

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

**INFLUÊNCIA DO AMBIENTE AVERSIVO NA RESPOSTA  
NOCICEPTIVA DE RATOS: UM ESTUDO SOBRE O PAPEL DE  
RECEPTORES OPIÓIDES E CANABINÓIDES**

**ALIANDA MAIRA CORNÉLIO**

**SÃO CARLOS – SP**

**2009**

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

**INFLUÊNCIA DO AMBIENTE AVERSIVO NA RESPOSTA  
NOCICEPTIVA DE RATOS: UM ESTUDO SOBRE O PAPEL DE  
RECEPTORES OPIÓIDES E CANABINÓIDES**

**ALIANDA MAIRA CORNÉLIO**

**Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Universidade Federal de São Carlos/ Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências, Área: Ciências Fisiológicas.**

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

**SÃO CARLOS – SP**

**2009**

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

C818ia

Cornélio, Alianda Maira.

Influência do ambiente aversivo na resposta nociceptiva de ratos : um estudo sobre o papel de receptores opióides e canabinóides / Alianda Maira Cornélio. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

103 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

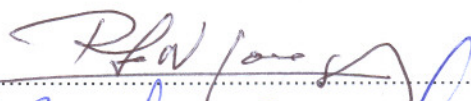
1. Neuropsicofarmacologia. 2. Labirinto em cruz elevado. 3. Ratos. 4. Estresse. 5. Analgesia. 6. Medo. I. Título.

CDD: 616.8041 (20<sup>a</sup>)

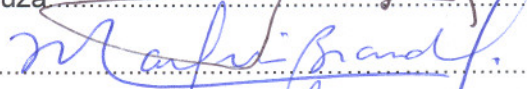
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Tese de Alianda Maira Cornélio

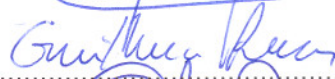
Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza



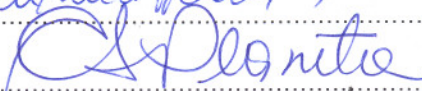
Prof. Dr. Marcus Lira Brandão



Prof. Dr. Guilherme de Araújo Lucas



Profª. Drª. Cleopatra da Silva Planeta



Profª. Drª. Leda Menescal de Oliveira



Dedico este trabalho à minha mãe, **Clélia**, meu exemplo de vida. Uma mulher guerreira que nunca se deixou abater diante das dificuldades e nunca mediu esforços para dar a melhor educação possível a suas filhas. Muito obrigada pelo incentivo e participação em todos os momentos da minha vida, sejam eles tristes ou alegres. A você, minha gratidão e amor por tudo que fez e faz por mim.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da vida, da sabedoria e por iluminar meus caminhos possibilitando um grande aprendizado humano. Espero com a graça de Deus aperfeiçoar o dom da misericórdia e amor a cada dia. Senhor fazei que meu lado humano não se sobressaia sobre estes dons, sei que só com sua força isto é possível!

Aos meus pais, **Dorival** e **Crélia**, pelo amor incondicional, pelo incentivo incansável e por compreenderem minhas ausências em ocasiões tão preciosas. Amo vocês!

À minha irmã, **Andriély**, pelo amor, pelo incentivo e por tornar a minha vida sempre mais alegre com seu jeito extrovertido de ser!

Ao **Arnóbio Júnior**, meu futuro marido, pelo amor, amizade, compreensão, incentivo incessante e por compartilhar momentos de alegrias e dificuldades encontradas durante esta caminhada. Meu amor, muito obrigada por tudo que vivemos juntos durante essa etapa da vida!

À minha **família**, pelo amor, apoio e compreensão durante essa jornada.

Ao prof. Dr. **Ricardo Luiz Nunes de Souza**, meu orientador durante o mestrado e doutorado. Obrigada pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelas valiosas horas de conversas sobre mecanismos relacionados à ansiedade e antinocicepção, pelos momentos de descontração e amizade. Muito obrigada pela orientação científica, amizade, dedicação e confiança. Tal período foi valioso em minha vida, contribuindo tanto para aprendizado pessoal quanto profissional.

Ao prof. Dr. **Michael Morgan**, pela contribuição para este trabalho e pela oportunidade de estágio no exterior. Obrigada pela receptividade tão alegre e amigável e, também, pelo estímulo à carreira de pesquisa. Essa colaboração foi de fundamental importância para minha reflexão pessoal sobre a carreira em pesquisa!

Às professoras Dra. **Christie Ramos Andrade Leite Panissi** e Dra. **Rosana Mattioli** pelas sugestões valiosas, durante o exame de qualificação, que muito contribuíram para este trabalho.

À profa. Dra. **Cleopatra da Silva Planeta**, pelas sugestões durante o exame de qualificação, apoio, carinho e amizade demonstrada ao longo destes anos.

À **banca examinadora**, pela avaliação e atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Aos professores Dr. **José Francisco Fracasso**, Dra. **Maria do Carmo Longo**, e ao pesquisador Dr. **Paulo Nogueira** pela amizade, carinho e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À profa. Dra. **Azair Liane Matos do Canto de Souza**, pela amizade, carinho, atenção e disposição em ajudar a qualquer momento.

À profa. Dra. **Susan Ingram**, pela amizade, carinho e apoio durante o desenvolvimento do estágio de doutorado no exterior.

Às técnicas do laboratório de farmacologia da FCF/UNESP, **Elisabete Z. P. Lepera e Rosana F. P. Silva**, pela alegria, amizade, prontidão e competência em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por tudo!

À **Maita Morgan** por me acolher com tanto carinho e ternura em sua casa durante a minha passagem por Vancouver.

Aos colegas e amigos do laboratório de farmacologia **Tarciso, Joyce, Eduardo, Yara, Vanessa, Karina, Fábio, Marcelo, Egberto, Rodrigo, Paulo Eduardo, Kelciane, Ana Cláudia, Juliana, Tati, Diego, Renata, Roberta, Ana Paula, Cássia, Leonardo, Liany** e a todos os outros que já passaram por este laboratório, pela amizade, colaboração e apoio essencial ao meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas e amigos do laboratório de **neurociência Erin, Adie, Tara, Cristie, Edvinas, Katie, Rachel, Michelle, Kayla, Lonnaka, Rex** pela amizade, colaboração e apoio durante todo o tempo do estágio na Universidade do Estado de Washington - WSU.

Aos amigos **Hilris e Luciano, Juliane Farinelli, Cristina Franzini, Crisitani Lopes e Ângelo, Márcia, Mara, Cristiane, Aline, Joyce, Graziela, Priscila, Gabriela, Nicole** pela amizade, conselhos e conversas nos momentos difíceis e pelos vários momentos agradáveis de convivência.

Aos amigos da pós-graduação **Lilia, Patrícia, Daniela, Graziela, André, Lidiane, Wagner Mariano, Charles, Valéria e a todos os outros** pela amizade e colaboração.

Ao secretário **Alexandre**, pela competência profissional na secretaria do PPG-CF.

À **Tirene**, pela disponibilidade, amizade e competência profissional inquestionável nos serviços prestados na secretaria do PANT.

Aos **funcionários da biblioteca, portaria, biotério, seção de transportes e seção de apoio** da FCFar/UNESP pela disponibilidade e apoio.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq – processos nº 141190/2006-0; 200639/2008-0) pelo apoio financeiro.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**, pertencente ao convênio da Universidade Federal de São Carlos e da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

À **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP** de Araraquara pelo espaço físico laboratorial, equipamentos e materiais fornecidos para realização desse trabalho.

À **Universidade do Estado de Washington** em Vancouver, WA, EUA, pelo espaço físico laboratorial, materiais fornecidos e suporte técnico para a realização de parte do presente trabalho.



Ao **Laboratório de Comportamento Exploratório da USP de Ribeirão Preto** por ceder-nos o programa de análise de comportamento X-Plorat e assessorar-nos tecnicamente quanto ao seu uso.

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

## RESUMO

Em situações ameaçadoras de natureza inata ou aprendida, animais exibem um conjunto de comportamentos defensivos espécie-específicos, tais como alterações autonômicas, fuga, luta e antinocicepção. A exposição de camundongos ao labirinto em cruz elevado aberto (LCEa: quatro braços abertos), uma situação aversiva, induz antinocicepção de alta magnitude. Todavia, os mecanismos envolvidos em tal antinocicepção ainda não estão elucidados. O presente estudo investigou se a antinocicepção induzida por exposição ao LCEa: mostra tolerância cruzada a morfina (experimentos I e II); é atenuada por exposição repetida ao LCEa (experimento III); é revertida por tratamento sistêmico com naltrexona (experimento IV); é impedida por adrenalectomia (experimento V); persiste após remoção do animal do LCEa e se há diferenças relacionadas ao sexo neste fator (experimento VI); é mediada pelo receptor canabinoide, CB1 (experimento VII). Ratos foram diariamente tratados com morfina (M, 5 mg/Kg, i.p.) ou água destilada (AD) por 5 dias consecutivos (tolerância antinociceptiva avaliada pelo teste de retirada da cauda). No dia seguinte, os ratos receberam injeção de formalina 2,5% (50 $\mu$ L) na pata traseira direita e, após a primeira fase do teste de formalina, foram tratados com M ou AD. Vinte e cinco minutos após injeção de formalina na pata, o tempo de lambidas na pata foi registrado por 10 minutos (experimento I). Procedimento semelhante foi utilizado no experimento II, exceto que o tempo de lambidas na pata foi registrado durante exposição ao LCEa ou LCE fechado (LCEf: quatro braços fechados). No experimento III, nocicepção foi avaliada em ratos submetidos a 1, 2, 3, 4 ou 6 exposições ao LCEf ou LCEa (formalina injetada somente durante a última exposição). O experimento IV investigou os efeitos de naltrexona (2,5 mg/kg; s.c.) sobre a nocicepção durante exposição ao LCEf ou LCEa. A nocicepção também foi avaliada durante exposição ao LCEf ou LCEa em ratos sham operados e adrenalectomizados (experimento V). No experimento VII, os ratos foram tratados com veículo (DMSO 60%) ou AM251 (1 mg/kg, i.p., antagonista CB1). Quinze minutos após, os animais receberam formalina na pata e, após 25 minutos, foram expostos ao LCEf ou LCEa. Já no experimento VI, ratos machos e fêmeas foram expostos ao LCEf ou LCEa, sem nenhum estímulo nociceptivo aplicado durante exposição e, imediatamente após, foram testados no teste da placa quente (52,4 °C). Os resultados mostraram que a antinocicepção induzida pelo LCEa não exhibe tolerância cruzada a morfina; não foi alterada por ao menos 6 exposições ao labirinto; mostrou-se insensível à naltrexona; não foi impedida por adrenalectomia e não foi bloqueada por AM251. Ainda, tal

antinocicepção não perdura após remoção dos animais do aparelho, pelo contrário, ocorre uma hiperalgesia (conforme avaliado pelo teste de placa quente), uma resposta que independe de diferenças relacionadas ao sexo. Os resultados sugerem que a antinocicepção induzida pelo LCEa: não é mediada por sistema opióide ou receptores canabinóides CB1 e não é sensível a corticosterona. Além disso, a retirada dos animais do ambiente aversivo altera a resposta nociceptiva de antinocicepção para hiperalgesia, um fenômeno que independe do gênero.

**Palavras-chave:** Antinocicepção induzida pelo medo. Opióides. Canabinóides. Labirinto em cruz elevado. Hiperalgesia. Teste de formalina. Teste de retirada da cauda. Teste da placa quente.

## ABSTRACT

In innate or learned threatening situations, animals display a set of defensive behaviors specie-specific such as autonomic alterations, flight, fight and antinociception. Exposure of mice to open elevated plus-maze (oEPM: four open arms), an aversive situation, elicits antinociception of high magnitude. However, mechanisms involved in this kind of antinociception are not clear yet. This study investigated whether antinociception induced by exposure to an oEPM shows cross-tolerance with morphine (Exp. I and II); is attenuated by repeated exposure to the oEPM (Exp. III); is blocked by systemic treatment with naltrexone (Exp. IV); is prevented by adrenalectomy (Exp. V); persists after animal removal from the oEPM and if there are sex-related differences in this factor (Exp. VI); is mediated by CB1 cannabinoid receptor (Exp. VII). Rats were daily treated with morphine (M, 5 mg/kg, i.p.) or distilled water (DW) for 5 consecutive days (antinociceptive tolerance assessed by the tail-flick test). Next day, rats received formalin 2.5% injection (50  $\mu$ L) into the right hind paw and, after first phase of formalin test, they were treated with M or DW. 25 minutes after formalin injection into the paw, time spent licking the injected paw was recorded for 10 minutes (Exp. 1). Similar procedure was followed in the Experiment II, except that time spent licking the paw was recorded during exposure to the oEPM or enclosed EPM (eEPM: four arms enclosed) in undrugged rats. In Experiment III, nociception was evaluated in rats submitted to 1, 2, 3, 4 or 6 exposures to either eEPM or oEPM (formalin was injected only during the last exposure). Experiment IV investigated the effects of naltrexone (0 and 2.5 mg/kg; s.c.) on nociception during eEPM or oEPM exposure. Nociception was also assessed during the eEPM or oEPM exposure in sham and adrenalectomized rats (exp. V). In experiment VII, rats were treated with vehicle (DMSO 60%) or AM251 (1 mg/kg, i.p., CB1 receptor antagonist). Fifteen minutes later, animals received formalin injection into the paw and, 25 minutes after, they were exposed to the eEPM or oEPM. In experiment VI, male and female rats were exposed to eEPM or oEPM (with no noxious stimulus during exposure) and immediately after they were tested on the hot plate test (52.4 °C). Results showed that antinociception induced by oEPM does not display cross-tolerance to morphine; was not altered for at least 6 exposures to the maze; failed to be reversed by naltrexone; was not prevented by adrenalectomy and was not blocked by AM251. In addition, this antinociception does not persist after animal removal of the apparatus, by contrast, it occurs a hyperalgesia (as

assessed by hot plate test), a response that does not depend on sex-related differences. Results suggest that antinociception induced by oEPM: is not mediated by opioid system or CB1 cannabinoid receptors and it is not sensitive to corticosterone. Furthermore, animal removal of aversive environment alters nociceptive response from antinociception to hyperalgesia, a phenomenon that is independent of the gender.

**Key-words:** Fear-induced antinociception. Opioid. Cannabinoid. Elevated plus maze. Hyperalgesia. Formalin test. Tail flick test. Hot plate test.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Arena. 36
- Figura 2:** Labirinto em cruz elevado fechado (LCEf), esquerda acima; Labirinto em cruz elevado aberto (LCEa), direita acima e centro abaixo. 37
- Figura 3:** Teste de retirada da cauda (tail-flick test). 38
- Figura 4:** Índice de analgesia (IA) avaliado com o teste de retirada em ratos tratados com morfina (○; 5mg/kg) ou água destilada (●) uma vez ao dia por 5 dias consecutivos. Latências de retirada da cauda foram medidas 20 minutos após tratamento. Pontos: Média ± Erro Padrão da Média (EPM) (n=19-26). \*  $p < 0,05$  vs AD, #  $p < 0,05$  vs Morfina administrada no dia 1. 43
- Figura 5:** (A) Tempo de lambidas na pata traseira direita durante a primeira fase do teste de formalina em ratos tratados com água destilada (AD) ou morfina (M) diariamente por 5 dias consecutivos (n= 19-26). (B) Após a primeira fase do teste de formalina, os animais foram tratados com AD ou M novamente e 20 minutos após, o tempo de lambidas na pata foi registrado por 10 minutos (segunda fase do teste de formalina, 9-14) na arena. Barras: Média ± EPM. #  $p < 0,01$  vs AD.\*  $p < 0,05$  vs AD/ AD, M/AD, M/M. 44
- Figura 6:** Índice de analgesia (IA) avaliado com o teste de retirada em ratos previamente tratados com morfina (○; 5mg/kg) ou água destilada (●) uma vez ao dia por 5 dias consecutivos. Latências de retirada da cauda foram medidas 20 minutos após tratamento. Pontos: Média ± Erro Padrão da Média (EPM). \*  $p < 0,05$  vs Água Destilada, #  $p < 0,05$  vs Morfina Dia 1. 45
- Figura 7:** Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase (A, n= 21) e segunda fase (B, n=10-11) do teste de formalina em rats previamente tratados com água destilada (AD) ou morfina (M) diariamente por 5 dias consecutivos. Somente a segunda fase do teste nociceptivo foi registrado durante exposição ao LCEf ou LCEa. Barras: Média ± EPM. #  $p < 0,01$  vs AD. \*  $p < 0,01$  vs AD/ LCEf, M/ LCEf, M/ LCEa. 47
- Figura 8:** Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase (A) e segunda fase (B) do teste de formalina em ratos expostos 1, 2, 3, 4 ou 6 vezes ao LCEf ou LCEa. Os animais foram expostos ao LCEf ou LCEa somente durante a segunda fase do teste de nocicepção(n= 7-10). Barras: Média ± EPM. 50

- Figura 9:** Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase (A, n=15) e segunda fase (B, n= 6-9) do teste de formalina em ratos previamente tratados com salina ou naltrexona e expostos ao LCEf e LCEa. Animais foram expostos ao LCEf ou LCEa somente durante a segunda fase do teste de nociceção. Barras: Média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,01$  vs Salina. 53
- Figura 10:** Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase (A, n=16-17) e segunda fase (B, n=8-9) do teste de formalina em ratos sham operados (controle) e ratos adrenalectomizados (ADX) expostos ao LCEf e LCEa. Animais foram expostos ao LCEf ou LCEa somente durante a segunda fase do teste de nociceção. Barras: Média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs sham/ LCEf. 56
- Figura 11:** Teste da placa quente (hot plate test). 59
- Figura 12:** Latência de lambida na pata (s) traseira de ratos machos e fêmeas testados no teste de placa quente (52,4 °C) imediatamente após a exposição ao LCEf ou LCEa (n= 9-8). \*  $p < 0,05$  vs gaiola moradia. 62
- Figura 13:** Latência de lambida na pata (s) traseira de ratos machos e fêmeas testados no teste de placa quente (52,4 °C) imediatamente após a exposição ao LCEf ou LCEa (n= 9-7). \*  $p < 0,05$  vs gaiola moradia. 63
- Figura 14:** Tempo de lambidas na pata traseira de ratos machos previamente tratados com DSMO ou AM251 e submetidos ao teste de formalina. (A) Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase do teste de formalina (n=14/ grupo). (B) Tempo de lambidas na segunda fase do teste de formalina em ratos expostos ao LCEf ou LCEa (n=7/grupo). 64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos subtipos de receptores opióides e suas ações em modelos animais	26
<b>Tabela 2:</b> Distribuição dos grupos de animais para a avaliação dos comportamentos de tolerância e nocicepção (teste de formalina)	39
<b>Tabela 3:</b> Comportamentos Espaço- Temporais Analisados durante Exposição por 10 minutos ao LCEf ou LCEa	48
<b>Tabela 4:</b> Comportamentos analisados em ratos que foram tratados com formalina e expostos por 10 minutos ao LCEf ou LCEa	51
<b>Tabela 5:</b> Comportamentos Espaço- Temporais Analisados durante Exposição por 10 minutos ao LCEf ou LCEa	54
<b>Tabela 6:</b> Comportamentos Espaço - Temporais Analisados durante Exposição ao LCEf ou LCEa, por 10 minutos	57



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>1.1 Reações de Defesa</b>	15
<b>1.2 Dor</b>	17
<b>1.2.1 Conceito</b>	17
<b>1.2.2 Neurofisiologia da Nocicepção</b>	18
<b>1.2.3 Modulação descendente</b>	22
<b>1.3 Opióides</b>	24
<b>1.4 Canabinóides</b>	28
<b>1.5 Antinocicepção induzida por estímulos ambientais aversivos</b>	29
<b>2. OBJETIVOS</b>	34
<b>3. ETAPAI: MODULAÇÃO OPIÓIDE DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO LCEa</b>	35
<b>3.1 Material e métodos</b>	35
<b>3.2 Análise dos resultados</b>	41
<b>3.3 Resultados</b>	42
<b>4. ETAPA II: INFLUÊNCIA DO ESTÍMULO AVERSIVO (LCEa) E DAS DIFERENÇAS RELACIONADAS AO SEXO NA DURAÇÃO DA ANTINOCICEPÇÃO E ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS CANABINÓIDES NA SUA MODULAÇÃO</b>	58
<b>4.1 Material e métodos</b>	58
<b>4.2 Análise dos resultados</b>	60
<b>4.3 Resultados</b>	61
<b>5. DISCUSSÃO</b>	65
<b>5.1 Etapa I</b>	65
<b>5.2 Etapa II</b>	74
<b>6. CONCLUSÕES</b>	79
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	80
<b>8. APÊNDICE</b>	95

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Reações de Defesa

Os estudos de processos emocionais tais como ansiedade e medo ganharam maior atenção a partir dos trabalhos de Charles Darwin publicados no livro *The Expression of Emotions in Man and Animals* 1872 (DARWIN, 1872 *apud* ZANGROSSI JÚNIOR; GRAEFF, 2004)<sup>1</sup>. A partir desta abordagem, o homem, possuindo outros animais como ancestrais, compartilharia com estes suas emoções básicas. Desta forma, na mente humana estaria embutida a herança de seu passado primitivo, permitindo que comparações entre o seu comportamento e o de outros animais pudessem ser realizadas.

Conforme esta teoria, as raízes da ansiedade e do medo estão nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem estar ou à integridade física das diferentes espécies. Considerando-se as variações intra e interespecíficas, o perigo ou ameaça para os animais podem ser representados por predadores ou estímulos associados a estes, por estímulos ambientais (altura, espaços abertos e iluminação), por alterações no ambiente natural dos animais (tempestades, incêndios, exposição a lugares novos), por estímulos nociceptivos (choques elétricos), ou pelo ataque ou confronto com animais da mesma espécie. Diante desses estímulos, os animais procuram responder com estratégias comportamentais básicas tais como: fuga, imobilização, ataque defensivo e submissão (ZANGROSSI JÚNIOR; GRAEFF, 2004). Nesse sentido quando estímulos aversivos são associados a eventos dolorosos, os animais respondem com comportamentos defensivos e inibição de dor (BOLLES; FANSELOW, 1980).

A escolha de uma estratégia comportamental adequada considera vários fatores, como as características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador, experiência prévia com o estímulo ou ambiente e a posição do indivíduo na hierarquia social de seu grupo. Desta forma, os transtornos de ansiedade reconhecidos na clínica teriam etiologia em alterações nos sistemas cerebrais que controlam essas reações de defesa (ZANGROSSI JÚNIOR; GRAEFF, 2004).

Neste sentido, Robert e Caroline Blanchard, investigando as respostas defensivas comportamentais de roedores (ratos e camundongos) em confronto com

---

<sup>1</sup> DARWIN, C. R. *The expression of emotions in man and animals*. London: John Murray, 1872.

predadores (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988; BLANCHARD et al., 1997), classificaram as estratégias comportamentais exibidas de acordo com o nível de ameaça ao qual os roedores são submetidos, se potencial ou real (se real, distal ou proximal). No primeiro nível de ameaça (potencial), as estratégias mais observadas foram comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, utilizando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. Estes comportamentos de avaliação de risco geralmente são observados mediante estímulos parciais associados a predadores, tais como objetos impregnados com o odor do predador, ou na retomada da exploração de ambientes em que a presença do predador fora detectada em situação anterior. Já no segundo nível de defesa, foram observadas fuga ou imobilidade (estímulo distal). Em situações onde há uma rota de fuga no ambiente de encontro com o predador, o animal tenta preferencialmente escapar da situação de perigo. Todavia, o animal apresenta a tendência a se manter imóvel, em congelamento, em situações onde a fuga não é viável e/ou o predador mantenha certa distância. Em casos onde o predador está muito próximo ou em contato direto com o animal os comportamentos observados foram fuga ou luta defensiva.

Na tentativa de distinção entre comportamentos relacionados a ansiedade e medo, tem sido sugerido que quando o estímulo ou a situação ameaçadora é real, os comportamentos desencadeados (fuga e luta) representariam medo, enquanto os que representam ansiedade (avaliação de risco) seriam desencadeados por estímulos ou situações apenas potencialmente ameaçadoras (BLANCHARD et al., 1993). Gray & McNaughton (2000) adicionaram a essa análise etoexperimental componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de recompensa (frustração) como eliciadores de ansiedade. Tais autores também enfatizam a importância da existência de conflitos esquiva-aproximação e da direção da resposta para a distinção entre medo e ansiedade. Desta forma, quando a situação permite aproximação ao estímulo aversivo, caracterizando um conflito entre aproximação e evitação, os comportamentos observados (inibição comportamental e avaliação de risco) estariam relacionados à ansiedade. Entretanto, quando a situação permite somente as estratégias de defesa tais como esquiva ativa e fuga, os comportamentos estariam relacionados com o medo.

Assim, é importante salientar que os mecanismos neurobiológicos envolvidos na modulação das respostas comportamentais de defesa que os animais (principalmente roedores) exibem frente a estímulos ameaçadores tais como a antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade ainda não estão completamente desvendados. Para isso, são necessários

estudos envolvendo a inter-relação ansiedade/medo x antinocicepção.

## 1.2 Dor

### 1.2.1 Conceito

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da dor (IASP, *International Association for the Study of Pain*, 2007), dor é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Ainda, a incapacidade para comunicação verbal não exclui a possibilidade de que um indivíduo está experienciando dor e está necessitando tratamento.

Esta definição de dor evita relacionar dor ao estímulo, pois a indução de atividade nos nociceptores e em vias nociceptivas por um estímulo nocivo não se configura necessariamente em dor, que é também um estado psicológico frequentemente associado a uma causa física adjacente (IASP, 2007). Neste sentido, a dor possui dois componentes: o componente perceptivo-discriminativo e o componente aversivo-cognitivo-motivacional (também denominado reacional). O componente perceptivo-discriminativo permite identificar o estímulo como doloroso e localizar a região do corpo em que a lesão ocorreu, enquanto o componente reacional inclui grande variedade de comportamentos, desde a simples retirada reflexa do segmento lesado até complexas respostas emocionais que, além de comportamento inato de cada espécie, envolvem aprendizagem e memória. Entretanto, há exemplos de dor sem lesão aparente, como a dor lombar crônica, ou exemplos de lesão sem dor, como os casos de analgesia congênita em que o indivíduo não sente dor, mesmo frente a estímulos reconhecidamente lesivos. Estes são exemplos da importância da dor para o alerta do indivíduo a estímulos lesivos, pois os portadores de analgesia congênita morrem precocemente de doenças ou traumas em que a dor é o principal sintoma (BRANDÃO, 2004; PRADO, 2005).

Neste contexto, a dor provocada por estímulo lesivo tem a função de ativar os circuitos neurais responsáveis pelos comportamentos de defesa dos organismos de maneira a lhes preservar a vida, evitando o contato com os estímulos que lhes possam causar dano ou injúria tissular (BRANDÃO, 2004). Entretanto, em alguns casos, a dor perdura por tempo excessivamente longo e passa a desencadear sofrimento desnecessário, muitas vezes prejudicial ao organismo. O primeiro caso corresponde à dor aguda, e o segundo, à dor crônica. Neste caso a dor crônica indica doença (dor patológica) e não tem o caráter protetor

da dor aguda (dor fisiológica) (PRADO, 2005). Na dor aguda, há etiologia e curso temporal bem definidos, e a dor desaparece com a cura da injúria. Já para o diagnóstico de dor crônica, é necessário que haja pelo menos seis meses de preocupação com a dor e a inexistência de uma patologia orgânica responsável pela dor nesse período. A dor crônica pode ocorrer como consequência de doenças estruturais ou funcionais da maioria dos órgãos do corpo (embora as doenças não existam mais) ou na ausência de detecção de qualquer injúria neuronal perceptível (BRANDÃO, 2004).

Ainda, no que diz respeito a diferenças entre a dor aguda e crônica, ambas possuem os componentes fásico e tônico. O componente fásico é caracterizado pelo rápido início da dor, ao passo que o componente tônico compreende a fase insidiosa, persistente. O componente tônico tem a função de propiciar o repouso, cuidados e proteção da área lesada a fim de promover a cura. Todavia, em casos de dor crônica, o componente tônico pode persistir mesmo após ter ocorrido a cura da injúria (BRANDÃO, 2004).

### **1.2.2 Neurofisiologia da Nociceção**

Uma das principais funções do sistema nervoso é fornecer informação ao organismo sobre a ocorrência ou ameaça de lesão. Fibras sensoriais especializadas sozinhas ou em conjunto com outras fibras fornecem informação ao sistema nervoso central sobre o ambiente e também sobre o estado do organismo por si só (MEYER et al., 2006). No caso de informações nociceptivas, a informação é veiculada através de um sistema sensorial específico. Para isso, há receptores e vias aferentes da dor específicos para todos os estímulos capazes de ultrapassar os limites fisiológicos e provocar lesão do organismo (LENT, 2001). Desta forma, a informação dolorosa é detectada por receptores morfolologicamente diferenciados localizados nas terminações das fibras nervosas (nociceptores).

Os nociceptores estão amplamente distribuídos na pele, mucosas, vísceras, músculos, periósteo e articulações (PRADO, 2005; CALVINO; GRILO, 2006). Dentre as várias modalidades de receptores sensoriais, os nociceptores são diferenciados devido ao fato de que eles respondem a múltiplas formas de energia que produzem lesão (tais como estímulos mecânicos, térmicos e químicos) e fornecem informação ao sistema nervoso central considerando a localização e intensidade do estímulo nocivo (MEYER et al., 2006).

A lesão ou irritação na pele ou em tecidos subcutâneos como articulações e músculos resulta na liberação de vários mediadores químicos no ambiente tecidual tais como bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanas,

fator ativador de plaqueta, adenosina, trifosfato de adenosina (ATP), prótons e radicais livres. Citocinas, tais como interleucinas (ILs) e fator de necrose tumoral (TNF), neurotrofinas, especialmente o fator de crescimento neural (NGF), são também gerados durante a inflamação. Algumas destas substâncias medeiam ou facilitam o processo inflamatório através da ativação direta de nociceptores, enquanto outras agem indiretamente via células inflamatórias que liberam agentes algogênicos. Outros mediadores levam a uma sensibilização da resposta do nociceptor a estímulos naturais e, assim, exercem um papel na hiperalgesia primária (MEYER et al., 2006).

Os nociceptores são porções terminais dos axônios de neurônios sensoriais cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios sensitivos espinhais ou do nervo trigêmio (BRANDÃO, 2004). A estimulação periférica de natureza e intensidade suficiente ativa os nociceptores e, então, são gerados potenciais de ação que percorrem toda extensão do neurônio aferente primário. Esses neurônios, denominados neurônios aferentes primários ou neurônios de primeira ordem, além do ramo periférico, possuem um ramo central, que adentra o corno dorsal da medula espinhal (pela raiz dorsal) ou o tronco encefálico (PRADO, 2005).

As fibras do neurônio de primeira ordem variam quanto ao grau de mielinização e à velocidade de condução de estímulos. São reconhecidas as fibras A-delta (A $\delta$ ) mielinizadas, de maior calibre (2-6 $\mu$ m de diâmetro), responsáveis pela condução rápida de sinais nociceptivos (12-30m/s) e as fibras C que são amielínicas, de menor calibre (0,4-1,2 $\mu$ m de diâmetro) e responsáveis pela condução lenta da dor (0,5-2m/s) (PRADO, 2005; MILLAN, 1999). Cerca de 60 a 70 % das fibras aferentes sensoriais são do tipo C. A ativação da fibra A $\delta$  provoca uma sensação de dor cortante e bem localizada, enquanto a ativação de fibras C promove uma sensação de dor em queimação, mais intensa e sem localização precisa (LE BARS et al, 2001).

No corno dorsal da medula espinhal, os neurônios de primeira ordem estabelecem sinapses com neurônios de segunda ordem. Este é o local da primeira sinapse para as vias ascendentes que transmitem a informação sensorial nociva ao cérebro que, por sua vez, processa a percepção consciente de dor (TODD; KOERBER, 2006). Rexed (1952) dividiu a matéria cinzenta da medula espinhal do gato em dez lâminas paralelas (REXED, 1952 *apud* MILLAN, 1999)<sup>2</sup>, tal divisão foi definida de acordo com diferenças no tamanho e densidade de vesículas de neurônios. O uso deste esquema tem sido extensivo à organização

---

<sup>2</sup> REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 96, 415-466, 1952.

anatômica da medula espinhal em várias outras espécies tais como humanos, macacos e ratos (TODD; KOERBER, 2006). O corno dorsal da medula espinhal compreende as lâminas I (lâmina marginal) e II (substância gelatinosa), III e IV (núcleo próprio), V e VI (lâminas profundas). A lâmina VII corresponde à matéria cinzenta intermediária, as lâminas VIII e IX compreendem o corno ventral medial e lateral, respectivamente, enquanto a lâmina X é a região que circunda o canal central da medula espinhal. As duas lâminas superficiais I e II juntamente com as lâminas profundas, V e VI, e a lâmina X constituem as regiões implicadas na recepção, processamento e transmissão da informação nociceptiva (MILLAN, 1999). As fibras C não mielinizadas e algumas fibras A $\delta$  mielinizadas terminam nas camadas mais superficiais do corno dorsal (I e II) enquanto outras fibras A projetam para a lâmina V (RANG, 2007). Os neurônios situados nas lâminas I e II respondem principalmente aos estímulos nocivos, ao passo que os neurônios da lâmina V (mais profundos) respondem a estímulos nocivos e várias outras formas de estímulos não nocivos, sendo chamados de neurônios polimodais. Pelo fato destas células nervosas receberem grande influxo sensorial, são também chamadas de neurônios convergentes ou de ampla faixa espectral (BRANDÃO, 2004).

No corno dorsal da medula espinhal, a passagem de impulsos nociceptivos do aferente primário para o neurônio de segunda ordem ocorre através da liberação local de diversas substâncias envolvidas na transmissão central e modulação da informação nociceptiva. Entre estas, estão o glutamato e outros aminoácidos excitatórios; neuropeptídeos, tais como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP); a fonte de energia celular universal, o ATP; o gás difusível, óxido nítrico; os metabólitos de fosfolípedes, prostaglandinas e neurotrofinas (PRADO, 2005; MILLAN, 1999).

Após sinapse no corno dorsal da medula espinhal, os axônios das células de segunda ordem transpõem a linha média para chegar ao fascículo espinhal ventrolateral (anterolateral no humano) contralateral. Todavia, alguns axônios passam pelo fascículo ventrolateral ipsilateral (PRADO, 2005). De um ponto de vista neuroanatômico, dois tipos de vias ascendentes podem ser reconhecidas: vias monossinápticas e polissinápticas. As vias monossinápticas projetam diretamente para estruturas encefálicas superiores e compreendem os tratos espinotalâmico, espinomesencefálico, espinoparabraquial, espino-hipotalâmico e o espinorreticular. Uma parte do trato espinorreticular projeta para a formação reticular lateral, um núcleo pré-cerebelar envolvido no controle motor. A outra porção desse trato projeta para a formação reticular pontinobulbar medial e de lá para circuitos tálamo-corticais. A via espinomesencefálica possui um trato espino-anular que se projeta para a matéria cinzenta

periaquedutal (MCP) e o trato espino-tectal que se dirige principalmente para as camadas profundas do colículo superior. O principal alvo do trato espinomesencefálico é o núcleo parabraquial da ponte, uma região importante na integração das respostas cardiovasculares, autonômicas e motivacionais à dor. Outras duas vias específicas que se projetam para o núcleo parabraquial são as vias espinoparabraquio-hipotalâmica e espinoparabraquio-amidalóide, respectivamente, conforme as projeções subseqüentes das duas subpopulações de neurônios do núcleo parabraquial. O núcleo parabraquial pode, desta forma, ser acessado por várias vias ascendentes. Além disso, neurônios individuais no núcleo parabraquial podem prover axônios a ambos os locais tálamo e medula espinhal destacando seu papel integrativo na transmissão sensorial. A amígdala, globo pálido/ putâmen (estriado nos ratos e núcleo lenticular no homem), núcleo acumbens e septo, assim como os córtices frontal, orbital (cingulado) e córtex infralímbico também podem ser diretamente acessados por neurônios nociceptivos espinhais. Certas alvos límbicos de informação nociceptiva ascendente estão interligados com o hipotálamo e têm sido denominados como uma projeção espinotelencefálica: esta parece representar uma extensão rostral e bilateral do trato espino-hipotalâmico. Além disso, outros colaterais do trato espino-hipotalâmico projetam para o tálamo e também inervam o bulbo e a ponte situados no tronco encefálico, locais onde se originam vias modulatórias descendentes da dor (MILLAN, 1999).

As vias polissinápticas possuem uma estação relé de neurônios de segunda ordem no trajeto para os centros superiores. As duas rotas polissinápticas mais importantes são o trato espinocervical, que projeta para o núcleo cervical lateral no nível C1-C3, e a via da coluna dorsal pós-sináptica (ou sistema lemniscal), que projeta para os núcleos cuneiforme (dos segmentos torácico e cervical) e grácil (dos segmentos lombo-sacrais), núcleos da coluna dorsal do bulbo caudal. Os núcleos da coluna dorsal do bulbo caudal também recebem uma projeção ascendente direta de fibras aferentes primárias conduzindo informação proprioceptiva e geralmente inócua. Do núcleo cervical lateral, a informação nociceptiva é carregada através do trato cervicotalâmico para vários núcleos talâmicos (abrangendo os grupos de núcleos ventroposterior e posterior) e também é carregada pelo trato cervicomesencefálico até o mesencéfalo (incluindo a MCP e o colículo superior). Quanto aos núcleos da coluna dorsal do bulbo caudal, neurônios eferentes projetam via o lemnisco medial para os grupos de núcleos ventroposterior e posterior do tálamo e para o colículos superior, enquanto poucas fibras descendem para a medula espinhal. Do tálamo a informação nociceptiva é carregada para a área somatossensorial primária (SI) do giro pós-central, área somatossensorial secundária (SII), regiões do córtex parietal inferior e anterior, córtex insular,



córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal medial. Desta forma, existe um padrão complexo e interativo de inervação múltipla direta e indireta do tálamo, mesencéfalo, sistema límbico, córtex, formação reticular e várias outras estruturas encefálicas através de múltiplas vias ascendentes. Estas regiões supraespinhais são interligadas e também interagem com mecanismos de modulação descendente carregada para o corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 1999).

### 1.2.3 Modulação descendente

A existência de um sistema modulatório de dor específico somente foi articulado em 1965 por Melzack e Wall na teoria do controle da comporta de dor (MELZACK; WALL, 1965). Influências supra-espinhais sobre a comporta foram sugeridas, mas, no início dos anos 60, havia poucas evidências para o controle descendente de nocicepção. Logo depois, Wall (1967 *apud* FIELDS et al., 2006)<sup>3</sup> mostrou que estruturas no tronco encefálico tonicamente inibem neurônios nociceptivos na medula espinhal.

A matéria cinzenta periaquedutal (MCP) foi a primeira estrutura a ser relacionada à modulação da dor (REYNOLDS, 1969; MAYER et al. 1971). Durante estimulação desta estrutura, os animais permanecem alerta e ativos, entretanto, as respostas a estímulos nocivos, incluindo orientação, vocalização e fuga, não estão presentes. Desta forma, tal analgesia é altamente seletiva e robusta (FIELDS et al., 2006).

Pesquisas subsequentes demonstraram que a MCP faz parte de um circuito do sistema nervoso central que modula transmissão nociceptiva em nível medular. Em animais, estimulação da MCP inibe reflexos provocados por estímulo nocivo, tais como retirada da cauda ou retirada da pata. Além disso, neurônios nociceptivos na medula espinhal são seletivamente inibidos por estimulação da MCP, e lesões do funículo dorsolateral da medula espinhal revertem a inibição causada por estimulação desta estrutura sobre neurônios do corno dorsal nociceptivos e respostas reflexas a estímulos nociceptivos.

A MCP integra aferências do prosencéfalo límbico e diencéfalo com aferências nociceptivas ascendentes do corno dorsal (BANDLER; KEAY, 1996). Há projeções diretas para a MCP de várias áreas prefrontais mediais, dentre elas está o cingulado anterior e o córtex insular.

---

<sup>3</sup> WALL, P.D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **Journal of Physiology**, v. 188, 403-423, 1967.

A amígdala, que recebe entrada massiva de ambos o hipocampo e neocórtex, é outra grande fonte de aferentes para a MCP. A antinocicepção resultante da microinjeção de agonistas opióides na amígdala é bloqueada por inativação com lidocaína, ou injeção de antagonista opióide na MCP (HELMSTETTER et al., 1998; PAVLOVIC et al., 1996). O núcleo basolateral da amígdala recebe considerável aferência cortical. Este núcleo envia projeções para o núcleo central da amígdala que, por sua vez, envia um número considerável de projeções para a MCP (RIZVI et al., 1991). O núcleo central da amígdala também recebe entrada nociceptiva diretamente da medula espinhal e indiretamente via uma extensa projeção da lâmina I do corno dorsal para o núcleo parabraqiual (GAURIAU E BERNARD, 2002).

Outra estrutura relacionada à modulação da dor é o núcleo accumbens, que está localizado no estriado ventromedial (GEAR et al., 1999). Este núcleo recebe uma projeção maior da amígdala basolateral e não tem projeção direta para a MCP, ele projeta para o hipotálamo lateral e para a amígdala, que por sua vez, envia projeções para a MCP (ZAHM et al., 1999).

Outra grande fonte diencefálica de aferentes para a MCP é o hipotálamo (BANDLER; KEAY, 1996). Tem sido demonstrado que a estimulação elétrica ou microinjeção opióide em algumas regiões do hipotálamo produz antinocicepção (HOLDEN et al., 2002; MANNING et al., 1994; RHODES; LIEBESKIND, 1978).

As maiores entradas do tronco cerebral para a MCP provém do núcleo cuneiforme, a formação reticular pontobulbar, o locus coeruleus e outros núcleos catecolaminérgicos do tronco encefálico (BEITZ, 1982; HERBERT; SAPER, 1992). A MCP também é reciprocamente conectada com o bulbo ventromedial rostral (BVR).

O BVR compreende o núcleo magno da rafe na linha média e a formação reticular adjacente que se situa ventralmente ao núcleo reticular gigantocelular. Estimulação elétrica ou microinjeção de aminoácidos excitatórios no BVR produz analgesia e inibe respostas neuronais do corno dorsal ao estímulo nocivo (FIELDS et al., 1991). A MCP e o núcleo cuneiforme adjacente são as maiores fontes de entradas para o BVR. O BVR também recebe considerável projeção direta da região pré-óptica medial (RIZVI et al., 1996) aferência cortical proveniente dos córtices límbico e pré-límbico, incluindo a ínsula anterior (HERMANN et al., 1997). Projeções espinhais diretas para o BVR são esparsas, mas o BVR recebe informação espinhal provavelmente via MCP e núcleo cuneiforme ou através do núcleo bulbar adjacente, o núcleo reticular gigantocelular, que recebe projeção direta dos neurônios espino-reticulares nociceptivos e envia um número de projeções consideráveis para

o BVR. O BVR também recebe entrada noradrenérgica dos grupos celulares A5 e A7 da ponte dorsolateral (SAGEN; PROUDFIT, 1981).

O circuito MCP-BRV é crítico para a modulação da nocicepção. A ação modulatória da dor pela MCP sobre a medula espinhal é enviada quase exclusivamente através do BVR (FIELDS et al., 2006).

Todavia as vias descendentes de modulação da dor não exercem somente ação inibitória sobre o corno dorsal (MILLAN, 1999). Estudos funcionais mostram nitidamente que o sistema modulatório do tronco encefálico exerce controle bidirecional e que facilitação da dor é parte considerável de sua função (HEINRICHER et al., 2003; PORRECA et al., 2002; REN; DUBNER, 2002). O BVR é relacionado a hiperalgesia associada com a retirada opióide precipitada por naltrexona ou administração opióide prolongada, ou durante aquecimento prolongado da cauda ou em doença induzida por administração de endotoxina (KAPLAN; FIELDS, 1991; MORGAN; FIELDS, 1994; VANDERAH et al., 2001; WIERTELAK et al., 1997). O sistema MCP-BVR também contribui para a hiperalgesia e alodinia em modelos de inflamação e neuropatia, incluindo o teste de formalina, hiperalgesia secundária por óleo de mostarda e ligadura do nervo espinhal (HEINRICHER et al., 2003; PORRECA et al., 2002). Vale salientar que este aumento de transmissão nociceptiva é seletivo para certos tipos de entrada. Por exemplo, o BVR não é recrutado na hiperalgesia primária ou secundária circundando um local de incisão cirúrgica (POGATZKI et al., 2002) ou após inflamação local de longa duração produzida por adjuvante de Freund completo. Em vez de hiperalgesia, em animais tratados com adjuvante de Freund completo, o BVR é recrutado para inibição descendente (REN; DUBNER, 2002). De acordo com estes achados, o sistema MCP-BVR pode facilitar nocicepção em alguns modelos animais de nocicepção, porém não em todos. Portanto, descobrir como este sistema é recrutado para inibir ou facilitar nocicepção em diferentes condições ambientais é um desafio para o entendimento completo do funcionamento do sistema de modulação descendente (FIELDS et al., 2006).

### 1.3 Opióides

O termo opióide é utilizado para se referir de forma ampla a todos os compostos relacionados com o ópio. O termo opium é proveniente da palavra opos, palavra grega que significa suco, pois o fármaco é retirado do suco da papoula, ou *Papaver somniferum*. Opiáceos são fármacos derivados do ópio e compreendem produtos naturais como morfina, codeína, tebaína e alguns semisintéticos das últimas. O termo endorfina é

utilizado para designar peptídeos opióides endógenos, mas também se refere a um opióide endógeno específico conhecido com  $\beta$ -endorfina (GOODMAN; GILMAN, 2005).

O ópio tem sido há muito tempo associado à história da humanidade. Ideogramas sumérios de 4000 a.C. referem-se à papoula como a “planta da alegria” e os papiros médicos egípcios utilizaram ópio em muitas de suas fórmulas médicas. Ele é citado na *Ilíada* de Homero, *Odisséia* e na *Eneida* de Virgílio. O médico persa Avicenna prescreveu ópio para tosse, anemia e diarreia (STEFANO et al., 2000).

O ópio é composto por mais de 20 alcalóides diferentes. Em 1806, foi descrito o isolamento de uma substância pura do ópio, a morfina, termo derivado de Morfeu, ou Deus grego dos sonhos. Logo depois, foram descobertos outros alcalóides do ópio – codeína em 1832 e papaverina em 1848. Em meados do século XIX, o uso dos alcalóides puros no lugar das preparações naturais começou a se difundir por toda a comunidade médica (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Além das ações benéficas dos opióides, os efeitos colaterais tóxicos e o potencial de gerar dependência também eram conhecidos há séculos (GOODMAN; GILMAN, 2005). Todos os efeitos dos opióides, inclusive os adversos, ocorrem devido a complexas interações entre esses fármacos e receptores específicos (DUARTE, 2005).

Os receptores opióides fazem parte da família de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana. Eles são ativados tanto por peptídeos opióides endógenos quanto por fármacos opióides exógenos, tais como morfina, que não apenas estão entre os analgésicos mais efetivos mas também são drogas de abuso com alto potencial de dependência (WALDHOER; BARTLETT; WHISTLER, 2004). Existem três tipos clássicos de receptores opióides -  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ . Um quarto receptor N O/FQ foi descoberto mais recentemente, sendo conhecido inicialmente como receptor 1 semelhante aos receptores opióides (ORL-1) ou receptor opióide órfão (GOODMAN; GILMAN, 2005). Este último apresenta um alto grau de homologia estrutural com os receptores opióides clássicos, mas o ligante endógeno, orfanina F/Q não interage diretamente com os receptores opióides clássicos (MOGIL; PASTERNAK, 2001).

Existem três grupos de ligantes de peptídeos opióides endógenos: as encefalinas (derivadas da pró-encefalina), as dinorfinas A e B e a neoendorfina (derivadas de pró-dinorfina), e as  $\beta$ -endorfinas (derivadas da pró-opiomelanocortina (POMC), precursora da proteína comum tanto para a  $\beta$ -endorfina quanto para o hormônio adrenocoticotrópico do estresse (ACTH)). As encefalinas têm alta afinidade por receptores opióides  $\delta$  e  $\mu$ , as dinorfinas preferencialmente se ligam a receptores  $\kappa$  enquanto a  $\beta$ -endorfina tem afinidade

preferencial por receptores  $\mu$  e  $\delta$  (LORD et al., 1977; COLASANTI et al., 2010). Outros peptídeos endógenos, as endomorfina, que não derivam dos precursores já citados, têm alta e seletiva afinidade pelos receptores  $\mu$ , e estão localizados em sua maioria na periferia (ZADINA et al., 1997).

Cada tipo de receptor opióide apresenta distribuição anatômica especial no encéfalo, na medula espinhal e nos tecidos periféricos (MANSOUR et al., 1988; GOODMAN; GILMAN, 2005, COLASANTI et al., 2010). A tabela 1 mostra os tipos de receptores envolvidos na mediação de vários efeitos opióides (GOODMAN; GILMAN, 2005).

**Tabela 1:** Classificação dos subtipos de receptores opióides e suas ações em modelos animais

	Subtipo do Receptor	Ações dos:	
		Agonistas	Antagonistas
Analgesia			
Supra-espinhal	$\mu, \kappa, \delta$	Analgesica	Nenhum efeito
Espinhal	$\mu, \kappa, \delta$	Analgesica	Nenhum efeito
Função respiratória	$\mu$	Depressão	Nenhum efeito
Trato gastrointestinal	$\mu, \kappa$	Redução do trânsito	Nenhum efeito
Psicotomimese	$\kappa$	Aumento	Nenhum efeito
Alimentação	$\mu, \kappa, \delta$	Aumento	Redução
Sedação	$\mu, \kappa$	Aumento	Nenhum efeito
Diurese	$\kappa$	Aumento	
Regulação hormonal			
Prolactina	$\mu$	Aumento da secreção	Redução da secreção
Hormônio do crescimento	$\mu, \kappa$ e/ou $\delta$	Aumento da secreção	Redução da secreção
Liberação de neurotransmissores			
Acetilcolina	$\mu$	Inibição	Nenhum efeito
Dopamina	$\mu, \delta$	Inibição	Nenhum efeito

Adaptada de Goodman and Gilman (2005).

Os efeitos centrais de opióides sobre a transmissão da informação nociceptiva por ações no corno dorsal da medula espinhal, no tronco encefálico e outros locais supraespinhais têm sido demonstrados há algum tempo (SAWYNOK, 2003). Através de estudos de imunohistoquímica tem sido demonstrado a presença de receptores  $\mu$  no bulbo olfatório, córtex encefálico, núcleo do leito da estria terminal, hipocampo, habênula, amígdala, tálamo, hipotálamo, eminência mediana, substância negra, área tegmental ventral, núcleo oculomotor, núcleos da rafe, MCP, locus ceruleus, formação reticular do núcleo trigeminal, área postrema, núcleos cerebelares profundos, colículo inferior, núcleo gigantocelular adjacente do BVR e na medula espinhal (BRODNAR, 2007). Já os receptores  $\delta$  estão

presentes no neocórtex, giro denteado, núcleo acumbens, caudado e putâmen, quadrantes ventral e ventrolateral da MCP, formação reticular da ponte, núcleo reticular gigantocelular e corno dorsal da medula espinhal. Baixa ou moderada densidade deste subtipo de receptor é encontrada na amígdala, hipocampo, globo pálido e rafe mediana (KASCOW; GERACIOTI, 2002; GOODMAN; GILMAN, 2005; BRODNAR, 2007). No que diz respeito aos receptores  $\kappa$ , tais receptores estão localizados no tálamo medial, MCP, formação reticular da ponte, tronco encefálico, BVR, rafe mediana, núcleo reticular gigantocelular adjacente, corno dorsal da medula espinhal (GOODMAN; GILMAN, 2005; BRODNAR, 2007). O RNAm de cada um dos três receptores opióides ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ) também está presente nos gânglios das raízes dorsais, entretanto, cada receptor está situado em um tipo diferente de célula aferente primária. O RNAm do receptor opióide  $\mu$  está presente nas células com diâmetros médio e grande dos gânglios da raiz dorsal, o RNAm do receptor  $\delta$  é encontrado nas células com diâmetro grande e o RNAm do receptor opióide  $\kappa$  ocorre nas células com diâmetros pequeno e médio (MANSOUR et al., 1995; GOODMAN; GILMAN, 2005). A presença do quarto receptor opióide N/OFQ tem sido relatada em estruturas tais como a MCP, a rafe mediana, BVR e no corno dorsal superficial (GOODMAN; GILMAN, 2005).

Além dos efeitos centrais de opióides na transmissão da informação nociceptiva também tem sido demonstrado que receptores opióides estão presentes em terminais periféricos de fibras sensoriais cutâneas mielinizadas finas e não mielinizadas (COGGESHALL et al., 1997; SAWYNOK, 2003). Os gânglios das raízes dorsais possuem RNAm para os receptores opióides (SAWYNOK, 2003) e, quando sintetizados, estes receptores são transportados centralmente (COGGESHALL; CARLTON, 1997) ou periféricamente (STEIN et al., 1990; HASSAN et al., 1993). Ações opióides periféricas não são notáveis em tecidos intactos mas aparecem previamente após a indução de inflamação (SAWYNOK, 2003). Apesar do aumento na expressão de receptores opióides e no transporte para terminais nervosos periféricos, resultantes da inflamação (HASSAN et al., 1993), este processo leva dias e a expressão inicial de analgesia precede estas mudanças (minutos a horas). O efeito inicial é devido à reação inflamatória na barreira perineural que normalmente limita o acesso de drogas ao nervo (ANTONIJEVIC et al., 1995). Assim, seguindo tal reação, os opióides têm acesso ao terminal nervoso e aos receptores que estão presentes (COGGESHALL et al., 1997). Os agonistas de receptor opióide  $\mu$  são os mais potentes em induzir analgesia periférica, com os agonistas de receptores  $\delta$  e  $\kappa$  sendo menos ativos. Entretanto, os efeitos podem influenciados pela natureza do estímulo nocivo e o tipo de inflamação (por exemplo, diferenças ocorrem se um modelo agudo como injeção intraplantar

de prostaglandina E<sub>2</sub> é usado ou se um modelo crônico como o adjuvante de Freund é usado). Os receptores opióides estão situados em vários alvos distintos abrangendo nervos sensoriais, neurônios simpáticos pós-ganglionares e células imunes. A antinocicepção por agonistas opióides  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  na inflamação ocorre devido a ações em nervos sensoriais antes que em neurônios simpáticos (SAWYNOK, 2003).

#### 1.4 Canabinóides

A planta *Cannabis* tem sido cultivada há séculos para a produção de cânhamo e por suas possíveis propriedades medicinais e psicoativas (GOODMAN; GILMAN, 2005). No que diz respeito às propriedades medicinais, os canabinóides foram usados para o tratamento de dor durante séculos. Estas substâncias foram utilizadas como anestésicos cirúrgicos na China, para tratar dor de parto em Israel, como um analgésico na Ásia, (durante a idade média) e para várias doenças dolorosas no ocidente durante os anos de 1800. Por razões políticas e farmacológicas (exemplo, a instabilidade dos extratos de *Cannabis*, absorção imprevisível e insolubilidade em água), o uso dos canabinóides como agentes terapêuticos foi interrompido em 1930 (WALKER; STRANGMAN; HUANG, 2001).

A fumaça da queima da *Cannabis* possui vários compostos químicos, incluindo-se 61 canabinóides diferentes. Um deles, o  $\Delta$ -9-tetraidrocanabinol ( $\Delta$ -9-THC), produz a maior parte dos efeitos farmacológicos característicos da maconha inalada (GOODMAN; GILMAN, 2005). Vários endocanabinóides também têm sido isolados incluindo anandamida, 2-araquidonoilglicerol (2-AG), virodamina (o éster de ácido araquidônico e etanolamina) e o 2-araquidonoilgliceril éter (DE FONSECA et al., 2004; HOHMANN; SUPLITA, 2006). Todos esses endocanabinóides têm sido identificados no encéfalo, plasma e tecidos periféricos. Tanto a anandamida quanto outros endocanabinóides são rapidamente inativados por uma associação de um mecanismo de transportador e pela enzima hidrolase de ácido graxo amido (FAAH, GIUFFRIDA et al., 2001). Tanto os canabinóides exógenos quanto os endocanabinóides exercem seu efeitos através da ação em receptores canabinóides (WALKER; STRANGMAN; HUANG, 2001; IVERSEN, 2003; DE FONSECA et al., 2004).

Dois tipos de receptores canabinóides têm sido identificados - CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> - ambos pertencem à família de receptores acoplados à proteína G (DE FONSECA et al., 2004; HOHMANN; SUPLITA, 2006). O receptor CB<sub>1</sub> está presente principalmente no sistema nervoso central, no sistema reprodutor (testículos) e baço. No encéfalo, os receptores CB<sub>1</sub>

estão distribuídos por terminações nervosas (exercendo ação pré-sináptica inibitória da liberação de neurotransmissores). Alta densidade de receptores canabinóides CB<sub>1</sub> está presente no hipocampo, nos gânglios basais e no cerebelo – áreas predominantemente relacionadas com memória e coordenação motora. Baixa densidade de receptores CB<sub>1</sub> é encontrada nos centros cardiorespiratórios do tronco encefálico. Receptores CB<sub>1</sub> também são encontrados em alta densidade em muitas áreas relacionadas à dor, tais como a MCP e o BVR. Eles também estão concentrados nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal e no gânglio da raiz dorsal de onde eles são transportados a ambos terminais periféricos e centrais de fibras aferentes primárias (WALKER; STRANGMAN; HUANG, 2001).

Tem sido relatado que o receptor canabinóide CB<sub>2</sub> está ausente nos tecidos neurais e está situado em tecidos imunes tais como baço, tonsilas, monócitos, células B e células T (WALKER; STRANGMAN; HUANG, 2001; IVERSEN, 2003; DE FONSECA et al., 2004). Entretanto, evidências da presença deste receptor no sistema nervoso também têm sido relatadas (PAZOS et al., 2005). Por exemplo, Van Sickle et al. (2005) têm demonstrado a expressão de RNA mensageiro e a localização da proteína do receptor canabinóide CB<sub>2</sub> no tronco encefálico. Evidências da possível presença de receptores CB<sub>2</sub> em neurônios sensoriais primários também têm sido demonstradas por Sokal et al. (2003). Nesse sentido, Yamamoto et al. (2008) têm mostrado que a administração intratecal de JW133, um agonista seletivo de receptor canabinóide CB<sub>2</sub>, reverteu a alodinia induzida por ligação mecânica parcial de nervo ciático em camundongos. Juntos, esses achados fornecem indícios da possível presença de receptores CB<sub>2</sub> nas células nervosas.

### **1.5 Antinociceção induzida por estímulos ambientais aversivos**

A exposição de animais a situações ameaçadoras, de natureza inata ou aprendida, resulta em um repertório de comportamentos defensivos espécie-específicos, alterações autonômicas e inibição da dor, sendo esse conjunto de reações de alta relevância para a sobrevivência de uma espécie (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

Bolles e Fanselow (1980) argumentaram que comportamentos defensivos e respostas nociceptivas são atividades incompatíveis, uma vez que os cuidados dispensados à recuperação da injúria sofrida prejudicariam a exibição de respostas defensivas apropriadas. Com efeito, uma série de estudos tem demonstrado que o sistema antinociceptivo pode ser ativado por uma variedade de estímulos nociceptivos externos ou ambientais, exercendo



importante função no controle de comportamentos defensivos e afetivos (FANSELOW, 1991; FARDIN et al, 1984; TERMAN et al, 1984; WATKINS et al, 1982). Por exemplo, ratos expostos à presença de um gato exibem resposta antinociceptiva detectada pelos testes de retirada da cauda (FANSELOW, 1991) e formalina (LESTER; FANSELOW, 1985). Esta antinocicepção é revertida pelo tratamento prévio com naltrexona (LESTER; FANSELOW, 1985; FANSELOW, 1991).

O envolvimento de mecanismos opióides também tem sido demonstrado na antinocicepção induzida por conflito social. Achados demonstram que camundongos derrotados exibem antinocicepção que mostra tolerância cruzada com morfina (MICZEK et al., 1982) e também é bloqueada pelo antagonista de receptor opióide, naloxona (MICZEK et al., 1982; RODGERS; HENDRIE, 1983). Entretanto, a antinocicepção não opióide também tem sido demonstrada em camundongos derrotados (RODGERS; RANDALL, 1986; RODGERS; SHEPERD, 1989; RODGERS et al., 1990; CANTO-DE-SOUZA et al., 1997), dependendo se o animal intruso é exposto a um estresse social leve (não opióide) ou a um estresse social prolongado (opióide) (RODGERS; RANDALL, 1988). Há evidências de que mecanismos envolvidos na antinocicepção não opióide do teste de derrota social sejam mediados por receptores benzodiazepínicos (RODGERS; RANDALL, 1987) e receptores serotoninérgicos, tais como, receptores 5HT1A (RODGERS; SHEPERD, 1989; CANTO-DE-SOUZA et al., 1997) e 5HT3 (RODGERS et al., 1990; SIEGFRIED ET AL., 1990).

Dentre as formas de antinocicepção induzida por estímulos ambientais, a eliciada por estímulos desencadeadores de respostas de medo tem sido uma das mais estudadas, tendo sido desenvolvidos vários testes para esse propósito (BOLLES; FANSELOW, 1980; KELLY, 1986). A procura por modelos animais que permitam avaliar a influência do medo sobre a nocicepção resultou no emprego do teste do labirinto em cruz elevado (LCE) (LEE; RODGERS, 1990, 1991; TAUKULIS; GOGGIN, 1990, RODGERS et al, 1992; NUNES-DE-SOUZA et al, 2000). O LCE (PELLOW, 1985) ou labirinto em X elevado (HANDLEY; MITHANI, 1984) foi inicialmente validado em ratos, e subseqüentemente em camundongos (LISTER, 1987; STEPHENS et al., 1986). O teste é baseado na aversão natural de roedores a espaços abertos e tem sido amplamente usado para estudar ansiedade e sua modulação pelo tratamento com drogas. Os níveis de ansiedade são avaliados pela esquiva aos braços abertos (% de entradas e % de tempo nos braços abertos), enquanto a atividade geral é avaliada pela freqüência absoluta de entradas nos braços fechados (CRUZ et al, 1994; RODGERS; COLE, 1994).

Evidências de que os braços abertos do labirinto são a principal fonte de aversão podem ser encontradas em estudos anteriores com ratos e camundongos. Neste sentido, tem sido demonstrado que o confinamento no braço aberto do LCE provoca reações defensivas caracterizadas por congelamento e imobilidade, aumento nos níveis de corticosterona plasmática, defecação (PELLOW et al., 1985) e antinocicepção (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000), quando comparado ao confinamento nos braços fechados, sugerindo ser a exposição ao primeiro mais estressante.

Com relação à inibição da resposta nociceptiva, Lee e Rodgers (1990) foram os primeiros a demonstrar que a exposição ao LCE resulta em antinocicepção, conforme avaliado pela elevação da latência de retirada da cauda (*tail flick test*). Esse tipo de analgesia parece ser mediado por mecanismos não opióides, uma vez que não é bloqueado por naltrexona e não apresenta tolerância cruzada com morfina (LEE e RODGERS, 1990). Porém, pode ser bloqueada pelo pré-tratamento com ansiolíticos com ação em receptores benzodiazepínicos (RODGERS et al., 1992) e 5-HT<sub>1A</sub> (LEE e RODGERS, 1991).

A interação entre respostas de medo/ansiedade e analgesia tem sido estudada em nosso laboratório e os resultados demonstram evidências de mediação central de antinocicepção, obtidas através de microinjeções intra-amídala de midazolam (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Este agonista pleno de receptores benzodiazepínicos atenuou a ansiedade no teste do LCE e bloqueou completamente a resposta antinociceptiva em animais confinados no braço aberto do aparelho. Neste mesmo estudo, Nunes-de-Souza et al (2000) demonstraram ainda que a antinocicepção induzida pelo confinamento no braço aberto do LCE é insensível ao tratamento sistêmico com naloxona. Embora os braços abertos do LCE sejam a principal fonte de ameaça eliciadora de antinocicepção, o emprego do confinamento em cada compartimento do aparelho dificulta a avaliação da relação entre ansiedade e antinocicepção. Vale lembrar que o confinamento é uma situação inescapável, pois não permite ao animal fugir do ambiente aversivo (braço aberto, BA) e, desta forma, pode desencadear a ativação de mecanismos de defesa diferentes daqueles envolvidos na exploração total do LCE.

Neste sentido, Mendes-Gomes & Nunes-de-Souza (2005) têm investigado se a oportunidade para evitar ou fugir dos braços abertos aversivos altera de maneira diferente a magnitude da resposta antinociceptiva durante exposição ao LCE. Estes autores mostraram que camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado todo aberto (LCEa, quatro braços abertos), uma variação do LCE, gastam menos tempo lambendo a pata injetada com formalina em comparação aos grupos expostos ao labirinto em cruz elevado padrão e ao labirinto em

cruz elevado fechado. Estes achados sugerem que a antinocicepção induzida pelo LCE depende do grau de aversão do teste. Em outras palavras, o estado emocional induzido pela exposição ao LCEa parece ser semelhante à condição de perigo imediato devido às características do teste.

É importante ressaltar que exposições a situações aversivas (geralmente referidas como estressores) provocam uma série de respostas coordenadas (referidas como “respostas ao estresse”) compostas de alterações comportamentais, ativação autonômica e a secreção de hormônios tais como hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol/corticosterona (VAN DE KAR; BLAIR, 1999; CARRASCO; VAN DE KAR, 2003). Tem sido demonstrado que corticosterona modula nocicepção e ansiedade/ medo. Por exemplo, aumento dos níveis de corticosterona plasmática estão correlacionados com um aumento no limiar de sensibilidade à dor em ratos expostos à estimulação elétrica na cauda (BOGDANOV; YARUSHKINA, 2000; BOGDANOV; YARUSHKINA, 2003). Este hormônio também induz um aumento na frequência de postura alongada (stretched attend posture, SAP) total e protegida no LCE (MIKICS; BARSY; BARSVÁRI; HALLER, 2005). Por outro lado, a frequência de postura alongada é diminuída por metirapona, um bloqueador da síntese de glicocorticóides (MIKICS; BARSY; BARSVÁRI; HALLER, 2005), e tratamento com midazolam (ALBRECHET-SOUZA et al., 2007) em ratos expostos ao LCE padrão. Outro esteróide adrenal ansiolítico endógeno, o alpha-THDOC, também atenua analgesia induzida pelo estresse não opióide (RODGERS; SHEPHERD, 1988). Diante de tais achados é possível que a corticosterona exerça algum efeito sobre a antinocicepção induzida pelo LCEa.

Embora a exposição de camundongos ao LCEa induza antinocicepção de alta magnitude, os mecanismos envolvidos neste tipo de inibição da dor são pouco conhecidos. Dentro deste contexto, também tem sido mostrado que os canabinóides modulam a analgesia induzida por estresse. Por exemplo, Finn et al. (2004) têm demonstrado que, em ratos condicionados ao choque, a analgesia condicionada pelo medo (avaliada pelo teste de formalina) foi revertida por administração sistêmica do antagonista de receptor CB1 canabinóide, SR141716A. Por outro lado, a microinjeção deste composto na amígdala basolateral de ratos condicionados ao choque e submetidos ao teste de formalina não alterou a analgesia condicionada pelo medo (ROCHE et al., 2007). Dentro deste contexto, tem sido demonstrado que a analgesia induzida por choque intermitente na pata é bloqueada por antagonistas opióides (LEWIS et al., 1980), ao passo que a analgesia induzida por choque

contínuo (3 min.) na pata é bloqueada por antagonistas canabinóides (HOHMANN et al., 2005).

Ainda, Hohmann et al. (2005) demonstraram que este tipo de analgesia induzida por estresse é mediada pela mobilização de dois endocanabinóides, 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e anandamida, no mesencéfalo dorsal. Neste sentido, como os mecanismos envolvidos na antinocicepção induzida pelo LCEa não foram estudados, é possível que mecanismos opióides, canabinóides ou ambos estejam envolvidos na modulação de tal antinocicepção.

Com relação à analgesia induzida por estresse, a literatura mostra diferenças entre os sexos no que diz respeito à magnitude de analgesia apresentada por machos e fêmeas expostos à mesma condição de estresse. Por exemplo, Vendruscolo et al. (2004) demonstraram que ratas espontaneamente hipertensas (SHR, sigla em inglês) e Wistar submetidas a um estresse de nado por três minutos exibiram maior percentagem de analgesia induzida por estresse quando comparadas aos machos dos respectivos grupos.

Diante das evidências acima, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a duração da resposta antinociceptiva, a possível modulação opióide e/ou canabinóide, influências da adrenalectomia e possíveis diferenças relacionadas ao sexo na antinocicepção induzida em ratos expostos ao LCEa.

## **2. OBJETIVOS**

### **ETAPA I:**

#### **Gerais:**

Investigar a participação de mecanismos opióides na antinocicepção induzida pelo LCEa.

#### **Específicos:**

Investigar se a antinocicepção induzida por exposição de ratos ao LCEa:

- Apresenta tolerância cruzada a morfina (experimentos I e II);
- É atenuada por exposições repetidas ao LCEa (experimento III);
- É revertida por tratamento sistêmico com naltrexona (experimento IV);
- É afetada por adrenalectomia (experimento V).

### **ETAPA II:**

#### **Gerais:**

Caracterizar a influência da presença do estímulo aversivo (LCEa) e das diferenças relacionadas ao sexo na duração da antinocicepção, bem como o envolvimento de mecanismos mediados por receptores canabinóides (CB<sub>1</sub>) na sua modulação.

#### **Específicos:**

Investigar se a antinocicepção induzida por exposição de ratos ao LCEa:

- Persiste após remoção do animal do LCEa;
- É influenciada por diferenças relacionadas ao sexo;
- É mediada pelo receptor canabinóide CB<sub>1</sub>.

### 3. ETAPA I: MODULAÇÃO OPIÓIDE DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO LCEa

#### 3.1 Material e métodos

##### Sujeitos:

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso médio de 230-280g, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os animais foram mantidos sob o ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas: 07:00h), em um ambiente com temperatura ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $55 \pm 5\%$ ) controladas. Alimento e água foram disponíveis *ad libitum*, exceto durante as breves sessões de teste. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro Experimentação Animal (protocolo CEP/FCF/Car. número 15/2005), baseado no “National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Esforços foram realizados para minimizar o número e sofrimento potencial de sujeitos.

##### Fármacos:

Sulfato de morfina (Dimorf<sup>®</sup>, Cristália; solução injetável 10 mg/ml) na dose de 5 mg/kg (intraperitoneal, i.p.) diluída em água destilada. Naltrexona (Naltrexona HCL, Endo Laboratories Inc., Garden City, USA), antagonista opióide não seletivo, na dose de 2,5 mg/kg (subcutânea, s.c.) diluída em salina.

As doses de morfina e naltrexona foram determinadas conforme estudo piloto e estudos anteriores (TSUCHIYA et al., 2006; REBOUÇAS et al., 2005; POWELL et al., 2002; MICZEK, 1982).

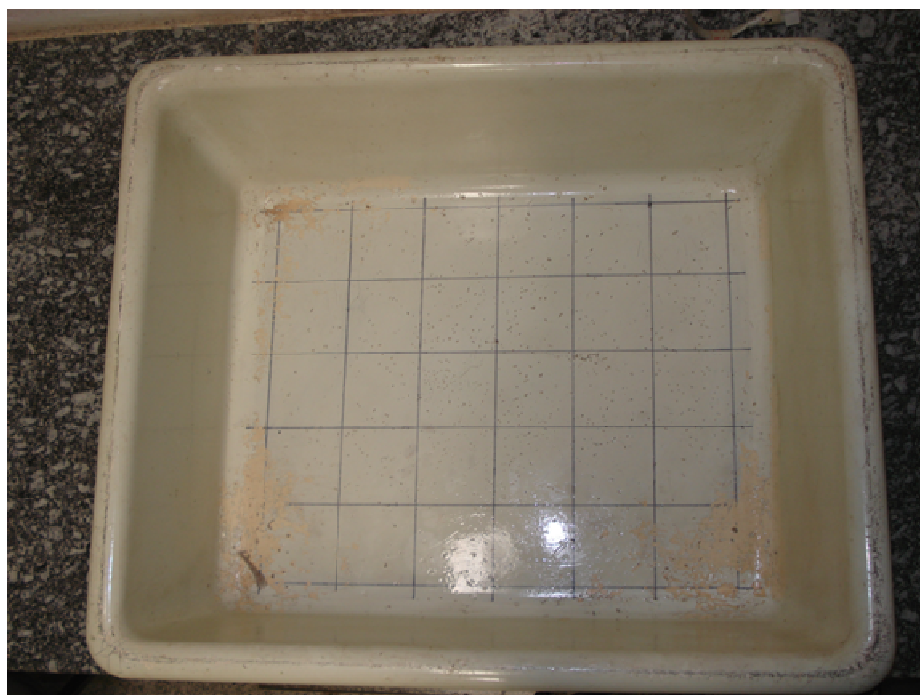
##### Equipamentos:

Em todos experimentos os animais foram posicionados na sala, onde permaneceram por um período de 1 hora sob luminosidade reduzida para habituação ao local.

##### Arena

A arena (Figura 1) consiste de uma caixa de polipropileno branco com base retangular (40 x 48 cm), cercada por paredes de 30 cm de altura. O assoalho é subdividido em

30 quadrados (8 x 8 cm). Este aparelho foi utilizado para o registro do tempo de lambidas na pata durante a segunda fase do teste de formalina no experimento I.



**Figura 1:** Arena.

### **Labirinto em cruz elevado**

**LCE fechado:** o LCEf (Figura 2, esquerda) é uma modificação do labirinto em cruz elevado padrão descrito por Pellow et al. (1985). Ele é confeccionado de acrílico (assoalho de acrílico cinza e paredes de acrílico cristal transparentes) com quatro braços fechados (50 x 10 cm) com paredes de 40 cm de altura, unidos por uma plataforma central comum (10 x 10 cm), e elevado 50 cm do solo por um suporte de acrílico cinza.

**LCE aberto:** o LCEa (Figura 2, direita) também apresenta as mesmas dimensões do LCE fechado, exceto que todos os quatro braços são abertos e circundados por uma parede de 0,5 cm, para evitar a queda dos animais. Exceto no experimento I, em todos os outros experimentos o LCEf e o LCEa foram usados.



**Figura 2:** Labirinto em cruz elevado fechado (LCEf), esquerda acima; Labirinto em cruz elevado aberto (LCEa), direita acima e centro abaixo.

### Testes de nociceção:

#### Teste de retirada da cauda (Tail-Flick Test)

Nos experimentos I e II, o teste de retirada da cauda (Figura 3) foi realizado com o objetivo de detectar a tolerância em ratos tratados com morfina (5mg/Kg, i.p.).

Para a medida da latência de retirada da cauda (LRC), foi utilizado um aparelho similar àquele descrito por Siegfried et al. (1987), que consiste numa fonte de luz posicionada sob a superfície do aparelho. Este dispositivo emite raios de luz através de um orifício, os quais incidem na cauda. Uma fotocélula situada acima do orifício e em linha reta com a fonte de luz permite o registro do tempo de retirada da cauda, assim que a mesma for flexionada para fora do feixe de luz, desligando o cronômetro. Para medir a LRC, cada rato foi gentilmente contido com uma flanela e a fonte de luz foi focada em um ponto 3-4 cm proximal à extremidade inferior da cauda. A deflexão da cauda ativou a fotocélula situada acima da fonte de luz e o teste foi finalizado. O feixe de luz foi ajustado a uma intensidade elétrica de 90  $\mu$ A e o tempo de corte para a latência de retirada da cauda foi padronizado em 5 segundos durante experimento piloto. Os animais que apresentaram LRC média acima de 3 segundos não receberam tratamento no primeiro dia de teste, sendo tratados apenas no dia em que esta foi reduzida. LRC foram registradas 0 e 10 minutos antes e 20 minutos após



tratamento farmacológico. Cada LRC foi normalizada por calcular um índice de analgesia (IA):

$$IA = \frac{(LRC \text{ teste}) - (Média \text{ basal de LRC})}{5 - (Média \text{ basal de LRC})}$$

IA, índice de analgesia;

LRC teste, latência de retirada da cauda teste;

Média basal de LRC, média basal de latência de retirada da cauda;



**Figura 3:** Teste de retirada da cauda (tail-flick test).

### Teste de formalina

A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva bifásica (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995). A primeira fase (fásica) é observada imediatamente após a injeção de formalina e dura de 3-5 minutos, ela resulta da estimulação direta de nociceptores. A segunda fase (tônica) inicia-se após 20 minutos de injeção da formalina, dura aproximadamente 40 minutos e envolve um período de sensibilização durante o qual

fenômenos inflamatórios ocorrem. (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Os animais foram tratados com 50 µl de solução de formalina a 2,5% (formaldeído 2,5%), injetada subcutaneamente na superfície plantar da pata traseira direita.

### Experimento I: Tolerância à morfina

Após o período de habituação à sala de experimento, os animais foram submetidos a duas medidas de LRC (LRC-basal) aos 0 e 10 minutos pré-tratamento e, então foram tratados com morfina (M) ou água destilada (AD). Vinte minutos após o tratamento, foram feitas uma medida de LRC aos 20 minutos pós-tratamento. Este mesmo procedimento foi realizado durante 5-7 dias, com exceção da pesagem dos animais que foi realizada a cada dois dias. Tal período foi determinado através de experimento piloto. Os ratos que não apresentaram tolerância à morfina até 7 dias de tratamento foram excluídos.

Um dia após a constatação de tolerância à morfina (obtida através do teste de LRC), os animais foram tratados com solução de formalina a 2,5% (*veja teste de formalina*). O tempo de lambidas na pata tratada durante a primeira fase do teste foi registrado por 5 minutos em uma caixa de vidro (30 x 20 x 25 cm). Após o registro da primeira fase do teste de formalina, os animais foram novamente tratados com morfina (5 mg/kg) ou água destilada (formando os grupos: AD + AD; AD + M; M + AD; M + M) e 25 minutos após a injeção de formalina, os animais foram individualmente colocados na arena (quadrado central da arena), para o registro do tempo de lambidas na pata traseira durante 10 minutos (Fase 2: 25-35 minutos). A Tabela 2 mostra detalhes do delineamento experimental realizado.

**Tabela 2:** Distribuição dos grupos de animais para a avaliação dos comportamentos de tolerância e nocicepção (teste de formalina).

<b>Grupos</b>	<b>Teste LRC (5-7 dias)</b>	<b>Teste da Formalina</b>	<b>Exposição à Arena</b>
Água Destilada (AD)	Tolerância	Água	AD + AD
		Destilada (AD)	AD + M
Morfina (M)		Morfina (M)	M + AD
			M + M

**Experimento II: Tolerância cruzada entre morfina e antinocicepção induzida pelo LCEa**

Neste experimento o teste de LRC foi realizado em ratos tratados com morfina (5mg/kg, i.p.) ou água destilada (AD) durante 5-7 dias. No dia seguinte à constatação de tolerância à morfina, os animais foram tratados com solução de formalina a 2,5% na pata traseira direita (*veja teste de formalina*). Em seguida, o tempo de lambidas na pata durante a primeira fase do teste foi registrado por 5 minutos na caixa de vidro. Este experimento seguiu o mesmo protocolo do experimento I, exceto que após o registro da primeira fase do teste de formalina os animais não receberam tratamento algum. Vinte e cinco minutos após a injeção de formalina, os animais foram expostos ao LCE aberto (LCEa) ou fechado (LCEf), para o registro do tempo de lambidas durante 10 minutos (Fase 2: 25-35 minutos).

**Experimento III: Influência de exposições repetidas ao LCEa sobre nocicepção**

No primeiro dia de teste, os animais foram expostos ao LCEf ou LCEa formando grupos de uma, duas, três, quatro ou seis exposições. Então, no último dia de exposições repetidas ao LCE os animais foram tratados com formalina conforme parâmetros citados (*ver teste de formalina*) e, após 25 minutos, foram expostos ao mesmo LCE, que já tinham sido previamente expostos, para o registro do tempo de lambidas durante 10 minutos (Fase 2: 25-35 minutos).

**Experimento IV: Efeitos de naltrexona na antinocicepção induzida pelo LCEa**

Os animais foram tratados com naltrexona (antagonista opióide não seletivo 2,5 mg/kg, s.c.) ou salina. Após 15 minutos, os animais foram tratados com formalina conforme parâmetros citados (*ver testes de formalina*) e, na 2ª fase do teste (25 minutos após injeção de formalina), foram expostos ao LCEa ou LCEf.

**Experimento V: Influência da adrenalectomia na antinocicepção induzida pelo LCEa****Adrenalectomia (ADX)**

Os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg)-xilazina (7 mg/kg). Uma incisão na pele na linha média lombar foi feita com o animal na posição prono. A parede muscular para-vertebral foi aberta bilateralmente e as glândulas adrenais foram removidas. Nos animais sham operados as glândulas adrenais foram localizadas similarmente, mas não removidas. Água pura e NaCl 0,9% estavam disponíveis tanto para os animais sham quanto para os ADX operados. Cinco a sete dias após a cirurgia, os animais foram tratados com

formalina conforme parâmetros citados (*ver teste de formalina*) e, após 25 minutos, foram expostos ao LCEa ou LCEf.

### **Análise Comportamental**

Os experimentos foram gravados através de um circuito de filmadora-vídeo-cassete-TV para posterior análise da resposta nociceptiva. Os comportamentos foram avaliados pela análise dos fitas cassetes com o auxílio do programa X-plorat 3.0, desenvolvido pelo grupo do Prof. Silvio Morato da USP de Ribeirão Preto (não publicado).

## **3.2 Análise dos resultados**

### **Análise Estatística:**

Os resultados de todos os experimentos foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de variâncias de Levene (com exceção dos resultados obtidos no teste de LRC). Quando apropriado, os dados foram transformados em Log de base 10 (variável+1), convertidos em raiz quadrada ou raiz cúbica antes de serem submetidos à análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores. Nos casos onde a transformação dos dados não revelou homogeneidade de variância, os dados foram analisados pela ANOVA de um fator não paramétrica de Kruskal–Wallis seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ou foram transformados em “Ranks” e então submetidos à ANOVA de dois fatores por ranks seguida pelo teste de comparações pareadas múltiplas de Student Newman Keuls. Um sumário da estatística utilizada em cada experimento é descrito abaixo:

Dados de índice de analgesia (Experimentos I e II) foram analisados pela ANOVA de dois fatores para medidas repetidas (fator 1: tratamento; fator 2: dia, medidas repetidas para dias). Para valores de F significativos, os dados foram analisados por comparações planejadas para contrastes entre médias (fator tratamento) para uma análise inter-grupos e pelo teste de comparações múltiplas de Newman Keuls para uma análise intra-grupos.

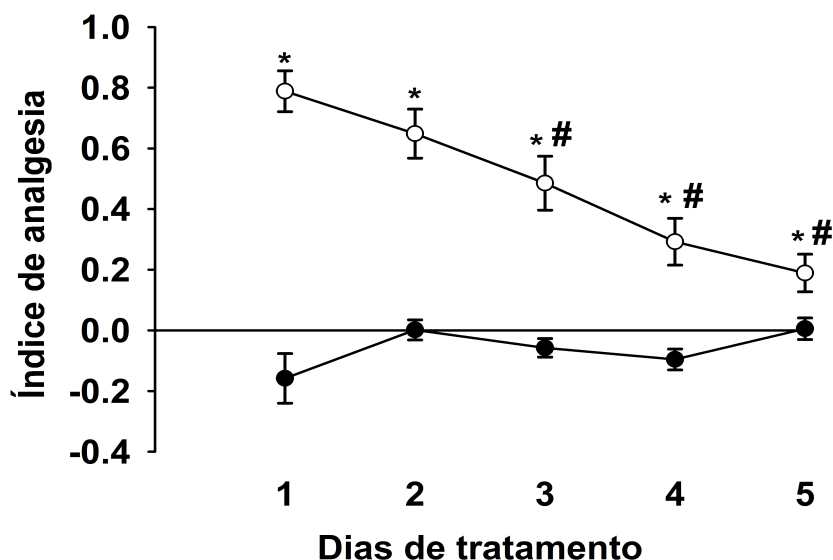
Os dados da primeira fase do teste de formalina (Experimentos I, II, IV e V) foram analisados usando-se o teste *t* de Student para amostras independentes (Experimentos I, II, IV fator independente: tratamento; Experimento V: fator independente: sham vs adrenalectomia). A ANOVA bifatorial foi usada para analisar a primeira fase do teste de nocicepção no experimento III (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: número de exposições ao labirinto).

Dados do experimento I (segunda fase do teste de formalina) foram submetidos à ANOVA de um fator não paramétrica de Kruskal Wallis (fator independente: tratamento) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Em todos os outros casos, a ANOVA bifatorial foi utilizada. Onde valores de F foram significativos, os dados foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Newman Keuls.

### 3.3 Resultados

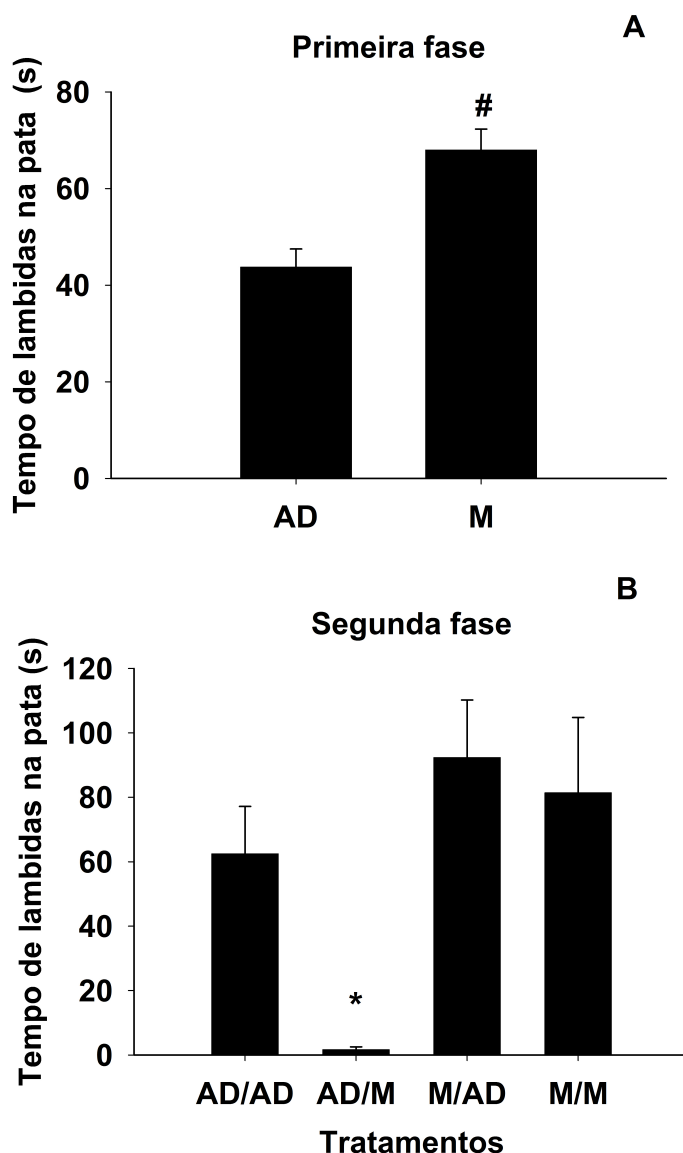
#### Experimento I: Tolerância à morfina

Os resultados apresentados nas Figuras 4 e 5 referem-se aos dados obtidos no experimento I. A Figura 4 mostra o IA em animais tratados com morfina e submetidos ao teste de LRC. A ANOVA de dois fatores para medidas repetidas [fator 1: tratamento; fator 2: dia, com medidas repetidas para este fator (dias de medida)] revelou um efeito significativo para os fatores tratamento ( $F_{1, 43} = 83,69, p < 0,01$ ), dia ( $F_{4,172} = 6,57, p < 0,01$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,172} = 10,84, p < 0,01$ ) tratamento e tempo sobre o IA. O teste de comparações planejadas para contrastes entre médias revelou que os índices de analgesia do grupo tratado com morfina são significativamente maiores que os índices de analgesia do grupo tratado com água destilada durante todos os dias de medida ( $p < 0,05$ ). A ANOVA de um fator não revelou diferença significativa do fator tempo no grupo tratado com água destilada ( $F_{4,72} = 2,39, p = 0,06$ ) e demonstrou uma diferença significativa para este mesmo fator no grupo tratado com morfina ( $F_{4,100} = 13,75, p < 0,01$ ). A análise *Post hoc* feita através do teste de Newman Keuls demonstrou que os índices de analgesia nos dias 3, 4 e 5 foram significativamente diferentes do IA do primeiro dia de tratamento com este fármaco. Além disso, o teste de Newman-Keuls ainda demonstrou que o IA dos dias 4 e 5 foi significativamente diferente daquele dos dias 2 e 3.



**Figura 4:** Índice de analgesia (IA) avaliado com o teste de retirada em ratos tratados com morfina (○; 5mg/kg) ou água destilada (●) uma vez ao dia por 5 dias consecutivos. Latências de retirada da cauda foram medidas 20 minutos após tratamento. Pontos: Média ± Erro Padrão da Média (EPM) (n=19-26). \*  $p < 0,05$  vs AD, #  $p < 0,05$  vs Morfina administrada no dia 1.

A Figura 5 mostra os efeitos do tratamento de morfina após a primeira fase do teste de formalina sobre o tempo de lambidas na pata traseira direita em ratos tolerantes e não-tolerantes. Nocicepção foi registrada durante a primeira fase (A) e segunda fase (B) do teste de formalina. Na primeira fase (Figura 5A), o teste de Levene detectou homogeneidade entre as amostras. O teste T revelou que o grupo tratado com morfina demonstra um tempo de lambidas na pata significativamente maior [ $t(43) = -4,05; p < 0,01$ ] quando comparado ao grupo tratado com água destilada. Para os dados da segunda fase (figura 5B) a análise não paramétrica realizada através do teste de Kruskal Wallis indicou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ( $p = 0,003$ ). O teste *Post hoc* de Dunn revelou que o grupo AD/M apresentou um tempo de lambidas na pata significativamente menor quando comparado aos grupos tratados com AD/AD, M/AD e M/M.

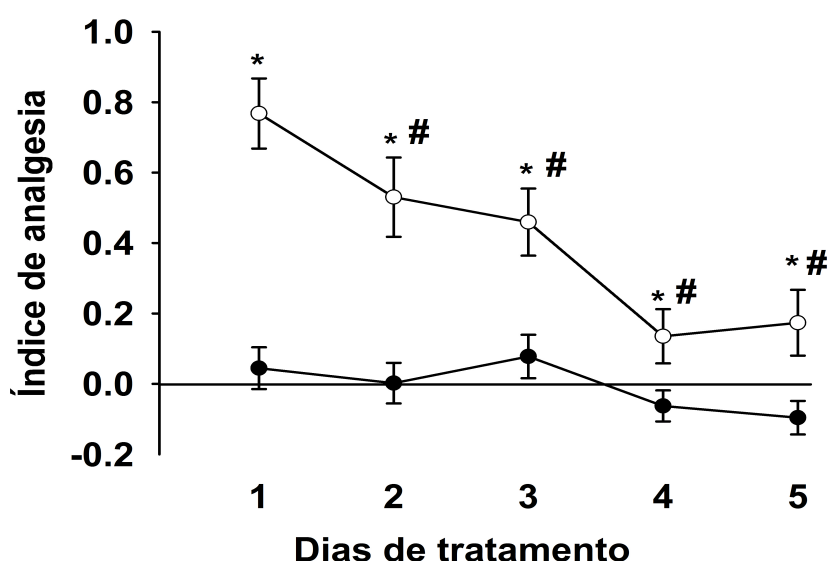


**Figura 5:** (A) Tempo de lambidas na pata traseira direita durante a primeira fase do teste de formalina em ratos tratados com água destilada (AD) ou morfina (M) diariamente por 5 dias consecutivos (n= 19-26). (B) Após a primeira fase do teste de formalina, os animais foram tratados com AD ou M novamente e 20 minutos após, o tempo de lambidas na pata foi registrado por 10 minutos (segunda fase do teste de formalina, 9-14) na arena. Barras: Média  $\pm$  EPM. <sup>#</sup>  $p < 0,01$  vs AD. <sup>\*</sup>  $p < 0,05$  vs AD/ AD, M/AD, M/M.

### Experimento II: Tolerância cruzada entre morfina e antinociceção induzida pelo LCEa

Os resultados apresentados nas Figuras 6-7 e Tabela 3 referem-se aos dados obtidos no experimento II. A Figura 6 mostra o índice de analgesia (IA), em animais tratados com morfina, obtido através do teste de LRC. A ANOVA de dois fatores para medidas repetidas [fator 1: tratamento; fator 2: dia, com medidas repetidas para este fator (dias de medida)] revelou valores significativos para os fatores tratamento ( $F_{1, 40} = 34,44$ ,  $p < 0,01$ ), tempo ( $F_{4,160} = 11,73$ ,  $p < 0,01$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{4,160} = 5,02$ ,  $p < 0,01$ ) tratamento e tempo sobre o IA. O teste de comparações planejadas para contrastes entre médias revelou que os índices de analgesia do grupo tratado com morfina é significativamente

maior que os índices de analgesia do grupo tratado com água destilada durante todos os dias de medida ( $p < 0,05$ ). A ANOVA de um fator não revelou diferença significativa do fator tempo no grupo tratado com água destilada ( $F_{4,80} = 1,80$ ,  $p = 0,14$ ) e demonstrou uma diferença significativa para este mesmo fator no grupo tratado com morfina ( $F_{4,80} = 11,58$ ,  $p < 0,01$ ). A análise *Post hoc* feita através do teste de Newman Keuls demonstrou que os IAs nos dias 2, 3, 4 e 5 foram significativamente diferentes do IA do primeiro dia de tratamento com este fármaco.



**Figura 6:** Índice de analgesia (IA) avaliado com o teste de retirada em ratos previamente tratados com morfina (○; 5mg/Kg) ou água destilada (●) uma vez ao dia por 5 dias consecutivos. Latências de retirada da cauda foram medidas 20 minutos após tratamento. Pontos: Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). \*  $p < 0,05$  vs Água Destilada, #  $p < 0,05$  vs Morfina Dia 1.

A Figura 7A mostra o tempo de lambidas na pata traseira direita durante a primeira fase do teste de formalina nos animais previamente tratados com água destilada ou morfina. O teste T revelou que o grupo tratado com morfina demonstra um tempo de lambidas na pata significativamente [ $t(40) = -2,72$ ;  $p < 0,01$ ] maior quando comparado ao grupo tratado com água destilada.

A Figura 7B mostra o tempo de lambidas na pata traseira direita durante a segunda fase do teste de formalina em animais expostos ao LCEf ou LCEa. A ANOVA de dois fatores (fator 1: tratamento; fator 2: tipo de labirinto) revelou um efeito significativo para os fatores tratamento ( $F_{1,38} = 9,36$ ,  $p < 0,01$ ), tipo de labirinto ( $F_{1,38} = 15,54$ ,  $p < 0,01$ ) e para a interação entre os fatores ( $F_{1,38} = 4,34$ ,  $p < 0,05$ ) tratamento e tipo de labirinto sobre o tempo de lambidas na pata durante 10 minutos de exposição ao LCEf ou LCEa. O teste *Post hoc* de Newman-Keuls mostrou que o tempo de lambidas na pata dos animais que foram tratados



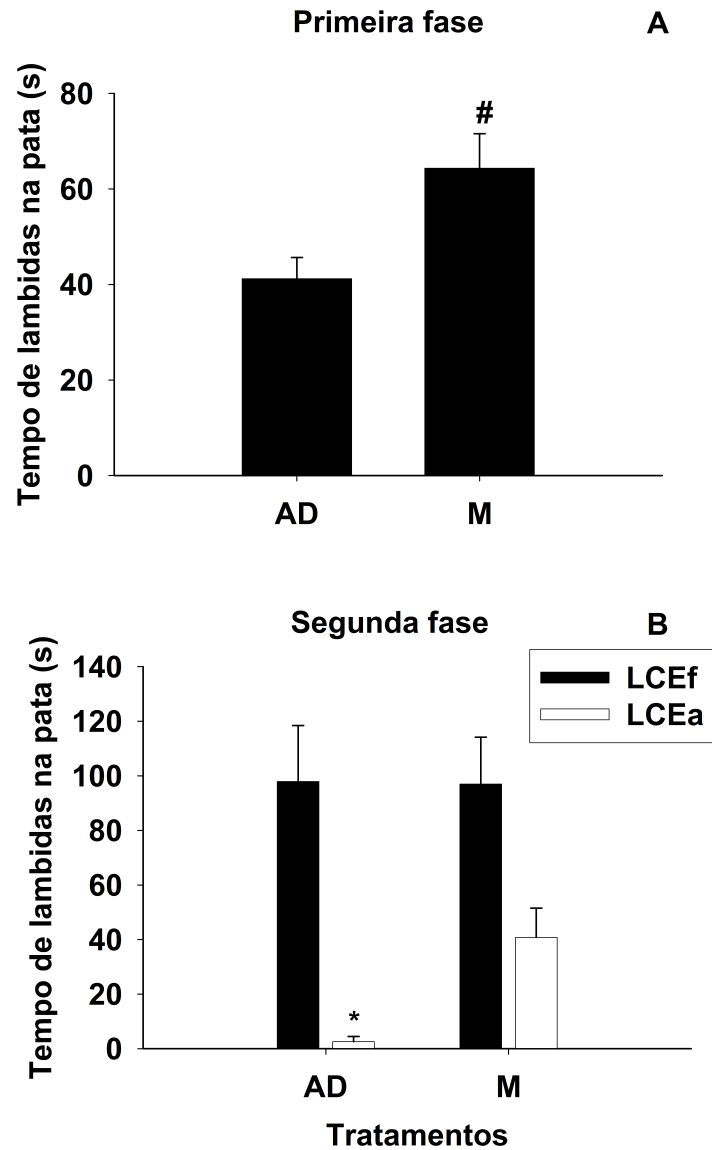
previamente com água destilada e expostos ao LCEa foi significativamente menor que aqueles que receberam o mesmo tratamento e foram expostos ao LCEf. Além disso, este teste detectou que o tempo de lambidas na pata dos animais que foram tratados previamente com água destilada e expostos ao LCEa foi significativamente menor em relação aos animais que receberam morfina e foram expostos ao LCEf ou LCEa.

A Tabela 3 mostra as medidas espaço-temporais (entradas totais nos braços; tempo total nos braços; tempo no centro) registradas durante a exposição ao LCE.

Para a medida de entradas totais nos braços a ANOVA de dois fatores (fator 1: tratamento; fator 2: tipo de labirinto) não revelou efeito para o fator tratamento ( $F_{1,38} = 1,47$ ;  $p = 0,23$ ), para o fator labirinto ( $F_{1,38} = 1,13$ ,  $p = 0,29$ ) e não revelou interação entre os fatores ( $F_{1,38} = 2,17$ ,  $p = 0,15$ ).

Para a medida de tempo total nos braços a ANOVA de dois fatores por Ranks (fator 1: tratamento; fator 2: tipo de labirinto) não revelou efeito para o fator tratamento ( $F_{1,38} = 0,3$ ;  $p = 0,6$ ), revelou efeito para o fator labirinto ( $F_{1,38} = 14,80$ ;  $p < 0,01$ ) e não mostrou interação entre os fatores ( $F_{1,38} = 1,44$ ,  $p = 0,24$ ).

Na análise da medida de tempo no centro, a ANOVA de dois fatores por Ranks (fator 1: tratamento; fator 2: tipo de labirinto) não revelou efeito para o fator tratamento ( $F_{1,38} = 0,3$ ;  $p = 0,6$ ), revelou efeito para o fator labirinto ( $F_{1,38} = 14,80$ ;  $p < 0,01$ ) e não mostrou interação entre os fatores ( $F_{1,38} = 1,44$ ,  $p = 0,24$ ).



**Figura 7:** Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase (A, n= 21) e segunda fase (B, n=10-11) do teste de formalina em rats previamente tratados com água destilada (AD) ou morfina (M) diariamente por 5 dias consecutivos. Somente a segunda fase do teste nociceptivo foi registrado durante exposição ao LCEf ou LCEa. Barras: Média  $\pm$  EPM. #  $p < 0,01$  vs AD. \*  $p < 0,01$  vs AD/ LCEf, M/ LCEf, M/ LCEa.

**Tabela 3:** Comportamentos Espaço-Temporais Analisados durante Exposição por 10 minutos ao LCEf ou LCEa

Comportamentos	LCEf		LCEa		ANOVA
	Água Destilada/	Água Destilada/	Morfina/LCEf	Morfina/LCEa	
<b>Entradas Totais nos Braços</b>	15,36 ± 1,86	21,2 ± 3,03	22 ± 2,12	21 ± 2,14	Não Significativo
<b>Tempo Total nos Braços</b>	369,73 ± 37,11	499,3 ± 6,45	403 ± 20,97	466 ± 22,08	Significativo para o Fator Labirinto
<b>Tempo no Centro</b>	230,27 ± 37,11	100,7 ± 6,45	197 ± 20,97	134 ± 22,08	Significativo para o Fator Labirinto

**Experimento III: Influência de exposições repetidas ao LCEa sobre a nociceção.**

Os dados obtidos durante este experimento estão ilustrados na figura 8 e na Tabela 4. A Figura 8 (A) mostra o tempo de lambidas na pata durante a primeira fase do teste de formalina. A ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: exposições) não mostrou significância para os fatores tipo de labirinto ( $F_{1,72} = 0,08$ ,  $p = 0,78$ ) e exposições ( $F_{4,72} = 0,36$ ,  $p = 0,84$ ) e não revelou interação entre os fatores ( $F_{4,72} = 0,32$ ,  $p = 0,86$ ).

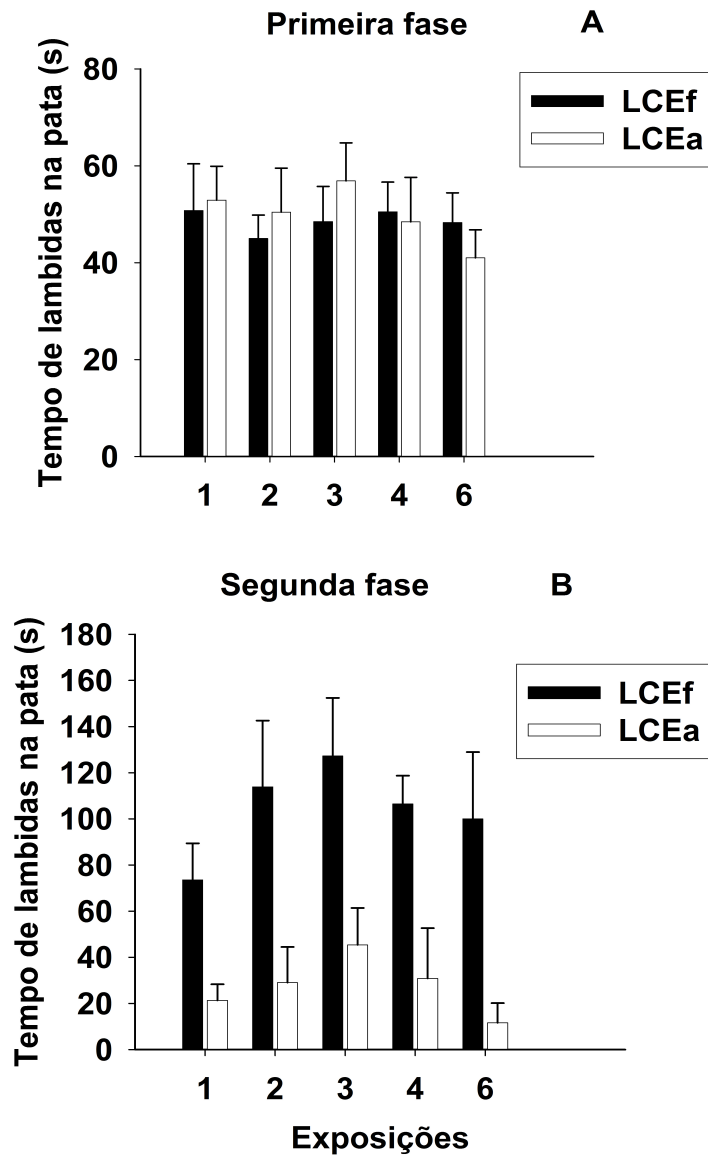
A Figura 8 B mostra o tempo de lambidas na pata durante a segunda fase do teste de formalina e exposição ao LCE. A ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: exposições) mostrou significância para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,72} = 45,81$ ,  $p < 0,01$ ) e não revelou significância para o fator exposições ( $F_{4,72} = 1,22$ ,  $p = 0,31$ ) e interação entre os fatores ( $F_{4,72} = 0,32$ ,  $p = 0,86$ ).

Quanto aos outros comportamentos registrados durante a exposição ao LCE, os dados estão demonstrados na Tabela 4.

No que diz respeito a entradas totais nos braços do LCE a ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: exposições) revelou significância para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,72} = 4,7$ ,  $p < 0,05$ ) não mostrando significância para o fator exposições ( $F_{4,72} = 0,76$ ,  $p = 0,56$ ) e interação entre os fatores tipo de labirinto e exposições ( $F_{4,72} = 0,08$ ,  $p = 0,99$ ).

Na análise da medida tempo total nos braços do labirinto a ANOVA de dois fatores por ranks (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: exposições) não revelou significância para os fatores tipo de labirinto ( $F_{1,72} = 0,003$ ,  $p = 0,96$ ), exposições ( $F_{4,72} = 1,67$ ,  $p = 0,16$ ) e interação entre estes fatores ( $F_{4,72} = 0,25$ ,  $p = 0,91$ ).

Quanto ao tempo no centro a ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: exposições) não mostrou nenhuma significância para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,72} = 0,013$ ,  $p = 0,91$ ) e para o fator exposições ( $F_{4,72} = 1,28$ ,  $p = 0,29$ ) assim como também não mostrou nenhuma valor significativo para a interação entre os fatores ( $F_{4,72} = 0,45$ ,  $p = 0,77$ ).



**Figura 8:** Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase (A) e segunda fase (B) do teste de formalina em ratos expostos 1, 2, 3, 4 ou 6 vezes ao LCEf ou LCEa. Os animais foram expostos ao LCEf ou LCEa somente durante a segunda fase do teste de nocicepção(n= 7-10). Barras: Média ± EPM.



**Experimento IV: Efeitos de naltrexona na antinociceção induzida pelo LCEa**

Os resultados apresentados na figura 9 e tabela 5 referem-se aos dados obtidos no experimento IV. A Figura 9A mostra o tempo de lambidas na pata durante a primeira fase do teste de formalina. O teste T revelou que o grupo tratado com naltrexona demonstra um tempo de lambidas na pata significativamente [ $t(28) = 3,92; p < 0,01$ ] menor quando comparado ao grupo tratado com salina.

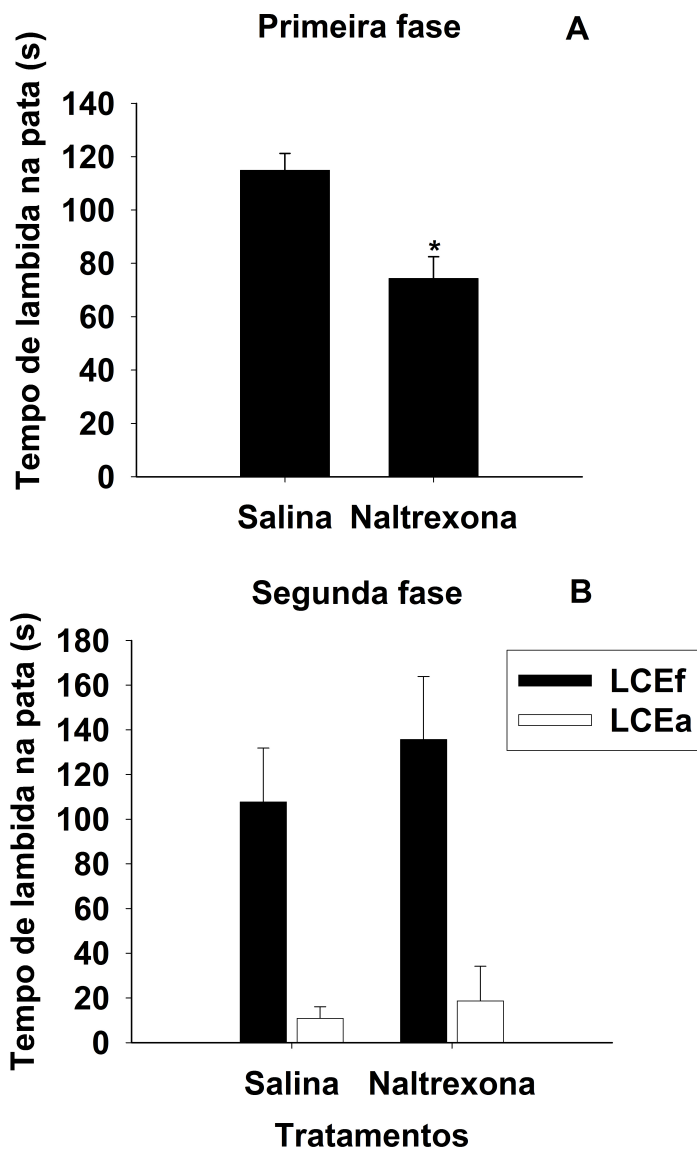
A Figura 9B mostra o tempo de lambidas na pata durante a segunda fase do teste de formalina e exposição ao LCE. A ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: tratamento) mostrou significância para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,26} = 32,43, p < 0,01$ ) e não revelou significância para o fator tratamento ( $F_{1,26} = 0,91, p = 0,35$ ) e interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 0,29, p = 0,6$ ).

A Tabela 5 mostra os comportamentos espaço-temporais registrados durante a exposição ao LCE.

Para a medida de entradas totais nos braços a ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: tratamento) não revelou efeito para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,26} = 0,91; p = 0,35$ ), mas mostrou efeito para o fator tratamento ( $F_{1,26} = 12,68, p < 0,01$ ) e não revelou interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 3,19, p = 0,08$ ).

No que diz respeito ao tempo total nos braços a ANOVA de dois fatores por Ranks (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: tratamento) não revelou efeito para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,26} = 0,02; p = 0,88$ ), revelou efeito para o fator tratamento ( $F_{1,26} = 16,28; p < 0,01$ ) e não mostrou interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 0,41, p = 0,53$ ).

Na análise da medida tempo no centro a ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: tratamento) não mostrou significância para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,26} = 0,14, p = 0,71$ ), revelou efeito para o fator tratamento ( $F_{1,26} = 16,65, p < 0,01$ ) e não mostrou valor significativo para a interação entre os fatores ( $F_{1,26} = 1,24, p = 0,27$ ).



**Figura 9:** Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase (A, n=15) e segunda fase (B, n= 6-9) do teste de formalina em ratos previamente tratados com salina ou naltrexona e expostos ao LCEf e LCEa. Animais foram expostos ao LCEf ou LCEa somente durante a segunda fase do teste de nocicepção. Barras: Média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,01$  vs Salina.



**Tabela 5:** Comportamentos Espaço- Temporais Analisados durante Exposição por 10 minutos ao LCEf ou LCEa

Comportamentos	Salina/		Naltrexona/		ANOVA	
	LCEf	LCEa	LCEf	LCEa		
<b>Entradas Totais nos Braços</b>	23,43 ± 2,56	21,63 ± 2,65	11,83 ± 1,72	17,78 ± 1,38		Significativo para o Fator Tratamento
<b>Tempo Total nos Braços</b>	424,86 ± 38,86	460 ± 22,40	538,50 ± 13,14	522,33 ± 12,29		Significativo para o Fator Tratamento
<b>Tempo no Centro</b>	175,14 ± 38,86	140 ± 22,40	51,50 ± 13,14	77,67 ± 12,29		Significativo para o Fator Tratamento

**Experimento V: Influência da adrenalectomia na antinocicepção induzida pelo LCEa**

Os resultados apresentados na figura 10A e tabela 6 referem-se aos dados obtidos no experimento V. A Figura 10 mostra o tempo de lambidas na pata durante a primeira fase do teste de formalina. O teste T não revelou diferenças entre os grupos sham e ADX [ $t(31) = 1,31; p = 0,20$ ].

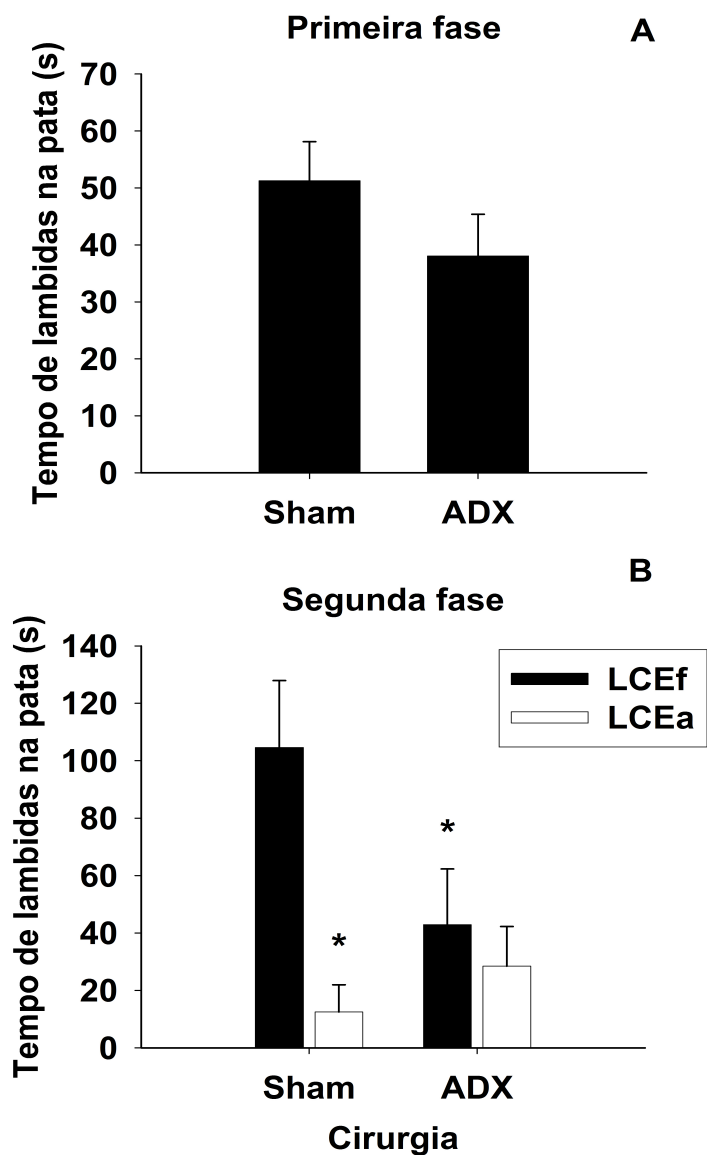
A Figura 10B mostra o tempo de lambidas na pata durante a segunda fase do teste de formalina e exposição ao LCE. A ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: cirurgia) mostrou significância para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,29} = 9,65, p < 0,01$ ), não revelou significância para o fator cirurgia ( $F_{1,29} = 1,78, p = 0,19$ ), mas revelou que há interação entre os fatores ( $F_{1,29} = 5,13, p < 0,05$ ). O teste Post Hoc de Newman-Keuls mostrou que o grupo Sham exposto ao LCEf é significativamente diferente dos grupos sham exposto ao LCEa, ADX exposto ao LCEf e ADX exposto ao LCEa.

A Tabela 6 mostra comportamentos espaço-temporais registrados durante a exposição ao LCE.

Na medida de entradas totais nos braços a ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: cirurgia) não revelou efeito para os fatores tipo de labirinto ( $F_{1,29} = 1,23; p = 0,27$ ), cirurgia ( $F_{1,29} = 1,98, p < 0,17$ ) e não revelou interação entre os fatores ( $F_{1,29} = 0,34, p = 0,56$ ).

No que diz respeito ao tempo total nos braços a ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: cirurgia) revelou efeito significativo para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,29} = 4,62; p < 0,05$ ), mas não mostrou efeito significativo para o fator cirurgia ( $F_{1,29} = 1,83; p = 0,19$ ) e não mostrou interação entre os fatores ( $F_{1,29} = 2,62, p = 0,12$ ).

Na análise da medida tempo no centro a ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: cirurgia) mostrou efeito significativo para o fator tipo de labirinto ( $F_{1,29} = 4,62, p < 0,05$ ), mas não mostrou efeito significativo para o fator cirurgia ( $F_{1,29} = 1,83, p = 0,19$ ) e não mostrou valor significativo para a interação entre os fatores ( $F_{1,29} = 2,62, p = 0,12$ ).



**Figura 10:** Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase (A, n=16-17) e segunda fase (B, n=8-9) do teste de formalina em ratos sham operados (controle) e ratos adrenalectomizados (ADX) expostos ao LCEf e LCEa. Animais foram expostos ao LCEf ou LCEa somente durante a segunda fase do teste de nocicepção. Barras: Média ± EPM. \* p < 0,05 vs sham/ LCEf.

**Tabela 6:** Comportamentos Espaço - Temporais Analisados durante Exposição ao LCEf ou LCEa, por 10 minutos.

<b>Comportamentos</b>	<b>Sham/LCEf</b>	<b>Sham /LCEa</b>	<b>ADX/LCEf</b>	<b>ADX/LCEa</b>	<b>ANOVA</b>
<b>Entradas Totais nos Braços</b>	21,25 ± 2,48	25,88 ± 2,83	19 ± 3,26	20,44 ± 2,33	Não Significativo
<b>Tempo Total nos Braços</b>	399,75 ± 31,18	498 ± 15,78	477,25 ± 27,16	491,11 ± 27,06	Significativo para o Fator Labirinto
<b>Tempo no Centro</b>	200,25 ± 31,18	102,00 ± 15,78	122,75 ± 27,16	108,89 ± 27,06	Significativo para o Fator Labirinto

#### 4. ETAPA II: INFLUÊNCIA DO ESTÍMULO AVERSIVO (LCEa) E DAS DIFERENÇAS RELACIONADAS AO SEXO NA DURAÇÃO DA ANTINOCICEPÇÃO E ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS CANABINÓIDES NA SUA MODULAÇÃO

##### 4.1 Material e métodos

###### Sujeitos:

Foram utilizados ratos Sprague Dawley adultos machos (213-290g) e fêmeas (162-219g, experimento VI), provenientes de Harlan, Kent WA, EUA. Os animais foram mantidos sob ciclo claro/escuro invertido de 12 horas (luzes acesas: 19h), em um ambiente com temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Alimento e água foram disponíveis *ad libitum*, exceto durante as breves sessões de teste. Os animais foram habituados e manuseados por pelo menos três dias antes do teste, conforme o procedimento de cada experimento. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas preconizadas pelo “National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Esforços foram realizados para minimizar o número e sofrimento potencial de sujeitos.

###### Fármacos:

AM 251 [(N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide)], antagonista CB1, na dose de 1 mg/kg (i.p.) diluída em solução veículo de DMSO (dimetilsulfóxido 60% em salina). A dose de AM 251 foi determinada com base no estudo anterior (WILSON et al, 2008).

###### Equipamentos:

Em todos experimentos os animais foram posicionados na sala, onde permaneceram por um período de 1 hora sob luminosidade reduzida para habituação ao local.

###### Labirinto em cruz elevado

Foram utilizados o LCEf e LCEa similares àqueles utilizados nos experimentos prévios (*ver o tópico labirinto em cruz elevado descrito na etapa I*).

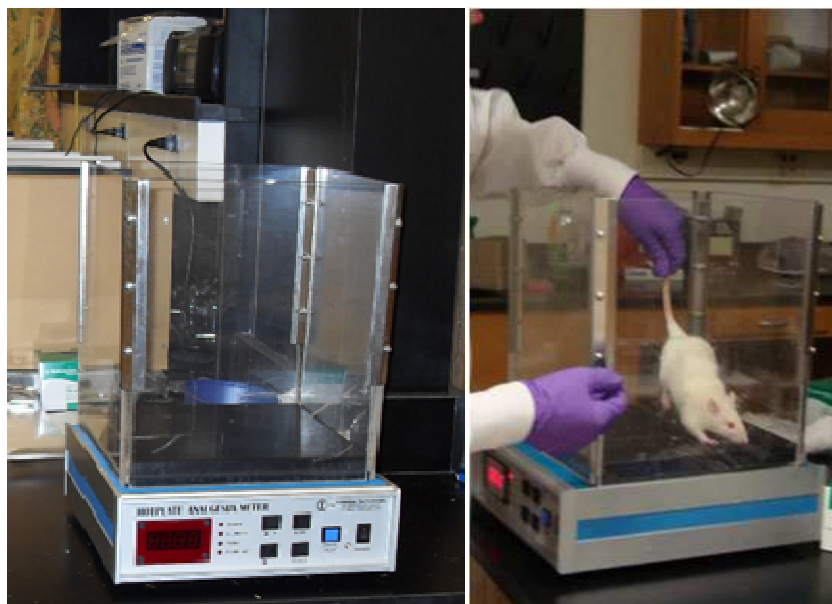
**Testes de nocicepção:****Teste de formalina**

Na etapa II, o teste de formalina também foi utilizado (*ver o procedimento em teste de formalina na etapa I*).

**Teste de placa quente (*Hot Plate test*)**

O teste consiste em introduzir o rato em um espaço retangular com um solo constituído de um prato composto por um conjunto de lâminas ou barras que podem ser aquecidas por energia elétrica (Figura 11). O prato aquecido a uma temperatura constante produz nos animais dois componentes comportamentais que podem ser medidos quanto ao tempo de reação. Estes componentes são: lambidas na pata e saltos, as quais são consideradas respostas supraespinhais integradas (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

No experimento VI, a nocicepção foi avaliada usando-se o teste de placa quente (Figura 11). Este teste consistiu em medir a latência para o rato lambar uma pata traseira quando colocado na placa quente (52,4 °C). Os animais foram testados no teste de placa quente imediatamente (0 minutos) após exposição ao LCEf ou LCEa. Animais não responsivos foram retirados do aparelho dentro de 50 segundos.



**Figura 11:** Teste da placa quente (hot plate test).

### **Experimento VI: Duração da antinocicepção induzida pelo LCEa e influência de fatores ligados ao sexo**

No primeiro dia de teste, ratos machos e fêmeas ingênuos foram expostos ao LCEf ou LCEa por dez minutos. Imediatamente (0 minutos) após exposição ao LCEf ou LCEa, os animais foram expostos ao teste de placa quente. Além dos grupos expostos ao LCEf ou LCEa, um outro grupo de animais que permaneceram na gaiola viveiro também foi submetido ao teste de placa quente como uma situação controle para a exposição ao LCE (fechado ou aberto).

Um dia após a primeira exposição, os animais foram testados novamente. Neste teste, os animais expostos ao LCEf ou LCEa no primeiro dia de teste foram respectivamente expostos ao LCEa e LCEf. Animais do grupo gaiola viveiro foram mantidos no mesmo grupo, sem alteração no segundo dia de teste.

### **Experimento VII: Modulação canabinóide da antinocicepção induzida pelo LCEa**

Ratos machos receberam injeção intraperitoneal (i. p.) de veículo (DMSO 60%) ou AM 251 (1 mg/kg). Quinze minutos após a injeção, os animais foram tratados com solução de formalina a 2,5% na pata traseira direita (*veja teste de formalina*). Em seguida, o tempo de lambidas na pata traseira direita (primeira fase do teste de formalina) foi registrado em uma caixa de acrílico por 5 minutos. Vinte e cinco minutos após a injeção de formalina os animais foram expostos ao LCEf ou LCEa por 10 minutos, quando era registrado o tempo de lambidas na pata.

### **Análise Comportamental**

A resposta nociceptiva foi registrada no momento do experimento e a frequência de entradas e tempo nos braços do LCEf ou LCEa foram gravados através de um circuito de filmadora-vídeo-cassete-TV para posterior análise da resposta.

## **4.2 Análise dos resultados**

### **Análise estatística:**

Dados da primeira fase do teste de formalina (Experimento VII) foram analisados usando o teste *t* de Student para amostras independentes (fator independente: tratamento).

Para os experimentos realizados com o teste de placa quente e para a segunda fase do teste de formalina os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores (Experimento VI: fator 1: Ambiente de exposição; fator 2: sexo; Experimento VII: fator 1: tipo de labirinto; fator 2: tratamento). Nos casos em que os valores de F foram significativos os dados foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Newman Keuls. Em todos os casos, o valor de  $p \leq 0.05$  foi considerado significativo.

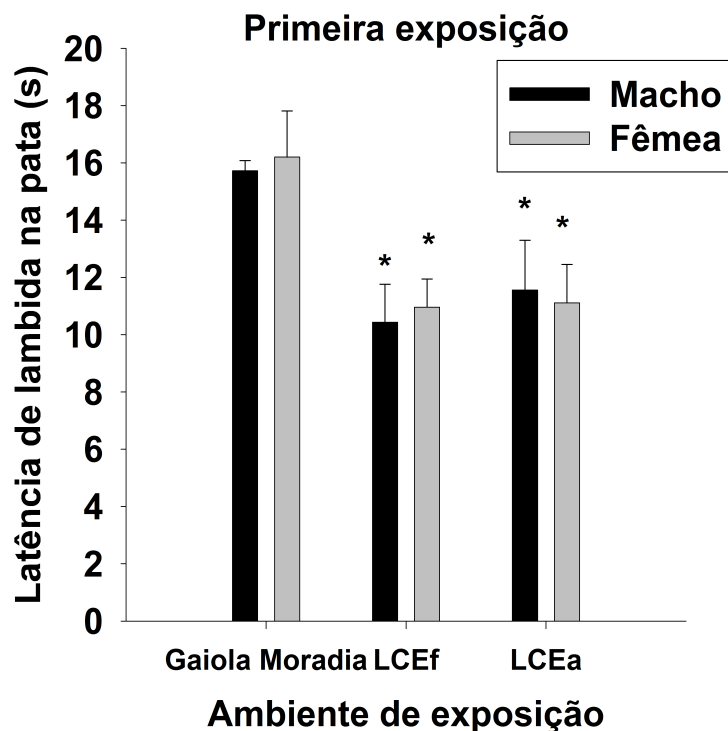
### 4.3 Resultados

#### **Experimento VI: Duração da antinocicepção induzida pelo LCEa e influência de fatores ligados ao sexo.**

##### **Primeiro Dia de Teste**

A Figura 12 mostra a latência de lambida na pata traseira de ratos machos e fêmeas submetidos ao teste de placa quente (52,4 °C) imediatamente após a exposição aos LCEf ou LCEa. A ANOVA de dois fatores (fator 1: Ambiente de exposição; fator 2: Sexo) revelou efeito significativo para o fator ambiente de exposição [ $F(2,43) = 9,02, p < 0,05$ ] mas não mostrou significância para o fator sexo [ $F(1,43) = 0,03, p > 0,05$ ] e nem interação entre os fatores ambiente de exposição e sexo [ $F(2,43) = 0,08, p > 0,05$ ]. O teste post hoc de Newman Keuls revelou que animais expostos ao LCEf ou ao LCEa apresentam latência de lambida na pata traseira significativamente menor quando comparados aos animais mantidos na gaiola moradia ( $p < 0,05$ ).

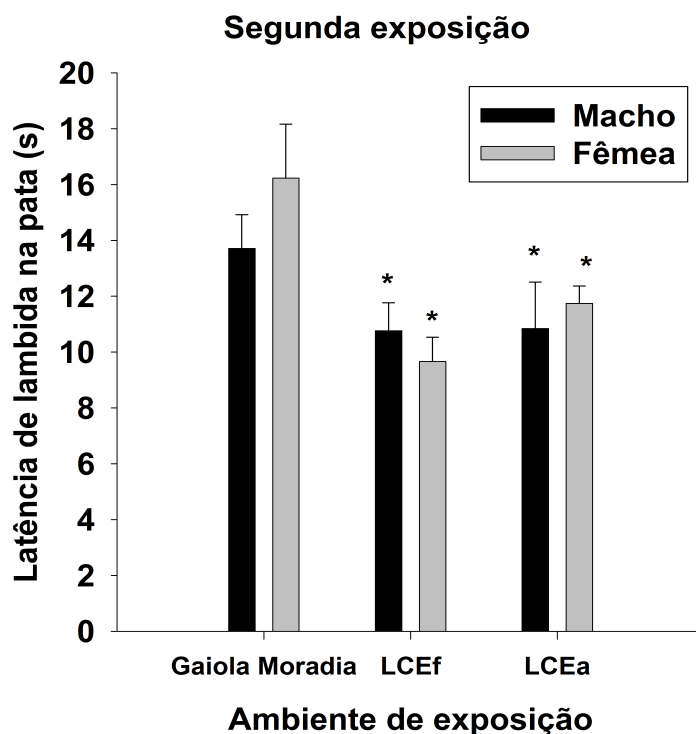




**Figura 12:** Latência de lambida na pata (s) traseira de ratos machos e fêmeas testados no teste de placa quente (52,4 °C) imediatamente após a exposição ao LCEf ou LCEa (n= 9-8). \*  $p < 0,05$  vs gaiola moradia.

### Segundo Dia de Teste

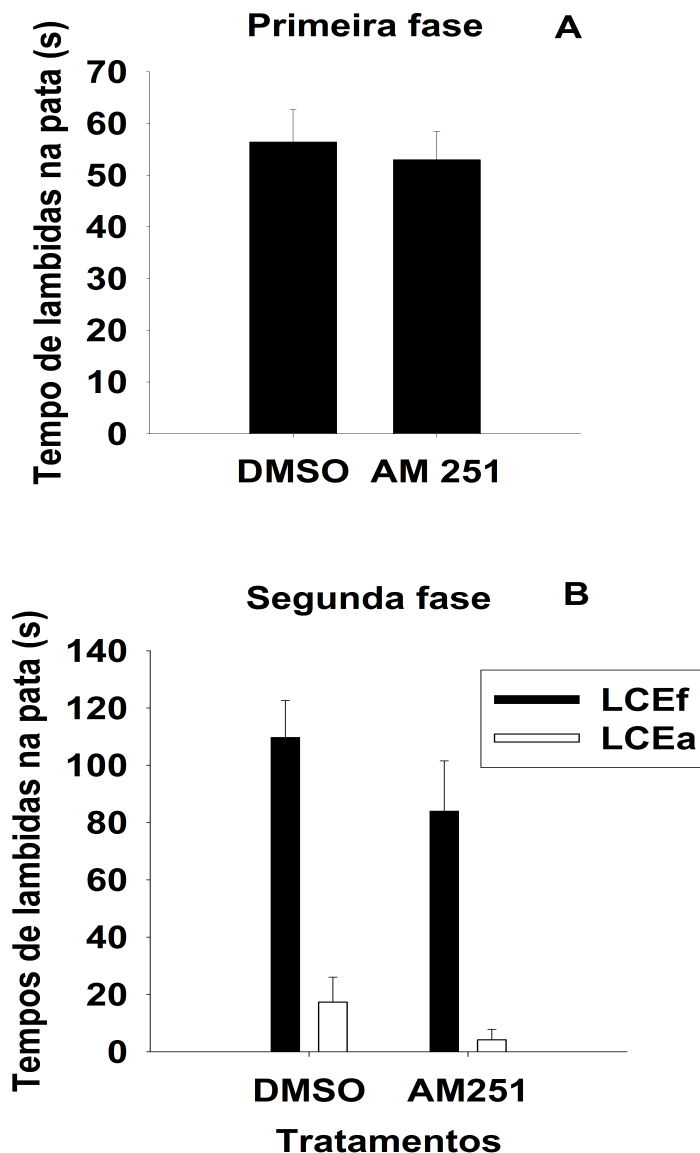
A Figura 13 mostra a latência de lambida na pata traseira de ratos machos e fêmeas testados no hot plate (52,4 °C) imediatamente após a exposição ao LCEf ou LCEa, no segundo dia de teste. Da mesma forma que no primeiro dia de teste, a ANOVA de dois fatores (fator 1: Ambiente de exposição; fator 2: Sexo) mostrou efeito significativo para o fator ambiente de exposição [ $F(2,41) = 7,15, p < 0,05$ ] mas não revelou significância para o fator sexo [ $F(1,41) = 0,49, p > 0,05$ ] e nem interação entre os fatores ambiente de exposição e sexo [ $F(2,41) = 0,92, p > 0,05$ ]. O teste post hoc de Newman Keuls revelou que animais expostos ao LCEf ou ao LCEa apresentam latência de lambida na pata traseira significativamente menor quando comparados a animais mantidos na gaiola moradia ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13:** Latência de lambida na pata (s) traseira de ratos machos e fêmeas testados no teste de placa quente (52,4 °C) imediatamente após a segunda exposição ao LCEf ou LCEa (n= 9-7). Um dia após a primeira exposição, ratos que haviam sido previamente expostos ao LCEf ou ao LCEa foram respectivamente expostos ao LCEa ou LCEf. Animais do grupo gaiola viveiro foram mantidos no mesmo grupo, sem alteração no segundo dia de teste. \*  $p < 0,05$  vs gaiola moradia.

### Experimento VII: Modulação canabinóide da antinociceção induzida pelo LCEa.

A Figura 14 mostra o tempo de lambidas na pata em ratos previamente tratados com DMSO ou AM 251 (1 mg/kg), durante a primeira (fase 1, figura A) e a segunda fase (fase 2, B) do teste de formalina (formaldeído 2,5%). Como pode ser observado na Figura 15A, o teste *t* de Student não revelou diferenças significativas entre os grupos tratados com DMSO e AM 251 [ $t(26) = 0,41, p > 0,05$ ]. Já na Figura 15B, a ANOVA de dois fatores (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: tratamento) revelou efeito significativo para o fator tipo de labirinto [ $F(1,24) = 52,75, p < 0,05$ ] e ausência de efeito significativo para o fator tratamento [ $F(1,24) = 2,68, p > 0,05$ ], assim como ausência de interação entre os fatores tipo de labirinto x tratamento [ $F(1,24) = 0,28, p > 0,05$ ].



**Figura 14:** Tempo de lambidas na pata traseira de ratos machos previamente tratados com DMSO ou AM251 e submetidos ao teste de formalina. (A) Tempo de lambidas na pata durante a primeira fase do teste de formalina (n=14/ grupo). (B) Tempo de lambidas na segunda fase do teste de formalina em ratos expostos ao LCEf ou LCEa (n=7/grupo).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Etapa I

Os principais resultados da etapa I deste trabalho demonstram que ratos expostos ao LCEa exibem uma antinocicepção de alta magnitude que é resistente a pelo menos seis exposições diárias à situação aversiva (LCEa). Ratos tolerantes à morfina expostos ao LCEa foram mais reativos à formalina quando comparados a ratos não tolerantes, sugerindo que este tipo de inibição da dor mostra algum grau de tolerância cruzada à morfina. Entretanto, administração sistêmica de naltrexona prévia à exposição não antagonizou este tipo de inibição da dor, sugerindo que mecanismos opióides não estão envolvidos na modulação da antinocicepção provocada pelo LCEa. Além disso, a adrenalectomia não alterou a resposta antinociceptiva avaliada durante exposição ao LCEa, sugerindo que a antinocicepção induzida pelo LCEa não é mediada pela corticosterona plasmática. Os resultados desta etapa são discutidos em detalhes abaixo.

### Experimento I

Como demonstrado na Figura 4, os animais tratados com morfina (5 mg/kg) apresentaram redução significativa no IA do quinto dia de tratamento em relação ao primeiro. Embora o IA do quinto dia de tratamento com morfina esteja significativamente diferente de seu controle água destilada, tais resultados sugerem que houve tolerância devido à diferença significativa entre os IA nos dias 1 e 5 de ratos tratados com morfina.

Detectada a tolerância, no dia seguinte os animais foram tratados com formalina na superfície plantar da pata traseira direita. Como demonstrado na Figura 5A, o grupo previamente tratado com morfina apresentou um tempo de lambidas na pata significativamente maior quando comparado ao grupo controle, água destilada, caracterizando um processo de hiperalgesia. Conciliando os resultados exibidos nas Figuras 4 e 5A, sugere-se que estes animais estavam tolerantes ao efeito antinociceptivo da morfina. Em apoio a essa interpretação existem várias evidências na literatura demonstrando que o desenvolvimento de tolerância antinociceptiva opióide tem sido associado à hiperalgesia (OSSIPOV et al., 2005; MAO et al., 1994; MAO et al., 2002; GARDELL et al., 2006).

Dentro deste contexto, vale ressaltar que a síndrome de retirada tem sido associada à tolerância, sendo fator indicativo de dependência (GRAEFF, 2005). Ainda, essa

síndrome pode ser reproduzida em animais experimentais e no caso de opióides os sinais são: estados dolorosos intensos, fenômenos neurovegetativos, como horripilação, cólicas, diarreia (RANG et al., 2007; GRAEFF, 2005). Tais manifestações de retirada variam no tempo conforme o tipo de fármaco. No caso dos opióides, o risco é alto a partir do primeiro dia (GRAEFF, 2005). Sendo assim, a hiperalgesia presente durante a primeira fase do teste de formalina pode ser decorrente da retirada de morfina já que a última administração deste agonista opioide foi realizada no dia anterior ao teste de formalina.

Nesse sentido, Dong et al. (2006) demonstraram que a retirada de morfina por 18 horas ou por quatro dias não só causou hiperalgesia, como indicado por latências reduzidas do tail flick, como também levou à tolerância de efeitos antinociceptivos de morfina aguda. Além disso, ratos tolerantes expostos a uma situação estressante (plataforma elevada) por trinta minutos exibiram redução ainda maior na latência de retirada da cauda como avaliado através do teste de *tail flick*. Nesse sentido, é possível que situação similar tenha ocorrido no presente experimento, visto que os ratos foram tratados com morfina por cinco dias, período no qual foi detectada tolerância, e, no dia seguinte, receberam injeção de formalina na pata, o que poderia atuar como um estressor reduzindo o limiar nociceptivo destes animais.

Embora a tolerância antinociceptiva à morfina tenha sido demonstrada nos animais submetidos ao teste de retirada da cauda, não era conhecido se essa perda dos efeitos analgésicos deste agonista opioide ocorreria também no teste da formalina em animais expostos a um outro ambiente. Para isso, após a primeira fase do teste de formalina, os animais receberam mais uma injeção de água destilada ou morfina e, 20 minutos após este tratamento, foram expostos por 10 minutos a uma arena para o registro do tempo de lambidas na pata. De acordo com a Figura 5B o grupo água destilada/morfina apresentou um tempo de lambidas na pata significativamente menor quando comparado aos grupos água destilada/água destilada, morfina/água destilada e morfina/morfina. Conforme estes resultados, o grupo tratado com água destilada/morfina exibiu um efeito antinociceptivo causado pelo tratamento agudo de morfina. Já o grupo morfina/morfina não mostrou diferença quando comparado ao grupo água destilada/água destilada, demonstrando, assim, a ocorrência de tolerância antinociceptiva à morfina. Estes dados corroboram os resultados apresentados por Detweiler et al. (1995), em que ratos submetidos ao tratamento com *pellets* de morfina (75 mg) ou veículo por cinco dias consecutivos exibiram tolerância opioide avaliada pelo teste de formalina a 5 %.

Uma vez demonstrada a tolerância antinociceptiva à morfina através do teste de formalina (segunda fase), o segundo experimento foi realizado para investigar se ratos

tolerantes aos efeitos antinociceptivos da morfina mostravam-se também tolerantes aos efeitos antinociceptivos da exposição ao LCEa. Se assim, teríamos o fenômeno de tolerância cruzada nos efeitos antinociceptivos da morfina e da exposição ao ambiente potencialmente aversivo.

## **Experimento II**

No experimento II, os resultados obtidos através do teste de LRC (figura 6) mostram a tolerância antinociceptiva obtida através da administração sistêmica repetida de morfina. Em seqüência a esse resultado a Figura 7A mostra a hiperalgisia desenvolvida em ratos tolerantes durante a primeira fase do teste de formalina quando comparados ao grupo controle (AD). Juntos, esses resultados reproduzem aqueles obtidos no experimento I, visto que foram utilizados os mesmos procedimentos relatados no experimento anterior, com exceção de que, após a primeira fase do teste de formalina, os animais não receberam tratamento algum e foram expostos ao LCE, e não a uma arena.

Quanto aos resultados obtidos com exposição de ratos ao LCEf ou LCEa durante a segunda fase do teste de formalina, a Figura 7B mostra que ratos não tolerantes expostos ao LCEa gastam menos tempo lambendo a pata quando comparados ao grupo exposto ao LCEf com o mesmo tratamento prévio. Assim, estes resultados corroboram resultados anteriores em que camundongos submetidos ao teste de formalina e expostos ao LCEa exibem antinocicepção de considerável magnitude (MENDES-GOMES & NUNES-DE-SOUZA, 2005; 2009).

Curiosamente, na segunda fase do teste de formalina (Figura 7B), os animais tolerantes não expressaram hiperalgisia quando expostos ao LCEf, um ambiente potencialmente não aversivo, já que os quatro braços são fechados por paredes. Uma possibilidade para esta ausência de hiperalgisia poderia estar relacionada ao efeito de exposição a um ambiente novo. Em acordo com esta hipótese, estudos demonstram que a presença de estressores, tais como um ambiente novo, pode levar à redução de comportamentos relacionados à dor (ABOTT et al., 1986; SIEGFRIED et al. 1987), demonstrando, portanto, que o ambiente novo pode interferir na resposta nociceptiva.

Entretanto, quando os animais foram submetidos a primeira fase do teste de formalina em uma caixa de vidro, à qual também não haviam sido familiarizados, a expressão de hiperalgisia se fez presente. Tal resultado sugere que a ausência de hiperalgisia durante a segunda fase não seja devida ao efeito de exposição a um ambiente novo. Por outro lado, não podemos deixar de mencionar que as dimensões da caixa de vidro (30 x 20 x 25 cm), onde o tempo de lambidas foi medido durante a primeira fase, e as do LCEf, onde foi avaliada a

segunda fase, são diferentes. Assim, a exploração de um ambiente maior poderia ser um fator concorrente com a nocicepção. Em apoio a esta hipótese, Carvalho-Netto et al. (2006) têm demonstrado que a resposta motora de camundongos pré-tratados com D,L homocisteico (DLH) na MCP dorsolateral pode ser influenciada pelas características do ambiente em que os animais são testados. Nesse estudo, os autores demonstram que camundongos que receberam microinjeção de DLH na MCP dorsolateral e foram submetidos a uma arena, situação com pouca disponibilidade de espaço, apresentaram como resposta predominante comportamento de saltos, enquanto camundongos submetidos à bateria de teste de defesa para camundongo (Mouse Defense Test Battery, MDTB) exibiram principalmente o comportamento de corrida (galopes) e pequena quantidade de saltos. Neste sentido, é possível que as dimensões do ambiente de exposição possam ter influenciado na resposta nociceptiva observada no presente estudo.

Semelhante aos resultados descritos no experimento I, no experimento II os animais tolerantes à morfina exibiram hiperalgisia durante a primeira fase do teste de formalina quando a nocicepção foi avaliada 24 h após a última dose de morfina. Ainda, no experimento I, ratos tolerantes tratados com morfina imediatamente após a primeira fase do teste de formalina (5 minutos após a injeção de formalina) não exibiram antinocicepção avaliada durante a segunda fase do teste de nocicepção. Ambos os grupos M/AD e M/M exibiram tendência em aumentar a resposta nociceptiva quando comparados ao grupo AD/AD, sugerindo que ratos tolerantes à morfina foram mais reativos ao estímulo doloroso que os não tolerantes. Embora um resultado similar seria esperado para ratos tolerantes à morfina expostos ao LCEf, é provável que a falta de hiperalgisia neste grupo seja devida a uma resposta nociceptiva teto à formalina, isto é, esta solução não teria sido suficientemente algogênica para induzir tempo de lambida na pata injetada superior a aproximadamente 120 segundos, durante os 10 minutos de teste. Nossos resultados parecem apoiar os achados de Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza (2005), que demonstraram um perfil nociceptivo semelhante em camundongos que receberam injeção de formalina na pata e foram expostos ao LCEf. Ao contrário dos animais expostos a esse ambiente (LCEf), é possível que o aumento do tempo gasto em lambidas na pata injetada, observado para os ratos tolerantes e expostos ao LCEa, seja também uma resposta hiperalgésica à formalina e não decorrente de tolerância cruzada ao tratamento com morfina.

Todavia, o grupo tolerante à morfina exposto ao LCEa apresentou um tempo de lambidas na pata significativamente maior quando comparado ao grupo não tolerante e exposto ao mesmo ambiente, tornando intrigante a possibilidade de existência de tolerância

cruzada à morfina em ratos expostos ao LCEa. Se assim, o envolvimento de mecanismos opióides na reversão da antinocicepção eliciada pelo LCEa estaria fortalecido. Uma série de evidências indicam que a MCP está envolvida no desenvolvimento de tolerância à morfina (ex., MORGAN et al., 2005; LANE et al., 2005) e também na modulação da resposta nociceptiva relacionada a reações de medo (ex., MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). Estudos anteriores têm salientado que tipos emocionais distintos assim como diferenças na mediação analgésica estão relacionados à estimulação de diferentes colunas da matéria cinzenta periaquedutal (BANDLER et al., 2000; KEAY; BANDLER, 2001). Enquanto a ativação da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (MCPdl) e lateral (MCPl), com injeção de aminoácido excitatório (AAE), desencadeia reações ativas seguidas por analgesia não-opióide, a estimulação da MCP ventrolateral (MCPvl) evoca reação passiva e analgesia mediada por opióides. Neste sentido, Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza (2009) têm demonstrado que tanto a lesão unilateral como bilateral da MCPdl não alteram a antinocicepção induzida pelo LCEa em camundongos submetidos ao teste de formalina. Tais evidências podem fornecer alguns indícios de que a MCPvl seja um local provável para a reversão da antinocicepção eliciada pelo LCEa em ratos tolerantes à morfina. Para responder a tal questionamento, seria necessário investigar se a antinocicepção eliciada pelo LCEa é revertida por um antagonista opióide. Para tanto, foi realizado o experimento IV (discussão adiante).

Por outro lado, a expressão da proteína Fos tem sido identificada em diversas estruturas límbicas de animais expostos ao LCE (DUNCAN et al., 1996; HINKS et al., 1996; SILVEIRA et al., 1993). Por exemplo, Hinks et al. (1996) demonstraram que a exposição de ratos ao LCE resulta em aumento na expressão de proteína Fos no córtex piriforme, giro do cíngulo, hipocampo, amígdala, e MCP, estruturas integrantes do sistema de defesa dos animais. Portanto, outra possibilidade para os resultados aqui encontrados, seria a participação de outras estruturas do sistema de defesa, que não a MCP, na modulação de mecanismos opióides envolvidos na antinocicepção eliciada pelo LCEa.

Quanto às medidas espaço-temporais (Tabela 3) realizadas durante este experimento, os animais expostos ao LCEa permaneceram mais tempo nos braços deste aparelho em comparação àqueles que foram expostos ao LCEf. Como um resultado “em espelho”, os animais que foram expostos ao LCEf permaneceram mais tempo no centro em relação àqueles que foram expostos ao LCEa. Não houve diferença no número de entradas nos braços entre os animais expostos ao LCEf ou LCEa. Assim, a administração sistêmica de morfina parece não ter provocado nenhum efeito locomotor neste teste já que não há



diferenças nas entradas nos braços dos LCE entre os grupos tratados com morfina e água destilada.

### **Experimento III**

A Figura 8A mostra resultados obtidos durante a primeira fase do teste de formalina. Como pode ser observado, não há diferenças significativas no tempo de lambidas na pata em ratos expostos sucessivamente ao LCEa quando comparados a ratos expostos sucessivamente ao LCEf.

Já na Figura 8B, pode-se observar que há um efeito de labirinto, ou seja, o número de lambidas na pata em animais expostos ao LCEa é significativamente menor quando comparado aos animais expostos ao LCEf. Todavia, duas, três, quatro ou seis reexposições diárias ao LCEa não mudaram a resposta antinociceptiva quando comparada a uma única exposição ao aparelho. Dentro deste contexto, tem sido demonstrado que a antinocicepção induzida por encontros agressivos sucessivos é extinguida após encontros diários em camundongos. Tal ausência de resposta antinociceptiva é insensível a uma dose analgésica de morfina, indicando um fenômeno de tolerância cruzada (MICZEK; THOMPSON; SHUSTER, 1982). Seguindo a linha de raciocínio dos experimentos anteriores, como houve a atenuação da antinocicepção em animais expostos ao LCEa (experimento II), esperava-se que com exposições sucessivas ao LCEa a antinocicepção eliciada por este aparelho fosse revertida. No entanto, como os resultados do presente estudo mostram, a antinocicepção eliciada pelo LCEa não sofre tolerância a exposições sucessivas neste aparelho. Estes resultados fortalecem a hipótese de que os mecanismos envolvidos na antinocicepção induzida pelo LCEa não dependem de ativação opióide endógena.

Outro ponto que merece destaque no que diz respeito a resultados obtidos neste experimento é o fato de que alguns autores demonstram a ausência de efeitos de fármacos ansiolíticos clássicos na segunda exposição ao LCEp. Assim, roedores expostos pela primeira vez ao LCEp apresentam um aumento característico na exploração dos braços abertos e redução em comportamentos de avaliação de risco após a administração de fármacos ansiolíticos. Todavia, sujeitos previamente expostos ao LCEp (teste 1) não respondem a estes fármacos no teste 2 (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Dentre as várias explicações para tal fenômeno estão a possibilidade de uma sensibilização experimentalmente induzida de medo/ansiedade (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2000), e/ ou uma mudança qualitativa na natureza da resposta aversiva desencadeada entre os testes, de uma resposta de medo incondicionado a uma resposta de esquiva aprendida (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2004), nas quais fármacos

ansiolíticos testados não demonstraram efeito (BERTOGLIO; CAROBREZ, 2003). Assim, é possível que a exposição ao LCEa desencadeie uma resposta comportamental de medo, uma vez que a antinocicepção provocada por essa situação aversiva não sofreu tolerância. Em apoio a esta hipótese estão os achados apresentados por Baptista et al. (2009), que demonstraram que a antinocicepção induzida por confinamento de camundongos ao braço aberto do LCE permaneceu inalterada durante uma segunda reexposição ao modelo. Ainda, tais autores demonstraram que microinjeções de midazolam, um agonista benzodiazepínico, na amígdala atenuaram antinocicepção induzida pelo braço aberto em camundongos sem experiência prévia ao braço aberto do LCE. De modo intrigante, esses autores observaram que o benzodiazepínico não alterou a antinocicepção de camundongos reexpostos ao braço aberto deste aparelho. Segundo Baptista et al. (2009), a falta de efeito da microinjeção de midazolam na amígdala sobre a antinocicepção induzida pelo braço aberto do LCE em camundongos reexpostos ao LCE sugere que o fenômeno de “one-trial tolerance” é também observado na modulação de nocicepção e que o receptor GABAA/ benzodiazepínico, localizado dentro desta estrutura prosencefálica, participa neste processo.

No que diz respeito às medidas espaço-temporais (Tabela 4), os animais que foram expostos ao LCEa apresentaram maior número de entradas nos braços do que aqueles que foram expostos ao LCEf, indicando um aumento na atividade locomotora em animais que foram expostos ao ambiente aversivo.

#### **Experimento IV**

Como demonstrado na Figura 9A, durante a primeira fase do teste de formalina ratos tratados com naltrexona exibiram tempo de lambidas na pata significativamente menor quando comparados ao grupo salina, indicando um possível efeito antinociceptivo deste fármaco. A literatura relata que este antagonista opióide aumenta o efeito antinociceptivo da morfina quando utilizado em doses ultra-baixas (ver POWELL et al., 2002; SHEN; CRAIN, 1997; MCNAULL et al., 2007) em testes de nocicepção como o teste de retirada da cauda e o teste de pressão na pata. Entretanto, nestes estudos não houve efeito antinociceptivo da naltrexona por si só. Todavia, Powell et al. (2002) também mostraram que a dose de 2 mg/kg deste antagonista opióide, co-administrada com morfina, reverte os efeitos antinociceptivos deste fármaco. Diante de tais resultados, considerando que a dose de naltrexona utilizada no presente estudo foi de 2,5 mg/Kg, não seria esperado que tal fármaco produzisse antinocicepção. Nesse sentido, outros estudos tem demonstrado efeito antinociceptivo de naltrexona. Por exemplo, Choi et al. (2003) mostraram que camundongos

tratados com naltrexona intraperitoneal, nas doses de 10 e 20 mg/kg, exibem antinocicepção durante a segunda fase do teste de formalina. Embora nossos resultados demonstrem um efeito antinociceptivo deste fármaco em ratos, tal efeito se dá somente na primeira fase do teste de formalina. Diante de tais resultados é preciso considerar as diferenças na metodologia utilizada. No estudo realizado por Choi et al. (2003) foi utilizada espécie e doses de naltrexona diferentes e, ainda, o teste de formalina foi realizado com formalina 1% e injeção de 10  $\mu$ L de solução na pata.

Outra possibilidade de explicação para os resultados da primeira fase do teste de formalina (Figura 9A), seria um possível efeito ansiogênico da naltrexona. Neste contexto, estudos têm demonstrado um efeito deste antagonista de receptores opióides em comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. Por exemplo, Lee e Rodgers (1990) demonstraram que, em camundongos expostos ao LCE, a dose de 10 mg/kg de naltrexona provocou uma redução do tempo gasto nos braços abertos do LCE juntamente com um aumento no tempo combinado gasto no centro e braço fechado, indicando um efeito ansiogênico. De forma interessante, neste mesmo estudo tal fármaco também provocou um aumento da antinocicepção em camundongos expostos ao LCE e testados no *tail flick*. Segundo esses autores, tal aumento na antinocicepção ocorre devido ao efeito ansiogênico causado pela naltrexona. Nesse sentido, é possível que a naltrexona tenha exercido um efeito ansiogênico nos ratos durante a primeira fase do teste de formalina e, desta forma, provocado antinocicepção. No entanto, a avaliação do estado emocional induzido pelo antagonista opióide não foi objeto de investigação do presente estudo.

Quanto à segunda fase do teste de formalina, a naltrexona parece não ter provocado efeito antinociceptivo intrínseco, visto que ratos expostos ao LCEf não demonstraram qualquer diferença significativa quando comparados aos tratados com salina e expostos ao mesmo LCE (LCEf). Desta forma, observando-se os resultados obtidos com ratos tratados com naltrexona e expostos ao LCEa pode-se afirmar que este antagonista opióide não seletivo não reverteu a antinocicepção eliciada por este aparelho, visto que tal grupo não foi significativamente diferente daquele tratado com salina e exposto ao LCEa. Tais resultados corroboram os estudos realizados por Lee e Rodgers (1990), que demonstraram que a exposição ao LCE padrão (LCEp) resulta em antinocicepção não opióide, uma vez que não é bloqueada por naltrexona e não apresenta tolerância cruzada com morfina (LEE; RODGERS, 1990). E, ainda, nossos resultados também corroboram os estudos demonstrados por Nunes-de-Souza et al. (2000), que demonstraram ser a antinocicepção induzida pelo confinamento no

braço aberto do LCE insensível ao tratamento sistêmico com naloxona. Assim, é provável que a antinocicepção elicitada pelo LCEa envolva mecanismos não opióides.

### **Experimento V**

Como um típico estressor, a injeção de formalina associada com a exposição ao LCEa poderia induzir ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal levando a aumentos no hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e níveis de corticosterona plasmática, que por sua vez poderiam aumentar comportamentos relacionados à ansiedade. Desta forma, este experimento foi realizado para investigar se a remoção cirúrgica de glândulas adrenais poderia impedir a antinocicepção induzida pelo LCEa. Como ilustrado na Figura 10A, durante a primeira fase do teste de formalina, ratos adrenalectomizados não exibiram diferença no tempo de lambidas na pata quando comparados ao grupo sham (controle).

Já durante a segunda fase do teste, conforme ilustrado na Figura 10B, os animais sham expostos ao LCEf exibiram um tempo de lambidas na pata significativamente maior quando comparados aos grupos sham/LCEa e ADX/LCEf. Naturalmente, não foi surpresa que o grupo sham e exposto ao LCEa tenha apresentado antinocicepção, visto que os experimentos anteriores demonstraram que ratos expostos ao LCEa exibem uma antinocicepção significativa em relação ao grupo exposto ao LCEf. No entanto, os animais submetidos à adrenalectomia também não alterou o perfil da antinocicepção induzida pelo LCEa.

Curiosamente, o grupo ADX/LCEf exibiu menos tempo de lambidas na pata quando comparado aos ratos sham operados e expostos ao mesmo ambiente, sugerindo um efeito antinociceptivo. Dentro deste contexto, Taylor et al. (1998) têm demonstrado que o teste de formalina induz aumento nos níveis de ACTH e corticosterona, principalmente durante a sua segunda fase. Ainda, tais autores demonstraram que a liberação de corticosterona plasmática não reduz o processamento nociceptivo provocado pelo teste de formalina. Entretanto, Vissers et al. (2004) têm demonstrado que ratos adrenalectomizados (ADX) exibem redução em mais de 50 % na reatividade a comportamentos relacionados à dor durante a primeira e segunda fases do teste de formalina. Ainda, tais autores demonstraram que animais ADX e tratados com formalina (5%) exibem níveis aumentados de beta-endorfina e hormônio ACTH plasmático. Segundo tais autores, visto que o pró-hormônio do ACTH é a pró-opiomelanocortina (POMC), que também é precursora da beta-endorfina, níveis plasmáticos aumentados de ACTH possivelmente refletem maior concentração de POMC e, conseqüentemente, de beta-endorfina, que, por sua vez, pode agir nos receptores

opióides atenuando a dor. Em outras palavras, ocorreria a redução das respostas nociceptivas em ratos adrenalectomizados e expostos à formalina. Segundo esses autores, tal pressuposto é reforçado pelo fato de que a redução nos comportamentos nociceptivos em ratos ADX foi revertida por naloxona.

Embora no presente estudo não tenha sido demonstrado redução em comportamentos nociceptivos em ratos adrenalectomizados durante a primeira fase do teste de formalina é possível que tal mecanismo tenha ocorrido durante a segunda fase do teste nociceptivo, quando os animais foram expostos aos LCEf ou LCEa. Talvez, durante a segunda fase do teste de formalina a exposição ao LCEf ou LCEa tenha sido um fator estressante adicional ao estresse da formalina e, juntos, tais fatores tenham provocado uma redução no comportamento nociceptivo. Isto explicaria a antinocicepção presente em ratos expostos ao ambiente potencialmente não aversivo, como o LCEf.

Quanto às medidas espaço-temporais (Tabela 6), os animais que foram expostos ao LCEa apresentaram tempo total nos braços maior quando comparados a ratos expostos ao LCEf. Da mesma forma que o grupo exposto ao LCEa apresentou tempo no centro reduzido quando comparado ao grupo exposto ao LCEf.

## 5.2 Etapa II

Os principais resultados da etapa II deste trabalho demonstram que ratos expostos ao LCEf ou LCEa, sem nenhum estímulo nociceptivo durante a exposição, exibem hiperalgesia quando testados no teste de placa. Tais resultados são reproduzidos na reexposição, quando ratos previamente expostos ao LCEf são expostos ao LCEa e vice-versa, sugerindo que a antinocicepção induzida pelo LCEa está presente somente durante a exposição ao aparelho. Ainda, não há diferenças na magnitude desta hiperalgesia entre ratos machos e fêmeas. Além disso, a injeção intraperitoneal de AM251, um antagonista de receptor canabinóide CB1, não foi capaz de bloquear a antinocicepção induzida pelo LCEa, sugerindo a não participação do sistema endocanabinóide neste tipo de antinocicepção. Os resultados são discutidos detalhadamente abaixo.

## Experimento VI

Os resultados obtidos neste experimento (Figuras 12 e 13) demonstram que ratos expostos ao LCEf ou LCEa (sem nenhum estímulo nociceptivo durante exposição) por dez minutos e subsequentemente submetidos ao teste de placa quente mostraram latência de

lambida na pata traseira menor quando comparados aos grupos mantidos na gaiola moradia. Na reexposição, apesar dos animais anteriormente expostos ao LCEf serem expostos ao LCEa e vice-versa, o mesmo resultado foi reproduzido. Deste modo, animais expostos ao LCEf ou ao LCEa mostraram latência de lambida na pata menor quando comparados aos grupos mantidos na gaiola moradia, caracterizando um processo de hiperalgesia. Nesse sentido, um número significativo de estudos relata que o estresse agudo pode induzir hiperalgesia (para revisão ver LOVICK, 2008). Por exemplo, a exposição a estressores relativamente leves, tais como, vibração, restrição leve, odores e outros, é capaz de induzir hiperalgesia transitória (JØRUM, 1988; VIDAL; JACOB, 1982). Já outros estudos mostram que a exposição breve a estímulos moderadamente estressantes (os quais seriam esperado induzir analgesia de curta duração) produz hiperalgesia tardia, mas de longa duração. Dentro deste contexto, ratos expostos a uma ampla variedade de estressores que incluem 15 min de choque nas patas (GEERSE et al., 2006), sessões de nado forçado (QUINTERO et al., 2000) ou situação de conflito social demonstram responsividade aumentada à estimulação nociceptiva desenvolvida em um período de horas a dias, porém com duração de uma a quatro semanas. Nesse sentido, a exposição de ratos ao LCEa, na ausência de injeção de formalina na pata, poderia configurar como um estresse leve ou moderado quando comparado à exposição ao LCEa na presença de formalina na pata. Assim, na presença de um estresse agudo relativamente leve é possível que ocorra hipernocicepção em vez de antinocicepção em ratos expostos ao LCEa. Em tal situação, o LCEf também poderia representar um estímulo de estresse leve ou moderado, já que este aparelho, embora circundado por quatro braços fechados, também provocou hiperalgesia em ratos. Se assim, na ausência de formalina, a exposição a tais aparatos se configuraria como um estresse à novidade. Tal hipótese encontra apoio nos estudos realizados por Vidal e Jacob (1982), onde ratos expostos a um ambiente novo por 5 minutos exibem hiperalgesia como avaliado por choque elétrico na cauda. Segundo os autores, durante exposição ao ambiente novo os animais também exibiram sinais comportamentais típicos refletindo estresse ao ambiente, isto é, exploração, levantamento, auto-limpeza e defecação.

Por outro lado, o estresse desencadeado pela exposição ao LCEa concomitante ao teste nociceptivo (formalina) pode ter sido de maior intensidade (devido à presença do estímulo nociceptivo combinado com o estímulo aversivo dos espaços abertos), provocando antinocicepção, sobretudo em decorrência da situação inescapável do teste. Neste sentido, Maier et al. (1983) têm demonstrado que o grau de controlabilidade da situação aversiva influencia o perfil da resposta nociceptiva. Por exemplo, ratos submetidos a choques nocivos

inescapáveis exibem analgesia de longa duração, ao passo que ratos recebendo quantias idênticas de choques, mas que são hábeis para fugir do estímulo aversivo, não mostram antinocicepção.

Todavia, se a antinocicepção no LCEa está relacionada à situação inescapável, o mesmo deveria ter ocorrido nos animais expostos ao LCEf, pois a situação também se mostra inescapável. Entretanto, nossos resultados não apontaram para esta direção. Ao contrário, o estresse físico causado pela injeção de formalina na pata pode ter se sobreposto ao desencadeado pela novidade ambiental (exposição ao LCEf), inibindo a resposta hiperalgésica ou antinociceptiva decorrente da percepção do ambiente potencialmente aversivo. Todavia, quando há a influência de estímulos de estresse intenso em conjunto, como por exemplo no LCEa (onde há o estímulo nociceptivo com a injeção de formalina e o estímulo aversivo com a presença de espaços abertos em uma situação inescapável), uma antinocicepção significativa ocorre. É possível que na presença do teste de formalina o que se torna importante é o estímulo ambiental, pois na presença de um estresse adicional (espaços abertos) ocorre a antinocicepção. Nesse sentido, Vidal e Jacob (1982) argumentam que a significância biológica de eventos ambientais pode ser um fator crítico para a ativação do sistema modulatório de dor. Isto se torna relevante quando se compara a natureza dos fatores ambientais que induzem analgesia com aqueles que produzem hiperalgesia. Os presentes resultados corroboram esta hipótese, visto que animais submetidos ao teste de formalina e expostos ao LCEa apresentam antinocicepção significativa quando comparados a ratos submetidos ao mesmo teste nociceptivo e expostos ao LCEf. Entretanto, tal diferença entre os grupos não ocorre quando os animais são expostos aos aparatos, sem nenhum estímulo nocivo durante exposição, e, testados no teste de placa quente imediatamente após exposição.

Segundo Lovick (2008), os fatores que determinam se um sujeito responderá ao estresse com hiper ou hipoalgesia ainda não estão claros. A valência de mudanças ao estresse evocadas na responsividade sensorial parece ser relacionada, ao menos em parte, à intensidade e ou à aversividade do estímulo estressor. Ainda, tal autora argumenta que há diferenças consideráveis entre indivíduos, sugerindo que o estado emocional poderia ser um fator importante.

Outro ponto que merece destaque no experimento VI, tanto na exposição quanto na reexposição, está relacionado ao fato de que não houve diferença significativa na latência de lambida na pata entre ratos machos e fêmeas. Há trabalhos na literatura que relatam diferenças de sexo na percepção da dor (ROLLMAN et al., 2000; VENDRUSCOLO et al., 2004; HURLEY et al., 2008). Por exemplo, Vierck et al. (2008) demonstraram que

ratos fêmeas mostram maior resposta de lambida ou proteção da pata frente a um estímulo nociceptivo de calor quando comparados a ratos machos. Entretanto, os resultados do presente estudo não corroboram tais achados, pois ratos machos e fêmeas expostos ao LCEf ou LCEa não demonstraram diferença na latência de lambida na pata quando testados no teste de placa quente.

### **Experimento VII**

A Figura 14A mostra que ratos previamente tratados com DMSO ou AM 251, antagonista de receptor  $CB_1$ , submetidos ao teste de formalina não diferem no tempo de lambidas na pata durante a primeira fase do teste de formalina. Na segunda fase do teste de formalina (Figura 14B), quando os animais foram expostos aos LCEf ou LCEa, observa-se que a exposição ao LCEa atenuou a resposta nociceptiva quando comparado aos ratos expostos ao LCEf. Esse resultado mostra que ratos expostos ao LCEa exibem antinocicepção como já demonstrado em experimentos anteriores (CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009). É importante ressaltar que o presente resultado foi reproduzido em laboratório diferente do relatado por Cornélio e Nunes-de-Souza (2009), mostrando que o fenômeno da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa é consistente.

O tratamento com o antagonista de receptor  $CB_1$  não reverteu a antinocicepção eliciada por este aparelho. Dentro deste contexto, tem sido mostrado que o bloqueio do receptor canabinóide  $CB_1$ , pelo antagonista SR 141716A, produz hiperalgesia e, que tal antagonista também reverte a analgesia produzida por estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd, WALKER; HUANG, 2002). Os resultados do presente estudo não corroboram estudos anteriores demonstrando o papel dos receptores canabinoides  $CB_1$  na modulação da dor. No entanto, nossos resultados não descartam a participação dos receptores canabinóides  $CB_2$ . Neste sentido, Ibrahim et al. (2006) têm demonstrado que o agonista canabinóide  $CB_2$ , AM1241, inibiu nocicepção térmica em camundongos não-geneticamente modificados para o receptor  $CB_2$ , mas não produziu efeito em camundongos geneticamente modificados para esse tipo de receptor. Ainda neste estudo, os autores mostraram que o agonista WIN 55,212, menos seletivo para o receptor  $CB_2$ , produziu antinocicepção equivalente em camundongos não geneticamente modificados e naqueles geneticamente modificados para receptores  $CB_1$ , enquanto seu efeito antinociceptivo foi reduzido em camundongos geneticamente modificados para receptores  $CB_2$ , quando comparados a camundongos não geneticamente modificados para tal receptor.



Ainda, no que diz respeito à canabinoides, Yamamoto et al. (2008) têm mostrado que a administração intratecal de JW133, um agonista seletivo de receptor canabinóide CB<sub>2</sub>, reverteu a alodinia induzida por ligação mecânica parcial de nervo ciático em camundongos. Tais autores também demonstraram que a administração sistêmica de JW133 não foi efetiva e que tal fármaco não produziu efeito em camundongos nocaute. Tais evidências encorajam a investigação do papel dos receptores canabinóides do tipo CB<sub>2</sub> na antinocicepção induzida por exposição de ratos ao labirinto todo aberto.

Tendo em vista as características aversivas do teste do LCEa e dado que os compostos anti-aversivos que agem no complexo GABAA-benzodiazepínico e receptor 5HT1A (CANTO-DE-SOUZA et al, 1997; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; SIEGFRIED; NUNES-DE-SOUZA, 1989; SIEGFRIED et al., 1990; HARRIS, 1996; CANTO-DE-SOUZA et al., 1998) também alteram muitos tipos de analgesia ambientalmente induzida, faz-se também relevante realizar estudos sobre o papel de tais mecanismos na modulação da antinocicepção induzida pelo LCEa.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo evidenciaram que:

- **Etapa I**
  - O sistema opióide parece não estar envolvido na modulação da antinocicepção induzida pelo LCEa;
  
- **Etapa II:**
  - Os receptores cannabinóides CB1 parecem não participar na modulação da antinocicepção induzida pelo LCEa.
  - A antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa não perdura após a remoção do animal do ambiente aversivo. Ao contrário, a resposta ao estímulo nociceptivo se caracteriza por hipernocicepção. Esse aumento da nocicepção não sofre influência de fatores relacionados ao sexo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; CONNELL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 141-144, 1986.

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats, **Pain**, v. 60, p. 91-102, 1995.

ALBRECHET-SOUZA, L.; CRISTINA DE CARVALHO, M.; RODRIGUES FRANCI, C.; BRANDÃO, M. L. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. **Horm and Behav**, v. 52, p. 267-73, 2007.

ANTONIJEVIC, I.; MOUSA, S. A.; SCHAFER, M.; STEIN, C. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. **J Neurosci**, v. 15, p. 165-172, 1995.

BANDLER, R.; KEAY, K.A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Prog. Brain Res.**, v.107, p.285-300, 1996.

BANDLER, R.; KEAY, K. A., FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. Passive emotional coping. **Brain Research Bulletin**. v. 53, p. 95-104, 2000.

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 Res.**, n. 1294, p. 29-37, 2009.

BEITZ, A. J. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 133-159, 1982.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Anxiolytic-like effects of NMDA/glycine-B receptor ligands are abolished during the elevated plus-maze trial 2 in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 170, n. 4, p.335-342, 2003.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behav Brain Res.**, v. 108, n.2, p.197-203, 2000.

BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Scopolamine given pre-Trial 1 prevents the one-trial tolerance phenomenon in the elevated plus-maze Trial 2. **Behav Pharmacol.**, v. 15, n. 1, p. 45-54, 2004.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Reviews of Psychology.** v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G.;HENRIE, J. A.; BLANCHARD, D. C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neuroscience Biobehavioral Reviews.** v. 21, p. 783-789, 1997.

BLANCHARD R.J.; YUDKO, E. B.; RODGERS R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research.** v. 58, p.155-165, 1993.

BOGDANOV, A. I.; YARUSHKINA, N. N. The relationship between analgesia and corticosteroid levels in rats. **Neurosc Behav Physiol**, v. 30, p. 487–9, 2000.

BOGDANOV, A.I.; YARUSHKINA, N.N. Mechanisms of the effects of adrenocorticotropic hormone on pain sensitivity in rats. **Neurosc Behav Physiol**, v. 33, p. 795–8, 2003.

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

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

BRODNAR, R. J. Endogenous opiates and behavior: 2006. **Peptides**, v. 28, p. 2435 – 2513, 2007.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, p. 10-16, 2006.

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, v. 463, p. 235–72, 2003.

CARVALHO-NETTO, E.F.; MARKHAM, C.; BLANCHARD, D. C.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; BLANCHARD, R.J.Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 85, n. 1, p. 140-7, 2006.

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.1193-1205, 2005.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; Pela, I. R.; GRAEFF, F. G. High intensity social conflict in the Swiss albino mouse induces analgesia modulated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors, **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 56, p. 481-486, 1997.

CANTO-DE-SOUZA, A.; NUNES DE SOUZA, R. L.; PELÁ, I. R.; GRAEFF, F. G. 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. 253-256, 1998.

CHOI, S. S.; HAN, K. J.; LEE, H. K.; HAN, E. J., SUH, H. W. Possible antinociceptive mechanisms of opioid receptor antagonists in the mouse formalin test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.**, v.75, p. 447–457, 2003.

COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res Rev**, v. 24, p. 28–66, 1997.

COGGESHALL, R. E.; ZHOU, S.; CARLTON, S. M. Opioid receptors on peripheral sensory axons. **Brain Research**, v. 764, p. 126–132, 1997.

COLASANTI, A.; RABINER, E. A.; LINGFORD-HUGHES, A.; NUTT, D.J. Opioids and anxiety. **Journal of Psychopharmacology**, p. 1-19, 2010, first published on June 8, 2010 as doi:10.1177/0269881110367448.

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

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

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

DUARTE, D. F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 55, n. 1, p. 135-146, 2005.

DUNCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res.**, v.713, p. 79-91, 1996.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A; BANDLER, R. (Eds). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 151-173.

FARDIN, V.; OLIVEIRAS, J. L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia. **Brain Res.** v. 306, p. 105-123, 1984.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of pain**. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier: Churchill Livingstone; 2006, p.3-34.

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

FINN, D. P.; BECKETT, S. R. G.; RICHARDSON, D.; KENDALL, D. A.; MARSDEN, C. A.; CHAPMAN, V. Evidence for differential modulation of conditioned aversion and fear conditioned analgesia by CB1 receptors, **European Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 848-852, 2004.

DE FONSECA, F. R.; DEL ARCO, I.; BERMUDEZ-SILVA, F. J.; BILBAO, A.; CIPPITELLI, A.; NAVARRO, M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. **Alcohol & Alcoholism**, v. 40, n. 1, pp. 2-14, 2005.

GARDELL, L. R.; KING, T.; OSSIPOV, M. H.; RICE, K. C.; LAI, J.; VANDERAH T. W.; PORRECA F. Opioid receptor-mediated hyperalgesia and antinociceptive tolerance induced by sustained opiate delivery. **Neurosci Lett**, v. 396, n. 1, p. 44-49, 2006.

GAURIAU, C.; BERNARD, J. F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat, **Experimental Physiology**, v. 87, n. 2, p. 251-258, 2002.

GEAR, R.W.; ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. **J Neurosci.**, v. 19, n. 16, p. 7175-81,1999.

GEERSE, G. J.; van GURP, L. C. A.; WIEGANT, V. M.; STAM, R. Individual reactivity to the open-field predicts the expression of stress-induced behavioural and somatic pain sensitisation. **Behavioral Brain Research**, v. 174, p. 112-118, 2006.

GIUFFRIDA, A.; BELTRAMO, M.; PIOMELLI, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, p. 7–14, 2001.

GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica/ editores responsáveis, JOEL G. HARDMAN, LEE E. LIMBIRD; editor-consultor, ALFRED GOODMAN GILMAN; [tradução da 10. ed. original, Carla de Mello Vorsatz et al.; revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca]. Rio de Janeiro; McGraw-Hill, 2005.

GRAEFF, F. G. Abuso e Dependência de drogas. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GRAY, J. A.; McNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety**. 2 ed. Oxford: Oxford University press, 2000.

HARRIS, J. A. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. **The Journal of physiology**, v. 90, p. 15-25, 1996.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist in a maze exploration model of "fear-motivated behaviour". **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HASSAN, A. H. S.; ABLEITNER, A.; STEIN, C.; HERZ, A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. **Neuroscience**, v. 55, p. 185–195, 1993.

HEINRICHER, M. M.; PERTOVARA, A.; Ossipov, M. H. Descending modulation after injury. In: KOLTZENBURG, M. **Proceedings of the 10th World Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management**. Seattle: IASP press, 2003. 251p.

HELMSTETTER, F. J.; TERSHNER S. A.; POORE, L. H.; BELLGOWAN, P. S. Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Brain Research**, v. 779, n.1-2, p. 104-118, 1998.

HERBERT, H.; SAPER, C.B. Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. **J Comp Neurol.**, v. 315, n. 1, p. 34-52, 1992.

HERMANN, D. M.; LUPPI, P. H.; PEYRON, C.; HINCKEL, P.; JOUVET, M. Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars  $\alpha$  demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b), **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 13, n. 1, p. 1-21, 1997.

HINKS, G.L.; BROWN, P.; FIELD, M.; POAT, J. A.; HUGHES, J. The anxiolytics CI-988 and chlordiazepoxide fail to reduce immediate early gene mRNA stimulation following exposure to the rat elevated X-maze. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 312, p.153-161, 1996.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA II, R. L.; BOLTON, N. M.; NEELY, M. H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R.; KREY, J. F.; WALKER, J. M.; HOLMES, P. V.; CRYSTAL, J. D.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, v. 435, p. 1108-1112, 2005.

HOHMANN, A. G.; SUPLITA II, R. L.; Endocannabinoid Mechanisms of Pain Modulation. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 4, p. 693-708, 2006.

HOLDEN, J. E.; VAN POPPEL, A. Y.; THOMAS, S. Antinociception from lateral hypothalamic stimulation may be mediated by NK<sub>1</sub> receptors in the A7 catecholamine cell group in rat, **Brain Research.**, v. 953, n. 1-2, 25, p. 195-204, 2002.

HURLEY, R. W.; ADAMS, M. C. Sex, Gender, and Pain: An Overview of a Complex Field. **Anesth Analg.**, v. 107, n. 1, p. 309-317, 2008.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Home&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=3058#Pain>>. Acesso em: 15/11/09.

IVERSEN, L. Cannabis and the brain. **Brain**, v. 126, p. 1252-1270, 2003.

JØRUM, E. Analgesia or hyperalgesia following stress correlates with emotional behavior in rats, **Pain**, v. 32, p. 341-348, 1988.

KAPLAN, H.; FIELDS, H. L. Hyperalgesia during acute opioid abstinence: evidence for a nociceptive facilitating function of the rostral ventromedial medulla. **J. Neurosci.**, v. 11, n. 5, p. 1433-9, 1991.

KASCKOW, J.; GERACIOTI, T. D., JR. Neuroregulatory Peptides of Central Nervous System Origin: From Bench to Bedside. **Hormones, Brain and Behavior**, v. 5, p. 152-208, 2002.



KEAY, K. A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, pp. 669-678, 2001.

KELLY, D. D. Stress induced analgesia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p.467, 1986.

LANE, D. A.; PATEL, P. A.; MORGAN, M. M. Evidence for an intrinsic mechanism of antinociceptive tolerance within the ventrolateral periaqueductal gray of rats, **Neuroscience**, v.135, p. 227-234, 2005.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v.53, p.597-652. 2001.

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

LEE, C.; RODGERS, R. J. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. **Behavioural pharmacology**, v. 2, p. 491-496, 1991.

LESTER, L. S.; FANSELOW, M. S. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats, **Behavioral Neuroscience**, v. 99, p. 756-759, 1985.

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

LORD, J. A.; WATERFIELD, A. A.; HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H. W. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature**, v. 267, p. 495-499, 1977.

LOVICK, T. A. Pro-nociceptive action of cholecystokinin in the periaqueductal grey: a role in neuropathic and anxiety-induced hyperalgesic states, **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 32, p. 852-862, 2008.

MANNING, B. H.; MORGAN, M. J.; FRANKLIN, K. B. Morphine analgesia in the formalin test: evidence for forebrain and midbrain sites of action. **Neuroscience**, v. 63, n. 1, p. 289-294, 1994.

MANSOUR, A.; FOX, C. A.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: Anatomical and functional implications. **Trends Neurosci.**, v. 18, p. 22-29, 1995.

MANSOUR, A; KHACHATURIAN, H; LEWIS, M .E.; AKIL, H; WATSON, S. J. Anatomy of CNS opioid receptors. **Trends Neurosci**, v. 11, p. 308–314, 1988.

MAO, J., PRICE D. D., MAYER D. J. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. **J Neurosci**. v. 14, n. 4, p. 2301-2312, 1994.

MAO, J., SUNG, B., JI R. R., LIM G. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. **J Neurosci**. v. 22, n. 18, p. 8312-8323, 2002.

MAYER, D.J.; WOLFLE, T.L.; AKIL, H.; CARDER, B.; LIEBESKIND, J. C. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. **Science**, v. 174; n. 16; p. 1351-4, 1971.

MAIER, S. F.; SHERMAN, J. E.; LEWIS, J.W.; TERMAN, G.W; LIEBESKIN, J. C. The opioid/nonopioid nature of stress-induced analgesia and learned helplessness. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Proc.*, v. 9, p. 80-90, 1983.

MCNAULL B, TRANG T, SUTAK M, JHAMANDAS K. Inhibition of tolerance to spinal morphine antinociception by low doses of opioid receptor antagonists. **Eur J Pharmacol.**, 560, n. 2-3, p. 132-141, 2007.

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, p. 97-104, 2005.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation. **Behav Brain Res.**, v. 203, n. 2, p. 180-7, 2009.

MELZAC, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 699, p. 971-979, 1965.

MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of pain**. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier: Churchill Livingstone; 2006, p.3-34.

MICZECK, K. A.; THOMPSON, M. L.; SHUSTER, L. Opioid-like analgesia in defeat mice., **Science**, v. 215, p. 1520-1522, 1982.

MIGUEL, T. T., NUNES-DE-SOUZA, R. L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. **Brain Res.** v. 1076, n. 1, p. 42-48, 2006.

MIKICS, E.; BARSY, B.; BARSVÁRI, B.; HALLER, J. Behavioral specificity of non genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. **Horm and Behav**, v. 48, p. 152–62, 2005.

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

MOGIL, J. S.; PASTERNAK, G. W. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. **Pharmacol Rev.**, v. 53, p. 381–415, 2001.

MORGAN, M. M.; FIELDS, H. L. Pronounced changes in the activity of nociceptive modulatory neurons in the rostral ventromedial medulla in response to prolonged thermal noxious stimuli. **J Neurophysiol.**, v.72, n. 3, p. 1161-70, 1994.

MORGAN, M. M.; TIERNEY, B.W.; INGRAM, S.L. Intermittent dosing prolongs tolerance to the antinociceptive effect of morphine microinjection into the periaqueductal gray. **Brain Res.** v. 1059, n. 2, p.173-178, 2005.

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, p. 300-310, 2000.

OSSIPOV, M. H.; LAI, J.; KING, T.; VANDERAH, T. W.; PORRECA, F. Underlying mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. **Biopolymers**, v. 80, n. 2-3, p.319-24, 2005.

PAVLOVIC, Z. W.; COOPER, M. L.; BODNAR, R. J. Opioid antagonists in the periaqueductal gray inhibit morphine and beta-endorphin analgesia elicited from the amygdala of rats. **Brain Res**, v. 741, n.1-2, p. 13-26, 1996.

PAZOS, M. R.; NUÑEZ, E.; BENITO, C; TOLON, R. M.; ROMERO, JULIÁN. Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 81, p. 239 – 247, 2005.

PRADO, W. A. Medicamentos Analgésicos de Ação Central. In: GRAEFF, F. G; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, p. 175-195.

PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, S. E; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v.14, p.149-167, 1985.

POWELL, K. J., ABUL-HUSN, N. S., JHAMANDAS A., OLMSTEAD, M. C., BENINGER, R. J., JHAMANDAS, K. Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia, tolerance, and reward in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v. 300, n. 2, p. 588-596, 2002.

POGATZKI, E. M.; URBAN, M. O.; BRENNAN, T. J.; GEBHART, G. F. Role of the rostral medial medulla in the development of primary and secondary hyperalgesia after incision in the rat, **Anesthesiology**, v. 96, n. 5, p. 1153-60, 2002.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation, **Trends Neurosci.**, v. 25, p. 319-325, 2002.

QUINTERO, L.; MORENA, M.; AVILA, C.; ARCAYA, J.; MAIXNER, W.; SUAREZROCA, H. Long lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 449-458, 2000.

RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Fármacos Analgésicos. In: RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 588-609.

REBOUÇAS, E. C.; SEGATO, E. N.; KISHI, R.; FREITAS, R. L.; SAVOLDI, M.; MORATO, S.; COIMBRA, N. C. Effect of the blockade of mu1-opioid and 5HT2A-serotonergic/alpha1-noradrenergic receptors on sweet-substance-induced analgesia. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 179, n. 2, p. 349-355, 2005.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update, **Pain**, v. 100, n. 1-2, p. 1-6, 2002.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v.164, n.878, p.444-445, 1969.

RHODES, D. L.; LIEBESKIND, J. C. **Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat.** *Brain Res.*, v.143, n. 3, p. 521-532, 1978.

RIZVI, T. A.; MURPHY, A.Z.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M. M.; SHIPLEY, M. T. Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study. **J Neurosci.**, v. 16, n. 1, p.333-344, 1996.

ROCHE, M.; O'CONNOR, E.; DISKIN, C.; FINN, D. P. The effect of CB1 receptor antagonism in the right basolateral amygdala on conditioned fear and associated analgesia in rats, **European Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 2643-2653, 2007.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J., HENDRIE, C. A. **Ethology and Psychopharmacology.** Chichester: Wiley, 1994. 9p.

RODGERS, R. J.; HENDRIE, C. A. Social conflict activates status-dependent endogenous analgesic or hyperalgesic mechanisms in male mice: effects of naloxone on nociception and behaviour. **Physiology & Behavior**, v. 30, p. 775-780, 1983.

RODGERS, R. J.; LEE, C.; SHEPHERD, J. K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 106, p. 102-110, 1992.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. I. Acute non-opioid analgesia in defeated male mice. **Physiology & Behavior**, v. 36, p. 947-950, 1986.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. I. Benzodiazepine ligands, nociception and 'defeat' analgesia in male mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, p. 305-315, 1987.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. I. Environmentally induced analgesia: situational factors, mechanisms and significance. In: RODGERS, R. J., COOPER, S. J. **Endorphins, opiates and behavioural processes.** John Wiley: Chichester, 1988. 107p.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Effects of an endogenous anxiolytic adrenal steroid, alpha-THDOC, on non-opioid defeat analgesia in male mice: interaction with Ro15-1788. **J Psychopharmacol**, v. 2, p. 150-8, 1988

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K. Prevention of the analgesic consequences of social defeat in male mice by 5HT1A anxiolytics, buspirone, gepirone and ipsapirone, **Psychopharmacology (Berl)**, v. 99, p. 374-380, 1989.

RODGERS, R. J.; SHEPHERD, J. K.; RANDALL, J. I. Highly Potent Inhibitory effects of 5-HT3 receptor antagonist, GR 38032F, on non-opioid defeat analgesia in male mice, **Neuropharmacology**, v. 29, p. 17-23, 1990.

ROLLMAN, G. B.; LAUTENBACHER, S.; JOHANES, K. S. Sex and gender differences in responses to experimentally induced pain in humans. In: **Sex, gender and pain: Progress in pain research and management**. Seattle: IASP Press, 2000. 165p.

SAGEN, J.; PROUDFIT, H. K. Hypoalgesia induced by blockade of noradrenergic projections to the raphe magnus: reversal by blockade of noradrenergic projections to the spinal cord. **Brain Res.**, v. 223, n. 2, p.391-396, 1981.

SAWYNOK, J. Topical and Peripherally Acting Analgesics. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 2003.

SHEN, K. F.; CRAIN, S. M. Ultra-low doses of naltrexone or etorphine increase morphine's antinociceptive potency and attenuate tolerance/dependence in mice. **Brain Res.**, v.757, n. 2, p. 176-190, 1997.

SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H. R.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 14, p. 481-490, 1990.

SIEGFRIED, B.; NETTO, C. A.; IZQUIERDO, I. Exposure to Novelty Induces Naltrexone-Reversible Analgesia in Rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 436-438, 1987.

SIEGFRIED, B.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. NMDA receptors blockade in the periaqueductal gray prevents stress-induced analgesia in attacked mice. **European journal of pharmacology**, v. 168, p. 239-242, 1989.

SILVEIRA, MCL; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav. Brain Res.** v. 56, p.115-118, 1993.

SOKAL, D. M.; ELMES, S. J.; KENDALL, D. A.; CHAPMAN, V. Intraplantar injection of anandamide inhibits mechanically-evoked responses of spinal neurons via activation of CB2 receptors in anaesthetised rats. **Neuropharmacology**, v. 45, p. 404–411, 2003.

STEFANO, G. B.; GOUMON, Y.; CASARES, F.; CADET, P.; FRICCHIONE, G. L.; RIALAS, C.; PETER, D.; SONETTI, D.; GUARNA, M.; WELTERS, I. D.; BIANCHI, E. Endogenous morphine. **TINS**, v. 23, n. 9, p. 436-442, 2000.

STEIN, C.; HASSAN, A. H. S.; PRZERLOCKI, R.; GRAMSCH, C.; PETER, K.; HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptor on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 5935–5939, 1990.

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

TAUKULIS, H. K.; GOGGIN, C. E. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-mazemodel of anxiety. **Behavioral and neural biology**, v. 53, p. 216, 1990.

TERMAN, G. W.; SHAVIT, Y.; LEWIS, J. W.; CANNON, J. T.; LIEBESKIND, J. C. Intrinsic mechanisms of pain inhibition. Activation by stress. **Science**, v. 226, p. 1270-1277, 1984.

TODD, A. J.; KOERBER, H.R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of pain**. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier: Churchill Livingstone; 2006, p.3-34.

TSUCHIYA, T.; TAKEUCHI, T.; HAYASHIDA, K.; SHIMIZU, H.; ANDO, K. A.; HARADA, E. Milk-derived lactoferrin may block tolerance to morphine analgesia. **Brain research**, v. 1068, n. 1, p. 102-108, 2006.

VAN DE KAR, L. D.; BLAIR, M. L. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. **Front Neuroendocrinol**, v. 20, p. 1–48, 1999.

VANDERAH, T. W.; SUENAGA, N. M.; OSSIPOV, M. H.; MALAN, T. P. J.R.; LAI, J.; PORRECA F. Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance, **J. Neurosci.**, v. 21, n. 1, p. 279-286, 2001.

VAN SICKLE, M. D.; DUNCAN, M.; KINGSLEY, P. J.; MOUIHATE, A.; URBANI, P.; MACKIE, K.; STELLA, N.; MAKRIYANNIS, A.; PIOMELLI, D.; DAVISON, J. S.; MARNETT, L. J.; DI MARZO, V.; PITTMAN, Q. J.; PATEL, K. D.; SHARKEY, K. A. Identification and Functional Characterization of Brainstem Cannabinoid CB 2 Receptors. **Science**, v. 310, p. 329-332, 2005.

VENDRUSCOLO, L. F.; PAMPLONA, F.A.; TAKAHASHI, R. N. Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. **Brain Res.**, 1030, n. 2, p. 277-283, 2004.

VIDAL, C.; JACOB, J. J. Stress hyperalgesia in rats: an experimental animal model of anxiogenic hyperalgesia in human. **Life Science**, v. 31, p. 1241-1244, 1982.

VIERCK, C. J.; ACOSTA-RUA, A. J.; ROSSI, H. L.; NEUBERT, J. K. Sex differences in thermal pain sensitivity and sympathetic reactivity for two strains of rat, **J. Pain**, v. 9, p. 739-749, 2008.

VISSERS, K. C.; DE JONGH, R. F.; CRUL, B. J. P.; VINKEN, P.; MEERT, T. F. Adrenalectomy affects pain behavior of rats after formalin injection. **Life Sciences**. v. 74, p. 1243–1251, 2004.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J.L. Opioid Receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 953-990, 2004

WALKER, J. M.; HUANG, S. M. Cannabinoid analgesia. **Pharmacology & therapeutics**, v. 95, p. 127-135, 2002.

WALKER, J. M.; STRANGMAN, N. M.; HUANG, S. M. Cannabinoids and pain. **Pain Res Manage**, v. 6, n. 2, p. 74-79, 2001.

WATKINS, L. R.; MAYER, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Science**, v. 216, p. 1185-1192, 1982.

WIERTELAK, E. P.; ROEMER, B.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on illness induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesias, **Brain Res.**, v.748, n. 1-2, p. 143-50, 1997.

WILSON, A. R.; MAHER, L.; MORGAN, M. M. Repeated cannabinoid injections into the rat periaqueductal gray enhance subsequent morphine antinociception, **Neuropharmacology**, v. 55, p. 1219-1225, 2008.



YAMAMOTO, W.; MIKAMI, T.; IWAMURA, H. Involvement of central cannabinoid C2 receptor in reducing mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain, **Eur. J. Pharmacol.**, v. 583, p. 56-61, 2008.

ZADINA, J.E.; HACKLER, L.; GE, L. J.; ANDKASTINA, J. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. **Nature**, v. 386, p. 499–502, 1997.

ZAHM, D. S.; JENSEN, S. L.; WILLIAMS, E. S.; MARTIN III, J. R. Direct comparison of projections from the central amygdaloid region and nucleus accumbens shell. **Eur J Neurosci.**, v. 11; n. 4; p. 1119-1126, 1999.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G. Modelos Animais. In: HETEM, L. A. B; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p.55-74.

**8. APÊNDICE**



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology &amp; Behavior

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/phb](http://www.elsevier.com/locate/phb)

## Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition?

Alianda Maira Cornélio<sup>a</sup>, Ricardo Luiz Nunes-de-Souza<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFSCar – UNESP Rod. Araraquara-Jaú, km 01, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

<sup>b</sup> Lab. Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Rod. Araraquara-Jaú, km 01, 14801-902, Araraquara, SP, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 July 2008

Received in revised form 12 November 2008

Accepted 17 November 2008

#### Keywords:

Open elevated plus-maze

Antinociception

Naltrexone

Adrenalectomy

Tail-flick test

Formalin test

### ABSTRACT

CORNÉLIO, A. M. AND NUNES-DE-SOUZA, R. L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition? *PHYSIOL BEHAV* 00 (0) 000–000, 2008. This study investigated whether antinociception induced by exposure to an open elevated plus-maze (oEPM: four open arms) (i) shows cross-tolerance to morphine (Exp. 1 and 2), (ii) is attenuated by repeated exposure to the oEPM (Exp. 3), (iii) is blocked by systemic treatment with naltrexone (Exp. 4), and (iv) is affected by adrenalectomy (Exp. 5) in rats. Animals were daily treated with morphine (M, 5 mg/kg, i.p.) or distilled water (DW) for 5 consecutive days (antinociceptive tolerance assessed by tail-flick test). Then, rats received formalin 2.5% injection (50  $\mu$ l) into the right hind paw followed by M or DW injection and 25 min later, time spent licking the injected paw was recorded for 10 min (Exp. 1). Similar procedure was followed in Experiment 2, except that licking response was recorded during exposure to an oEPM or enclosed EPM (eEPM: four enclosed arms) in undrugged rats. Experiment 3 evaluated nociception in rats submitted to 1, 2, 3, 4 or 6 exposures to either eEPM or oEPM (formalin was injected only during the last exposure). Experiment 4 investigated the effects of naltrexone (2.5 mg/kg; s.c.) on nociception during eEPM or oEPM exposure. Nociception was also assessed during eEPM or oEPM exposure in sham and adrenalectomized rats (Exp. 5). The results shown that oEPM-induced antinociception (i) did not display cross-tolerance to morphine, (ii) was unchanged by at least 6 maze re-exposures, (iii) failed to be reversed by naltrexone, and (iv) was not prevented by adrenalectomy.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Animals exposed to innate or learned threatening situations usually display defensive behaviors (e.g., fight, flight, freezing, vocalization), and neurovegetative (e.g., tachycardia, hypertension, defecation) responses characterized as a fear reaction [1]. Commonly, these responses are accompanied by antinociception [2,3].

Several studies have shown that the antinociceptive system can be activated by a variety of environmental threatening stimuli [4–7]. For example, it has been shown that rats exposed to the presence of a cat display antinociceptive response as assessed by tail flick test [8] and formalin test [9]. This response is blocked by pretreatment with the opiate receptor antagonist naltrexone [8,9]. Involvement of opiate mechanisms has also been reported in antinociception induced by social conflict. It has been shown that defeated mice display opioid-like antinociception which was both blocked by the opiate receptor antagonist naloxone [10,11] and cross-tolerant to morphine [10]. However, non-opioid antinociception has also been reported in

defeated mice [12–15] depending on whether intruder mice are exposed to a mild (non-opioid) or a prolonged (opioid) social stress [16]. There is evidence suggesting that mechanisms underlying defeat-induced non-opioid antinociception involves benzodiazepine receptors [17], 5HT<sub>1A</sub> receptors [15,13] as well as 5HT<sub>3</sub> receptors [14].

According to Bolles and Fanselow [18] fear and pain are independent and competing motivational systems implicated in different biological functions. Fear, produced by stimuli associated with painful events, results in defensive behavior and in pain inhibition. In this context, the search for animal models to evaluate the influence of emotionality on nociception has resulted in the use of the elevated plus-maze (EPM) test [19–21]. The EPM [22] or elevated X maze [23] was originally validated to study anxiety-like behavior in rats and subsequently in mice [24,25]. This test is based on the natural aversion of rodents to open spaces and has been used to study anxiety and its modulation by drug treatment. Rodgers and colleagues were the first to show that mice display not only defensive behavioral reactions but also antinociception (as assessed by the tail-flick test) when exposed to the EPM [19,26,27]. In addition, they reported that this form of pain inhibition was not blocked by the opiate receptor antagonist naltrexone and did not show cross-tolerance to morphine [19], but it is attenuated by anxiolytic drugs such as diazepam and buspirone [26,27].

\* Corresponding author. Lab. Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Rod. Araraquara-Jaú, km 01., 14801-902, Araraquara, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3301 6983; fax: +55 16 3301 6980.

E-mail address: [souzarn@fcar.unesp.br](mailto:souzarn@fcar.unesp.br) (R.L. Nunes-de-Souza).

Central mediation of EPM-induced antinociception has been reported using intra-amygdaloid microinjections of midazolam [28]. This benzodiazepine receptor full agonist induced an anxiolytic-like effect in a standard EPM test (sEPM: two enclosed arms and two open arms) and completely blocked the antinociceptive response induced by the open arm confinement [28]. However, as argued by Nunes-de-Souza et al. [28] the emotional state elicited during open arm confinement may engage different mechanisms than those recruited during exposure to the standard EPM, making it difficult to precisely define the relationship between anxiety and antinociception.

Mendes-Gomes and Nunes-de-Souza [29] have investigated whether the opportunity to avoid or escape from the aversive open arms differentially alters the magnitude of the antinociceptive response to EPM exposure. These authors showed that mice exposed to the standard elevated plus-maze did not show modification of the nociception behaviors while mice exposed to the open elevated plus-maze (oEPM: four open arms) displayed antinociception of high magnitude (as evaluated by the formalin test). These findings suggest that EPM-induced antinociception is based on the degree of the test aversion. In other words, the emotional state elicited by oEPM exposure appears to be similar to the immediate danger condition due to the test characteristics.

It is important to consider that exposure to the hostile situations (usually referred to as stressors) induce a series of coordinated responses (referred to as “stress responses”) composed of behavioral alterations, autonomic activation and the secretion of hormones such as adrenocorticotropin hormone (ACTH) and cortisol/corticosterone [30,31]. It has been demonstrated that corticosterone modulates nociception and anxiety/fear. For example, increase of plasma corticosterone levels correlate with an increase in pain sensitivity thresholds in rats exposed to electrical stimulation on the tail [32,33]. This hormone also induces an increase in frequency of protected and total stretched attend posture (SAP) in the EPM [34]. In contrast, the frequency of SAP is decreased by metyrapone, an glucocorticoid synthesis blocker [34], and midazolam treatment [35] in rats exposed to the standard EPM. Another endogenous anxiolytic adrenal steroid, alpha-THDOC, also attenuates non-opioid stress-induced analgesia [36].

Although oEPM exposure elicits a high magnitude antinociception [29] the mechanisms underlying this type of pain inhibition has not been investigated. The present study attempted to investigate whether oEPM-induced antinociception (i) shows cross-tolerance to morphine (ii) is attenuated to repeated exposures to the oEPM (iii) is blocked by naltrexone and (iv) is affected by removal of the adrenal glands.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Adult male Wistar rats weighting 230–280 g (São Paulo State University/UNESP, SP, Brazil), housed in groups of 3–4 in Plexiglas cages (32×40×16 cm) were maintained under a normal 12-h light cycle (lights on: 7:00 h) in a temperature (23±1 °C) and humidity (55±5%) controlled environment. Food and drinking water were freely available except during the brief test periods. Naïve rats were used in each experiment. All experiments were carried out between 9:00 and 17:00 h under red light conditions.

The experimental protocols were conducted according to the ethical principles of the Brazilian College of Animal's Experimentation (COBEA) (protocol CEP/FCF/Car. Number 15/2005), based on the US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.2. Drugs

Morphine sulfate (Dimorf<sup>®</sup>, Cristália, Brazil) was dissolved in distilled water. Naltrexone hydrochloride (Endo<sup>®</sup> Laboratories Inc., Garden City, USA) was dissolved in physiological saline. The doses of

morphine (5 mg/kg, i.p.) and naltrexone (2.5 mg/kg, s.c.) were based on previous [10,37–39] and pilot studies.

### 2.3. Apparatus

#### 2.3.1. Arena

The arena consisted of a white propylene box (40×48×30 cm). This apparatus was used in Experiment 1 to record time spent licking injected paw during the second phase of the formalin test.

#### 2.3.2. Tail-flick test

In Experiments 1 and 2, morphine antinociception was assessed daily using the tail-flick test as previously described [40]. To measure tail-flick latency (TFL), each rat was gently restrained and the light source was focused on a point along the bottom of the tail 3–4 cm proximal to the tip. A deflection of the tail activated a photocell mounted above it and terminated test. The light intensity was adjusted to 90 µA to obtain baselines from 2.0–3.0 s. Selection of the light intensity was based on pilot studies and it was kept constant throughout the experiment. A cut-off time of 5 s was used in nonreactive animals. Tail-flick latencies were recorded 0 and 10 min before and 20 min after pharmacological treatment. Three animals did not show morphine tolerance at the end of 6 days of treatment (i.e., they presented tail-flick latencies similar to the cut-off time=5 s) and were excluded from the study. Each TFL was normalized by calculating an index of analgesia (IA):

$$IA = \frac{(\text{test TFL}) - (\text{average baseline TFL})}{5 - (\text{average baseline TFL})}$$

#### 2.3.3. Formalin test

Nociception was assessed using the formalin test as previously described [41]. This test has two phases, the first phase begins immediately after formalin injection and lasts approximately 5 min. It results from the direct stimulation of nociceptors. The second phase begins approximately 20 min after formalin injection and reaches a pick around 30 min, then starts to decay. This phase lasts approximately 20–30 min and involves a period of sensitization during which inflammatory phenomena occur [42]. Rats were injected with 50 µl of formalin (formaldehyde 2.5%) into the plantar surface of the right hind paw and individually placed in a glass holding cage (30×20×25 cm) to record the first phase of the formalin test (initial 5 min). Twenty-five minutes after formalin injection, animals were placed in the arena (Experiment 1), eEPM or oEPM (Experiments 2, 3, 4, 5) for 10 min (Second phase: 25–35 min after formalin injection) and the time (in seconds) spent licking the injected paw was recorded.

#### 2.3.4. Enclosed and open elevated plus maze

The enclosed elevated plus maze (eEPM) is a modification of the standard elevated plus maze described by Pellow et al. [22]. It consists of four enclosed arms (50×10×40 cm) connected to a common central platform (10×10 cm). The apparatus was constructed from gray acrylic (floor) and transparent acrylic (clear walls) elevated 50 cm above floor level. Conversely, the open elevated plus maze (oEPM) consists of four open arms surrounded by an acrylic 0.5 cm edge.

### 2.4. Procedure

In all experiments, animals were transported to the experimental room and left undisturbed for at least 1 h to adapt to the laboratory conditions before testing.

#### 2.4.1. Experiment 1: Morphine tolerance

Two groups of rats ( $n=45$ ) received i.p. injection of distilled water (DW) or morphine (M; 5 mg/kg) daily for 5 days. Changes in nociception

produced by tolerance was assessed by the tail-flick test (see Section 2.3.2. Tail-flick test). Twenty-four hours after last morphine injection, rats were injected with formalin and the first phase of the nociception test was recorded. Five minutes after formalin injection (i.e., immediately after the first phase of formalin test), both DW and M groups were divided into two additional groups and once more injected with DW or M. Thus a total of four groups were tested, namely: DW+DW; DW+M; M+DW; M+M ( $n=9-14$ /group). Twenty minutes after DW or M injection, animals were individually exposed to the arena for recording of the second phase of the formalin test.

2.4.2. Experiment 2: Evaluation of cross-tolerance between morphine and oEPM-induced antinociception

An additional 42 rats were rendered tolerant to morphine as described in Exp.1. Twenty-four hours after the last morphine injection, rats were injected with formalin solution and 25 min later they were individually exposed to the oEPM or eEPM. Time spent licking the injected paw was recorded for 10 min (second phase of formalin test). The four groups were tested: DW + eEPM; DW + oEPM; M + eEPM; M + oEPM ( $n=10-11$ /group).

2.4.3. Experiment 3: Influence of repeated oEPM exposures on nociception

Eighty-two rats were exposed to the eEPM or oEPM for one, two, three, four or six days for 10-min intervals each day ( $n=7-10$ /group). Twenty-five minutes before the last maze exposure, each rat was injected with formalin as described above and then individually exposed to the same maze and time spent licking the injected paw was recorded for 10 min.

2.4.4. Experiment 4: Effects of naltrexone on oEPM-induced antinociception

Thirty rats were treated with naltrexone (2.5 mg/kg, s.c.) or saline and 15 min later were injected with formalin as described above. Twenty-five minutes after formalin injection animals were exposed to the oEPM or eEPM ( $n=6-9$ /group).

2.4.5. Experiment 5: Influence of adrenalectomy on oEPM-induced antinociception

2.4.5.1. Surgery (Adrenalectomy, ADX). Thirty-three rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xilazine (7 mg/kg) i.p. and both adrenal glands were removed through single dorsal midline incision in skin at the level of the kidneys. Sham surgery consisted of single dorsal midline incision where the adrenal glands were located but not removed. All rats (adrenalectomized and sham) were maintained with both water and 0.9% NaCl drinking solution as well food *ad libitum*.

Five to seven days after the adrenalectomy or sham procedure, each rat was injected with formalin as described above. Twenty-five minutes after formalin injection animals were exposed to the oEPM or eEPM ( $n=8-9$ /group) and time spent licking the injected paw was recorded for 10 min.

2.5. Behavioural analysis

Videotapes were scored by a highly trained observer using an ethological analysis package developed by Dr. Morato's group at Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP (personal communication). The time spent licking the formalin-injected paw was recorded.

2.6. Statistics

All results were initially analyzed using Levene's test for homogeneity of variance. When appropriate, the data were transformed to log, square root or cube root before being submitted to one or two-way analysis of variance (ANOVA). In those cases where data

transformation did not reveal homogeneity of variance, data were analyzed by non-parametric Kruskal–Wallis ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test. A summary of the statistics employed for each experiment is described below.

Data from the analgesia index (Experiments 1 and 2) were analyzed by two-way repeated measures ANOVA (factor 1; treatment; factor 2: repeated measures for days). When *F* values were significant, data were further analyzed by planned comparison for contrasts between averages (treatment factor) or by Newman Keuls multiple comparisons test.

Data from first phase of formalin test (Experiments 1, 2, 4 and 5) were analyzed using a *t*-test for independent samples (Experiments 1, 2, 4 independent factor: treatment; Experiment 5: independent factor: sham vs adrenalectomy). A two-way ANOVA was used to analyze the first phase of the nociceptive test in Experiment 3 (factor 1: type of maze; factor 2: number of maze exposures).

Data from the Experiment 1 (second phase of formalin test) were submitted to Kruskal Wallis one-way ANOVA on ranks (independent factor: treatment) followed by Dunn's multiple comparison test. In all other cases, the two-way ANOVA was used. Where *F* values were significant, data were further analyzed using the Newman–Keuls multiple comparisons test. In all cases, a *P* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

3. Results

Two-way ANOVAs were initially used to assess within-group and between-group differences on baseline latencies of DW and morphine treated animals in Experiments 1 and 2 (data not shown). In Experiment 1, ANOVA followed by Newman–Keuls test revealed that Day 1 baseline TFL was higher than Days 2, 3, 4 and 5 baseline TFL ( $F(4,172)=4.14$ ,  $p<0.05$ ). ANOVA did not reveal significant differences for treatment factor ( $F(1,43)=0.33$ ,  $p>0.05$ ) and treatment  $\times$  time factor ( $F(4,172)=1.07$ ,  $p>0.05$ ). In Experiment 2, ANOVA did not reveal any effect for treatment factor ( $F(1,40)=0.21$ ,  $p>0.05$ ), time factor ( $F(4,160)=0.67$ ,  $p>0.05$ ) and treatment  $\times$  time factor ( $F(4,160)=1.08$ ,  $p>0.05$ ).

3.1. Experiment 1: Morphine tolerance

Fig. 1 shows the analgesia index (AI) assessed by the tail flick test in rats treated with DW or M. Two-way repeated measures ANOVA revealed significance for treatment factor ( $F(1, 43)=83.69$ ,  $p<0.01$ ),

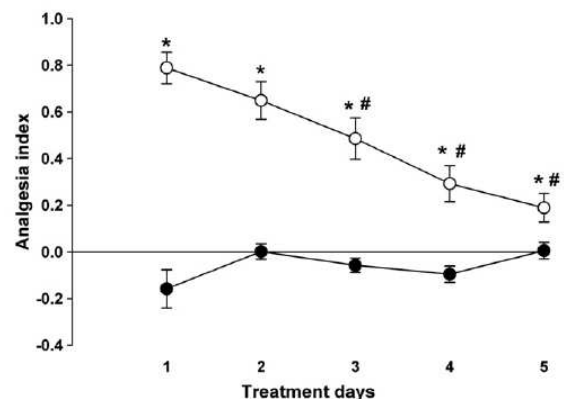


Fig. 1. Analgesia index assessed with the tail-flick test in rats treated with morphine (○) or distilled water (●) once a day for 5 consecutive days. Tail-flick latencies were measured 20 min after drug treatment. Points represent means ( $\pm$  SEM) ( $n=19-26$ ; see text for details). \* $p<0.05$  vs distilled water, # $p<0.05$  vs morphine given in day 1.

time factor ( $F(4,172)=6.57, p<0.01$ ) and treatment $\times$ time interaction ( $F(4,172)=10.84, p<0.01$ ). Between-group comparisons revealed that the morphine treated group exhibited a higher AI than the DW group on all five days of the test ( $p<0.05$ ). Within-group comparisons revealed that AI was lower on the 3rd, 4th and 5th days when compared to the 1st day following morphine injection. AI for DW-treated group did not change significantly along the five days of the experiment [ $F(4,72)=2.39, p>0.05$ ].

Fig. 2 shows the effects of morphine injected after the first phase of the formalin test on time spent licking the injected paw in morphine tolerant and non-tolerant rats. Nociception was recorded during the first phase (A) and second phase (B) of the formalin test. In the first phase, morphine tolerant rats spent significantly more time licking the injected paw than the DW-treated group [ $t(43)=-4.04; p<0.01$ ]. Kruskal–Wallis ANOVA followed by Dunn's test revealed that time spent licking the injected paw during the second phase was significantly lower for morphine non-tolerant rats (DW/M) than DW/DW, M/DW and M/M treated groups ( $\chi^2_{(3,41)}=13.8, p<0.05$ ). Animals rendered tolerant to the analgesic effect of morphine (assessed by the tail-flick test) did not differ in the time spent licking the injected paw when compared to the distilled water group (i.e., M/M  $\times$  DW/DW).

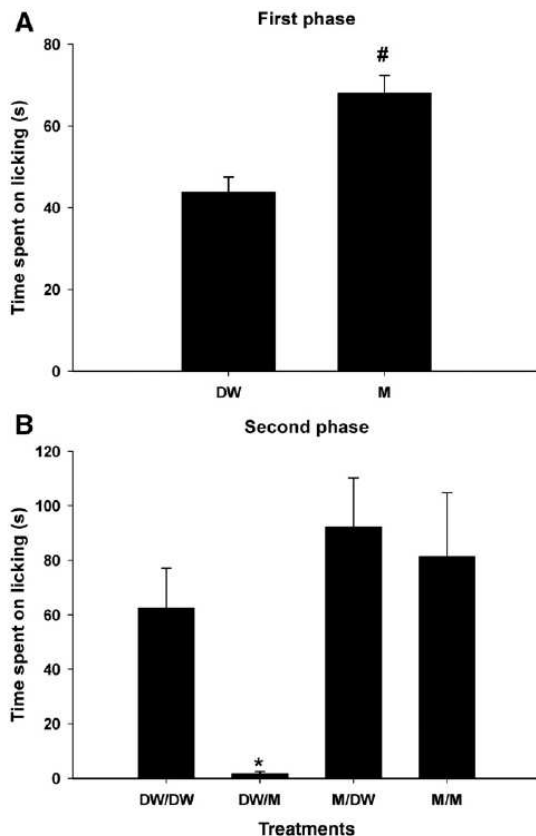


Fig. 2. (A) Time (in seconds) spent licking the paw during the first phase of the formalin test in rats treated with distilled water (DW) or morphine (M) daily for 5 consecutive days ( $n=19-26$ ). (B) Five minutes after the first phase of the formalin test, animals were treated with DW or M and 20 min later, time spent licking the paw was recorded for 10 min (second phase of formalin test,  $n=9-14$ ; see text for details). Columns represent means ( $\pm$  SEM).  $\#p<0.01$  vs DW.  $*p<0.05$  vs DW/DW, M/DW, M/M.

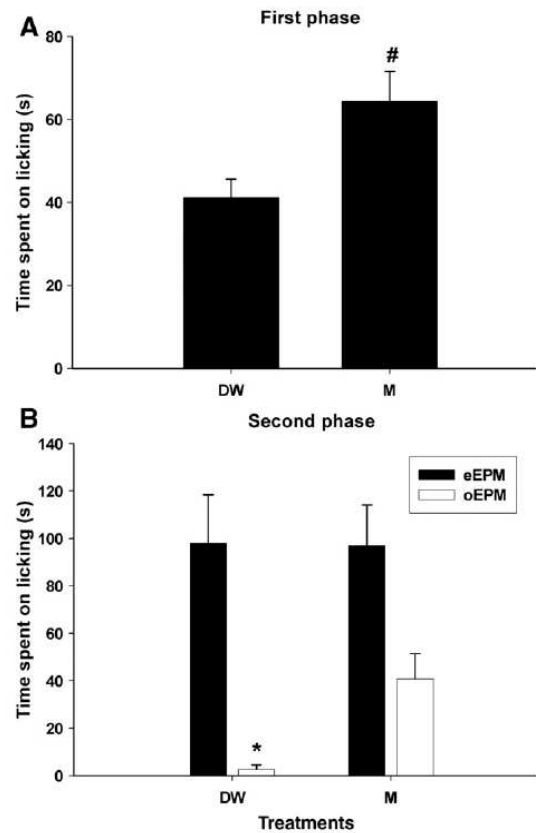


Fig. 3. Time (in seconds) spent licking the paw during the first phase (A,  $n=21$ ) and second phase (B,  $n=10-11$ ) of the formalin test in rats treated with distilled water (DW) or morphine (M) daily for 5 consecutive days. Only the second phase of the nociceptive test was recorded during eEPM or oEPM exposure (see text for details). Columns represent means ( $\pm$  SEM).  $\#p<0.01$  vs DW.  $*p<0.01$  vs DW/eEPM, M/eEPM, M/oEPM.

3.2. Experiment 2: Cross-tolerance between morphine and oEPM-induced antinociception

Fig. 3 shows the time spent licking the paw during first phase (A) and second phase (B) of the formalin test in morphine tolerant and non-tolerant rats. On the first phase,  $t$ -test for independent samples revealed that morphine tolerant rats spent significantly more time licking their paw than non-tolerant rats [ $t(40)=-2.72, p<0.05$ ].

During the second phase (Fig. 3B) of the formalin test, the two-way ANOVA revealed significance for treatment factor ( $F(1,38)=9.36, p<0.01$ ), type of plus-maze factor ( $F(1,38)=15.54, p<0.01$ ) and treatment versus type of plus-maze interaction ( $F(1,38)=4.34, p<0.05$ ). Post hoc analysis showed that animals that had been treated with distilled water and were exposed to the oEPM (non-tolerant group) spent significantly less time licking the injected paw than rats in the eEPM group. Significant differences were also revealed when the DW/oEPM group was compared to the M/eEPM and M/oEPM groups. Finally, time spent licking the paw exhibited by morphine tolerant and oEPM-exposed group was not significantly different when compared to M/eEPM or DW/eEPM groups.

3.3. Experiment 3: Influence of repeated oEPM exposures on oEPM-induced antinociception

Fig. 4 illustrates the time spent licking the right hind paw during the first phase (A) and second phase (B) of the formalin test. On the

444

A.M. Cornélio, R.L. Nunes-de-Souza / Physiology & Behavior 96 (2009) 440–447

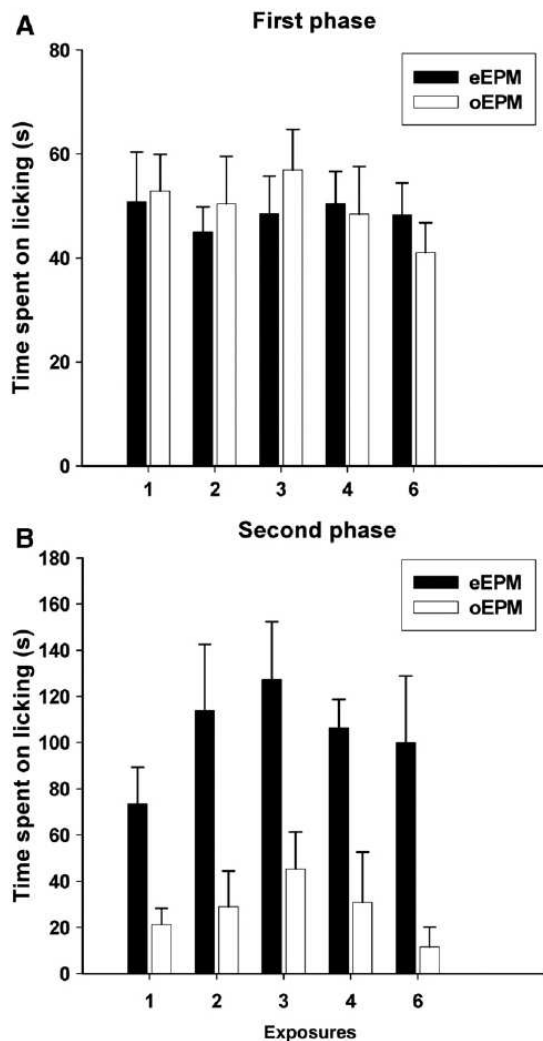


Fig. 4. Time (in seconds) spent licking the paw during the first phase (A) and second phase (B) of the formalin test in rats exposed 1, 2, 3, 4 or 6 times to the eEPM or oEPM. Note: animals were exposed to the eEPM or oEPM only during the second phase of nociception test (see text for details). Columns represent means ( $\pm$  SEM) ( $n=7-10$ ).

first phase, two-way ANOVA did not revealed significant differences for type of maze factor ( $F(1,72)=0.08, p=0.78$ ), prior maze experience factor ( $F(4,72)=0.36, p=0.84$ ) or type of maze x prior maze experience interaction ( $F(4,72)=0.32, p=0.86$ ).

On the second phase of the formalin test, a two-way ANOVA revealed a significant difference for type of maze factor ( $F(1,72)=45.81, p<0.01$ ) but no significant effect for the prior maze experience factor ( $F(4,72)=1.22, p=0.31$ ) or type of maze x prior maze experience interaction ( $F(4,72)=0.32, p=0.86$ ).

3.4. Experiment 4: Effects of naltrexone on oEPM-induced antinociception

Rats treated with naltrexone spent significantly less time licking the paw [ $t(28)=3.92; p<0.01$ ] than those treated with saline during the first phase of the formalin test (Fig. 5, A).

During the second phase of the formalin test, in which the animals were exposed to eEPM or oEPM, two-way ANOVA revealed a significant difference for the type of plus-maze factor [ $F(1,26)=32.43, p<0.01$ ], but no significant effect for the treatment factor ( $F(1,26)=0.91, p=0.35$ ) or type of plus-maze x treatment interaction ( $F(1,26)=0.29, p=0.6$ ; see Fig. 5, B).

3.5. Experiment 5: Influence of adrenalectomy on oEPM-induced antinociception

The effects of ADX on nociceptive response recorded before and during eEPM or oEPM exposure are shown in Fig. 6 (A and B). Independent *t*-test did not reveal significant differences between sham and ADX groups on the time spent licking the paw [ $t(31)=1.31; p=0.20$ ] in the first phase of the formalin test (Fig. 6, A).

During the second phase of formalin test, two-way ANOVA did not reveal significant differences for surgery type [ $F(1,29)=1.78, p=0.19$ ], but showed significant differences for the type of plus-maze [ $F(1,29)=9.65,$

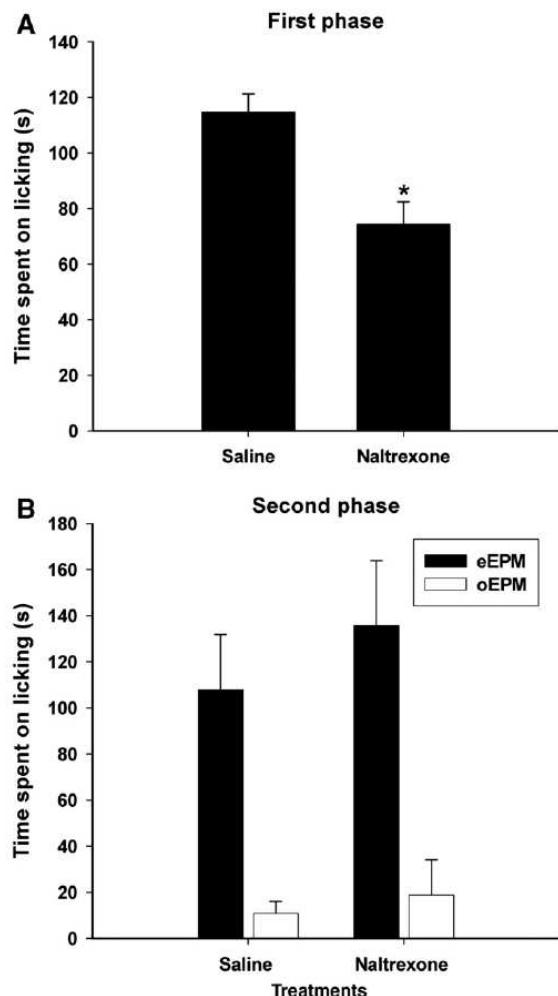


Fig. 5. Time (in seconds) spent licking the paw during the first phase (A,  $n=15$ ) and second phase (B,  $n=6-9$ ) of the formalin test in rats treated with saline or naltrexone and exposed to the eEPM or oEPM. Note: animals were exposed to the eEPM or oEPM only during the second phase of nociception test (see text for details). Columns represent means ( $\pm$  SEM). \* $p<0.01$  vs Saline.

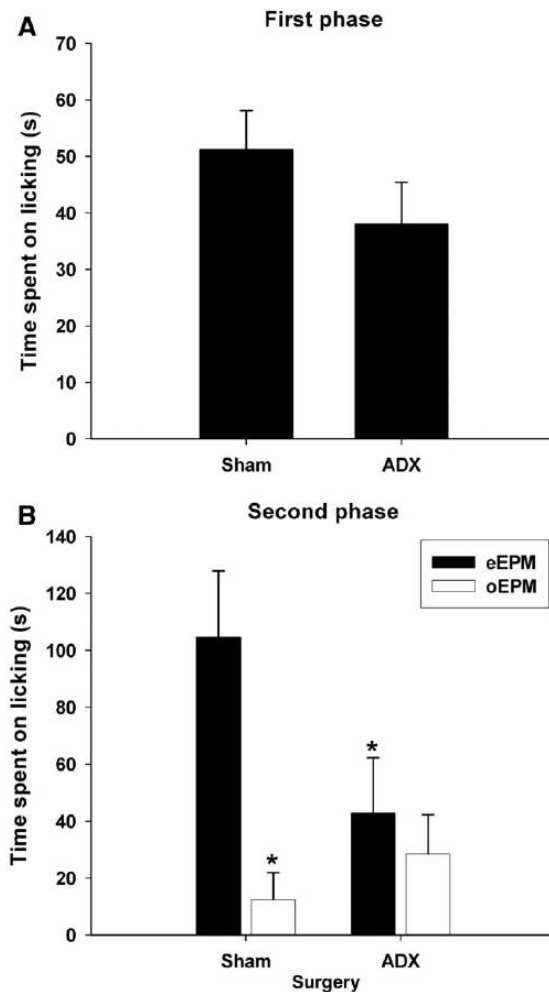


Fig. 6. Time (in seconds) spent licking the paw during the first phase (A,  $n = 16-17$ ) and second phase (B,  $n = 8-9$ ) of the formalin test in adrenalectomized (ADX) or sham rats exposed to the eEPM or oEPM. Note: animals were exposed to the eEPM or oEPM only during the second phase of nociception test (see text for details). Columns represent means ( $\pm$  SEM). \* $p < 0.05$  vs Sham/eEPM.

$p < 0.01$ ] as well as for the type of plus-maze  $\times$  surgery type interaction [ $F(1,29) = 5.13$ ,  $p < 0.05$ ]. Post hoc comparisons confirmed that the antinociceptive response induced by oEPM exposure was not altered by ADX. However, ADX reduced the time spent licking the paw in eEPM exposed group (Fig. 6, B) when compared to Sham-operated eEPM exposed animals.

4. Discussion

The main results of the present study demonstrate that rats exposed to the oEPM shows a high magnitude antinociception which is resistant to at least six daily exposures to the aversive situation (i.e., the oEPM). oEPM-exposed morphine-tolerant rats were more reactive to the formalin test than oEPM-exposed non-tolerant rats, suggesting this type of pain inhibition shows some degree of cross-tolerance to morphine. However, systemic administration of naltrexone prior to oEPM exposure did not antagonize this type of pain inhibition, sug-

gesting that opiate mechanisms are not involved in the modulation oEPM-induced antinociception. Furthermore, adrenalectomy failed to alter the antinociceptive response assessed during oEPM exposure, suggesting that oEPM-induced antinociception is not mediated by plasma corticosterone.

The relationship between morphine tolerance and hyperalgesia has been demonstrated in several studies [43–45]. According to the results of Exp. 1, a single dose of morphine (5.0 mg/kg) given daily for 5 days rendered rats tolerant to the analgesic effect of this opioid agonist, as assessed by the tail-flick test. Importantly, ANOVA did not reveal any increase in baseline TFL throughout Experiments 1 and 2 (data not shown). On the contrary, baseline TFL decreased slowly from Day 1 to Day 5 (Exp. 1) or remained unchanged throughout the study (Exp. 2), indicating that the reduction in analgesia index observed in days 3, 4 and 5 in morphine treated animals (see Fig. 1) was specifically due to a decrease of morphine effects on TFL. The lack of analgesic effect of morphine in rats submitted to the formalin test (Exp. 1) confirmed the tolerance to this opioid receptor agonist. In fact, morphine tolerant rats exhibited higher nociceptive response during the first phase of the formalin test when compared to non-tolerant rats. This phenomenon is known as hyperalgesia or hypernociception [45–47]. It is possible that this hyper-reactive response to formalin is related to morphine withdrawal symptoms, since the opioid agonist was administered 24 h before the nociceptive test. For instance, Dong et al. [48] have emphasized that withdrawal syndrome is severe 18 h after the last morphine injection. They further reported that morphine withdrawal caused hyperalgesia, as indicated by a reduction in tail flick latencies, and induced analgesic tolerance to acute morphine. In this context, many studies have reported that tolerance to opiates is accompanied by hyperalgesia [e.g., 43–45,47]. Moreover, hyperalgesia was evidenced only during the first phase of the formalin test. No significant differences on time spent licking the injected paw were observed during the second phase of the nociception test among DW/DW and M/DW or M/M groups, whereas a marked reduction of licking time was observed in non-tolerant morphine-treated rats (see Fig. 2, B).

The results of Exp. 2 indicate that the tolerance to the analgesic effects of morphine attenuates the antinociception induced by oEPM exposure, suggesting that this form of pain inhibition may be opioid mediated. However, some caution needs to be taken when interpreting this result. Firstly, similarly to the results described for Exp. 1, morphine tolerant animals also exhibited hyperalgesia during the first phase of the formalin test when nociception was assessed 24 h after the last dose of morphine (see Fig. 3, A) in Exp. 2. Secondly, morphine injected immediately after the first phase of formalin test (i.e., 5 min after formalin injection) failed to provoke antinociception assessed during the second phase of the nociception test in tolerant animals. Indeed, both M/DW and M/M groups exhibited a tendency for enhancement (instead of decrease) of nociceptive response when compared to DW/DW group (see Fig. 2, B), suggesting that morphine tolerant animals were more reactive to the painful stimulus than non tolerant rats. Although a similar result would be expected for the morphine-tolerant eEPM-exposed group (see Fig. 3, B), it is likely that the lack of hyperalgesia in this group is due to a ceiling nociceptive response to formalin, i.e., this irritant solution is not able to induce paw licking beyond approximately 120 s in a 10-min test. Corroborating this assumption are findings reported by Mendes-Gomes and Nunes-de-Souza [29] who have demonstrated a similar nociceptive profile in mice that received formalin injection and were exposed to the eEPM. Thus, it is likely that the enhancement of the time spent licking the injected paw observed for the oEPM exposed rats is also a hyperalgesic response to formalin rather than cross-tolerance with morphine treatment. However, further studies need to address more details regarding the involvement of opioid mechanisms on oEPM-induced antinociception.

It has been demonstrated that antinociception induced by successive aggressive encounters is extinguished after daily encounters in mice. Such absence of antinociceptive response is insensitive to



## Author's personal copy

446

A.M. Cornélio, R.L. Nunes-de-Souza / *Physiology & Behavior* 96 (2009) 440–447

an analgesic dose of morphine, indicating a cross-tolerance phenomenon [10]. Based on these findings, Exp. 3 investigated the influence of repeated exposures to the oEPM on nociceptive response in rats. As shown in Fig. 4 B, two, three, four or six daily reexposures to the oEPM did not change the antinociceptive response when compared to a single exposure to the apparatus. In other words, this kind of antinociception remained unchanged for at least a one week period. These results strengthen the hypothesis that the mechanisms underlying oEPM-induced antinociception do not depend on endogenous opioid activation.

One of the most common pharmacological tools used to investigate the involvement of opioid mechanisms in some types of antinociception induced by environmental stimuli involves showing its reversal with opioid receptor antagonists. In this context, Exp. 4 demonstrated that pretreatment with naltrexone, an opioid receptor antagonist that blocks the three well-known opioid receptors types [49], did not block oEPM-induced antinociception, emphasizing that this type of antinociception is mediated by non-opioid mechanisms. The lack of effect of opioid antagonists on standard EPM- or open arm confinement-induced antinociception has been previously demonstrated [19,28]. In addition, in the present study, naltrexone produced antinociception during the first phase of the formalin test (see Fig. 5, A). Although opioid antagonists are widely used to block the antinociceptive effect of opioid receptor activation, there is evidence demonstrating they also produce antinociception in different nociceptive tests [e.g., 37,50,51]. Despite the antinociceptive effect of naltrexone observed during the first phase of formalin test, it is unlikely that the lack of effect to block oEPM-induced antinociception is related to an intrinsic effect of naltrexone on nociception, since it did not change time spent licking the paw during the second phase of the formalin test in eEPM-exposed rats.

As a typical stressor, the formalin injection associated with the exposure to the oEPM might induce hypothalamus-pituitary-adrenal activation leading to increases in ACTH and plasma corticosterone levels which in turn could enhance fear-like behavior [e.g. 52,53]. Thus, Exp. 5 investigated whether surgical removal of adrenal glands would prevent oEPM-induced antinociception. Adrenalectomy did not lead to any change in nociceptive response assessed during the first phase of the formalin test when compared with sham-operated rats. Yet, adrenal removal did not antagonize oEPM-induced antinociception. However, intriguingly, eEPM ADX rats spent less time licking the injected paw than sham-operated rats, suggesting an antinociceptive effect. However, it remains undetermined how ADX induces antinociception. According to Vissers et al. [54] ADX increase plasmatic  $\beta$ -endorphin and ACTH levels. Thus, considering that the pro-opiomelanocortin (POMC) is the ACTH pro-hormone as well as the precursor of  $\beta$ -endorphin, it is likely that any increase in plasma ACTH levels could be accompanied by increases in  $\beta$ -endorphin levels and consequently in antinociception via its action at central opioid receptors. Despite attractive, this interpretation does not explain why adrenalectomized rats did not exhibit antinociception during first phase of formalin test. Possibly antinociception occurred only during the second phase because animals were moved to a place where they never had been before (i.e., the eEPM or oEPM). In this context, it has been demonstrated that stressors such as a novel environment can provoke pain inhibition in rodents [40,55]. In the present study, eEPM exposure did not produce antinociception *per se*, but reduced nociceptive response in ADX rats.

In conclusion, the present study demonstrated that rats exposed to oEPM displayed antinociception of high magnitude. This type of pain inhibition does not suffer cross-tolerance to morphine and is not blocked by naltrexone or prevented by adrenalectomy. Taken together these results suggest that the oEPM-induced antinociception is not mediated by opiate mechanisms and does not depend on hormones secreted by adrenal glands. Further studies need to be conducted to identify the underlying non-opioid mechanisms of the oEPM-induced antinociception. For instance, it has been widely reported the in-

volvement of non-opioid mechanisms in several types of antinociception induced by threatening situations [e.g. 15,28,56–59]. Considering the aversive characteristics of the oEPM test and given that antiaversive compounds that act at GABA<sub>A</sub>-Benzodiazepine receptor complex, 5-HT<sub>1A</sub> receptor and cannabinoid CB1 receptors [e.g., 15,28,56–60] also change many types of environmentally induced analgesia, it seems reasonable to investigate whether these mechanisms also play a role on oEPM-induced antinociception.

## Acknowledgements

The authors thank Professor Michael M. Morgan (Washington State University Vancouver, USA) and Erin N. Bobeck for suggestions and English corrections. This study was supported by CNPq and PADC/FCF-UNESP. A.M. Cornélio was recipient of CNPq (Proc. 141190/2006-0) and R.L. Nunes-de-Souza received a CNPq research fellowship.

## References

- [1] Deakin JFW, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defense. *J Psychopharmacol* 1991;5:305–15.
- [2] Kelly DD. Stress induced analgesia. *Ann N Y Acad Sci New York* 1986;467.
- [3] Rodgers RJ. Neuropharmacological aspects of adaptive pain inhibition in murine "victims" of aggression. *Aggress Behav* 1995;21:29–39.
- [4] Watkins LR, Mayer DJ. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. *Science* 1982;216:1185–92.
- [5] Fardin V, Oliveiras JL, Besson JM. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat I. The production of behavioral side effects together with analgesia. *Brain Res* 1984;306:105–23.
- [6] Terman GW, Shavit Y, Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC. Intrinsic mechanisms of pain inhibition. Activation by stress. *Science* 1984;226:1270–7.
- [7] Fanselow MS. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A, Bandler, editors. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. New York: Plenum Press; 1991. p. 151–73.
- [8] Lichtman AH, Fanselow MS. Cats produce analgesia in rats on the tail-flick test: naltrexone sensitivity is determined by the nociceptive test stimulus. *Brain Res* 1990;533:91–4.
- [9] Lester LS, Fanselow MS. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. *Behav Neurosci* 1985;99(4):756–9.
- [10] Miczek KA, Thompson ML, Shuster L. Opioid-like analgesia in defeat mice. *Science* 1982;215:1520–2.
- [11] Rodgers RJ, Hendrie CA. Social conflict activates status-dependent endogenous analgesic or hyperalgesic mechanisms in male mice: effects of naloxone on nociception and behaviour. *Physiol Behav* 1983;30:775–80.
- [12] Rodgers RJ, Randall JL. Acute non-opioid analgesia in defeated male mice. *Physiol Behav* 1986;36:947–50.
- [13] Rodgers RJ, Shepherd JK. Prevention of the analgesic consequences of social defeat in male mice by 5HT<sub>1A</sub> anxiolytics, buspirone, gepirone and ipsapirone. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;99:374–80.
- [14] Rodgers RJ, Shepherd JK, Randall JL. Highly Potent Inhibitory effects of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, GR 38032F, on non-opioid defeat analgesia in male mice. *Neuropharmacology* 1990;29(1):17–23.
- [15] Canto-de-Souza A, Nunes-de-Souza RL, Pelá IR, Graeff FG. High intensity social conflict in the Swiss albino mouse induces analgesia modulated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;56:481–6.
- [16] Rodgers RJ, Randall JL. Environmentally induced analgesia: situational factors, mechanisms and significance. In: Rodgers RJ, Cooper SJ, editors. *Endorphins, opiates and behavioural processes*. Chichester: John Wiley; 1988. p. 107–42.
- [17] Rodgers RJ, Randall JL. Benzodiazepine ligands, nociception and 'defeat' analgesia in male mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;91:305–15.
- [18] Bolles RC, Fanselow MSA. Perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci* 1980;3:291–322.
- [19] Lee C, Rodgers RJ. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology (Berl)* 1990;102:507–13.
- [20] Taukulis HK, Goggin CE. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. *Behav Neural Biol* 1990;53:205–16.
- [21] Conceição IM, Maiolini JRM, Mattia N, Vital MA, Santos BR, Smaili S, Frussa-Filho R. Anxiety-induced antinociception in the mouse. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:831–4.
- [22] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149–67.
- [23] Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonist in a maze-exploration model of "fear-motivated behaviour". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984;327:1–5.
- [24] Stephens DN, Meldrum BS, Weidmann R, Schneider C, Grutsner M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharmacology (Berl)* 1986;90:166–9.
- [25] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;92:180–5.
- [26] Lee C, Rodgers RJ. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. *Behav Pharmacol* 1991;2:491–6.

## Author's personal copy

A.M. Cornélio, R.L. Nunes-de-Souza / *Physiology & Behavior* 96 (2009) 440–447

447

- [27] Rodgers RJ, Lee C, Shepherd JK. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology (Berl)* 1992;106:102–10.
- [28] Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, Da-Costa M, Fornari RV, Graeff FG, Pelá IR. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology (Berl)* 2000;150:300–10.
- [29] Mendes-Gomes J, Nunes-de-Souza RL. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. *Brain Res* 2005;1047:97–104.
- [30] Van de Kar LD, Blair ML. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 1999;20:1–48.
- [31] Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003;463:235–72.
- [32] Bogdanov AI, Yarushkina NN. The relationship between analgesia and corticosteroid levels in rats. *Neurosc Behav Physiol* 2000;30:487–9.
- [33] Bogdanov AI, Yarushkina NN. Mechanisms of the effects of adrenocorticotropic hormone on pain sensitivity in rats. *Neurosc Behav Physiol* 2003;33:795–8.
- [34] Mikics E, Barsy B, Barsvári B, Haller J. Behavioral specificity of non genomic glucocorticoid effects in rats: effects on risk assessment in the elevated plus-maze and the open-field. *Horm and Behav* 2005;48:152–62.
- [35] Albrechet-Souza L, Cristina de Carvalho M, Rodrigues Franci C, Brandão ML. Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naïve and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Horm and Behav* 2007;52:267–73.
- [36] Rodgers RJ, Shepherd JK. Effects of an endogenous anxiolytic adrenal steroid, alpha-THDOC, on non-opioid defeat analgesia in male mice: interaction with Ro 15-1788. *J Psychopharmacol* 1988;2:150–8.
- [37] Powell KJ, Abul-Husn NS, Jhamandas A, Olmstead MC, Beninger RJ, Jhamandas K. Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia, tolerance, and reward in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:588–96.
- [38] Reboças ECC, Segato EN, Kishi R, Freitas RL, Savoldi M, Morato S, Coimbra NC. Effect of the blockade of  $\mu$ 1-opioid and 5HT2A-serotonergic/ $\alpha$ 1-noradrenergic receptors on sweet-substance-induced analgesia. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179:349–55.
- [39] Tsuchiya T, Takeuchi T, Hayashida K, Shimizu H, Ando K, Harada E. Milk-derived lactoferrin may block tolerance to morphine analgesia. *Brain Res* 2006;1068:102–8.
- [40] Siegfried B, Netto CA, Izquierdo I. Exposure to novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. *Behav Neurosci* 1987;101:436–8.
- [41] Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 1995;60:91–102.
- [42] Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001;53:597–652.
- [43] Mao J, Price DD, Mayer DJ. Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. *J Neurosci* 1994;14:2301–12.
- [44] Mao J, Sung B, Ji RR. Chronic morphine induces downregulation of spinal glutamate transporters: implications in morphine tolerance and abnormal pain sensitivity. *J Neurosci* 2002;22:8312–23.
- [45] Gardell LR, King T, Ossipov MH, Rice KC, Lai J, Vanderah TW, Porreca F. Opioid receptor-mediated hyperalgesia and antinociceptive tolerance induced by sustained opiate delivery. *Neurosci Lett* 2006;396:44–9.
- [46] Mao J, Price DD, Mayer DJ. Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* 1995;62:259–74.
- [47] Ossipov MH, Lai J, King T, Vanderah TW, Porreca F. Underlying mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. *Biopolymers* 2005;80:319–24.
- [48] Dong Z, Mao R, Han H, Cao J, Xu L. Morphine withdrawal modifies antinociceptive effects of acute morphine in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:578–82.
- [49] Helm S, Trescot AM, Colson J, Sehgal N, Silverman S. Opioid antagonists, partial agonists, and agonists/antagonists: the role of office-based detoxification. *Pain Physician* 2008;11:225–35.
- [50] Choi SS, Han KJ, Lee HK, Han EJ, Suh HW. Possible antinociceptive mechanisms of opioid receptor antagonists in the mouse formalin test. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;75:447–57.
- [51] McNaull B, Trang T, Sutak M, Jhamandas K. Inhibition of tolerance to spinal morphine antinociception by low doses of opioid receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2007;560:132–41.
- [52] Taylor BK, Akana SF, Peterson MA, Dallman MF, Basbaum AI. Pituitary-adrenocortical responses to persistent noxious stimuli in the awake rat: endogenous corticosterone does not reduce nociception in the formalin test. *Endocrinology* 1998;139:2407–13.
- [53] Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halas ZJ, Walton TJ, Brain PF. Corticosterone response to the plus-maze: high correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiol Behav* 1999;68:47–53.
- [54] Vissers KC, De Jongh RF, Crul BJP, Vinken P, Meert TF. Adrenalectomy affects pain behavior of rats after formalin injection. *Life Sci* 2004;74:1243–51.
- [55] Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav Neural Biol* 1987;48:304–9.
- [56] Siegfried B, Nunes-de-Souza RL. NMDA receptors blockade in the periaqueductal gray prevents stress-induced analgesia in attacked mice. *Eur J Pharmacol* 1989;168:239–42.
- [57] Siegfried B, Frischknecht HR, Nunes-de-Souza RL. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:481–90.
- [58] Harris JA. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. *J Physiol* 1996;90:15–25.
- [59] Canto-de-Souza A, Nunes-de-Souza RL, Pelá IR, Graeff FG. Involvement of the midbrain periaqueductal gray 5-HT1A receptors in social conflict induced analgesia in mice. *Eur J Pharmacol* 1998;345:253–6.
- [60] Palazzos E, de Novellis V, Marabese I, Rossi F, Maione S. Metabotropic glutamate and cannabinoid receptor crosstalk in periaqueductal grey pain processing. *Curr Neuropharmacol* 2006;4(3):225–31.