Pain**. Springer Berlin Heidelberg, p. 233-250, 2014

WALL, P. D., MELZACK, R., MCGRATH, P. Textbook of pain. **Canadian Psychology**, v.32(1), p. 92-93, 1991.

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

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v.57(1), p.1-164,1999.

MISCHKOWSKI D., CROCKER J., WAY B.M. From painkiller to empathy killer: acetaminophen (paracetamol) reduces empathy for pain. **Social cognitive and affective neuroscience**, v. 5, p. 1345-1353, 2016.

MOGIL, S.J. The Surprising Complexity of Pain Testing in the Laboratory Mouse. **What's Wrong with my mouse? Strategies for Rodent Behavior Phenotyping.** (Crawley J. ed), p. 11-25; 2007.

MOGIL J.S. Social modulation of and by pain in humans and rodents. **PAIN**, v. 156, p. s35-41, 2015.

MORRISON, J. Understanding others by understanding the self: neurobiological models of empathy and their relevance to personality disorders. **The Canadian child and adolescent psychiatry review**, v. 13, p. 68-73, 2004.

NAGAI, M., KISHI, K., KATO, S. Insular cortex and neuropsychiatric disorders: a review of recent literature. **European Psychiatry**, v. 22(6), p. 387-394, 2007.

NEUGEBAUER V., GALHARDO V., MAIONE S., MACKEY S.C. Forebrain pain mechanisms. **Brain research reviews**. v. 60, p. 226-42, 2009.

NEUMANN, M., EDELHÄUSER, F., TAUSCHEL, D., FISCHER, M. R., WIRTZ, M., WOOPEN, C., SCHEFFER, C. Empathy decline and its reasons: a systematic review of 27 studies with medical students and residents. **Academic medicine**, v. 86(8), p. 996-1009, 2011.

NITANDA, A., YASUNAMI, N., TOKUMO, K., FUJII, H., HIRAI, T., NISHIO, H. Contribution of the peripheral 5-HT_{2A} receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. **Neurochemistry international**, v. 47, n. 6, p. 394-400, 2005.

NORDT, S. P., CLARK, R. F. Midazolam: a review of therapeutic uses and toxicity. **The Journal of emergency medicine**, v. 15(3), p. 357-365, 1997.

NUNES-DE-SOUZA, R. L., CANTO-DE-SOUZA, A., DA-COSTA, M., FORNARI, R. V., GRAEFF, F. G., PELA, I. R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-oh-dpat and midazolam. **Psychopharmacology (berl)**, v. 150 (3), p. 300-10,2000.

NUNES-DE-SOUZA, R.L., CANTO-DE-SOUZA, A., DELUCIA, R. **Farmacologia do sistema nervoso central**, v. 4 (5), p.108-111, 2012.

OCHSNER, K., KNIERIM, K., LUDLOW, D., HANELIN, J., RAMACHANDRAN, T., GLOVER, G., & MACKEY, S. Reflecting upon feelings: an fMRI study of neural systems supporting the attribution of emotion to self and other. **Cognitive Neuroscience**, v. 16(10), p.1746-1772, 2004.

OHARA, P. T., GRANATO, A., MOALLEM, T.M., WANG, B. R., TILLET, Y., JASMIN, L. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. **Journal of neurocytology**, v. 32(2), p. 131-141, 2003.

OSBORN, J., DERBYSHIRE, S. W. Pain sensation evoked by observing injury in others. **Pain**, v. 148(2), p. 268-274, 2010.

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

PAULUS, M. P., FEINSTEIN, J. S., CASTILLO, G., SIMMONS, A. N., STEIN, M. B. Dose-dependent decrease of activation in bilateral amygdala and insula by lorazepam during emotion processing. **Archives of General Psychiatry**, v. 62(3), p. 282-288, 2005.

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

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

PELARIN, V. Empatia em camundongos: Avaliação do papel da amígdala, ínsula e córtex cingulado anterior na nocicepção em camundongos expostos ao teste de contorções abdominais. 09/05/2014. 55 folhas. Dissertação – UFSCar – Universidade Federal de São Carlos.

PLOGHAUS, A., BECERRA, L., BORRAS, C., BORSOOK, D. Neural circuitry underlying pain modulation: expectation, hypnosis, placebo. **Trends in cognitive sciences**, v. 7(5), p. 197-200, 2003.

PRESTON, S. D., DE WAAL, F. B. Empathy: its ultimate and proximate bases. **Behavioral and brain sciences**, v. 25(1), p. 1-20, 2002.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. **Pharmacology Churchill Livingstone**, p. 3-4. 2003.

REIS, L. M., CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain research**, v. 1231, p. 93-102, 2008.

REVES, J. D., FRAGEN, R. J., VINIK, H. R., GREENBLATT, D. J. Midazolam: pharmacology and uses. **Anesthesiology**, v. 62(3), p. 310-324, 1985.

RODGERS R.J., RANDALL J.I. Benzodiazepine ligands, nociception and 'defeat' analgesia in male mice. **Psychopharmacology**, v. 91(3), p. 305-15, 1987.

RÜTGEN M., SEIDEL E.M., SILANI G., RIEČANSKÝ I., HUMMER A., WINDISCHBERGER C., PETROVIC P., LAMM C. Placebo analgesia and its opioidergic regulation suggest that empathy for pain is grounded in self pain. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 112(41), p. e5638-46, 2015.

SANGER, D.J. GABA and the behavioral effects of anxiolytic drugs. **Life sciences**, v. 36(16), p.1503-1513, 1985.

SCHULZ, R., SHERWOOD, P.R. Physical and mental health effects of family caregiving. **Journal of Social Work Education**, v. 44(sup3), p.105-113, 2008.

SHAMAY-TSOORY, S. G. The neural bases for empathy. **The Neuroscientist**, v. 17(1), p. 18-24, 2011.

SIEGEL, K., RAVEIS, V. H., HOUTS, P., MOR, V. Caregiver burden and unmet patient needs. **Cancer**, v. 68(5), p. 1131-1140, 1991.

SIEGEL, A., BHATT, S., BHATT, R., ZALCMAN, S. S. The neurobiological bases for development of pharmacological treatments of aggressive disorders. **Current neuropharmacology**, v. 5(2), p.135-147, 2007.

SIEGHART, W., FUCHS, K., TRETTER, V., EBERT, V., JECHLINGER, M., HOGER, H., ADAMIKER, D. Structure and subunit composition of GABAA receptors. **Neurochemistry International**, v.34, p.379-385, 1999a.

SIEGHART, W. GABAA receptors: ligand gated Cl⁻ ionchannels modulated by multiple drug-binding sites. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, p.446-450, 1999b.

SIMNER, R. L. Newborn's Response to the Cry of Another Infant. **Developmental Psychology**, v. 5, p. 136-150, 1971.

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(5661), p. 1157-62, 2004.

SINGER, T., LAMM, C. The social neuroscience of empathy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1156, p. 81-96, 2009.

SINGH, N.N., LANCIANI, G.E., KARAZSIA, B.T., CHAN, J., WINTON, A.S. Effectiveness of Caregiver Training in Mindfulness-Based Positive Behavior Support (MBPBS) vs. Training-as-Usual (TAU): A Randomized Controlled Trial. **Frontiers in psychology**, v.7, 2016.

SMITH, T., RISKIN, J. Effect of clozapine on plasma nortriptyline concentration. **Pharmacopsychiatry**, v. 27(01), p.41-42, 1994.

SOMMER, C., SCHAFERS, M., MARZINIAK, M., TOYKA, K.V. Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. **Journal of Peripheral Nervous System**, v. 6, p. 67-72, 2001.

STARR, C. J., SAWAKI, L., WITTENBERG, G. F., BURDETTE, J. H., OSHIRO, Y., QUEVEDO, A. S., COGHILL, R. C. Roles of the insular cortex in the modulation of pain: insights from brain lesions. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 2684-94, 2009.

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 (3), p. 737-50, 2014.

TRAMULLAS, M., DINAN, T.G. AND CRYAN, J.F. Chronic psychosocial stress induces visceral hyperalgesia in mice. **Stress**, v.15(3), p.281-292, 2012.

ULRICH-LAI, Y.M., XIE, W., MEIJ J.T., DOLGAS C.M., YU L., HERMAN J.P., Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain. **Physiology & behavior**, v. 88 p. 67-76, 2006.

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.

VANDER WENDE, C., MARGOLIN, S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed Proc.** p. 494, 1956.

WATSON C.J. Insular balance of glutamatergic and gabaergic signaling modulates pain processing. **PAIN**, v. 157(10), p. 2194-2207, 2016.

WILLIS, W.D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences.**, v. 308(1136), p.253-70, 1985.

WISE, R. G., LUJAN, B. J., SCHWEINHARDT, P., PESKETT, G. D., ROGERS, R., & TRACEY, I. The anxiolytic effects of midazolam during anticipation to pain revealed using fMRI. **Magnetic resonance imaging**, v. 25(6), p. 801-810, 2007.

YOWTAK J., WANG J., KIM H.Y.; LU Y., CHUNG K., CHUNG J.M. Effect of antioxidant treatment on spinal gaba neurons in a neuropathic pain model in the mouse. **PAIN**, v. 154(11), p.2469-76, 2013.

ZAKI, J., OCHSNER, K. N. The neuroscience of empathy: progress, pitfalls and promise. **Nature neuroscience**, v. 15 (5), p. 675-80, 2012.

ANEXO 1



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Empatia em Camundongos: Avaliação do papel dos receptores GABAA-benzodiazepínicos da insula na modulação de resposta nociceptiva em camundongos submetidos ao convívio com par em condição de dor crônica", protocolada sob o CEUA nº 4752090415, sob a responsabilidade de **Caroline Riberti Zaniboni** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 22/04/2015.

We certify that the proposal "Empathy in mice: the role of GABA_A-Benzodiazepine receptors within insula in the modulation of nociceptive response in mice after cohabiting with a pair submitted to chronic pain condition.", utilizing 336 Heterogenics mice (336 males), protocol number CEUA 4752090415, under the responsibility of **Caroline Riberti Zaniboni** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 04/22/2015.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [05/2015](#) a [03/2017](#)

Área: [Psicologia](#)

ANEXO 2

Resumo publicado em edição especial da revista The Journal of Pain, referente à 35th Annual Scientific Meeting (11-14 de maio, Austin, Tx – 2016)

The Journal of Pain
OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN PAIN SOCIETY

American Pain Society
RESEARCH
EDUCATION
TREATMENT
ADVOCACY

RSS Feeds Mobile
Login | Register | Subscribe

Home Articles and Issues ▾ Collections ▾ For Authors ▾ Journal Info ▾ Subscribe APS ▾ More Periodicals ▾

All Content ▾ Search [Advanced Search](#)

< Previous Article **April 2016** Volume 17, Issue 4, Supplement, Page S58 Next Article >

Access this article on [ScienceDirect](#)

(330) Effects of midazolam on hypernociception induced by living with a conspecific in neuropathic pain condition in mice

C. Zaniboni, D. Baptista-de-Souza, A. Canto-de-Souza
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brazil

0

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2016.01.237>

Article Tools

- PDF (33 KB)
- [Email Article](#)
- [Add to My Reading List](#)
- [Export Citation](#)
- [Create Citation Alert](#)
- [Cited in Scopus \(0\)](#)

resulted in increased itch, but decreased pain behaviors. When glutamatergic neurons in the PAG were selectively targeted we found that activation led to enhanced itch and decreased pain, while inhibition neurons produced decreased itch and increased pain. We conclude that the PAG bidirectionally modulates itch and pain signaling and is a neural control center for pruritus.

(329) Temporal habituation of heat pain? Parameters used for measuring temporal summation primarily lead to decreases in pain ratings

M Payne, B Kuhn, E Lannon, C Sturycz, S Palit, Y Güereca, K Thompson, J Fisher, S Herbig, J Shadlow, and J Rhudy; The University of Tulsa, Tulsa, OK

Animal studies have shown that dorsal horn neurons become hyperexcitable (ie, wind-up) in response to a repetitive, constant-intensity, noxious stimulus. Temporal summation of pain (eg, increased pain in response to a repetitive, constant-intensity painful heat pulse) is believed to reflect the psychophysical correlate of wind-up. We examined temporal summation of heat pain (TS-heat) using previously published procedures in 107 healthy, pain-free participants from the community. To assess TS-heat, participants received 5 blocks of 10 heat pulses from a Contact Heat Evoked Potential Stimulator (CHEPs) attached to the volar surface of the left forearm, and the thermode was moved in between blocks. Pulse peak was determined from a preliminary workup that determined the temperature that evoked pain of ~45 out of 100. TS-heat was assessed after thermal sensory thresholds, but was randomized with three other pain tests (heat pain threshold/tolerance, electric pain tolerance, pressure pain threshold). Two pulse train parameters were attempted (between-subjects) with the same 3-s ISI: 1) from baseline of 35°C, each pulse reached peak temperature in 0.5-s, held peak for 0.5-s, and returned to baseline in 0.5-s, 2) from baseline of 39°C, each pulse reached peak temperature in 0.5-s, held peak for 0.75-s, and returned to baseline in 0.5-s. Three methods were used to calculate TS-pain: 1) $TS_{trend} = \text{mean pain ratings across all 10 pulses}$, 2) $TS_{10} = 10^{\text{th}}$ pain rating minus 1st pain rating, and 3) $TS_{max} = \text{max pain rating of pulses 2-10 minus 1}^{\text{st}}$ pain rating. Analyses examined whether train parameter, testing order, or calculation method had an effect on TS-heat. Analyses revealed habituation rather than summation in all cases except when TS_{max} was employed. Even then, average summation was minimal (change=1.3-2.7 on 100-point scale) and non-significant. Results suggest these TS-heat procedures may primarily measure habituation processes. Further investigation of the underlying neural mechanisms of TS-heat is warranted.

(330) Effects of midazolam on hypernociception induced by living with a conspecific in neuropathic pain condition in mice

C Zaniboni, D Baptista-de-Souza, and A Canto-de-Souza; Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brazil

Recent studies suggest the capacity to empathy of rodents, mainly in front of pain situation. The pain perception also has evolutionary importance and covers several brain circuits. Findings of our group demonstrated that living with a cagemate in neuropathic pain is able to induce the hypernociception in mice (Baptista-de-Souza et al, 2015). Among the neurotransmitters involved in the emotional modulation of pain, GABAergic is one of them. The aim was to investigate the role of GABAergic system in this type of social modulation of pain. Male Swiss mice (n=8-12 per group) were housed in pairs and after 14 days they were divided into two groups: cagemate nerve constriction (CNC, neuropathic pain model), in which one animal of each pair was subjected to sciatic nerve constriction; cagemate sham (CS), in which one animal from each pair was subjected to the same surgery but without constriction. After that, each pair was returned to its home cage to live together for further 14 days. In the 28th day of cohabiting, the observer cagemate who lived with a CS or CNC received injections of saline or midazolam (0.5, 1 and 2 mg/kg, subcutaneous) and 30 minutes after were submitted to the writhing test, for 5 minutes to evaluate nociception. The two-way ANOVA revealed that the number of writhes was significantly higher in CNC animals compared with animals in the CS groups. The higher dose of midazolam (2mg/kg) attenuated the hypernociception induced by living with a pair in neuropathic pain. These results suggest that the cohabited in pairs in the chronic

pain condition induced the hypernociception and the GABAergic neurotransmission is possibly involved on this kind of social modulation of pain.

(331) Empathy for pain: hyper or hypoalgesia in mice living with a conspecific in chronic pain?

D Baptista-de-Souza, R Nunes-de-Souza, and A Canto-de-Souza; Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brazil

Rodents can recognize pain-related responses in conspecifics. For instance, it has been shown that pain-related behaviors are bidirectionally influenced among animals that are suffering pain. We have recently shown that mouse living with a conspecific suffering with chronic pain [pain induced by sciatic nerve constriction (SNC)] displays increased nociceptive responses assessed with the writhing test (WT) (Baptista-de-Souza et al, Behavioral Pharmacology, 2015). Here we investigated whether this type of empathy is also observed when formalin test (FT) and hot plate test (HP) are employed to assess pain response in the observer mouse living with a cagemate suffering of chronic pain. Male Swiss mice (n=8-11 per group) were housed in pairs for 28 consecutive days. On day 14th, pairs of mice were grouped as follow: Cagemate nerve constriction (CNC), in which one animal from each pair was subjected to SNC surgery; Cagemate sham (CS), in which one animal from each pair was subjected to SNC sham surgery. After that, each pair was returned to its home cage to live together for further 14 days. On testing day (day 28th), the observer cagemate was subjected to one of the following nociceptive tests: WT, FT or HP. Student t test revealed that the CNC groups displayed higher number of abdominal writhes ($t(1,14)=5.83$ $P < 0.05$) and lower time spent licking the formalin injected paw than animals from CS group ($t(1,20)=2.50$, $P < 0.05$). No significant differences were observed between CNC and CS groups on the latency to lick the paw in mice exposed to the HP test ($t(1,16)=0.94$, $P > 0.05$). These results demonstrated that living with animals subjected to SNC induces hyperalgesia and hypoalgesia in the observer cagemate, as assessed in the writhing test and formalin test, respectively. Taken together, the present results suggest distinct nociceptive mechanisms involved on empathy for pain.

(332) Anxiogenic-like behaviors induced by living with a conspecific in neuropathic pain condition are attenuated by systemic injection of midazolam in mice

I Carmona, D Baptista-de-Souza, and A Canto-de-Souza; Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, São Paulo, Brazil

The ability to perceive emotions in each other allows predicting and understanding their feelings, this aspect is a relevant factor for social interaction. Findings of our group demonstrated that living with a cagemate in neuropathic pain condition is able to increase anxiety-like behavior in mice (Baptista-de-Souza et al, 2015). In this context, it is possible to infer that this increase in anxiety responses is result of this interaction. Among the neurotransmitters involved in the emotional modulation of anxiety is the GABAergic. The aim of this study was investigate the role of midazolam, a benzodiazepine drug, on anxiety responses in mice that cohabited for 28 days with a conspecific in chronic pain condition. For this purpose, male Swiss mice (n=5-9) were housed in pairs, from weaning, and after 14 days of living, one animal of each pair were submitted to sciatic nerve injury (CNC group), or not (SHAM Group). After the surgery they remained living in pairs for more 14 days. In the 28th day of cohabiting, the animal who lived with a pair in chronic pain and SHAM received systemic administration of saline or midazolam (0.5, 1 e 2 mg/kg, intraperitoneal) and 30 minutes after were exposed to elevated plus-maze (EPM). Two-way ANOVA test revealed that the animals that living with a cagemate in chronic pain condition present a decrease of EPM open arms exploration (percent open arm entries and percent open arm time) compared to SHAM group, characterizing the anxiogenic-like effects. In addition, the higher dose of midazolam induced an increase of open arms exploration in CNC group compared to CNC group treated with saline. These results suggest that the cohabited in pairs in the chronic pain condition can induce the anxiogenic-like responses and the GABAergic neurotransmission is

