

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS/ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

**Avaliação da injeção na substância cinzenta periaquedutal de agonista serotoninérgico em camundongos submetidos à constrição crônica do nervo ciático: efeitos nos testes de nocicepção e ansiedade**

**Luciana Maria dos Reis**

São Carlos- SP  
2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS / ASSOCIAÇÃO AMPLA UFSCar/UNESP**

**Avaliação da injeção na substância cinzenta periaquedutal de agonista serotoninérgico em camundongos submetidos à constrição crônica do nervo ciático: efeitos nos testes de nocicepção e ansiedade**

**Luciana Maria dos Reis**

**Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Associação Ampla UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências fisiológicas.**

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

São Carlos- SP  
2011

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

R375ai

Reis, Luciana Maria dos.

Avaliação da injeção na substância cinzenta periaquedutal de agonista serotoninérgico em camundongos submetidos à constrição crônica do nervo ciático : efeitos nos testes de nocicepção e ansiedade / Luciana Maria dos Reis. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

79 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Medicina experimental - camundongo. 2. Dor. 3. Ansiedade. 4. Serotonina. I. Título.

CDD: 619.93 (20<sup>a</sup>)

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Luciana Maria dos Reis

Dia 12/12/2011

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

Profª. Drª. Christie Ramos Andrade Leite Panissi.....

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase.....

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.....

Prof. Dr. Eduardo F. Carvalho Netto.....

Dedico este trabalho aos meus pais **Antônio** e **Benedita** pelo incentivo e doação incondicional em todos os momentos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À **Deus** por ter-me provido força e determinação para concluir este trabalho.

À **Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza**, pela orientação competente, compreensão e amizade. A você, meu respeito e admiração.

À banca de qualificação, **Dr. Nivaldo Antônio Parizotto, Dra. Rosana Matioli e Dra. Cleópatra da Silva Planeta** pelas importantes sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Ao secretário **Alexandre**, pelo trabalho desenvolvido na secretaria do PIPG-CF.

A todos os amigos do laboratório de pesquisa e aprendizagem (LPA), pela amizade e apoio.

A todos os meus amigos, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis e pelos momentos agradáveis de convivência.

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	<b>8</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>3. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
3.1. Dor Fisiológica X Dor Neuropática	12
3.2. Modulação Descendente da Dor	17
3.3. Componente Afetivo-Motivacional da Dor	20
3.4. Modelos Animais de Dor Neuropática	24
3.5. Tratamento da Dor Neuropática/ Evidências Experimentais	26
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
5.1. Sujeitos	33
5.2. Ética	33
5.3. Constrição do Nervo Ciático	33
5.4. Cirurgia e Administração de Drogas	34
5.5. Drogas	35
5.6. Teste de Ansiedade	35
5.7. Teste Nociceptivo	37
5.8. Histologia	38
5.9. Análise Estatística	38
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
6.1. Experimento 1: Efeito da exposição ao predador em animais submetidos à constrição crônica do nervo ciático.	40
6.2. Experimento 2: Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na matéria cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador	42
<b>7. DISCUSSÃO</b>	<b>53</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>59</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	<b>60</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Exposição do nervo ciático para constrição	<b>34</b>
<b>Figura 2.</b> Teste de exposição ao rato	<b>37</b>
<b>Figura 3-</b> Representação esquemática dos sítios de microinfusão na SCP ventrolateral de camundongos. O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição.	<b>39</b>
<b>Figura 4.</b> Efeito da exposição ao predador nas porcentagens de entradas e tempo gasto em ambiente protegido em animais SHAM e expostos à constrição do nervo ciático (CNC).	<b>40</b>
<b>Figura 5.</b> Efeito da exposição ao predador no frequência de coçar em animais SHAM e expostos à constrição do nervo ciático (CNC).	<b>41</b>
<b>Figura 6.</b> Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao total de entradas.	<b>43</b>
<b>Figura 7.</b> Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação à porcentagem de entradas no ambiente protegido.	<b>44</b>
<b>Figura 8.</b> Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação à porcentagem de tempo gasto no ambiente protegido.	<b>45</b>
<b>Figura 9.</b> Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao frequência de coçar.	<b>46</b>
<b>Figura 10.</b> Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao tempo gasto no teste de hiperalgesia mecânica.	<b>48</b>
<b>Figura 11.</b> Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação à carga no teste de hiperalgesia mecânica.	<b>49</b>
<b>Figura 12.</b> Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao tempo gasto no teste de hiperalgesia térmica.	<b>50</b>
<b>Tabela 1.</b> Comportamentos avaliados durante o teste de exposição ao predador.	<b>52</b>

## **LISTA DE ABREVIACOES**

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SCP** - Substância Cinzenta Periaquedutal

**SCPvl** – Substância Cinzenta Periaquedutal Ventrolateral

**5-HT** - Serotonina

**CNC** - Constrição do nervo ciático

**RB** – Rato de Brinquedo

**RV** – Rato de Verdade

**TE** – Total de Entradas

**EP** – Entradas no Ambiente Protegido

**TP** - Tempo no Ambiente Protegido

**Sal** - Salina

## 1. RESUMO

Estudos têm demonstrado que situações de ansiedade/medo podem inibir a nocicepção e que a serotonina (5-HT) possui efeito antinociceptivo em estruturas do encéfalo, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da ansiedade/medo na nocicepção, induzida pelo modelo de constrição do nervo ciático (CNC), e da infusão intra-SCP ventrolateral (SCPvl) do 8-OH-DPAT (agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>), nos dados de nocicepção e ansiedade/medo. Camundongos machos, suíço-albino (n= 7-15/grupo), foram submetidos à exposição ao rato verdadeiro (RV) e de brinquedo (RB), para registro da nocicepção (total de coçar) e da ansiedade/medo [total de entradas (TE), porcentagens de entradas (%EP) e de tempo gasto no compartimento protegido (%TP) do aparato e comportamentos de auto-limpeza, levantar e total de imobilidade (s)], bem como aos testes de hiperalgesia mecânica e térmica. O Experimento 1, realizado sem administração de drogas, mostrou que os animais com CNC apresentaram aumento do total de coçar em relação ao grupo SHAM sendo, este índice, reduzido pela exposição ao RV. Mostrou também aumento das %EP e %TP nos animais expostos ao RV. No Experimento 2, o 8-OH-DPAT (5,6 nmol/0,1 µl) injetado na SCP de camundongos com CNC diminuiu os índices de ansiedade (TE, %EP e %TP), apenas nos animais expostos ao RV, sem diminuir estes índices nos animais SHAM. A dose de 10 nmol/0,1 µl produziu efeito apenas em relação ao aumento da %TP e tempo de imobilidade, nos animais expostos ao RB. Nenhuma das doses de 8-OH-DPAT foi capaz de modificar a resposta nociceptiva (frequência de coçar e testes de hiperalgesia mecânica e térmica). Em conjunto, concluímos que a exposição do camundongo ao predador (rato) produziu aumento da ansiedade/medo em ambos os camundongos, SHAM e CNC e redução das medidas de nocicepção apenas nos animais com CNC. O agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, na dose de 5,6

nmol, intra- SCPvl produziu efeito ansiolítico nos camundongos com CNC, sem alterar os índices de dor, enquanto a dose de 10 nmol produziu efeitos sugestivos de aumento de nocicepção. Desta forma, estes resultados fortalecem a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da SCPvl na modulação das respostas de ansiedade/medo e na nocicepção avaliadas em roedores.

## 2. ABSTRACT

Studies have shown that situations of anxiety/fear can inhibit nociception and serotonin (5-HT) has antinociceptive effect in the brain structures such as the periaqueductal gray matter (PAG). This work aimed to evaluate the effect of anxiety/fear in nociception-induced model of sciatic nerve constriction (CNC), and infused intra-ventrolateral PAG (PAGvl) of 8-OH-DPAT (5-HT<sub>1A</sub> agonist), nociception and anxiety/fear data. Male mice, Swiss albino (n = 7-15/group) were exposed to the real rat (RR) and toy rat (TR), for registration of nociception (total scratching) and anxiety/fear [total entries (TE), percentage of protected entries (% PE) and time spent (% PT) in the apparatus and behaviors of self-cleaning, rearing and total immobility (s)], as well as tests of mechanical and thermal hyperalgesia. Experiment 1, performed without drug administration, showed that animals with CNC had an increase in total scratching compared to SHAM group being, this index decreased by exposure to RR. It also showed an increase in % PE and % PT in animals exposed to RR. In Experiment 2, the 8-OH-DPAT (5.6 nmol/0.1 µl) intra-PAG of mice with CNC, decreased levels of anxiety (TE, % PE, and % PT) only in animals exposed to RR, without decreasing the indices in SHAM animals. The 10 nmol/0.1 µl dose takes effect only in increased % PT and immobility time in animals exposed to TR. None doses of 8-OH-DPAT was able to modify the nociceptive response (scratching and frequency of mechanical and thermal hyperalgesia tests). Together, we conclude that exposure of mice to the predator (rat) produced increased anxiety/fear in both SHAM or CNC mice, and reduction measures of nociception only in CNC animals. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist in 5.6 nmol dose, intra-PAGvl, produced anxiolytic effects in CNC mice without altering the levels of pain, while the 10 nmol dose effects produced suggestive nociception increased. Thus, these results support the

involvement of the 5-HT<sub>1A</sub> receptors in modulating responses PAGvl anxiety/fear and nociception evaluated in rodents.

### **3. INTRODUÇÃO**

#### **3.1. Dor Fisiológica X Dor Neuropática**

De acordo com a Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com potencial destruição dos tecidos ou descrita em termos de grande destruição (Bonica, 1990). Entretanto, lesões do sistema nervoso central ou periférico podem levar a um tipo especial de dor denominado dor neuropática (Dickenson e Suzuki, 2005).

Enquanto a dor fisiológica é fundamental para a preservação da integridade do indivíduo porque alerta para a ocorrência de lesões nos diversos tecidos corporais, a dor neuropática, é mal-adaptativa, não tem valor biológico e é uma importante causa de incapacidade permanente, principalmente quando cronificada sendo, portanto, caracterizada como um tipo de dor patológica (Benbouzid et al, 2007).

Na dor fisiológica, o primeiro passo na sequência de eventos que originam o fenômeno sensitivo-doloroso é a transformação dos estímulos ambientais, captados pelos nociceptores, em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas são transferidos para o sistema nervoso central (SNC), onde a informação sensorial é decodificada e interpretada (Dickenson e Suzuki, 2005). Os nociceptores são terminações nervosas livres localizadas em vários tecidos corporais e que, ao serem ativados por estímulos térmicos, mecânicos ou químicos intensos, são capazes de informar ao SNC, através das vias de transmissão, sobre a qualidade, localização, intensidade e duração do estímulo nociceptivo (Sorkin e Carlton, 1997).

A transmissão da informação, originada nos nociceptores, para a medula espinhal ocorre, inicialmente, através de fibras nervosas mielinizadas de condução rápida (fibras A-delta e C). Essas fibras, constituídas pelos chamados neurônios de primeira ordem, conduzem o impulso até a medula espinhal onde terminam fazendo sinapse com o neurônio de segunda ordem, nas lâminas II, V e, principalmente na lâmina I do corno posterior da substância cinzenta da medula espinhal (Nagy e Hunt, 1983; Hund e Mantyh, 2001; Davis, 2006). O principal neurotransmissor liberado entre os neurônios primário e secundário é o glutamato, embora outros mediadores excitatórios (substância P) e inibitórios (GABA e glicina) estejam envolvidos nesta etapa da transmissão do estímulo doloroso (Okuse, 2007).

Os neurônios da lâmina II apresentam axônios curtos de projeção local (Woolf e Fitzgerald, 1983), enquanto os neurônios da lâmina I e V apresentam axônios longos, que cruzam o plano mediano, ganham o funículo lateral do lado oposto e inflectem-se cranialmente, constituindo o trato espino-talâmico lateral, o qual constitui uma via importante na discriminação dos estímulos de dor e temperatura (Craig e Dostrovsky, 2001).

O tracto espino-talâmico lateral termina no tálamo, principalmente no núcleo ventral póstero-lateral, onde faz sinapse com os neurônios de terceira ordem. Estes finalmente se projetam para o córtex sensorial primário, ou área somestésica do córtex cerebral, no giro pós-central, permitindo que a pessoa tenha, conscientemente, conhecimento de uma dor aguda em um local específico. Através desta via chegam ao córtex cerebral, impulsos originados no tronco e nos membros do lado oposto, sendo a dor originada na face transmitida por meio da via trigêmio-talâmica, originada no V par de nervos cranianos (Hunt e Bester, 2005).

Se ocorrer lesão tecidual, a dor rápida é seguida por dor lenta e crônica que, diferentemente da dor aguda inicial, utiliza diversas vias, com número variável de neurônios de projeção, além de não possuir uma organização somatotópica, de modo que não pode ser

localizada com precisão. O primeiro neurônio desta via é pequeno, com fibra C delgada amielínica e penetra na medula espinhal fazendo sinapse com neurônios de segunda ordem nas lâminas I e/ou V do corno dorsal da medula espinhal. Estes, por sua vez, apresentam ampla faixa dinâmica, atingindo o mesencéfalo, a formação reticular e o tálamo (Hunt e Bester, 2005).

Os neurônios da lâmina I se projetam para a área parabraquial constituindo o tracto espino-parabraquial, importante nas reações afetivas à dor e nos sistemas de controle descendente (Wall et al, 1988). Os neurônios da área parabraquial se projetam para o núcleo central da amígdala, envolvido nas reações emocionais aversivas à dor (Gauriau e Bernard, 2002), e para o hipotálamo ventrolateral medial que, por sua vez, apresenta projeções para a substância cinzenta periaquedutal, envolvida nos comportamentos aversivos e ativação de tratos descendentes que controlam a dor através da modulação da atividade espinhal (Gauriau e Bernard, 2002; Millan, 2002).

Os neurônios da lâmina V se projetam para formação reticular do tronco cerebral e para os núcleos da linha média e intralaminares do tálamo, terminando em áreas do córtex cerebral relacionadas às emoções, à integração sensorial, à personalidade e ao movimento, o que resulta nas respostas de afastamento, autonômicas e afetivas à dor (Hunt e Bester, 2005).

A estimulação repetida e a liberação de mediadores químicos endógenos como, por exemplo, histamina, bradicinina, prostaglandinas e serotonina (5-HT), decorrentes da lesão tecidual fazem com que as terminações relacionadas às fibras C fiquem sensibilizadas, resultando em ativação com menos estimulação que a usualmente necessária, estado conhecido como “sensibilização periférica” (Dray, 1997). O aumento da atividade nas fibras aferentes nociceptivas gera uma plasticidade nas células do corno dorsal da medula espinhal, as quais podem se tornar espontaneamente ativas resultando em despolarização adicional e hipersensibilidade neuronal, estado conhecido como “sensibilização central” (Pogatzki et al.,

2002). As sensibilizações periférica e central são consideradas respostas à inflamação por lesão tecidual, entretanto, existem evidências da contribuição destes eventos no desenvolvimento e manutenção da hiperalgesia e alodinia, observadas em casos de dor neuropática (Pogatzki et al., 2002).

As propriedades funcionais dos axônios e das unidades centrais precisam estar íntegras para que o processamento da informação sensitiva ocorra de modo adequado. Em pacientes com neuropatias periféricas ou centrais há modificações anatômicas, eletrofisiológicas e neuroquímicas significativas das vias nervosas periféricas e dos núcleos e tratos implicados no processamento sensitivo gerando alterações permanentes que resultam em dor espontânea ou gerada por estímulos não nocivos (alodinia) e resposta exacerbada aos estímulos nocivos (hiperalgesia) (Ueda, 2006).

A lesão de nervos periféricos induz a expressão de nociceptores sobre fibras nas quais estes usualmente não estão presentes (Woolf e Mannion, 1999; Ueda, 2006). Ocorre um aumento dos receptores para o glutamato no corno dorsal da medula espinhal, como forma compensatória à diminuição da substância P nesta região, e uma diminuição dos receptores para morfina, caracterizando a tolerância aos opióides (Nichols et al., 1997; Porreca et al., 1998). O aumento na expressão e atividade dos canais de cálcio voltagem-dependentes contribui para o aumento da excitabilidade neuronal, e está envolvida no mecanismo de ação da gabapentina, uma droga comumente utilizada no tratamento da dor neuropática (Woolf e Mannion, 1999; Ueda, 2006).

Em lesões nas quais os nervos periféricos tornam-se sensibilizados e inflamados pela pressão constante, as fibras de pequeno diâmetro, responsáveis pela transmissão da dor, têm menor probabilidade de sobreviver e se regenerar que as fibras maiores, responsáveis pela transmissão das sensações táteis finas, vibratórias e proprioceptivas. Com isso, estímulos previamente não dolorosos podem se tornar gravemente perturbadores, já que as fibras de grosso

calibre, durante o processo de regeneração, emitem ramos que irão fazer sinapse sobre as fibras de pequeno diâmetro restantes, facilitando as vias de transmissão associadas à nocicepção (Lisney, 1989). A dor em resposta a estímulos normalmente indolores (alodinia) também é dependente da excitação cruzada entre os neurônios, decorrente do dano à mielina e conseqüente falta de isolamento entre os neurônios (Lisney, 1989). A lesão nervosa periférica também causa diminuição dos interneurônios GABAérgicos, que possuem atividade inibitória no corno dorsal da medula espinhal (Truini e Cruccu, 2006).

Nas lesões completas de nervos periféricos o crescimento do nervo é bloqueado, ocorrendo formação de neuromas capazes de gerar potenciais de ação espontâneos. Estes focos ectópicos de potenciais de ação também são observados em lesões parciais, onde a regeneração é bloqueada a diferentes intervalos, gerando microneuromas disseminados (Vallbo et al., 1979; Nordim et al., 1984; Cline et al., 1989). Os focos ectópicos surgem porque as proteínas sintetizadas normalmente no corpo celular e transportadas para o axônio periférico têm seu trajeto obstruído pela lesão, gerando excitabilidade anormal nestes locais e sítios anormalmente sensíveis à estimulação mecânica (Vallbo et al., 1979; Nordim et al., 1984; Cline et al., 1989).

Além dos mecanismos periféricos, há evidências de que na dor das neuropatias periféricas exista participação de mecanismos centrais, como a reorganização da representação somato-sensória no córtex cerebral, uma vez que, frequentemente, a dor atinge territórios distantes do local da lesão (hiperalgesia secundária) e o bloqueio anestésico das vias periféricas não controla o desconforto de muitos pacientes (Birklein e Rowbotham, 2005). Além disso, como nos demais tipos de dor crônica, a dor neuropática promove a ativação de regiões do sistema nervoso central que são importantes nas reações afetivas à dor. Assim, o surgimento de co-morbidades como a ansiedade e depressão pode ser decorrente da ativação de estruturas do SNC como por exemplo,

área parabraquial, núcleo central da amígdala, substância cinzenta periaquedutal e áreas do córtex cerebral relacionadas às emoções, à integração sensorial e à personalidade (Hunt e Bester, 2005).

Recentemente, estudos têm demonstrado a participação de uma resposta imune adaptativa do sistema nervoso central na fisiopatologia da dor neuropática (Austin e Moalem-Taylor, 2010; Ren e Dubner, 2010; Grace et al., 2011). De acordo com estes estudos, a ativação de linfócitos T e microgliócitos, no sistema nervoso central contribuem para a hipersensibilidade nos nervos periféricos e no gânglio da raiz dorsal, favorecendo o estado de hiperalgesia (Grace et al., 2011).

A fisiopatologia da dor neuropática não está completamente esclarecida, no entanto, a sensibilização dos receptores, a ocorrência de focos ectópicos de potencial de ação, bem como a atividade anormal das unidades de processamento central da aferência sensitiva, são mecanismos importantes envolvidos na gênese deste tipo de dor (Koltzenberg, 2005).

### **3.2. Modulação Descendente da Dor**

É conhecido que a transmissão da dor na medula espinhal está sujeita a modulação por estruturas supra-espinhais como o *locus coeruleus* (LC) e os *núcleos da rafe* (Millan, 2002; Ren e Dubner, 2002; Suzuki et al., 2004). As vias descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas, originadas nos *núcleos da rafe* e LC, respectivamente, se projetam para o corno dorsal da medula espinhal, através do funículo dorsolateral, favorecendo o processo de inibição descendente da transmissão do estímulo doloroso (Vanegas e Schaible, 2004). Os *núcleos da rafe*, por sua vez, recebem projeções da substância cinzenta periaquedutal (SCP), constituindo um importante sistema de controle descendente o qual pode facilitar ou inibir a transmissão da dor na região do corno dorsal (Carstens et al., 1979; Vanegas, 2004; Vanegas e Schaible, 2004).

A hiperalgesia resultante da inflamação, em modelos experimentais, é mais intensa quando o controle descendente é bloqueado pela secção bilateral do funículo dorsolateral (Ren e Dubner, 1996), pela destruição dos neurônios serotoninérgicos da região dos *núcleos da rafe* (Wei et al, 1999) ou pela lesão do LC (Tsuruoka e Willis, 1996), sugerindo que a inflamação pode levar a um aumento na inibição descendente (Vanegas, 2004). A plasticidade nos *núcleos da rafe* durante a inflamação, no entanto, envolve mudanças tanto na inibição quanto na facilitação descendente. A estimulação elétrica dos *núcleos da rafe* ativa sinapses glutamatérgicas (via receptor NMDA) no corno dorsal da medula espinhal e, geralmente, leva à inibição da transmissão do impulso doloroso. Entretanto, três horas após a indução da inflamação experimental o efeito inibitório da estimulação elétrica diminui (Herrero e Cervero, 1996), sugerindo a ativação de vias descendentes facilitatórias que são capazes de bloquear a inibição descendente três horas após o início do processo inflamatório (Vanegas, 2004). Após 24 horas da indução da inflamação experimental, a ativação de vias descendentes inibitórias, envolvendo a ativação de receptores AMPA, tende a prevalecer (Herrero e Cervero, 1996).

O controle da transmissão espinhal do impulso doloroso pelos *núcleos da rafe* envolve vias serotoninérgicas e receptores 5-HT<sub>3</sub> localizados no corno dorsal da medula espinhal (Morales et al, 1998) e nas fibras nervosas periféricas de pequeno diâmetro (Zeitz et al, 2002). Tem sido demonstrado que as vias descendentes serotoninérgicas podem gerar efeitos excitatórios ou inibitórios (Suzuki et al., 2002). Estes efeitos controversos, em modelos experimentais, podem ser devido à variabilidade de doses das drogas utilizadas, de vias de administração ou diferenças entre espécies (Suzuki e Dickenson, 2005).

Na dor neuropática, existe um aumento dos impulsos excitatórios descendentes dos *núcleos da rafe* para o corno dorsal da medula espinhal, que pode ocorrer como um mecanismo

compensatório devido à diminuição do impulso sensorial normal decorrente da lesão do nervo periférico (Dickenson et al., 2001; Porreca et al., 2002).

Narita e colaboradores (2003) demonstraram através da expressão de *c-fos*, que a lesão de nervos periféricos em ratos promove ativação de estruturas supra-espinhais como SCP, córtex frontal, tálamo, enquanto que a atividade neuronal em estruturas como a amígdala, hipotálamo e hipocampo, permanece inalterada. Dentre as estruturas relacionadas ao controle descendente da dor, a SCP exerce importante função. De forma particular, em resposta à qualidade do estímulo, ocorre à mobilização de locais específicos da SCP, tais como as colunas, dorsolateral, dorsomedial e ventrolateral (Canteras e Goto, 1999; Comoli et al., 2003).

Tem sido comprovado que diferentes tipos de dor são capazes de estimular diferentes regiões da SCP, gerando uma resposta comportamental específica em cada caso. Estudos utilizando expressão de *c-fos* como um marcador da atividade neuronal (Key e Bandler, 1993, 1998; Clemente et al., 1996; Key et al., 1994, 2000) têm demonstrado que a dor originada em estruturas somáticas profundas (músculos e articulações) e em estruturas viscerais é capaz de ativar, de forma específica, a coluna ventrolateral da SCP. Esta ativação pode gerar uma resposta comportamental passiva, caracterizada por imobilidade, hiporeatividade aos estímulos externos, diminuição da vigilância, hipotensão, bradicardia e analgesia opióide (Bandler et al., 1991; Lovick, 1993; Teskey e Kavaliers, 1995). Entretanto, a dor evocada pela estimulação cutânea é capaz de ativar a coluna dorsolateral da SCP, gerando uma resposta comportamental ativa, caracterizada por comportamentos de luta ou fuga, aumento da vigilância, hiper-reatividade, hipertensão, taquicardia e analgesia não-opióide (Bandler et al., 1991; Lovick, 1993; Bandler e Keay, 1996).

A estimulação elétrica da coluna ventral da SCP é capaz de reduzir a alodinia mecânica e térmica, observadas após lesão nervosa periférica (Lee et al., 2000). Este efeito é bloqueado pela

naloxona (antagonista opióide), sugerindo a participação de opióides na redução da dor neuropática por ativação de vias modulatórias descendentes originadas na SCP (Lee et al., 2000). A microinjeção de ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, na SCP não é capaz de provocar mudanças nas respostas comportamentais à dor evocada pela injeção subcutânea de formalina em animais controle, entretanto, provoca evidente aumento destes comportamentos em animais com lesão nervosa periférica (Monhemius et al., 2001). Estes resultados sugerem que a inibição da nocicepção mediada pela SCP é inativa em condições normais, porém é ativada por impulsos nociceptivos persistentes, como na dor neuropática, provavelmente devido às alterações no circuito nociceptivo decorrentes das neuropatias periféricas (Monhemius et al., 2001).

### **3.3. Componente Afetivo-motivacional da Dor**

A dor pode ser entendida como uma experiência subjetiva com propriedades sensoriais e afetivas, cujo componente afetivo envolve múltiplas emoções (Ohayon e Schatzberg, 2003; Wilson et al., 2007). A presença de co-morbidades, como ansiedade e depressão, é comum em pacientes com diferentes tipos de dor, especialmente em estados de dor crônica (Van Houdenhove, 2000; Ohayon e Schatzberg, 2003). Na clínica, grandes níveis de ansiedade estão associados ao aumento da percepção da dor aguda (Marchand e Arsenault, 2002; Villemure et al., 2003) e crônica (Vickers e Boocock, 2005; Christie e Moore, 2005) e intervenções clínicas, principalmente farmacológicas, capazes de diminuir a ansiedade, estão relacionadas à diminuição da percepção da dor crônica (Rhudy e Meagher, 2000).

Em contraste com dados clínicos, estudos em modelos animais demonstram que a ansiedade pode induzir a antinocicepção que, por sua vez, é bloqueada por ansiolíticos como a

bupirona (Rodgers e Shepherd, 1989) e o 8-OH-DPAT (Nunes-de-Souza et al., 2000). Por outro lado, a nociceção é capaz de aumentar o nível basal de ansiedade e reduzir a ação de drogas ansiolíticas, como o diazepam e a bupirona (Fernández-Guasti et al., 2005).

Entretanto, segundo Riley et al. (1981), a influência de estímulos estressores físicos e/ou emocionais sobre a nociceção, em modelos animais, é dependente do estímulo aplicado. A exposição ao estresse físico, como o nado forçado (Onodera et al., 2000) e a aplicação de choques elétricos (Yamada e Nabeshima, 1995), induz analgesia, enquanto a exposição crônica a estes estímulos provoca hiperalgesia em roedores (da Silva Torres et al., 2003).

De forma semelhante, a exposição crônica ao estresse emocional (ansiedade), através do modelo de estresse rotacional, induz hiperalgesia na fase tardia do teste de formalina em camundongos (Boccalon et al., 2006), enquanto a exposição aguda ao odor de predadores induz analgesia, cujo mecanismo varia de acordo com o tempo de exposição ao estímulo aversivo (Kavaliers et al., 1997). A exposição de camundongos ao odor de predadores por 15 minutos induz analgesia opióide, avaliada através da aplicação de calor nocivo. Em contraste, uma exposição de 30 segundos ao odor aversivo produz analgesia não-opióide de baixa intensidade e curta duração e é parcialmente sensível à administração intraperitoneal de 8-OH-DPAT, agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, e bicuculina, antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub> (Kavaliers et al., 1997).

Segundo Blanchard et al. (1998), as diferenças qualitativas e quantitativas nas respostas de analgesia decorrentes da exposição de roedores ao estresse físico ou emocional estão intimamente relacionadas com a variação no tempo de exposição e na qualidade do estímulo aplicado.

Robert e Caroline Blanchard, avaliando as respostas defensivas comportamentais de roedores (ratos e camundongos) em confronto com predadores, classificaram as estratégias comportamentais exibidas de acordo com o nível de ameaça, se potencial ou real. No nível de

ameaça potencial, as estratégias observadas foram comportamentos exploratórios cautelosos e excitantes, utilizando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. Já no nível de ameaça real, foi observada fuga ou imobilidade, e no caso em que o predador estava muito próximo ou em contato direto com o animal os comportamentos observados foram fuga ou luta defensiva (Blanchard e Blanchard, 1988; Blanchard et al., 1997).

Tentando distinguir os comportamentos relacionados com ansiedade e medo, alguns autores sugerem que quando o estímulo ou 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).

No que se refere à influência dos comportamentos de medo e ansiedade no processo de modulação da dor, tem sido sugerido que o medo, caracterizado por uma reação imediata a uma ameaça real, é capaz de inibir a dor enquanto a ansiedade, caracterizada por um afeto negativo e apreensivo a uma ameaça potencial, pode intensificá-la (Rhudy e Meagher, 2000). Segundo Rhudy e Meagher (2000), a ansiedade promove um estado de aumento da vigilância, o qual aumenta a atenção e, conseqüentemente, a sensibilidade à dor.

Embora tenha sido demonstrada a existência de uma relação recíproca entre dor e distúrbios afetivos (Vatine et al., 2000; Takahashi et al., 2003; Gomes et al., 2005; Boccalon et al., 2006; Jiménez-Velázquez, 2006; Narita et al., 2006; Ulrich-Lai et al., 2006; Benbouzid et al., 2007; Hasnie et al., 2007; Matsuzawa-Yanagida et al., 2007; Pedersen et al., 2007; Suzuki et al., 2007; Wilson et al., 2007, Roeska et al., 2009), a influência da nocicepção sobre o processo de ansiedade e depressão permanece controversa na literatura.

A dor decorrente da inflamação e da constrição crônica do nervo ciático (Narita et al., 2006; Matsuzawa-Yanagida et al., 2007) e da constrição de nervos espinhais (Suzuki et al., 2007), em camundongos, produz significativo aumento da ansiedade, avaliada através do teste claro-escuro e do labirinto em cruz elevado. De forma semelhante, a inflamação do nervo ciático em camundongos, produz aumento da ansiedade, avaliada através do labirinto em cruz elevado e do teste *marble-burying* (Benbouzid et al., 2007). Entretanto, a constrição crônica do nervo ciático, não altera a ansiedade, avaliada através do campo aberto e do labirinto em cruz elevado em camundongos C57BL/6J (Hasnie et al., 2007). Segundo Hasnie (2007), a diferença nos resultados observados pode estar relacionada aos diferentes protocolos experimentais utilizados em cada estudo.

Segundo Blackburn-Munro e Blackburn-Munro (2001), a dor crônica pode ser considerada uma forma de estresse crônico. Neste contexto, estruturas pertencentes ao sistema límbico, como córtex pré-frontal, septo, hipocampo, amígdala, hipotálamo medial, substância cinzenta periaquedutal, núcleo dorsal e mediano da rafe e colículos superior e inferior (Nunes-de-Souza et al., 2000; Brandão et al., 2003; Figueiredo et al., 2003; Misslin, 2003; McNaughton e Corr, 2004), podem estar intimamente ligadas ao circuito neural envolvido nos aspectos sensório-discriminativos e afetivo-motivacionais da dor (La Graize et al., 2005; Pedersen et al., 2007).

A microinjeção do agonista do receptor GABA<sub>A</sub> no núcleo central da amígdala é capaz de atenuar comportamentos de fuga, avaliados através do teste claro-escuro e reverter a hipersensibilidade mecânica em ratos submetidos à constrição crônica do nervo ciático (Pedersen et al., 2007). Estes dados demonstram a participação dos receptores GABA<sub>A</sub> da amígdala nos componentes afetivo-motivacional e sensório-discriminativo da dor neuropática (Pedersen et al., 2007), embora outros estudos tenham demonstrado a participação da amígdala no componente

afetivo mas não sensorial da dor (Nunes-de-Souza et al., 2000; Tanimoto et al., 2003; Gao et al., 2004; Matsuzawa-Yanagida et al., 2007).

A administração de paroxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, no córtex somatosensorial primário reduz a hiperalgesia térmica e mecânica em ratos submetidos à constrição crônica do nervo ciático sem alterar os comportamentos de ansiedade, avaliados através do labirinto em cruz elevado e do teste claro-escuro (Matsuzawa-Yanagida et al., 2007), indicando uma modulação seletiva do componente sensorial da dor por esta estrutura encefálica. Por outro lado, a microinjeção de morfina (La Graize et al., 2005) ou paroxetina (Matsuzawa-Yanagida et al., 2007) no córtex cingulado anterior em ratos submetidos à constrição crônica do nervo ciático reduz os comportamentos de fuga e ansiedade sem alterar a hipersensibilidade sensorial decorrente da dor, indicando uma modulação seletiva do componente afetivo da dor por esta estrutura do sistema límbico.

### **3.4. Modelos Animais de Dor Neuropática**

Os modelos animais de dor neuropática são considerados de grande importância, pois permitem reproduzir características comportamentais e patológicas das síndromes dolorosas periféricas ou centrais observadas em humanos favorecendo, assim, a identificação de efeitos analgésicos de drogas, bem como a investigação de mecanismos neurobiológicos que não são facilmente estudados no homem por questões éticas e sociais (Ralston, 1998).

As mudanças morfológicas e eletrofisiológicas decorrentes das neuropatias periféricas geralmente são investigadas através de ligações ou secções de nervos periféricos em roedores (ratos e camundongos) (Ralston, 1998; Koltzenburg, 2005), enquanto que as alterações decorrentes de danos no SNC são estudadas através do uso de modelos animais de trauma,

isquemia ou lesão tóxica das estruturas do sistema nervoso supra-segmentar (Wiesefeld-Hallin et al., 1997) ou medula espinhal (Yeziarski, 1996).

A lesão parcial do nervo ciático através de constrição crônica foi descrita, inicialmente, por Bennett e Xie (1988) e caracteriza o modelo mais frequentemente utilizado como material experimental na investigação sobre dor neuropática (Bardim et al., 2000; Ardid et al., 2001; Liu et al., 2002; Vogel et al., 2003; Nitanda et al., 2005; Reis et al., 2007). Este modelo envolve a realização de ligaduras ao redor do nervo ciático, produzindo uma mononeuropatia periférica cuja manifestação dolorosa (hiperalgesia, alodinia e sinais comportamentais de dor espontânea), induzida por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, torna-o vantajoso do ponto de vista anatômico, bioquímico e fisiológico (Ralston, 1998).

Alterações neuroanatômicas, como a degeneração dos neurônios do corno dorsal (Sugimoto et al., 1990) e das fibras aferentes somáticas, seguidas de regeneração com excitação cruzada entre os neurônios (Colvin et al., 1996), bem como alterações neuroquímicas, como a redução da substância P (Kajander e Xu, 1995) e das sinapses GABAérgicas no corno dorsal da medula espinhal (Colvin et al., 1997), têm sido relacionadas ao modelo de constrição crônica do nervo ciático.

Outros modelos animais de neuropatias periféricas, como aqueles envolvendo a secção parcial do nervo ciático (Seltzer et al., 1990), a ligação dos nervos espinhais (Kim e Chung, 1992) e a compressão do nervo ciático ou sural (Mosconi e Kruger, 1996) são descritos na literatura. Estes modelos, assim como os modelos de constrição crônica do nervo ciático geralmente são caracterizados pela presença de sinais de dor espontânea (lambadura, batida ou evitação de contato da pata afetada com o solo) e hipersensibilidade a estímulos mecânicos e térmicos (Koltzenberg, 2005). Entretanto, têm sido relatadas diferenças entre modelos no que se refere ao início e duração dos sinais. No modelo de constrição crônica, os sinais de dor

espontânea e hiperalgesia a estímulos mecânicos e térmicos são observados por até 24 horas após a lesão e podem permanecer por um período de 3 a 4 meses (Bennett e Xie, 1988). Porém, no modelo de secção parcial do nervo ciático e ligação dos nervos espinhais, estes sinais se iniciam poucas horas após a lesão e tendem a permanecer por um período de 7 meses (Seltzer et al., 1990; Kim e Chung, 1992).

### **3.5. Tratamento da Dor Neuropática / Evidências Experimentais**

O tratamento das síndromes álgicas envolve interações psicossociais e biológicas, incluindo esquemas medicamentosos adequados, fisioterapia, terapia ocupacional, psicoterapia e, em alguns casos, intervenções em nível periférico, como a descompressão nervosa, ressecção de neuroma ou desnervação proximal através de bloqueios neurolíticos (Russo e Brose, 1998; Davis, 2006; Reis et al., 2007).

Os medicamentos utilizados no tratamento da dor proveniente de neuropatias periféricas ou centrais podem ser classificados em opióides, os quais costumam ser mais efetivos no tratamento inicial ou em associação com outros agentes (Davis, 2006); moduladores dos canais de cálcio que, embora sejam efetivos na redução da dor, costumam gerar efeitos colaterais (Mellegers et al., 2001; Parsons et al., 2004) e drogas que aumentam a inibição descendente através da modulação da neurotransmissão monoaminérgica (Harden e Cohen, 2003; Davis, 2006).

A preocupação em reduzir a dor neuropática e suas conseqüências tem estimulado a realização de pesquisas com diversos recursos farmacológicos tais como, anti-inflamatórios não-esteroidais (Vanegas et al., 1997; Vasquez e Vanegas, 2000; Hernández e Vanegas, 2001;

Vasquez et al., 2005), anticonvulsivantes (Suzuki et al., 2005; Coderre et al., 2007), ansiolíticos (Kontinen e Dickenson, 2000) e antidepressivos (Pedersen et al., 2005; Leventhal et al., 2007).

Tem sido demonstrado que a resposta dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal é reduzida após administração periférica ou intra-SCP de dipirona, um anti-inflamatório não-esteroidal, em ratos (Hernández e Vanegas, 2001; Vasquez e Vanegas, 2000; Vasquez et al., 2005). Estes efeitos são abolidos pela microinjeção de naloxona na medula espinhal (Hernández e Vanegas, 2001), nos *núcleos da rafe* (Vasquez e Vanegas, 2000; Vasquez et al., 2005) e na SCP (Vasquez et al., 2005), sugerindo a participação de opióides endógenos destas regiões na analgesia induzida pela dipirona.

A administração periférica de gabapentina, um anticonvulsivante com atividade modulatória dos canais de cálcio, pode inibir a formação de novas sinapses e reduzir a alodinia mecânica, em ratos, após a lesão de nervos periféricos (Pedersen et al., 2005; Suzuki et al., 2005; Coderre et al., 2007). Este efeito envolve a redução da liberação de glutamato no corno dorsal da medula espinhal (Coderre et al., 2007) e é bloqueado pela administração intra-tecal de ondansetron, antagonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub> (Suzuki et al., 2005), sugerindo que os circuitos serotoninérgicos supra-espinhais são importantes na gênese da atividade neuronal anormal das neuropatias periféricas e na eficácia da gabapentina nestas síndromes dolorosas (Suzuki et al., 2005).

A administração periférica de midazolam, um ansiolítico com ação agonista nos receptores GABA-benzodiazepínicos (Murai et al., 1994), em ratos, reduz a atividade das fibras A-delta e C, envolvidas na transmissão do estímulo doloroso da periferia para a medula espinhal, após indução de neuropatia periférica por ligação dos nervos espinhais (Kontinen e Dickenson, 2000). Este efeito é bloqueado pela administração periférica de flumazenil, antagonista dos receptores GABA-benzodiazepínicos (Bertz et al., 1995), sugerindo a ocorrência de alterações no

sistema GABAérgico espinhal em animais com neuropatia periférica (Kontinen e Dickenson, 2000).

A administração periférica de antidepressivos, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA) têm se mostrado eficaz na antinocicepção em modelos animais de neuropatias periféricas (Pedersen et al., 2005; Leventhal et al., 2007). A administração intraperitoneal de fluoxetina, inibidor da recaptação de 5-HT (Wong et al., 1995), e bupropion, inibidor da recaptação de DA e NA (Clayton, 2007), reduz a alodinia mecânica, e não a alodinia térmica, em ratos após constrição crônica do nervo ciático e ligação dos nervos espinhais, enquanto que a reboxetina, inibidor da recaptação de NA (Kasper et al., 2000), e venlafaxina, inibidor da recaptação de 5-HT e NA (Berrocoso e Mico, 2007) não apresentam qualquer efeito sobre a alodinia mecânica, entretanto são capazes de reduzir significativamente a alodinia térmica (Pedersen et al., 2005). Estes resultados sugerem que a combinação dos inibidores das monoaminas pode ser mais eficaz na redução da dor das neuropatias periféricas do que a administração isolada destes agentes (Pedersen et al., 2005).

O efeito antinociceptivo da serotonina (5-HT) tem sido bem observado em modelos de dor neuropática. Este dado pode ser comprovado por estudos que demonstram que camundongos com deficiência no transportador de 5-HT apresentam: a) ausência de hiperalgesia térmica após constrição crônica do nervo ciático (Vogel et al., 2003); b) que a administração intra-tecal de 5-HT produz redução da hiperalgesia induzida por modelos de dor crônica (Bardim et al., 2000); c) que a analgesia decorrente da estimulação da região dos núcleos da rafe é acompanhada da liberação de 5HT na medula espinhal e atenuada pela administração de antagonistas serotoninérgicos (Gilbert e Franklin, 2001; Buhler et al., 2004). Entretanto, a serotonina tem um complexo papel na regulação da dor, favorecendo, em alguns casos, o estado de hiperalgesia que

é atenuado pela administração periférica de antagonistas dos receptores serotoninérgicos (Ardid et al., 2001).

O uso de drogas agonistas e antagonistas dos subtipos de receptores 5-HT presentes na medula espinhal, tem favorecido o estudo dos efeitos distintos da serotonina no controle da transmissão da dor (Bardim et al., 2000). A administração intra-tecal de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> reverte totalmente a analgesia induzida pela serotonina na dor originada por estímulos mecânicos em ratos. Este efeito, entretanto, não é observado com antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>4</sub>. A administração intra-tecal de agonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> produz efeito analgésico, enquanto agonistas dos receptores 5-HT<sub>2</sub> não produz analgesia (Bardin et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, concentrados em áreas do sistema nervoso central como tálamo, *núcleos da rafe*, corno dorsal da medula espinhal e SCP, estão amplamente envolvidos na modulação da nocicepção (Liu et al., 2002). A administração de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no núcleo magno da rafe reduz a hiperalgesia mecânica em ratos com lesão dos nervos espinhais. Estes efeitos são revertidos pela administração de antagonistas dos receptores  $\alpha_2$  da adrenalina, mas não pela naloxona (Wei e Pertovaara, 2006). Já em ratos com hemiseção da medula espinhal, a redução da hiperalgesia a estímulos mecânicos e térmicos é observada pela administração intratecal de agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, e este efeito é bloqueado pelo tratamento prévio com antagonistas destes receptores (Hains et al., 2003). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, particularmente da SCP, têm sido relacionados à redução da analgesia induzida pelo conflito social em camundongos (Canto-de-Souza et al., 1998).

A administração, sistêmica ou intra-tecal, de fluvoxamina, inibidor seletivo da recaptação de serotonina (Inazu et al., 2001), reduz a alodinia em camundongos após secção parcial do nervo ciático (Nozaki e Kamei, 2006). Este efeito é reduzido pela administração sistêmica de naloxona

(Nozaki e Kamei, 2006) e administração, sistêmica ou intra-tecal, de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> (Honda et al., 2006). Entretanto, tem sido demonstrado que a administração, no núcleo magno da rafe e núcleos reticulares, de antagonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, reduz significativamente a resposta à dor em ratos com a síndrome da imobilidade pós-ictal (Oliveira et al., 2006).

O modelo de constrição crônica do nervo ciático (Bennett e Xie, 1988), tem sido utilizado na investigação sobre o efeito da serotonina (Bardim et al., 2000; Vogel et al., 2003) e de drogas serotoninérgicas (Wang et al., 2000; Ardid et al., 2001; Liu et al., 2002; Nitanda et al., 2005) na modulação da dor neuropática em ratos. A administração sistêmica de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> não reduz a hiperalgesia (Nitanda et al., 2005), entretanto potencializa o efeito analgésico de antidepressivos tricíclicos, como a clomipramina (Ardid et al., 2001), após constrição do nervo ciático. A injeção intra-tecal de antagonistas 5-HT<sub>1A</sub>, reduz o efeito analgésico da morfina (intra-SCP) (Liu et al., 2002). Este efeito não é observado com a administração intra-tecal de antagonistas 5-HT<sub>2A</sub> (Liu et al., 2002), os quais são capazes de reduzir a hiperalgesia quando administrados sistemicamente (Nitanda et al., 2005). Os antagonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> não alteram a hiperalgesia (Nitanda et al., 2005), nem o efeito analgésico da morfina (intra-SCP) (Liu et al., 2002), em administrações sistêmicas ou intra-tecal, respectivamente.

A administração intra-SCP de galanina, neuropeptídeo com ação inibitória sobre a secreção de serotonina (Wang et al., 2000), aumenta a latência de retirada da pata por estímulos mecânicos e térmicos em ratos após a constrição crônica do nervo ciático. Estes efeitos também são observados com a administração sistêmica ou intra-SCP de morfina, os quais são bloqueados pela microinjeção intra-SCP de antagonistas dos receptores de galanina (Wang et al., 2000).

Segundo Bardim et al. (2000), a marcada inconsistência entre os resultados encontrados com a administração de drogas serotoninérgicas pode refletir a complexidade dos mecanismos de

modulação da dor que envolve a serotonina e/ou diferenças nos aspectos metodológicos, como a natureza do estímulo nocivo utilizado e a dose da droga administrada, sugerindo a necessidade da realização de novos estudos para maior esclarecimento sobre o assunto.

Embora o modelo por constrição crônica do nervo ciático seja frequentemente utilizado como material experimental na pesquisa sobre a dor neuropática e suas conseqüências, principalmente as de origem afetivo-motivacionais, existe pouca evidência do uso deste modelo em investigações sobre a relação recíproca entre nocicepção e ansiedade, bem como no estudo da modulação de ambas por meio da administração central, particularmente na SCP, de drogas serotoninérgicas em camundongos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Considerando as evidências acima, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da serotonina sobre os comportamentos nociceptivos e relacionados ao medo/ansiedade em camundongos submetidos à constrição crônica do nervo ciático.

### **4.2. Objetivos Específicos**

4.1.1. Experimento 1 - Avaliar a influência da exposição ao predador nos testes de nocicepção em camundongos com constrição crônica do nervo ciático.

4.1.2. Experimento 2 - Avaliar o efeito da administração intra-SCPvl de 8-OH-DPAT, agonista dos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT<sub>1A</sub>, nos testes de nocicepção e ansiedade em camundongos com constrição crônica do nervo ciático.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Sujeitos**

Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino, machos, pesando 40-45 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas (41x 34x16cm, 10 por gaiola), mantidos em condições controladas de temperatura (24 +/- 1 °C), umidade (55 +/- 5%), luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e livre acesso ao alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste.

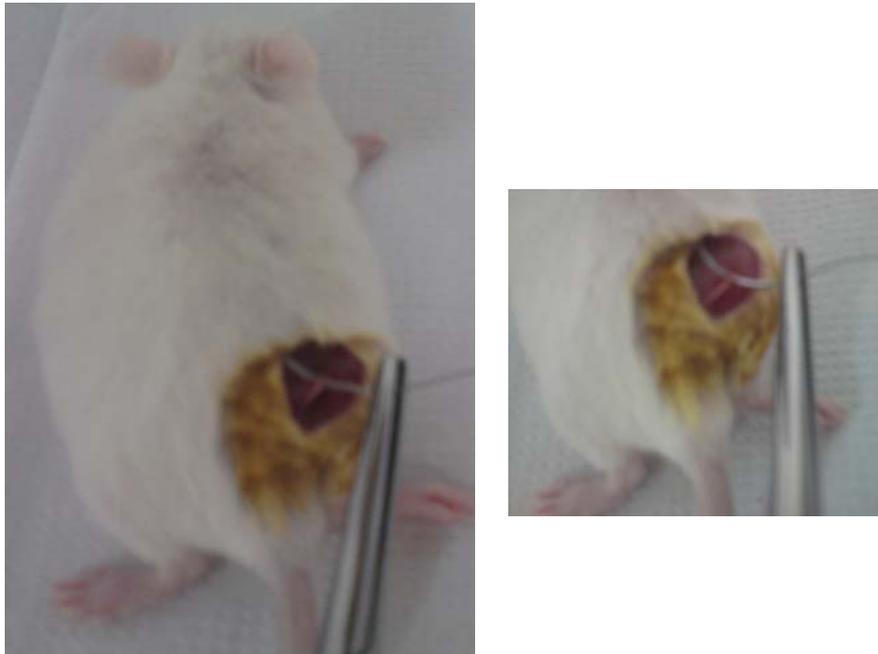
### **5.2. Ética**

O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos (CEEA/UFSCar), protocolo número 019/2008.

### **5.3. Constrição crônica do nervo ciático**

O método de Bennet e Xie (1998) foi utilizado para a reprodução do modelo de dor neuropática (Figura 1). Após anestesia com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilasina (10 mg/kg, i.p.), a fáscia entre o glúteo e o bíceps femural foi seccionada e o nervo ciático direito exposto próximo a sua trifurcação. O tecido ao redor do nervo foi cuidadosamente cortado a uma distância de aproximadamente 8 mm e, posteriormente, foi realizada a compressão do nervo através de quatro

ligaduras com fio estéril não inflamatório mononylon 6.0. Nos animais do grupo sham, o nervo ciático foi exposto, conforme procedimento descrito acima, entretanto não foi ligado.



**Figura 1-** Exposição do nervo ciático para constrição (Bennet e Xie, 1998)

#### **5.4. Cirurgia e administração de drogas**

Um dia depois da constrição do nervo ciático, os animais receberam implantação craniana de cânula-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento após anestesia cetamina (100 mg/kg, i.p.) e Xilasina (10 mg/kg, i.p.), com ângulo de 26°, na substância cinzenta periaquedutal. A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico auto polimerizante clássico (JET). As coordenadas estereotáxicas (Insight EFF-333- Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) para implantação da cânula-guia, definidas pelo Atlas de Franklin e Paxinos (1997), foram: antero posterior (AP)= -4,1 mm; lateral (L)= +1,3 mm e ventral (V)= -1,2mm, ao bregma. O mandril foi inserido dentro da cânula-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação.

A agulha de injeção (33-gauge), cujo comprimento ultrapassa em 1,0 mm a ponta da cânula-guia, foi inserida dentro da mesma para a infusão de soluções na SCPvl. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), a microseringa Hamilton de 10 µl. Uma bomba de infusão (Insight BI 2000 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil) foi programada para injetar 0,1 µl de solução durante um período de 60 segundos.

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, injeção da solução por 60 segundos, permanência da agulha por 90 segundos após o término da infusão e inserção do mandril. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução (Nunes-de-Souza et al, 2000).

O procedimento de microinjeção central (intra-SCPvl) de drogas foi realizado nos 5° e 6° dias após a constrição do nervo ciático.

## **5.5. Drogas**

8-OH-DPAT (agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>), adquirido da Sigma e dissolvido em veículo (solução salina + Tween 80 a 10%). As doses usadas foram 5,6 e 10 nmol/0,1 µl, baseadas em estudos prévios da literatura (Nunes-de-Souza et al, 2000).

## **5.6. Teste de ansiedade**

**Teste de exposição ao rato:** Foi utilizada uma caixa retangular de madeira (59 x 29,3 x 18 cm), modificada de Beijamini e Guimarães (2006) (Fig.2). A caixa é dividida em três compartimentos,

sendo: lado A - local de alojamento do rato (20 x 29 cm); lado B – área para exploração pelo camundongo (29,2 x 29,3 cm), separada do compartimento A por uma grade de arame e lado C - área de fuga do camundongo (9,8 x 29,3 cm). Os camundongos foram separados aleatoriamente em dois grupos, a saber:

*Grupo exposto ao rato de verdade:* um rato da cepa *Long Evans*, pesando de 250 a 350 g, foi colocado no Lado A do aparato, após receber injeção de apomorfina (3,0 mg/1ml, s.c), e os camundongos foram colocados individualmente no Lado B, podendo explorar o ambiente por um período de dez minutos.

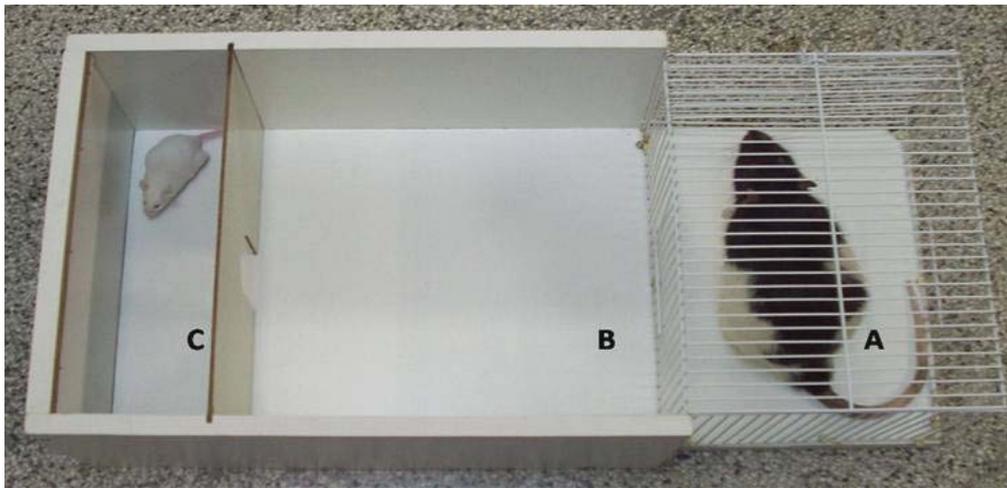
*Grupo exposto ao rato de brinquedo:* Foi realizado um procedimento semelhante ao descrito acima, exceto que, no lado A do aparato, foi colocado um rato de brinquedo com medidas e aparência semelhantes a um rato de verdade.

O teste foi realizado 5 dias após a constrição do nervo ciático. Os dados de frequência de entradas nos compartimentos protegido (área C) e desprotegido (área B), bem como a duração do tempo gasto nestes compartimentos foram avaliados pela análise das fitas gravadas, usando o programa de análise etológica X-plorat, versão 3.0 (Becerra-Garcia et al, 2005). Estes dados foram usados para o cálculo da porcentagem de entradas e tempo gasto em cada compartimento [Entradas: (compartimento/total) x 100; Tempo (tempo no compartimento/300) x 100].

Foram avaliados também, nos compartimentos descritos acima, comportamentos de auto-limpeza, frequência de levantamentos (elevação do corpo sobre as patas traseiras) e duração de imobilidade, utilizados como índices de ansiedade (Rodgers et al, 1997), além da frequência do reflexo de coçar a cabeça ou o ar com a pata traseira lesada, comportamento considerado como índice de dor (Bennet e Xie; 1998).

O teste de exposição ao rato foi realizado em grupos de animais submetidos à cirurgia para constrição do nervo ciático, porém, sem a microinjeção de drogas (Experimento 1) e em

grupo de animais após a infusão de drogas intra-SCPvl conforme descrito anteriormente (Experimento 2).



**Figura 2-** Teste de exposição ao rato (modificado de Beijamini e Guimarães, 2006)

### 5.7. Teste nociceptivo

#### *Observação do comportamento evocado:*

A hiperalgesia ao calor (Liu et al, 2002) foi avaliada pelo registro do tempo, em segundos, para a retirada da pata traseira após aplicação de calor a 52 °C (51,8-52,4 °C), através do teste da placa quente (Insight EFF 361 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil). O tempo máximo de permanência do animal sobre a placa foi de 25 segundos para evitar possíveis lesões (Kuraishi et al, 1983).

A hiperalgesia ao estímulo mecânico (Randall e Selitto, 1957) foi avaliada através do teste de “Randall e Selitto” (Insight EFF 440 - Equipamentos Científicos Ltda, Brasil). Este teste consiste em parâmetros de avaliação da carga máxima suportada sobre a pata traseira lesada, em gramas, e a latência para a resposta de retirada com a carga máxima, em segundos.

Em todos os casos, os animais foram testados 24 horas após o teste de ansiedade (exposição ao rato).

### **5.8. Histologia**

Após o término dos experimentos todos os animais receberam injeção central de 0.1 µl de uma solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o procedimento descrito para a injeção de drogas. Os animais foram anestesiados com sobredose de cetamina e xilasina (300 e 30 mg/kg, i.p., respectivamente), e em seguida decapitados. Seus cérebros foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente, utilizando o micrótomo (criostato ANCAP 300), sofrerem secções coronais ao longo do trajeto da cânula. As secções serão inspecionadas com o uso de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção central de drogas. Os animais cujas injeções não atingiram a SCPvl foram excluídos do estudo. Consideramos como SCPvl as colunas lateral e ventrolateral da SCP (-4,60 à -4,16 em relação ao bregma).

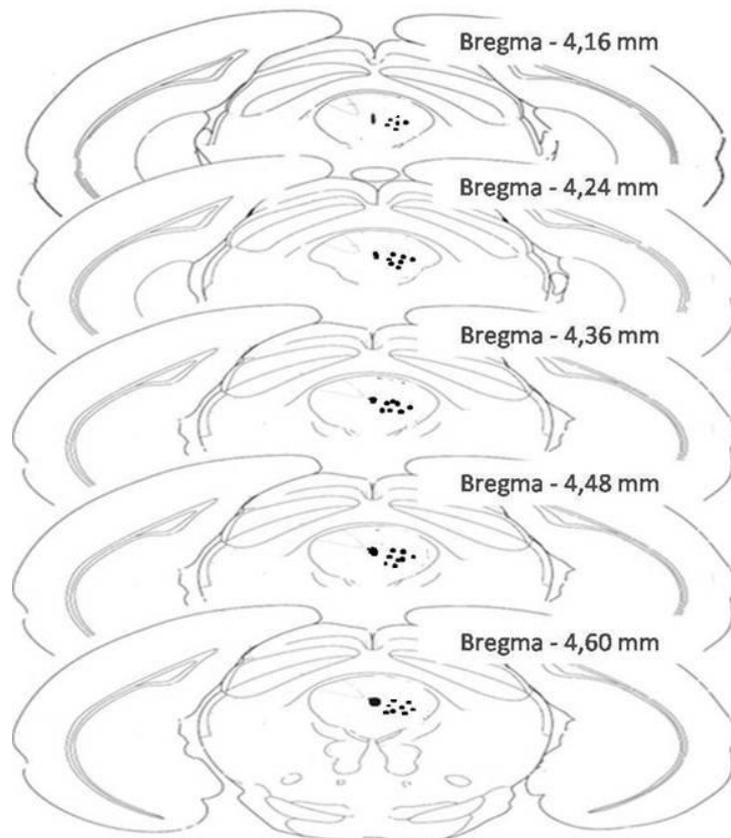
### **5.9. Análise estatística**

Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA). No Experimento 1, foi utilizado a ANOVA de dois fatores sendo, estímulo (Fator 1) e condição (Fator 2). No Experimento 2, foi utilizado ANOVA de três fatores sendo, estímulo (Fator 1), condição (Fator 2) e tratamento (Fator 3). A análise de variância foi seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de p iguais ou inferiores a 5% foram considerados significativos. Todos os dados foram representados como média ± EPM.

## 6. RESULTADOS

Foi utilizado, para o estudo, um total de 168 animais, sendo 65 (n=10-15) no Experimento 1, com o objetivo de avaliar o efeito da exposição ao predador em animais submetidos à constrição crônica do nervo ciático sem infusão de drogas.

No Experimento 2, o qual teve como objetivo avaliar o efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador, a análise histológica confirmou a inserção da cânula na SCPvl (fig.3) em 103 animais (n=7-12).

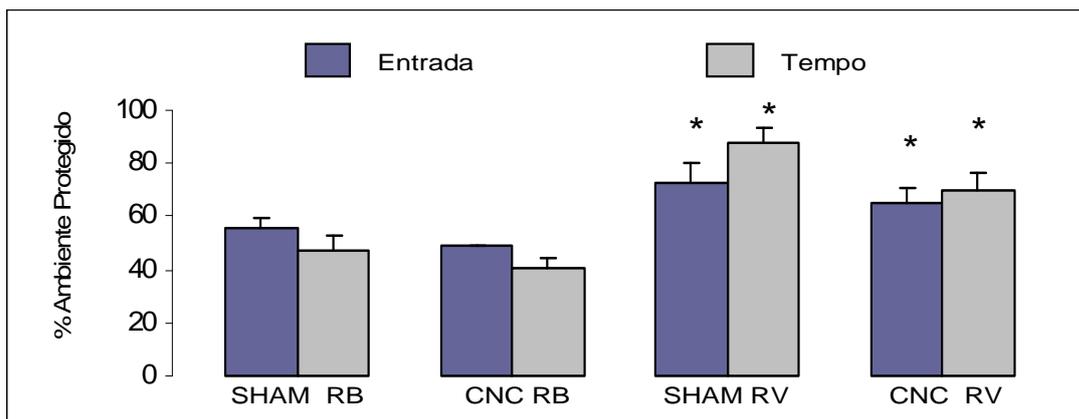


**Fig. 3-** Representação esquemática dos sítios de microinfusão na SCPvl (pontos pretos) de camundongos. O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição (Franklin e Paxinos, 1997).

### 6.1. Experimento 1 - A exposição de camundongos ao predador (rato) produz antinocicepção avaliada pelo modelo de constrição crônica do nervo ciático

A Figura 4 mostra o resultado da exposição ao predador em animais SHAM e submetidos à constrição do nervo ciático (CNC). A ANOVA de dois fatores mostrou ausência de efeito do fator 2 (condição) em relação à porcentagem de entrada ( $F(1,61)=1,96$ ,  $P>0.05$ ) e tempo gasto ( $F(1,61)=1,16$ ,  $P>0.05$ ) em ambiente protegido. Porém, mostrou efeito significativo do fator 1 (estímulo) no que se refere à porcentagem de entradas ( $F(1,61)=12,95$ ,  $P<0.05$ ) e tempo ( $F(1,61)=20,91$ ,  $P<0.05$ ) no mesmo ambiente.

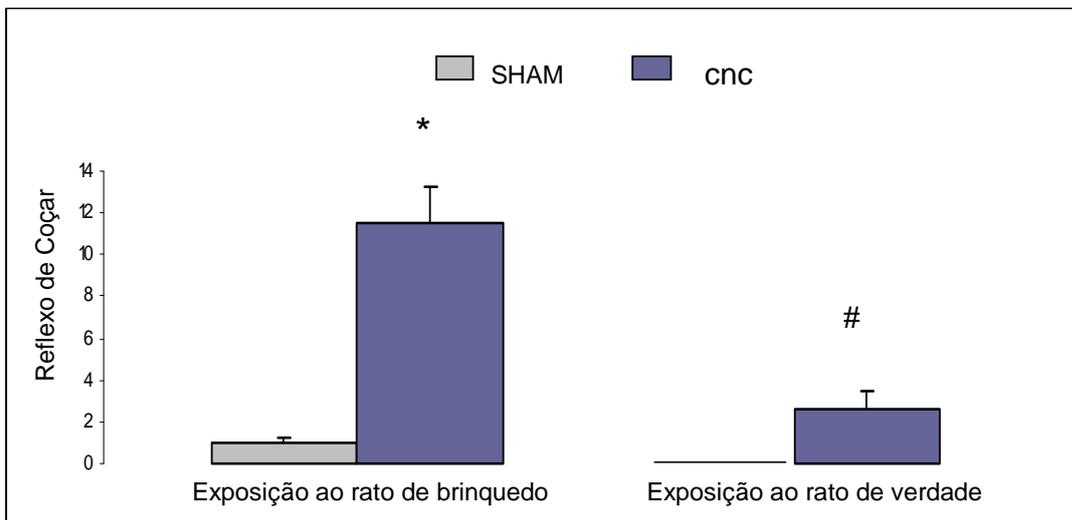
O teste de Duncan mostrou aumento significativo nas porcentagens de entradas e tempo gasto em ambiente protegido nos animais expostos ao rato em comparação aos animais expostos ao rato de brinquedo (estímulo neutro), indicando a eficácia do teste de exposição ao predador no aumento dos índices de ansiedade em camundongos.



**Figura 4.** Efeito da exposição ao predador nas porcentagens de entradas e tempo gasto em ambiente protegido em animais SHAM e expostos à constrição do nervo ciático (CNC). RB= rato de brinquedo, RV= rato de verdade. Os valores representam a média das porcentagens de entradas e tempo gasto no ambiente protegido (média + E.P.M).  $n=10-15$ . \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo (RB).

A Figura 5 mostra o resultado da exposição ao predador em animais SHAM e CNC em relação ao frequência de coçar. A ANOVA de dois fatores mostrou efeito significativo do fator 1 [estímulo ( $F(1,61)=21,11$ ,  $P<0.05$ )], do fator 2 [condição ( $F(1,61)=26,97$ ,  $P<0.05$ )] e da interação entre os fatores 1 e 2 ( $F(1,61)=14,42$ ,  $P<0.05$ ).

O teste de Duncan mostrou aumento significativo na frequência de coçar nos animais expostos à CNC em relação ao grupo SHAM expostos ao estímulo neutro (RB), indicando indução da nocicepção pela CNC. Entretanto, houve diminuição da frequência de coçar nos animais CNC expostos ao rato em relação aos expostos ao estímulo neutro (rato de brinquedo), demonstrando inibição da nocicepção pela ansiedade induzida por meio da exposição ao predador. Não ocorreu alteração significativa para os animais SHAM expostos ao estímulo neutro ou ao rato.



**Figura 5.** Efeito da exposição ao predador no frequência de coçar em animais SHAM e expostos à constrição do nervo ciático (CNC). Os valores representam a média do frequência de coçar (média + E.P.M).  $n=10-15$ . \* $P < 0,05$  comparado ao grupo SHAM exposto ao estímulo neutro (rato de brinquedo). #  $P < 0,05$  comparado ao grupo CNC exposto ao rato de brinquedo.

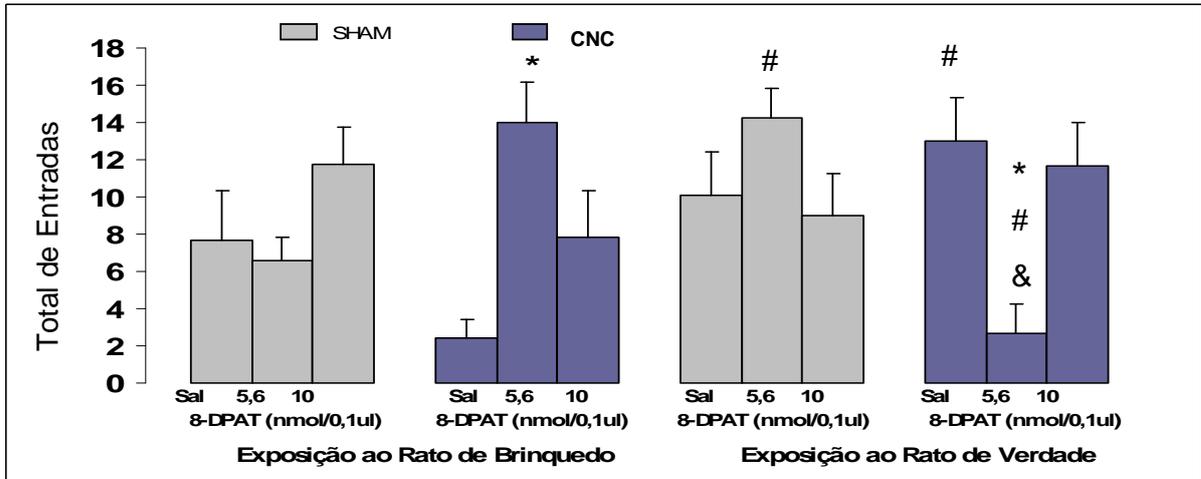
## **6.2. Experimento 2 - Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na matéria cinzenta periaquedutal de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador**

A Figura 6 mostra o resultado da injeção de 8-OH-DPAT na SCPvl de camundongos com CNC e submetidos ao teste de exposição ao rato em relação ao total de entradas. A ANOVA de três fatores mostrou ausência de efeito do fator 1 [estímulo ( $F(1,90)=2,33$ ,  $P>0.05$ )], fator 2 [condição ( $F(1,90)=1.24$ ,  $P>0.05$ )] e fator 3 [tratamento ( $F(2,90)=0,81$ ,  $P>0.05$ )]. Porém, mostrou interação significativa entre os três fatores [estímulo x condição x tratamento ( $F(2,90)=13,44$ ,  $P<0.0001$ )].

O teste de Duncan mostrou para os animais com CNC que o grupo salina exposto ao rato apresentou aumento significativo do total de entradas, quando comparado ao salina exposto ao estímulo neutro (rato de brinquedo). O tratamento com 8-OH-DPAT (5,6 nmol) produziu aumento do total de entradas no grupo exposto ao estímulo neutro, quando comparado ao salina. Além disso, esta mesma dose produziu diminuição significativa do total de entradas quando comparado ao salina exposto ao rato e ao 8-OH-DPAT (5,6 nmol) exposto ao estímulo neutro e ao SHAM exposto ao rato.

Para os animais SHAM, o *post hoc* mostrou que o 8-OH-DPAT (5,6 nmol) apresentou aumento do total de entradas nos animais expostos ao rato quando comparado ao respectivo grupo SHAM exposto ao estímulo neutro.

Não ocorreu alteração significativa do total de entradas para os grupos SHAM e com CNC expostos ao estímulo neutro e ao rato e tratados com 8-OH-DPAT na dose de 10nmol.



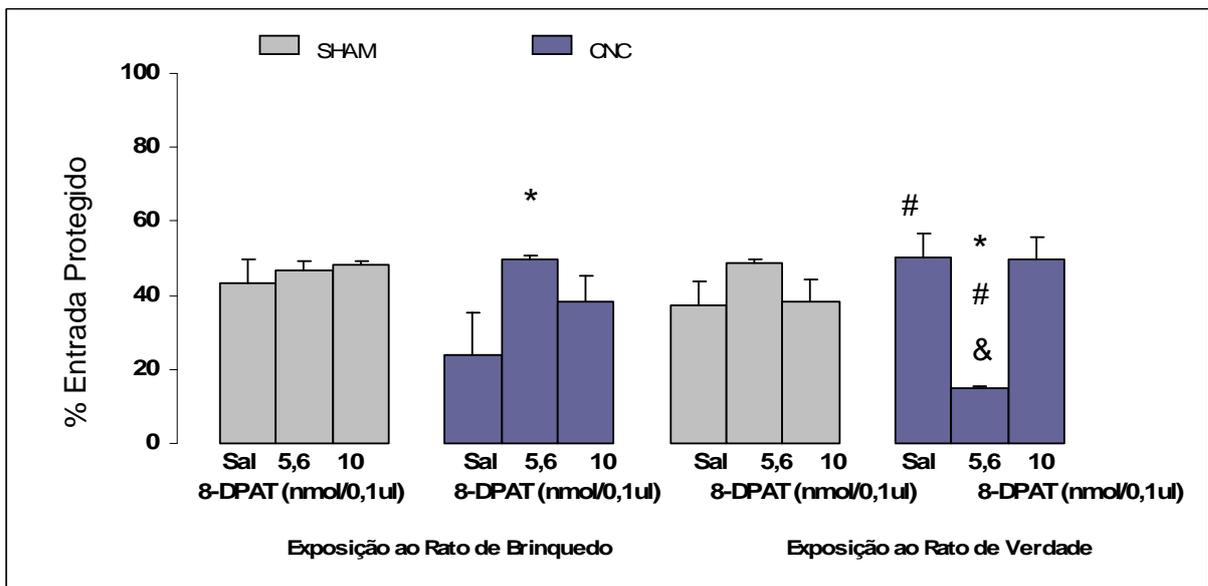
**Figura 6.** Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao total de entradas. Os valores representam a média do total de entradas (média + E.P.M).  $n=7-12$ . \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo salina. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo tratamento exposto ao rato de brinquedo. & $P < 0,05$  comparado ao grupo SHAM 8-OH-DPAT 5,6 nmol exposto ao rato de verdade.

A Figura 7 mostra o resultado da injeção de 8-OH-DPAT na SCPvl de camundongos com CNC e submetidos ao teste de exposição ao rato em relação à porcentagem de entradas no ambiente protegido. A ANOVA de três fatores mostrou ausência de efeito do fator 1 [estímulo ( $F(1,90)=0,31$ ,  $P>0.05$ )] fator 2 [condição ( $F(1,90)=3,23$ ,  $P>0.05$ )] e fator 3 [tratamento ( $F(2,90)=0,81$ ,  $P>0.05$ )]. Porém, mostrou interação significativa entre os três fatores [estímulo x condição x tratamento ( $F(2,90)=10,52$ ,  $P<0.0001$ )].

O teste de Duncan mostrou para os animais com CNC que o grupo salina exposto ao rato apresentou aumento significativo da porcentagem de entradas no lado protegido, quando comparado ao grupo salina exposto ao estímulo neutro (rato de brinquedo). O tratamento com 8-OH-DPAT (5,6 nmol) produziu aumento significativo da porcentagem de entradas no lado protegido no grupo exposto ao estímulo neutro, quando comparado ao controle (salina). Entretanto, produziu diminuição significativa da porcentagem de entradas no lado protegido

quando comparado ao controle exposto ao rato, ao 8-OH-DPAT (5,6 nmol) exposto ao estímulo neutro, e ao SHAM exposto ao rato.

Não ocorreu alteração significativa na porcentagem de entradas no lado protegido para os grupos SHAM e com CNC, expostos ao estímulo neutro e ao rato e tratados com 8-OH-DPAT na dose de 10nmol.



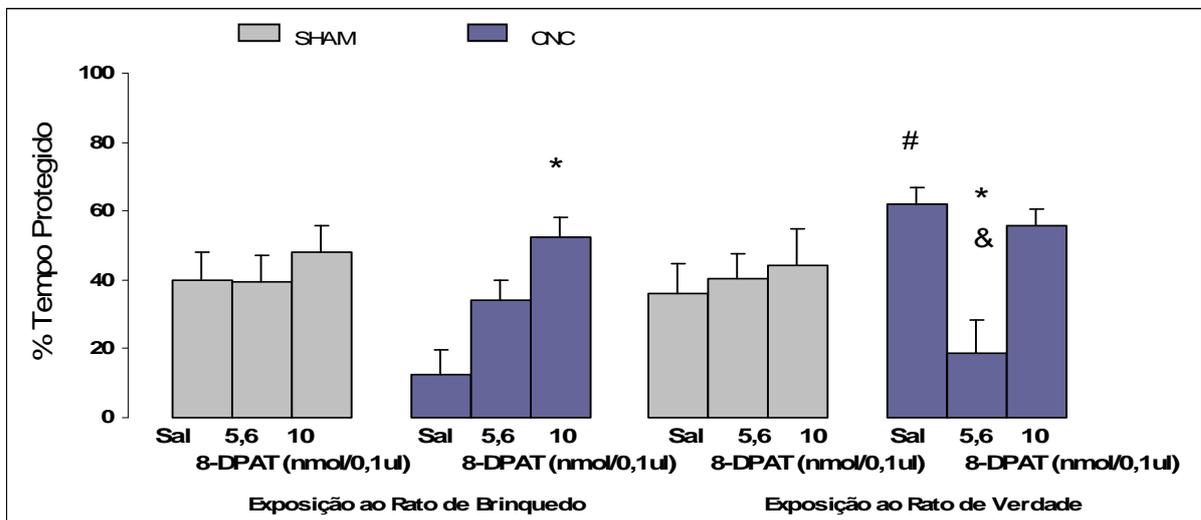
**Figura 7.** Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação à porcentagem de entradas no ambiente protegido. Os valores representam da porcentagem no ambiente protegido (média + E.P.M).  $n=7-12$ .  $*P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo salina.  $\#P < 0,05$  comparado ao respectivo tratamento exposto ao rato de brinquedo.  $\&P < 0,05$  comparado ao grupo SHAM 8-DPAT 5,6 nmol/0,1 $\mu$ l exposto ao rato de verdade.

A Figura 8 mostra o resultado da injeção de 8-OH-DPAT na SCPvl de camundongos com CNC e submetidos ao teste de exposição ao rato em relação a porcentagem de tempo gasto no ambiente protegido. A ANOVA de três fatores mostrou ausência de efeito do fator 1 [estímulo ( $F(1,90)=1,54$ ,  $P>0.05$ )] e fator 2 [condição ( $F(1,90)=0,3$ ,  $P>0.05$ )]. Porém, mostrou efeito do

fator 3 [Tratamento ( $F(2,90)=4,63$ ,  $P<0.01$ )] e interação significativa entre os três fatores [estímulo x condição x tratamento ( $F(2,90)=5,52$ ,  $P<0.05$ )].

O post hoc mostrou para os animais com CNC que o grupo salina exposto ao rato, apresentou aumento significativo da porcentagem de tempo no lado protegido quando comparado ao salina exposto ao estímulo neutro (rato de brinquedo). O 8-OH-DPAT (5,6 nmol) produziu diminuição significativa da porcentagem de tempo gasto no lado protegido quando comparado à salina exposto ao rato e ao SHAM exposto ao rato. O tratamento com 8-OH-DPAT (10 nmol) produziu aumento significativo na porcentagem de tempo gasto no ambiente protegido no grupo exposto ao estímulo neutro quando comparado ao grupo salina.

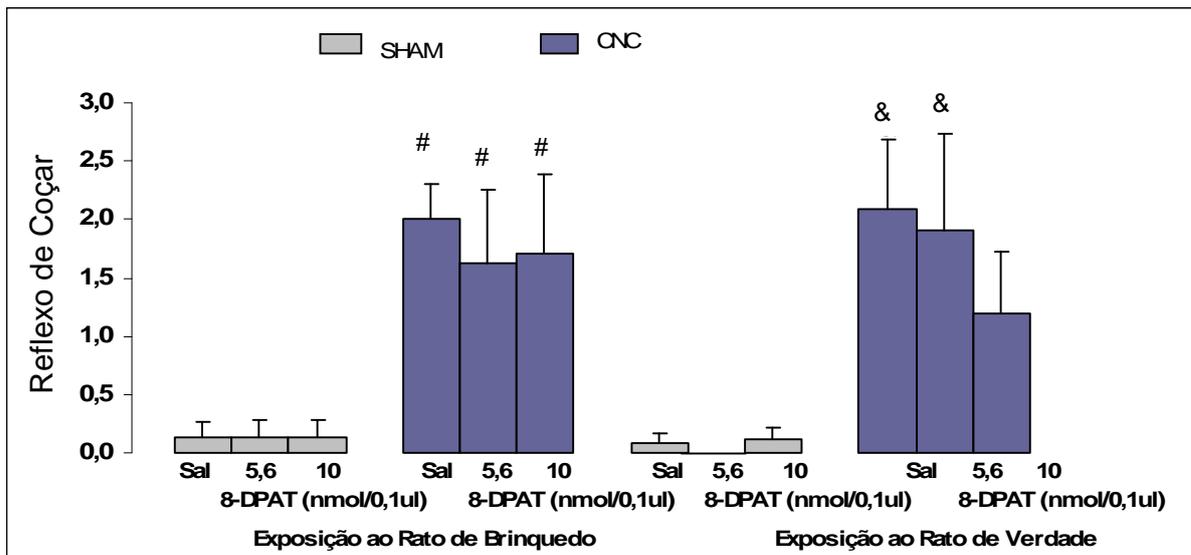
Não ocorreu alteração significativa para a porcentagem de tempo gasto no ambiente protegido para os demais grupos tratados com 8-OH-DPAT na dose de 10 nmol CNC, e SHAM exposto ao estímulo neutro e ao rato.



**Figura 8.** Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação à porcentagem de tempo gasto no ambiente protegido. Os valores representam da porcentagem no ambiente protegido (média + E.P.M).  $n=7-12$ .  $*P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo salina.  $\#P < 0,05$  comparado ao respectivo tratamento exposto ao rato de brinquedo.  $\&P < 0,05$  comparado ao grupo SHAM 8-DPAT (5,6 nmol) exposto ao rato de verdade.

A Figura 9 mostra o resultado da injeção de 8-OH-DPAT na SCPvl de camundongos com CNC e submetidos ao teste de exposição ao rato em relação ao frequência de coçar. A ANOVA de três fatores mostrou ausência de efeito do fator 1 [estímulo ( $F(1,91)=0,04$ ,  $P>0.05$ )], fator 3 [tratamento ( $F(2,91)=0,35$ ,  $P>0.05$ )] e interação entre estímulo e condição ( $F(2,91)=0,21$ ,  $P>0.05$ ). Entretanto, mostrou efeito significativo no fator 2 [condição ( $F(1,91)=34,91$ ,  $P<0.05$ )].

O teste de Duncan mostrou aumento significativo no frequência de coçar no grupo CNC, em relação ao grupo SHAM (todas as doses) exposto ao estímulo neutro. Este efeito também foi observado para os animais expostos ao rato, exceto nos animais que receberam 8-OH-DPAT (10 nmol).

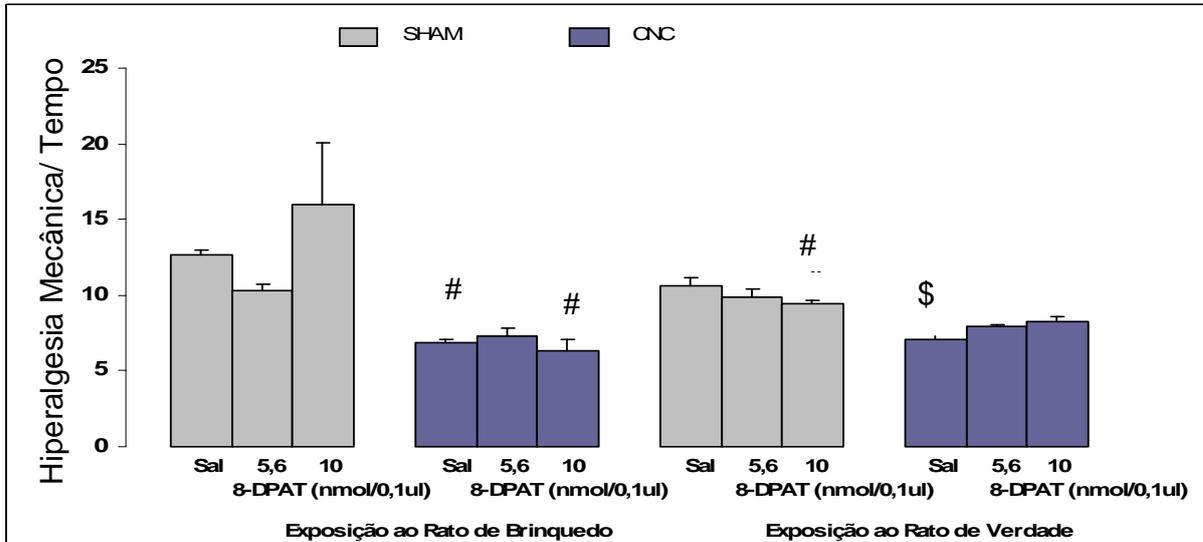


**Figura 9.** Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao frequência de coçar. Os valores representam o total de coçar (média + E.P.M).  $n=7-12$ . # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. & $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo SHAM exposto ao rato de verdade.

A Figura 10 mostra o resultado da injeção de 8-OH-DPAT na SCPvl de camundongos com CNC e submetidos ao teste de exposição ao rato em relação ao tempo gasto no teste de hiperalgesia mecânica. A ANOVA de três fatores mostrou ausência de efeito no fator 1 [estímulo ( $F(1,90)=2,47$ ,  $P>0.05$ )] e no fator 3 [tratamento ( $F(2,90)=1,08$ ,  $P>0.05$ )], entretanto mostrou efeito significativo no fator 2 [condição ( $F(1,90)=48,88$ ,  $P<0.05$ )] e interação entre os três estímulos [estímulo x condição x tratamento ( $F(2,90)=3,81$ ,  $P<0.05$ )].

Apesar da ANOVA não ter mostrado efeito do tratamento, o *post hoc* mostrou que a microinjeção de 8-OH-DPAT (10 nmol) nos animais SHAM, aumentou significativamente o tempo gasto (antinociceção) comparado ao SHAM salina nos animais expostos ao estímulo neutro. Além disso, ocorreu diminuição do tempo gasto na dose de 10nmol de 8-OH-DPAT quando comparamos os animais SHAM expostos ao rato e ao estímulo neutro.

Nos animais com CNC ocorreu diminuição significativa da antinociceção (tempo gasto) quando comparamos os animais salina e 8-OH-DPAT (10 nmol) com os respectivos grupos SHAM expostos ao estímulo neutro. Também ocorreu diminuição significativa entre os animais salina CNC e salina SHAM, expostos ao rato. Para os outros grupos com CNC e SHAM expostos ao rato ou ao estímulo neutro, não houve alteração significativa em nenhum dos fatores avaliados.

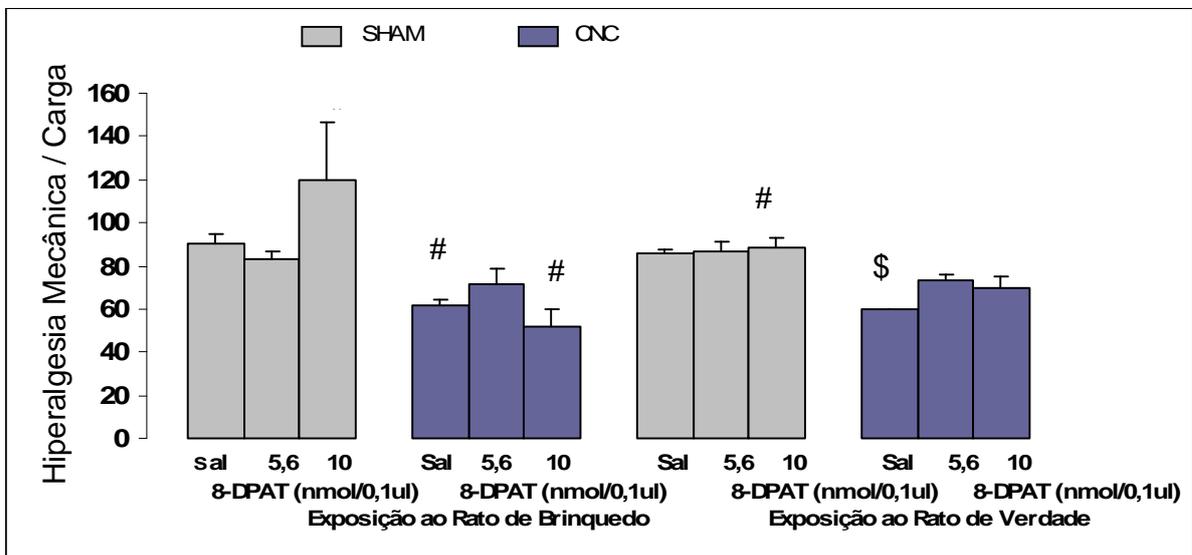


**Figura 10.** Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao tempo gasto no teste de hiperalgesia mecânica. Os valores representam o tempo (média + E.P.M).  $n=7-12$ .  $*P < 0,05$  comparado ao grupo salina SHAM exposto ao estímulo neutro.  $\#P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo.  $\$P < 0,05$  comparado ao grupo salina SHAM exposto ao rato de verdade.

A Figura 11 mostra o resultado da injeção de 8-OH-DPAT na SCPvl de camundongos com CNC e submetidos ao teste de exposição ao rato em relação à carga suportada no teste de hiperalgesia mecânica. A ANOVA de três fatores mostrou ausência de efeito do fator 1 [estímulo ( $F(1,90)=0,0004$ ,  $P>0.05$ ) e fator 3 [tratamento ( $F(2,90)=1,55$ ,  $P>0.05$ )], entretanto mostrou efeito significativo no fator 2 [condição ( $F(1,90)=32,72$ ,  $P<0.05$ )] e interação entre os três fatores [estímulo x condição x tratamento ( $F(2,90)=2,97$ ,  $P<0.05$ )].

Apesar da ANOVA não ter mostrado efeito do tratamento, o *post hoc* mostrou que a microinjeção de 8-OH-DPAT (10 nmol) nos animais SHAM, aumentou significativamente a carga suportada (antinocicepção) comparado ao SHAM salina nos animais expostos ao estímulo neutro. Além disso, ocorreu diminuição da carga suportada para o grupo 8-OH-DPAT (10nmol) quando comparado aos animais SHAM expostos ao rato e ao estímulo neutro.

Nos animais com CNC ocorreu diminuição significativa da antinocicepção (carga suportada) nos animais salina e 8-OH-DPAT (10 nmol) comparados aos respectivos grupos SHAM expostos ao estímulo neutro. Também ocorreu diminuição significativa entre os animais salina CNC e salina SHAM, expostos ao rato. Para os outros grupos com CNC e SHAM expostos ao rato ou ao estímulo neutro, não houve alteração significativa em nenhum dos fatores avaliados.

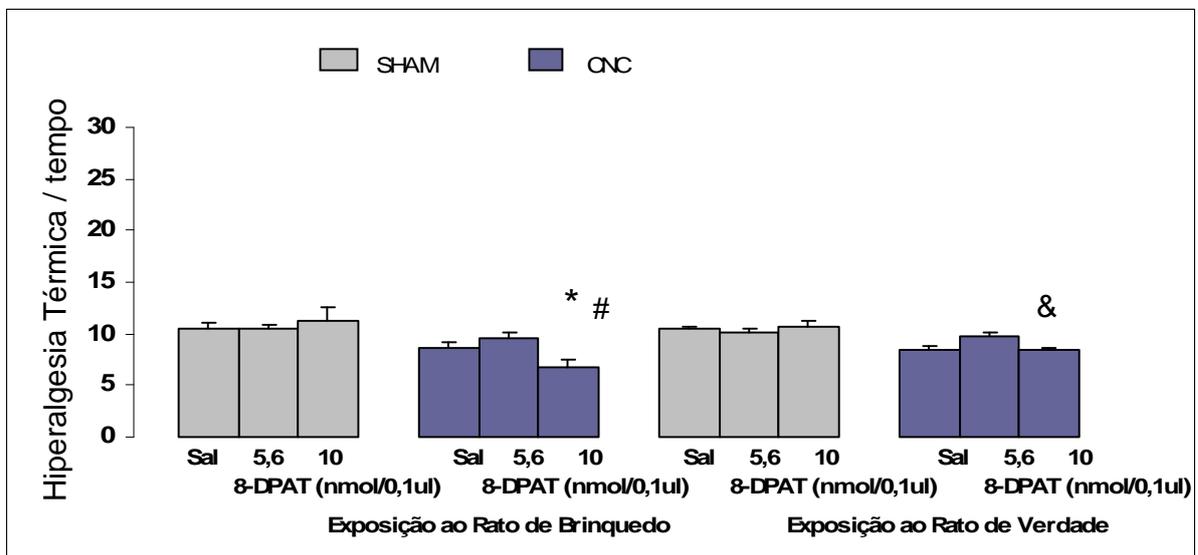


**Figura 11.** Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação à carga no teste de hiperálgia mecânica. Os valores representam a carga (média + E.P.M).  $n=7-12$ . \* $P < 0,05$  comparado ao grupo salina SHAM exposto ao estímulo neutro. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. \$ $P < 0,05$  comparado ao grupo salina SHAM exposto ao rato de verdade.

A Figura 12 mostra o resultado da injeção de 8-OH-DPAT na SCPvl de camundongos com CNC e submetidos ao teste de exposição ao rato em relação ao tempo no teste de hiperálgia térmica. A ANOVA de três fatores mostrou ausência de efeito do fator 1 [estímulo ( $F(1,90)=0,18$ ,  $P>0.05$ )] e fator 3 [tratamento ( $F(2,90)=1,71$ ,  $P>0.05$ )], entretanto mostrou efeito

significativo no fator 2 [condição ( $F(1,90)=39,98$ ,  $P<0.05$ )] e interação entre os fatores 2 (condição) e 3 (tratamento) ( $F(2,90)=5,98$ ,  $P<0.05$ ).

Apesar da ANOVA não ter mostrado efeito do tratamento, o *post hoc* mostrou que a microinjeção de 8-OH-DPAT (10 nmol) nos animais CNC produziu diminuição significativa do tempo (nocicepção) comparado aos grupos, salina CNC e SHAM expostos ao estímulo neutro. Mostrou também redução do tempo no grupo CNC 8-OH-DPAT (10 nmol/0,1  $\mu$ l) exposto ao rato comparado ao respectivo grupo SHAM.



**Figura 12.** Efeito da injeção de 8-OH-DPAT na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral de camundongos com constrição do nervo ciático e submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao tempo gasto no teste de hiperalgisia térmica. Os valores representam o tempo (média + E.P.M).  $n=7-12$ . \* $P < 0,05$  comparado ao salina exposto ao estímulo neutro. # $P < 0,05$  comparado ao grupo SHAM 8-OH-DPAT (10nmol) exposto ao estímulo neutro. & $P < 0,05$  comparado ao grupo SHAM 8-OH-DPAT (10nmol) exposto ao rato.

A Tabela 1 mostra o resultado da injeção de 8-OH-DPAT na SCPvl de camundongos com CNC e submetidos ao teste de exposição ao rato em relação ao tempo de imobilidade e comportamentos de auto-limpeza e levantamentos. Em relação ao tempo de imobilidade, a ANOVA de três fatores mostrou efeito significativo no fator 1 [estímulo ( $F(1,91)=6,54$ ,  $P<0.05$ )],

fator 2 [condição ( $F(1,91)=3,68$ ,  $P<0.05$ )] e no fator 3 [tratamento ( $F(2,91)=3,93$ ,  $P<0.05$ )], entretanto mostrou ausência de efeito na interação entre os três estímulos [estímulo x condição x tratamento ( $F(2,91)=2,40$ ,  $P>0.05$ )]. O *post hoc* mostrou que os animais CNC expostos ao rato apresentaram, aumento do tempo de imobilidade em comparação aos animais CNC expostos ao estímulo neutro, após microinjeção de salina. O mesmo efeito foi observado após a microinjeção de 8-OH-DPAT (5,6 nmol), diferente do grupo que recebeu 8-OH-DPAT (10 nmol), o qual apresentou diminuição do tempo de imobilidade quando comparado ao grupo salina.

Em relação à frequência do comportamento de auto-limpeza, a ANOVA de três fatores mostrou efeito significativo no fator 1 [estímulo ( $F(1,91)=17,16$ ,  $P<0.05$ )], fator 2 [condição ( $F(1,91)=7,98$ ,  $P<0.05$ )] e na interação entre os três estímulos [estímulo x condição x tratamento ( $F(2,91)=3,66$ ,  $P<0.05$ )]. Entretanto mostrou ausência de efeito no fator 3 [tratamento ( $F(2,91)=2,66$ ,  $P>0.05$ )]. O *post hoc* mostrou que os animais CNC expostos ao rato apresentaram aumento do comportamento de auto-limpeza, quando comparados aos animais CNC expostos ao estímulo neutro, após microinjeção de salina. O mesmo efeito foi observado após a microinjeção de 8-OH-DPAT (10 nmol), diferente do grupo que recebeu 8-OH-DPAT (5,6 nmol), o qual apresentou diminuição do comportamento de auto-limpeza quando comparado ao grupo salina.

Em relação à frequência do comportamento de levantar, a ANOVA de três fatores mostrou ausência de efeito no fator 1 [estímulo ( $F(1,91)=0,87$ ,  $P>0.05$ )], fator 2 [condição ( $F(1,91)=1,83$ ,  $P>0.05$ )], fator 3 [tratamento ( $F(2,91)=1,47$ ,  $P>0.05$ )], e na interação entre os três estímulos [estímulo x condição x tratamento ( $F(2,91)=1,76$ ,  $P>0.05$ )].

**Tabela 1.** Comportamentos avaliados durante o teste de exposição ao predador.

			COMPORTAMENTOS		
			Imobilidade	Auto-limpeza	Levantamento
RB	CNC	Sal (n=7)	0,0 ± 0,0	9,9 ± 2,7	13,9 ± 1,8
RB	CNC	DPAT 5,6 (n=8)	0,0 ± 0,0	13,3 ± 0,6	19,3 ± 1,1
RB	CNC	DPAT 10 (n=7)	0,0 ± 0,0	13,9 ± 0,7	20,4 ± 1,7
RB	SHAM	Sal (n=8)	12,5 ± 13,4	16,6 ± 1,9	19,0 ± 1,6
RB	SHAM	DPAT 5,6 (n=7)	0,0 ± 0,0	14,6 ± 0,6	18,6 ± 2,3
RB	SHAM	DPAT 10 (n=7)	0,0 ± 0,0	17,4 ± 1,4	19,3 ± 1,6
RV	CNC	Sal (n=11)	27,3 ± 9,8*	19,7 ± 1,4*	18,2 ± 1,2
RV	CNC	DPAT 5,6 (n=10)	2,0 ± 7,6*	13,0 ± 1,7&	18,1 ± 1,0
RV	CNC	DPAT 10 (n=10)	0,0 ± 0,0 &	19,4 ± 1,0*	19,5 ± 1,2
RV	SHAM	Sal (n=12)	6,7 ± 5,5	18,9 ± 1,5	20,2 ± 0,9
RV	SHAM	DPAT 5,6 (n=7)	0,0 ± 0,0	18,1 ± 1,4	21,9 ± 1,5
RV	SHAM	DPAT 10 (n=9)	0,0 ± 0,0	18,4 ± 1,8	17,3 ± 1,8

Os dados representam a média ± EPM. RV = Rato Verdadeiro, RB = Rato de Brinquedo, CNC = Com constrição do nervo ciático.

\* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo exposto ao estímulo neutro.

& $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo salina

## 7. DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostraram que os animais submetidos à constrição do nervo ciático (CNC), sem administração de drogas, apresentaram aumento do total do frequência de coçar quando comparados ao grupo SHAM, indicando indução da nocicepção pela CNC, um modelo de dor neuropática. A avaliação da ansiedade/medo, pelo modelo de exposição ao predador mostrou que os animais expostos ao rato, apresentaram aumento dos índices de ansiedade (porcentagens de entrada e tempo gasto no ambiente protegido) e redução da nocicepção (frequência do reflexo de coçar), quando comparados a exposição ao estímulo neutro (Experimento 1).

Os resultados obtidos com a injeção local, na substância cinzenta periaquedutal (SCPvl), de salina (Experimento 2), reproduzem o efeito de indução da nocicepção pela CNC e, em parte, os efeitos de aumento da ansiedade obtidos no Experimento 1, juntamente com do aumento do tempo de imobilidade e da frequência de auto-limpeza, comportamentos relacionados aos índices de ansiedade.

Além disso, a dose de 5,6 nmol de 8-OH-DPAT, agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, nos animais CNC, produziu diminuição dos comportamentos avaliados na presença do rato, tais como, total de entradas, %EP, %TP e auto-limpeza, sem alterar a resposta nociceptiva induzida pela CNC, hiperalgesia mecânica (tempo e carga) e de hiperalgesia térmica (tempo gasto na placa quente) (Experimento 2).

O aumento da frequência de coçar nos animais com CNC, no nosso estudo, corrobora com dados anteriores da literatura (Bennet e Xie, 1998; Bardim et al., 2000; Ardid et al., 2001; Liu et al., 2002; Vogel et al., 2003; Nitanda et al., 2005; Reis et al., 2007), o que sugere que o modelo induziu a nocicepção.

De forma semelhante, o efeito de aumento dos índices de ansiedade no grupo exposto ao rato de verdade (RV) foi observado em outros estudos com roedores, ratos e camundongos, quando na presença de predadores naturais, gato e rato, respectivamente (Canteras e Goto, 1999; Blanchard et al., 2004; Yang et al., 2004; Blanchard et al., 2005; Carvalho-Neto et al., 2006; Ribeiro-Barbosa et al., 2005; Cezario et al., 2008; Do Monte et al., 2008; Martinez et al., 2008), indicando que o modelo de exposição ao predador induziu a ansiedade.

No experimento 2, embora tenha sido observado aumento da nocicepção, por meio frequência do reflexo de coçar, nos animais com CNC, não foi observada a redução deste índice quando os animais foram expostos ao RV, conforme observado no experimento 1. Esta perda do efeito da exposição ao RV na redução da nocicepção em animais com CNC pode estar relacionada à manipulação dos animais durante o procedimento de microinjeção de drogas, realizado apenas no experimento 2.

Trabalhos da literatura têm demonstrado a existência de uma relação recíproca entre dor e reações afetivas, como ansiedade e depressão, em modelos animais (Yamada e Nabeshima, 1995; Canto-de-Souza et al., 1998; Nunes-de-Souza et al., 2000; Onodera et al., 2000; da Silva Torres et al., 2003; Boccalon et al., 2006; Narita et al., 2006; Benbouzid et al., 2007; Hasnie et al., 2007; Baptista et al., 2009). Estudos em modelos animais demonstram que a ansiedade pode induzir a antinocicepção que, por sua vez, é bloqueada por ansiolíticos como a buspirona (Rodgers e Shepherd, 1989) e o 8-OH-DPAT, um agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Nunes-de-Souza et al., 2000).

No presente estudo, a injeção do 8-OH-DPAT na dose de 5,6 nmol injetado na SCPvl produziu diminuição dos comportamentos avaliados na presença do rato, tais como, total de entradas, %EP, %TP e auto-limpeza nos animais com CNC, sem alterar a resposta nociceptiva de hiperalgesia mecânica (tempo e carga) e hiperalgesia térmica (tempo gasto na placa quente)

(Experimento 2). Entretanto, os animais SHAM que receberam 8-OH-DPAT, na mesma dose citada acima não apresentaram alteração destes índices de ansiedade, sugerindo que a indução da nocicepção pela CNC, de alguma forma, contribuiu para a reversão dos índices de ansiedade avaliados na exposição do camundongo ao rato. Em relação às outras respostas nociceptivas induzidas pela CNC, o tratamento com este agonista serotoninérgico não produziu alteração significativa nos testes de hiperalgesia mecânica (tempo e carga) e hiperalgesia térmica (tempo gasto na placa quente).

A dose de 10 nmol/0,1 µl não produziu efeito no teste de exposição ao rato, exceto nos dados referentes à porcentagem de tempo gasto em ambiente protegido e no tempo de imobilidade. A diferença encontrada nas diferentes doses de 8-OH-DPAT pode estar relacionada ao processo de ocupação dos receptores da SCP pela droga, ou à mobilização de diferentes subtipos de receptores de serotonina na SCP (para revisão ver Barnes e Sharp, 1999).

De acordo com a teoria de Deakin e Graeff (1991), a serotonina apresenta um papel dual no sistema de defesa, podendo atuar como ansiolítica ou ansiogênica dependendo das características do estímulo aversivo (se proximal ou distal, condicionado ou incondicionado); dos subtipos de receptores serotoninérgicos envolvidos e dos sítios de atuação no sistema nervoso central.

Neste sentido, estudos têm demonstrado que estímulos aversivos condicionados aumentam os disparos dos neurônios serotoninérgicos da rafe com projeções para a amígdala, resultando em facilitação do comportamento defensivo (efeito ansiogênico) via ativação de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>3</sub>. Enquanto estímulos aversivos incondicionados resultam no aumento da liberação de serotonina na substância cinzenta periaquedutal gerando atenuação do comportamento defensivo (efeito ansiolítico ou antipânico) via receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> e 5-HT<sub>1A</sub> (Deakin e Graeff, 1991; Graeff et al., 1996).

Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os trabalhos citados acima, uma vez que, foi observada diminuição dos comportamentos relacionados à ansiedade, avaliados no modelo de exposição ao predador (estímulo aversivo incondicionado), após a injeção de 8-OH-DPAT (5,6 nmol), um agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, na SCPvl de camundongos.

Estudos da literatura também têm demonstrado efeitos controversos da serotonina na modulação da dor neuropática, induzida pelo modelo de constrição crônica do nervo ciático (Bardim et al., 2000; Wang et al., 2000; Ardid et al., 2001; Liu et al., 2002; Vogel et al., 2003; Nitanda et al., 2005).

Tem sido observado que a administração intra-tecal de 5-HT produz redução da hiperalgesia induzida por modelos de dor crônica (Bardim et al., 2000), e que a analgesia decorrente da estimulação dos *núcleos da rafe* é acompanhada da liberação de 5HT na medula espinhal e atenuada pela administração de antagonistas serotoninérgicos (Gilbert e Franklin, 2001; Buhler et al., 2004). Entretanto, a serotonina tem um complexo papel na regulação da dor, favorecendo, em alguns casos, o estado de hiperalgesia que é atenuado pela administração periférica de antagonistas dos receptores serotoninérgicos (Ardid et al., 2001).

No presente estudo, o 8-OH-DPAT na dose de 5,6 nmol não foi capaz de modificar os índices de dor (frequência de coçar, tempo e carga no teste de hiperalgesia mecânica e tempo no teste de hiperalgesia térmica). Entretanto, na dose de 10 nmol, a ANOVA mostrou efeito significativo da interação entre os três fatores avaliados (estímulo, condição e tratamento) no teste de hiperalgesia mecânica. Também ocorreu interação entre condição e tratamento no teste de hiperalgesia térmica. O 8-OH-DPAT (10 nmol/0,1 µl) produziu redução do tempo de levantamento da pata nos animais comparados ao veículo, sugerindo aumento do índice de nocicepção avaliado.

Os efeitos controversos da serotonina na modulação da dor podem estar relacionados aos seus diferentes sítios de ação. Após a constrição crônica do nervo ciático, antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, administrados sistemicamente, não reduzem a hiperalgesia (Nitanda et al., 2005) mais potencializam o efeito analgésico de antidepressivos tricíclicos (Ardid et al., 2001), enquanto a injeção intra-tecal reduz o efeito analgésico da morfina (intra-SCP) (Liu et al., 2002). Este efeito não é observado com antagonistas 5-HT<sub>2A</sub> (Liu et al., 2002), os quais não são capazes de reduzir o efeito analgésico da morfina em administração intra-tecal, porém reduzem a hiperalgesia quando administrados sistemicamente (Nitanda et al., 2005). Os antagonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> não alteram a hiperalgesia (Nitanda et al., 2005), nem o efeito analgésico da morfina (intra-SCP) (Liu et al., 2002), em administrações sistêmicas ou intra-tecal, respectivamente.

A administração intra-tecal de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> reverte totalmente a analgesia induzida pela serotonina na dor originada por estímulos mecânicos em ratos. Este efeito, entretanto, não é observado com antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>4</sub>. A administração intra-tecal de agonistas dos receptores 5-HT<sub>3</sub> produz efeito analgésico, enquanto agonistas dos receptores 5-HT<sub>2</sub> não produz analgesia (Bardin et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, concentrados em áreas do sistema nervoso central como tálamo, corno dorsal da medula espinhal e SCP, estão amplamente envolvidos na modulação da nocicepção (Liu et al., 2002). A administração de antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> no núcleo magno da rafe reduz a hiperalgesia mecânica em ratos com lesão dos nervos espinais. Estes efeitos são revertidos pela administração de antagonistas dos receptores  $\alpha_2$  da adrenalina, mas não pela naloxona (Wei e Pertovaara, 2006). Já em ratos com hemiseção da medula espinhal, a redução da hiperalgesia a estímulos mecânicos e térmicos é observada pela administração intratecal de agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, sendo este efeito

bloqueado pelo tratamento prévio com antagonistas destes receptores (Hains et al., 2003). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, particularmente da SCP, têm sido relacionados à redução da analgesia induzida pelo conflito social em camundongos (Canto-de-Souza et al., 1998).

Estes resultados fortalecem a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da SCP na modulação das respostas de ansiedade/medo e na nocicepção avaliadas em roedores. Entretanto, devido ao complexo papel da serotonina na modulação destas respostas, muitos resultados controversos são descritos na literatura, o que fortalece a necessidade de novos estudos com agonistas e antagonistas dos diferentes subtipos dos receptores serotoninérgicos para maior esclarecimento sobre o assunto.

## 8. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

- Os animais submetidos à constrição do nervo ciático (CNC) apresentaram aumento no reflexo de coçar quando comparados ao grupo SHAM, indicando indução da nocicepção pela CNC.
- A exposição de camundongos ao rato (RV) aumentou a ansiedade/medo em ambos os grupos, SHAM e com CNC.
- A exposição de camundongos ao RV produziu antinocicepção nos camundongos submetidos à CNC, sugerindo que a nocicepção foi diminuída pela ansiedade/medo.
- O agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, na dose de 5,6 nmol, intra-SCPvL produziu efeito ansiolítico nos camundongos com CNC, sem alterar os índices de dor, enquanto a dose de 10 nmol produziu efeitos sugestivos de aumento de nocicepção.
- Estes resultados fortalecem a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da SCPvL na modulação das respostas de ansiedade/medo e na nocicepção avaliada em roedores.

## 9. REFERÊNCIAS

ARDID, D.; ALLOUI, G.; BROUSSE, G.; JOURDAN, D.; PICARD, P.; DUBRAY, C.; ESCHALIER, A. Potentiation of the antinociceptive effect of clomipramine by a 5-HT<sub>1A</sub> antagonist in neuropathic pain in rats. **British Journal of Pharmacology**. 132: 1118-1126, 2001.

AUSTIN, P.J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **J. Neuroimmunol.** 229, 26–50, 2010.

BANDLER, R.; KEY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Progress in Brain Research**. 107: 285-300, 1996.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S.P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal gray: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Progress Brain Research**. 87: 67-154, 1991.

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

BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**. 86: 11-18, 2000.

BARNES, N.M.; SHARP, T.A. Review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**. 38 (8): 1083-1152, 1999.

BECERRA-GARCIA, A.M.; CARDENAS, F.R.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiol Behav**. 85: 265 – 270, 2005.

BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behavioural Brain Research**. 170:52–61, 2006.

BENBOUZID, M.; PALLAGE, V.; RAJALU, M.; WALTISPERGER, E.; DORIDOT, S.; POISBEAU, P.; FREUND-MERCIER, M.J.; BARROT, M. Sciatic nerve cuffing in mice: A model of sustained neuropathic pain. **European Journal of Pain**. Article in press, 2007.

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

BERROCOSO, E.; MICO, J.A. In vivo effect of venlafaxine on locus coeruleus neurons: role of opioid,  $\alpha$ 2-adrenergic and 5-HT1A receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 322: 101-107, 2007.

BERTZ, R.J.; REYNOLDS, I.J.; KROBOTH, P.D. Effect of neuroactive steroids on [3H]flumazenil binding to the GABAA receptor complex *in vitro*. **Neuropharmacology**. 34: 1169-1175, 1995.

BIRKLEIN, F.; ROWBOTHAM, M.C. Does pain change the brain? **Neurology**. 65: 666-667, 2005.

BLACKBURN-MUNRO, G.; BLACKBURN-MUNRO, R. E. Chronic Pain, Chronic Stress and Depression: Coincidence or Consequence? **Journal of Neuroendocrinology**. 13: 1009-1023, 2001.

BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Reviews of Psychology**. 39: 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**. 21: 783-789, 1997.

BLANCHARD, R.J.; NIKULINA, J.N.; SAKAI, R.R.; MCKITTRICK, C.; MCEWEN, B.; BLANCHARD, D.C. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. **Physiology & Behavior**, 63 (4): 561–569, 1998.

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**. 58: 55-165, 1993.

BLANCHARD, D.C.; YANG, M.; MARKHAM, C.; FARROHKI, C.F.; PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, R.J.; GRIEBEL, G. Diazepam and buspirone effects in c57bl/6j mice in the rat exposure test (RET). Washington, D C: **Society for Neuroscience**, 2004. Online.

BLANCHARD, D.C.; CANTERAS, N.S.; MARKHAM, C.M.; PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, R.J. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 29 (8): 1243-1253, 2005.

BOCCALON, S.; SCAGGIANTE, B.; PERISSIN, L. Anxiety stress and nociceptive responses in mice. **Life Sciences**. 78: 1225 – 1230, 2006.

BONICA, J. J. Definitions and taxonomy of pain. In: BONICA, J.J. **Management of Pain**. 2: 18-27, 1990.

BRANDÃO, M.L.; TRONCOSO, A.C.; SILVA, M.A.S.; HUSTON, J. . The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **Eur. J. Pharmacol**. 463: 225-233, 2003.

BUHLER, A.V.; PROUDFIT, H.K.; GEBHART, G.F. Separate populations of neurons in the rostral ventromedial medulla project to the spinal cord and to the dorsolateral pons in the rat. **Brain Research**. 1016: 12-19, 2004.

CANTERAS, N.S.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **NeuroReport**. 10:413-8, 1999.

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. **European Journal of Pharmacology**. 345: 253-256, 1998.

CARSTENS, E.; YOKOTA, T.; ZIMMERMANN, M. Inhibition of spinal neuronal responses to noxious skin heating by stimulation of mesencephalic periaqueductal gray in the cat. **J. Neurophysiol**. 42: 558-568, 1979.

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. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 85: 140-147, 2006.

CEZARIO, A.F.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; BALDO, M.V.C.; CANTERAS, N.S. Hypothalamic sites responding to predator threats - the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned antipredatory defensive behavior. **European Journal of Neuroscience**. 28: 1003-1015, 2008.

CHRISTIE, W.; MOORE, C. The impact of humor on patients with cancer. **Clin. J. Oncol. Nurs**. 9: 211-218, 2005.

CLAYTON, A.H. Extended-release bupropion: an antidepressant with a broad spectrum of therapeutic activity? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. 8 (4): 457-466, 2007.

CLEMENT, C.I.; KEY, K.A.; OWLER, B.K.; BANDLER, R. Common patterns of increased and decreased Fos expression in midbrain and pons evoked by noxious deep somatic and noxious visceral manipulations in the rat. **Journal of Comparative Neurology**. 366: 495-515, 1996.

CLINE, M.A.; OCHOA, J.; TOREBJORK, H.E. Chronic hyperalgesia and skin warming caused by sensitized C nociceptores. **Brain**. 112: 621-647, 1989.

CODERRE, T.J.; KUMAR, N.; LEFEBVRE, C.D.; YU, J.S.C. A comparison of the glutamate release inhibition and anti-allodynic effects of gabapentin, lamotrigine and riluzole in a model of neuropathic pain. **Journal of Neurochemistry**. 100: 1289-1299, 2007.

COLVIN, L.A.; MARK, M.A.; DUGGAN, A.W. Bilaterally enhanced dorsal horn postsynaptic currents in a rat model of peripheral mononeuropathy. **Neuroscience Letters**. 207: 29-32, 1996.

COLVIN, L.A.; MARK, M.A.; DUGGAN, A.W. The effect of a peripheral mononeuroathy on immunoreactive (ir)-galanin release in the spinal cord of the rat. **Brain Research**. 766: 259-61, 1997.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**. 138:17-28, 2003.

CRAIG, A.; DOSTROVSKY, J. Differential projections of thermoreceptive and nociceptive lamina I trigeminothalamic and spinothalamic neurons in the cat. **Journal of Neurophysiology**. 86: 856-870, 2001.

DA SILVA TORRES, I.L.; CUCCO, S.N.S.; BASSANI, M.; DUARTE, M.S.; SILVEIRA, P.P.; VASCONCELLOS, A.P.; TABAJARA, A.S.; DANTAS, G.; FONTELLA, F.U.; DALMAZ, C.; FERREIRA, M.B.C. Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats effect of morphine administration. **Neuroscience Research**. 45: 277– 283, 2003.

DAVIS, M.P. What is new in neuropathic pain? **Support Care Cancer**. DOI 10.1007/s00520-006-0156-0, 2006.

DEAKIN, J.F.W. e GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol.** 5: 305-315, 1991.

DICKENSON, A.; SUZUKI, R. Targets in pain and analgesia. In: HUNT, S.P.; KOLTZENBURG, M. **The neurobiology of pain.** Ed. Oxford University Press. New York: 149-160, 2005.

DICKENSON, A.; MATTHEWS, E.; SUZUKI, R. Central nervous system mechanisms of pain in peripheral neuropathy. In: HANSSON, P.; FIELDS, H.; HILL, R.; MARCHETTINI, P. **Neuropathic Pain: Pathophysiology and Treatment.** Seattle, IASP Press: 85-106, 2001.

DO MONTE, F.H.M.; CANTERAS, N.S.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J.; CAROBREZ, A.P. New Perspectives on -Adrenergic Mediation of Innate and Learned Fear Responses to Predator Odor. **The Journal of Neuroscience.** 28: 13296-13302, 2008.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia.** 75: 125-131, 1997.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; REYES, R.; MARTÍNEZ-MOTA, L.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. Influence of inflammatory nociception on the anxiolytic-like effect of diazepam and buspirone. **Psychopharmacology.** 180: 399-407, 2005.

FIGUEIREDO, H.F.; BODIE, B. L.; TAUCHI, M.; DOLGAS, C. M.; HERMAN, J. Stress Integration after Acute and Chronic Predator Stress: Differential Activation of Central Stress Circuitry and Sensitization of the Hypothalamo-Pituitary- Adrenocortical Axis. **Endocrinology.** 144 (12): 5249-5258, 2003.

FRANKLIN, K.B.; PAXINOS, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Ed. Academic Press. Califórnia, USA, 1997.

GAO, Y.J.; REN, W.H.; ZHANG, Y.Q.; ZHAO, Z.Q. Contributions of the anterior cingulate cortex and amygdala to pain- and fear-conditioned place avoidance in rats. **Pain**.110:343–53, 2004.

GAURIAU, C.; BERNARD, J. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp. Physiol.** 87: 251-258, 2002.

GILBERT, A-K.; FRANKLIN, K.B.J. GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. **Pain**. 90: 25-36, 2001.

GOMES, K.S.; GARCIA, C.A.; PLANETA, C.S.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Fos-like immunoreactivity in central nervous system of mice simultaneously exposed to the elevated plus-maze and nociception. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 41(3): 385-391, 2005.

GRACE, P.M.A.; ROLAN, P. E.; HUTCHINSON, M.R. Peripheral immune contributions to the maintenance of central glial activation underlying neuropathic pain. **Brain, Behavior, and Immunity** 25: 1322–1332, 2011.

GRAEFF, F.G.; BRANDÃO, M.L.; AUDI, E.A.; SCHUTZ, M.T.B. Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**. 21: 65-72, 1996.

HAINS, B.C.; WILLIS, W.D.; HULSEBOSCH, C.E. Serotonin receptors 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> reduce hyperexcitability of dorsal horn neurons after chronic spinal cord hemisection injury in rat. **Exp. Brain Research**. 149: 174-186, 2003.

HARDEN, N.; COHEM, M.; Unmet needs in the management of neuropathic pain. **J. Pain Symptom Manage**. 25: 12-17, 2003.

HASNIE, F.S.; WALLACE V.C.J.; HEFNER, K.; HOLMES, A.; RICE, A.S.C. Mechanical and cold hypersensitivity in nerve-injured C57BL/6J mice is not associated with fear-avoidance- and depression-related behaviour. **British Journal of Anaesthesia**. 1 -7, 2007.

HERNÁNDEZ, N.; VANEGAS, H. Antinociception induced by PAG-microinjected dipyrrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids. **Brain Research**. 896: 175-178, 2001.

HERRERO, J.F.; CERVERO, F. Supraspinal influences on the facilitation of rat nociceptive reflexes induced by carrageenan monoarthritis. **Neuroscience Letters**. 209: 21-24, 1996.

HONDA, M.; KUNITOSHI, U.; TANABE, M.; ONO, H. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor exerts its antiallodynic effects on neuropathic pain in mice via 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors. **Neuropharmacology**. 51: 866-872, 2006.

HUNT, S.P.; BESTER, H. The ascending pain pathways. In: HUNT, S.P.; KOLTZENBURG, M. **The neurobiology of pain**. Ed. Oxford University Press. New York: 115-137, 2005.

HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Nat. Rev. Neurosci.** 2: 83-91, 2001.

INAZU, M.; TAKEDA, H.; IKASHI, H.; SUGISAWA, M.; UCHIDA, Y.; MATSUMIYA, T. Pharmacological characterization and visualization of the glial serotonin transporter. **Neurochem. Int.** 39 (1): 39-49, 2001.

JIMÉNEZ-VELÁZQUEZ, G.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. Influence of pharmacologically-induced experimental anxiety on nociception and antinociception in rats. **European Journal of Pharmacology**. 547: 83-91, 2006.

KAJANDER, K.C.; XU, J. Quantitative evaluation of calcitonin gene-related peptide and substance P levels in rat spinal cord following peripheral nerve injury. **Neuroscience Letters**. 186: 184-188, 1995.

KASPER, S.E.L.; GIAMAL, N.; HILGER, E. Reboxetine: the first selective noradrenaline re-uptake inhibitor. **Expert Opin Pharmacother**.1(4): 771-82, 2000.

KAVALIERS, M.; COLWELL, D.D.; PERROT-SINAL, T.S. Opioid and non-opioid NMDA-mediated predator-induced analgesia in mice and the effects of parasitic infection **Brain Research**. 766: 11–18, 1997.

KEAY, K.A.; BANDLER, R. Deep and superficial noxious stimulation increases Fos-like immunoreactivity in different regions of the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Neuroscience Letters**. 154: 143-158, 1993.

KEAY, K.A.; BANDLER, R. Vascular head pain selectively activates ventrolateral periaqueductal gray in the cat. **Neuroscience Letters**. 245: 58-60, 1998.

KEAY, K.A.; CLEMENT, C.I.; OWLER, B.K.; DEPAULIS, A.; BANDLER, R. Convergence of deep somatic and visceral nociceptive information onto a discrete ventrolateral midbrain periaqueductal gray region. **Neuroscience**. 61: 727-732, 1994.

KEAY, K.A.; LI, Q.F.; BANDLER, R. Muscle pain activates a direct projection from ventrolateral periaqueductal gray to rostral ventrolateral medulla in rats. **Neuroscience Letters**. 290: 157-160, 2000.

KIM, S.H.; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**. 50: 355-63, 1992.

KOLTZENBURG, M. Mechanisms of peripheral neuropathic pain. In: HUNT, S.P.; KOLTZENBURG, M. **The neurobiology of pain**. Ed. Oxford University Press. New York: p.115-137, 2005.

KONTINEN, V. K.; DICKENSON, A.H. Effects of midazolam in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain in rats. **Pain**. 85: 425-431, 2000.

KURASHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**. 273(2):245-52, 1983.

LA GRAIZE, S.C.; BORZAN, J.; PENG, Y.B.; FUCHS, P.N. Selective regulation of pain affect following activation of the opioid anterior cingulate cortex system. **Exp Neurol**. 197:22-30, 2005.

LEE, B.H.; PARK, S-H.; WON, R.; PARK, Y.G.; SOHN, J-H. Antiallodynic effects produced by stimulation of the periaqueductal gray matter in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience Letters**. 291: 29-32, 2000.

LEVENTHAL, L.; SMITH, V.; HORNBY, G.; ANDREE, T.H.; BRANDT, M.R.; ROGERS, K.E. Differential and Synergistic Effects of Selective Norepinephrine and Serotonin Reuptake Inhibitors in Rodent Models of Pain. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 320: 1178-1185, 2007.

LISNEY, S.J. Regeneration of unmyelinated axons after injury of mammalian peripheral nerve. **Q.J. Exp. Physiol**. 74: 757-784, 1989.

LIU, Z.Y.; ZHUANG, T.; LUNDERBERG, T.; YU, L.C. Involvement of 5-Hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. **Neuroscience**. 112(2): 399-407, 2002.

LOVICK, T.A. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: Role in adaptative behavioural responses. **Progress of Neurobiology**. 40: 631-644, 1993.

MARCHAND, S.; ARSENAULT, P. Odors modulate pain perception: a genderspecific effect. **Physiol. Behav.** 76: 251–256, 2002.

MARTINEZ, R.C.; CARVALHO-NETTO, E. F.; AMARAL, V.C.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTERAS, N.S. Investigation of the hypothalamic defensive system in the mouse.. **Behavioural Brain Research**. 192: 185-190, 2008.

MATSUZAWA-YANAGIDA, K.; NARITA, M.; NAKAJIMA, M.; KUZUMAKI, N.; NIIKURA, K.; NOZAKI, H.; TAKAGI, T.; TAMAI, E.; HAREYAMA, N.; TERADA, M.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI, T. Usefulness of Antidepressants for Improving the Neuropathic Pain-Like State and Pain-Induced Anxiety through Actions at Different Brain Sites. **Neuropsychopharmacology**. 1–14, 2007.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 28: 285-305, 2004.

MELLEGGERS, M.A.; FURLAN, A.D.; MAILIS, A. Gabapentin for neuropathic pain: systematic review of controlled and uncontrolled literature. **Clin. J. Pain.** 17:284-295, 2001.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress of Neurobiology**. 66: 355-474, 2002.

MISSLIN, R. The defense system of fear: behavior and neurocircuitry. **Cl. Neuropsychiol.** 33: 55-66, 2003.

MONHEMIUS, R.; GREEN, D.L.; ROBERTS, M.H.T.; AZAMI, J. Periaqueductal grey mediated inhibition of responses to noxious stimulation is dynamically activated in the rat model of neuropathic pain. **Neuroscience Letters**. 298: 70-74, 2001.

MORALES, M.; BATTENBERG, E.; BLOOM, F.E. Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5-HT<sub>3</sub> receptor subtype in the rat brain and spinal cord. **J. Comp. Neurol.** 402: 385-401, 1998.

MOSCONI, T.; KRUGER, L. Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induces a painful neuropathy: ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. **Pain.** 64: 37-57, 1996.

MURAI, T.; KOSHIKAWA, N.; KANAYAMA, T.; TAKADA, K.; TOMIYAMA, K.; KOBAYASHI, M. Opposite effects of midazolam and beta-carboline-3-carboxylate ethyl ester on the release of dopamine from rat nucleus accumbens measured by in vivo microdialysis. **Eur J Pharmacol.** 261(1-2):65-71, 1994.

NAGY, J.I.; HUNT, S.P. The termination of primary afferents within the rat dorsal horn: evidence for rearrangement following capsaicin treatment. **J. Comp. Neurol.** 218: 145-158, 1983.

NARITA, M.; SATORU, O.; NARITA, M.; ISE, Y.; YAJIMA, Y.; SUZUKI, T. Change in the expression of *c-fos* in the rat brain following sciatic nerve ligation. **Neuroscience Letters.** 352: 231-233, 2003.

NARITA, M.; KANEKO, C.; MIYOSHI, K.; NAGUMO, Y.; KUZUMAKI, N.; NAKAJIMA, M.; NANJO, K.; MATSUZAWA, K.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI, T. Chronic Pain Induces Anxiety with Concomitant Changes in Opioidergic Function in the Amygdala. **Neuropsychopharmacology.** 31: 739-750, 2006.

NICHOLS, M.L.; LOPEZ, Y.; OSSIPOV, M.H.; BIAN, D.; PORRECA, F. Enhancement of the antiallodynic and antinociceptive efficacy of spinal morphine by antisera to dynorphin A (1-13) or MK-801 in nerve ligation model of peripheral neuropathy. **Pain.** 69: 317-322, 1997.

NITANDA, A.; YASUNAMI, N.; TOKUMO, K.; FUJII, H.; HIRAI, T.; NISHIO, H. Contribution of the peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. **Neurochemistry International**. 47: 394-400, 2005.

NORDIN, M.; NYSTROM, B.; WALLIN, U.; HAGBARTH, K. Ectopic sensory discharges and paresthesiae in patients with disorders of peripheral nerves, dorsal roots and dorsal columns. **Pain**. 20: 231-245, 1984.

NOZAKI, C.; KAMEI, J. Possible involvement of opioidergic systems in the antinociceptive effect of the selective serotonin reuptake inhibitors in sciatic nerve-injured mice. **European Journal of Pharmacology**. 552: 99-104, 2006.

NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, F.G.; PELA, I.R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intraamygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**. 150: 300–310, 2000.

OHAYON, M.M.; SCHATZBERG, A.F. Using chronic pain to predict depressive morbidity in the general population. **Arch. Gen. Psychiatry**. 60:39–47, 2003.

OKUSE, K. Pain signaling pathways: From cytokines to ion channels. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39: 490-496, 2007.

OLIVEIRA, R.C.; OLIVEIRA, R.; FERREIRA, C.M.R.; COIMBRA, N.C. Involvement of 5-HT<sub>2</sub> serotonergic receptors of the nucleus raphe magnus and nucleus reticularis gigantocellularis/paragigantocellularis complex neural networks in the antinociceptive phenomenon that follows the post-ictal immobility syndrome. **Experimental Neurology**. 201: 144-153, 2006.

ONODERA, K.; SAKURADA, S.; FURUTA, S.; YONEZAWA, A.; ARAI, K., HAYASHI, T.; KATSUYAMA, S.; SATO, T.; MIYAZAKI, S.; KISARA, K. Differential involvement of opioid

receptors in stress-induced antinociception caused by repeated exposure to forced walking stress in mice. **Pharmacology**. 61 (2): 96–100, 2000.

PARSONS, B.; TIVE, L. HUANG, S. Gabapentin a pooled analysis of adverse events from three clinical trials in patients with postherpetic neuralgia. **Am. J. Geriatr. Pharmacother**. 3: 157-162, 2004.

PEDERSEN, L.H.; NIELSEN, A.N.; BLACKBURN-MUNRO, G. Antinociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. **Psychopharmacology**. 182: 551-561, 2005.

PEDERSEN, L.H.; SCHEEL-KRUGER J.; BLACKBURN-MUNRO, G. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. **Pain**. 127: 17–26, 2007.

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**. 96:1153–60, 2002.

PORRECA, F.; TANG, Q.B.; BIAN, D.; RIEDL, M.; ELDE, R.; LAI, J. Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury. **Brain Research**. 795: 197-203, 1998.

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

RALSTON, D.D. Present models of neuropathic pain. **Pain Reviews**. 5: 83-100, 1998.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn**. 111:409-419, 1957.

REIS, L.M.; LOPES, J.A.M.; BRISOLA, M.L.; SANTOS, M.M.; BITTENCOURT, J.C.; VASCONCELOS, L.A.P. The influence of AsAlGa laser on the neuropathic pain-like syndrome in rats submitted to a perioheral nerve constrictive lesion. **Revista DOR: Pesquisa, Clínica e Terapêutica**. 8(2):1000-1009, 2007.

REN, K.; DUBNER, R. Enhanced descending modulation of nociception in rats with persistent hindpaw inflammation. **Journal of Neurophysiology**. 76: 3025-3037, 1996.

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

REN, K., DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nat. Med**. 16: 1267–1276, 2010.

RHUDY, J.L.; MEAGHER, M.W. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. **Pain**. 84:65–75, 2000.

RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S.; CEZÁRIO, A.F.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. An alternative experimental procedure for studying predator-related defensive responses. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 29 (8): 1255-1263, 2005.

RILEY, V.; FITZMAURICE, M.A.; SPACKMAN, D.H. Psychoneuroimmunology factors in neoplasia: studies in animals. In: ADER, R. **Psychoneuroimmunology**. Academic Press, New York, 31– 102, 1981.

RODGERS, R.J.; SHEPHERD, J.K. 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-hydroxy-2-(DI-npropylamino) tetralin (8-OH-DPAT), inhibits non-opioid analgesia in defeated mice: influence of route of administration. **Psychopharmacology**. 97: 163–165, 1989.

RODGERS, R.J., CAO, B.J., DALVI, A., HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Biological Research**. 30: 289-304, 1997.

ROESKA, K.; CECI, A.; TREEDE R.; DOODS, H. Effect of high trait anxiety on mechanical hypersensitivity in male rats. **Neuroscience Letters**. 464: 160–164, 2009.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review Medicine**. 49:123-133, 1998.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**. 43: 205-18, 1990.

SORKIN, L.; CARLTON, S. Spinal anatomy and pharmacology of afferent processing. In: YAKSH, T; LYNCH, C; ZAPOL, W.; MAZE, M; BIEBUYCK, J.; SAIDMAN, L. **Anesthesia Biologic Foundations**. Lippincott-Raven. Philadelphia/New York: p. 577-610, 1997.

SUGIMOTO, T.; BENNETT, G.J.; KAJANDER, K.C. Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transaction and strychnine. **Pain**. 42:205-13, 1990.

SUZUKI, R.; DICKENSON, A. Spinal and supraspinal contributions to central sensitization in peripheral neuropathy. **Neurosignals**. 14: 175-181, 2005.

SUZUKI, R.; MORCUENDE, S.; WEBBER, M.; HUNT, S.P.; DICKENSON, A.H. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. **Nature Neuroscience**. 5: 1319-1326, 2002.

SUZUKI, R.; RAHAMAN, W.; HUNT, S.; DICKENSON, A. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurons following peripheral nerve injury. **Brain Research**. 1019: 68-76, 2004.

SUZUKI, R.; RAHMAN, W.; RYGH, L.J.; WEBBER, M.; HUNT, S.P.; DICKENSON, A.H. Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin. **Pain**. 117: 292-303, 2005.

SUZUKI, T.; AMATA, M.; SAKAUE, G.; NISHIMURA, S.; INOUE, T.; SHIBATA, M.; MASHIMO, T. Experimental Neuropathy in Mice Is Associated with Delayed Behavioral Changes Related to Anxiety and Depression. **Anesth Analg.** 104:1570–7, 2007.

TAKAHASHI, R. N.; RAMOS G. A.; ASSINI, F.L. Anxiety does not affect the antinociceptive effect of D9-THC in mice: participation of cannabinoid and opioid receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** 75: 763–768, 2003.

TANIMOTO, S.; NAKAGAWA, T.; YAMAUCHI, Y.; MINAMI, M.; SATOH, M. Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical somatic and visceral pains in the rats. **Eur J Neurosci.** 18:2343–50, 2003.

TESKEY, G.C.; KAVALIERS, M. Aggression, defeat and opioid activation in mice: Influences of social factors, sinze and territory. **Behav. Brain Research.** 23: 77-84, 1995.

TRUINI, A.; CRUCCU, G. Pathophysiological mechanisms of neuropathic pain. **Neurol. Sci.** 179-182, 2006.

TSURUOKA, M. WILLIS, W.D. Bilateral lesions in the area of the nucleus locus coeruleus affect the development of hiperalgesia during carrageenan-induced inflammation. **Brain Research.** 726: 233-236, 1996.

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypie switch and initiation mechanisms. **Pharmacol. Ther.** 109: 57-77, 2006.

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

VALBO, A.B.; HAGBARTH, K.E.; TOREBJORK, H.E.; WALLIN, B.G. Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves. **Physiol. Rev.** 59: 919-957, 1979.

VAN HOUDENHOVE, B. Psychosocial stress and chronic pain. **European Journal of Pain.** 4: 225-228, 2000.

VANEGAS, H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. **Neuroscience Letters.** 361: 225-228, 2004.

VANEGAS, H.; TORTORICI, V.; EBLEN-ZAJJUR, A.; VÁSQUEZ, E. PAG-microinjected dipyrone (metamizol) inhibits responses of spinal dorsal horn neurons to natural noxious stimulation in rats. **Brain Research.** 759: 171-174, 1997.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H-G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews.** 46: 295-309, 2004.

VASQUES, E.; VANEGAS, H. The antinociceptive effect of PAG-microinjected dipyrone in rats is mediated by endogenous opioids of the rostral ventromedial medulla. **Brain Research.** 854: 249-252, 2000.

VAZQUEZ, E.; HERNADEZ, N.; ESCOBAR, W.; VANEGAS, H. Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: Involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. **Brain Research.** 1048: 211-217, 2005.

VATINE, J.; DEVOR, M.; BELFER, I.; RABER, P.; ZELTSER, R.; DOLINA, S.; SELTZER, Z. Preoperative open Field behavior predicts levels of neuropathic pain-related behavior in mice. **Neuroscience Letters.** 279: 141-144, 2000.

VICKERS, E.R.; BOOCOCK, H. Chronic orofacial pain associated with psychological morbidity and negative personality changes: a comparison to the general population. **Aust. Dent. J.** 50: 21–30, 2005.

VILLEMURE, C.; SLOTNICK, B.M.; BUSHNELL, M.C. Effects of odors on pain perception: deciphering the roles of emotion and attention. **Pain.** 106: 101–108, 2003.

VOGEL, C.; MOSSNER, R.; GERLACH, M.; HEINEMANN, T.; MURPHY, D.L.; RIEDERER, P.; LESCH, K-P.; SOMMER, C. Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. **The Journal of Neuroscience.** 23(2): 708-715, 2003.

WALL, P.; BERY, J.; SAADE, N. Effects of lesions to rat spinal cord lamina I cell projection pathways on reactions to acute and chronic noxious stimuli. **Pain.** 35: 327-339, 1988.

WANG, D.; LUNDEBERG, T.; YU, L-C. Antinociceptive role of galanin in periaqueductal grey of rats with experimentally induced mononeuropathy. **Neuroscience.** 96(4): 767-771, 2000.

WEI, H.; PERTOVAARA, A. 5-HT<sub>1A</sub> receptors in endogenous regulation of neuropathic hypersensitivity in the rat. **European Journal Pharmacology.** 535: 157-165, 2006.

WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal Fos protein expression after peripheral inflammation. **Pain.** 80: 127-141, 1999.

WIESENFELD-HALLIN, Z.; HAO, J.X.; XU, X.J. Mechanisms of central pain. In: JESEN, T.S.; TURNER, J.A.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Congress on Pain. **IASP Press.** 8: 575-89, 1997.

WILSON, H.D.; BOYETTE-DAVIS, J.; FUCHS, P.N. The relationship between basal level of anxiety and the affective response to inflammation. **Physiology & Behavior.** 90: 506–511, 2007.

WONG D.T.; BYMASTER F.P.; ENGLEMAN E.A. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Science**. 57: 411-441, 1995.

WOOLF, C.; FITZGERALD, M. The properties of neurons recorded in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. **J. Comp. Neurol**. 221: 313-328, 1983.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, 353: 1959-1964, 1999.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Stress-induced behavioural responses and multiple opioid systems in the brain. **Behavioural Brain Research**. 67 (2): 133– 145, 1995.

YANG, M.; AUGUSTSSON, H.; MARKHAM, C.M.; HUBBARD, D.; WEBSTER, D.; WALL, P.M.; BLANCHARD, R.J.; BLANCHARD, D.C. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiology & Behavior**. 81: 465-473. 2004.

YEZIERSKI, R.P. Pain following spinal cord injury: the clinical problem and experimental studies. **Pain**, 68: 185-94, 1996.

ZEITZ, K.P.; GUY, N.; MALMBERG, A.B.; DIRAJLAL, S.; MARTIN, W.J.; SUN, L.; BONHAUS, D.W.; STUCKY, C.L.; JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. The 5-HT<sub>3</sub> subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. **Journal Neuroscience**. 22: 1010-1019, 2002.