



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS UFSCar/UNESP – PIPGCF  
GRUPO DE PSICOBIOLOGIA**

**O TRATAMENTO CRÔNICO COM FLUOXETINA REVERTE OS  
EFEITOS NOCICEPTIVO E ANTINOCICEPTIVO INDUZIDOS PELA  
ATIVAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> E 5-HT<sub>2C</sub> DA AMÍDALA  
DE CAMUNDONGOS CONFINADOS AOS BRAÇOS DO LABIRINTO  
EM CRUZ ELEVADO**

**Elke Mayumi Furuya Da Cunha**

**São Carlos – SP**

**2019**

**ELKE MAYUMI FURUYA DA CUNHA**

**O TRATAMENTO CRÔNICO COM FLUOXETINA REVERTE OS  
EFEITOS NOCICEPTIVO E ANTINOCICEPTIVO INDUZIDOS PELA  
ATIVACÃO DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> E 5-HT<sub>2C</sub> DA AMÍDALA  
DE CAMUNDONGOS CONFINADOS AOS BRAÇOS DO LABIRINTO  
EM CRUZ ELEVADO**

**Tese apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciência Fisiológicas UFSCar/UNESP, como  
parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Ciências Fisiológicas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza**

**São Carlos – SP**

**2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

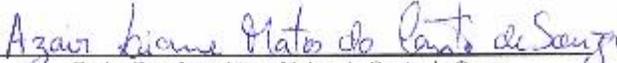
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

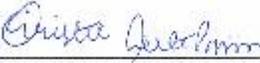
---

Folha de Aprovação

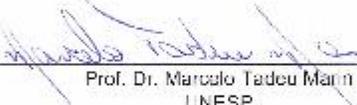
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Elke Mayumi Furuya da Cunha, realizada em 31/05/2019.

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

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Parissi  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel  
UFU

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marín  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Amância Ribeiro de Oliveira  
UFSCar

*Dedico este trabalho a minha família:  
meus pais, Mário e Maria, e meu  
marido e filhos, Sebá, Caio e Mateus.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus,

À Professora Azair, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela orientação e pela confiança,

Aos professores Carlos Cesar Crestani, Marcelo Tadeu Marin e Patrícia Maria de Paula pelas contribuições no exame de qualificação,

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

À técnica do laboratório, Lara Maria Silveira, pelo auxílio no dia a dia,

Aos meus amigos do laboratório, pelo apoio, amizade e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho,

Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos momentos da minha vida,

Ao meu marido, pelo amor, pelo respeito, pelo apoio, pela compreensão,

Aos meus filhos, minhas bênçãos queridas,

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF,

Ao Alexandre, pela competência profissional na secretaria do PIPGCF,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela bolsa concedida durante a realização de parte deste estudo.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: (A) Representação esquemática da análise histológica de acordo com o atlas de Franklin e Paxinos (2001). Os círculos escuros representam os locais que a infusão da droga atingiu a amígdala. E os círculos claros representam os locais de infusão fora da amígdala. O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição. (B) Fotomicrografia ilustrando o sítio de microinjeção (seta) intra-amígdala. 29
- Figura 2: Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c.) combinado ao tratamento intra-amígdala de 8-OH-DPAT (10,0nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \*P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle. 1P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+8-OH-DPAT. 31
- Figura 3: Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c.) combinado ao tratamento intra-amígdala de MK-212 (0,63 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \*P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle. 1P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+MK-212. 32
- Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais em relação ao tratamento farmacológico e ao tamanho da amostra 28

## **LISTA DE ABREVIACOES**

5-HT – 5-hidroxitriptamina, serotonina

BA – braço aberto

BF – braço fechado

IASP – Associação Internacional para Estudo da Dor

ISRS – Inibidor seletivo da recaptação de serotonina

LCE – labirinto em cruz elevado

SCP – substância cinzenta periaquedutal

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

V – veículo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
1.1. OBJETIVOS	21
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	22
2.1. SUJEITOS	22
2.2. ÉTICA	22
2.3. CIRURGIA E MICROINJEÇÃO	22
2.4. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	23
2.5. TESTE PARA AVALIAR A NOCICEPÇÃO	24
2.6. DROGAS	25
2.5.1 Tratamento sistêmico	25
2.5.2 Tratamento intra-amídala	25
2.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
2.7.1 Experimento 1	25
2.7.2 Experimento 2	26
2.8. HISTOLOGIA	26
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
<b>3. RESULTADOS</b>	28
<b>4. DISCUSSÃO</b>	33
<b>5. CONCLUSÃO</b>	39
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	40

## RESUMO

Estudos apontam que quadros de ansiedade e depressão podem ser acompanhados por sintomas de dor intensa sem localização precisa ou lesões aparentes, e diversas evidências demonstram que alguns fármacos antidepressivos utilizados no tratamento destes transtornos emocionais também são eficazes no alívio da dor. Sendo a interação entre estas respostas emocionais e sensoriais de alta relevância para a sobrevivência das espécies, diversos trabalhos têm demonstrado que a exposição a situações ameaçadoras, resulta em reações comportamentais e fisiológicas de defesa que são acompanhadas por inibição da dor. A amígdala, um complexo subcortical de núcleos, tem se mostrado envolvida no mecanismo da antinocicepção induzida pelo medo, além de ser um complexo de interface entre os estímulos sensoriais e emocionais, e evidências tem demonstrado que a estimulação desta estrutura pode induzir reações de medo ou ansiedade, acompanhada por analgesia, sugerindo assim sua participação no sistema de defesa e na modulação da nocicepção. Neste sentido, o labirinto em cruz elevado (LCE), um aparato utilizado para avaliar ansiedade em roedores, sensível ao efeito ansiolítico e ansiogênico de drogas, é também utilizado ao estudo da neurobiologia da antinocicepção induzida pelo potencial aversivo da experiência nos braços abertos. Assim, considerando evidências do papel antiaversivo da serotonina na amígdala, observado com o tratamento crônico com inibidores da recaptção de serotonina, este estudo teve por objetivo avaliar o papel dos subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> da amígdala sobre a nocicepção e antinocicepção de camundongos expostos ao LCE. Para isso, utilizamos administração intra-amígdala de agonistas dos receptores 5HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) e 5HT<sub>2C</sub> (MK-212), após o tratamento sistêmico crônico, de fluoxetina em camundongos. Os animais foram confinados no braço fechado ou aberto do LCE e foi avaliado o número de contorções abdominais após a injeção intraperitoneal (i.p.) de solução de ácido acético. O tratamento intra-amígdala com 8-OH-DPAT produziu um aumento no número de contorções tanto nos camundongos que foram confinados no braço aberto quanto nos que foram confinados no braço fechado. Entretanto, o tratamento fluoxetina+8-OH-DPAT bloqueou esse efeito da injeção intra-amígdala somente para os camundongos confinados no braço aberto. O tratamento intra-amígdala com MK-212 produziu uma diminuição no número de contorções somente nos camundongos que foram confinados no braço aberto, e o tratamento fluoxetina+MK-212 prejudicou esse efeito. Diante destes

resultados, é possível sugerir que o tratamento crônico com a fluoxetina reverte os efeitos produzidos pela ativação dos receptores 5-HT1A e 5-HT2C da amígdala de camundongos confinados ao LCE.

**Palavras-chave:** Antinocicepção, Labirinto em cruz elevado, Serotonina, Fluoxetina, Amígdala, Camundongos.

## ABSTRACT

Several studies indicate that anxiety and depression may be accompanied by symptoms of severe pain with no precise location or apparent lesions. Several evidences demonstrate that some antidepressive drugs used in the treatment of these emotional disorders are also effective in the relief of pain. The interaction between emotional and sensorial responses is of high relevance for the survival of the species. Several studies have shown that exposure to threatening situations results in behavioral and physiological defense reactions that be accompanied by inhibition of pain. The amygdala, a subcortical nucleus complex, has been shown to be involved in the mechanism of fear-induced antinociception. And it being a complex of interface between the sensorial and emotional stimuli. Evidences have shown that stimulation of this structure can induce fear or anxiety reactions, accompanied by analgesia, thus suggesting its participation in the defense system and nociception modulation. The elevated plus maze (EPM) is an apparatus used to assess rodent anxiety and it is sensitive to anxiolytic and anxiogenic effect of drugs. In this sense, EPM is used to study the neurobiology of antinociception induced by the aversive potential of the open arms experiment. Thus, considering evidences of the antiaversive role of serotonin in the amygdala, observed with chronic treatment with serotonin reuptake inhibitors, this study aimed to evaluate the role of amygdala 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> serotonin receptor subtypes on nociception and antinociception effects of mice exposed to the EPM in this context. For this, 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) and 5-HT<sub>2C</sub> (MK-212) receptor agonists were microinjected intra-amygdala associated with chronic systemic treatment of fluoxetine in mice. The animals were confined in the enclosed or open arm of the EPM and the number of abdominal writhings after the intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid solution was counted. Intra-amygdala treatment with 8-OH-DPAT produced an increase in the number of writhes in both mice that were confined in the open arm and those that were confined in the enclosed arm. However, treatment fluoxetine + 8-OH-DPAT blocked the effect of intra-amygdala injection only for the mice confined in the open arm. Intra-amygdala treatment with MK-212 produced a decrease in the number of writhes only in mice that were confined to the open arm, and the fluoxetine + MK-212 treatment impaired this effect. These results suggest that chronic treatment with fluoxetine reversed the effects produced by the activation of the 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the amygdala of mice confined to the EPM.

**Key words:** Antinociception, Elevated plus maze, Serotonin, Fluoxetine, Amygdala, Mice

## 1. INTRODUÇÃO

A dor corresponde a uma variedade de sensações físicas e aspectos emocionais que podem estar associados a um tipo de injúria sofrida em decorrência de um ferimento, ou até sensações anormais de síndromes neuropáticas (Cervero, 2000). De acordo com a Associação Internacional para Estudos da Dor (do inglês: International Association for the Study of Pain – IASP) “A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano potencial tecidual de fato, ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano”. A sensação de dor varia de indivíduo para indivíduo. Os componentes responsáveis pela informação dolorosa podem ser classificados como, componente sensorial (perceptivo-discriminativo), que permite identificar o estímulo como doloroso e o discrimina em relação ao tempo, espaço e intensidade e o componente emocional (aversivo-cognitivo-motivacional) , que atribui emoções à experiência dolorosa, e é responsável pela resposta comportamental frente à dor (Fernandez e Turk, 1992).

Os nociceptores são os neurônios que formam as fibras responsáveis pela transmissão dos estímulos nociceptivos periféricos ao corno dorsal da medula, também conhecidos por neurônios de 1ª. ordem. As fibras responsáveis pela transmissão nociceptiva periférica são formadas por fibras A delta mielinizadas, responsáveis pela transmissão rápida da dor, e fibras C amielinizadas, responsáveis pela transmissão lenta dos estímulos nociceptivos. Os nociceptores são sensíveis a estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos, e são ativados por receptores específicos a estes estímulos. O estímulo químico pode ser exógeno ou endógeno, como mediadores inflamatórios (bradicinina, prostaglandinas e substância P) e neurotransmissores (aminoácidos excitatórios, serotonina, noradrenalina, histamina), entre outros (Basbaum et al., 2009; Nickel et al., 2012).

As fibras constituídas pelos neurônios de 1ª. ordem conduzem o impulso até a medula espinhal onde terminam fazendo sinapse com neurônios de 2ª. ordem no corno posterior da substância cinzenta da medula espinhal. Parte destes neurônios constituem a via ascendente espinotalâmica lateral: responsável pela transmissão dos estímulos de dor e de temperatura ao tálamo. Os neurônios de terceira ordem projetam do tálamo ao córtex sensorial primário, resultando na sensação dolorosa consciente do indivíduo. A via ascendente espino-reticular é constituída pelos neurônios de 2ª. ordem que projetam difusamente para o tálamo, córtex e estruturas do sistema límbico, como a amígdala. Esta via tem papel importante nas reações afetivas-aversivas à dor e nos sistemas de controle descendente da dor (Millan, 1999).

Um aspecto intrigante no estudo da dor é o seu controle através do sistema nervoso central, ou controle inibitório descendente, um importante mecanismo em que a interação entre processos induzidos por estímulos nociceptivos e por estímulos de medo pode levar à sua inibição ou à analgesia (Canto-De-Souza *et al.*, 1998; Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2009; Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2009; Baptista *et al.*, 2012). O sistema descendente de modulação da dor envolve projeções corticais e de estruturas do sistema límbico, como a amígdala, para a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Esta estrutura emite projeções para os núcleos da rafe e, daí para o corno dorsal da medula, que recebe também projeções do locus ceruleus (Fields, 2004).

A amígdala, um complexo subcortical de núcleos, tem se mostrado envolvida no mecanismo da antinocicepção induzida pelo medo, além de ser um complexo de interface entre os estímulos sensoriais e emocionais (Ledoux, 1989), e evidências tem demonstrado que a estimulação desta estrutura pode induzir reações de medo ou ansiedade (Davis, 1992), acompanhada por analgesia (Helmstetter e Bellgowan, 1993), sugerindo assim sua participação no sistema de defesa e na modulação da nocicepção. Nesse sentido, Myers *et al.*

(Myers *et al.*, 2007) demonstraram que a ativação do núcleo central da amígdala aumenta a resposta visceromotora ao teste de distensão colorretal, enquanto a desativação deste mesmo núcleo diminui as respostas afetivo-emocionais relacionadas a dor (Neugebauer *et al.*, 2009), sugerindo que a amígdala processa os estímulos nociceptivos aferentes e participa tanto da modulação do componente sensorial como do componente emocional da dor.

Alguns tipos de eventos emocionais aversivos, como por exemplo, choque nas patas (Fanselow, 1984), inibem a dor e foram intensamente investigados por Bolles e Fanselow (Bolles e Fanselow, 1980), que sugeriram ser esta inibição relacionada à ativação de mecanismos analgésicos endógenos. Com a descoberta dos opióides endógenos, muitos modelos animais vêm sendo desenvolvidos e empregados no estudo da resposta nociceptiva, com o objetivo principal de selecionar drogas analgésicas que se mostrem mais potentes para o tratamento da dor em humanos (Frazer e Harris, 1967; Shih *et al.*, 2008).

A exposição a situações ameaçadoras de natureza inata ou aprendida resulta na exibição de um repertório de comportamentos defensivos espécie-específicos, alterações autonômicas e em inibição da dor, sendo esse conjunto de reações de alta relevância para a sobrevivência de uma espécie [para revisão, ver (Deakin e Graeff, 1991)]. Embora tenha sido demonstrada a existência de uma relação recíproca entre dor e distúrbios afetivos em modelos animais (Boccalon *et al.*, 2006; Narita *et al.*, 2006; Hasnie *et al.*, 2007), a neurobiologia da influência da ansiedade sobre a nocicepção ainda não está clara na literatura.

Neste sentido, um dos testes amplamente utilizados para avaliação da ansiedade em roedores é o labirinto em cruz elevado (LCE) [revisão, ver (Carobrez e Bertoglio, 2005)]. Este modelo foi validado para ratos por Pellow e colaboradores (Pellow *et al.*, 1985) e, para camundongos, por Lister (Lister, 1987). O LCE se baseia na aversão natural que roedores têm aos espaços abertos e envolve o estudo dos padrões exploratórios em um labirinto de

quatro braços, dois dos quais têm paredes e dois não, unidos ortogonalmente (Lister, 1987; Cruz *et al.*, 1994; Rodgers e Johnson, 1995). Ao lado das respostas fisiológicas e comportamentais defensivas, outros estudos demonstraram que a exposição de camundongos e ratos ao LCE também induz antinocicepção (Lee e Rodgers, 1990; Conceicao *et al.*, 1992; Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2005; Baptista *et al.*, 2009; Cornelio e Nunes-De-Souza, 2009; Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2009; Baptista *et al.*, 2012).

A resposta nociceptiva pode ser induzida por vários testes (Butler e Finn, 2009), sendo a aplicação de substâncias irritantes no peritônio de roedores, por exemplo, de amplo uso e sensível ao tratamento com agonistas de receptores opióides (Tyers, 1980; Abbott *et al.*, 1986). Este modelo, conhecido como teste de contorções abdominais, foi inicialmente empregado por (Vanderwende e Margolin, 1956) e permite medir a dor através do registro do número de contorções abdominais induzidas por estímulos químicos. Por se tratar de um estímulo nociceptivo inescapável, o teste de contorções abdominais permite avaliar a nocicepção em concomitância a exposição do animal a um ambiente potencialmente aversivo. Desta forma, pode-se investigar a influência do ambiente na resposta nociceptiva. O emprego do teste de contorções abdominais mostra-se útil, por exemplo, para a avaliação da influência da exposição ao LCE sobre a nocicepção (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2009; Baptista *et al.*, 2012).

Na tentativa de investigar os mecanismos centrais envolvidos nesta resposta antinociceptiva, Nunes-de-Souza e colaboradores (2000) demonstraram que injeções no complexo amidalóide de midazolam, agonista do receptor do ácido gama-aminobutírico - GABA A benzodiazepínico, bloquearam a antinocicepção em camundongos confinados nos braços abertos do LCE. De modo surpreendente, injeções de midazolam nessa mesma

estrutura não produziram qualquer efeito sobre este tipo de antinocicepção em camundongos previamente expostos ao mesmo ambiente aversivo (Baptista *et al.*, 2009), sugerindo, assim, que o GABA participa tanto da modulação da antinocicepção induzida pelo medo, como da ausência de efeito do fármaco quando o animal já conhece o ambiente do teste, fenômeno conhecido como one trial tolerance (OTT).

Outra classe de ansiolíticos, que é objeto de estudo de diversos trabalhos voltados a investigar tanto a modulação da ansiedade quanto da nocicepção, são os compostos que interferem na transmissão serotoninérgica. A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é um neurotransmissor com diversas funções encefálicas (Feldberg e Myers, 1964). De acordo com Deakin e Graeff (1991), a serotonina apresenta um papel dual na modulação da ansiedade porque dependendo dos estímulos aversivos (condicionado ou incondicionado), das estruturas mobilizadas no sistema nervoso central e do tipo de receptor ativado [5-H<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>, para revisão ver (Barnes e Sharp, 1999)], pode apresentar um papel ansiolítico ou ansiogênico.

Uma classe de fármacos utilizados no tratamento de transtornos emocionais e que atua nas vias serotoninérgicas são os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS). Um aspecto interessante destes fármacos é a sua utilização no tratamento da dor. Neste sentido, foi demonstrado efeito antinociceptivo promovido pela administração de fluoxetina em ratos avaliados no teste de retirada da cauda “tail-flick test” (Pedersen *et al.*, 2005).

Embora haja um papel importante para a serotonina no controle dos estados emocionais e de dor, vários resultados conflitantes ou inconsistentes são encontrados na literatura. Provavelmente isso se deva à complexidade das vias serotoninérgicas, diferentes estruturas do SNC e/ou diferenças nos aspectos metodológicos empregados em diferentes

estudos, como a natureza do estímulo nociceptivo aplicado e a via de administração ou dose da droga utilizada (Bardin *et al.*, 2000).

Com relação a amígdala, evidências demonstram que esta estrutura recebe projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (Ma *et al.*, 1991). No entanto, os efeitos específicos da ativação de seus receptores serotoninérgicos sobre a modulação da nocicepção ainda não são completamente compreendidos. Estudos com a administração de agonistas e antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> em diferentes estruturas do SNC realizados por nosso grupo de pesquisa tem demonstrado um papel complexo desta neurotransmissão na modulação da ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Canto-De-Souza *et al.*, 2002; Nunes-De-Souza *et al.*, 2002; Cornelio e Nunes-De-Souza, 2007; Nunes-De-Souza *et al.*, 2008; Nunes-De-Souza *et al.*, 2011).

Os receptores do subtipo 5-HT<sub>1A</sub> são ligados a proteína Gi (inibitória) e, quando ativados, produzem a abertura dos canais de potássio (K<sup>+</sup>) e hiperpolarização celular (Barnes e Sharp, 1999; Raymond *et al.*, 2001). Este subtipo de receptor está localizado em duas populações principais de neurônios: células serotoninérgicas do núcleo da Rafe, como receptores pré-sinápticos e em células pós-sinápticas no hipocampo, septo, amígdala e regiões cortico límbicas (Pazos e Palácios, 1985; Pompeiano *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 2001; Sanabria-Bohorquez *et al.*, 2002; Santana *et al.*, 2004). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> têm papel importante na auto-regulação do sistema serotoninérgico.

O papel dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT<sub>1A</sub> da amígdala sobre a antinocicepção induzida pela exposição ao LCE foi avaliado por Nunes-de-Souza *et al.* (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000), os quais observaram que a microinjeção de 8-OH-DPAT (agonista 5-HT<sub>1A</sub>) nesta estrutura provocou efeitos ansiogênicos, porém não atenuou a resposta antinociceptiva em camundongos confinados aos braços abertos do LCE, sugerindo

uma possível dissociação dos mecanismos que modulam a ansiedade daqueles envolvidos no controle da nocicepção no complexo amigdaloide.

Em relação aos receptores do subtipo 5-HT<sub>2C</sub> (metabotrópicos, ligados a proteína Gq, estimulatória), Grégoire e Neugebauer (Gregoire e Neugebauer, 2013) demonstraram que este subtipo de receptor limita a eficácia dos ISRS em atenuar os comportamentos afetivo-emocionais relacionados a dor, em ratos submetidos a um modelo de dor artrítica. Além disso, é importante ressaltar que, dentre os ISRS, a fluoxetina é capaz de interagir diretamente com os receptores 5-HT<sub>2C</sub> como um antagonista competitivo (Ni e Miledi, 1997; Palvimaki *et al.*, 1999).

Os ISRS são amplamente empregados no tratamento de transtornos como a ansiedade e a depressão (ex., Hyttel, 1994; Nash e Hack 2000; Argyropoulos *et al.*, 2000). O efeito dessa classe de fármacos sobre a ansiedade tem sido marcado por resultados diversificados em diferentes modelos animais (revisão, Pinheiro *et al.*, 2007). Neste sentido, o tratamento agudo com fluoxetina produziu efeito ansiogênico, enquanto que o tratamento crônico com fluoxetina produziu ausência de efeito sobre as medidas comportamentais avaliadas em ratos submetidos ao LCE (Silva e Brandão, 2000). Efeito ansiogênico semelhante ao teste com ratos, foi obtido com o tratamento agudo com fluoxetina e sertralina, entretanto somente o tratamento crônico com fluoxetina produziu efeito ansiolítico em camundongos avaliados no mesmo aparato (Kurt *et al.*, 2000).

Usando o labirinto em T elevado (LTE), um modelo animal utilizado para avaliar respostas relacionadas à ansiedade e ao pânico em ratos e camundongos (Teixeira *et al.*, 2000; Carvalho-Netto e Nunes-De-Souza, 2004), foi observado que o tratamento agudo com fluoxetina produziu efeito ansiogênico, porém o tratamento crônico por 15 dias com este mesmo composto apresentou efeito ansiolítico (Gomes *et al.*, 2009), sugerindo que a

administração prolongada com este ISRS deve levar a neuroadaptações que sustentam o efeito ansiolítico do agonista serotoninérgico.

De maneira interessante, Zanoveli e colaboradores (Zanoveli *et al.*, 2007) demonstraram que a resposta panicolítica observada após a administração crônica de fluoxetina ou sertralina foi acentuada com infusões intra-SCP de 8-OH-DPAT, sugerindo a ocorrência de mudanças adaptativas nos receptores 5HT<sub>1A</sub> que resultam no aumento de sua reatividade. Efeitos semelhantes foram encontrados com a administração crônica e sub-crônica de fluoxetina, associado ao tratamento intra-SCP do agonista 5-HT<sub>2A</sub> (DOI), no modelo de pânico induzido pela estimulação elétrica da porção dorsal desta estrutura mesencefálica, evidenciando que receptores 5-HT<sub>2A</sub> também são sensibilizados na presença desse fármaco (De Bortoli *et al.*, 2006).

Em relação à amígdala, estudos mostram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> do núcleo basolateral da amígdala produz efeitos ansiolíticos em ratos expostos ao labirinto em T (Strauss *et al.*, 2013; Vicente e Zangrossi, 2014). Além disso, Vicente e Zangrossi (Vicente e Zangrossi, 2014) demonstraram que o tratamento crônico sistêmico com imipramina (antidepressivo tricíclico) e fluoxetina causa a dessensibilização dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> do núcleo basolateral da amígdala de ratos expostos ao labirinto em T. No entanto, estes receptores e os do subtipo 5-HT<sub>1A</sub> deste mesmo núcleo amigdal, parecem não estar envolvidos no efeito panicolítico dos antidepressivos avaliados.

Há evidências que demonstram que o tratamento crônico com antidepressivos da classe dos ISRS, promove a dessensibilização de receptores serotoninérgicos (Artigas, 2013), não só do subtipo 5-HT<sub>2C</sub> como demonstrado por Vicente e Zangrossi (Vicente e Zangrossi, 2014), assim como do subtipo 5-HT<sub>1A</sub>. No entanto, os estudos sugerem que essa plasticidade

parece estar mais relacionada aos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pré-sinápticos, do que aos receptores localizados no corpo neuronal (Artigas, 2013).

Na clínica, tanto os quadros de depressão como de ansiedade interferem na percepção da dor. Hipoteticamente, a redução da ansiedade produziria um aumento na sensação dolorosa, entretanto observa-se o amplo uso de uma variedade de medicamentos antidepressivos e ansiolíticos, por exemplo, a fluoxetina, associados com a redução do quadro álgico (Tomkins et al, 2001; Salerno et al, 2002; Arnold et al., 2002; McCleane, 2008). Neste sentido, como a redução da resposta a estímulos dolorosos estaria associada à redução da ansiedade produzida pelos antidepressivos? Diante das evidências apresentadas, nossa hipótese é que os efeitos produzidos pela ativação dos receptores 5HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> da amígdala sobre o estado emocional e a resposta nociceptiva, em camundongos confinados aos braços do labirinto em cruz elevado podem ser modulados pelo tratamento com fluoxetina.

## **1.1. OBJETIVOS**

Diante do exposto, este estudo avaliou a influência do tratamento crônico com fluoxetina sobre os efeitos da administração intra-amígdala de agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) e 5HT<sub>2C</sub> (MK-212), sobre as respostas nociceptiva e antinociceptiva em camundongos confinados aos braços aberto e fechado do LCE.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Sujeitos**

Foram utilizados camundongos da linhagem Suíço-albino, machos, pesando 15-20 gramas, com 21 dias de idade no início do experimento, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar. Os animais foram agrupados em caixas coletivas (10/caixa, 41 x 34 x 16 cm), mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1$  °C), umidade ( $55 \pm 5\%$ ), luz (ciclo claro escuro de 12/12horas, luzes acesas às 7:00hs) e livre acesso ao alimento e água.

### **2.2. Ética**

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as recomendações da diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar), sob protocolo CEUA no. 021/2014.

### **2.3. Cirurgia e Microinjeção**

Após anestesia com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100/10 mg/kg, i.p.), os camundongos foram fixados a um aparelho estereotáxico (Insight Instruments, Brasil) para a implantação intracraniana de cânulas-guia (25-gauge x 7 mm; Insight Equipamentos, Brasil) direcionadas para a amígdala e fixadas com cimento acrílico odontológico. As coordenadas estereotáxicas foram: 1,0mm posterior ao bregma; 3,0mm bilateralmente a linha média e -2,5mm ventral à superfície craniana (Paxinos e Franklin, 2004). Um mandril de aço inoxidável (33-gauge; Fishtex®, Brasil) foi inserido dentro da cânula-guia para evitar sua

obstrução e prevenir contaminação. Após o término do procedimento cirúrgico, os camundongos receberam uma injeção do antiinflamatório cetoprofeno (5mg/kg, i.p.) (Lu *et al.*, 2004) e do antibiótico ceftriaxona (4mg/kg, i.m) (Stepanovic-Petrovic *et al.*, 2014), para evitar infecções e auxiliar na recuperação pós-operatória.

No 21º. dia de tratamento com fluoxetina, 25 minutos após a última injeção, foi realizado o procedimento de microinjeção. As agulhas de injeção (33-gauge, aço inoxidável, Insight Equipamentos, Brasil), cujo comprimento ultrapassa em 2,0 mm as pontas das cânulas-guia (9mm), foram inseridas dentro das mesmas para a infusão de veículo ou mK212 ou 8-OH-DPAT na amígdala. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), a microseringa Hamilton de 10 µL acomodada em uma bomba de infusão (BI 2000 – Insight Equipamentos, Brasil), que foi programada para injetar 0,1 µL de solução.

O procedimento de microinjeção bilateral consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, injeção das soluções por 60 segundos, permanência da agulha de injeção por 90 segundos, enquanto o animal foi contido manualmente pelo examinador com auxílio de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmou o fluxo da solução.

#### **2.4. Labirinto em Cruz Elevado**

O labirinto em cruz elevado consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25cm) unidos por uma plataforma central (5 x 5cm) a dois braços fechados com paredes de madeira (30 x 5 x 15cm). O aparato fica elevado do solo a 38,5cm e possui portas removíveis nas

extremidades centrais dos braços, possibilitando o confinamento ao braço fechado ou ao braço aberto (modificado de Lister, 1987).

Os camundongos foram confinados individualmente ao braço aberto (BA) ou ao braço fechado (BF) do LCE por 5 minutos. Após cada exposição, o labirinto foi limpo com algodão umedecido em solução de álcool a 20% (v/v) e seco com papel toalha. Os testes foram conduzidos sob iluminação moderada (77 lux, medida na plataforma central do aparato) e durante a fase clara do ciclo de luz. Os experimentos foram filmados por uma câmera conectada a um computador alocado em uma sala adjacente à sala de testes. Os resultados coletados foram analisados posteriormente utilizando o programa X-Plo-Rat 2005, versão 1.1.0 (Garcia *et al.*, 2005).

## **2.5. Teste para avaliar a nocicepção**

A nocicepção foi avaliada pelo teste de contorções abdominais, descrito por Vander Wende e Margolin (Vander Wende e Margolin, 1956) que observaram “severas contrações da musculatura abdominal, acompanhada pelas contorções que se estendem por todo o corpo e para os membros traseiros”. Neste estudo as contorções foram induzidas pela injeção de ácido acético a 0,6% (10 ml/kg, i.p.) (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2009).

Após a injeção de ácido acético, os camundongos permaneceram em caixas individuais por 5 minutos até o início das contorções. Os animais que não contorceram durante esse período foram eliminados do experimento. Após a confirmação do início das contorções, foram formados dois grupos, a saber: a) *Avaliação da antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE* – os camundongos foram confinados ao BA do LCE durante 5 minutos e foi registrado o número de contorções abnominais. b) *Avaliação da*

*nocicepção* – os camundongos foram confinados ao BF do LCE durante 5 minutos e foi registrado o número de contorções abdominais.

## **2.6. Drogas**

**2.5.1. Tratamento Sistêmico:** Crônico – Fluoxetina, (5mg/kg; Sigma/RBI), diluído em salina (0,9% NaCl), (Singh *et al.*, 2001).

**2.5.2. Tratamento Intra-Amígdala:** 8-OH-DPAT (agonista 5-HT<sub>1A</sub>) – bromidrato de (±)-8-hidroxi-2-(di-n-propil-amino) tetralina [Sigma PM: 328,3 g (na dose de 10 nmol)], diluído em veículo (salina 0,9% e 2% de Tween 80) (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000); MK-212 (agonista 5-HT<sub>2C</sub>) (6-cloro-2-(1-piperazinil)-pirazina) [Tocris, Cookson, Ballwin, USA (na dose de 0,63 nmol)] dissolvido em veículo (Gomes e Nunes-De-Souza, 2009).

## **2.7. Delineamento experimental**

**2.7.1. Experimento 1: Influência do tratamento crônico com fluoxetina nos efeitos do tratamento intra-amígdala do agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) sobre a nocicepção e a antinocicepção de camundongos avaliados no LCE.**

Os sujeitos receberam tratamento subcutâneo crônico com salina ou fluoxetina, por 21 dias. Entre os 15º. e 16º. dias do tratamento crônico os camundongos passaram pela cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia na amígdala, conforme descrito no item 2.2. No 21º. dia, após o tempo necessário para a ação da fluoxetina i.p. (30 minutos), cada camundongo recebeu injeções intra-amígdala de veículo ou 8-OH-DPAT (na dose de 10 nmol) e, após 5 minutos, uma injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo), 0,6% (i.p.). Após a confirmação do início das contorções, os camundongos foram confinados ao BA ou ao BF do LCE por 5 minutos e foi registrado o número de contorções abdominais.

### **2.7.2. Experimento 2: Influência do tratamento crônico com fluoxetina nos efeitos do tratamento intra-amídala de agonista dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> (MK-212) sobre a nocicepção e a antinocicepção de camundongos avaliados no LCE.**

Foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 2.6.1., com exceção do tratamento intra-amídala. Neste experimento os camundongos receberam injeções intra-amídala de veículo ou do agonista dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> (MK-212, na dose de 0,63 nmol), e foram submetidos ao mesmo procedimento para avaliar a nocicepção e a antinocicepção induzida pelo confinamento no BA ou no BF do LCE.

### **2.8. Histologia**

Após o término dos experimentos 1 e 2, todos os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina (100/10 mg/kg, i.p.) e receberam uma infusão de 0,1 µL de uma solução de azul de Evans a 2%, de acordo com o procedimento descrito anteriormente para administração central de drogas. Após a infusão intra-amídala, os camundongos foram submetidos a eutanásia com o auxílio da câmara de CO<sub>2</sub>, decapitados, seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Posteriormente, os encéfalos foram seccionados (40 µm) em criostato a -20°C (Leica CM1850) para análise histológica dos sítios de injeção. As secções foram avaliadas com o auxílio de um microscópio (Olympus BX41TF) e a visualização da dispersão do azul de Evans indicou o local da injeção central de drogas (Paxinos e Franklin, 2004). Os camundongos cujas injeções não atingiram a amídala bilateralmente foram excluídos do estudo. O número de acertos bilaterais na amídala foi de aproximadamente 60%.

## **2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de três fatores [tratamento 1 (fluoxetina ou salina) x tratamento 2 (8-OH-DPAT ou MK-212 ou veículo) x tipo de confinamento (BA ou BF)], seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. O valor de *P* menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

### 3. RESULTADOS

A análise histológica confirmou a canulação positiva bilateral na amígdala em 152 camundongos, no núcleo basolateral (95%) e no núcleo central (5%). Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos: camundongos tratados com fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c.) ou salina crônica que receberam veículo ou 8-OH-DPAT (10 nmol) intra-amígdala (Exp. 1) e camundongos tratados com fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c.) ou salina crônica que receberam veículo ou MK-212(0,63 nmol) intra-amígdala (Exp. 2), conforme descrito na tabela 1.

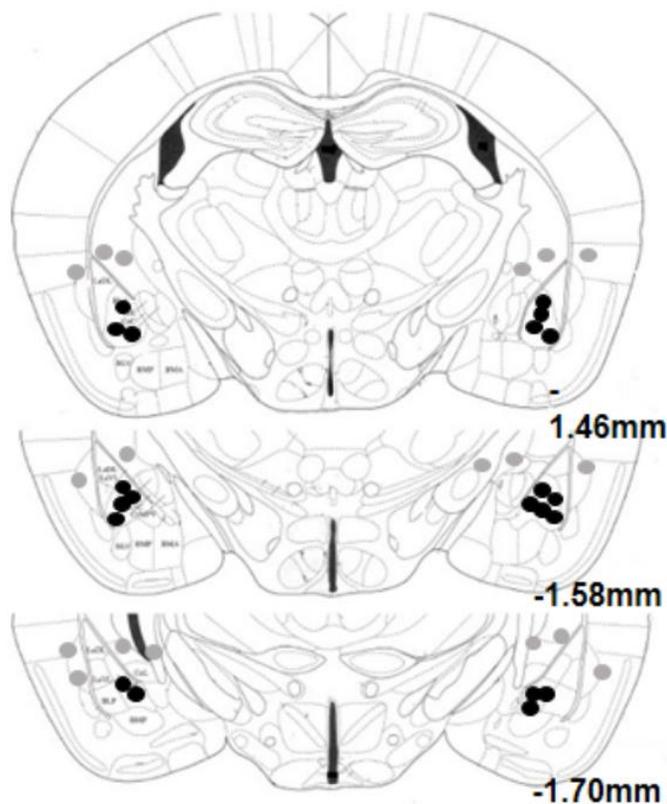
Tabela 1. Descrição dos grupos experimentais em relação ao tratamento farmacológico e ao tamanho da amostra

Experimento	Tratamento	LCE (confinamento)	
		BA	BF
1	Salina + Veículo	12	10
	Salina + 8-OH-DPAT (10nmol/0,1µL)	7	9
	Fluoxetina (5,0mg/kg) + Veículo	11	8
	Fluoxetina (5,0mg/kg) + 8-OH-DPAT (10nmol/0,1µL)	10	12
2	Salina + Veículo	10	10
	Salina + MK-212 (0,63nmol/0,1 µL)	10	10
	Fluoxetina (5,0mg/kg) + Veículo	8	8
	Fluoxetina (5,0mg/kg) + MK-212 (0,63nmol/0,1 µL)	7	10

LCE=labyrintho em cruz elevado; BA=braço aberto; BF=braço fechado

A Figura 1A é uma representação esquemática da análise histológica de acordo com o atlas de Franklin e Paxinos (2001). Os círculos escuros representam os locais que a infusão da droga atingiu a amígdala. Os círculos claros representam os locais de infusão fora da amígdala. A Figura 1B mostra uma fotomicrografia de uma secção encefálica coronal onde é possível visualizar o local da microinjeção na amígdala.

1A



1B

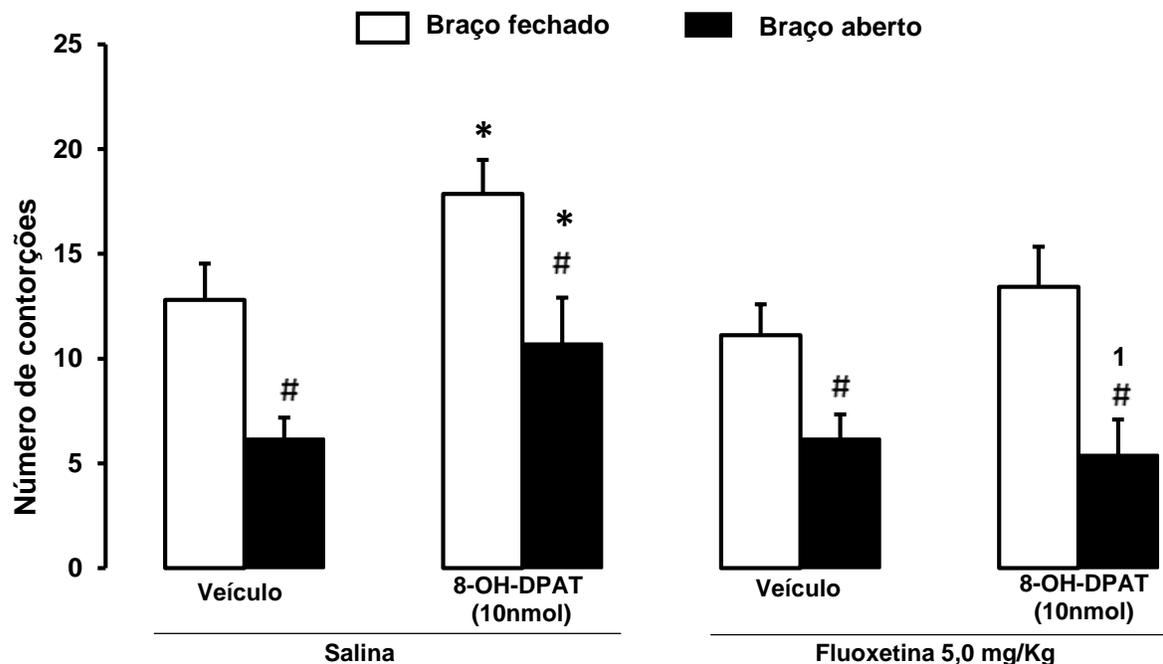


**Figura 1:** (A) Representação esquemática da análise histológica de acordo com o atlas de Franklin e Paxinos (2001). Os círculos escuros representam os locais que a infusão da droga atingiu a amígdala. E os círculos claros representam os locais de infusão fora da amígdala. O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição. (B) Fotomicrografia ilustrando o sítio de microinjeção (seta) intra-amígdala.

**Experimento 1. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c) combinado ao tratamento intra-amídala de 8-OH-DPAT (10,0 nmol), sobre a nocicepção e a antinocicepção de camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE.**

A figura 2 ilustra o resultado do experimento 1. A ANOVA mostrou diferença significativa para os seguintes fatores: local de confinamento ( $F_{1,71}=34,18$ ,  $P<0,05$ ), tratamento sistêmico com fluoxetina ( $F_{1,71}=5,64$ ,  $P<0,05$ ), tratamento intra-amídala com 8-OH-DPAT ( $F_{1,71}=6,16$ ,  $P<0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa para a interação local de confinamento x tratamento sistêmico ( $F_{1,71}=0,07$ ,  $P>0,05$ ), local de confinamento x tratamento intra-amídala ( $F_{1,71}=0,47$ ,  $P>0,05$ ), tratamento sistêmico x intra-amídala ( $F_{1,71}=3,36$ ,  $P>0,05$ ) e local de confinamento x tratamento sistêmico x intra-amídala ( $F_{1,71}=0,40$ ,  $P>0,05$ ).

Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados aos confinados no braço fechado, independente do tratamento recebido. O tratamento salina+8-OH-DPAT produziu aumento no número de contorções nos animais expostos ao braço aberto e fechado, quando comparados aos seus grupos controles, enquanto o tratamento com fluoxetine+8-OH-DPAT reverteu esse efeito seletivamente para os camundongos confinados no braço aberto somente.



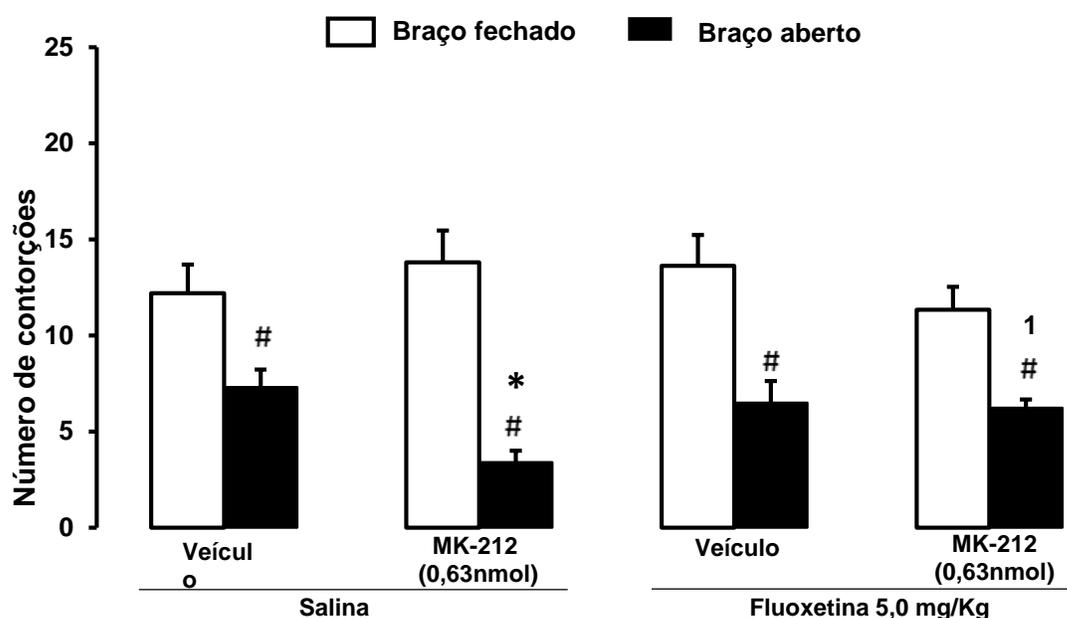
**Figura 2:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c.) combinado ao tratamento intra-amídala de 8-OH-DPAT (10,0nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \*P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle. 1P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+8-OH-DPAT.

**Experimento 2. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c) combinado ao tratamento intra-amídala de MK-212 (0,63 nmol), sobre a nocicepção e a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE.**

A figura 3 ilustra o resultado do experimento 2. A ANOVA mostrou diferença significativa para os seguintes fatores: local de confinamento ( $F_{1,69}=57,90, P<0,05$ ), local de confinamento x tratamento sistêmico x tratamento intra-amídala ( $F_{1,69}=5,62, P<0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa para os fatores tratamento sistêmico ( $F_{1,69}=0,19, P>0,05$ ), tratamento intra-amídala ( $F_{1,69}=2,38, P>0,05$ ), local de confinamento x tratamento sistêmico

( $F_{1,69}=2,67, P>0,05$ ), local de confinamento x tratamento intra-amídala ( $F_{1,69}=0,39, P>0,05$ ) e tratamento sistêmico x intra-amídala ( $F_{1,69}=0,65, P>0,05$ ).

Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados aos confinados no braço fechado, independente do tratamento recebido. O tratamento salina+MK-212 produziu diminuição no número de contorções nos animais expostos ao braço aberto, quando comparados ao seu grupo controle, enquanto o tratamento com fluoxetina+MK-212 prejudicou esse efeito seletivamente.



**Figura 3:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c.) combinado ao tratamento intra-amídala de MK-212 (0,63 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado.\*P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle. 1P < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+MK-212.

#### 4. DISCUSSÃO

Os nossos resultados demonstraram que o confinamento no braço aberto do LCE promoveu uma diminuição no número de contorções nos camundongos, quando comparados com os animais que foram confinados no braço fechado, independentemente dos tratamentos utilizados. O tratamento intra-amídala com 8-OH-DPAT produziu um aumento no número de contorções tanto nos camundongos que foram confinados nos braços aberto e fechado. Entretanto, o tratamento fluoxetina+8-OH-DPAT bloqueou esse efeito da injeção intra-amídala somente para os camundongos confinados no braço aberto. Por outro lado, o tratamento intra-amídala com MK-212 produziu uma diminuição no número de contorções nos camundongos que foram confinados no braço aberto somente, enquanto o tratamento fluoxetina+MK-212 prejudicou esse efeito.

Vários autores têm utilizado o LCE para avaliar os mecanismos centrais envolvidos no controle da ansiedade e das respostas defensivas, como a antinocicepção induzida por situações aversivas (Lee e Rodgers, 1990; Conceicao *et al.*, 1992; Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2005; Baptista *et al.*, 2009; Cornelio e Nunes-De-Souza, 2009; Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2009; Baptista *et al.*, 2012; Tavares *et al.* 2018).

O confinamento no braço aberto do LCE produziu a diminuição do número de contorções abdominais nos camundongos (Figuras 3 e 4), fenômeno conhecido como antinocicepção induzida pelo braço aberto. Estes resultados corroboram com trabalhos anteriores do nosso grupo de estudos (Nunes-de-Souza *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2009; Baptista *et al.*, 2012; Tavares *et al.* 2018), confirmando ser este um teste eficaz para avaliar a antinocicepção induzida pelo medo.

A amígdala é um complexo subcortical de núcleos com papel importante na modulação das emoções e da dor associada aos transtornos emocionais, como depressão e transtorno do pânico (Neugebauer *et al.*, 2004; Heinricher *et al.*, 2009). Este complexo recebe projeções serotoninérgicas dos núcleos da Rafe (Ma *et al.*, 1991) e uma classe de fármacos muito utilizada no tratamento das desordens emocionais e da dor a ela relacionada são os que atuam nesta neurotransmissão (Pedersen *et al.*, 2005; Artigas, 2013). Assim, este estudo procurou avaliar o papel de dois subtipos de receptores serotoninérgicos: 5-HT1A e 5-HT2C, na modulação da antinocicepção induzida pelo confinamento no braço aberto do LCE.

A injeção intra-amígdala de 8-OH-DPAT, um agonista 5-HT1A, produziu o aumento no número de contorções abdominais em ambos grupos de camundongos, confinados nos braços abertos e nos braços fechados. Considerando que os camundongos confinados nos braços abertos do LCE reproduzem comportamentos relacionados ao medo e a ansiedade, uma vez que o braço aberto é um ambiente aversivo a roedores, dentro destes comportamentos é possível destacar a diminuição ou inibição da dor. Sendo assim, a ativação dos receptores 5-HT1A intra-amígdala, produziu um comportamento relacionado ao efeito ansiolítico, permitindo que o camundongo exibisse mais comportamentos relacionados a dor, como já observado por Tavares *et al.* (2018), em estudos anteriores do nosso laboratório. Da mesma forma, Strauss *et al.* (2013) demonstraram que a ativação dos receptores 5-HT1A do núcleo basolateral da amígdala produz efeitos ansiolíticos em ratos expostos ao labirinto em T.

No entanto, como resultado da ativação dos receptores 5-HT1A da amígdala, foi observado aumento no número de contorções nos camundongos confinados nos braços fechados, ambiente considerado seguro para roedores. Este comportamento também foi observado por Tavares *et al.* (2018), sugerindo que a ativação destes receptores esteja

relacionada as vias descendentes de modulação da nocicepção. Os receptores 5-HT1A são acoplados a proteína Gi, cuja ativação resulta na hiperpolarização celular (Fox and Sorenson, 1994; Raymond et al., 2001; Artigas, 2013) e consequente inativação do sistema inibitório descendente de modulação da dor (Fields, 2004; McGaraughty et al., 2004). Sendo assim, ativação dos receptores 5-HT1A da amígdala produziu aumento da nocicepção tanto nos camundongos confinados no braço fechado, quanto nos animais confinados no braço aberto do LCE.

A participação dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT2C na modulação da ansiedade e reações de defesa também tem sido extensamente investigada (Baptista et al., 2012; Vicente e Zangrossi, 2014; Tavares et al., 2018; Baptista-de-Souza et al., 2018). Neste estudo, o tratamento intra-amígdala com MK-212, agonista 5-HT2C, produziu uma diminuição no número de contorções nos camundongos confinados no braço aberto do LCE. Dessa forma, a ativação deste subtipo de receptor da amígdala pode estar relacionado com um efeito ansiogênico, com consequente diminuição da sensibilidade a dor (Tavares et al., 2018).

Neste sentido, em estudo anterior, Vicente e Zangrossi (2014) observaram que a ativação dos receptores 5-HT2C do núcleo basolateral da amígdala de ratos produziu comportamentos relacionados a ansiedade, quando os animais foram expostos ao labirinto em T e na caixa claro-escuro. Considerando que os braços abertos são considerados espaços potencialmente aversivos e que produzem aumento de ansiedade em roedores (Pelow et al, 1985; Lister, 1987; Nunes-de-Souza et al, 2000), no nosso estudo a ativação dos receptores 5-HT2C da amígdala nos camundongos que foram confinados no braço aberto do LCE produziu aumento da antinocicepção, provavelmente induzida pelo medo/ansiedade. Trabalho anterior do nosso grupo também observaram aumento da antinocicepção em

camundongos confinados no LCE quando avaliaram a ativação destes receptores na SCP, estrutura com papel relevante no controle das reações de defesa (Baptista et al., 2012).

Estudos prévios têm demonstrado que os ISRS tem uma interação direta com os receptores serotoninérgicos, principalmente dos subtipos 1A e 2C, e que o seu efeito terapêutico ocorre justamente devido a essa interação (Chen et al., 1995; De Vry et al., 2004). Dentre esta classe de fármacos a fluoxetina é um ISRS clássico e estudos anteriores já mostraram sua interação direta com os receptores do subtipo 2C como antagonista (Ni e Miledi, 1997; Palvimaki *et al.*, 1999) e outros subtipos de receptores (Artigas, 2013). Assim, para melhor investigar essa interação do antagonismo seletivo dos receptores de serotonina com os receptores do subtipo 2C, nós utilizamos uma dose de fluoxetina sem efeito na resposta nociceptiva, avaliada anteriormente em estudos prévios do nosso laboratório (Baptista-de-Souza, 2015).

O tratamento crônico com a fluoxetina produziu uma diminuição no número de contorções nos camundongos tratados intra-amídala com 8-OH-DPAT confinados no braço aberto do LCE, ou seja, reverteu o efeito de aumentar a nocicepção resultante da injeção intra-amídala nesse grupo de animais. Em estudos anteriores, Tavares et al. (2018) demonstraram que o tratamento agudo com fluoxetina na dose de 2,5mg/kg s.c. não foi capaz de produzir esse efeito. Além disso, Baptista-de-Souza (2015) não observou efeito significativo na antinocicepção de camundongos expostos ao LCE, após ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da SCP. No entanto, no mesmo estudo, Baptista-de-Souza (2015) observou que o tratamento sistêmico agudo e crônico com fluoxetina foi capaz de reverter totalmente a antinocicepção induzida pelo confinamento no braço aberto do LCE somente para os camundongos que receberam injeção intra-SCP de 8-OH-DPAT, demonstrando, dessa forma, que ocorre uma interação da fluoxetina com os receptores do subtipo 1A.

O aumento da concentração de serotonina decorrente do tratamento crônico com ISRS induz neuroplasticidade nos receptores serotoninérgicos e, em relação aos do subtipo 1A, ocorre uma dessensibilização desses receptores (Artigas, 2013), entretanto este efeito parece estar mais relacionado aos receptores pré-sinápticos.

Em relação aos receptores do subtipo 2C, este trabalho demonstrou que o tratamento crônico com a fluoxetina reverteu o efeito antinociceptivo produzido pela injeção intramígdala de MK-212. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos do nosso laboratório, quando Baptista-de-Souza (2015) e Tavares et al. (2018) observaram que o tratamento agudo com fluoxetina foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da injeção central de MK-212, na SCP e na amígdala, respectivamente, em camundongos confinados no braço aberto do LCE. Dessa forma, é possível afirmar que a ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, tanto da amígdala quanto da SCP, produz aumento da antinocicepção induzida pelo confinamento no braço aberto do LCE e o tratamento sistêmico com fluoxetina, agudo ou crônico, reverteu esse efeito.

Baptista-de-Souza et al. (2014) demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina induziu aumento na expressão de receptores do subtipo 5-HT<sub>2C</sub> na amígdala. Além disso, outros autores também observaram que a fluoxetina pode exercer uma ação direta neste subtipo de receptor serotoninérgico (Palvimaki et al., 1999) e ainda, que a afinidade deste ISRS com o 5-HT<sub>2C</sub> é maior que com o próprio transportador de serotonina (Ni e Miledi, 1997). Vicente e Zangrossi (2014) demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina inibiu o efeito ansiogênico produzido pela ativação de receptores 5-HT<sub>2C</sub> presentes no núcleo basolateral da amígdala de ratos expostos ao labirinto em T, sugerindo que o tratamento crônico com ISRS induzem a dessensibilização destes receptores. No conjunto, estas evidências concordam com outros estudos que sugerem que a fluoxetina atue como um

antagonista competitivo reversível dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> (Ni e Miledi, 1997; Palvimaki et al., 1999; Tavares et al., 2018).

Curiosamente Baptista-de-Souza et al. (2018) observaram que ocorre uma interação entre os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 2C da SCP, na modulação da antinocicepção induzida pelo medo em camundongos. Esta interação também foi descrita por outros autores. Valdez et al. (2002) demonstraram que a ativação de receptores 5-HT<sub>2</sub> induz a atenuação da atividade do receptor 5-HT<sub>1A</sub> no córtex cingulado anterior em ratos, sugerindo que esta co-modulação pode ocorrer devido a interação entre componentes intra-celulares da cascata de sinalização, quando os receptores avaliados estão localizados no mesmo neurônio.

Considerando estas evidências, é possível que esta co-modulação entre receptores de subtipos diversos também ocorra em outras estruturas relacionados com a modulação da antinocicepção, como a amígdala. Dessa forma, o efeito do tratamento sistêmico com fluoxetina crônica sobre os receptores 5-HT<sub>2C</sub> da amígdala pode ter prejudicado o efeito de aumentar a nocicepção produzido pela ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da amígdala, observado no experimento 1.

## 5. CONCLUSÃO

Os nossos resultados confirmam resultados anteriores da literatura demonstrando que o confinamento de camundongos no braço aberto do LCE produziu antinocicepção.

A ativação dos receptores 5-HT1A da amígdala com 8-OH-DPAT (10 nmol) acentuou a nocicepção, enquanto a ativação dos receptores 5-HT2C da amígdala com MK-212 (0,63 nmol) aumentou o efeito antinociceptivo induzido pelo modelo.

O tratamento crônico com fluoxetina (5,0 mg/Kg) foi capaz de reverter o efeito nociceptivo induzido pelo agonista dos receptores 5-HT1A, e o efeito antinociceptivo induzido pelo agonista dos receptores 5-HT2C da amígdala de camundongos confinados aos braços aberto ou fechado do labirinto em cruz elevado.

Dessa forma, a fluoxetina é capaz de atuar como antagonista dos receptores 5-HT2C, revertendo o efeito antinociceptivo produzido pela ativação destes receptores na amígdala. Além disso, devido a interação que ocorre entre os receptores 5-HT1A e 5-HT2C, o tratamento crônico com fluoxetina reverteu o efeito nociceptivo produzido pela ativação dos receptores 5-HT1A.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B.; LIBMAN, R. B. A dose-ratio comparison of mu and kappa agonists in formalin and thermal pain. **Life Sci**, v. 39, n. 21, p. 2017-24, Nov 24 1986.

ARNOLD, L. M. et al. A randomized, placebo-controlled, double-blind, flexible-dose study of fluoxetine in the treatment of women with fibromyalgia. **Am J Med**, v. 112, n. 3, p. 191-7, Feb 15 2002.

ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacol Ther**, v. 137, n. 1, p. 119-31, Jan 2013.

BAPTISTA, D. et al. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. **Brain Res**, v. 1294, p. 29-37, Oct 19 2009.

BAPTISTA, D.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray increases antinociception in mice exposed to the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 235, n. 1, p. 42-7, Nov 1 2012.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. **Interação entre fluoxetina e receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal: efeitos nociceptivos e neuroquímicos em camundongos, São Paulo**. 2015. 109f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Faculdade de Psicologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Interplay between 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray in the modulation of fear-induced antinociception in mice. **Neuropharmacology**, v. 140, p. 100-106, 2018.

BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 11-8, May 2000.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083-152, Aug 1999.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009.

BOCCALON, S.; SCAGGIANTE, B.; PERISSIN, L. Anxiety stress and nociceptive responses in mice. **Life Sci**, v. 78, n. 11, p. 1225-30, Feb 9 2006.

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 291-323, June, 1980 1980.

BUTLER, R. K.; FINN, D. P. Stress-induced analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 3, p. 184-202, Jul 2009.

CANTO-DE-SOUZA, A.; LUIZ NUNES-DE-SOUZA, R.; RODGERS, R. J. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. **Brain Res**, v. 928, n. 1-2, p. 50-9, Feb 22 2002.

CANTO-DE-SOUZA, A. et al. Involvement of the midbrain periaqueductal gray 5-HT<sub>1A</sub> receptors in social conflict induced analgesia in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 345, n. 3, p. 253-6, Mar 26 1998.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005.

CARVALHO-NETTO, E. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Use of the elevated T-maze to study anxiety in mice. **Behav Brain Res**, v. 148, n. 1-2, p. 119-32, Jan 5 2004.

CERVERO, F. [Neurobiology of pain]. **Rev Neurol**, v. 30, n. 6, p. 551-5, Mar 16-31 2000.

CHEN, Y. et al. Further evidence that fluoxetine interacts with a 5-HT<sub>2C</sub> receptor in glial cells. **Brain Res Bull**, v. 38, p. 153-159, 1995.

CONCEICAO, I. M. et al. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 8, p. 831-4, 1992.

CORNELIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 178, n. 1, p. 82-9, Mar 12 2007.

\_\_\_\_\_. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? **Physiol Behav**, v. 96, n. 3, p. 440-7, Mar 2 2009.

CRUZ, A. P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 1, p. 171-6, Sep 1994.

CZESAK, M. et al. Increased serotonin-1A (5-HT<sub>1A</sub>) autoreceptor expression and reduced raphe serotonin levels in deformed epidermal autoregulatory factor-1 (Deaf-1) gene knock-out mice. **J Biol Chem**, v. 287, n. 9, p. 6615-27, Feb 24 2012.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annu Rev Neurosci**, v. 15, p. 353-75, 1992.

DE BORTOLI, V. C.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H., JR. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 183, n. 4, p. 422-8, Jan 2006.

DE VRY, J. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists: recent developments and controversial issues. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 121, p. 1-26, 1995.

DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**, v. 5, n. 4, p. 305-15, Jan 1991.

FANSELOW, M. S. Shock-induced analgesia on the formalin test: effects of shock severity, naloxone, hypophysectomy, and associative variables. **Behav Neurosci**, v. 98, n. 1, p. 79-95, Feb 1984.

FELDBERG, W.; MYERS, R. D. Effects on Temperature of Amines Injected into the Cerebral Ventricles. A New Concept of Temperature Regulation. **J Physiol**, v. 173, p. 226-31, Sep 1964.

FERNANDEZ, E.; TURK, D. C. Sensory and affective components of pain: separation and synthesis. **Psychol Bull**, v. 112, n. 2, p. 205-17, Sep 1992.

FIELDS, H.L. State-dependent opioid control of pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, p. 565-575, 2004.

FOX, R. J.; SORENSON, C.A. Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. **Brain Res**, v. 648, p. 215-221, 1994.

GARCIA, A. M.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiol Behav**, v. 85, n. 3, p. 265-70, Jun 30 2005.

GOMES, K. S. et al. Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. **Brain Res Bull**, v. 78, n. 6, p. 323-7, Mar 30 2009.

GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Implication of the 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> (but not 5HT<sub>1A</sub>) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1261-9, Oct 1 2009.

GREGOIRE, S.; NEUGEBAUER, V. 5-HT<sub>2CR</sub> blockade in the amygdala conveys analgesic efficacy to SSRIs in a rat model of arthritis pain. **Mol Pain**, v. 9, n. 1, p. 41, Aug 12 2013.

HASNIE, F. S. et al. Mechanical and cold hypersensitivity in nerve-injured C57BL/6J mice is not associated with fear-avoidance- and depression-related behaviour. **Br J Anaesth**, v. 98, n. 6, p. 816-22, Jun 2007.

HEINRICHER, M. M.; TAVARES, I.; LEITH, J.; LUMB, B. M. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev**, v. 60, p. 214-225, 2009.

HELMSTETTER, F. J.; BELLGOWAN, P. S. Lesions of the amygdala block conditional hypoalgesia on the tail flick test. **Brain Res**, v. 612, n. 1-2, p. 253-7, May 28 1993.

KURT, M.; ARIK, A. C.; CELIK, S. The effects of sertraline and fluoxetine on anxiety in the elevated plus-maze test. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, v. 11, p. 173-180, 2000.

LEDOUX, J. E. Cognitive-Emotional Interactions in the Brain. **Cognition and emotion**, v. 3, n. 4, p. 267-289, 1989.

LEE, C.; RODGERS, R. J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 102, n. 4, p. 507-13, 1990.

LI, Q. H. et al. Unique expression patterns of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the rat brain during postnatal development: Western blot and immunohistochemical analyses. **J Comp Neurol**, v. 469, n. 1, p. 128-40, Jan 26 2004.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, n. 2, p. 180-5, 1987.

LU, W. L. et al. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen beta-cyclodextrin inclusion complexes in animals. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 10, p. 1515-20, Oct 2004.

MA, Q. P. et al. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. **Neurosci Lett**, v. 134, n. 1, p. 21-4, Dec 16 1991.

MANEV, H. et al. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. **Eur J Pharmacol**, v. 411, n. 1-2, p. 67-70, Jan 5 2001.

MARTINEZ, D. et al. Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5HT<sub>1A</sub> receptors by pindolol: a dose-occupancy study with [<sup>11</sup>C]WAY100635 and positron emission tomography in humans. **Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 209-229, 2001.

McGARAUGHTY, S.; FARR, D.A.; HEINRICHER, M. M. Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. **Brain Res**, v. 1009, p. 223-227, 2004.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Res**, v. 1047, n. 1, p. 97-104, Jun 14 2005.

\_\_\_\_\_. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation. **Behav Brain Res**, v. 203, n. 2, p. 180-7, Nov 5 2009.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, vol. 57, n. 1, p. 1-167, 1999.

MYERS, B.; DITTMAYER, K.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. Involvement of amygdaloid corticosterone in altered visceral and somatic sensation. **Behav Brain Res**, v. 181, n. 1, p. 163-7, Jul 19 2007.

NARITA, M. et al. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 4, p. 739-50, Apr 2006.

NEUGEBAUER, V. et al. The amygdala and persistent pain. **The Neuroscientist**, v. 10, n. 4, p. 221-234, 2004

NEUGEBAUER, V. et al. Forebrain pain mechanisms. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 226-42, Apr 2009.

NI, Y. G.; MILEDI, R. Blockage of 5HT<sub>2C</sub> serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 5, p. 2036-40, Mar 4 1997.

NICKEL, F. T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 81-91, Feb 2012.

NUNES-DE-SOUZA, R. L. et al. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 150, n. 3, p. 300-10, Jun 2000.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Res**, v. 927, n. 1, p. 87-96, Feb 8 2002.

NUNES-DE-SOUZA, V. et al. Blockade of 5-HT<sub>2</sub> receptors in the periaqueductal grey matter (PAG) abolishes the anxiolytic-like effect of 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonism in the median raphe nucleus in mice. **Behav Brain Res**, v. 225, n. 2, p. 547-53, Dec 1 2011.

NUNES-DE-SOUZA, V. et al. 5-HT<sub>2</sub> receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behav Brain Res**, v. 187, n. 1, p. 72-9, Feb 11 2008.

PALVIMAKI, E. P. et al. Differential effects of fluoxetine and citalopram treatments on serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor occupancy in rat brain. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 2, n. 2, p. 95-99, Jun 1999.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Compact 2nd. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004.

PAZOS, A.; PALACIOS, J. M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. **Brain Res**, v. 346, p. 205-230, 1985.

PEDERSEN, L. H.; NIELSEN, A. N.; BLACKBURN-MUNRO, G. Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 182, n. 4, p. 551-61, Nov 2005.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.

POMPEIANO, M.; PALACIOS, J. M.; MENGOD, G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. **J Neurosci**, v.12, p. 440-453, 1992.

RAYMOND, J.R. et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacol Ther**, v. 92, p. 179-212, 2001.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 2, p. 297-303, Oct 1995.

SACHS, B. D. et al. The effects of congenital brain serotonin deficiency on responses to chronic fluoxetine. **Transl Psychiatry**, v. 3, p. e291, 2013.

SAIRANEN, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 5, p. 1089-1094, Feb 2 2005.

SALERNO, S. M.; BROWNING, R.; JACKSON, J. L. The effect of antidepressant treatment on chronic back pain: a meta-analysis. **Arch Intern Med**, v. 162, n. 1, p. 19-24, Jan 14 2002.

SANABRIA-BOHORQUEZ, S. M. et al. Quantification of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in human brain using p-MPPF kinetic modelling and PET. **Eur J Nucl Med**, v. 29, p. 76-81, 2002.

SANTANA, N. et al. Expression of serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. **Cereb Cortex**, v. 14, p. 1100-1109, 2004.

SILVA, R. C. B., BRANDAO, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **Pharmacology biochemistry and behaviour**, v. 65, p. 209-216, 2000.

SINGH, V. P.; JAIN, N. K.; KULKARNI, S. K. On the antinociceptive effect of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor. **Brain Res**, v. 915, n. 2, p. 218-26, Oct 12 2001.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M. et al. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. **Anesthesiology**, v. 120, n. 3, p. 737-50, Mar 2014.

STRAUSS, C. V.; VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H., JR. Activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat basolateral amygdala induces both anxiolytic and antipanic-like effects. **Behav Brain Res**, v. 246, p. 103-10, Jun 1 2013.

TAVARES, L. R. R.; BAPTISTA-DE-SOUZA D.; CANTO-DE-SOUZA A. Activation of 5-HT<sub>2C</sub> (but not 5-HT<sub>1A</sub>) receptors in the amygdala enhances fear-induced antinociception: Blockade with local 5-HT<sub>2C</sub> antagonist or systemic fluoxetine. **Neuropharmacology**, v.135, p. 376-385, 2018.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, n. 4, p. 571-6, Apr 2000.

TYERS, M. B. A classification of opiate receptors that mediate antinociception in animals. **Br J Pharmacol**, v. 69, n. 3, p. 503-12, Jul 1980.

VALDEZ, M.; BURKE, T. F.; HENSLER, J. G. Selective heterologous regulation of 5HT<sub>1A</sub> receptor-stimulated 35S GTPgammaS binding in the anterior cingulate cortex as a result of 5-HT<sub>2</sub> receptor activation. **Brain Res**, v. 957, n. 1, p. 174-82, Dec 6 2002.

VANDERWENDE, C.; MARGOLIN, S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Federation Proceedings**, v. 15, 1956.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H., JR. Involvement of 5-HT<sub>2C</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. **Neuropharmacology**, v. 79, p. 127-35, Apr 2014.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H., JR. Enhanced reactivity of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 4, p. 1188-95, Mar 2007.