



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

**O PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> E  
5-HT<sub>2C</sub> DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL SOBRE OS  
EFEITOS DA FLUOXETINA NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA  
PELO CONFINAMENTO DE CAMUNDONGOS AOS BRAÇOS DO  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

**Daniela Baptista de Souza**

**SÃO CARLOS/ SP  
2015**



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

**O PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> E  
5-HT<sub>2C</sub> DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL SOBRE OS  
EFEITOS DA FLUOXETINA NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA  
PELO CONFINAMENTO DE CAMUNDONGOS AOS BRAÇOS DO  
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

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

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

**SÃO CARLOS/ SP  
2015**

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

S729pr

Souza, Daniela Baptista de.

O papel dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal sobre os efeitos da fluoxetina na antinocicepção induzida pelo confinamento de camundongos aos braços do labirinto em cruz elevado / Daniela Baptista de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2015. 107 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Farmacologia. 2. Fluoxetina. 3. Camundongos. 4. Serotonina. 5. Antinocicepção. 6. Labirinto em cruz elevado. I. Título.

CDD: 615.1 (20<sup>a</sup>)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

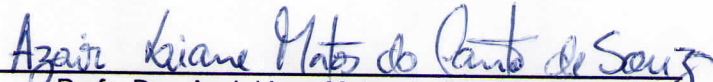
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

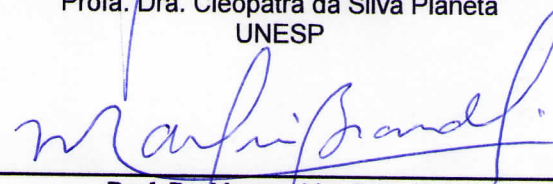
**Folha de Aprovação**

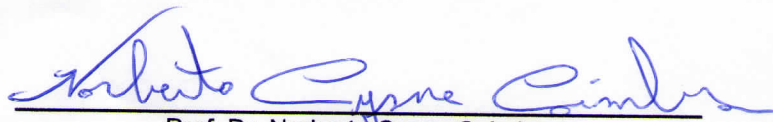
---

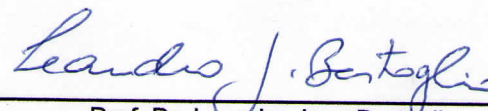
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Daniela Baptista de Souza, realizada em 20/03/2015:

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

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcus Lira Brandão  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Leandro Jose Bertoglio  
UFSC

*Dedico este trabalho a minha família, pelo apoio incondicional em todas as escolhas da minha vida. Especialmente, ao Lucas, meu amor, amigo e maior incentivador, sem o seu apoio o desenvolvimento deste trabalho não seria possível. E ao Arthur, meu filho que acaba de entrar na minha vida, e me mostrar o verdadeiro sentido da palavra felicidade.*

## AGRADECIMENTOS

À Professora **Azair**, pela orientação, incentivo, paciência, amizade, dedicação e confiança para a realização deste trabalho.

Ao Professor **Ricardo Luiz Nunes de Souza**, pela co-orientação, amizade, incentivo, apoio e valiosa contribuição à minha formação científica.

À **banca examinadora**, pela atenção dispensada na leitura e colaboração para com este trabalho.

À técnica do laboratório, **Lara Maria Silveira**, pelo auxílio e amizade no dia-a-dia.

Aos amigos do laboratório, **Caio, Carol, Elke, Isabela, Lígia, Marília, Rimenez, Vinícius, Vitor** e a todos os outros que já passaram por este laboratório, pela amizade, colaboração e apoio essencial ao meu crescimento pessoal e profissional.

Aos **amigos do Laboratório de Farmacologia-Unesp e Neurociências-UFSCar**, pelo apoio e amizade.

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

Ao **Alexandre**, pela competência profissional na secretaria do PIPGCF.

Ao **Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**.

À **Professora Carla Guelardini**, pela oportunidade de estágio em seu laboratório na Universidade de Firenze. E aos amigos **Lorenzo Manelli, Matteo Zanardelli e Laura Micheli**, pela receptividade tão alegre e amigável e pelo estímulo à carreira.

Aos **demais amigos e pessoas** que, de certa forma, me apoiaram.

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, processo Nº 2009/17938-6, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

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

## Sumário

<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>14</b>
<b>CAPITULO 1: INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1. Modulação emocional da dor.....	18
1.2. Modelos Animais .....	20
1.3. Substrato Neural da Antinocicepção .....	23
1.4. Bases Neuroquímicas da Antinocicepção .....	26
1.5. Serotonina .....	27
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO 2: MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
2.1. Sujeitos .....	35
2.2. Cirurgia e Microinjeção.....	35
2.3. Labirinto em Cruz Elevado .....	36
2.4. Teste Nociceptivo.....	36
2.5. Drogas.....	37
2.6. Histologia.....	37
2.7. Quantificação da concentração de serotonina e 5-HIAA da substância cinzenta periaquedutal .....	38
2.8. Quantificação da densidade de proteínas para os receptores 5-HT <sub>1A</sub> e 5-HT <sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal.....	39
2.9. Análise Estatística.....	41
2.10. Ética.....	41
<b>CAPÍTULO 3: OS EFEITOS DA FLUOXETINA SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO..</b>	<b>42</b>
3.1. Delineamento Experimental .....	43
3.3.1. Avaliação do tratamento agudo com Fluoxetina, sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao braço aberto do LCE. ....	43
3.3.2. Avaliação do tratamento crônico com fluoxetina sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao braço aberto do LCE. ....	43
3.2. Resultados .....	44



3.2.1. Efeitos do tratamento agudo de fluoxetina, sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE.....	44
3.2.2. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	45
<b>3.3. Discussão .....</b>	<b>46</b>

## **CAPÍTULO 4: O PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> E 5-HT<sub>2C</sub> LOCALIZADOS NA SCP SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO.....48**

<b>4.1. Delineamento Experimental .....</b>	<b>49</b>
4.1.1. Avaliação do tratamento intra-SCP com agonista dos receptores 5HT <sub>1A</sub> (8-OH-DPAT), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	49
4.1.2. Avaliação do tratamento intra-SCP com agonista não seletivo dos receptores 5HT <sub>2B/2C</sub> (mCPP), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	49
4.1.3. Avaliação do tratamento combinado intra-SCP com agonista não seletivo dos receptores 5HT <sub>2B/2C</sub> (mCPP), e antagonista não seletivo para os receptores 5HT <sub>2A/2C</sub> (cetanserina) sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	49
4.1.4. Avaliação do tratamento intra-SCP com agonista dos receptores 5HT <sub>2C</sub> (MK-212), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	50
4.1.5. Avaliação do tratamento intra-SCP com antagonista dos receptores 5HT <sub>2C</sub> (SB 242080) sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	50
<b>4.2. Resultados .....</b>	<b>51</b>
4.2.1. Histologia.....	51
4.2.2. Efeitos do tratamento intra-SCP com agonista dos receptores 5HT <sub>1A</sub> (8-OH-DPAT), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	52
4.2.3. Efeitos do tratamento intra-SCP com agonista não seletivo dos receptores 5HT <sub>2B/2C</sub> (mCPP), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	53
4.2.4. Efeitos do tratamento combinado intra-SCP com agonista não seletivo dos receptores 5HT <sub>2B/2C</sub> (mCPP), e antagonista não seletivo 5HT <sub>2A/2C</sub> (cetanserina) sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	54
4.2.5. Efeitos do tratamento intra-SCP do agonista dos receptores 5HT <sub>2C</sub> (MK-212), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	56
4.2.6. Efeitos do tratamento intra-SCP com antagonista dos receptores 5HT <sub>2C</sub> (SB 242080), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE. ....	57
<b>4.3. Discussão .....</b>	<b>58</b>

## **CAPÍTULO 5: EFEITOS DAS INJEÇÕES COMBINADAS DE FLUOXETINA (AGUDA E CRÔNICA) E AGONISTAS E ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> E 5-HT<sub>2C</sub> INTRA-SCP SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO.....61**

<b>5.1. Delineamento Experimental .....</b>	<b>62</b>
5.1.1. Avaliação do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com 8-OH-DPAT (10 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	62
5.1.2. Avaliação do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com MK-212 (0,63 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	62
5.1.3. Avaliação do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com 8-OHDPAT (10 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	63
5.1.4. Avaliação do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com MK-212 (0.63 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	63
5.1.5. Avaliação do tratamento combinado intra-SCP com SB 242080 (0.1 nmol) e MK-212 (0.63 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	63

5.1.6. Avaliação do tratamento combinado de SB 242080 (0.1 nmol) e 8-OHDPAT (10 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	64
<b>5.2. Resultados .....</b>	<b>64</b>
5.2.1. Histologia.....	64
5.2.2. Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	66
5.2.3. Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com MK-212 (0,63 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	67
5.2.4. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	69
5.2.5. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com MK-212 (0,63 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	70
5.2.6. Efeitos do tratamento combinado intra-SCP com SB 242080 (0.1 nmol) e MK-212 (0.63 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	71
5.1.7. Efeitos do tratamento combinado de SB 242080 (0.1 nmol) e 8-OH-DPAT (10 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE. ....	73
<b>5.3. Discussão .....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO 6: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM FLUOXETINA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE SEROTONINA, E DENSIDADE DE PROTEÍNAS PARA OS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> E 5-HT<sub>2C</sub> DA SCP .....</b>	<b>80</b>
<b>6.1. Delineamento Experimental .....</b>	<b>81</b>
6.1.1. Avaliação do tratamento crônico (21 dias) com salina e fluoxetina (5,0, 10 e 20 mg/kg, s.c), sobre as concentrações de serotonina, seu metabólito e turnover na SCP. ....	81
6.1.2. Avaliação do tratamento crônico (21 dias) com fluoxetina (5,0 e 20 mg/kg, s.c), sobre a densidade de proteínas para os receptores 5-HT <sub>1A</sub> e 5-HT <sub>2C</sub> na SCP. ....	81
<b>6.2. Resultados .....</b>	<b>82</b>
6.2.1. Efeito do tratamento crônico (21 dias) com salina e fluoxetina (5,0, 10 e 20 mg/kg, s.c), sobre a concentração de serotonina, o metabólito (5-HIAA) e turnover na SCP. ....	82
6.2.2. Efeito do tratamento crônico (21 dias) com fluoxetina (5,0 e 20 mg/kg, s.c), sobre a densidade de proteínas para os receptores 5-HT <sub>1A</sub> e 5-HT <sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal. ....	84
<b>6.3. Discussão .....</b>	<b>86</b>
<b>CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE 2.....</b>	<b>113</b>



## RESUMO

A dor é uma experiência universal, e frequentemente acompanha quadros de ansiedade e depressão. Alguns tipos específicos de fármacos utilizados no tratamento da depressão e ansiedade são também empregados como analgésicos. Há evidências mostrando que a exposição a situações ameaçadoras podem resultar em inibição da dor. Desta forma, pesquisas que envolvem dor e ansiedade frequentemente empregam modelos animais como instrumentos para a seleção de potenciais agentes terapêuticos, e para investigações acerca da neurobiologia das emoções. Diante destas evidências, esse estudo investigou os efeitos: do tratamento agudo e crônico de fluoxetina; tratamento intra-substância cinzenta periaquedutal (SCP) com agonistas serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> e administração combinada destes fármacos sobre a antinocicepção induzida pelo confinamento ao braço aberto (BA) do labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, investigamos os efeitos do tratamento crônico com fluoxetina sobre os níveis de serotonina, 5-HIAA e de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> da SCP. Nossos resultados demonstraram que: (I) o tratamento agudo com fluoxetina, na dose de 20 mg/kg, foi capaz de aumentar a antinocicepção induzida pelos BA's do LCE; (II) o tratamento crônico (21 dias) com fluoxetina (20 mg/kg) aumentou a antinocicepção induzida pelo ambiente aversivo, e diminuiu o número de contorções dos animais confinados no braço fechado, o que caracteriza um efeito analgésico; (III) a administração intra-SCP do agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (8-OHDPAT); não alterou o número de contorções nos animais confinados nos braços do LCE; (IV) as infusões intra-SCP de agonistas dos receptores 5HT<sub>2C</sub> (mCPP e MK-212), acentuaram a antinocicepção nos animais confinados no BA; (V) o bloqueio dos receptores 5HT<sub>2C</sub> localizados na SCP, através de injeções do antagonista SB 242080, foi capaz de reverter completamente a antinocicepção induzida pelo BA do LCE; (VI) a administração combinada de fluoxetina (aguda) e 8-OH-DPAT intra-SCP, bloqueou a antinocicepção induzida pelo confinamento ao

BA; (VII) a administração combinada de fluoxetina (aguda) e MK-212 intra-SCP reverteu o aumento da antinocicepção observada com a injeção isolada de MK-212; (VIII) a administração combinada de fluoxetina (crônica) e 8-OH-DPAT intra-SCP bloqueou a antinocicepção induzida pelo confinamento ao BA; (IX) o tratamento combinado com fluoxetina (crônica) e MK-212 intra-SCP prejudicou o aumento da antinocicepção observada com a injeção isolada de MK-212; (X) o tratamento crônico com fluoxetina não foi capaz de alterar os níveis de serotonina, 5-HIAA e “turnover” da serotonina na SCP; (XI) o tratamento crônico com fluoxetina promoveu um aumento nos níveis de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> localizados na SCP. Estes achados sugerem que a antinocicepção induzida pelos BA's do LCE é médiada pelos receptores 5-HT<sub>2C</sub> localizados na SCP. Além disso, a fluoxetina é capaz de interagir com este subtipo de receptor serotoninérgico promovendo alterações funcionais (tratamento agudo) e quantitativas (tratamento crônico) sobre os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> localizados na SCP.

**Palavras-Chave:** Antinocicepção induzida pelo medo. Labirinto em cruz elevado. Serotonina. Fluoxetina. Receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub>. Substância Cinzenta Periaquedutal. Teste de contorções. Camundongos.

## **ABSTRACT**

The pain is an universal experience, and frequently follows anxiety and depression cases. Some specific drugs used in depression and anxiety treatment are also used for the relief of pain. There are evidences showing that exposure to threatening situations can result in pain inhibition. In this way, studies involving pain and anxiety use animal models as tools for potential therapeutic agents screening as well as for enhance the knowledge about the neurobiology of emotions. This study investigated the following effects: acute and chronic fluoxetine treatment; microinjections of 5-HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2C</sub> receptors agonists intra-periaqueductal gray matter (PAG), and the administration combined of these drugs on antinociception induced by the open arms (OAA) of the elevated plus maze (EPM). Furthermore, we investigated the effects of fluoxetine chronic treatment on serotonin, 5-HIAA, 5-HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2C</sub> receptors levels within PAG. Our results showed that: (I) fluoxetine acute treatment (20 mg/kg) was able to increase the OAA; (II) fluoxetine chronic treatment (21 days) (20 mg/kg) also enhances the OAA, and decreased the number of writhes on animal confined in the enclosed arm, featuring an analgesic effect; (III) the administration of 8-OH-DPAT (5-HT<sub>1A</sub> agonist) intra-PAG did not change the number of writhes in animals confined in the arms of the EPM; (IV) the infusions of mCPP and MK-212 (5HT<sub>2C</sub> agonists) intra-PAG increased the OAA. (V) The blockade of 5HT<sub>2C</sub> receptors located in the PAG by SB 242080 injection (5HT<sub>2C</sub> antagonist) was able to completely reverse the OAA; (VI) the combined administration of fluoxetine (acute treatment) and 8-OH-DPAT intra-PAG also blocked completely the OAA; (VII) the combined administration of fluoxetine (acute treatment) and MK-212 intra-PAG reversed the increase of OAA observed with MK-212 injection; (VII) combined administration of fluoxetine (chronic treatment) and 8-OH-DPAT intra-SCP once more blocked OAA; (IX) the fluoxetine (chronic treatment) + MK-212 intra-PAG, impairs the OAA increase observed with isolated MK-212 injection; (X) fluoxetine chronic treatment was not capable to change the serotonin,

5-HIAA levels, and serotonin turnover in the PAG (XI) fluoxetine chronic treatment promoted up-regulation of 5-HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2C</sub> receptors within PAG. These findings suggest that OAA is mediated by 5-HT<sub>2C</sub> receptors located in the PAG. Furthermore, fluoxetine was capable to interact with this serotonergic receptor promoting functional (acute treatment) and quantitative (chronic treatment) changes on 5-HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2C</sub> receptors within PAG.

**Keywords:** Antinociception induced by fear. Elevated Plus-Maze. Serotonin. Fluoxetine. 5-HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2C</sub> receptors. Periaqueductal Gray Matter. Writthing test. Mice.

## *Lista de Ilustrações*

**Figura 1:** Efeito das injeções subcutâneas de fluoxetina administrada em camundongos confinados aos braços do LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \**P* < 0,05 comparado ao grupo controle (salina).....44

**Figura 2:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=8-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle (salina).....45

**Figura 3:** Representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (2001). Os pontos em cinza (olhar ponta das setas) representam os animais que tiveram canulação positiva, os pontos pretos representam aqueles canulados fora da SCP. O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição.....52

**Figura 4:** Efeito do 8-OH-DPAT, administrado intra-SCP em camundongos reexpostos ao LCE (n=11-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado (BF).....53

**Figura 5:** Efeito do tratamento intra-SCP de mCPP sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=9-13). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle (veículo).....54

**Figura 6:** Efeito de injeções combinadas de mCPP + cetanserina, administrado intra-SCP em camundongos reexpostos ao LCE (n=6-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado (BF). \**P* < 0,05 comparado ao grupo controle <sup>1</sup>*P* < 0,05 comparado ao grupo veículo + mCPP.....55

**Figura 7:** Efeito do MK-212, administrado intra-SCP em camundongos reexpostos ao LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado (BF). \**P* < 0,05 comparado ao grupo controle.....56

**Figura 8:** Efeito do SB 242080, administrado intra-SCP em camundongos reexpostos ao LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado (BF). \**P* < 0,05 comparado ao grupo controle.....57

**Figura 9:** Fotomicrografia ilustrando o sítio de microinjeção (seta) intra-SCP. SCPdm: substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; SCPdl: substância cinzenta periaquedutal dorsolateral; SCPl: substância cinzenta periaquedutal lateral; SCPvl: substância cinzenta periaquedutal ventrolateral.....66



**Figura 10:** Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mk/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-SCP de 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle. <sup>1</sup>*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+8-OH-DPAT.....67

**Figura 11:** Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mk/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-SCP de MK-212 (0,63 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=8-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle. <sup>1</sup>*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+MK-212.....68

**Figura 12:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 mk/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-SCP de 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle. <sup>1</sup>*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+8-OH-DPAT.....70

**Figura 13:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 mk/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-SCP de MK-212 (0,63 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle.....71

Figura 14. Efeito do tratamento combinado intra-SCP com SB 242080 (0,1 nmol) e MK-212 (0,63 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado.\**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle <sup>1</sup>*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+MK-212.....72

Figura 15. Efeito do tratamento combinado intra-SCP com SB 242080 (0,1 nmol) e 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado.\**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle <sup>1</sup>*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo salina+8-OH-DPAT.....74

**Figura 16:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre os níveis de serotonina da SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=8-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) da quantidade de serotonina em nanogramas por tecido.....82

**Figura 17:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre os níveis de 5-HIAA da SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=8-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) da quantidade de 5-HIAA em nanogramas por tecido. #*P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \**P* < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle (salina).....83

**Figura 18:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre o turnover de serotonina da SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=8-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do turnover de serotonina.....84

**Figura 19:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, e 20 mg/kg, s.c) sobre a densidade dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da substância cinzenta periaquedutal em camundongos (n=6-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) dos níveis de proteínas para o 5-HT<sub>1A</sub>. \**P* < 0,05 comparado ao grupo controle (salina).....85

**Figura 20:** Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 e 20 mg/kg, s.c) sobre a densidade dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal em camundongos (n=6-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) dos níveis de proteínas para o 5-HT<sub>2C</sub>. \**P* < 0,05 comparado ao grupo controle (salina).....86

***CAPITULO 1***  
***INTRODUÇÃO***

## **1.1. Modulação emocional da dor**

A Associação Internacional para o estudo da dor (IASP, International Association for the Study of Pain, 2012), conceitua dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual ou potencial, ou descrita em termos que sugerem tal dano”. Tamanha subjetividade neste conceito se dá pelo fato de a experiência dolorosa ser um processo multidimensional, em que sinais dolorosos podem ser modificados e até mesmo bloqueados nos estágios iniciais da transmissão dos impulsos nociceptivos (BRANDÃO, 2014). Devido a esta subjetividade, foi proposto pela IASP que a dor envolve um estado psicológico frequentemente associado a uma causa física adjacente (IASP, 2012).

A percepção da dor envolve a ativação de vias medulares e supra-medulares, que compreendem regiões encefálicas diretamente envolvidas em processos afetivos e cognitivos. O envolvimento complexo destas vias resultou na divisão do fenômeno da dor em dois componentes: o componente perceptivo-discriminativo e o componente aversivo-cognitivo-motivacional. O primeiro permite identificar o estímulo como nocivo e localizar a região do corpo em que este ocorreu, enquanto que o componente aversivo-cognitivo-motivacional inclui uma maior variedade de respostas, desde a retirada reflexa da região lesada a respostas emocionais mais complexas, incluindo aquelas que envolvem aprendizagem e memória (BRANDÃO, 2004).

A dor possui uma estreita relação com as reações comportamentais defensivas. Ambas interagem fortemente nos planos evolutivo, neuroquímico e psicofisiológico. Neste sentido, a dor provocada por um estímulo lesivo tem a função de ativar os circuitos neurais responsáveis pelos comportamentos defensivos com o objetivo de preservar a espécie, evitando assim, o contato com estímulos que possam lhes causar dano ou injúria tecidual (BRANDÃO, 2004). Entretanto, apesar da dor ser uma das características

mais importantes para a manutenção da vida, quando um animal é confrontado com uma ameaça a sua integridade física ou sobrevivência, além de exibir respostas comportamentais (fuga, luta, congelamento, vocalização) e neurovegetativas (taquicardia, hipertensão e defecação) também apresenta diminuição da sensibilidade dolorosa ou antinocicepção (LEWIS, 1986; RODGERS e RANDALL, 1986).

Neste sentido, há evidências sugestivas de que estados emocionais aversivos (ex., situações de medo) são capazes de inibir a dor. Estas evidências foram intensamente investigadas por Bolles e Fanselow (1980), que sugeriram que esta inibição está relacionada à ativação de mecanismos analgésicos endógenos (ex. via liberação de peptídeos opioides endógenos), uma vez que os estímulos nociceptivos normalmente promovem um conjunto de reflexos de retirada, fuga, repouso e outros comportamentos recuperativos. Assim, mediante situações aversivas, a antinocicepção apresenta claro valor adaptativo, pois permite ao animal exibir reações defensivas, tais como congelamento, luta e fuga, mesmo que uma injúria tenha ocorrido, aumentando suas chances de sobrevivência (BOLLES e FANSELOW, 1980).

A antinocicepção pode ser evocada por estímulos que predizem o perigo aprendido ou inato. Neste sentido, Rodgers e Randall (1986) demonstraram que camundongos colocados num ambiente onde haviam sido previamente atacados por coespecíficos apresentavam analgesia condicionada. Por outro lado, a antinocicepção induzida por estímulos inatos de perigo pode ser evidenciada quando o animal é exposto a um predador (KAVALIERS, 1988; LESTER e FANSELOW, 1985), ou a um ambiente desconhecido (NETTO *et al.*, 1987; TORRES *et al.*, 2001).

O curso temporal da antinocicepção induzida pelo estresse pode durar de minutos a horas, dependendo do tipo de agente, sua severidade e os métodos utilizados para avaliar a nocicepção. Desta forma, exposições repetidas ao mesmo agente estressante podem levar ao declínio progressivo da resposta antinociceptiva, revelando que este fenômeno é

suscetível à tolerância (LE BARS *et al.*, 2001). Neste sentido, modelos experimentais bem empregados podem ajudar a elucidar mecanismos relacionados à nocicepção e aos comportamentos defensivos.

## **1.2. Modelos Animais**

Respeitando-se as limitações, os modelos animais são empregados com o objetivo de esclarecer os mecanismos da neurobiologia da dor e da ansiedade. Este entendimento pode ocorrer pela análise das bases neurais do comportamento animal, em que alguns mecanismos importantes mostram-se similares aos da espécie humana, conforme descrito por Charles Darwin em 1872 APUD ZANGROSSI JUNIOR (2004). Neste sentido, são necessários esclarecimentos mais precisos acerca dos processos da antinocicepção induzida pelo medo, com a finalidade de desenvolver drogas analgésicas que possam ser mais eficazes no tratamento de dor em humanos (FRASER e HARRIS, 1967; SHIH *et al.*, 2008).

Na tentativa de elucidar os mecanismos relacionados à antinocicepção induzida por estímulos ambientais, vários testes têm utilizado ferramentas que desencadeiam respostas de medo e antinocicepção (CANTO DE SOUZA *et al.*, 1997; KAVALIERS, 1988; KELLY, 1982; RODGERS e HENDRIE, 1983; RODGERS e RANDALL, 1986; TERMAN *et al.*, 1984). Neste sentido, um dos modelos amplamente utilizados para avaliação da ansiedade em roedores é o labirinto em cruz elevado (LCE) (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Este modelo foi validado para ratos por Handley e Mithani (1984) e Pellow e colaboradores (1985), e para camundongos por Lister (1987).

O LCE se baseia na aversão natural que roedores têm aos espaços abertos e envolve o estudo dos padrões exploratórios em um labirinto simples, compreendendo quatro braços, dos quais dois têm paredes (braços fechados - BF) e dois não (braços abertos - BA)

(CRUZ *et al.*, 1994; FILE, 1992; LISTER, 1987). Ao lado das respostas fisiológicas e comportamentais defensivas, estudos anteriores demonstraram que a exposição de camundongos e ratos ao LCE também induz antinocicepção (BAPTISTA *et al.*, 2009; BAPTISTA *et al.*, 2012; CONCEICAO *et al.*, 1992; CORNELIO e NUNES-DE-SOUZA, 2009; LEE e RODGERS, 1990; MENDES-GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2009; 2005; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2000).

Neste paradigma, Lee e Rodgers (1990) e Nunes-de-Souza (2000) demonstraram que a exposição de camundongos ao LCE elicia reações comportamentais defensivas e produz antinocicepção avaliada pelo teste da retirada da cauda (*tail-flick test*) e pelo teste de contorções, respectivamente. Esses autores observaram que a analgesia induzida pela exposição ao labirinto não é revertida pelo pré-tratamento com opioides, o que sugere um envolvimento de mecanismos não-opioides. Entretanto, pode ser bloqueada pelo pré-tratamento com ansiolíticos com ação em receptores benzodiazepínicos (RODGERS *et al.*, 1992) e serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub>) (LEE e RODGERS, 1991).

Embora os braços abertos do LCE sejam a principal fonte de ameaça eliciadora de antinocicepção, o emprego do confinamento em cada compartimento do aparelho dificulta a avaliação da relação entre ansiedade e antinocicepção. O confinamento em um dos braços do aparato configura uma situação inescapável, pois não permite ao animal fugir do ambiente aversivo (braços abertos), podendo assim desencadear a ativação de mecanismos de defesa diferentes daqueles envolvidos na exploração total do LCE.

Outro aspecto relevante a ser levantado acerca da exposição de animais a ambientes estressores é que estes são capazes de eliciar uma série de respostas denominadas como “respostas ao estresse”, que são compostas por alterações comportamentais, ativação autonômica e secreção de hormônios adrenocorticotróficos (ACTH) e cortisol/corticoesterona (CARRASCO e VAN DE KAR, 2003; VAN DE KAR e BLAIR, 1999). Sob este aspecto, tem sido demonstrado que as respostas relacionadas à nocicepção

podem ser moduladas pela corticoesterona (BOGDANOV e IARUSHKINA, 2003; BOGDANOV e YARUSHKINA, 2000).

Mendes-Gomes e colaboradores (2011) avaliaram os níveis de corticoesterona em camundongos submetidos ao teste de formalina e expostos ao LCE modificado com quatro braços abertos. Os autores demonstraram que tanto o estímulo nociceptivo quanto a exposição do animal ao LCE aberto aumentam os níveis de corticoesterona. Entretanto, a adrenalectomia não altera a resposta de antinocicepção induzida pelo medo, indicando que a corticoesterona não está envolvida na modulação deste tipo de antinocicepção.

O modelo utilizado neste trabalho para induzir nocicepção foi inicialmente empregado por Vanderwende e Margolin (1956) e permite mensurar a dor através do registro do número de contorções abdominais induzidas por estímulos químicos. Por se tratar de um estímulo nociceptivo inescapável, o teste de contorções abdominais permite avaliar a nocicepção em concomitância a exposição do animal a um ambiente potencialmente aversivo. Desta forma, pode-se investigar a influência do ambiente na resposta nociceptiva.

A resposta nociceptiva pode ser induzida por vários testes (BUTLER e FINN, 2009; LE BARS *et al.*, 2001), entre eles a aplicação de substâncias irritantes no peritônio de roedores, pois é sensível ao tratamento com agonistas de receptores opióides  $\mu$  ( $\mu$ ) e  $\kappa$  (capa) (ABBOTT e FRANKLIN, 1986; TYERS, 1980). A administração de ácido acético no peritônio de camundongos provoca uma dor profunda induzida via nociceptores presentes na região. A ativação destes nociceptores leva a liberação de mediadores como as prostaglandinas que contribuem para a sensibilização da transmissão nociceptiva (GAWADE, 2012).



### 1.3. Substrato Neural da Antinociceção

Grande parte dos neurônios envolvidos na modulação da informação dolorosa pertence a áreas filogeneticamente antigas, como as paredes mediais e caudais do terceiro ventrículo, o tálamo, o hipotálamo e núcleos da formação reticular do tronco encefálico (MILLAN, 1999). A participação destas regiões mais antigas do ponto de vista evolutivo, na recepção e condução da informação nociceptiva e no controle ou inibição da dor, sugere que compartilhamos esta propriedade com muitas espécies animais.

As principais vias ascendentes da condução dolorosa até estruturas superiores do sistema nervoso central (SNC) são identificadas como paleoespinalâmica, cuja estimulação leva a forte conotação afetiva da dor (sofrimento), motivando reações defensivas, e a via neoespinalâmica, apresenta velocidade de condução mais rápida, projetando-se para o tálamo ventral póstero-lateral e córtex sensorial somático I e II (WILLIS, 1979).

Do tálamo os impulsos nociceptivos são conduzidos diferentes regiões corticais ( área SI do giro pós-central, área II somatossensorial, várias regiões do córtex parietal inferior e anterior, córtex insular, córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal medial (BORNHOVD *et al.*, 2002; BOURNE *et al.*, 2014). Demonstrando a existência de um padrão complexo de inervação múltipla direta e indireta do tálamo, mesencéfalo, córtex, formação reticular e outras estruturas encefálicas através de múltiplas vias ascendentes. Essas regiões supraespinais são extensivamente interligadas e também interagem com mecanismos de modulação descendente direcionados ao corno dorsal (BUSHNELL *et al.*, 2013; NEUGEBAUER *et al.*, 2009)

As primeiras evidências relacionadas a um sistema inibitório da nociceção baseia-se no que conhecemos como; “modelo da comporta” da percepção da dor, proposto por Ronald Melzack e Patrick Wall, (1965). Estes pesquisadores destacam dois aspectos na

percepção da dor: primeiro, a dor depende do somatório da estimulação sensorial e não apenas da descarga de receptores especializados; segundo, a sensação da dor está sujeita a um intenso controle central que influencia a entrada de impulsos dolorosos no corno dorsal da medula. Tendo em vista que neste período havia poucas evidências acerca do controle descendente da nocicepção, posteriormente foi descrito que neurônios do tronco encefálico são capazes de inibir tonicamente os neurônios nociceptivos na medula espinal, e a este sistema foi dado o nome de “Teoria da Comporta”.

Posteriormente Reynolds (1969) demonstrou a existência de um sistema descendente capaz de modular a nocicepção. Foi demonstrado que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP) é capaz de induzir analgesia. A ativação dessa estrutura mesencefálica inibe respostas comportamentais relacionadas à estimulação nociva. A supressão seletiva da dor permite ao organismo responder de maneira apropriada à situação ameaçadora sem a distração ou respostas motoras concorrentes que são evocadas pelo impulso nociceptivo (BRANDÃO, 2004).

A SCP e o núcleo magno da rafe (NMR) exercem um papel crucial na via inibitória descendente, a qual é um importante sítio de ação dos opióides (HUNT, 2005). A SCP recebe também aferências de neurônios que conduzem informações nociceptivas oriundas da medula espinal e envia projeções para núcleos talâmicos que processam a dor, mantendo ainda relações recíprocas com estruturas límbicas como a amígdala. A exemplo dessa relação, Behbehani (1995) demonstrou que lesões na SCP alteram o estado de medo e ansiedade produzidos por estimulação elétrica ou química da amígdala.

Posteriormente, foi demonstrado que a SCP faz parte de um circuito do sistema nervoso central que controla a transmissão nociceptiva na medula espinal. Nesse circuito, um sistema amplamente investigado é aquele que envolve a conexão da SCP com o bulbo rostral ventromedial (RVM), que, por sua vez, envia projeções para a medula espinal (BEHBEHANI, 1995; HEINRICHER *et al.*, 2009a).

Acerca da modulação do controle da dor na medula espinal, estudos demonstram que projeções serotoninérgicas e opioidérgicas originadas principalmente do NMR descendem via funículo dorsolateral e chegam ao corno dorsal da medula espinal. Além disso, fibras noradrenérgicas provenientes do *locus coeruleus* também exercem modulação inibitória sobre a nocicepção no corno dorsal da medula através da atuação em receptores  $\alpha 2$  adrenérgicos (MILLAN, 2002).

Além do sistema inibitório descendente da dor, nos últimos anos crescem as evidências que demonstram a existência de um sistema facilitatório da nocicepção. Portanto, o sistema modulador parece exercer um controle bidirecional, de modo que essa via é prontamente recrutada para suprimir respostas a estímulos nociceptivos em circunstâncias caracterizadas por ameaça de injúria ou de extremo estresse (BOLLES e FANSELOW, 1980). Além disso, esse sistema também contribui para aumentar a resposta nociceptiva em uma variedade de condições, incluindo a estimulação nociva prolongada, inflamação, injúria de nervos e retirada aguda de opióides. Frequentemente são as mesmas estruturas (p.ex. o RVM) que estão envolvidas na modulação facilitatória e inibitória da dor. Algumas dessas vias são tonicamente ativas, mas o balanço entre inibição e facilitação é dinâmico, e pode ser alterado em diferentes estados comportamentais, emocionais e patológicos (HEINRICHER *et al.*, 2009a).

Esse sistema modulatório, que recebe impulsos diretos e indiretos de vias envolvidas com a transmissão nociceptiva, conecta-se com o hipotálamo e outras estruturas límbicas, e propicia um mecanismo, através do qual, fatores como medo, atenção e expectativa podem regular o processamento da dor. A SCP integra estes impulsos vindos de áreas límbicas e diencefálicas com impulsos ascendentes vindos do corno dorsal da medula espinal, fazendo conexão direta com o feixe espinotalâmico (HEINRICHER *et al.*, 2009a).

Um aspecto interessante relacionado à SCP é que esta é citoarquiteticamente e quimicamente heterogênea e suas subdivisões contribuem diferentemente na modulação da dor. Por exemplo, a porção ventrolateral envia projeções ao RVM e ao tegmento pontino ventrolateral e dorsolateral (*locus coeruleus*). Já a coluna dorsolateral da SCP não envia projeções diretas ao RVM, mas primeiramente ao tegmento pontino e ao bulbo ventrolateral, uma região crítica para o controle autonômico. A SCP também se projeta rostralmente para o tálamo medial e ao córtex frontal orbital, aumentando as possibilidades da existência de controle ascendente da nocicepção (BANDLER e SHIPLEY, 1994; DEPAULIS *et al.*, 1989; FIELDS, 2006).

Resumidamente as descrições apontadas acima descreveram que as informações nociceptivas que ascendem na medula espinal ativam a substância cinzenta periaquedutal que, por sua vez, enviam impulsos inibitórios descendentes via núcleo magno da rafe até a medula espinal, onde exercem um controle inibitório sobre a atividade das células transmissoras da dor (BRANDÃO, 2004).

#### **1.4. Bases Neuroquímicas da Antinocicepção**

Embora já tenha sido demonstrada que a antinocicepção induzida pelo medo resulte em uma inibição das respostas nociceptivas de alta magnitude, os mecanismos envolvidos na modulação desta resposta ainda são poucos conhecidos. Um dos grandes avanços no estudo da modulação da nocicepção ocorreu com a descoberta de receptores opióides no SNC através de pesquisas desenvolvidas independentemente por S. H. Snyder (1973), nos EUA, e L. Terenius (1973), na Suécia. Estes autores mostraram, em estudos independentes, que drogas opióides, como por exemplo, a morfina é capaz de ligar-se de forma estereoespecífica aos receptores opióides

Neste sentido, estudos de mapeamento de receptores opióides no sistema nervoso central mostram uma ampla distribuição ao longo de sistemas neuronais que conduzem e integram informações dolorosas, como estruturas do sistema límbico e a SCP (BRANDÃO, 2004). Dada a participação desses sistemas na modulação de estados emocionais, evidências tem demonstrado que as respostas relacionadas à antinociceção induzida pelo medo envolveriam modulação não-opióide. Sendo este comportamento defensivo mediado por receptores GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínicos e/ou serotoninérgicos.

## 1.5. Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é um neurotransmissor que desempenha um grande número de funções cerebrais (BRODIE e SHORE, 1957; GORDON e HEN, 2004; RAYMOND *et al.*, 2001). Dentre estas funções, é de grande interesse esclarecer seu papel na modulação dos comportamentos emocionais, tendo sido bem descrito o papel dual da 5-HT na ansiedade (DEAKIN e GRAEFF, 1991). Segundo estes autores, a serotonina pode atuar facilitando o comportamento defensivo, ou inibindo-o, dependendo dos sítios e dos subtipos de receptores serotoninérgicos que atuam no sistema nervoso central.

Os receptores serotoninérgicos são divididos em 7 famílias, sendo ainda subdivididos em 14 subtipos (5-H<sub>1A</sub>, 5-H<sub>1B</sub>, 5-H<sub>1D</sub>, 5-H<sub>1E</sub>, 5-H<sub>1F</sub>, 5-H<sub>2A</sub>, 5-H<sub>2B</sub>, 5-H<sub>2C</sub>, 5-H<sub>3</sub>, 5-H<sub>4</sub>, 5-H<sub>5A</sub>, 5-H<sub>5B</sub>, 5-H<sub>6</sub>, e 5-H<sub>7</sub>) (BARNES e SHARP, 1999). Assim como na modulação da ansiedade, os estudos sobre o papel da serotonina na modulação da dor são marcados por resultados inconsistentes (SOMMER, 2006; 2004). Provavelmente isso se deva à complexidade das vias serotoninérgicas, diferentes estruturas do SNC e/ou diferenças nos aspectos metodológicos empregados em diferentes estudos, como a natureza do estímulo

nociceptivo aplicado e a via de administração ou dose da droga utilizada (BARDIN *et al.*, 2000).

Alguns resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa têm demonstrado o complexo papel da serotonina na modulação das respostas defensivas em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado, após administração de agonistas e antagonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> em diferentes estruturas do SNC (CANTO-DE-SOUZA *et al.*, 2002; CORNELIO e NUNES-DE-SOUZA, 2007; GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2009; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2002; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2008).

Mais recentemente, foi demonstrado que a infusão central de agonistas de receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2A</sub> *per se* é capaz de produzir efeitos ansiolíticos em ratos avaliados no labirinto em T-elevado (LTE) (SOARES e ZANGROSSI, 2009), um modelo animal utilizado para avaliar respostas relacionadas à ansiedade e ao pânico (CARVALHO-NETTO e NUNES-DE-SOUZA, 2004; ZANGROSSI e GRAEFF, 2014). Assim como, em estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, as microinjeções de agonistas de receptores 5-HT<sub>2B/2C</sub> (NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2008) e 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> (GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2009) na SCP, produziram efeito ansiolítico em camundongos avaliados no LCE. Tais resultados confirmam o papel dos receptores 5HT<sub>1</sub> e 5HT<sub>2</sub> da SCP na modulação do comportamento emocional.

Neste sentido, buscando avaliar o papel da serotonina em receptores 5-HT<sub>1A</sub> da amígdala sobre a antinocicepção induzida pela exposição ao LCE, Nunes-de-Souza e colaboradores (2000) observaram que a microinjeção de 8-OH-DPAT (agonista 5-HT<sub>1A</sub>) nesta estrutura provocou efeitos ansiogênicos, porém não atenuou a resposta antinociceptiva em camundongos confinados aos braços abertos do LCE, sugerindo uma dissociação dos mecanismos que modulam a ansiedade daqueles envolvidos no controle da nocicepção no complexo amidalóide.

Os corpos celulares dos neurônios serotoninérgicos estão localizados principalmente nos núcleos dorsal e mediano da rafe (AZMITIA, 2007). Tendo em vista que a SCP recebe uma extensa inervação de fibras destes núcleos (VERTES *et al.*, 1999), existem evidências sugestivas de que neurônios serotoninérgicos, localizados nas porções dorsal e ventral desta estrutura mesencefálica, são ativados na geração de comportamentos defensivos (BRANDAO *et al.*, 2008; GRAEFF, 2003). Especificamente, diversos trabalhos demonstraram que a analgesia induzida pela estimulação elétrica da SCP provém de áreas com grande concentração de receptores serotoninérgicos (BRANDAO *et al.*, 1999; COIMBRA e BRANDAO, 1997; LOHOF *et al.*, 1987).

Neste sentido, estudos mais recentes que envolvem técnicas imunohistoquímicas também indicam uma atuação direta de núcleos serotoninérgicos do teto mesencefálico, tais como colículos superiores e inferiores e porção dorsal da substância cinzenta periaquedutal no sistema descendente inibitório da dor (COIMBRA *et al.*, 2006). Em conjunto, tais achados enfatizam a participação de mecanismos localizados nestes núcleos na mediação de comportamentos defensivos e antinocicepção.

Além do já descrito papel da transmissão serotoninérgica da SCP sobre a nocicepção (Coimbra *et al.*, 1997; Brandão *et al.*, 1999), resultados consistentes da literatura também demonstraram a atuação dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>1</sub> e 5HT<sub>2</sub>, localizados nesta mesma estrutura, na antinocicepção avaliada em diferentes paradigmas (CANTO DE SOUZA *et al.*, 1997; DE LUCA-VINHAS *et al.*, 2006; DE LUCA *et al.*, 2003). *Entretanto, o papel dos receptores 5HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> localizados na substância cinzenta periaquedutal sobre a antinocicepção promovida pelo confinamento aos braços abertos do LCE permanece desconhecido.*

Alterações na neurotransmissão serotoninérgica também são obtidas com a utilização de inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), tendo sido descritos como os mais frequentemente empregados para o tratamento de transtornos como depressão

e ansiedade (HOMBERG *et al.*, 2010; HYTTEL, 1994; NASH e HACK, 2002). O mecanismo de ação destes fármacos envolve o acúmulo dos níveis de serotonina nos espaços extracelulares, devido ao bloqueio de sua recaptação. A latência prolongada descrita para o início dos efeitos antidepressivos dos ISRS's está relacionada a alterações na transcrição gênica e mecanismos de plasticidade neuronal (KRISHNAN e NESTLER, 2008).

Os ISRS são amplamente investigados em respostas relacionadas às emoções (ARGYROPOULOS *et al.*, 2000; KRISHNAN e NESTLER, 2008; NASH e HACK, 2002). O efeito dessa classe de fármacos sobre a ansiedade é caracterizado por resultados diversificados em diferentes modelos animais (ZANGROSSI e GRAEFF, 2014). Curiosamente, os tratamentos agudo e crônico com fluoxetina produziram respostas ansiogênicas em ratos avaliados no LCE (SILVA e BRANDAO, 2000), e este efeito também foi obtido com a administração aguda de sertralina, um outro ISRS, em camundongos avaliados no mesmo aparato (KURT *et al.*, 2000).

Resultados intrigantes também foram observados em recente estudo com uso do LTE. Neste teste, o tratamento agudo com fluoxetina resultou em efeito ansiogênico, porém o tratamento crônico por 15 dias com este mesmo composto apresentou efeito ansiolítico (GOMES *et al.*, 2009), sugerindo que a administração prolongada com este ISRS deve levar a neuroadaptações que sustentam o efeito ansiolítico do agonista serotoninérgico.

A utilização destes fármacos no tratamento de diversas síndromes dolorosas se dá uma vez que, a depressão é um sintoma frequente em pacientes com dor crônica, o que indica que esses estados possuem alguns mecanismos bioquímicos em comum (BLACKBURN-MUNRO e BLACKBURN-MUNRO, 2001; SUZUKI *et al.*, 2004). Contudo, em estudos anteriores observou-se que antidepressivos também causam analgesia em pacientes com dor crônica sem depressão, indicando que os efeitos analgésico e antidepressivo podem ocorrer independentemente (MICO *et al.*, 2006). Embora evidências indiquem que a analgesia induzida por essas drogas sejam resultado de sua ação no sistema



nervoso central, também há descrições consistentes de sítios de ação no sistema periférico (SAWYNOK, 2003; SINGH *et al.*, 2001).

Neste sentido, foi demonstrado efeito antinociceptivo promovido pela administração de fluoxetina em ratos e camundongos avaliados no teste de retirada da cauda “tail-flick test” e teste de contorções abdominais (PEDERSEN *et al.*, 2005). Além disso, em outros modelos de avaliação da nocicepção o tratamento com fluoxetina também promoveu um aumento dose-dependente da antinocicepção (SCHREIBER e PICK, 2006).

Na clínica, tanto os quadros de depressão como de ansiedade interferem na percepção da dor. Hipoteticamente, a redução do estímulo aversivo produziria um aumento na sensação dolorosa, entretanto observa-se o amplo uso de uma variedade de medicamentos antidepressivos e ansiolíticos associados com a redução do quadro álgico (MCCLEANE, 2008; SALERNO *et al.*, 2002; TOMKINS *et al.*, 2001). *Neste sentido, a redução da resposta a estímulos dolorosos estaria associada à ausência de ansiedade? Ou a serotonina modularia independentemente estas respostas?*

Interessante aspecto relacionado aos efeitos terapêuticos dos ISRS envolve sua ação em subtipos de receptores serotoninérgicos. Neste sentido, estudos recentes, têm demonstrado ações da fluoxetina sobre a atividade dos receptores 5HT<sub>1A</sub> (DESCARRIES e RIAD, 2012; SUBHASH *et al.*, 2000) e 5-HT<sub>2C</sub> (DREMENCOV *et al.*, 2006; MONGEAU *et al.*, 2010) após a administração aguda e crônica destes fármacos.

Acerca desta interação, Zanoveli e colaboradores (2007; 2010) demonstraram que a resposta ansiolítica observada após a administração crônica de fluoxetina e sertralina foi acentuada com infusões intra-SCP de 8-OH-DPAT. Estes resultados sugeriram que a ocorrência de mudanças adaptativas nos receptores 5HT<sub>1A</sub> podem resultar no aumento de sua reatividade. Efeitos semelhantes foram encontrados com a resposta panicolítica provocada pela administração crônica e sub-crônica de fluoxetina, associado ao tratamento intra-SCP do agonista 5-HT<sub>2A</sub> (DOI), no modelo de estimulação elétrica da porção dorsal

desta estrutura mesencefálica, evidenciando que receptores 5-HT<sub>2A</sub> também são sensibilizados na presença desse fármaco (DE BORTOLI *et al.*, 2006).

*Diante das evidências descritas, entendemos ser relevante investigar o papel dos receptores 5HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> da SCP (utilizando agonistas) na facilitação da neurotransmissão serotoninérgica (com a fluoxetina), sobre a antinocicepção induzida pelo confinamento de camundongos aos braços do labirinto em cruz elevado.*

## **OBJETIVOS**

### **Geral:**

Avaliar o papel dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> sobre os efeitos da fluoxetina na antinocicepção induzida pelo confinamento aos braços do labirinto em cruz elevado

### **Específicos:**

Avaliar os efeitos:

- ✓ Do tratamento agudo e crônico com fluoxetina sobre a antinocicepção induzida pelo confinamento de camundongos no braço aberto do LCE;
- ✓ Da administração intra-SCP de agonistas dos receptores; 5-HT<sub>1A</sub> (8-OHDPAT), 5HT<sub>2C</sub> (mCPP e MK-212) e antagonista seletivo 5HT<sub>2C</sub> (SB 242080) sobre a antinocicepção induzida pelo confinamento de camundongos no braço aberto do LCE.
- ✓ Da administração intra-SCP de agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub>, concomitante ao tratamento agudo com fluoxetina sobre a antinocicepção.
- ✓ Da administração intra-SCP de agonistas dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub>, concomitante ao tratamento crônico com fluoxetina sobre a antinocicepção.
- ✓ Do tratamento crônico com fluoxetina sobre: a concentração de 5-HT e seu metabólito, o 5-HIAA (ácido 5-hidróxi-indolacético) e a densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> na SCP.

***CAPÍTULO 2:***  
***MATERIAL E MÉTODOS***

## 2.1. Sujeitos

Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino, machos, pesando 25-35 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar. Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm), mantidos em condições controladas de temperatura ( $23 \pm 1$  °C), umidade ( $55 \pm 5\%$ ), luz (ciclo claro escuro de 12/12horas, luzes acesas às 7:00 e apagadas às 19:00 horas) e livre acesso ao alimento e água.

## 2.2. Cirurgia e Microinjeção

Após anestesia com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), os animais foram submetidos a cirurgia para a implantação intracraniana de cânula-guia(25-gauge) de 7 mm de comprimento sob um ângulo de  $26^\circ$  na substância cinzenta periaquedutal (SCP) com cimento acrílico. As coordenadas estereotáxicas foram: 4,1 mm posterior ao bregma,+1,3 mm lateral a linha média,-1,2 mm ventral à superfície craniana (PAXINOS, 2001).

A ponta da cânula-guia foi posicionada  $\pm 2,0$  mm dorsal à estrutura alvo. Um mandril, o qual foi removido durante o procedimento de injeção, foi inserido dentro da cânula-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir a contaminação. A agulha de injeção(33-gauge) foi inserida dentro da cânula-guia para a injeção das soluções intra-SCP, sendo que o comprimento da mesma ultrapassou 2,0 mm a ponta da cânula-guia.

A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10) a microseringa Hamilton(10 $\mu$ l). Uma bomba de infusão programada para injetar 0,1  $\mu$ l de solução durante um período de 60 segundos. Durante a cirurgia, os animais receberam cetoprofeno (5 mg/kg, i.p.) (LU *et al.*, 2004) e ceftriaxona (4 mg/kg, i.p.) (STEPANOVIC-PETROVIC *et al.*, 2014). Os animais permaneceram em recuperação por 4 a 5 dias após a cirurgia, e posteriormente foram submetidos ao teste comportamental.

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

### **2.3. Labirinto em Cruz Elevado**

O aparato utilizado foi confeccionado em madeira e consiste em dois braços abertos (BA) (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados (BF) (30 x 5 x 15 cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (modificado de LISTER , 1987), com portas removíveis nas entradas dos braços fechados e abertos do aparelho (NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2000), o que possibilita o confinamento do animal ao braço aberto. Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz (8:30-17:00 horas).

### **2.4. Teste Nociceptivo**

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

Durante os experimentos foi realizado o registro do número de contorções abdominais dos sujeitos. Após cada intervalo do confinamento aos BA e BF, os compartimentos foram limpos com álcool a 20% (v/v) e secos com papel toalha. Os animais foram eutanasiados imediatamente após as análises em câmara de CO<sub>2</sub>. Os experimentos

foram filmados por um sistema de filmadora-DVD-televisão, e os resultados coletados foram analisados posteriormente.

## 2.5. Drogas

- Fluoxetina (2,5, 5,0, 10 e 20 mg/kg, s.c.), (Sigma/RBI), diluído em salina (0,9% NaCl), (Singh et al, 2001).

- 8-OH-DPAT: (bromidrato de (±)-8-hidroxi-2-(di-n-propil-amino) tetralina), tetralina hidrobromida; Sigma, (5,6 e 10 nmol) (NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2000).

- mCPP: [(1-(3-chlorofenil)piperazina); Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA; (0.01, 0.03 e 0.1 nmol) (NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2008).

- Cetanserina: [3-[2-[4-(4-fluorobenzoil)-1-piperidinil]etil]-2,4[1H,3H]-quinazolinediona tartrato; Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA, (10 nmol) (NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2008).

- MK-212: 6-cloro-2-(1- piperazinil)-pirazina, Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA; (0.21 e 0.63 nmol) (GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2009).

- SB 242080: 6-cloro-2,3-dihidro-5-metil-N-[6-[(2-metil-3-piridinil)oxi]-3-piridinil]-1H-indol-1-carboxiamida dihidroclorido (0,01, 0,1 e 1) (VICENTE e ZANGROSSI, 2012).

Com exceção da fluoxetina e SB 2420808, as demais drogas foram preparadas em veículo com 10% de Tween 80, e 0,1 µl foi microinjetado intra-SCP.

## 2.6. Histologia

Após o término dos experimentos com injeções intra-SCP, os animais receberam injeção intra-SCP 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 eutanasiados através de uma câmara de CO<sub>2</sub>, seus cérebros removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente sofrerem secções coronais ao

longo do trajeto das cânulas com auxílio de um criostato. As secções foram inspecionadas com o uso de um microscópio e a visualização da dispersão do azul de metileno indicou o local da injeção de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (PAXINOS, 2001).

## **2.7. Quantificação da concentração de serotonina e 5-HIAA da substância cinzenta periaquedutal**

Os animais foram decapitados em guilhotina e seus encéfalos extraídos, congelados por imersão em isopentano e armazenados em freezer à -80°C. Os encéfalos foram colocados em um criostato (Leica CM 1850) e a SCP foi dissecada com agulha de 15 Gauge, utilizando-se para isso as coordenadas do Atlas de Paxinos e Franklin (2001). Os tecidos retirados foram transferidos para tubos de polipropileno e mantidos em gelo seco até seu armazenamento a -80°C .

Para determinação das concentrações de serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidróxi-indol-acético(5-HIAA), as amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,1M, centrifugadas a 1300rpm, 20 minutos, 4°C; 30µL de sobrenadante foi injetado no sistema de cromatografia para quantificação do neurotransmissor e seu metabólito por detecção eletroquímica em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O cromatógrafo (Waters@Alliance) consiste de uma coluna de separação Symmetry C18, 5 mm (250mm x 4,6mm) e fase móvel, em fluxo de 0,8 mL/min, de constituição ácido cítrico (0,05 M), heptano-sulfônico(1,2mM), pH 3,2 e após ajuste do pH o metanol (17%) foi adicionado. A fase móvel foi filtrada e degaseificada por ultrassom. As concentrações de serotonina e metabólito foram expressas em ng/mg de tecido. Como parâmetro de ativação serotoninérgica utilizamos a taxa de renovação (*turnover*) de serotonina. O *turnover* foi calculado através da razão entre metabólito e seu respectivo neurotransmissor (CHI *et al.*, 1999).



## **2.8. Quantificação da densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal**

Os animais foram decapitados sem anestesia em guilhotina e seus encéfalos extraídos. Estes foram lavados e resfriados por imersão em tampão TBS (100 mM de Tris Base; 0,9% de NaCl em água; pH 7,5) em gelo.

Após a lavagem, os encéfalos foram acondicionados em uma matriz de acrílico (Insight®). A matriz consiste em uma base com o formato do encéfalo do camundongo e fissuras no eixo coronal a cada 1,0 mm, por onde lâminas são introduzidas. As fatias do encéfalo feitas na parte superior do colículo superior e na parte inferior do colículo inferior serão retiradas, colocadas em uma lâmina de vidro e dissecadas com o auxílio de uma agulha de 12 Gauge (G) na SCP. Todo o procedimento foi realizado sobre gelo em ambiente refrigerado. O tecido retirado foi colocado em tubos de polipropileno de 2,0 ml e mantido em gelo seco até seu armazenamento a -80°C.

O tecido (SCP) dissecado foi homogeneizado por meio de ondas de ultra-som em tampão contendo 1% SDS. O conteúdo de proteínas nas amostras é determinado utilizando o kit Bio-Rad®. A quantidade de proteína a ser mensurada foi de 20 µg por aplicação. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos com [Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (25%); glicerol (20%); SDS (4%); DTT (3,5%) Azul de Bromofenol 1% (0,1%) água deionizada (qsp 100%). %]. Logo após, foram submetidas à eletroforese por 1h10min a 160V em gel de SDS-poliacrilamida [acrilamida (10%); bisacrilamida (0,27%), SDS (10%)]. No mesmo gel foi adicionado um padrão de peso molecular. Ao final da separação, as proteínas foram transferidas eletroforicamente para uma membrana de nitrocelulose por 2h30min/100 V. Após a transferência, foram deixadas “overnight” numa solução contendo

[TBS (100mM tris-base; 0,9% NaCl e água); leite em pó desnatado (5%); Tween 20 (0,1%)].

Após essa etapa, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo primário anti-5HT<sub>1A</sub> (Santa Cruz) ou anti-5-HT<sub>2C</sub> (Sigma-Aldrich) na diluição 1:4000 e deixadas por 4 h a 4°C. Foram então novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (anti rabbit, Amersham), na diluição 1:4000 por 1 hora. A revelação foi realizada utilizando-se o kit de quimioluminescência ECL-Amersham® e filme Kodak. Após a revelação do filme com as proteínas 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> as membranas foram ressonadas (retirada dos anticorpos até então ligados na membrana) para posterior incubação com  $\beta$ -Actina. Para isso as membranas foram imersas em Tampão de Ressonagem (100mM de mercaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCL; pH 6,7) e incubadas a 50° C por 30 min com agitação a cada 10 min.

Ao final da ressonagem foram lavadas 5X (5 min cada) com TTBS e em seguida incubadas com solução bloqueadora “overnight”. Após essa etapa foram lavadas e incubadas com o anticorpo primário (anti-Actina, Sigma-Aldrich) na diluição 1:200 e deixadas por 4 h a 4°C. As membranas foram então novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário (anti rabbit, Amersham), na diluição 1:200 por 1 hora. Da mesma forma que anteriormente, a revelação foi feita utilizando-se o kit de quimioluminescência ECL-Amersham® e filme Kodak. Após as revelações, foi realizada a etapa de leitura dos filmes, que consiste no escaneamento dos filmes com o auxílio do software LabScan e na quantificação das bandas através do programa ImageQuant. Os dados em densidade ótica, obtidos através do programa ImageQuant, foram convertidos em volume no Microsoft Excel.

## **2.9. Análise Estatística**

Os dados foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) fatorial. Nos casos de significância, a análise foi seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan ou pelo teste  $t$  para amostras independentes. Os valores de  $P$  menores ou iguais a 0,05 foram considerados como significativos.

## **2.10. Ética**

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar (processo nº 040/2009). Além disso, os experimentos seguiram as normas e preceitos especificados pela diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

## ***CAPÍTULO 3:***

# ***OS EFEITOS DA FLUOXETINA SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO***

### **3.1. Delineamento Experimental**

#### **3.3.1. Avaliação do tratamento agudo com Fluoxetina, sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao braço aberto do LCE.**

Os sujeitos receberam injeções subcutâneas de solução salina ou fluoxetina (2,5, 5, 10 ou 20 mg/kg). Após transcorrido o tempo necessário para ação da droga (30 minutos), foi realizada a injeção de ácido acético, 0,6% (i.p.). Os animais receberam injeções com o ácido acético e permaneceram em gaiolas individuais até o início das contorções, e foram imediatamente expostos ao BA ou BF do LCE. Todos os camundongos foram confinados individualmente no LCE por cinco minutos (5').

#### **3.3.2. Avaliação do tratamento crônico com fluoxetina sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao braço aberto do LCE.**

Durante 21 dias os camundongos receberam solução salina ou fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c). No 21º dia, depois de transcorrido o tempo necessário para ação da droga (30 minutos), foi realizado a injeção de ácido acético 0,6% (i.p.). Passados mais 5 minutos da aplicação do estímulo nociceptivo, os camundongos foram submetidos ao protocolo experimental conforme descrito acima.

## 3.2. Resultados

### 3.2.1. Efeitos do tratamento agudo de fluoxetina, sobre a antinociceção em camundongos confinados ao BA do LCE.

A ANOVA de duas vias (local do confinamento x tratamento) mostrou diferença significativa do local do confinamento ( $F_{(1,96)}=121,18$ ,  $P < 0,05$ ), e do tratamento ( $F_{(4,96)}=2,66$ ,  $P < 0,05$ ) e ausência de efeitos na interação entre local do confinamento x tratamento ( $F_{(4,96)}=1,60$ ,  $P > 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no BA apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao BF, independente do tratamento recebido. Os animais tratados com fluoxetina na dose de 20mg/kg, e expostos aos braços abertos do LCE apresentaram menor número de contorções, quando comparados ao grupo controle também expostos ao BA.

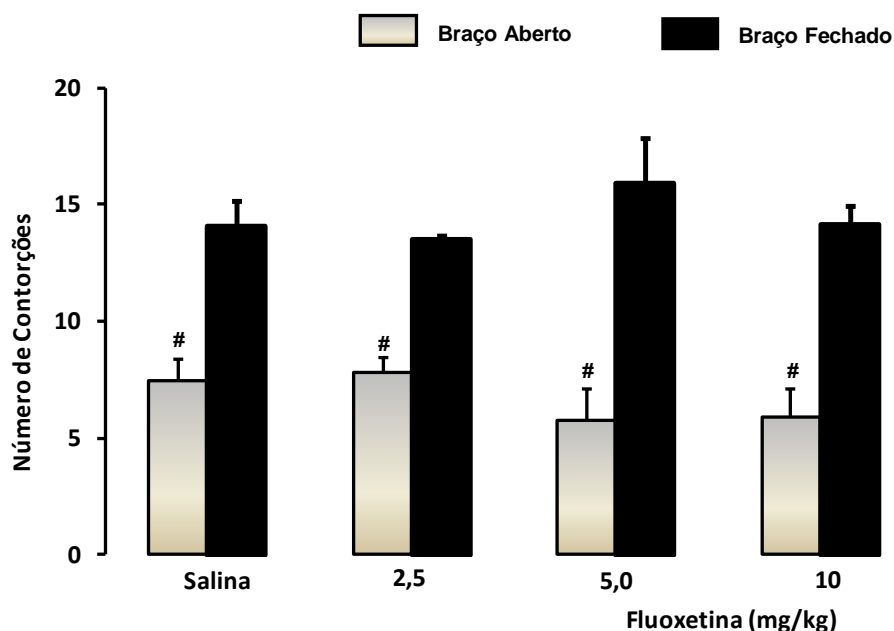


Figura 1. Efeito das injeções subcutâneas de fluoxetina administrada em camundongos confinados aos braços do LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (salina).

### 3.2.2. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre a antinociceção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.

A ANOVA de dois fatores mostrou diferença significativa do local do confinamento ( $F_{(1,54)}=83,10$ ,  $P < 0,05$ ), e do tratamento ( $F_{(3,54)}=9,57$ ,  $P < 0,05$ ). Não ocorreu interação entre os fatores, local de confinamento x tratamento ( $F_{(3,54)}=1,16$ ,  $P > 0,05$ ).

Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao braço fechado, independente do tratamento recebido. Apenas a dose de 20 mg/kg (s.c), foi capaz de reduzir o número de contorções em ambos os braços, aberto ou fechado do LCE, quando comparados ao seu respectivo grupo controle.

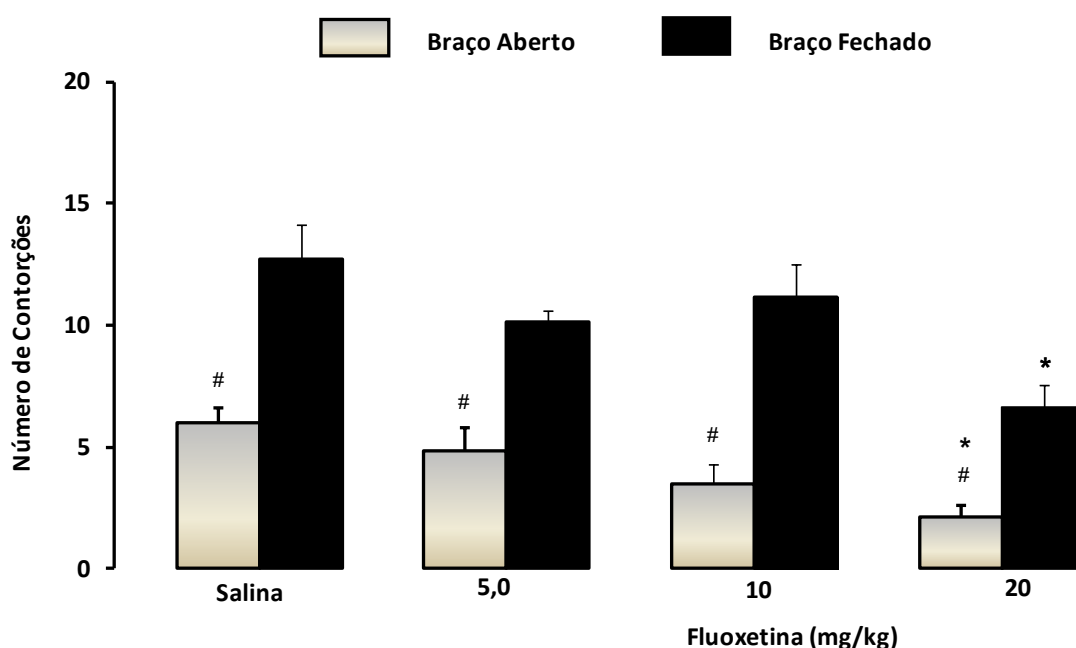


Figura 2. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre a antinociceção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=8-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina).

### 3.3. Discussão

Nossos resultados corroboram trabalhos anteriores, onde foi demonstrado que o confinamento de camundongos aos braços abertos do LCE promoveu uma diminuição no número de contorções abdominais quando comparado ao respectivo grupo confinado ao braço fechado independentemente do tratamento recebido (BAPTISTA *et al.*, 2009; BAPTISTA *et al.*, 2012; CONCEICAO *et al.*, 1992; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2000).

Em nosso primeiro experimento observamos que a administração aguda de fluoxetina em sua maior dose (20 mg/kg) induziu uma exacerbação da resposta antinociceptiva promovida pelos braços abertos do LCE (Fig.1). Resultados semelhantes já estão descritos na literatura. Pendersen e colaboradores (2005) demonstraram que fluoxetina, também em sua maior dose (30 mg/kg), promoveu aumento da antinocicepção em ratos submetidos a diferentes testes nociceptivos. A avaliação da nocicepção em outros modelos como o teste de placa quente, mostrou que o tratamento com fluoxetina em camundongos também promoveu aumento dose-dependente da antinocicepção (SCHREIBER e PICK, 2006).

Além disso, já foi demonstrado aumento da antinocicepção dose-dependente em camundongos avaliados no teste de contorções. Nesse trabalho, os efeitos da fluoxetina foram bloqueados por agentes opióides, deixando evidente que os efeitos da fluoxetina sobre a antinocicepção podem ser decorrentes de uma interação com a neurotransmissão opioidérgica e não apenas serotoninérgica (SINGH *et al.*, 2001).

Estudos para avaliação dos efeitos do tratamento agudo com fluoxetina sobre as respostas de medo/ansiedade têm apresentado resultados controversos em modelos animais. Por exemplo, o tratamento agudo com fluoxetina em ratos avaliados no labirinto em cruz elevado (DURCAN *et al.*, 1988; GRIEBEL *et al.*, 1997), não produziu alterações significativas quando comparados ao grupo controle (SANCHEZ, 1995; SANCHEZ e



MEIER, 1997) Entretanto grande parte dos estudos mais recentes, que avaliam respostas relacionadas à ansiedade em camundongos, mostraram que o tratamento agudo com fluoxetina é capaz de promover aumento da ansiedade (BELZUNG, LE GUIQUET, *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2009; GOMEZ *et al.*, 2014; ROBERT *et al.*, 2011; SALCHNER e SINGEWALD, 2002). Neste sentido, parece ser razoável afirmar que, o aumento nos níveis de ansiedade, conforme descrito nos trabalhos acima, seria em parte responsável pela exacerbação da antinociceção observadas no nosso trabalho.

Além disso, considerando que o efeito da fluoxetina sobre a resposta nociceptiva ocorreu apenas nos animais confinados no braço aberto (situação aversiva), nós sugerimos que a resposta observada com a facilitação serotoninérgica sobre a nociceção é dependente do estado emocional induzido pelo ambiente aversivo a que os camundongos foram submetidos.

Na clínica os ISRS's promovem um efeito analgésico, principalmente nos quadros de dor crônica e dor neuropática, entretanto este efeito é observado de modo geral com o tratamento crônico (MCCLEANE, 2008; SALERNO *et al.*, 2002; TOMKINS *et al.*, 2001). Os efeitos observados em modelos animais acerca dos efeitos do tratamento crônico com a fluoxetina apontam para um efeito ansiolítico (BECHTHOLT *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2009; ZANOVELI *et al.*, 2010).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina (20 mg/kg) promoveu diminuição no número de contorções, tanto nos animais expostos aos braços abertos quanto naqueles confinados nos braços fechados do aparato (Fig. 2). Portanto, este efeito antinociceptivo se mostrou independente do estado emocional ao qual o animal estava exposto. Neste sentido, os nossos resultados corroboram a literatura que descreve o efeito diretamente sobre as vias relacionadas à nociceção, como o obtido com o tratamento crônico com fluoxetina (BAPTISTA-DE-SOUZA *et al.*, 2014; TYNAN *et al.*, 2012).

## ***CAPÍTULO 4:***

# ***O PAPEL DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1A</sub> E 5-HT<sub>2C</sub> LOCALIZADOS NA SCP SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO***

## **4.1. Delineamento Experimental**

### **4.1.1. Avaliação do tratamento intra-SCP com agonista dos receptores 5HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE.**

Quatro ou cinco dias após a cirurgia os animais receberam injeções intra-SCP de salina, ou 8-OH-DPAT (5,6 e 10 nmol). Após o tempo necessário para ação das drogas (5 minutos), foi realizada a injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo), 0,6% (i.p.). Os animais permaneceram em gaiolas individuais até o início das contorções e, em seguida, foram confinados nos braços aberto (BA) ou fechado (BF) do LCE para o registro das contorções abdominais (resposta nociceptiva) por cinco minutos. Este protocolo descrito acima foi adotado em todos os experimentos descritos a seguir.

### **4.1.2. Avaliação do tratamento intra-SCP com agonista não seletivo dos receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> (mCPP), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE.**

Os animais receberam injeções intra-SCP de veículo, ou mCPP (0,01, 0,03, 0,1 nmol). Após o tempo necessário para ação da droga (5 minutos), foi realizada a injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo) 0,6% (i.p.), conforme protocolo descrito no item 4.1.1.

### **4.1.3. Avaliação do tratamento combinado intra-SCP com agonista não seletivo dos receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> (mCPP), e antagonista não seletivo para os**

### **receptores 5HT<sub>2A/2C</sub> (cetanserina) sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE.**

Os animais receberam injeções intra-SCP de veículo, cetanserina (10 nmol) e passados 5 minutos de mCPP (0,01 nmol/0,1µl). Após o tempo necessário para ação da droga (5 minutos), foi realizada a injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo) 0,6% (i.p.), conforme protocolo descrito no item 4.1.1.

### **4.1.4. Avaliação do tratamento intra-SCP com agonista dos receptores 5HT<sub>2C</sub> (MK-212), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE.**

Os animais receberam injeções intra-SCP de veículo, ou MK-212 (0,21 ou 0,63 nmol). Após o tempo necessário para ação da droga (5 minutos), foi realizada a injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo) 0,6% (i.p.), conforme protocolo descrito no item 4.1.1.

### **4.1.5. Avaliação do tratamento intra-SCP com antagonista dos receptores 5HT<sub>2C</sub> (SB 242080) sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE.**

Os animais receberam injeções intra-SCP de veículo, ou SB 242080 (0,01 ou 0,1 e 1 nmol). Após o tempo necessário para ação da droga (5 minutos), foi realizada a injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo) 0,6% (i.p.), conforme protocolo descrito no item 4.1.1.

## 4.2. Resultados

### 4.2.1. Histologia

A análise histológica confirmou que nesta etapa do trabalho 361 camundongos receberam canulação positiva na substância cinzenta periaquedutal (SCP). (Fig.3). Sessenta e um animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais expostos ao LCE, após administração intra-SCP de 8-OH-DPAT (5,6 e 10nmol), [Veículo (n= 22 ) 8-OHDPAT (n=39 )].

Cento e oito animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais expostos ao LCE, após administração intra-SCP de mCPP (0,01, 0,03, 0,1nmol), [Veículo (n= 25) mCPP (n=63)]. Setenta e um animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais expostos ao LCE, após administração combinada intra-SCP de cetanserina (10 nmol) e mCPP (0,01 nmol), [Veículo+Veículo (n= 16), Veículo+mCPP (n=18), cetanserina+Veículo (n=17), cetanserina+ mCPP (n=20)].

Sessenta e um animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais expostos ao LCE, após administração intra-SCP de MK-212 (0,21, 0,63, nmol), [Veículo (n= 25) MK-212 (n=36)]. Sessenta animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais expostos ao LCE, após administração intra-SCP de SB 242080 (0,01, 0,1, 1 nmol), [Veículo (n= 15) SB 242080 (n=45)].

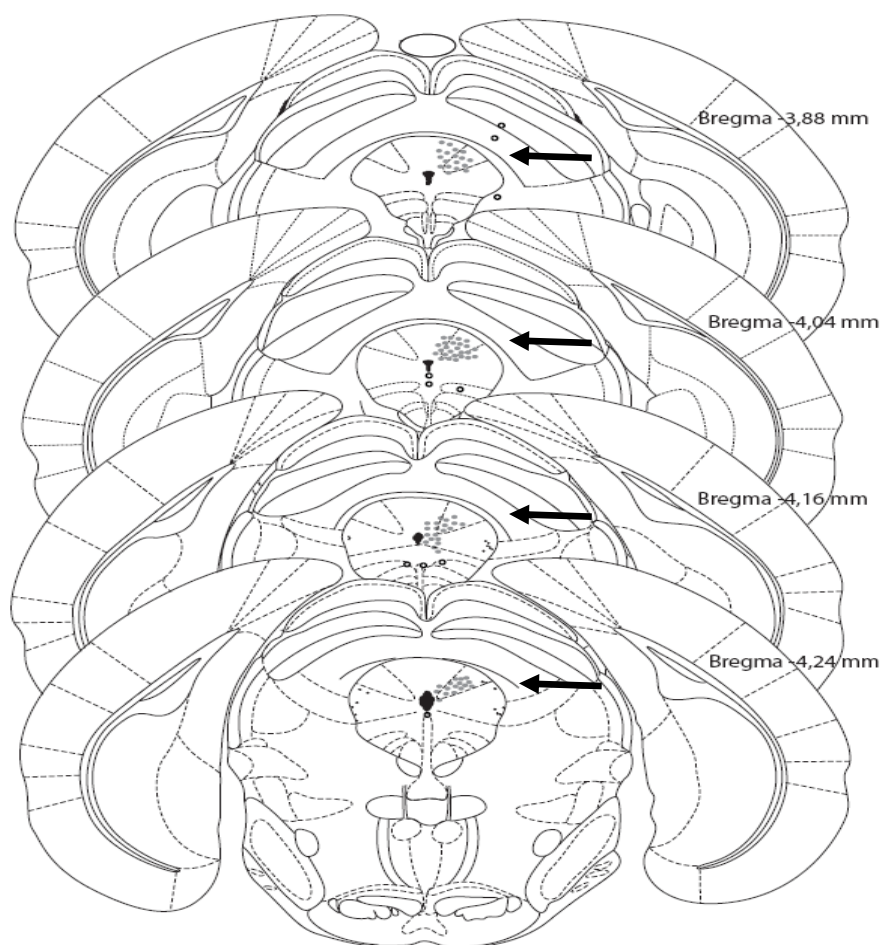


Figura 3. Representação esquemática dos resultados histológicos de acordo com o Atlas de Paxinos e Franklin (2001). Os pontos em cinza (olhar ponta das setas) representam os animais que tiveram canulação positiva, os pontos pretos representam aqueles canulados fora da SCP. O número de pontos é inferior ao número total de animais devido à sobreposição.

#### 4.2.2. Efeitos do tratamento intra-SCP com agonista dos receptores 5HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT), sobre a antinociceção em camundongos confinados ao BA do LCE.

A ANOVA de duas vias (local do confinamento x tratamento) mostrou diferença significativa do local do confinamento ( $F_{(1,55)}=37,48$   $P < 0,05$ ), e ausência de efeitos do tratamento ( $F_{(2,55)}=1,13$ ,  $P > 0,05$ ) e ausência de significância para o fator interação ( $F_{(2,55)}=0,64$ ,  $P > 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os

animais confinados no BA apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao BF, independente do tratamento recebido.

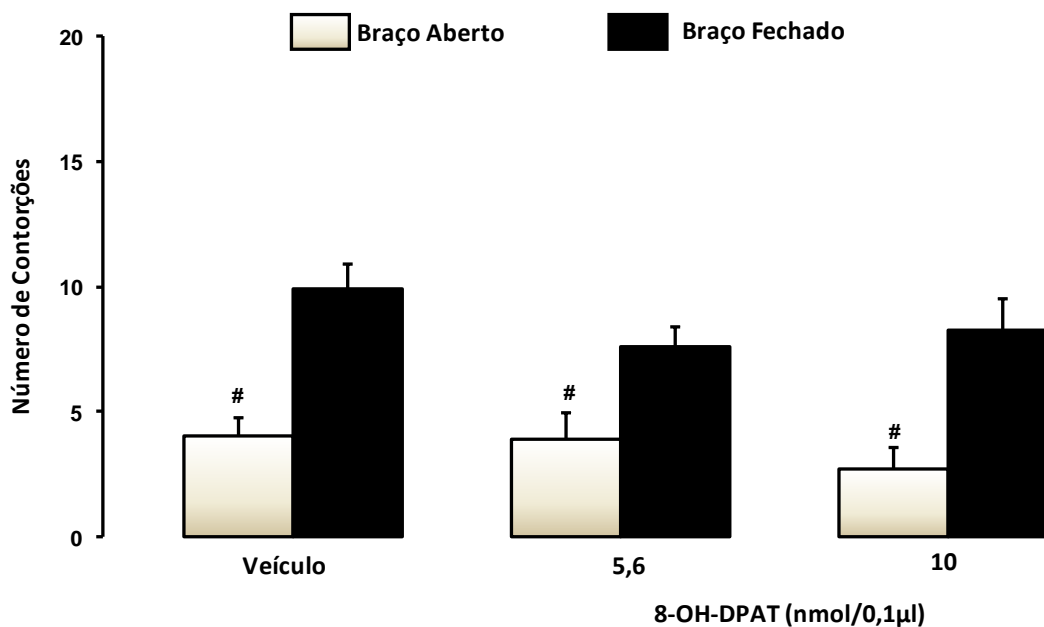


Figura 4. Efeito do 8-OH-DPAT, administrado intra-SCP em camundongos confinados aos braços do LCE (n=11-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado (BF).

#### 4.2.3. Efeitos do tratamento intra-SCP com agonista não seletivo dos receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> (mCPP), sobre a antinocicepção em camundongos confinados ao BA do LCE.

A ANOVA de duas vias (local do confinamento x tratamento) mostrou diferença significativa do local do confinamento ( $F_{(1,80)}=106,68$   $P < 0,05$ ), e do tratamento ( $F_{(3,80)}=11,31$ ,  $P < 0,05$ ) e ausência de significância para o fator interação ( $F_{(3,80)}=0,15$ ,  $P > 0,05$ ). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no BA apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao BF, independente do tratamento recebido. Além disso, os animais que receberam a dose de 0,01

nmol de mCPP e foram confinados no BA do LCE, apresentaram um menor número de contorções comparados ao seu respectivo grupo controle.

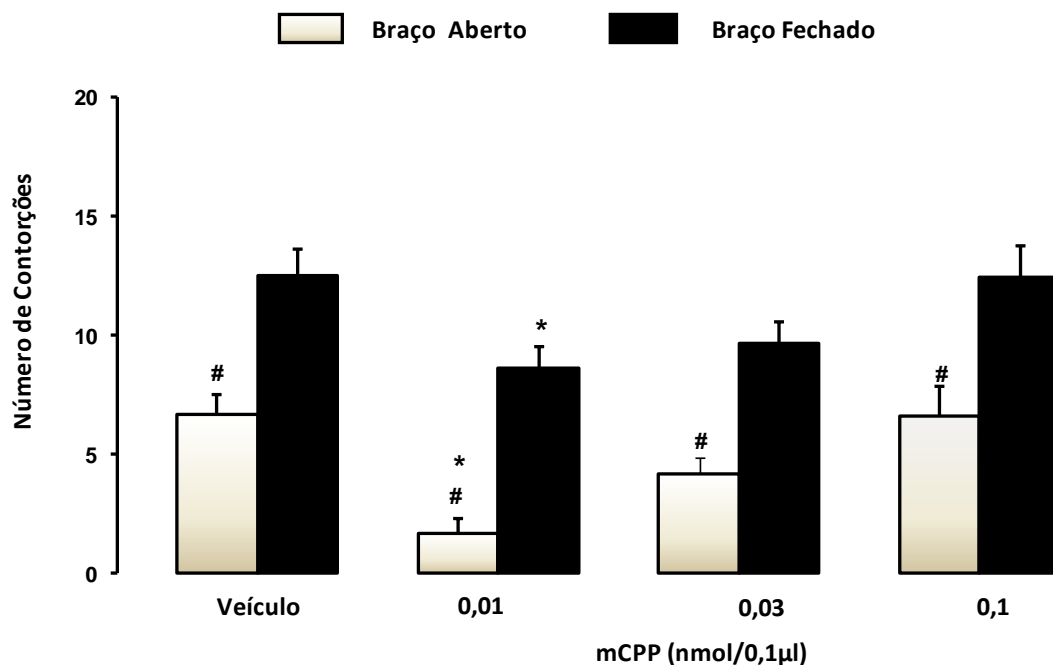


Figura 5. Efeito do tratamento intra-SCP de mCPP sobre a antinociceção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=9-13). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \*P < 0,05 comparado ao respectivo grupo controle (veículo).

#### 4.2.4. Efeitos do tratamento combinado intra-SCP com agonista não seletivo dos receptores 5HT<sub>2B/2C</sub> (mCPP), e antagonista não seletivo 5HT<sub>2A/2C</sub> (cetanserina) sobre a antinociceção em camundongos confinados ao BA do LCE.

A ANOVA de três vias (local de confinamento x pré-tratamento x tratamento), revelou efeitos significativos para o fator confinamento [ $F_{(2,63)} = 48,96$ ,  $P < 0.0001$ ], interação pré-tratamento x tratamento [ $F_{(7,63)} = 6,73$ ,  $P < 0,05$ ] e interação pré-tratamento x tratamento x local de confinamento [ $F_{(7,63)} = 4,14$ ,  $P < 0,05$ ]. Não foram observados efeitos para os fatores; pré-tratamento [ $F_{(7,63)} = 1,94$ ,  $P > 0,05$ ] e tratamento [ $F_{(7,63)} = 0,19$ ,  $P > 0,05$ ]. As comparações posteriores (Teste de Duncan), mostraram que os



animais confinados no BA apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao BF, independente do tratamento recebido. Os animais confinados no BA e que receberam a dose de 0,01 nmol de mCPP (veículo + mCPP) apresentaram uma diminuição no número de contorções quando comparado ao seu respectivo grupo controle (veículo+veículo). Entretanto os animais tratados com cetanserina + mCPP e confinados no BA, não apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle, demonstrando que o aumento da antinocicepção observada nos animais que receberam mCPP foi bloqueada pelo pré-tratamento com cetanserina.

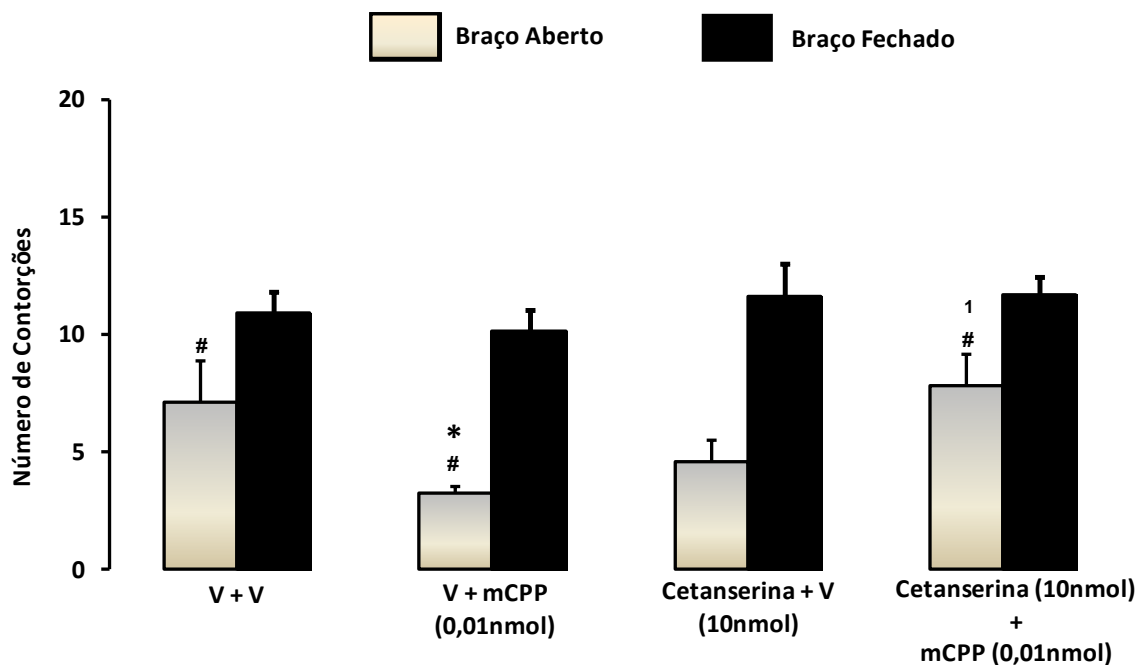


Figura 6. Efeito de injeções combinadas de mCPP + cetanserina, administrado intra-SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=6-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado (BF). \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle <sup>1</sup> $P < 0,05$  comparado ao grupo veículo + mCPP.

#### 4.2.5. Efeitos do tratamento intra-SCP do agonista dos receptores 5HT<sub>2C</sub> (MK-212), sobre a antinociceção em camundongos confinados ao BA do LCE.

A ANOVA de duas vias (local do confinamento x tratamento) demonstrou que ocorreu efeito do local do confinamento [ $F_{(1,53)}= 70,14, P < 0,0001$ ] e do tratamento [ $F_{(2,53)}= 4,23, P < 0,05$ ], e interação entre local do confinamento x tratamento [ $F_{(2,53)}=4,55, P < 0,05$ ]. Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no BA apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao BF, independente do tratamento recebido. Os animais tratados com MK-212 na dose de 0,63 nmol e confinados aos braços abertos do LCE apresentaram menor número de contorções, quando comparados ao grupo controle, também confinado ao BA.

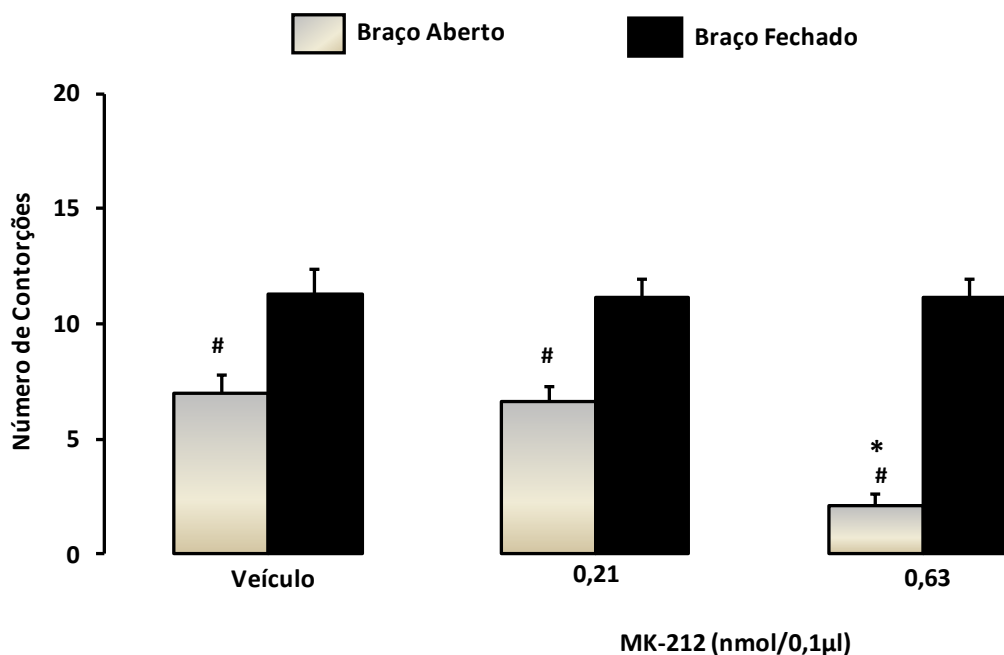


Figura 7. Efeito do MK-212, administrado intra-SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado (BF). \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle.

#### 4.2.6. Efeitos do tratamento intra-SCP com antagonista dos receptores 5HT<sub>2C</sub> (SB 242080), sobre a antinociceção em camundongos confinados ao BA do LCE.

A ANOVA de duas vias (local do confinamento x tratamento) demonstrou que ocorreu efeito do local do confinamento [ $F_{(1,52)}= 55,96, P < 0,0001$ ] e da interação entre local do confinamento x tratamento [ $F_{(3,52)}=3,97, P < 0,05$ ] sem significância para o efeito do tratamento [ $F_{(3,52)}= 2,18, P > 0,05$ ]. O Teste de Duncan revelou que os animais confinados no BA apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao BF, no grupo controle ou 0,01 e 0,1 nmol de SB 242080. Os animais tratados com a maior dose (1 nmol) e confinados aos braços abertos do LCE apresentaram maior número de contorções, quando comparados ao grupo controle, também confinado ao BA.

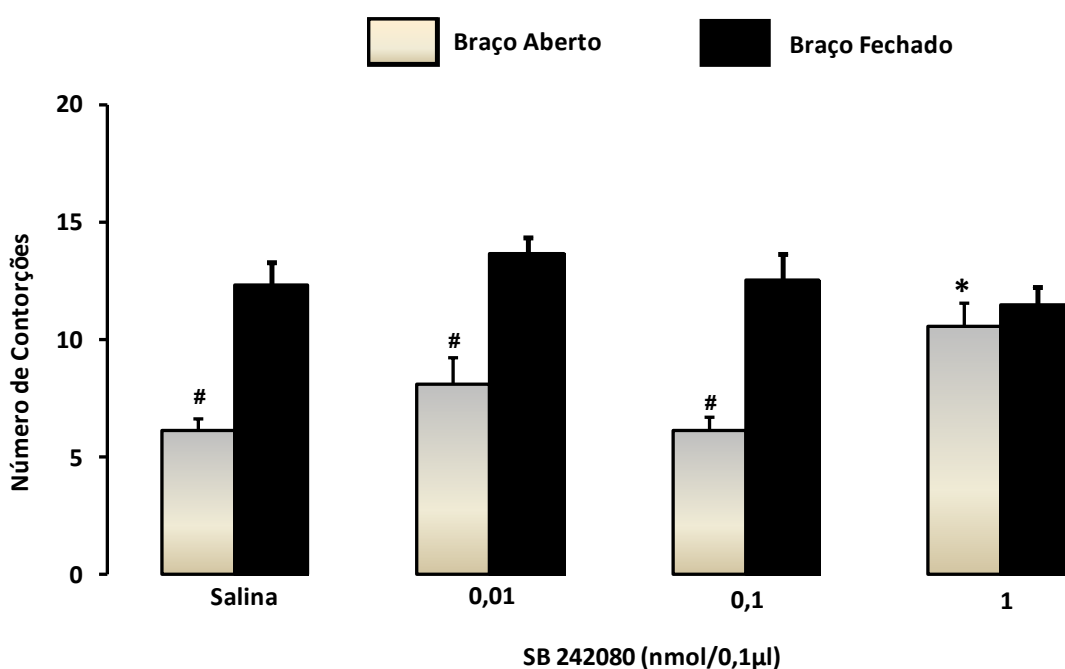


Figura 8. Efeito do SB 242080, administrado intra-SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE reexpostos ao LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado (BF). \*P < 0,05 comparado ao grupo controle.

### 4.3. Discussão

Nossos resultados histológicos desta etapa do trabalho indicaram que a grande maioria dos sítios de injeções observada se localizava nas colunas dorsais da SCP (Fig. 3). Esta estrutura mesencefálica é longitudinalmente dividida em quatro colunas, cuja estimulação química ou elétrica produz antinocicepção (KEAY *et al.*, 2001; MORGAN, 1991). Alguns estudos enfatizam que as porções dorsais da SCP teriam um papel crucial na modulação de respostas a situações aversivas (p.ex., comportamentos defensivos, ativação autonômica) (BRANDAO *et al.*, 2003; GRAEFF, 2004) e, em geral, essas reações são acompanhadas por antinocicepção (FANSELOW, 1991; SIEGFRIED *et al.*, 1990).

A participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da SCP na modulação dos comportamentos defensivos em roedores é bastante descrita na literatura (ENGIN e TREIT, 2008; GRAEFF, 2004). Microinfusões intra-SCP de agonistas destes tipos de receptores serotoninérgicos produzem efeito ansiolítico em roedores submetidos à diferentes modelos (DE PAULA SOARES e ZANGROSSI, 2004; NOGUEIRA e GRAEFF, 1995; POBBE *et al.*, 2011).

Diante destas evidências, nossa hipótese era de que a ativação destes receptores intra-SCP poderia atenuar a antinocicepção induzida pelos BA's. Entretanto não houve alteração desta resposta com a administração de 8-OH-DPAT. Anteriormente foi investigado por Canto-de-Souza (1997), a participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> da SCP sobre a antinocicepção induzida pelo estresse em camundongos submetidos ao teste de conflito social. Neste estudo também não foi observado efeitos sobre a nocicepção com a administração intra-SCP de 8-OHDPAT (agonista 5-HT<sub>1A</sub>) (Fig. 4).

Resultado semelhante também foi obtido no trabalho realizado por Nunes-de-Souza e colaboradores (2000), no qual, o objetivo era avaliar o papel da serotonina em receptores 5-HT<sub>1A</sub> da amígdala sobre a antinocicepção induzida pela exposição ao LCE. Os

autores observaram que a microinjeção de 8-OH-DPAT na amígdala, não atenuou a resposta antinociceptiva em camundongos confinados aos braços abertos do aparato. Entretanto, a administração desse agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, produziu efeitos ansiogênicos, sugerindo uma dissociação dos mecanismos que modulam a ansiedade daqueles envolvidos no controle da nocicepção no complexo amigdalóide.

Embora não tão extensivamente investigado quanto o receptor 5-HT<sub>1A</sub>, alguns autores têm se voltado a esclarecer o envolvimento dos receptores 5-HT<sub>2</sub> na modulação dos estados emocionais (DEAKIN e GRAEFF, 1991; GRAEFF, 2004; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2008). Dentre essa classe de receptores, a ação dos 5-HT<sub>2C</sub> têm sido bastante explorada (DE PAULA SOARES e ZANGROSSI, 2004; GOMES e NUNES-DE-SOUZA, 2009; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2011).

Nunes-de-Souza e colaboradores (2008), demonstraram que a administração de mCPP intra-SCP dorsal aumentou a exploração aos braços abertos de camundongos expostos ao LCE, sugerindo um efeito ansiolítico deste agonista 5-HT<sub>2B/2C</sub>. Este efeito foi seletivamente bloqueado pela cetanserina (antagonista 5-HT<sub>2A/2C</sub>), evidenciando que esta modulação ocorre em decorrência da ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>.

Considerando esses achados, nossa hipótese era de que a ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> poderia atenuar a antinocicepção em camundongos, entretanto observamos o efeito oposto. Embora a injeção na dose de 0,01 nmol de mCPP também tenha ocasionado uma redução no número de contorções dos animais confinados nos braços fechados (Fig. 5), resposta essa que poderia ser interpretada como um efeito intrínseco do fármaco nas vias nociceptivas, esse efeito não foi reproduzido com doses maiores e nas injeções combinadas (Fig. 6).

Tendo em vista o bloqueio desta intensificação da resposta antinociceptiva obtida com o mCPP (agonista 5-HT<sub>2B/2C</sub>), através do tratamento com a cetanserina (antagonista 5-HT<sub>2A/2C</sub>), fica fortalecida a hipótese de que este resultado foi observado em

decorrência da ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>. Esta hipótese foi confirmada com injeções intra-SCP do agonista seletivo 5-HT<sub>2C</sub> (MK-212) (Fig. 7). Diante destes achados, acreditamos que a ausência de efeitos observados com o mCPP com as doses maiores, provavelmente seja devido a sua ação em receptores 5-HT<sub>2B</sub> (BARNES e SHARP, 1999) e não em 5-HT<sub>2C</sub>. Assim, neste estudo sugerimos que a ativação dos receptores 5-HT<sub>2B</sub> pode ter anulado o efeito da ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> na SCP de camundongos confinados ao BA do LCE.

Nesta etapa do estudo, no último experimento, observamos que a administração de SB 242080 (antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>) intra-SCP em sua maior dose (1 nmol), é capaz de reverter a antinocicepção induzida pelo braço aberto do LCE (Fig. 8). Considerando que não há alteração no número de contorções dos animais que foram confinados no BF e receberam o mesmo tratamento, nossa hipótese é de que o bloqueio dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> da SCP é capaz de diminuir/anular a aversividade dos braços abertos do aparato.

Levando em consideração que o receptor 5-HT<sub>2C</sub> possui alta atividade constitutiva, ou seja, pode ter ativada sua cascata intracelular mesmo na ausência do agonista endógeno (ALOYO *et al.*, 2009), podemos sugerir que o SB 242080 possa estar atuando como agonista inverso, e assim impedindo a ocorrência da antinocicepção. Entretanto, esta hipótese necessita ser confirmada em outros estudos.

Diante dos achados descritos acima, nesta etapa do estudo os nossos resultados indicaram que a ação da serotonina nos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> localizados na SCP exerce papéis distintos na modulação da ansiedade e da antinocicepção induzida pelo confinamento nos braços abertos do LCE.

## ***CAPÍTULO 5:***

# ***EFEITOS DAS INJEÇÕES COMBINADAS DE FLUOXETINA (AGUDA E CRÔNICA) E AGONISTAS E ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES 5- HT<sub>1A</sub> E 5-HT<sub>2C</sub> INTRA-SCP SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO***

## **5.1. Delineamento Experimental**

### **5.1.1. Avaliação do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com 8-OH-DPAT (10 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

Quatro ou cinco dias após a cirurgia estereotáxica os animais receberam injeções subcutâneas (s.c) de solução salina ou fluoxetina (2,5 mg/kg). Depois de transcorrido o tempo necessário para ação da droga (25 minutos), os animais receberam injeções intra-SCP de veiculo ou 8-OH-DPAT (10 nmol). Em seguida, foi realizada a administração de ácido acético 0,6% (i.p.) (estímulo nociceptivo). Os animais permaneceram em gaiolas individuais até o início das contorções e, em seguida, foram confinados nos braços aberto (BA) ou fechado (BF) para o registro das contorções abdominais por cinco minutos. Este protocolo foi repetido nos outros experimentos descritos abaixo.

### **5.1.2. Avaliação do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com MK-212 (0,63 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

Quatro ou cinco dias após a cirurgia estereotáxica os animais receberam injeções subcutâneas (s.c) de solução salina ou fluoxetina (2,5 mg/kg). Depois de transcorrido o tempo necessário para ação da droga (25 minutos), os animais receberam injeções intra-SCP de veiculo ou MK-212 (0,63 nmol). Em seguida, foi realizada a administração de ácido acético 0,6% (i.p.), conforme o protocolo descrito no item 5.1.1.



**5.1.3. Avaliação do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com 8-OHDPAT (10 nmol), sobre a antinociceção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

Durante 21 dias os camundongos receberam solução salina ou fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c). No 21º dia, depois de transcorrido o tempo necessário para ação da droga (25 minutos), os animais receberam injeções intra-SCP de veiculo ou 8-OH-DPAT (10 nmol). Em seguida, foi realizada a injeção de ácido acético, conforme o protocolo descrito no item 5.1.1.

**5.1.4. Avaliação do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com MK-212 (0,63 nmol), sobre a antinociceção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

Durante 21 dias os camundongos receberam solução salina ou fluoxetina (5,0 mg/kg, s.c). No 21º dia, depois de transcorrido o tempo necessário para ação da droga (25 minutos), os animais receberam injeções intra-SCP de veiculo ou MK-212 (0,63 nmol). Em seguida, foi realizada a injeção de ácido acético, conforme o protocolo descrito no item 5.1.1.

**5.1.5. Avaliação do tratamento combinado intra-SCP com SB 242080 (0,1 nmol) e MK-212 (0,63 nmol), sobre a antinociceção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

Os animais receberam injeções intra-SCP de veículo, SB 242080 (0,1 nmol) e passados 5 minutos de MK-212 (0,63 nmol). Em seguida, foi realizada a injeção de ácido acético, conforme o protocolo descrito no item 5.1.1.

#### **5.1.6. Avaliação do tratamento combinado de SB 242080 (0,1 nmol) e 8-OHDPAT (10 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

Os animais receberam injeções intra-SCP de veículo, SB 242080 (0,1 nmol) e passados 5 minutos de 8-OHDPAT (10 nmol). Em seguida, foi realizada a injeção de ácido acético, conforme o protocolo descrito no item 5.1.1.

## **5.2. Resultados**

### **5.2.1. Histologia**

A análise histológica confirmou que nesta etapa do trabalho 410 camundongos receberam canulação positiva na substância cinzenta periaquedutal (SCP) (Fig. 9). Setenta e seis animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais confinados ao LCE, após administração combinada de Fluoxetina administrada agudamente (2,5 mg/kg) e intra-SCP de 8-OH-DPAT (10nmol), [Salina+Veículo (n= 18), Fluoxetina+Veículo (n=17), Salina+ 8-OH-DPAT (n=19), Fluoxetina + 8-OH-DPAT (n=22)].

Setenta e três animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais confinados ao LCE, após administração combinada de Fluoxetina administrada agudamente (2,5 mg/kg) e intra-SCP de MK-212 (0,63 nmol), [Salina + Veículo (n= 19), Fluoxetina+Veículo (n=15), Salina+MK-212 (n=22), Fluoxetina+MK-212 (n=17)].

Setenta e dois animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais confinados ao LCE, após administração combinada de Fluoxetina administrada cronicamente (5 mg/kg) e intra-SCP de 8-OH-DPAT (10nmol), [Salina+Veículo (n= 17), Fluoxetina+Veículo (n=16), Salina+8-OH-DPAT (n=19), Fluoxetina+8-OH-DPAT (n=20)].

Sessenta animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais confinados ao LCE, após administração combinada de Fluoxetina administrada cronicamente (5 mg/kg) e intra-SCP de MK-212 (0,63 nmol), [Salina+Veículo (n= 13), Fluoxetina+Veículo (n=14), Salina+MK-212 (n=16), Fluoxetina+MK-212 (n=17)].

Sessenta e oito animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais confinados aos braços do LCE, após administração combinada intra-SCP de SB 242080 (0,1 nmol) e MK-212 (0,63 nmol), [Salina+Veículo (n= 14), SB 242080+Veículo (n=17), Salina+MK-212 (n=18), SB 242080+MK-212 (n=19)].

Sessenta e um animais foram utilizados para investigar a antinocicepção em animais confinados aos braços do LCE, após administração combinada intra-SCP de SB 242080 (0,1 nmol) e 8-OHDPAT (10 nmol), [Salina+Veículo (n= 14), SB 242080+Veículo (n=16), Salina+8-OHDPAT (n=15), SB 242080+8-OHDPAT (n=16)].

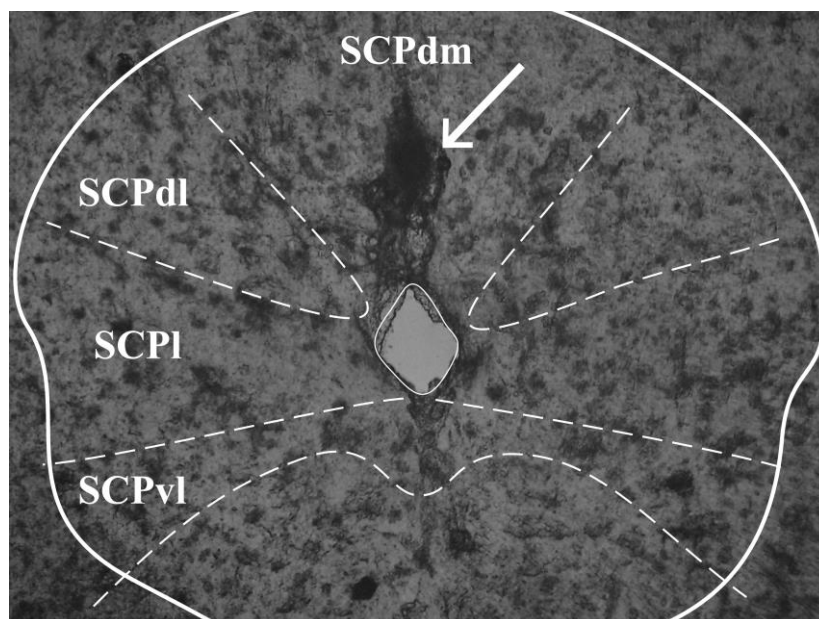


Figura 9. Fotomicrografia ilustrando o sítio de microinjeção (seta) intra-SCP. SCPdm: substância cinzenta periaquedutal dorsomedial; SCPdl: substância cinzenta periaquedutal dorsolateral; SCPl: substância cinzenta periaquedutal lateral; SCPvl: substância cinzenta periaquedutal ventrolateral.

### **5.2.2. Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

A ANOVA mostrou diferença significativa para os seguintes fatores: local de confinamento ( $F_{(1,68)}=59,61$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento sistêmico ( $F_{(1,68)}=4,03$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento intra-SCP ( $F_{(1,68)}=16,93$ ,  $P < 0,05$ ), local de confinamento e tratamento sistêmico ( $F_{(1,68)}=4,37$ ,  $P < 0,05$ ), local de confinamento e tratamento intra-SCP ( $F_{(1,68)}=7,11$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento sistêmico e intra-SCP e local de confinamento ( $F_{(1,68)}=4,62$ ,  $P < 0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa para os fatores interação tratamento sistêmico e intra-SCP ( $F_{(1,68)}=1,20$ ,  $P > 0,05$ ).

Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao braço fechado, com exceção do grupo fluoxetina+8-OHDPAT. O tratamento

intra-SCP de fluoxetina+8-OH-DPAT, promoveu um aumento no número de contorções nos animais expostos ao braço aberto, quando comparados ao respectivo grupo controle.

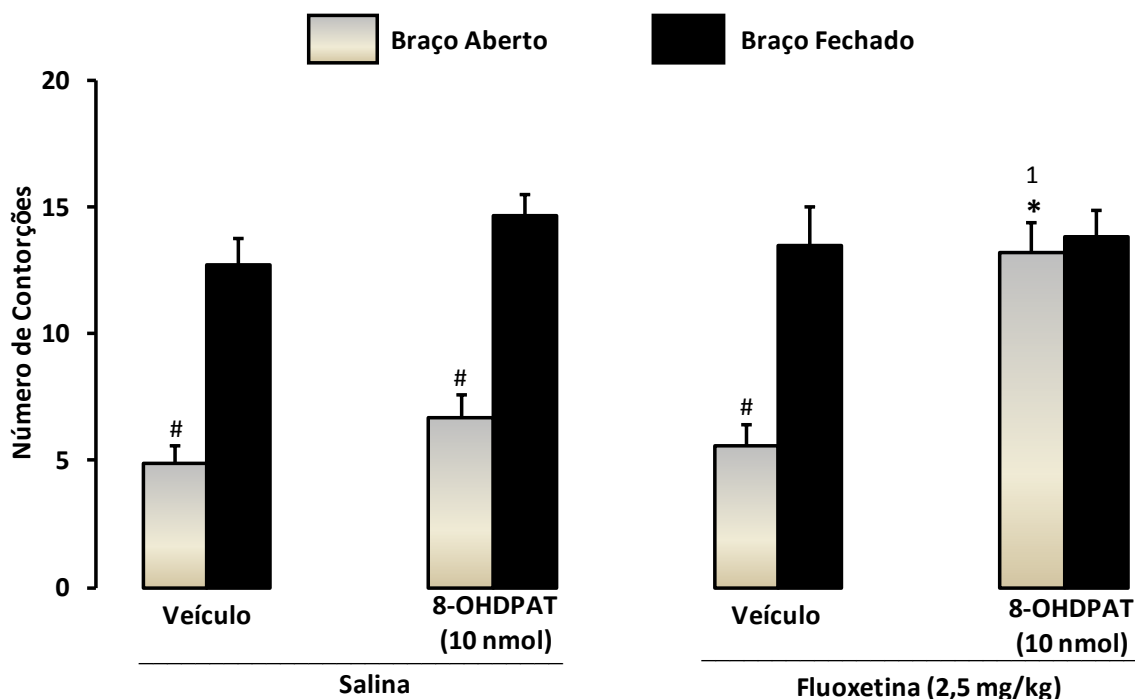


Figura 10. Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-SCP de 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle. <sup>1</sup> $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo salina+8-OH-DPAT

### 5.2.3. Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com MK-212 (0,63 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.

A ANOVA mostrou diferença significativa para os seguintes fatores: local de confinamento ( $F_{(1,64)}=75,36$ ,  $P < 0,05$ ), e interação tratamento sistêmico e intra-SCP ( $F_{(1,64)}=5,51$ ,  $P < 0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa para os fatores: tratamento sistêmico ( $F_{(1,64)}=0,53$ ,  $P > 0,05$ ), tratamento intra-SCP ( $F_{(1,64)}=0,40$ ,  $P > 0,05$ ), local de confinamento e tratamento sistêmico ( $F_{(1,64)}=0,01$ ,  $P > 0,05$ ), local de confinamento e

tratamento intra-SCP ( $F_{(1,64)}=0,31$ ,  $P > 0,05$ , tratamento sistêmico e intra-SCP e local de confinamento ( $F_{(1,64)}=3,97$ ,  $P > 0,05$ ).

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

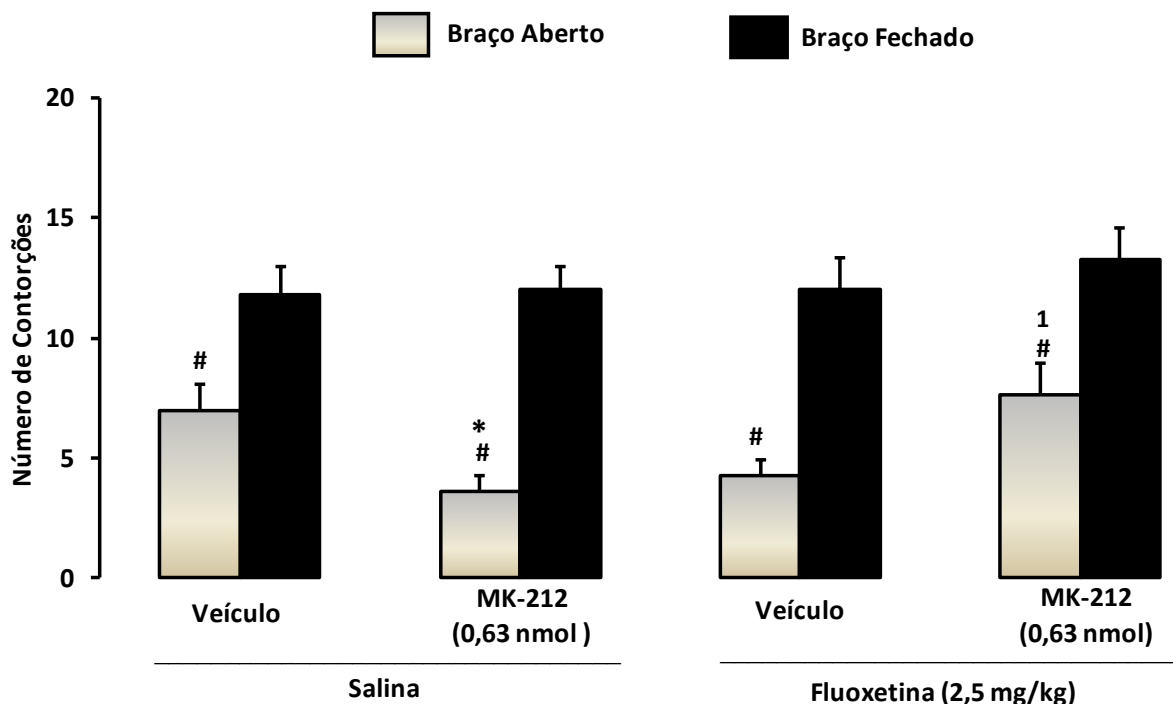


Figura 11. Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-SCP de MK-212 (0,63 nmol) sobre antinociceção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=8-11). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle. <sup>1</sup> $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo salina+MK-212

#### **5.2.4. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

A ANOVA mostrou diferença significativa para os seguintes fatores: local de confinamento ( $F_{(1,64)}=91,53, P < 0,05$ ), tratamento sistêmico ( $F_{(1,64)}=6,82, P < 0,05$ ), tratamento intra-SCP ( $F_{(1,64)}=12,25, P < 0,05$ ), local de confinamento e tratamento intra-SCP ( $F_{(1,64)}=5,43, P < 0,05$ ) tratamento sistêmico e intra-SCP e local de confinamento ( $F_{(1,64)}=8,90, P < 0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa para a interação entre os fatores local de confinamento e tratamento sistêmico ( $F_{(1,64)}=0,72, P > 0,05$ ) e interação tratamento sistêmico e intra-SCP ( $F_{(1,64)}=1,10, P > 0,05$ ).

Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao braço fechado, com exceção do grupo (fluoxetina + 8-OHDPAT). O tratamento intra-SCP de fluoxetina+8-OH-DPAT, promoveu um aumento no número de contorções nos animais expostos ao braço aberto, quando comparados ao respectivo grupo controle.

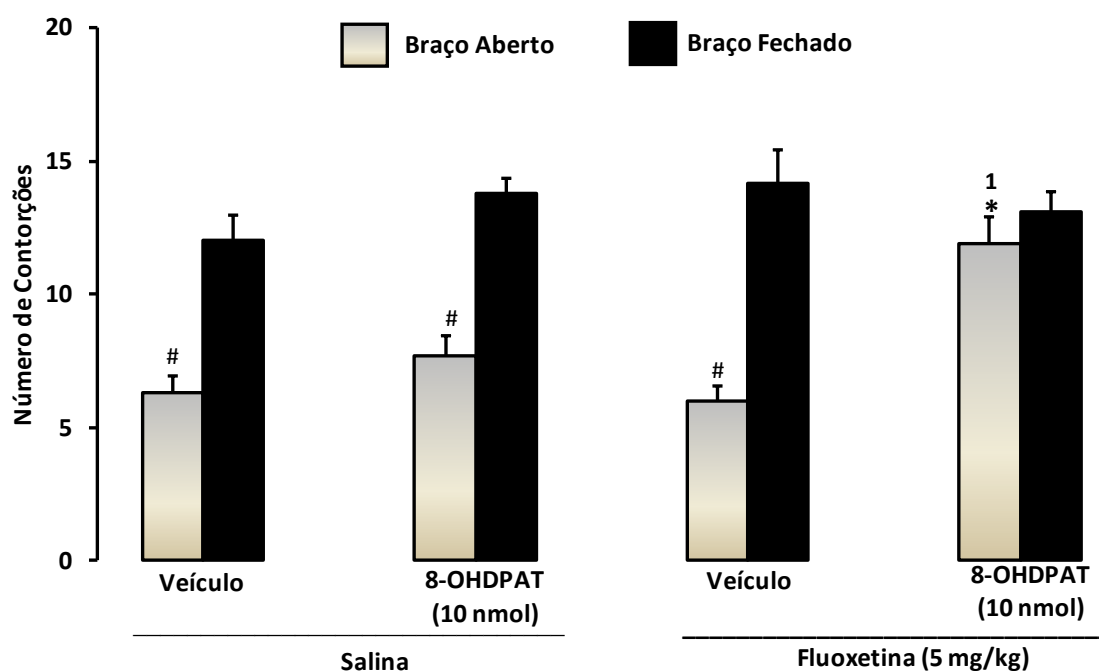


Figura 12. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-SCP de 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de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

### 5.2.5. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c), concomitante ao tratamento intra-SCP com MK-212 (0,63 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.

A ANOVA mostrou diferença significativa para os seguintes fatores: local de confinamento ( $F_{(1,55)}=100,21$ ,  $P < 0,05$ ) e tratamento sistêmico, e intra-SCP e local de confinamento ( $F_{(1,55)}=3,72$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento intra-SCP ( $F_{(1,55)}=3,13$ ,  $P < 0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa para os fatores: tratamento sistêmico ( $F_{(1,55)}=0,65$ ,  $P > 0,05$ ), interação tratamento sistêmico e intra-SCP ( $F_{(1,55)}=0,30$   $P > 0,05$ ), local de confinamento e tratamento sistêmico ( $F_{(1,55)}=1,27$   $P > 0,05$ ), local de confinamento e tratamento intra-SCP ( $F_{(1,55)}=2,52$ ,  $P > 0,05$ ).



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

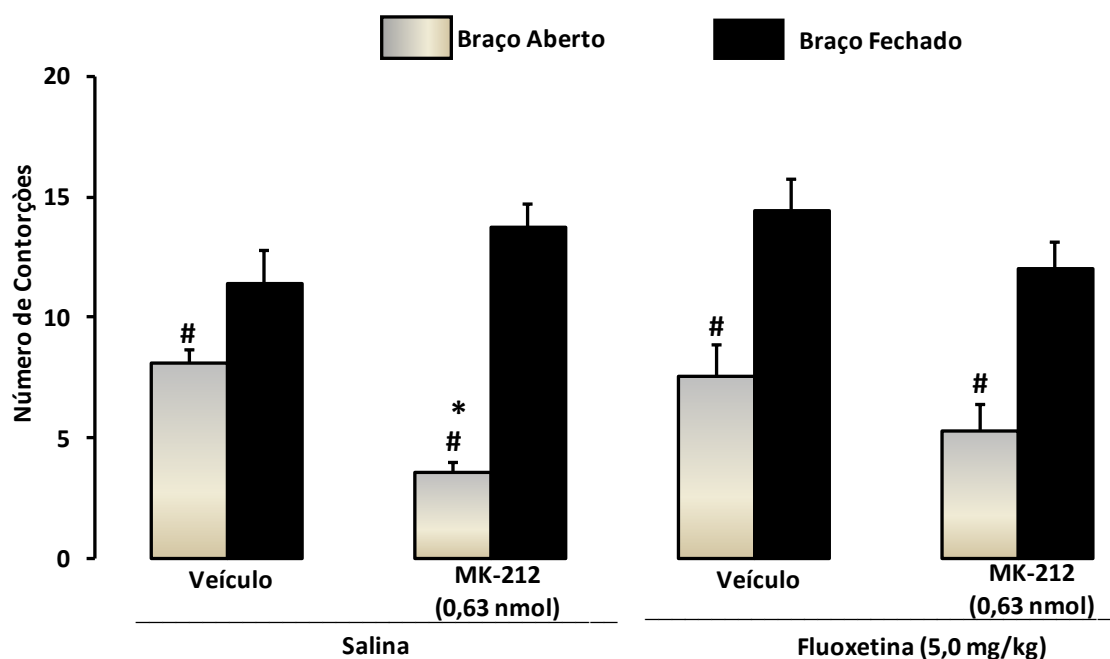


Figura 13. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 mg/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-SCP de MK-212 (0,63 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado.\* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle.

#### 5.2.6. Efeitos do tratamento combinado intra-SCP com SB 242080 (0,1 nmol) e MK-212 (0,63 nmol), sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.

A ANOVA mostrou diferença significativa para os seguintes fatores: local de confinamento ( $F_{(1,60)}=99,92$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento intra-SCP com MK-212 ( $F_{(1,60)}=14,89$ ,  $P < 0,05$ ), interação entre os tratamentos ( $F_{(1,60)}=10,68$ ,  $P < 0,05$ ), e interação entre o local de

confinamento e os dois tratamentos intra-SCP ( $F_{(1,60)}=8,15$ ,  $P < 0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa para os fatores: tratamento com SB 242080 ( $F_{(1,60)}=0,33$ ,  $P > 0,05$ ), interação entre o local e tratamento intra-SCP de SB 242080 ( $F_{(1,60)}=1,34$ ,  $P > 0,05$ ), e local de confinamento e tratamento MK-212 ( $F_{(1,60)}=8,15$ ,  $P > 0,05$ ).

Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao braço fechado, independente do tratamento recebido. O tratamento intra-SCP de salina+MK-212, promoveu diminuição no número de contorções nos animais expostos ao braço aberto, quando comparados ao grupo controle, enquanto o tratamento com SB 242080+MK-212 reverteu este efeito seletivamente.

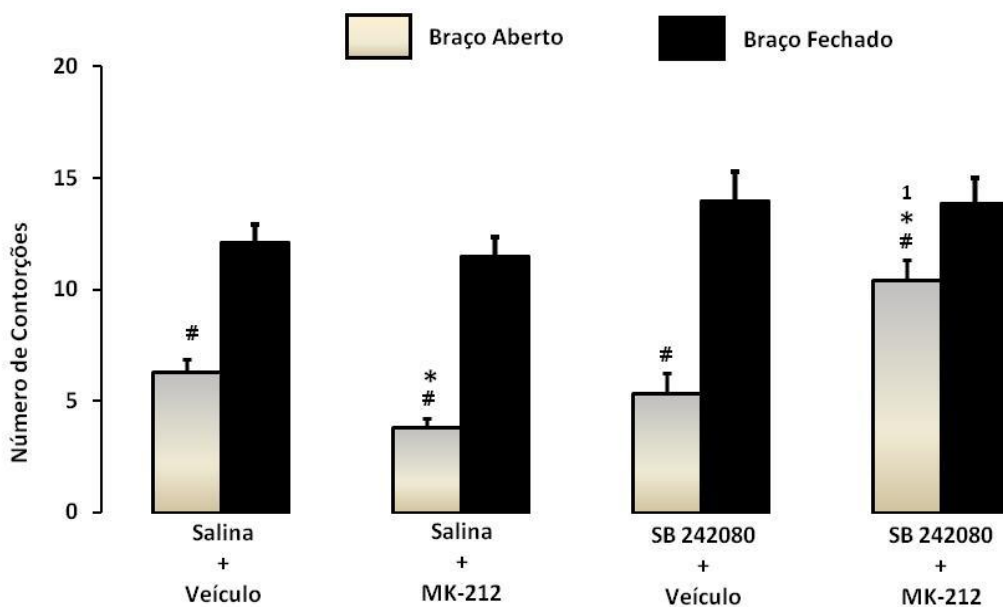


Figura 14. Efeito do tratamento combinado intra-SCP com SB 242080 (0,1 nmol) e MK-212 (0,63 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle <sup>1</sup> $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo salina+MK-212.

### **5.1.7. Efeitos do tratamento combinado de SB 242080 (0,1 nmol) e 8-OH-DPAT (10 nmol), sobre a antinociceção em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE.**

A ANOVA mostrou diferença significativa para os seguintes fatores: local de confinamento ( $F_{(1,54)}=56,64$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento intra-SCP com 8-OH-DPAT ( $F_{(1,54)}=9,50$ ,  $P < 0,05$ ), local de confinamento e tratamento intra-SCP com 8-OH-DPAT ( $F_{(1,54)}=5,16$ ,  $P < 0,05$ ), entre os tratamentos intra-SCP ( $F_{(1,54)}=6,45$ ,  $P < 0,05$ ), e entre os tratamentos intra-SCP e local de confinamento ( $F_{(1,54)}=5,05$ ,  $P < 0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa para o tratamento com SB 242080 ( $F_{(1,54)}=2,52$ ,  $P > 0,05$ ) a interação entre os fatores local de confinamento e tratamento com SB 242080 ( $F_{(1,54)}=0,0034$ ,  $P > 0,05$ ).

Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao braço fechado, com exceção do grupo fluoxetina + 8-OHDPAT. O tratamento intra-SCP de fluoxetina+8-OH-DPAT, promoveu um aumento no número de contorções nos animais expostos ao braço aberto, quando comparados ao respectivo grupo controle.

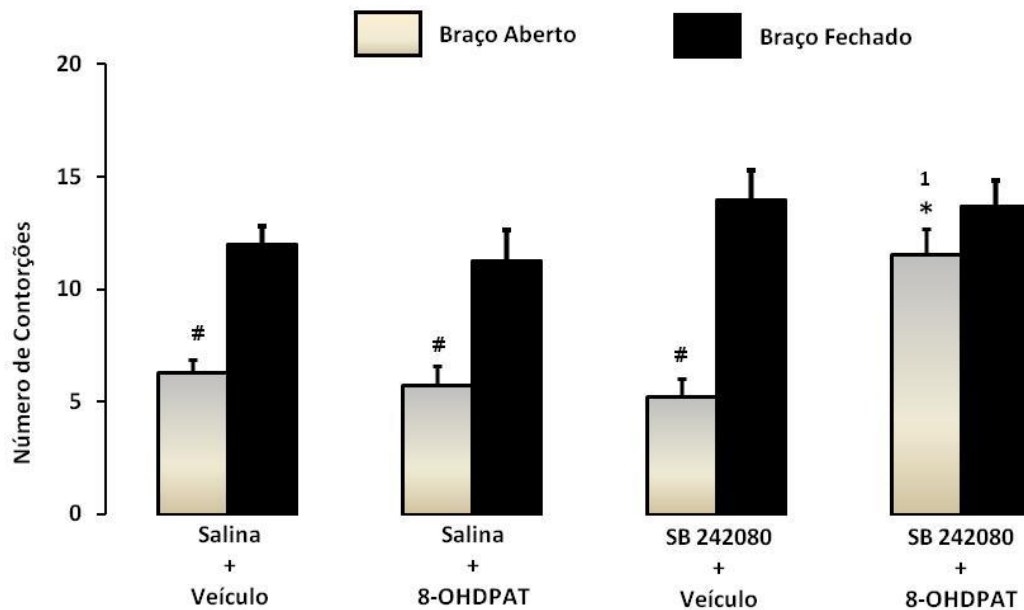


Figura 15. Efeito do tratamento combinado intra-SCP com SB 242080 (0,1 nmol) e 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=7-10). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle <sup>1</sup> $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo salina+8-OH-DPAT.

### 5.3. Discussão

Considerando evidências da literatura que demonstram que os efeitos terapêuticos observados com o tratamento com fluoxetina podem ser decorrentes de sua interação com subtipos específicos de receptores serotoninérgicos (CICCOCIOPPO *et al.*, 1997; KLIMEK *et al.*, 1994; LI *et al.*, 1997; PALVIMAKI *et al.*, 1994; WONG e BYMASTER, 1981), especificamente os receptores 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>1A</sub> (BRISTOW *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 1995; DAWSON e NGUYEN, 2000; DE VRY *et al.*, 2004), realizamos nesta etapa do trabalho microinjeções dos agonistas 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, intra-SCP combinadas com injeções agudas e crônicas de fluoxetina. O objetivo nesta etapa foi verificar a influência desta interação na antinocicepção.

Para a investigação do papel do tratamento agudo de fluoxetina sobre os receptores, utilizamos uma dose em que não observamos efeitos sobre a antinocicepção (2,5

mg/kg) (Fig. 1), combinada com a maior dose utilizada com o agonista 8-OH-DPAT (10 nmol) (Fig.4), em que não observamos efeito sobre a antinocicepção. Para o tratamento combinado com MK-212, utilizamos a dose de 0,63 nmol, que induziu aumento da antinocicepção (Fig.7).

Na combinação dos tratamentos de fluoxetina (agudo) com 8-OH-DPAT intra-SCP, ocorreu bloqueio da antinocicepção induzida pelo braço aberto do LCE (Fig. 10), embora isoladamente não tenhamos observado efeito destes compostos (Capítulo 3 - Fig. 1 e Capítulo 4 - Fig. 4). A combinação do tratamento de fluoxetina com MK-212 intra-SCP, produziu reversão do aumento da antinocicepção induzida pelo tratamento com o agonista 5-HT<sub>2C</sub> ( Fig. 11).

Estudos mais recentes buscaram investigar os efeitos de tratamentos combinados de ISRS's com agonistas serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2</sub> localizados na SCP, sobre as respostas emocionais em ratos. Foi demonstrado uma exacerbação de respostas ansiolíticas e panicolíticas induzidas por estes agonistas de receptores serotoninérgicos (DE BORTOLI *et al.*, 2006; ZANOVELI *et al.*, 2007; ZANOVELI *et al.*, 2010).

Diante destas evidências, e devido a acentuação da antinocicepção obtida com a administração de MK-212, nós esperávamos que o aumento nos níveis de serotonina obtido com o tratamento agudo de fluoxetina, através do bloqueio de seus transportadores (CARLSSON, 1970), acarretasse na exacerbação da antinocicepção. Entretanto, em nosso resultado com a administração aguda de fluoxetina e MK-212, observamos exatamente o oposto. A fluoxetina foi capaz de prejudicar a resposta do agonista 5-HT<sub>2C</sub>, e não acentuar a antinocicepção, conforme hipotetizamos. Curiosamente, na literatura tem sido demonstrado um papel secundário exercido pela fluoxetina, em que esta atua como antagonista de receptores 5-HT<sub>2C</sub>.

Neste sentido, Ni e colaboradores (1997), demonstraram através de técnicas de eletrofisiologia que a fluoxetina é capaz de inibir a ligação da serotonina com os

receptores 5-HT<sub>2C</sub> localizados em membranas de córtex de ratos. Estes autores concluíram com a observação destes resultados que a fluoxetina atua como um antagonista reversível e competitivo neste subtipo de receptor serotoninérgico. Posteriormente, esta evidência foi reforçada por Palvimack e colaboradores (1999), em que observaram ocupação de 43% dos receptores 5HT<sub>2C</sub> no plexo coróide de ratos, após administração de fluoxetina.

Outra característica investigada acerca da ação de receptores serotoninérgicos envolve a interação entre os receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>1A</sub> na modulação de respostas comportamentais e endócrinas (HENSLER e TRUETT, 1998; ZHANG *et al.*, 2001). Especificamente, Valdez e colaboradores (2002) demonstraram que a ativação de receptores 5-HT<sub>2</sub> induz à significativa atenuação da atividade do receptor 5-HT<sub>1A</sub> no córtex cingulado anterior de ratos. Estes autores descrevem que esta co modulação pode ocorrer devido a interação entre componentes intracelulares da cascata de sinalização, quando estes receptores estão localizados no mesmo neurônio.

Tal interação poderia explicar nossos resultados obtidos com o tratamento combinado de fluoxetina (aguda) com o 8-OH-DPAT administrado intra-SCP. Neste experimento observamos que a antinocicepção induzida pelos braços abertos do LCE foi completamente revertida (Figura 10). Considerando a alta densidade dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5HT<sub>2C</sub> na SCP (CLEMETT *et al.*, 2000; HANNON e HOYER, 2008; RIAD *et al.*, 2000), podemos propor a ocorrência de co modulação entre estes receptores.

Tendo em vista as características funcionais de cada um destes subtipos, em que a ativação dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> evoca respostas excitatórias, enquanto que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> desencadeia uma hiperpolarização da membrana celular (ANDRADE e NICOLL, 1987; CONN e SANDERS-BUSH, 1987), sugerimos que a reversão da antinocicepção observada com o tratamento combinado (Fluoxetina+8-OH-DPAT) tenha ocorrido como resultado da hiperpolarização neuronal desencadeada pelo bloqueio dos

receptores 5-HT<sub>2C</sub> somada à ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> (promovida pela administração do agonista e o aumento da concentração de serotonina desencadeada pela fluoxetina).

Embora estudos futuros com ferramentas farmacológicas ou imunoistoquímicas poderão confirmar essa hipótese, esta reversão da antinocicepção também foi observada nos resultados obtidos com o tratamento intra-SCP com SB-242080 (antagonista 5-HT<sub>2C</sub>) (Capítulo 4 - Fig. 8). Juntas, essas evidências reforçam a hipótese de que a atividade do receptor 5-HT<sub>2C</sub> localizado na SCP é crucial para a modulação deste tipo de antinocicepção induzida pelos BA's no LCE.

Entretanto, parece contraditório que as injeções combinadas de fluoxetina (aguda) com agonistas 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> tenham promovido um prejuízo na antinocicepção, enquanto a administração isolada deste fármaco sistêmico levou a uma intensificação desta resposta em sua maior dose (20 mg/kg) (Capítulo 3 - Fig. 1). Neste sentido, tendo sido descrito que a administração aguda de fluoxetina é capaz de induzir aumento nos níveis de ansiedade (GOMES *et al.*, 2009; SALCHNER e SINGEWALD, 2002; SILVA *et al.*, 1999) em diferentes modelos animais, sugerimos que este aumento da antinocicepção seja resultado do aumento nos níveis de ansiedade. Adicionalmente, devido a administração sistêmica da fluoxetina, acreditamos que esta resposta possa ser resultado do efeito deste fármaco em outras estruturas que também modulam a antinocicepção induzida por situações aversivas, com exemplo para o que ocorre na amígdala (BAPTISTA *et al.*, 2009; HELMSTETTER, 1993; NUNES-DE-SOUZA *et al.*, 2000).

Considerando que o tratamento crônico com ISRS é responsável pelo papel terapêutico descrito na literatura (FREO *et al.*, 2000; KRISHNAN e NESTLER, 2008; MCCLEANE, 2008), realizamos experimentos de injeção combinada de fluoxetina administrada cronicamente, na dose que não apresentou efeitos (5 mg/kg), e administração intra-SCP de 8-OH-DPAT (10 nmol) e MK-212 (0,63 nmol).

Na administração crônica de fluoxetina combinada à injeções intra-SCP de 8-OH-DPAT, observamos que permaneceu a ausência de antinocicepção no animais confinados nos BA's do LCE. Diante deste resultado, sugerimos que as neuroadaptações descritas na literatura com o tratamento crônico não foram capazes de alterar essa resposta, observada no tratamento agudo com uma dose ainda menor (2,5 mg/kg).

Diversos pesquisadores demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina é capaz de promover alterações quantitativas (SUBHASH *et al.*, 2000) e funcionais (LE POUL *et al.*, 1997; LESCH *et al.*, 1991; NEWMAN *et al.*, 2004) nos receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Entretanto, algumas evidências apontam para um aumento da reatividade deste receptor na SCP após tratamento crônico com fluoxetina (DE BORTOLI *et al.*, 2006; ZANOVELI *et al.*, 2007; ZANOVELI *et al.*, 2010), evidências que se assemelham aos resultados obtidos neste experimento.

Os resultados obtidos com a administração crônica de fluoxetina e injeções intra-SCP de MK-212 demonstraram que a fluoxetina atenuou o efeito de aumento da antinocicepção obtido com o tratamento intra-SCP deste agonista 5-HT<sub>2C</sub> (Fig. 13), de modo diverso daquele obtido na combinação com tratamento agudo de fluoxetina. As análises estatísticas demonstraram que o grupo que recebeu Fluoxetina+MK-212 e foi confinado ao BA do LCE não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle. Além disso, essa diferença também não foi observada na comparação deste grupo com aqueles animais na mesma situação e que receberam Salina+MK-212. Estas análises indicam que houve apenas uma atenuação no aumento da antinocicepção induzido pelo MK-212 e não uma reversão completa, como ocorreu nos tratamentos combinados com injeções aguda de fluoxetina (Fig. 11).

Considerando os achados que descrevem o antagonismo exercido pela fluoxetina (NI e MILEDI, 1997; PALVIMAKI *et al.*, 1999), sugerimos que esta



característica tenha levado ao aumento na densidade destes receptores localizados na SCP, resultando em um efeito mais discreto da fluoxetina em bloquear os receptores 5-HT<sub>2C</sub>.

Com o objetivo de fortalecer a hipótese de que a fluoxetina estaria atuando como antagonista dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, e como consequência deste bloqueio, reverteu o efeito de aumento da antinocicepção exercido pelo MK-212, realizamos um protocolo experimental com microinjeções combinadas do antagonista seletivo SB 242080 (em uma dose que não exerceu efeitos sobre a antinocicepção) com MK-212.

Neste experimento, observamos um resultado bastante semelhante a aquele obtido com a combinação do tratamento agudo com fluoxetina e intra-SCP com MK-212, ou seja, uma completa reversão dos efeitos observados com a administração isolada de MK-212. Desta forma, nos parece bastante plausível que a fluoxetina exerça um bloqueio dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> prejudicando a antinocicepção.

No último experimento realizado nesta etapa do trabalho, tivemos como objetivo sustentar a hipótese da ocorrência de interação entre os receptores 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>1A</sub> localizados na SCP. Para tal realizamos microinjeções intra-SCP e SB 242080 e 8-OH-DPAT. Os dados obtidos na realização deste experimento também vão de encontro a aqueles obtidos com a administração aguda de fluoxetina e intra-SCP com 8-OH-DPAT, em que a combinação dos tratamentos induziu a reversão completa da antinocicepção. Diante desta evidência concluímos que ocorra uma interação entre estes subtipos de receptores serotoninérgicos.

***CAPÍTULO 6:***

***EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO  
COM FLUOXETINA  
SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE  
SEROTONINA,  
E  
DENSIDADE DE PROTEÍNAS PARA OS  
RECEPTORES  
5-HT<sub>1A</sub> E 5-HT<sub>2C</sub> DA SCP***

## **6.1. Delineamento Experimental**

### **6.1.1. Avaliação do tratamento crônico (21 dias) com salina e fluoxetina (5,0, 10 e 20 mg/kg, s.c), sobre as concentrações de serotonina, seu metabólito e turnover na SCP.**

Os sujeitos receberam tratamento subcutâneo crônico com salina ou fluoxetina (5,0, 10 e 20 mg/kg) por 21 dias. No 21º dia, receberam uma injeção de ácido acético a 0,6% (i.p.), e em seguida foram confinados ou ao braço aberto ou fechado do LCE. Após o experimento os animais foram decapitados em guilhotina e seus encéfalos extraídos. Em seguida o protocolo transcorreu conforme descrito anteriormente (Capítulo 2 – Item 2.7).

### **6.1.2. Avaliação do tratamento crônico (21 dias) com fluoxetina (5,0 e 20 mg/kg, s.c), sobre a densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> na SCP.**

Os sujeitos receberam tratamento crônico subcutâneo com salina ou fluoxetina (5 e 20mg/kg) por 21 dias. No 21º dia, os animais foram decapitados sem anestesia em guilhotina e seus encéfalos extraídos. Em seguida o protocolo transcorreu conforme descrito anteriormente (Capítulo 2 – Item 2.8).

## 6.2. Resultados

### 6.2.1. Efeito do tratamento crônico (21 dias) com salina e fluoxetina (5,0, 10 e 20 mg/kg, s.c), sobre a concentração de serotonina, o metabólito (5-HIAA) e turnover na SCP.

Para a análise dos níveis de serotonina, a ANOVA de dois fatores mostrou diferença significativa do local do confinamento ( $F_{(1,48)}= 5,55, P < 0,05$ ), sem diferença significativa para os fatores; tratamento ( $F_{(3,45)}=0,30, P > 0,05$ ) e interação entre os fatores, local de confinamento x tratamento ( $F_{(3,45)}= 0,41, P > 0,05$ ).

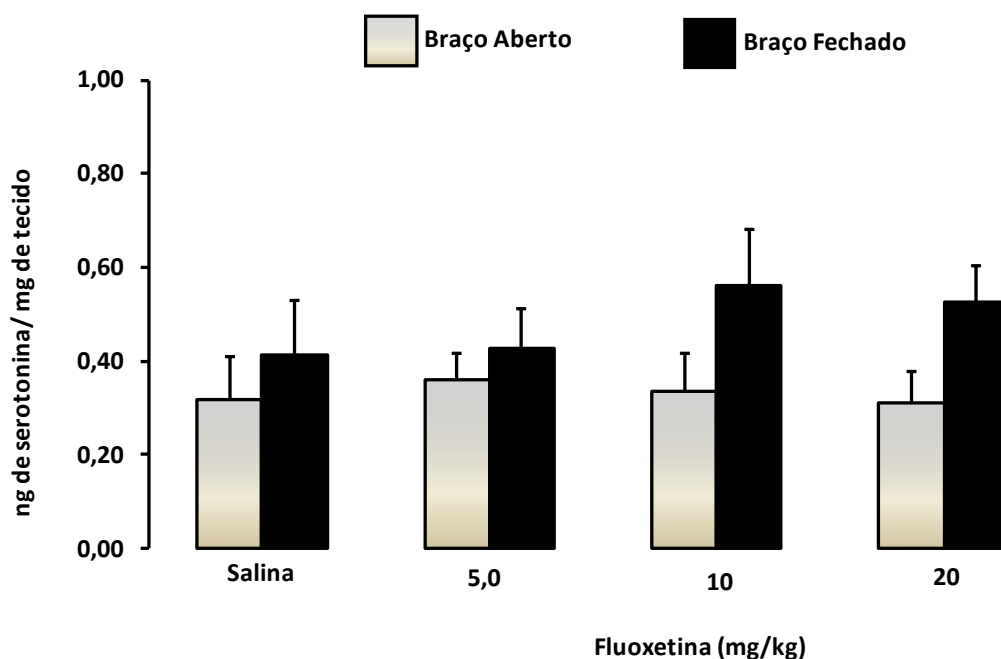


Figura 16. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre os as concentrações de serotonina da SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=5-7). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) da quantidade de serotonina em nanogramas por tecido.

A ANOVA de dois fatores mostrou para a avaliação da concentração de 5-HIAA, diferença significativa do local do confinamento ( $F_{(1,45)}=6,84, P < 0,05$ ), sem diferença significativa para os fatores; tratamento ( $F_{(3,45)}=0,57, P > 0,05$ ) e interação entre os fatores, local de confinamento x tratamento ( $F_{(3,45)}= 2,45 P > 0,05$ ). Comparações

posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor concentração de 5-HIAA quando comparados ao grupo confinado no braço fechado, e que recebeu 10mg/kg de fluoxetina.

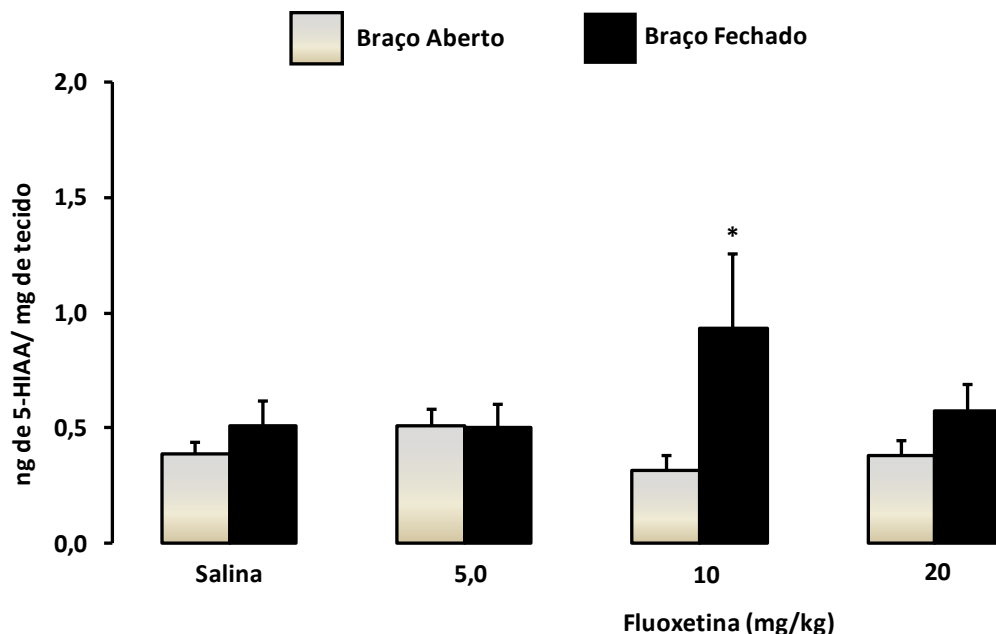


Figura 17. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre a concentração de 5-HIAA da SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=5-7). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM da quantidade de 5-HIAA em nanogramas por tecido). \* $P < 0,05$  comparado ao respectivo grupo controle (salina).

Nas análises sobre o turnover, a ANOVA de dois fatores mostrou que não houve diferença significativa para os fatores: local do confinamento ( $F_{(1,45)}=0,09$ ,  $P > 0,05$ ), tratamento ( $F_{(3,45)}=1,46$ ,  $P > 0,05$ ) e interação entre os fatores, local de confinamento x tratamento ( $F_{(3,45)}= 0,86$   $P > 0,05$ ).

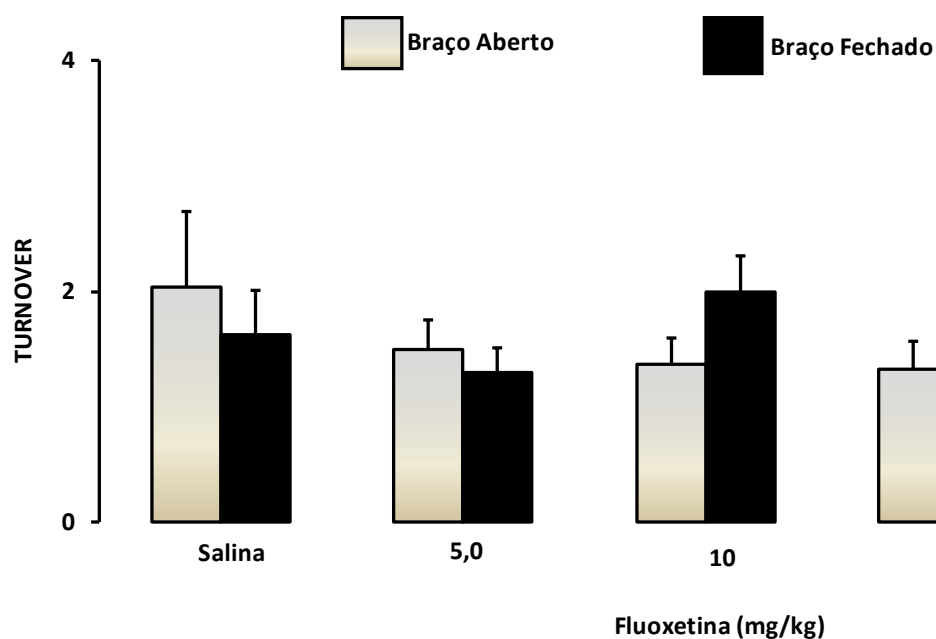


Figura 18. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, 10 e 20 mg/kg, s.c) sobre o turnover de serotonina da SCP em camundongos confinados nos braços, aberto ou fechado do LCE (n=5-7). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do turnover de serotonina.

### 6.2.2. Efeito do tratamento crônico (21 dias) com fluoxetina (5,0 e 20 mg/kg, s.c), sobre a densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal.

Para a análise da densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, a ANOVA de um fator mostrou diferença significativa para o fator tratamento ( $F_{(2,18)}=12,49$ ,  $P < 0,05$ ). O teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que os animais que receberam as duas doses de fluoxetina apresentaram um aumento na densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> da substância cinzenta periaquedutal, quando comparados ao grupo controle.

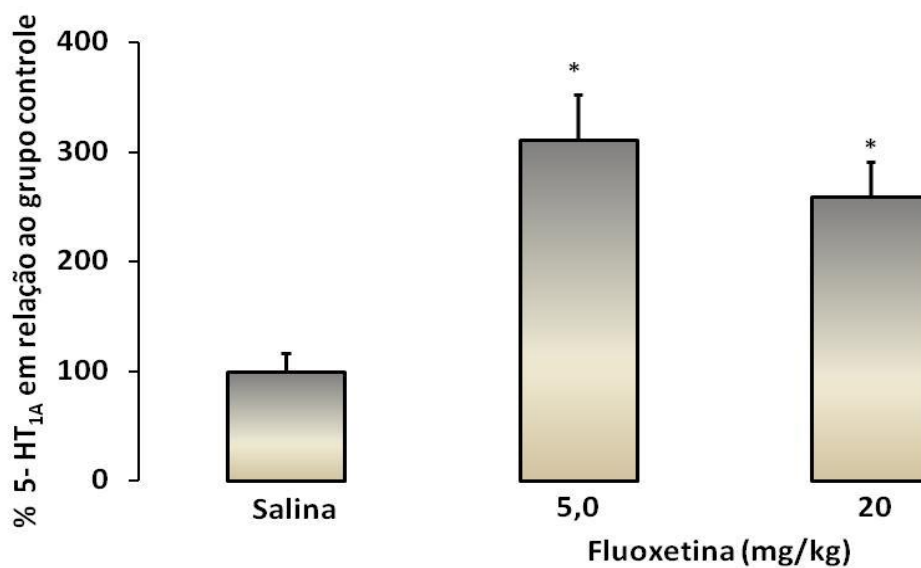


Figura 19. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5, e 20 mg/kg, s.c) sobre a densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> da substância cinzenta periaquedutal em camundongos (n=6-7). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) dos níveis de proteínas para o 5-HT<sub>1A</sub>. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (salina).

Nas avaliações sobre a densidade para os receptores 5-HT<sub>2C</sub>, a ANOVA de um fator mostrou diferença significativa para o fator tratamento ( $F_{(2,23)}=16,40$ ,  $P < 0,05$ ). O teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que os animais que receberam as duas doses de fluoxetina apresentaram um aumento na densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal, quando comparados ao grupo controle.

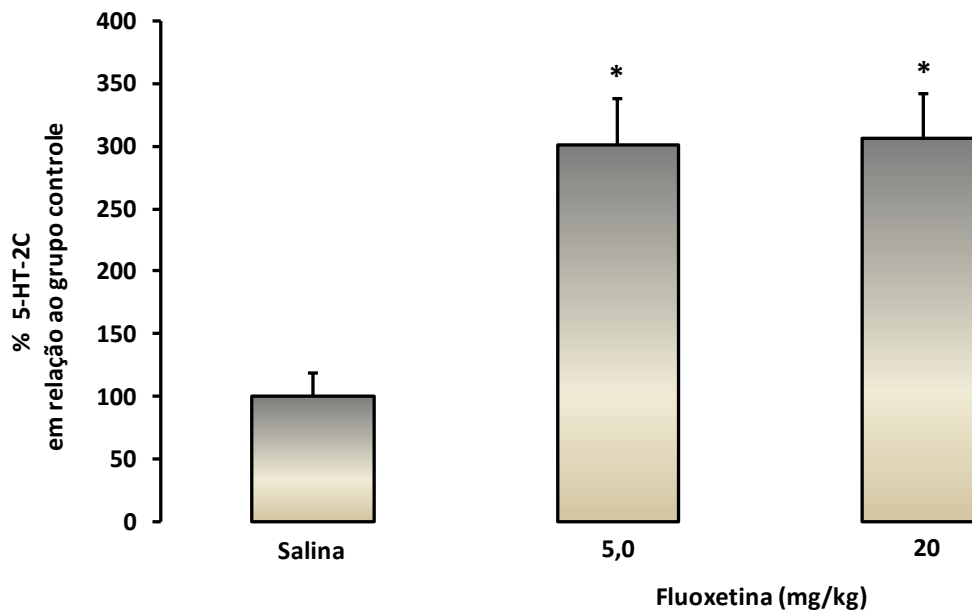


Figura 20. Efeito do tratamento crônico com fluoxetina (5 e 20 mg/kg, s.c) sobre a densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>2C</sub> da substância cinzenta periaquedutal em camundongos (n=6-7). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) dos níveis de proteínas para o 5-HT<sub>2C</sub>. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (salina).

### 6.3. Discussão

Nossas análises que investigaram as concentrações de serotonina, 5-HIAA (ácido hidróxi-indol-acético) e o “turnover” da serotonina na SCP, demonstraram que o tratamento crônico com três doses de fluoxetina (5, 10 e 20mg/kg), não foi capaz de alterar esses parâmetros em camundongos submetidos ao teste de contorções e confinados aos braços aberto e fechados do LCE.

Diversos trabalhos indicam a ocorrência de neuroadaptacões na neurotransmissão serotoninérgica promovidas pela administração crônica de antidepressivos (CHAPUT *et al.*, 1991; SHIODA *et al.*, 2004; WEGENER *et al.*, 2003), inclusive algumas promovidas especificamente pela administração de fluoxetina (GUAN e MCBRIDE, 1988; KOBAYASHI *et al.*, 2008; SARKISSIAN *et al.*, 1990).



Entretanto, nossas análises apresentaram resultados diversos daqueles observados na literatura. Sugerimos que estas diferenças possam estar relacionadas às doses de fluoxetina, as estruturas investigadas e a técnica empregada. Considerando que, em nosso estudo não foi possível avaliar as concentrações extracelulares do neurotransmissor, devido a limitações técnicas, verificamos as concentrações de serotonina, 5-HIAA e turnover na SCP em tecido “*pós mortem*”.

A exemplo destas diferenças, estudos em que foi utilizado microdialise indicam que o tratamento crônico com fluoxetina é capaz de alterar as concentrações de serotonina quando administrada em doses maiores (30mg/kg), no córtex frontal e no núcleo acumbens de ratos (GUAN e MCBRIDE, 1988; SARKISSIAN *et al.*, 1990). Neste sentido, Zanolini e colaboradores (2010), demonstraram que o tratamento crônico com fluoxetina, na dose de 10 mg/kg induziu ao aumento das concentrações extracelulares de serotonina na SCP de ratos.

Embora nossos resultados de avaliação das concentrações de serotonina indiquem uma tendência de aumento dos índices deste neurotransmissor nos animais confinados no braço fechado, quando comparados aos respectivos grupos confinados no braço aberto, este efeito não foi estatisticamente significativo (Fig. 16). Entretanto, para que a interpretação deste resultado possa ser confirmada, análises futuras serão realizadas com o objetivo de comparar os resultados observados com animais que recebam o tratamento com fluoxetina, sem ser submetido ao labirinto.

Os resultados com 5-HIAA mostraram aumento nas concentrações deste metabólito nos animais que receberam a dose de 10mg/kg e foram confinados ao braço fechado (Fig. 17). Entretanto este resultado nos parece ser um efeito inespecífico, tendo em vista que, na avaliação comportamental dos animais que receberam este tratamento, esta dose não alterou a resposta antinociceptiva quando comparada ao grupo controle (Capítulo 3 – Fig. 2). Na investigação de possíveis alterações no turnover de serotonina, índice que

indica atividade da neurotransmissão serotoninérgica (CHI *et al.*, 1999), a análise estatística demonstrou que não há diferença significativa neste parâmetro para nenhuma das doses, e nenhuma das condições a que os camundongos foram expostos (Fig.18).

A realização destas análises em animais que além do tratamento crônico foram submetidos a avaliação comportamental, ocorreu com o objetivo de esclarecer o papel da neurotransmissão serotoninérgica no aumento da antinocicepção e na resposta analgésica observada com a maior dose de fluoxetina (20 mg/kg) (Capítulo 3 – Fig. 2). No entanto, diversos trabalhos demonstraram que estímulos aversivos são capazes de alterar os níveis de serotonina (BELZUNG, EL HAGE, *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2005; ZANOVELI *et al.*, 2009). Tais evidências nos indicam que, o protocolo desenvolvido pode ter dificultado a avaliação acerca de alterações na neurotransmissão serotoninérgica, neste tipo de inibição da nocicepção, obtido após o tratamento crônico com fluoxetina.

Diante destes resultados, sugerimos que, o tratamento sistêmico poderia induzir alterações nas concentrações de serotonina em outras estruturas do SNC relacionadas com a modulação da nocicepção e dos estados aversivos (BUTLER e FINN, 2009; HEINRICHER *et al.*, 2009b). Neste sentido, nosso grupo verificou aumento nas concentrações de serotonina e diminuição no turnover na amígdala, com a dose de 20 mg/kg, em animais confinados nos BA's do LCE (BAPTISTA- DE-SOUZA, 2012).

Estudos recentes indicam que o tratamento crônico com fluoxetina é capaz de induzir alterações plásticas no sistema nervoso central (AMPUERO *et al.*, 2010; GUIRADO *et al.*, 2012; SACHS e CARON, 2014; SAWYER *et al.*, 2012). Considerando esses achados, nossa hipótese é que a ocorrência destas neuroadaptações também possa levar a um balanço nas concentrações de serotonina na SCP.

Nossos resultados utilizando a técnica de Western Blotting, demonstraram que o tratamento crônico com as duas doses de fluoxetina (5 e 20mg/kg) induz aumento na densidade dos níveis de proteínas para os receptores 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> na SCP (Fig. 19).

Cabe ressaltar que estas duas doses foram escolhidas para o desenvolvimento desta etapa do trabalho, em decorrência dos resultados obtidos anteriormente na qual, a dose de 5 mg/kg foi utilizada nas injeções combinadas com agonistas 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> na substância SCP (Capítulo 5 –Fig. 12 e 13), e a dose de 20 mg/kg induziu redução sobre a resposta antinociceptiva (Capítulo 3 – Fig. 2).

Alterações em receptores serotoninérgicos após tratamento com fluoxetina estão amplamente descritas a literatura (BLIER e DEMONTIGNY, 1994; LE POUL *et al.*, 1995; MAJ e MORYL, 1993; TIKHONOVA *et al.*, 2010). Considerando que o mecanismo clássico descrito com a administração de ISRS é aumentar os níveis extracelulares deste neurotransmissor (MESSIHA, 1993), sugerimos que este aumento da demanda do neurotransmissor possa induzir “up-regulation” principalmente de auto-receptores 5-HT<sub>1A</sub> da SCP.

Tendo conhecido o papel destes auto-receptores na liberação de serotonina, esse mecanismo descrito resultaria na diminuição da liberação da serotonina, como mecanismo compensatório à inibição da recaptação (DEAKIN e GRAEFF, 1991). Tal evidência em parte, vai ao encontro dos nossos achados na investigação dos níveis de serotonina na SCP (Fig. 16). Nesta etapa do estudo não observamos alterações nos níveis deste neurotransmissor após tratamento crônico com fluoxetina.

Na avaliação dos níveis de proteínas para os receptores 5-HT<sub>2C</sub> na SCP também observamos aumento na densidade deste subtipo de receptor serotoninérgico em camundongos (Fig. 20). Neste sentido, esse resultado corrobora estudos anteriores em que foi observado “up-regulation” do receptor 5-HT<sub>2C</sub> no plexo coróide de ratos após tratamento crônico com este ISRS (LAAKSO *et al.*, 1996; PALVIMAKI *et al.*, 2005).

Este aumento na densidade de proteínas desta classe de receptores também foi demonstrado em nossas análises realizadas durante o estágio BEPE (Apendice 2). Neste estudo, demonstramos que ratos tratados cronicamente com fluoxetina na dose de 20mg/kg e

submetidos ao modelo de dor neuropática induzida pela oxaliplatina, também apresentaram aumento na densidade de proteínas para os receptores 5-HT<sub>2C</sub> na SCP e amígdala (BAPTISTA-DE-SOUZA *et al.*, 2014).

Conforme descrevemos anteriormente, há evidências na literatura de que a fluoxetina pode atuar como antagonista dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> (NI e MILEDI, 1997; PALVIMAKI *et al.*, 1999; PALVIMAKI *et al.*, 1996). Considerando estes achados, sugerimos que a ocorrência crônica deste antagonismo poderia ser responsável por este aumento nos níveis destes receptores. Neste sentido, nossos resultados observados em conjunto evidenciam que o “up-regulation” dos receptores 5-HT<sub>2C</sub> estaria relacionado a não reversão total pela fluoxetina do efeito obtido com o agonista, como observado no tratamento agudo (Capítulo 5 - Fig 11), mas sim a um prejuízo desta resposta conforme demonstrado na combinação dos tratamentos crônico de fluoxetina e MK-212 intra-SCP (Capítulo 5 - Fig. 13).

***CAPÍTULO 7:***  
***CONCLUSÕES***

De maneira geral, nossos resultados demonstraram que o tratamento sistêmico com fluoxetina acentua a antinocicepção induzida pelo confinamento ao BA do LCE.

Além disso, demonstramos que os receptores 5-HT<sub>2C</sub> localizados na SCP, exercem uma modulação tônica sobre a este tipo de antinocicepção, e a atividade deste subtipo de receptor serotoninérgico, interfere na ação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, presentes nesta estrutura mesencefálica.

A fluoxetina quando administrada agudamente é capaz de atuar como antagonista dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, revertendo o aumento da antinocicepção induzido pelo tratamento intra-SCP de MK-212 (agonista 5-HT<sub>2C</sub>). Entretanto, quando administrada cronicamente, prejudica a facilitação da antinocicepção induzida por ação deste agonista. Este prejuízo pode ser consequência do aumento de proteínas para os receptores 5-HT<sub>2C</sub> localizados na SCP, que teria sido causado pelo antagonismo crônico exercido pela fluoxetina sobre estes receptores.

O tratamento combinado de fluoxetina (agudo e crônico) e agonista 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT) intra-SCP, é capaz de reverter completamente a antinocicepção induzida pelo confinamento ao BA. Esse efeito seria resultado de uma co localização deste subtipo de receptor e receptores 5-HT<sub>2C</sub> na SCP, que somado aos mecanismos desencadeados pelas manipulações farmacológicas (bloqueio dos receptores 5-HT<sub>2C</sub>, pela fluoxetina, e ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> pelo agonista) acarretaria numa hiperpolarização neuronal da estrutura, e como consequência a diminuição da aversividade induzida pelo BA.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. Noncompetitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, n. 2, p. 319-21, Feb 1986.

ALOYO, V. J.; BERG, K. A.; SPAMPINATO, U.; CLARKE, W. P.; HARVEY, J. A. Current status of inverse agonism at serotonin<sub>2A</sub> (5-HT<sub>2A</sub>) and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. **Pharmacol Ther**, v. 121, n. 2, p. 160-73, Feb 2009.

AMPUERO, E.; RUBIO, F. J.; FALCON, R.; SANDOVAL, M.; DIAZ-VELIZ, G.; GONZALEZ, R. E., . . . WYNEKEN, U. Chronic fluoxetine treatment induces structural plasticity and selective changes in glutamate receptor subunits in the rat cerebral cortex. **Neuroscience**, v. 169, n. 1, p. 98-108, Aug 11 2010.

ANDRADE, R.; NICOLL, R. A. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. **J Physiol**, v. 394, p. 99-124, Dec 1987.

APUD ZANGROSSI JUNIOR, H. G., F.G. Modelos Animais. In: ATHENEU (Ed.). **In: .** In: Hetem, L.A. B.; Graeff, F.G. Transtornos de Ansiedade, 2004. p.55-74.

ARGYROPOULOS, S. V.; SANDFORD, J. J.; NUTT, D. J. The psychobiology of anxiolytic drug. Part 2: Pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacol Ther**, v. 88, n. 3, p. 213-27, Dec 2000.

AZMITIA, E. C. Serotonin and brain: Evolution, neuroplasticity, and homeostasis. **Pharmacol of Neurog and Neuroenh**, v. 77, p. 31-+, 2007.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends Neurosci**, v. 17, n. 9, p. 379-89, Sep 1994.

BAPTISTA- DE-SOUZA, D. N.-D.-S., R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. **Chronic treatment with fluoxetine enhances 5-HT levels within the amygdala (but not within the periaqueductal gray) in mice exposed to an aversive situation.** Neuroscience 2012, New Orleans. (SfN 2012) 2012.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; DI CESARE MANNELLI, L.; ZANARDELLI, M.; MICHELI, L.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; GHELARDINI, C. Serotonergic modulation in neuropathy induced by oxaliplatin: effect on the 5HT<sub>2C</sub> receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 735, p. 141-9, Jul 15 2014.

BAPTISTA, D.; BUSSADORI, K.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. **Brain Res**, v. 1294, p. 29-37, Oct 6 2009.

BAPTISTA, D.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray increases antinociception in mice exposed to the elevated plus-maze. **Behavio Brain Res**, v. 235, n. 1, p. 42-47, Nov 1 2012.

BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, v. 86, n. 1-2, p. 11-18, May 2000.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacol**, v. 38, n. 8, p. 1083-1152, Aug 1999.

BECHTHOLT, A. J.; VALENTINO, R. J.; LUCKI, I. Overlapping and distinct brain regions associated with the anxiolytic effects of chlordiazepoxide and chronic fluoxetine. **Neuropsychopharmacol**, v. 33, n. 9, p. 2117-30, Aug 2008.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v. 46, n. 6, p. 575-605, Aug 1995.

BELZUNG, C.; EL HAGE, W.; MOINDROT, N.; GRIEBEL, G. Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. **Neuropharmacol**, v. 41, n. 3, p. 400-8, Sep 2001.

BELZUNG, C.; LE GUIQUET, A. M.; BARREAU, S.; CALATAYUD, F. An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine-induced anxiogenic-like effects in mice. **Behav Pharmacol**, v. 12, n. 3, p. 151-62, Jun 2001.

BLACKBURN-MUNRO, G.; BLACKBURN-MUNRO, R. E. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence? **J Neuroendocrinol**, v. 13, n. 12, p. 1009-23, Dec 2001.

BLIER, P.; DEMONTIGNY, C. Current Advances and Trends in the Treatment of Depression. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 220-226, Jul 1994.

BOGDANOV, A. I.; IARUSHKINA, N. I. [The role of adrenocorticotrophic hormone in inhibition of pain reaction in awake rats]. **Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova**, v. 89, n. 1, p. 60-5, Jan 2003.

BOGDANOV, A. I.; YARUSHKINA, N. N. The relationship between analgesia and corticosteroid levels in rats. **Neurosci Behav Physiol**, v. 30, n. 4, p. 487-9, Jul-Aug 2000.

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. S. A Perceptual-Defensive-Recuperative Model of Fear and Pain. **Behavi and Brain Sci**, v. 3, n. 2, p. 291-301, 1980.

BORNHOVD, K.; QUANTE, M.; GLAUCHE, V.; BROMM, B.; WEILLER, C.; BUCHEL, C. Painful stimuli evoke different stimulus-response functions in the amygdala, prefrontal, insula and somatosensory cortex: a single-trial fMRI study. **Brain**, v. 125, n. Pt 6, p. 1326-36, Jun 2002.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurg Clin N Am**, v. 25, n. 4, p. 629-38, Oct 2014.

BRANDÃO, M. L. **As Bases Biológicas do Comportamento: Introdução à Neurociência**. São Paulo: E.P.U, 2004.

BRANDAO, M. L.; ANSELONI, V. Z.; PANDOSSIO, J. E.; DE ARAUJO, J. E.; CASTILHO, V. M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 6, p. 863-75, 1999.



BRANDAO, M. L.; TRONCOSO, A. C.; DE SOUZA SILVA, M. A.; HUSTON, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 225-33, Feb 28 2003.

BRANDAO, M. L.; ZANOVELI, J. M.; RUIZ-MARTINEZ, R. C.; OLIVEIRA, L. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behav Brain Res**, v. 188, n. 1, p. 1-13, Mar 17 2008.

BRANDÃO, M. L. G., F.G. **Neurobiologia dos transtornos mentais**. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

BRISTOW, L. J.; O'CONNOR, D.; WATTS, R.; DUXON, M. S.; HUTSON, P. H. Evidence for accelerated desensitisation of 5-HT(2C) receptors following combined treatment with fluoxetine and the 5-HT(1A) receptor antagonist, WAY 100,635, in the rat. **Neuropharmacol**, v. 39, n. 7, p. 1222-36, Apr 27 2000.

BRODIE, B. B.; SHORE, P. A. A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 66, n. 3, p. 631-42, Mar 14 1957.

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

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

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

CANTO DE SOUZA, A.; NUNES DE SOUZA, R. L.; PELA, I. R.; GRAEFF, F. G. High intensity social conflict in the Swiss albino mouse induces analgesia modulated by 5-HT1A receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 56, n. 3, p. 481-6, Mar 1997.

CARLSSON, A. Structural specificity for inhibition of [14C]-5-hydroxytryptamine uptake by cerebral slices. **J Pharm Pharmacol**, v. 22, n. 10, p. 729-32, Oct 1970.

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

CARRASCO, G. A.; VAN DE KAR, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 235-72, Feb 28 2003.

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

CARVALHO, M. C.; ALBRECHET-SOUZA, L.; MASSON, S.; BRANDAO, M. L. Changes in the biogenic amine content of the prefrontal cortex, amygdala, dorsal

hippocampus, and nucleus accumbens of rats submitted to single and repeated sessions of the elevated plus-maze test. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 12, p. 1857-66, Dec 2005.

CHAPUT, Y.; DE MONTIGNY, C.; BLIER, P. Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. An in vivo electrophysiologic study in the rat. **Neuropsychopharmacol**, v. 5, n. 4, p. 219-29, Dec 1991.

CHEN, Y.; PENG, L.; ZHANG, X.; STOLZENBURG, J. U.; HERTZ, L. Further evidence that fluoxetine interacts with a 5-HT<sub>2C</sub> receptor in glial cells. **Brain Res Bull**, v. 38, n. 2, p. 153-9, 1995.

CHI, J. D.; ODONTIADIS, J.; FRANKLIN, M. Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, v. 731, n. 2, p. 361-7, Aug 20 1999.

CICCOCIOPPO, R.; PANOCCA, I.; POLIDORI, C.; DOURISH, C. T.; MASSI, M. Blockade of pre- and post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors does not modify the effect of fluoxetine or 5-hydroxytryptophan on ethanol and food intake in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 134, n. 1, p. 55-63, Nov 1997.

CLEMETT, D. A.; PUNHANI, T.; DUXON, M. S.; BLACKBURN, T. P.; FONE, K. C. Immunohistochemical localisation of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor protein in the rat CNS. **Neuropharmacol**, v. 39, n. 1, p. 123-32, 2000.

COIMBRA, N. C.; BRANDAO, M. L. Effects of 5-HT<sub>2</sub> receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behav Brain Res**, v. 87, n. 1, p. 97-103, Aug 1997.

COIMBRA, N. C.; DE OLIVEIRA, R.; FREITAS, R. L.; RIBEIRO, S. J.; BORELLI, K. G.; PACAGNELLA, R. C., . . . BRANDAO, M. L. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. **Exp Neurol**, v. 197, n. 1, p. 93-112, Jan 2006.

CONCEICAO, I. M.; MAIOLINI JUNIOR, M.; MATTIA, N.; VITAL, M. A.; SANTOS, B. R.; SMAILI, S.; FRUSSA-FILHO, R. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 8, p. 831-4, 1992.

CONN, P. J.; SANDERS-BUSH, E. Relative efficacies of piperazines at the phosphoinositide hydrolysis-linked serotonergic (5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1c</sub>) receptors. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 242, n. 2, p. 552-7, Aug 1987.

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

\_\_\_\_\_. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition? **Physiology & Behavior**, v. 96, n. 3, p. 440-447, Mar 2 2009.

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

DAWSON, L. A.; NGUYEN, H. Q. The role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B/1D) receptors on the modulation of acute fluoxetine-induced changes in extracellular 5-HT: the mechanism of action of (+/-)pindolol. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 6, p. 1044-52, Apr 3 2000.

DE BORTOLI, V. C.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H., JR. Effects of fluoxetine and bupirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 183, n. 4, p. 422-8, Jan 2006.

DE LUCA-VINHAS, M. C.; MACEDO, C. E.; BRANDAO, M. L. Pharmacological assessment of the freezing, antinociception, and exploratory behavior organized in the ventrolateral periaqueductal gray. **Pain**, v. 121, n. 1-2, p. 94-104, Mar 2006.

DE LUCA, M. C. Z.; BRANDAO, M. L.; MOTTA, V. A.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Antinociception induced by stimulation of ventrolateral periaqueductal gray at the freezing threshold is regulated by opioid and 5-HT2A receptors as assessed by the tail-flick and formalin tests. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, n. 2, p. 459-466, May 2003.

DE PAULA SOARES, V.; ZANGROSSI, H., JR. Involvement of 5-HT1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain Res Bull**, v. 64, n. 2, p. 181-8, Aug 30 2004.

DE VRY, J.; SCHREIBER, R.; MELON, C.; DALMUS, M.; JENTZSCH, K. R. 5-HT1A receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 14, n. 6, p. 487-95, Dec 2004.

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

DEPAULIS, A.; BANDLER, R.; VERGNES, M. Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. **Brain Res**, v. 486, n. 1, p. 121-32, May 1 1989.

DESCARRIES, L.; RIAD, M. Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT1A receptors and SERT. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 367, n. 1601, p. 2416-25, Sep 5 2012.

DREMENCOV, E.; WEIZMANN, Y.; KINOR, N.; GISPAN-HERMAN, I.; YADID, G. Modulation of dopamine transmission by 5HT2C and 5HT3 receptors: a role in the antidepressant response. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 165-75, Feb 2006.

DURCAN, M. J.; LISTER, R. G.; ECKARDT, M. J.; LINNOILA, M. Behavioral interactions of fluoxetine and other 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors with ethanol in tests of anxiety, locomotion and exploration. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 96, n. 4, p. 528-33, 1988.

ENGIN, E.; TREIT, D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: a systematic review. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1399-419, Aug 1 2008.

FANSELOW, M. S. The Midbrain Periaqueductal Gray as a Coordinator of Action in Response to Fear and Anxiety. **Midbrain Periaqueductal Gray Matter**, v. 213, p. 151-173, 1991.

FIELDS, H. L. B., A.I.; HEINRICHER, M.M. **Central nervous system mechanisms of pain modulation**. In: MCMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). Wall and Melzack's textbook of pain.: 5th. ed. Churchill Livingstone, 2006

FILE, S. E. Usefulness of animal models with newer anxiolytics. **Clin Neuropharmacol**, v. 15 Suppl 1 Pt A, p. 525A-526A, 1992.

FRASER, H. F.; HARRIS, L. S. Narcotic and Narcotic Antagonist Analgesics. **Annual Review of Pharmacology**, v. 7, p. 277-&, 1967.

FREO, U.; ORI, C.; DAM, M.; MERICO, A.; PIZZOLATO, G. Effects of acute and chronic treatment with fluoxetine on regional glucose cerebral metabolism in rats: implications for clinical therapies. **Brain Res**, v. 854, n. 1-2, p. 35-41, Jan 31 2000.

GAWADE, S. P. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. **J Pharmacol Pharmacother**, v. 3, n. 4, p. 348, Oct 2012.

GOMES, K. S.; DE CARVALHO-NETTO, E. F.; MONTE, K. C.; ACCO, B.; NOGUEIRA, P. J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Contrasting effects of acute and chronic treatment with imipramine and fluoxetine on inhibitory avoidance and escape responses in mice exposed to the elevated T-maze. **Brain Res Bull**, v. 78, n. 6, p. 323-7, Mar 30 2009.

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

GOMEZ, F.; VENERO, C.; VIVEROS, M. P.; GARCIA-GARCIA, L. Short-term fluoxetine treatment induces neuroendocrine and behavioral anxiogenic-like responses in adolescent male rats. **Exp Brain Res**, Dec 17 2014.

GORDON, J. A.; HEN, R. The serotonergic system and anxiety. **Neuromolecular Med**, v. 5, n. 1, p. 27-40, 2004.

GRAEFF, F. G. [Serotonin, periaqueductal gray matter and panic disorder]. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 25 Suppl 2, p. 42-5, Dec 2003.

\_\_\_\_\_. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 239-59, May 2004.

GRIEBEL, G.; RODGERS, R. J.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 57, n. 4, p. 817-27, Aug 1997.

GUAN, X. M.; MCBRIDE, W. J. Fluoxetine increases the extracellular levels of serotonin in the nucleus accumbens. **Brain Res Bull**, v. 21, n. 1, p. 43-6, Jul 1988.

GUIRADO, R.; SANCHEZ-MATARREDONA, D.; VAREA, E.; CRESPO, C.; BLASCO-IBANEZ, J. M.; NACHER, J. Chronic fluoxetine treatment in middle-aged rats induces changes in the expression of plasticity-related molecules and in neurogenesis. **BMC Neurosci**, v. 13, p. 5, 2012.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 327, n. 1, p. 1-5, Aug 1984.

HANNON, J.; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behav Brain Res**, v. 195, n. 1, p. 198-213, Dec 16 2008.

HEINRICHER, M. M.; TAVARES, I.; LEITH, J. L.; LUMB, B. M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 214-25, Apr 2009a.

\_\_\_\_\_. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 214-225, Apr 2009b.

HELMSTETTER, F. J. Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 44, n. 2, p. 433-8, Feb 1993.

HENSLER, J. G.; TRUETT, K. A. Effect of chronic serotonin-2 receptor agonist or antagonist administration on serotonin-1A receptor sensitivity. **Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 5, p. 354-64, Nov 1998.

HOMBERG, J. R.; SCHUBERT, D.; GASPAR, P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, n. 2, p. 60-5, Feb 2010.

HUNT, S. K. M. **The Neurobiol. of Pain**. Oxford University: 2005.

HYTTEL, J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). **Int Clin Psychopharmacol**, v. 9 Suppl 1, p. 19-26, Mar 1994.

IASP, I. A. F. T. S. O. P. <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576#Pain> 2012.

KAVALIERS, M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Res Bull**, v. 21, n. 6, p. 923-31, Dec 1988.

KEAY, K. A.; CLEMENT, C. I.; DEPAULIS, A.; BANDLER, R. Different representations of inescapable noxious stimuli in the periaqueductal gray and upper cervical spinal cord of freely moving rats. **Neuroscience Letters**, v. 313, n. 1-2, p. 17-20, Nov 2 2001.

KELLY, D. D. The role of endorphins in stress-induced analgesia. **Ann N Y Acad Sci**, v. 398, p. 260-71, 1982.

KLIMEK, V.; ZAK-KNAPIK, J.; MACKOWIAK, M. Effects of repeated treatment with fluoxetine and citalopram, 5-HT uptake inhibitors, on 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the rat brain. **J Psychiatry Neurosci**, v. 19, n. 1, p. 63-7, Jan 1994.

KOBAYASHI, K.; IKEDA, Y.; HANEDA, E.; SUZUKI, H. Chronic fluoxetine bidirectionally modulates potentiating effects of serotonin on the hippocampal mossy fiber synaptic transmission. **J Neurosci**, v. 28, n. 24, p. 6272-80, Jun 11 2008.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, Oct 16 2008.

KURT, M.; ARIK, A. C.; CELIK, S. The effects of sertraline and fluoxetine on anxiety in the elevated plus-maze test in mice. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 11, n. 2, p. 173-80, 2000.

LAAKSO, A.; PALVIMAKI, E. P.; KUOPPAMAKI, M.; SYVALAHTI, E.; HIETALA, J. Chronic citalopram and fluoxetine treatments upregulate 5-HT<sub>2c</sub> receptors in the rat choroid plexus. **Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 143-51, Aug 1996.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 597-652, Dec 2001.

LE POUL, E.; LAARIS, N.; HAMON, M.; LANFUMEY, L. Fluoxetine-induced desensitization of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors is independent of glucocorticoid(s). **Synapse**, v. 27, n. 4, p. 303-12, Dec 1997.

LE POUL, E.; LIMA, L.; LAPORTE, A. M.; EVEN, C.; DOUCET, E.; FATTACCINI, C. M., . . . LANFUMEY, L. [Central serotonin receptors and chronic treatment with selective serotonin reuptake inhibitors in the rat: comparative effects of fluoxetine and paroxetine]. **Encephale**, v. 21, n. 2, p. 123-32, Mar-Apr 1995.

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

\_\_\_\_\_. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. **Behav Pharmacol**, v. 2, n. 6, p. 491-496, Dec 1991.

LESCH, K. P.; HOH, A.; SCHULTE, H. M.; OSTERHEIDER, M.; MULLER, T. Long-term fluoxetine treatment decreases 5-HT<sub>1A</sub> receptor responsivity in obsessive-compulsive disorder. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 105, n. 3, p. 415-20, 1991.

LESTER, L. S.; FANSELOW, M. S. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. **Behav Neurosci**, v. 99, n. 4, p. 756-9, Aug 1985.

LEWIS, J. W. Multiple neurochemical and hormonal mechanisms of stress-induced analgesia. **Ann N Y Acad Sci**, v. 467, p. 194-204, 1986.

LI, Q.; MUMA, N. A.; BATTAGLIA, G.; VAN DE KAR, L. D. Fluoxetine gradually increases [125I]DOI-labelled 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors in the hypothalamus without changing the levels of Gq- and G11-proteins. **Brain Res**, v. 775, n. 1-2, p. 225-8, Nov 14 1997.

LISTER, R. G. The Use of a Plus-Maze to Measure Anxiety in the Mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOHOF, A. M.; MORGAN, M. M.; SOHN, J. H.; LIEBESKIND, J. C. Involvement of the periaqueductal gray matter and serotonin in the analgesia produced by stimulation of the nucleus tractus solitarius. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 30, p. 267-8, 1987.

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

MAJ, J.; MORYL, E. Effects of fluoxetine given chronically on the responsiveness of 5-HT receptor subpopulations to their agonists. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 3, n. 2, p. 85-94, Jun 1993.

MCCLEANE, G. Antidepressants as analgesics. **CNS Drugs**, v. 22, n. 2, p. 139-56, 2008.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-9, Nov 19 1965.

MENDES-GOMES, J.; MIGUEL, T. T.; AMARAL, V. C.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Corticosterone does not change open elevated plus maze-induced antinociception in mice. **Horm Behav**, v. 60, n. 4, p. 408-13, Sep 2011.

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

\_\_\_\_\_. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation. **Behavioural Brain Research**, v. 203, n. 2, p. 180-187, Nov 5 2009.

MESSIHA, F. S. Fluoxetine: a spectrum of clinical applications and postulates of underlying mechanisms. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 17, n. 4, p. 385-96, Winter 1993.

MICO, J. A.; ARDID, D.; BERROCOSO, E.; ESCHALIER, A. Antidepressants and pain. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, n. 7, p. 348-54, Jul 2006.

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

\_\_\_\_\_. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, n. 6, p. 355-474, Apr 2002.

MONGEAU, R.; MARTIN, C. B. P.; CHEVARIN, C.; MALDONADO, R.; HAMON, M.; ROBLEDO, P.; LANFUMEY, L. Antidepressant-induced functional adaptive changes in 5-HT<sub>2C</sub> receptors: are they underlying their anxiolytic effects? **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. S181-S181, Aug 2010.

MORGAN, M. M. Differences in Antinociception Evoked from Dorsal and Ventral Regions of the Caudal Periaqueductal Gray-Matter. **Midbrain Periaqueductal Gray Matter**, v. 213, p. 139-150, 1991.

NASH, L. T.; HACK, S. The pharmacological treatment of anxiety disorders in children and adolescents. **Expert Opin Pharmacother**, v. 3, n. 5, p. 555-71, May 2002.

NETTO, C. A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. **Behav Neural Biol**, v. 48, n. 2, p. 304-9, Sep 1987.

NEUGEBAUER, V.; GALHARDO, V.; MAIONE, S.; MACKEY, S. C. Forebrain pain mechanisms. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 226-42, Apr 2009.

NEWMAN, M. E.; SHALOM, G.; RAN, A.; GUR, E.; VAN DE KAR, L. D. Chronic fluoxetine-induced desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> autoreceptors: regional differences and effects of WAY-100635. **Eur J Pharmacol**, v. 486, n. 1, p. 25-30, Feb 13 2004.

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

NOGUEIRA, R. L.; GRAEFF, F. G. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 52, n. 1, p. 1-6, Sep 1995.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R. V.; GRAEFF, F. G.; PELA, I. R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 300-310, Jun 2000.

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

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

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

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



PALVIMAKI, E. P.; LAAKSO, A.; KUOPPAMAKI, M.; SYVALAHTI, E.; HIETALA, J. Up-regulation of beta 1-adrenergic receptors in rat brain after chronic citalopram and fluoxetine treatments. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 115, n. 4, p. 543-6, Aug 1994.

PALVIMAKI, E. P.; MAJASUO, H.; SYVALAHTI, E.; HIETALA, J. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis in rat choroid plexus after fluoxetine and citalopram treatments. **Pharmacol Res**, v. 51, n. 5, p. 419-25, May 2005.

PALVIMAKI, E. P.; ROTH, B. L.; MAJASUO, H.; LAAKSO, A.; KUOPPAMAKI, M.; SYVALAHTI, E.; HIETALA, J. Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. **Psychopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 234-240, Aug 1996.

PAXINOS, G. F., K.B.J The mouse brain in stereotaxic coordinates. **California: Elsevier Science.**, 2001.

PEDERSEN, L. H.; NIELSEN, A. N.; BLACKBURN-MUNRO, G. Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. **Psychopharmacology**, v. 182, n. 4, p. 551-561, Nov 2005.

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

PINHEIRO, S. H.; ZANGROSSI, H., JR.; DEL-BEN, C. M.; GRAEFF, F. G. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **An Acad Bras Cienc**, v. 79, n. 1, p. 71-85, Mar 2007.

POBBE, R. L.; ZANGROSSI, H., JR.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 21, n. 4, p. 306-15, Apr 2011.

RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; TURNER, J.; COLLINSWORTH, G.; GETTYS, T. W., . . . GARNOVSKAYA, M. N. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacol Ther**, v. 92, n. 2-3, p. 179-212, Nov-Dec 2001.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, n. 3878, p. 444-5, Apr 25 1969.

RIAD, M.; GARCIA, S.; WATKINS, K. C.; JODOIN, N.; DOUCET, E.; LANGLOIS, X., . . . DESCARRIES, L. Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. **J Comp Neurol**, v. 417, n. 2, p. 181-94, Feb 7 2000.

ROBERT, G.; DRAPIER, D.; BENTUE-FERRER, D.; RENAULT, A.; REYMANN, J. M. Acute and chronic anxiogenic-like response to fluoxetine in rats in the elevated plus-maze: modulation by stressful handling. **Behav Brain Res**, v. 220, n. 2, p. 344-8, Jul 7 2011.

RODGERS, R. J.; HENDRIE, C. A. Social conflict activates status-dependent endogenous analgesic or hyperalgesic mechanisms in male mice: effects of naloxone on nociception and behaviour. **Physiol Behav**, v. 30, n. 5, p. 775-80, May 1983.

RODGERS, R. J.; LEE, C.; SHEPHERD, J. K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 106, n. 1, p. 102-10, 1992.

RODGERS, R. J.; RANDALL, J. I. Acute non-opioid analgesia in defeated male mice. **Physiol Behav**, v. 36, n. 5, p. 947-50, 1986.

SACHS, B. D.; CARON, M. G. Chronic Fluoxetine Increases Extra-Hippocampal Neurogenesis in Adult Mice. **Int J Neuropsychopharmacol**, Oct 31 2014.

SALCHNER, P.; SINGEWALD, N. Neuroanatomical substrates involved in the anxiogenic-like effect of acute fluoxetine treatment. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 8, p. 1238-48, Dec 2002.

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

SANCHEZ, C. Serotonergic mechanisms involved in the exploratory behaviour of mice in a fully automated two-compartment black and white text box. **Pharmacol Toxicol**, v. 77, n. 1, p. 71-8, Jul 1995.

SANCHEZ, C.; MEIER, E. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they all alike? **Psychopharmacology (Berl)**, v. 129, n. 3, p. 197-205, Feb 1997.

SARKISSIAN, C. F.; WURTMAN, R. J.; MORSE, A. N.; GLEASON, R. Effects of fluoxetine or D-fenfluramine on serotonin release from, and levels in, rat frontal cortex. **Brain Res**, v. 529, n. 1-2, p. 294-301, Oct 8 1990.

SAWYER, E. K.; MUN, J.; NYE, J. A.; KIMMEL, H. L.; VOLL, R. J.; STEHOUWER, J. S., . . . HOWELL, L. L. Neurobiological changes mediating the effects of chronic fluoxetine on cocaine use. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 8, p. 1816-24, Jul 2012.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 1, p. 1-20, Mar 2003.

SCHREIBER, S.; PICK, C. G. From selective to highly selective SSRIs: a comparison of the antinociceptive properties of fluoxetine, fluvoxamine, citalopram and escitalopram. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 16, n. 6, p. 464-8, Aug 2006.

SHIH, Y. Y. I.; CHIANG, Y. C.; CHEN, J. C.; HUANG, C. H.; CHEN, Y. Y.; LIU, R. S., . . . JAW, F. S. Brain nociceptive imaging in rats using F-18-fluorodeoxyglucose small-animal positron emission tomography. **Neuroscience**, v. 155, n. 4, p. 1221-1226, Sep 9 2008.

SHIODA, K.; NISIJIMA, K.; YOSHINO, T.; KATO, S. Extracellular serotonin, dopamine and glutamate levels are elevated in the hypothalamus in a serotonin syndrome animal model induced by tranylcypromine and fluoxetine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 28, n. 4, p. 633-40, Jul 2004.

SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H. R.; NUNES DE SOUZA, R. L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 481-90, Winter 1990.

SILVA, M. T.; ALVES, C. R.; SANTAREM, E. M. Anxiogenic-like effect of acute and chronic fluoxetine on rats tested on the elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 3, p. 333-9, Mar 1999.

SILVA, R. C.; BRANDAO, M. L. Acute and chronic effects of gepirone and fluoxetine in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 65, n. 2, p. 209-16, Feb 2000.

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

SNYDER, S. H.; MEYERHOF, J. L. How Amphetamine Acts in Minimal Brain Dysfunction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 205, n. Feb28, p. 310-320, 1973.

SOARES, V. D.; ZANGROSSI, H. Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-like effect in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 1, p. 178-185, Jan 30 2009.

SOMMER, C. Serotonin in pain and analgesia. **Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 2, p. 117-125, Oct 2004.

\_\_\_\_\_. Is serotonin hyperalgesic or analgesic? **Curr Pain Headache Rep**, v. 10, n. 2, p. 101-6, Apr 2006.

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

SUBHASH, M. N.; SRINIVAS, B. N.; VINOD, K. Y.; JAGADEESH, S. Modulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mediated response by fluoxetine in rat brain. **J Neural Transm**, v. 107, n. 3, p. 377-87, 2000.

SUZUKI, R.; RYGH, L. J.; DICKENSON, A. H. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 12, p. 613-7, Dec 2004.

TERENIUS, L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)**, v. 32, n. 3, p. 317-20, 1973.

TERMAN, G. W.; SHAVIT, Y.; LEWIS, J. W.; CANNON, J. T.; LIEBESKIND, J. C. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. **Science**, v. 226, n. 4680, p. 1270-7, Dec 14 1984.

TIKHONOVA, M. A.; ALPERINA, E. L.; TOLSTIKOVA, T. G.; BAZOVKINA, D. V.; DI, V. Y.; IDOVA, G. V., . . . POPOVA, N. K. Effects of chronic fluoxetine treatment on catalepsy and the immune response in mice with a genetic predisposition to freezing reactions: the roles of types 1A and 2A serotonin receptors and the tph2 and SERT genes. **Neurosci Behav Physiol**, v. 40, n. 5, p. 521-7, Jun 2010.

TOMKINS, G. E.; JACKSON, J. L.; O'MALLEY, P. G.; BALDEN, E.; SANTORO, J. E. Treatment of chronic headache with antidepressants: a meta-analysis. **Am J Med**, v. 111, n. 1, p. 54-63, Jul 2001.

TORRES, I. L.; VASCONCELLOS, A. P.; SILVEIRA CUCCO, S. N.; DALMAZ, C. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 2, p. 241-4, Feb 2001.

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

TYNAN, R. J.; WEIDENHOFER, J.; HINWOOD, M.; CAIRNS, M. J.; DAY, T. A.; WALKER, F. R. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. **Brain Behav Immun**, v. 26, n. 3, p. 469-79, Mar 2012.

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

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

VANDER WENDE, C. M., S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **S. Fed. Proc.**, v. 15, p. 494, 1956.

VERTES, R. P.; FORTIN, W. J.; CRANE, A. M. Projections of the median raphe nucleus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 407, n. 4, p. 555-582, May 17 1999.

VICENTE, M. A.; ZANGROSSI, H. Serotonin-2C receptors in the basolateral nucleus of the amygdala mediate the anxiogenic effect of acute imipramine and fluoxetine administration. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 15, n. 3, p. 389-400, Apr 2012.

WEGENER, G.; BANDPEY, Z.; HEIBERG, I. L.; MORK, A.; ROSENBERG, R. Increased extracellular serotonin level in rat hippocampus induced by chronic citalopram is augmented by subchronic lithium: neurochemical and behavioural studies in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 166, n. 2, p. 188-94, Mar 2003.

WILLIS, W. D. Spinal control of ascending pathways. **Prog Brain Res**, v. 50, p. 163-74, 1979.

WONG, D. T.; BYMASTER, F. P. Subsensitivity of serotonin receptors after long-term treatment of rats with fluoxetine. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v. 32, n. 1, p. 41-51, Apr 1981.

ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: Contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46P3, p. 397-406, Oct 2014.

ZANOVELI, J. M.; CARVALHO, M. C.; CUNHA, J. M.; BRANDAO, M. L. Extracellular serotonin level in the basolateral nucleus of the amygdala and dorsal periaqueductal gray under unconditioned and conditioned fear states: an in vivo microdialysis study. **Brain Res**, v. 1294, p. 106-15, Oct 19 2009.

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

ZANOVELI, J. M.; POBBE, R. L.; DE BORTOLI, V. C.; CARVALHO, M. C.; BRANDAO, M. L.; ZANGROSSI, H., JR. Facilitation of 5-HT<sub>1A</sub>-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 13, n. 8, p. 1079-88, Sep 2010.

ZHANG, Y.; D'SOUZA, D.; RAAP, D. K.; GARCIA, F.; BATTAGLIA, G.; MUMA, N. A.; VAN DE KAR, L. D. Characterization of the functional heterologous desensitization of hypothalamic 5-HT(1A) receptors after 5-HT(2A) receptor activation. **J Neurosci**, v. 21, n. 20, p. 7919-27, Oct 15 2001.

# ***APÊNDICE 1***

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

**This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.**

**Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.**

**In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:**

**<http://www.elsevier.com/copyright>**

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

## Behavioural Brain Research

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

## Research report

Activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the dorsal periaqueductal gray increases antinociception in mice exposed to the elevated plus-mazeDaniela Baptista<sup>a,b</sup>, Ricardo Luiz Nunes-de-Souza<sup>b,c,e</sup>, Azair Canto-de-Souza<sup>a,b,d,e,\*</sup><sup>a</sup> Psychobiology Group, Department of Psychology, CECH–UFSCar, São Carlos, SP 13565-905, Brazil<sup>b</sup> Joint Graduate Program in Physiological Sciences UFSCar, UNESP, Rod. Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil<sup>c</sup> Laboratory of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, University of Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP 14801-902, Brazil<sup>d</sup> Joint Graduate Program in Psychology UFSCar, Rod. Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil<sup>e</sup> Institute for Neuroscience & Behavior–IneC, USP, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

## HIGHLIGHTS

- ▶ Intra-dPAG injection of 8-OHDPAT does not change open-arm confinement-induced antinociception (OAA).
- ▶ Activation of 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptors located within dPAG facilitates OAA.
- ▶ Facilitation of the OAA is selectively and completely blocked by intra-dPAG ketanserin.
- ▶ dPAG 5-HT<sub>2C</sub> receptors have distinct roles in the modulation of anxiety and OAA.

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 March 2012

Received in revised form 29 June 2012

Accepted 7 July 2012

Available online xxx

## Keywords:

Antinociception

Elevated plus-maze

Periaqueductal gray matter

5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors

Mice

## ABSTRACT

Several findings have pointed to the role of the dorsal periaqueductal gray (dPAG) serotonin 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A–C</sub> receptor subtypes in the modulation of defensive behavior in animals exposed to the elevated plus-maze (EPM). Besides displaying anxiety-like behavior, rodents also exhibit antinociception in the EPM. This study investigated the effects of intra-dPAG injections of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor ligands on EPM-induced antinociception in mice. Male Swiss mice received 0.1 μl intra-dPAG injections of vehicle, 5, 6 and 10 nmol of 8-OHDPAT, a 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist (Experiment 1), or 0.01, 0.03 and 0.1 nmol of mCPP, a 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor agonist (Experiment 2). Five minutes later, each mouse received an intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g body weight; nociceptive stimulus) and was individually confined in the open (OA) or enclosed (EA) arms of the EPM for 5 min, during which the number of abdominal writhes induced by the acetic acid was recorded. While intra-dPAG injection of 8-OHDPAT did not change open-arm antinociception (OAA), mCPP (0.01 nmol) enhanced it. Combined injections of ketanserin (10 nmol/0.1 μl), a 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist, and 0.01 nmol of mCPP (Experiment 3), selectively and completely blocked the OAA enhancement induced by mCPP. Although intra-dPAG injection of mCPP (0.01 nmol) also produced antinociception in EA-confined mice (Experiment 2), this effect was not confirmed in Experiment 3. Moreover, no other compound changed the nociceptive response in EA-confined animals. These results suggest that the 5-HT<sub>2C</sub> receptors located within the PAG play a role in this type of environmentally induced pain inhibition in mice.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

There is suggestive evidence showing that aversive emotional states (e.g., fear) reduce the pain response to noxious stimuli (e.g.,

*Abbreviations:* PAG, periaqueductal gray matter; EPM, elevated plus-maze; OAA, open arm antinociception; 5-HT, serotonin; dPAG, dorsal periaqueductal gray; OA, open arms; EA, enclosed arms; LD cycle, light-dark cycle; ETM, elevated T-maze.

\* Corresponding author at: Psychobiology Group, Department of Psychology, CECH–UFSCar, São Carlos, SP 13565-905, Brazil. Tel.: +55 16 3351 8462; fax: +55 16 3351 8489.

E-mail address: [souzaalm@power.ufscar.br](mailto:souzaalm@power.ufscar.br) (A. Canto-de-Souza).

0166-4328/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.008>

[1–4]). Concerning the fact that animals display pain inhibition when confronted with threatening situations. Bolles and Fanselow [1] pointed out that this reaction has a clear adaptive value, since it gives the animal an opportunity to exhibit defensive behavior, even though an injury has occurred, thereby increasing its chances of survival.

It has been demonstrated that the exposure of rodents to an elevated plus-maze (EPM: an apparatus in the shape of a plus sign, with two open and two enclosed walled arms, each with an open roof, raised from the floor), a widely used animal model of anxiety [5], besides inducing defensive behavioral responses, also elicits antinociception [6–9]. Evidence showing that the open arms of the



EPM are the main source of danger that elicits antinociception can be found elsewhere [7,9–12]. Briefly, contrasting the intense open-arm induced antinociception (OAA), the confinement of rats [10] and mice [11,13] in a totally enclosed EPM (i.e., with four enclosed arms) does not elicit pain inhibition assessed through the formalin test or writhing test. Moreover, we have demonstrated that the confinement of mice to the open arm of the EPM markedly reduces the nociceptive response [12,14].

In order to investigate the underlying mechanisms in the mediation of OAA, previous studies have focused on the use of intracerebral infusion of anti-aversive drugs in forebrain and mid-brain limbic structures. In this context, it has been demonstrated that intra-amygdala injection of midazolam, a benzodiazepine receptor agonist [15], attenuates anxiety [12] and OAA [12,14]. However, when injected into the periaqueductal gray (PAG), a midbrain structure closely related to the modulation of emotional states and nociception [16–21], midazolam only attenuated anxiety-like behavior, without affecting the nociceptive response [11], suggesting that the PAG GABA-benzodiazepine complex plays differential roles in the modulation of anxiety and OAA.

Beyond the various typical and atypical neurotransmitter systems present within the PAG matter (e.g., glutamate, nitric oxide, corticotrophin releasing factor) that might modulate OAA, the monoamine serotonin (5-HT) system seems to be a strong candidate. This indoleamine has long been implicated in the modulation of defensive behaviors. Indeed, it is widely acknowledged that 5-HT plays a dual role in the regulation of anxiety and fear, a role that in part depends upon its action at different 5-HT receptor subtypes and in different limbic forebrain and brainstem structures [22]. Various studies have shown that electrical or chemical stimulation of the dorsal region of the PAG (dPAG) in rats [23–25] and mice [26,27] induces vigorous aversive responses (e.g., aimless vertical jumping and freezing behavior). These responses, which are very similar to escape reactions elicited by natural predators [28], are markedly attenuated by activation of 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2</sub> receptors within the PAG [22,29–32]. For instance, intra-PAG infusions of mCPP (1-(3-chlorophenyl)piperazine), a 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor agonist, reduce anxiety-like behavior in mice exposed to the EPM, an effect that is completely blocked by local infusion of ketanserin [34], a 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonist [33]. The hypothesis that serotonin has an anti-anxiety action at the 5-HT<sub>2C</sub> receptors in this midbrain structure is strengthened by results reported by Gomes and Nunes-de-Souza [35], who observed that intra-PAG injection of DOI ((±)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane hydrochloride), a preferential 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist, did not change anxiety, while local infusion of MK-212 (6-chloro-2-(1-piperazinyl) pyrazine hydrochloride), a preferential 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist, produced an anxiolytic-like effect in maze-exposed mice.

Concerning the potential role of 5-HT within the PAG in the modulation of nociception, there is suggestive evidence to suggest that the analgesia induced by electrical stimulation of the PAG is mainly observed when electrodes are placed in its dorsal portions, which, in turn, express a high density of serotonergic receptors [36–38]. Furthermore, the role of PAG 5HT<sub>1</sub> and 5HT<sub>2</sub> serotonergic receptors has also been assessed in nociceptive responses to various pain stimuli. For instance, Canto-de-Souza et al. [39] observed that intra-PAG injections of BAY R1531 (a 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist) reduced the antinociception in mice exposed to the social conflict test. Regarding to the 5-HT<sub>2</sub> receptors, previous studies have shown that intra-PAG injection of ketanserin, a 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist, inhibited the antinociception induced by electrical stimulation of this limbic midbrain structure [40,41].

In view of these findings, the present study investigated the role of the PAG 5HT<sub>1A</sub> and 5HT<sub>2</sub> receptors in the OAA. To that end, the effects of intra-dPAG injections of 8-OHDPAT and mCPP, as well as

the combined injections of ketanserin and mCPP, on nociception were recorded in mice confined to the enclosed arm or open arm of the EPM.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Subjects

The subjects were adult male Swiss mice, weighing 25–30 g (Federal University of São Carlos, SP, Brazil), housed in groups of 10 per cage (cage size: 41 cm × 34 cm × 16 cm). They were maintained under a normal 12:12 h light-dark (LD) cycle (lights on: 7:00 a.m.) in a temperature (24 ± 1 °C) controlled environment. Food and drinking water were freely available except during the brief test periods. The experiments were carried out during the light phase of the LD cycle (9:00–16:00). Different batches of experimentally naive mice were used for each experiment.

### 2.2. Drugs

8-OH-DPAT [(±)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin hydrobromide; Sigma, MW: 328.3 g (5.6 and 10 nmol)]; mCPP [(1-(3-chlorophenyl)piperazine); Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA; (0.01, 0.03 and 0.1 nmol)] and ketanserin [3-[2-[4-(4-fluorobenzoyl)-1-piperidinyl]ethyl]-2,4[1H,3H]-quinazolinone] tartrate; Tocris Cookson Inc., Ballwin, USA; (10 nmol)]. The doses used were based on previous studies [12,34]. All doses were prepared in a vehicle of physiological saline with 10% of Tween 80 and 0.1 μl was injected. The same vehicle was injected without drug into animals of the control group (vehicle group).

### 2.3. Surgery and microinjection

A stainless-steel guide cannula (25-gauge × 7 mm; Insight Instruments, Brazil) was implanted in mice under ketamine + xylazine anesthesia (100 mg/kg and 10 mg/kg, i.p.) in a stereotaxic frame (Insight Instruments, Brazil). The guide cannula was fixed to the skull with dental acrylic and jeweler's screws. Stereotaxic coordinates for the target site in the dPAG were 4.1 mm posterior to bregma, 1.3 mm lateral to the midline and 1.2 mm ventral to skull surface. The guide cannula was implanted at an angle of angled 26° to the vertical and was aimed to terminate 2 mm from the target site. A dummy cannula (33-gauge stainless steel wire; Fishtex®, Brazil), inserted into the guide cannula at the time of surgery, served to reduce the incidence of occlusion. Before tests, mice were allowed 4–5 days to recover from surgery. Postoperative analgesia was provided for 2 days by adding acetaminophen solution (200 mg/ml) to the drinking water at a dilution of 0.2 ml acetaminophen solution in 250 ml water (final concentration 0.16 mg/ml) [42].

Solutions were injected into the dPAG by a microinjection unit (33-gauge stainless steel cannula, Insight Instruments, Brazil), that extended 2 mm beyond the tip of the guide cannula. The microinjection unit was connected to a 10 μl Hamilton microsyringe via polyethylene tubing (PE-10) and the rate of flow was controlled by an infusion pump (BI 2000–Insight Instruments, Brazil) programmed to deliver 0.1 μl of each solution over a period of 60 s. The microinjection procedure consisted of gently restraining the mouse, inserting the injection unit, infusing the solution for 60 s and keeping the injection unit in place for 90 s. The movement of a small air bubble in the PE-10 tubing, during and after the microinjection, confirmed the delivery of the solution.

### 2.4. Apparatus and general procedure

The basic EPM design was very similar to that originally described by Lister [43]. It comprised two open arms (OA: 30 cm × 5 cm × 0.25 cm) and two enclosed arms (EA: 30 cm × 5 cm × 15 cm) that extended in a cross from a common central platform (5 cm × 5 cm), the entire maze being raised to a height 38.5 cm above floor level. Confinement to an OA or EA was achieved by placing an easily removable gate at the proximal end of each arm of the EPM. All testing was conducted under moderate illumination (77 lux; measured on the central platform of the EPM) during the light phase of the LD cycle.

Nociception was assessed by the writhing test previously described by Vanderwende and Margolin [44]. In the present study, writhes were induced by injecting 0.1 ml/10 g b.w. of 0.6% acetic acid i.p., 5 min after the intra-PAG drug injection. They were then individually confined to either an OA or an EA of the EPM for 5 min, during which the number of writhes was recorded. Between subjects, the maze was thoroughly cleaned with 20% ethanol and dried with a cloth. All sessions were video-recorded with a camera linked to a monitor and DVD in an adjacent laboratory.

#### 2.4.1. Experiment 1: Effects of intra-dPAG 8-OH-DPAT on OAA in mice

Four to five days after surgery for guide-cannula implantation, mice received an intra-PAG injection of vehicle or 8-OH-DPAT (5.6 or 10 nmol) and, 5 min later, an i.p. injection of 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g b.w.), a nociceptive stimulus. Half of the animals in each group (i.e., vehicle, 5.6 or 10 nmol) were confined to the OA and half to the EA of the EPM, to record the number of writhes during a 5 min period. A similar experimental protocol was repeated in the experiments described below.

#### 2.4.2. Experiment 2: Dose-dependent effects of intra-dPAG mCPP on OAA in mice

Mice received an intra-dPAG injection of vehicle or mCPP (0.01, 0.03 or 0.1 nmol) and, 5 min later, an i.p. injection of 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g b.w.). Half of the animals in each group were confined to the OA and half to the EA of the EPM, to record the number of writhes during a 5 min period.

#### 2.4.3. Experiment 3: Effects of combined injections of ketanserin and mCPP into the dPAG on OAA in mice

Mice received intra-dPAG injections of ketanserin (0 or 10 nmol/0.1  $\mu$ l) and, 5 min later, mCPP (0 or 0.01 nmol/0.1  $\mu$ l). Five minutes after the mCPP, each mouse received an intraperitoneal injection of 0.6% acetic acid (0.1 ml/10 g b.w.). Half of the animals in each group were confined to the OA and half to the EA of the EPM, to record the number of writhes during a 5 min period.

#### 2.5. Histology

At the end of testing, all animals received a 0.1  $\mu$ l infusion of 1% methylene blue, by the microinjection procedure described above. The animals were then killed by anesthetic overdose (300 mg/kg ketamine + 30 mg/kg xylazine, i.p.), their brains removed, and injection sites verified histologically against the atlas of Paxinos and Franklin [45]. Data from animals with injection sites outside the dorsal periaqueductal gray were excluded from the study.

#### 2.6. Statistical analysis

In the Experiments 1 and 2 the data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) (treatment  $\times$  type of confinement). In Experiment 3, the data were analyzed by three-way analysis of variance (ANOVA) (treatment 1  $\times$  treatment 2  $\times$  type of confinement). Significant *F* values were followed up by Duncan's multiple range tests. A *P* value of 0.05 or less was required for significance.

#### 2.7. Ethics

The experiments reported in this study were performed in compliance with the recommendations of the Brazilian Society of Neuroscience and Behavior (SBNeC), based on the US National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of the Federal University of São Carlos (Res. 040/2009).

### 3. Results

The histological analysis confirmed that 222 mice received cannula implantation in the PAG and 90.1% of these being located within the dPAG (Fig. 1). Sixty-one subjects were used to investigate the effects of intra-PAG 8-OH-DPAT (vehicle, 5.6 or 10 nmol) on OAA [Experiment 1: Vehicle [OA (*n* = 12) and EA (*n* = 10)], 8-OHDPAT 5.6 nmol [OA (*n* = 11) and EA (*n* = 07)], 10 nmol [OA (*n* = 12) and EA (*n* = 09)]. Ninety-two animals were used to investigate the effects of intra-PAG mCPP (0.01, 0.03, or 0.1 nmol) on OAA [Experiment 2: Vehicle [OA (*n* = 13) and EA (*n* = 12)], mCPP 0.01 nmol [OA (*n* = 11) and EA (*n* = 10)], 0.03 nmol [OA (*n* = 12) and EA (*n* = 11)], 0.1 nmol [OA (*n* = 12) and EA (*n* = 11)]. Sixty-nine mice were used to assess the effects of combined injections of ketanserin (10 nmol) and mCPP (0.01 nmol) intra-PAG on OAA [Experiment 3: vehicle + vehicle [OA (*n* = 7) and EA (*n* = 9)], vehicle + mCPP [OA (*n* = 10) and EA (*n* = 8)], ketanserin + vehicle [OA (*n* = 9) and EA (*n* = 8)], ketanserin + mCPP [OA (*n* = 9) and EA (*n* = 9)].

#### 3.1. Experiment 1: Test for effects of intra-dPAG 8-OHDPAT on OAA in mice

Two-way ANOVA revealed statistically significant effects for the type of confinement factor ( $F_{(1,55)} = 37.48, P < 0.05$ ), but no significant effects were observed for the treatment factor ( $F_{(2,55)} = 1.13, P > 0.05$ ) or treatment versus type of confinement interaction ( $F_{(2,55)} = 0.64, P > 0.05$ ). The post hoc Duncan test indicated that the number of writhes was significantly higher in EA-confined animals than in the OA group (Table 1).

**Table 1**

Lack of effect of intra-dPAG injection of vehicle or 8-OH-DPAT (5.6 or 10 nmol/0.1  $\mu$ l) on OAA in mice (*n* = 7–12/group).

Treatment	Number of writhes	
	Open arm	Enclosed arm
Vehicle	4.00 $\pm$ 0.73 <sup>#</sup>	9.90 $\pm$ 0.97
8-OH-DPAT (5.6 nmol/0.1 $\mu$ l)	3.91 $\pm$ 1.06 <sup>#</sup>	7.57 $\pm$ 0.81
8-OH-DPAT (10 nmol/0.1 $\mu$ l)	2.73 $\pm$ 0.83 <sup>#</sup>	8.22 $\pm$ 1.27

Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

<sup>#</sup> *P* < 0.05 versus EA confined group.

#### 3.2. Experiment 2: Effects of intra-dPAG mCPP on OAA in mice

Two-way ANOVA revealed statistically significant effects for the type of confinement factor [ $F(1,80) = 106.68, P < 0.0001$ ] and for the treatment factor [ $F(3,80) = 11.31, P < 0.05$ ], but no effect for treatment versus type of confinement interaction [ $F(3,80) = 0.15, P > 0.05$ ]. The post hoc Duncan test indicated that the number of writhes was significantly higher in EA-confined animals than in the OA group, regardless of the dose of mCPP the mice had received. However, the animals confined to the EA or the OA groups and injected with 0.01 nmol of mCPP displayed lower numbers of writhes than their respective control groups (Fig. 2).

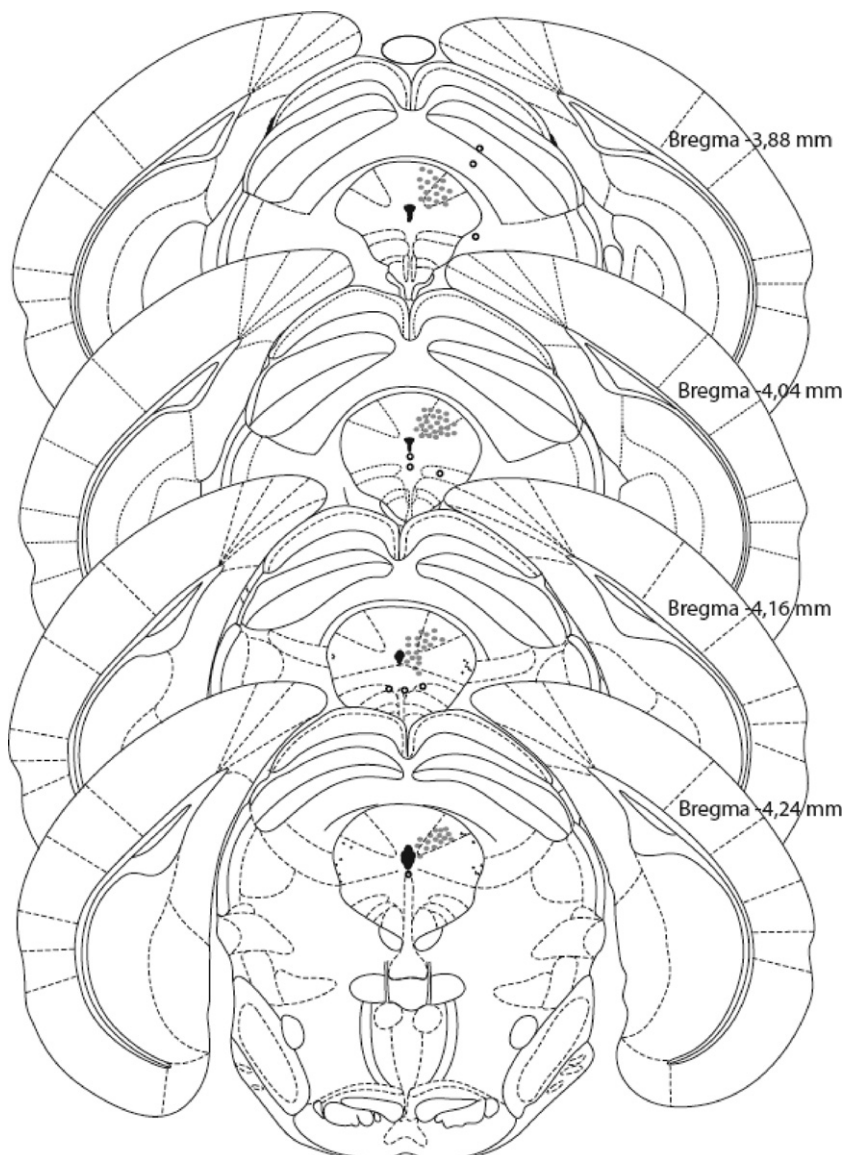
#### 3.3. Experiment 3: Effects of combined injections of ketanserin and mCPP into the dPAG on OAA in mice

Three-way ANOVA revealed statistically significant effects for type of confinement factor [ $F(7,63) = 48.96, P < 0.0001$ ], for treatment 1  $\times$  treatment 2 interaction [ $F(7,63) = 6.73, P < 0.05$ ] and for treatment 1  $\times$  treatment 2  $\times$  type of confinement interaction [ $F(7,63) = 4.14, P < 0.05$ ]. No effects were observed for treatment 1 factor [ $F(7,63) = 1.94, P > 0.05$ ] or for treatment 2 factor [ $F(7,63) = 0.19, P > 0.05$ ]. Post hoc analyses confirmed that the number of writhes was significantly higher in EA-confined animals than in the OA group, and that OA-confined animals treated with 0.01 nmol of mCPP (vehicle + mCPP) exhibited fewer abdominal contortions than the respective control group (vehicle + vehicle). Ketanserin pretreatment (ketanserin + vehicle) per se did not significantly alter the number of writhes in both EA- and OA-confined groups. However, animals treated with ketanserin + mCPP and confined to the OA showed no statistical difference in the number of writhes from the respective control group (vehicle + vehicle). Overall, these data indicate that the enhancement of the OA-induced antinociception observed in mice treated with mCPP was blocked by intra-PAG ketanserin pretreatment (Fig. 3).

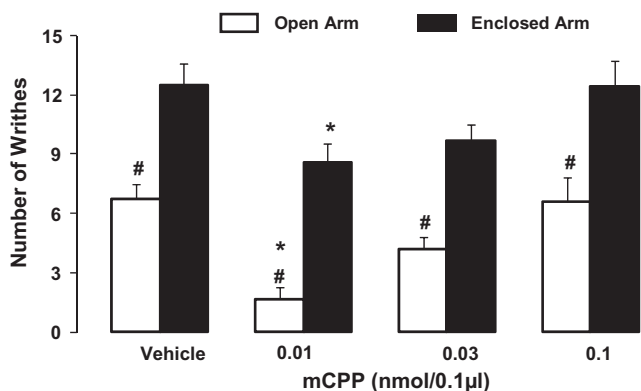
### 4. Discussion

The main results of the present study show that while activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor within the dPAG does not change OAA, injection of a low dose of mCPP, a 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor agonist, intensified it, an effect that was selectively and completely blocked by prior local injection of ketanserin, a 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist.

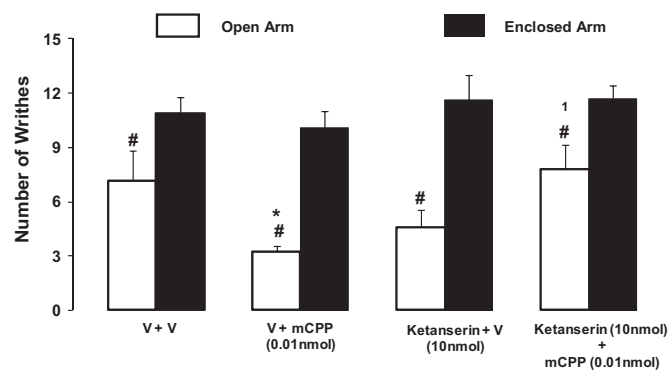
The role played by PAG 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the modulation of defensive behavior of rodents has been extensively investigated elsewhere [31,46,47]. Briefly, intra-dPAG infusions of 5-HT<sub>1A</sub> agonists produce anxiolytic-like effects in rats exposed to the elevated T-maze (ETM) [48,49] and in rodents exposed to various tests of anxiety (for a review see [47,50,51]). In this light, we hypothesized that activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors within the dPAG could also attenuate OAA, by a type of threat-induced pain inhibition. However, intra-dPAG injection of 8-OH-DPAT did not change OAA, suggesting that serotonin does not act on 5-HT<sub>1A</sub> receptors located within this midbrain structure to modulate this environmentally



**Fig. 1.** Map showing histological results sketched on to the Atlas of Paxinos and Franklin [45]. The filled circles represent the sites of drug infusion. Unfilled circles represent the locations at which the infusion occurred outside the periaqueductal gray.



**Fig. 2.** Effect of local intra-dPAG injection of vehicle or mCPP (0.01, 0.03 and 0.1 nmol/0.1 μl) on OAA in mice ( $n=7-12$ ). Data are presented as mean ± SEM. # $P<0.05$  versus EA confined group. \* $P<0.05$  versus respective control (vehicle) group.



**Fig. 3.** Effects of combined injections of ketanserin (10 nmol/0.1 μl) and mCPP (0.01 nmol/0.1 μl) intra-dPAG on OAA in mice ( $n=7-10$ ). Data are presented as mean ± SEM. # $P<0.05$  versus EA confined group. \* $P<0.05$  versus respective control group (v+v). <sup>1</sup>  $P<0.05$  versus vehicle+mCPP group (v+mCPP) and ketanserin + vehicle (ketanserin + v) group.



induced antinociception. Present results seem to corroborate previous findings showing that intra-dPAG infusions of 8-OH-DPAT, at the same doses used in this study, failed to change anxiety in maze-naïve or maze-experienced mice [35].

The failure of intra-dPAG 8-OH-DPAT to attenuate OAA has also been reported when this 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist is injected into the amygdala [12]. However, while present results do not show any effect of 8-OH-DPAT injection into the PAG on open arm exploration, activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors within the amygdala increased anxiety-like behavior in mice exposed to the EPM [12]. Together, these findings suggest that 5-HT does not play a role in the modulation of OAA and anxiety that involves 5-HT<sub>1A</sub> receptors located within the dPAG, whereas its action on amygdaloid 5-HT<sub>1A</sub> receptors differentially affects these processes, i.e., this indoleamine increases anxiety without changing OAA. However, given that a modest trend toward reduced writhing was observed with 8-OH-DPAT, it remains to be determined whether higher doses of this drug would produce an effect similar to mCPP on OAA.

Although not as thoroughly investigated as the 5-HT<sub>1A</sub> receptors, the role played by 5-HT<sub>2</sub> receptors in the modulation of emotional states has also received appreciable attention in published work. It has been shown that activation of 5-HT<sub>2</sub> receptors within the PAG leads to attenuation of aversive-like behavior in rodents [22,31,34,51,52]. Although there is evidence that serotonin changes defensive behavior at all three different 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes (i.e., 2A, 2B and 2C), the role played by 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the modulation of aversive emotions has recently received more attention [34,35,48,53,54]. For instance, Yamashita et al. [55] have recently demonstrated that intra-dPAG injections of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists, MK-212 and RO-600175, increased inhibitory avoidance acquisition in rats tested in the elevated T-maze (ETM), suggesting an anxiogenic effect in rats exposed to this EPM-related animal test of panic and anxiety [56].

In mice, pharmacological manipulations with 5-HT<sub>2</sub> receptor ligands within the dPAG also indicate that the 2C receptor subtype is markedly involved in the modulation of anxiety-like behavior. However, while activation of this serotonin receptor subtype elicits anxiety in the dPAG of rats, in mice the prominent effect following intra-dPAG injection of a 5-HT<sub>2C</sub> agonist is anxiolysis. For instance, intra-dPAG injection of mCPP increases open arm exploration in the EPM [34], suggesting an anxiolytic-like effect of this 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor agonist [33]. Importantly, this effect was selectively and completely blocked in this study by prior local injection of ketanserin, a 5-HT<sub>2A/2C</sub> antagonist [33], suggesting that the mCPP anxiolytic-like effect is via activation of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor subtype. Similarly, ketanserin totally prevented the reduction of anxiety observed following disinhibition of 5-HT neurons in the median raphe nucleus [54].

The hypothesis that serotonin has an antianxiety effect on the 5-HT<sub>2C</sub> receptors in this midbrain structure is strengthened by results showing that intra-PAG injection of DOI ((±)-1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane hydrochloride), a preferential 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonist, does not change anxiety, while local infusion of MK-212 (6-chloro-2-(1-piperazinyl)pyrazine hydrochloride), a preferential 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist, produces an anxiolytic-like effect in mice exposed to the EPM [35].

In light of the above evidence, we hypothesized that the OAA, as a response to aversive situations, would be attenuated by activation of the 5-HT<sub>2C</sub> receptors within the mouse dPAG. However, contrary to our assumption, the present results showed that activation of dPAG 5-HT<sub>2C</sub> receptors enhanced OAA. Although injection of 0.01 nmol mCPP into the dPAG also reduced nociceptive response in EA-confined animals (Experiment 2), which might indicate an intrinsic effect of this 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptor agonist on nociceptive response, injections of higher doses of mCPP (Experiment 2) or even combined injections with vehicle (vehicle + mCPP, Experiment 3)

did not confirm this effect. Thus, remarkably, the activation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors increased antinociception only in OA-confined animals. In other words, intra-dPAG mCPP seemed to facilitate endogenous antinociceptive mechanisms triggered by threatening situations, such as the OA experience. It is also interesting that the effects of intra-PAG mCPP did not intensify with higher doses; rather, effects were substantially lost. However, it should be recalled that mCPP has high affinity for 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors [33] and that these actions may cancel one another at higher doses. It remains unclear how mCPP increase OAA. Considering that PAG projects densely to the rostral ventromedial medulla (RVM), which in turn plays a role in the descending pain inhibitory mechanisms [57], activation of 5-HT<sub>2</sub> receptors within the PAG might intensify OAA via stimulation of RVM neurons. Interestingly the facilitation of OAA by mCPP was completely blocked by prior intra-dPAG injection of ketanserin. As a preferential 5-HT<sub>2A/2C</sub> antagonist [33], the blockade of the facilitatory effect of mCPP on OAA observed with ketanserin strongly suggests that this type of aversive situation-induced antinociception is mediated by 5-HT<sub>2C</sub> receptors within this limbic midbrain area. Importantly, intra-dPAG ketanserin by itself neither changed OAA nor altered the nociceptive response in mice confined to the enclosed arms of the EPM, suggesting a selective effect of this 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist in blocking the facilitatory effects of mCPP on OAA. Evidence showing that ketanserin does not exert intrinsic effects on nociception but rather does block antinociception induced by aversive stimuli has been shown in studies of electrical stimulation of the midbrain tectum [37,40]. Moreover, systemic administration of ketanserin also inhibits the antinociception induced by convulsant doses of pentylenetetrazole in rats [58].

The failure of ketanserin alone to block OAA suggests that other neurotransmitters and systems play a role in the modulation of pain inhibition in mice exposed to this aversive situation [59]. Further studies are necessary to clarify the underlying mechanisms of OAA.

In conclusion, present results demonstrate that while the activation of dPAG 5-HT<sub>1A</sub> receptors do not play a role in OAA, activation of 5-HT<sub>2B/2C</sub> receptors located within this midbrain structure facilitates this type of pain inhibition. Given that previous studies have shown that activation of the PAG 5-HT<sub>2C</sub> receptors attenuate anxiety-like behavior (e.g., [34,35]), present results indicate that serotonin plays distinct roles in the modulation of anxiety and OAA at these receptor subtypes. Further studies using more selective ligands will be necessary in order to identify which specific 5-HT<sub>2</sub> receptor subtype is involved in this fear-induced antinociception.

## Acknowledgments

D. Baptista received a scholarship from CAPES and FAPESP (09/17938-6) and R.L. Nunes-de-Souza received a CNPq research fellowship (303580/2009-7). The authors would like to thank Lara Maria Silveira and Gabriel Fachini for their technical assistance.

## References

- [1] Bolles RC, Fanselow MS. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and Brain Sciences* 1980;3:291–322.
- [2] Siegfried B, Frischknecht HR, Nunes-de-Souza RL. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1990;14:481–90.
- [3] Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1995;52:297–303.
- [4] Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology* 2009;88:184–202.
- [5] Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior. The elevated plus-maze model 20 years. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2005;29:1193–205.

- [6] Stephens N, Meldrum S, Weidmann R, Schneider C, Grutzner M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharmacology* 1986;1:6–169.
- [7] Lee C, Rodgers RJ. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology* 1990;102:507–13.
- [8] Taukulis HK, Goggin CE. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. *Behavioral and Neural Biology* 1990;53:205–16.
- [9] Conceição IM, Maiolini Jr M, Mattia N, Vital MA, Santos BR, Smaili S, et al. Anxiety-induced antinociception in the mouse. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1992;25:831–4.
- [10] Cornélio AM, Nunes-de-Souza RL. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition. *Physiology and Behavior* 2009;96:440–7.
- [11] Mendes-Gomes J, Nunes-de-Souza RL. Concurrent nociceptive stimulation impairs anxiolytic effect midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. *Brain Research* 2005;9:7–104.
- [12] Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza ALM, Fornari RV, Costa M, Pela IR, Graeff FG. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intramygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology* 2000;150(3):300–10.
- [13] Mendes-Gomes J, Nunes-de-Souza RL. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: influence of concurrent nociceptive stimulation. *Behavioural Brain Research* 2009;203:180–7.
- [14] Baptista D, Bussadori KM, Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: influence of prior test experience. *Brain Research* 2009;1294:29–37.
- [15] Greenblatt DJ, Shader RI, Abernathy DR. Current status of benzodiazepines. *New England Journal of Medicine* 1983;309:354–8.
- [16] Bandler R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal grey region. In: Epstein A, Morrison A, editors. *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*. New York: Academic Press; 1988. p. 67–154.
- [17] Graeff FG. Brain defense systems and anxiety. In: Roth M, Borrows GD, Noyes R, editors. *Handbook of Anxiety*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1990. p. 307–54.
- [18] Bandler R, Carrive P, Zhang SP. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. *Progress in Brain Research* 1991;87:269–305.
- [19] Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research* 1993;58:27–47.
- [20] Coimbra NC, Tomaz C, Brandão ML. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. *Behavioural Brain Research* 1992;50:77–83.
- [21] Coimbra NC, Brandão ML. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Behavioural Brain Research* 1993;59:131–9.
- [22] Deakin JFW, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology* 1991;54:305–15.
- [23] Aguiar DC, Moreira FA, Guimarães FS. Flight reactions induced by injection of glutamate N-methyl-D-aspartate receptor agonist into the rat dorsolateral periaqueductal gray are not dependent on endogenous nitric oxide. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2006;83:296–301.
- [24] Bandler R, Depaulis A, Vergnes M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. *Behavioural Brain Research* 1985;15(2):107–19.
- [25] Di Scala G, Schmitt P, Karli P. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Research* 1984;309(2):199–208.
- [26] Carvalho-Netto EF, Markham C, Blanchard CD, Nunes-de-Souza RL, Blanchard RJ. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2006;85:140–7.
- [27] Miguel TT, Nunes-de-Souza RL. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. *Brain Research* 2006;1076:42–8.
- [28] Blanchard RJ, Blanchard DC. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology* 1988;39:43–68.
- [29] Castilho VM, Brandão ML. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rats. *Psychopharmacology* 2001;155:154–62.
- [30] Graeff FG, Guimarães FS, Andrade TGCS, Deakin JFW. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996;54(1):129–41.
- [31] Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2004;3:239–59.
- [32] Oliveira LC, Broia AC, de Macedo CE, Landeira-Fernandez J, Brandão ML. 5-HT<sub>2</sub> receptor mechanisms of the dorsal periaqueductal gray in the conditioned and unconditioned fear in rats. *Psychopharmacology* 2007;191:253–62.
- [33] Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Journal of Neurology* 1999;38:1083–152.
- [34] Nunes-de-Souza V, Nunes-de-Souza R, Rodgers RJ, Canto-de-Souza A. 5-HT<sub>2</sub> receptor activation in the midbrain periaqueductal (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. *Behavioural Brain Research* 2008;87:72–9.
- [35] Gomes KS, Nunes-de-Souza RL. The implication of the 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> (but not 5-HT<sub>1A</sub>) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2009;33:1261–9.
- [36] Coimbra NC, Oliveira RD, Freitas RL, Ribeiro SJ, Borelli KG, Pacagnella RC, et al. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. *Experimental Neurology* 2006;197:93–112.
- [37] Coimbra NC, Brandão ML. Effects of 5-HT<sub>2</sub> receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. *Behavioural Brain Research* 1997;87:97–103.
- [38] Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, De Araújo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1999;23:863–75.
- [39] Canto-de-Souza A, Nunes-de-Souza RL, Pela IR, Graeff FG. Involvement of the midbrain periaqueductal gray 5-HT<sub>1A</sub> receptors in social conflict induced analgesia in mice. *European Journal of Pharmacology* 1998;345:253–6.
- [40] De Luca-Vinhas MCZ, Brandão ML, Motta VA, Landeira-Fernandez J. Antinociception induced by stimulation of ventrolateral periaqueductal gray at the freezing threshold is regulated by opioid and 5-HT<sub>2A</sub> receptors as assessed by the tail-flick and formalin tests. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2003;75:459–66.
- [41] De Luca-Vinhas MCZ, Macedo CE, Brandão ML. Pharmacological assessment of the freezing, antinociception, and exploratory behavior organized in the ventrolateral periaqueductal gray. *Pain* 2006;121:94–104.
- [42] Messier C, Émond S, Ethier K. New techniques in stereotaxic surgery and anesthesia in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1999;63(2):313–8.
- [43] Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987;92:180–5.
- [44] Vanderwende C, Margolin S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. *Federation Proceedings* 1956;15:494.
- [45] Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Science; 2001.
- [46] Menard J, Treit J. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1999;23:591–613.
- [47] Engin E, Treit D. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: a systematic review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2008;32(6):1399–419.
- [48] Soares VP, Zangrossi Jr H. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. *Brain Research Bulletin* 2004;64:181–8.
- [49] Soares VP, Zangrossi Jr H. Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> or 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-like effect in rats. *Behavioural Brain Research* 2009;197:178–85.
- [50] Nogueira RL, Graeff FG. Role of 5-HT receptor subtypes in the modulation of dorsal periaqueductal gray generated aversion. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1995;52:1–6.
- [51] Pobbe RLH, Zangrossi Jr H, Blanchard C, Blanchard RJ. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors. *European Neuropsychopharmacology* 2011;21(4):306–15.
- [52] Oliveira TS, De Bortoli VC, Zangrossi Jr H. Serotonin-2A receptor regulation of panic-like behavior in the rat dorsal periaqueductal gray matter: the role of GABA. *Psychopharmacology* 2011;218(4):725–32.
- [53] Zanoveli JM, Nogueira RL, Zangrossi Jr H. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. *European Journal of Pharmacology* 2003;473:153–61.
- [54] Nunes-de-Souza V, Nunes-de-Souza R, Rodgers RJ, Canto-de-Souza A. Blockade of 5-HT<sub>2</sub> receptors in the periaqueductal grey matter (PAG) abolishes the anxiolytic-like effect of 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist in the median raphe nucleus in mice. *Behavioural Brain Research* 2011;225(2):547–53.
- [55] Yamashita PSM, De Bortoli VC, Zangrossi Jr H. 5-HT<sub>2C</sub> receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray. *Neuropharmacology* 2011;60:216–22.
- [56] Graeff FG, Zangrossi Jr H. Animal models of anxiety. In: D'Haenen H, Den Boer JA, Willner P, editors. *Biological Psychiatry*. 2002. p. 1–15.
- [57] Fields HL, Basbaum AI, Heinricher MM. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon SB, Koltzenburg M, editors. *Wall & Melzack's Textbook of Pain*. 5 ed. Philadelphia, USA: Elsevier; 2006. p. 125–42.
- [58] Freitas RL, Ferreira CMR, Ribeiro SJ, Carvalho AD, Elias-Filho DH, Cairasco NG, et al. Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study. *Experimental Neurology* 2005;191:225–42.
- [59] Millan MJ. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology* 2002;66:355–474.

# ***APÊNDICE 2***



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## European Journal of Pharmacology

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

## Neuropharmacology and analgesia

Serotonergic modulation in neuropathy induced by oxaliplatin: Effect on the 5HT<sub>2C</sub> receptor

Daniela Baptista-de-Souza<sup>a,b,c,\*</sup>, Lorenzo Di Cesare Mannelli<sup>c</sup>, Matteo Zanardelli<sup>c</sup>, Laura Micheli<sup>c</sup>, Ricardo Luiz Nunes-de-Souza<sup>b</sup>, Azair Canto-de-Souza<sup>a,b</sup>, Carla Ghelardini<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Psychobiology Group/Department of Psychology/CECH–UFSCar, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

<sup>b</sup> Joint Graduate Program in Physiological Sciences UFSCar/UNESP, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

<sup>c</sup> Department of Neuroscience, Psychology, Drug Research and Child Health – Neurofarba – Pharmacology and Toxicology Section, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 October 2013

Received in revised form

16 April 2014

Accepted 17 April 2014

Available online 29 April 2014

## Keywords:

Oxaliplatin

Fluoxetine

Periaqueductal gray matter (PAG)

Spinal cord

Amygdala

5-HT<sub>2C</sub> receptors

## ABSTRACT

Fluoxetine has been shown to be effective in clinical and experimental studies of neuropathic pain. Besides to increase serotonin levels in the synaptic cleft, fluoxetine is able to block the serotonergic 5-HT<sub>2C</sub> receptor subtype, which in turn has been involved in the modulation of neuropathic pain. This study investigated the effect of repeated treatments with fluoxetine on the neuropathic nociceptive response induced by oxaliplatin and the effects of both treatments on 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression and protein levels in the rat spinal cord (SC), rostral ventral medulla (RVM), midbrain periaqueductal gray (PAG) and amygdala (Amy). Nociception was assessed by paw-pressure, cold plate and Von Frey tests. Fluoxetine prevented mechanical hypersensitivity and pain threshold alterations induced by oxaliplatin but did not prevent the impairment in weight gain induced by this anticancer drug. Ex vivo analysis revealed that oxaliplatin increased the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression and protein levels in the SC and PAG. Similar effects were observed in fluoxetine-treated animals but only within the PAG. While oxaliplatin decreased the 5-HT<sub>2C</sub> mRNA expression levels in the Amy, fluoxetine increased their protein levels in this area. Fluoxetine impaired the oxaliplatin effects on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression in the SC and Amy and protein levels in the SC. All treatments increased 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression and protein levels in the PAG. These results suggest that the effects of fluoxetine on neuropathic pain induced by oxaliplatin are associated with quantitative changes in the 5-HT<sub>2C</sub> receptors located within important areas of the nociceptive system.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Previous studies have demonstrated that serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) plays a role in the control of nociceptive transmission (Heinricher et al., 2009). This monoamine increases and decreases nociceptive responses, depending on the site, cell type and subtype of the receptor it activates (Green et al., 2000; Suzuki et al., 2004). Briefly, serotonin is able to interact with 7 different classes of receptors that are differentiated into 14 subtypes (Barnes and Sharp, 1999) and the 5-HT<sub>2C</sub> receptor subtype has been involved in the modulation of neuropathic pain in various animal models (Nakae et al., 2013; Ren

et al., 2013). Also, several studies have shown that 5-HT projections from raphe nuclei to the spinal cord modulate neuronal plasticity in response to neuropathic pain (Porreca et al., 2002).

Antidepressants belong to a group of limited pharmacological resources that can be used to treat neuropathic pain (McCleane, 2008). In this context, fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), has been shown to have analgesic effects in tests of neuropathic pain in rats (Pedersen et al., 2005). Clinical studies have also demonstrated that patients who suffered from neuropathic pain and displayed pain relief during treatment with escitalopram (an SSRI) had polymorphisms in their 5-HT<sub>2C</sub> genes, emphasizing the involvement of this serotonin receptor subtype in this clinical situation (Brasch-Andersen et al., 2011).

Besides to increase the levels of serotonin in the synaptic cleft, fluoxetine can also act as a competitive 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist (Ni and Miledi, 1997; Palvimaki et al., 1999). Moreover, chronic treatment with SSRIs leads to 5-HT<sub>2C</sub> receptor desensitization (review see Artigas, 2013), suggesting that fluoxetine, as an SSRI, might modulate serotonin action at this receptor subtype.

\* Corresponding author at: Department of Neuroscience, Psychology, Drug Research and Child Health – Neurofarba – Pharmacology and Toxicology Section, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy. Tel.: +39 0554271316.

E-mail address: [baptistadani@gmail.com](mailto:baptistadani@gmail.com) (D. Baptista-de-Souza).

<sup>1</sup> Permanent address: Department of Psychology/CECH–UFSCar, Rod. Washington Luís, Km 235, São Carlos, SP 13565-905, Brazil. Tel.: +55 1633518363.

Oxaliplatin is an anti-neoplastic drug that is used for the treatment of advanced colorectal cancer (Kannarkat et al., 2007). Perhaps the most important dose-limiting toxicity of oxaliplatin is the induction of a neuropathic syndrome with paresthesia, dysesthesia and pain (Pasetto et al., 2006). There are few studies reporting the molecular aspects involved in neuropathic pain induced by oxaliplatin (Adelsberger et al., 2000). It has been shown that this type of neuropathy can be caused by the prolonged opening of sodium channels in peripheral nerve fibers. More recently, it was also demonstrated that peripheral nociceptive fibers were damaged by oxidative stress, which consequently resulted in sensory symptoms that were similar to those observed during oxaliplatin-induced neurotoxicity (Di Cesare Mannelli et al., 2012).

Although our group has been investigating the role of the central nervous system structures in neuropathic pain induced by oxaliplatin (Norcini et al., 2009), there has been no evidence related to the role of serotonergic neurotransmission in this condition. In the present study, we investigated the effects of chronic treatment with fluoxetine in rats treated with oxaliplatin and evaluated the possible quantitative alterations in 5-HT<sub>2C</sub> receptors levels in the lumbar portion of the spinal cord and in central nervous system structures (rostral ventral medulla, mid-brain periaqueductal gray and amygdala) involved in the ascending and descending pathways of the supraspinal processing of pain.

## 2. Materials and methods

A schematic representation of the experimental protocol can be seen in Fig. 1.

### 2.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats (Harlan, Varese, Italy), weighing approximately 200–250 g at the beginning of the experimental procedures, were used for the experiments. Four animals per cage were housed at  $23 \pm 1$  °C under a 12-h light/dark cycle; they were fed with standard laboratory diet and tap water ad libitum and experimentation began within one week of their arrival. The experimental protocol complied with the European Community guidelines for animal care (DL 116/92, the European Communities Council Directive of 24 November 1986: 86/609/EEC) and was approved by the animal subject review board of the University of Florence. The ethical policy of the University of Florence complies with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996; University of Florence assurance number: A5278-01). All efforts were made to minimize suffering and to reduce the number of animals used. Rats were randomly assigned to each

experimental group and were individually habituated to handling prior to testing.

### 2.2. Evaluation of general toxicity.

To evaluate the effects of oxaliplatin and fluoxetine on body weight gain, all animals were weighed at 1st, 8th, 12th, 19th and 22nd days from the beginning of the pharmacological treatment.

### 2.3. Anticancer agent-induced neuropathy

Rats were treated with 2.4 mg/kg oxaliplatin, which was administered intraperitoneally (i.p.) for 5 consecutive days every week for 3 weeks (15 i.p. injections) (Cavaletti et al., 2001). Oxaliplatin was dissolved in a 5% glucose solution. Control animals received an equivalent volume of 5% glucose i.p.

### 2.4. Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)

Fluoxetine was dissolved in saline at a dose of 20 mg/kg (Abdel-Salam et al., 2004) and administered subcutaneously (s.c.) for 5 consecutive days every week for 3 weeks (15 s.c. injections), concurrently with the oxaliplatin treatment. Control rats received an equal volume of saline s.c.

### 2.5. Paw pressure test

The pain threshold in the rats was determined with an analgesimeter (Ugo Basile, Varese, Italy), according to the method described by Leighton et al. (1988). Briefly, a constantly increasing pressure was applied to a small area of the dorsal surface of the paw using a blunt conical probe. Pressure was increased until a vocalization or a withdrawal reflex occurred. The withdrawal threshold was expressed in grams, the test was repeated three times and the mean was used as the value for each paw. Before starting experimental protocols, the pain threshold was evaluated, and rats scoring below 50 g or over 80 g were discarded. These limits assured a more precise determination of the mechanical withdrawal threshold in experiments aimed at determining the effect of treatments. Mechanical pressure application was stopped at 150 g, independent of a rat reflex. Blinded experiments were performed.

The paw pressure test was performed at 7th, 14th and 22nd days from the beginning of the pharmacological treatments (see Fig. 1).

### 2.6. Cold plate test

The animals were placed in a stainless box (12 cm × 20 cm × 10 cm) with a cold plate as the floor. The temperature of the cold plate was maintained at  $4 \pm 1$  °C. Pain-related behaviors (i.e., lifting and

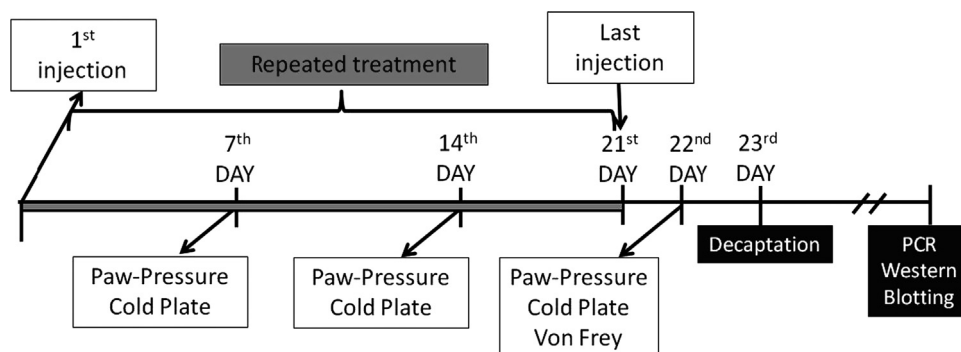


Fig. 1. Schematic representation showing the experimental protocol.



licking of the hind paw) were observed, and the time (s) of the first pain-related behavior was recorded. The cut-off time for the latency of paw lifting or licking was set at 60 s.

The cold plate test was performed at 7th, 14th and 22nd days from the beginning of the pharmacological treatments (see Fig. 1).

### 2.7. Von Frey test

The animals were placed in 20 cm × 20 cm plexiglass boxes equipped with a metallic mesh floor, 20 cm above the bench. A habituation period of 15 min was allowed before the test. An electronic Von Frey hair unit (Ugo Basile, Varese, Italy) was used, and the withdrawal threshold was evaluated by applying force ranging from 0 to 50 g, with 0.2 g accuracy. Punctuate stimulus was delivered to the mid-plantar area of each anterior paw from below the mesh floor through a plastic tip, and the withdrawal threshold was automatically displayed on the screen. The paw sensitivity threshold was defined as the minimum pressure required to elicit a robust and immediate withdrawal reflex of the paw. Voluntary movements associated with locomotion were not considered to be withdrawal responses. Stimuli were applied on each anterior paw with an interval of 5 s. The test was repeated 5 times for each animal, and the final values were obtained by averaging results of the 5 tests (Sakurai et al., 2009).

The Von Frey test was performed only at 22nd day from the beginning of the pharmacological treatments (see Fig. 1).

### 2.8. Tissue processing

Immediately following the last body weight recording (see Fig. 1), the brains were extracted, frozen in isopentane (−50 °C) within 30–45 s of decapitation and stored at −80 °C until dissection. One-millimeter coronal slices of the brain (rostral face beginning approximately 2.0 mm from Bregma, based on the atlas of Paxinos and Watson (2005)) were cut in a cryostat at −20 °C. Tissue punches (using a blunt 14-gauge needle) were obtained from the periaqueductal gray matter (PAG), rostral ventral medulla (RVM) and amygdala (approximately 20 mg). The spinal cord was extracted, and the lumbar section (approximately 200 mg) was isolated and dissected along the median sagittal plane to obtain the right and left sides.

### 2.9. Western blot

The tissue was homogenized in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, and Complete Protease Inhibitor (Roche, Italy). The homogenate was incubated on ice for 30 min, and the suspension was sonicated on ice using three 10-s bursts at high intensity, with a 10-s cooling period between each burst. The samples were centrifuged at 13,000g for 15 min at 4 °C. Protein concentrations in the supernatant were measured using the BiCinchoninic Acid (BCA; Sigma-Aldrich, Italy) assay. Forty micrograms of each protein extract were separated on a 4–12% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel by electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes (Biorad, Italy). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 (PBST) and then probed overnight with anti-rabbit 5-HT<sub>2C</sub> receptor (Abcam, England) and anti-rabbit GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) primary antibodies at a concentration of 1:1000 in PBST/5% Bovine Serum Albumin (BSA). After washing with PBST, the membranes were incubated for 1 h in PBST containing the appropriate secondary antibody (1:5000). The blots were then extensively washed according to the manufacturer's instructions and developed using an enhanced chemiluminescence detection system (Pierce, Milan, Italy). The exposure and

development times used were standardized for all of the blots. Optical density measurements were performed by dividing the intensity of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor bands by the intensity of the GAPDH bands at each time point; GAPDH is a housekeeping protein that was also used as loading control.

### 2.10. RT-PCR analysis

The mRNA expression levels of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor (GenBank accession number: MN012765), and 18S were measured using RT-PCR (Invitrogen). mRNA was extracted from the periaqueductal gray matter, rostral ventral medulla, amygdala and spinal cord tissues by TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, Italy). The 5-HT<sub>2C</sub> receptor primer set spanned an intron, and the forward primer used was 5'-CCA ACG AAC ACC TTC TTT CC-3'; the 5-HT<sub>2C</sub> receptor reverse primer used was 5'-GCA TTG TGC AGT TTC TTC TCC-3'. The RT-PCR parameters used were denaturing at 94 °C, annealing at 50.1 °C and elongation at 72 °C (Promega Guidelines). The amplicons were electrophoresed in a 1.4% agarose gel containing ethidium bromide. The resultant bands were then quantified by densitometry, and the intensity of the signal was normalized to 18S as an internal control, thus correcting for any possible uneven loading of RNA.

### 2.11. Statistical analyses

The results were expressed as the means ± S.E.M., and a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Significant *F* values were followed up by Duncan's multiple range tests. A *P* value of 0.05 or less was required for significance.

## 3. Results

### 3.1. Evaluation of general toxicity

Two-way ANOVA revealed statistically significant effects of the oxaliplatin treatment on weight gain following 8 days ( $F_{(1,32)}=78.49$ ,  $P<0.05$ ), 12 days ( $F_{(1,32)}=114.42$ ,  $P<0.05$ ), 19 days ( $F_{(1,32)}=91.93$ ,  $P<0.05$ ) and 22 days ( $F_{(1,32)}=69.10$ ,  $P<0.05$ ). No significant effects on weight gain were observed for the fluoxetine treatment alone ( $n=10$ ) or when injected combined with oxaliplatin ( $n=9$ ). Post-hoc Duncan test indicated that the weight gain was significantly reduced in animals that received the

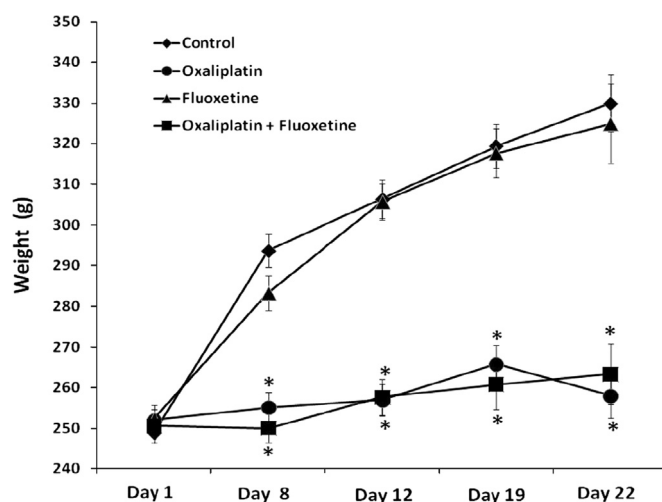


Fig. 2. Time-course of rat body weight gain during oxaliplatin (2.4 mg/kg) and fluoxetine (20 mg/kg) treatment. Data are presented as the means ± S.E.M. of 7–10 animals per group. \* $P<0.05$  compared to the control group.

**Table 1**

Lack of effects on mechanical hypersensitivity and pain threshold observed after 7 days and 14 days of treatment with oxaliplatin (2.4 mg/kg; i.p.), fluoxetine (20 mg/kg; s.c.) or oxaliplatin+fluoxetine in rats ( $n=9-10$ ).

Treatment	7 Days		14 Days	
	Paw-pressure test	Cold plate test	Paw-pressure test	Cold plate test
Saline	65.00 ± 1.06	26.38 ± 1.25	70.31 ± 1.45	25.88 ± 2.29
Oxaliplatin	58.61 ± 1.96	25.44 ± 1.87	65.83 ± 1.44	21.56 ± 1.69
Fluoxetine	58.44 ± 1.76	21.75 ± 1.61	71.72 ± 2.92	28.13 ± 2.14
Oxaliplatin+Fluoxetine	62.22 ± 2.71	23.44 ± 2.06	72.28 ± 2.68	21.56 ± 1.78

Paw-pressure (in g) and cold plate (in s) responses are presented as mean ± S.E.M.

oxaliplatin injections ( $n=8$ ) compared with the control group ( $n=10$ ) (Fig. 2).

### 3.2. Anticancer agent-induced neuropathy

Two-way ANOVA did not reveal significant effects for pretreatment factor (glucose or oxaliplatin), treatment factor (saline or fluoxetine) or pretreatment versus treatment interactions on paw pressure test and cold plate test at 7 [pretreatment ( $F_{(1,30)}=2.35$ ,  $P>0.05$ ); treatment ( $F_{(1,30)}=1.42$ ,  $P>0.05$ ); interaction ( $F_{(1,30)}=1.78$ ,  $P>0.05$ )] or 14 days [pretreatment ( $F_{(1,30)}=1.97$ ,  $P>0.05$ ); treatment ( $F_{(1,30)}=2.14$ ,  $P>0.05$ ); interaction ( $F_{(1,30)}=1.06$ ,  $P>0.05$ )] (Table 1).

However, 22 days after the beginning of treatment two-way ANOVA revealed statistically significant effects for the oxaliplatin pretreatment factor ( $F_{(1,32)}=56.15$ ,  $P<0.05$ ), fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,32)}=7.17$ ,  $P<0.05$ ), and the interaction between the factors ( $F_{(1,32)}=5.92$ ,  $P<0.05$ ) in the paw pressure test. The post-hoc Duncan test indicated that oxaliplatin ( $n=7$ ) increased significantly pain threshold, since it reduced the amount of charge to induce the paw withdrawal response compared with the control group ( $n=10$ ). While fluoxetine alone ( $n=10$ ) (i.e., glucose+fluoxetine) did not produce intrinsic effects on nociception, this SSRI was able to impair the effects provoked by the anticancer drug ( $n=9$ ) (Fig. 3A).

Two-way ANOVA revealed statistically significant effects on the cold plate test for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,32)}=9.94$ ,  $P<0.05$ ) and for the interaction between the oxaliplatin treatment and fluoxetine treatment factors ( $F_{(1,32)}=9.23$ ,  $P<0.05$ ), but no significant effect was observed for the fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,32)}=0.05$ ,  $P>0.05$ ). The post-hoc Duncan test indicated that oxaliplatin treatment ( $n=7$ ) decreased the licking latency compared with the control group ( $n=10$ ). Fluoxetine treatment completely reversed this effect ( $n=8$ ), without changing per se ( $n=10$ ) the licking latency (Fig. 3B).

For the Von Frey test, two-way ANOVA revealed statistically significant effects for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,32)}=42.36$ ,  $P<0.05$ ), fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,32)}=42.15$ ,  $P<0.05$ ) and interaction between the factors ( $F_{(1,32)}=15.93$ ,  $P<0.05$ ). The post-hoc Duncan test indicated that oxaliplatin ( $n=7$ ) decreased the withdrawal threshold compared with the control group ( $n=10$ ). Fluoxetine treatment completely reversed oxaliplatin effects ( $n=8$ ) on the Von Frey test. The SSRI alone ( $n=10$ ) also increased the withdrawal threshold (Fig. 3C).

### 3.3. RT-PCR and Western blotting analyses of 5-HT<sub>2C</sub> receptor in the spinal cord (SC), rostral ventral medulla (RVM), periaqueductal gray matter (PAG) and amygdala (Amy)

#### 3.3.1. SC

Two-way ANOVA revealed statistically significant effects on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression levels for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,13)}=19.91$ ,  $P<0.05$ ) and for the interaction between the oxaliplatin treatment and the fluoxetine treatment factors

( $F_{(1,13)}=5.74$ ,  $P<0.05$ ), but no significant effect was observed for the fluoxetine treatment ( $n=4$ ) factor ( $F_{(1,13)}=1.20$ ,  $P>0.05$ ). Post-hoc Duncan test indicated that oxaliplatin treatment ( $n=4$ ) increased the mRNA expression levels of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor compared with the control group ( $n=4$ ) and that fluoxetine treatment completely reversed this effect ( $n=5$ ) (Fig. 4A).

In the Western blot analysis, ANOVA revealed statistically significant effects on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor protein expression levels for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,13)}=19.91$ ,  $P<0.05$ ), fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,13)}=5.58$ ,  $P<0.05$ ) and the interaction between the factors ( $F_{(1,13)}=9.70$ ,  $P<0.05$ ). The post-hoc Duncan test indicated that oxaliplatin ( $n=4$ ) increased the protein expression levels of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor compared with the control group ( $n=4$ ) and that fluoxetine was also able to reverse this effect ( $n=5$ ), without inducing effects per se ( $n=4$ ) (Fig. 4B).

#### 3.3.2. RVM

Two-way ANOVA revealed no significant effects on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression levels for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,13)}=0.00$ ,  $P>0.05$ ), fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,13)}=0.14$ ,  $P>0.05$ ) or interaction between the factors ( $F_{(1,13)}=0.01$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 4C) ( $n=4-5$ ).

A similar profile was observed for the Western blot analysis. Two-way ANOVA revealed no significant effects on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor protein expression levels in the RVM for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,13)}=1.99$ ,  $P>0.05$ ), fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,13)}=4.24$ ,  $P>0.05$ ) or interaction between the factors ( $F_{(1,13)}=0.00$ ,  $P>0.05$ ) (Fig. 4D) ( $n=4-5$ ).

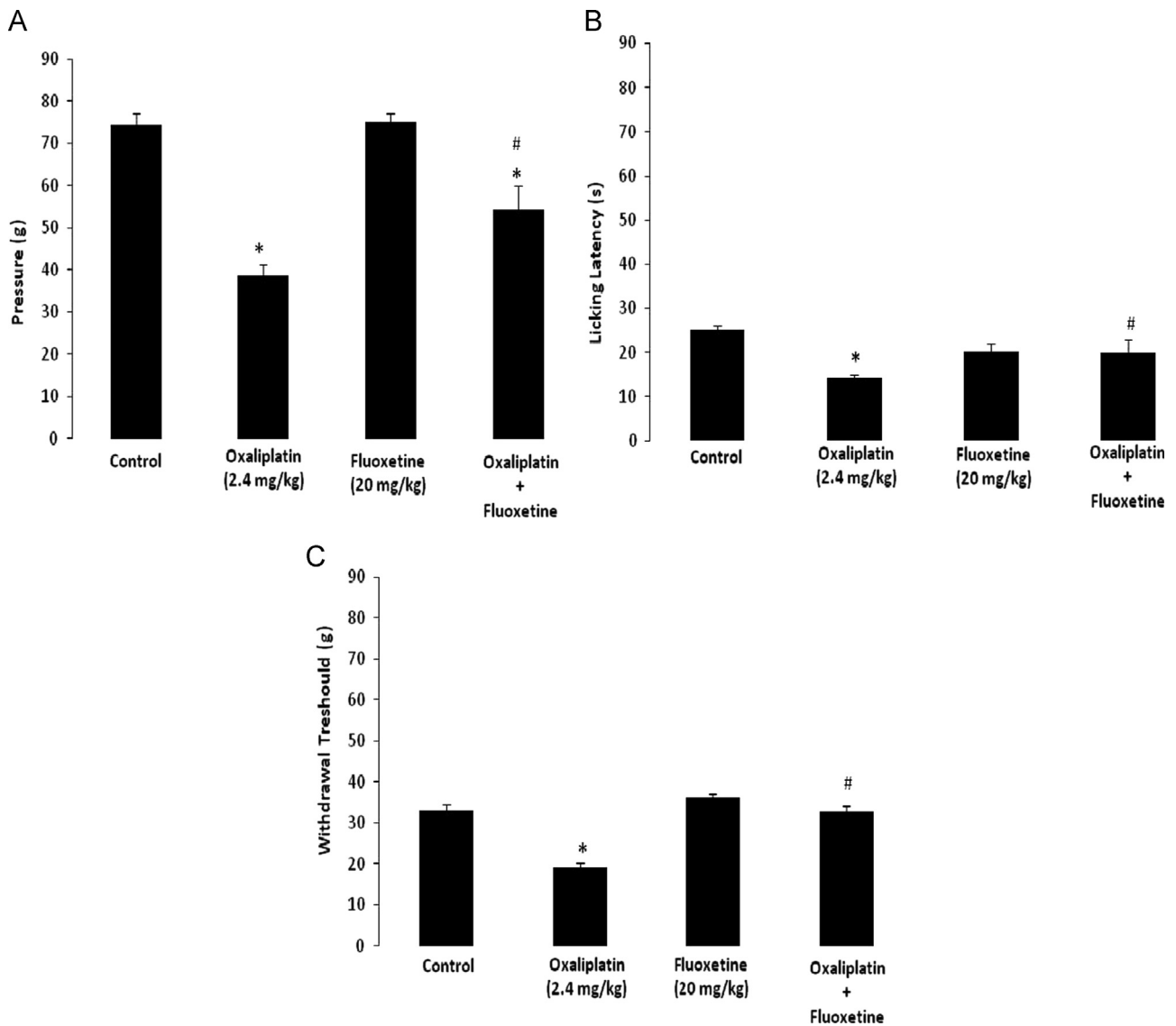
#### 3.3.3. PAG

Two-way ANOVA revealed significant effects on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression levels for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,13)}=14.66$ ,  $P<0.05$ ), fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,13)}=10.39$ ,  $P<0.05$ ) and interaction between the factors ( $F_{(1,13)}=6.35$ ,  $P<0.05$ ). The post-hoc Duncan test indicated that all treatments increased the mRNA expression levels of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor compared with the control group (Fig. 4E) ( $n=4-5$ ).

A similar profile was obtained for the Western blot analysis. Two-way ANOVA revealed statistically significant effects on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor protein expression levels for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,13)}=10.05$ ,  $P<0.05$ ), fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,13)}=46.68$ ,  $P<0.05$ ) and interaction between the factors ( $F_{(1,13)}=13.37$ ,  $P<0.05$ ). The post-hoc Duncan test indicated that all treatments increased the protein expression levels of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor compared with the control group (Fig. 4F) ( $n=4-5$ ).

#### 3.3.4. Amy

Two-way ANOVA revealed statistically significant effects on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression levels for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,13)}=9.04$ ,  $P<0.05$ ), fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,13)}=8.52$ ,  $P<0.05$ ) and interaction between the factors ( $F_{(1,13)}=6.35$ ,  $P<0.05$ ). The post-hoc Duncan test indicated that



**Fig. 3.** Anticancer agent-induced neuropathy. Effects of chronic treatment (21 days) with oxaliplatin (2.4 mg/kg) and fluoxetine (20 mg/kg) on nociceptive response of rats exposed to the (A) paw pressure test, (B) cold plate test and (C) Von Frey test. Data are presented as the means  $\pm$  S.E.M. of 7–10 animals per group \* $P < 0.05$  compared to the control group. # $P < 0.05$  compared to the oxaliplatin group.

oxaliplatin treatment ( $n=5$ ) decreased the mRNA expression levels of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor compared with the control group ( $n=4$ ) and that fluoxetine treatment ( $n=4$ ) completely reversed this effect, without inducing effects per se ( $n=4$ ) (Fig. 4G).

In the Western blot analysis, two-way ANOVA revealed a statistically significant effect on the 5-HT<sub>2C</sub> receptor protein expression levels for the fluoxetine treatment factor ( $F_{(1,13)}=12.20$ ,  $P < 0.05$ ) but not for the oxaliplatin treatment factor ( $F_{(1,13)}=0.01$ ,  $P > 0.05$ ) or the interaction between the factors ( $F_{(1,13)}=0.05$ ,  $P > 0.05$ ). The post-hoc Duncan test indicated that the fluoxetine treatment increased the protein expression levels of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor compared with the control group (Fig. 4H) ( $n=4-5$ ).

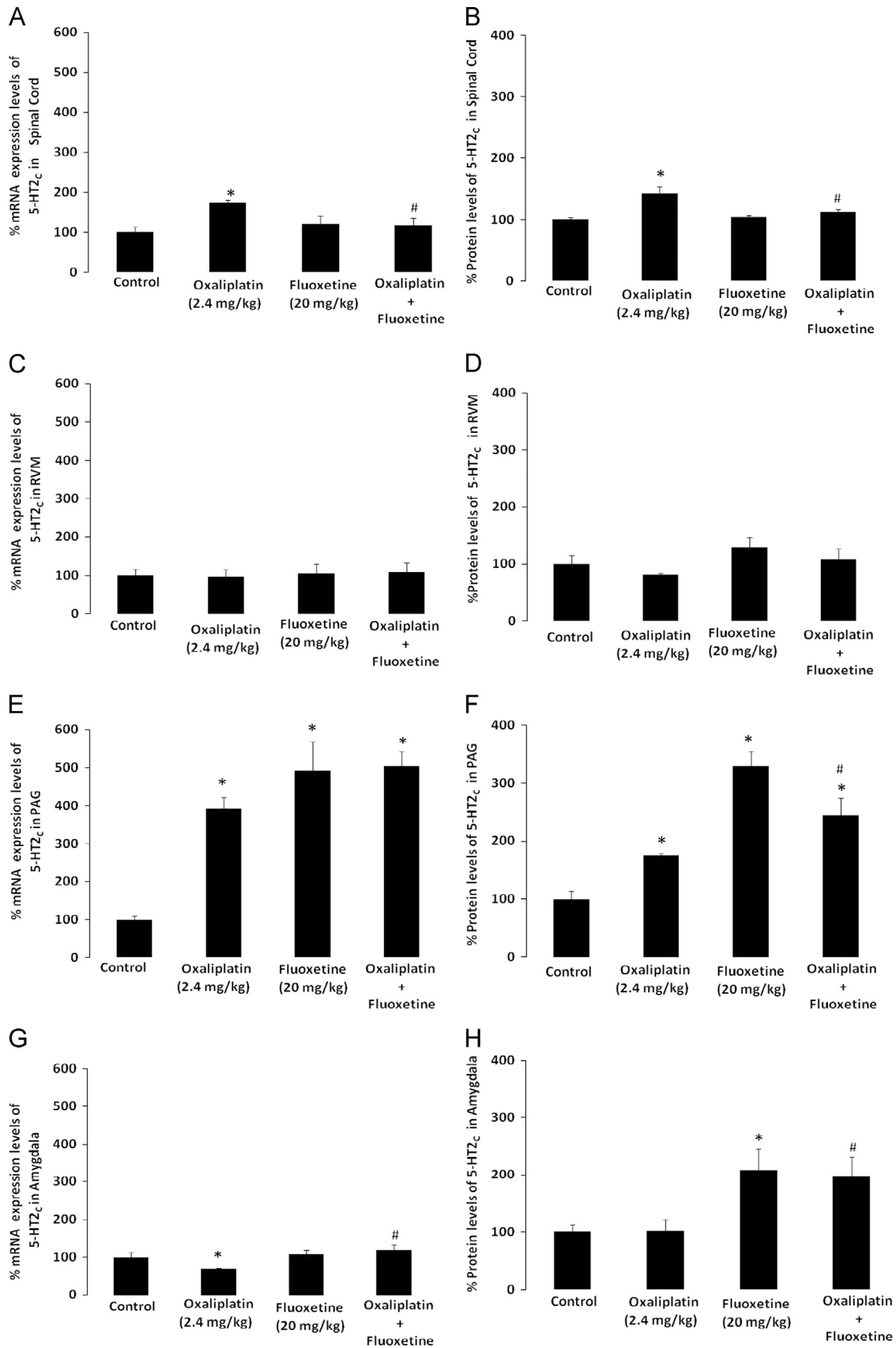
#### 4. Discussion

Oxaliplatin-induced neurotoxicity in humans and rodents is often related to a long time course of peripheral hyperalgesia. In general, the peripheral hyperalgesia disappears within a few days or weeks following chemotherapy, reappearing with repeated cycles of chemotherapy (Joseph et al., 2008). In the present study, we observed

that the administration of oxaliplatin for up two weeks trended to induce only a slight mechanical hypersensitivity and pain thresholds reduction in rats. However, when given for three consecutive weeks, oxaliplatin provoked nociceptive responses that resemble allodynia and hyperalgesia. Our results corroborate previous findings showing that the repeated administration of oxaliplatin induced significant mechanical hypersensitivity and decreased pain threshold (Di Cesare Mannelli et al., 2013; Ghelardini et al., 2010).

Oxaliplatin-treated rats also showed impairment in the weight gain. Although oxaliplatin has produced robust effects on nociception only when given for three consecutive weeks, its effects on body weight gain were observed from the first week of treatment. Actually, the rats practically did not gain body weight during the three weeks treatment with the anticancer drug. This effect has previously been described in the literature as a parameter of general toxicity that is induced by this anticancer compound (Cavaletti et al., 2001).

The underlying mechanisms of neuropathic pain are still poorly understood. Previous studies have shown the inhibitory or facilitatory influence of descending serotonergic pathways on the spinal processing of nociception, and the effects of 5-HT depend



**Fig. 4.** Effects of chronic treatment (21 days) with oxaliplatin (2.4 mg/kg) and fluoxetine (20 mg/kg) on the 5-HT<sub>2c</sub> receptor mRNA [assessed with RT-PCR assay (left)] or protein expression [assessed with western blot (right)] levels in the SC (A, B), RVM (C, D), PAG (E, F) and Amy (G, H). Data represent the means  $\pm$  S.E.M. of the density levels obtained from 4 to 5 animals per group. Abbrev: SC – spinal cord; RVM – rostral ventral medulla; PAG – periaqueductal gray matter; Amy – amygdala. \* $P < 0.05$  compared to the control group; # $P < 0.05$  compared to the oxaliplatin group.



on the cell type and receptor subtype involved (Bardin et al., 2000; Jeong et al., 2004; Sommer, 2006). 5-HT<sub>2C</sub> receptors are widely distributed in the spinal cord and central nervous system (Clemett et al., 2000). Moreover, the role of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor has been demonstrated in several nociceptive tests (Freitas et al., 2008; Obata et al., 2007). In line with these findings, present results showed that the neuropathic pain induced by oxaliplatin led to an increase in the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA or protein expression levels in the SC and PAG. Previous studies using several protocols of neuropathic pain have also reported an increase in the 5-HT<sub>2C</sub> receptor density in the SC (Kong et al., 2010; Ren et al., 2013). Corroborating these recent findings, our results demonstrated that oxaliplatin increased 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA and protein expression levels in the SC, an effect that is likely due to the activation of nociceptive ascending pathways induced by nerve injury (Apkarian et al., 2011). In apparent contrast to the results obtained in the present study, previous findings have been showing that 5-HT<sub>2C</sub> receptor activation in the SC may induce antiallodynic effects (Obata et al., 2007; Obata et al., 2004), and spinal cord injury produced a decrease in 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression in the SC of rats (Nakae et al., 2013). However, it is important to highlight that those studies used other pain models (e.g., trigeminal neuropathic pain model, ligation of spinal nerves, spinal cord injury). Still, while we have used three parameters of pain alterations (i.e., mechanical, thermal hypersensitivity and antiallodynic effects), Obata et al. (2004, 2007) evaluated only the antiallodynic effects in the Von Frey test.

The present results also showed that neither oxaliplatin- nor fluoxetine-treated rats altered the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA or protein expression levels in the RVM. These results do not corroborate previous findings showing that the RVM plays an important role in the modulation of hyperalgesia and allodynia processes (Vera-Portocarrero et al., 2006). However, in line with the present results, no changes in the activity of neurons located within the RVM have been observed in rodents exposed to tests that induce hyperalgesia and allodynia (Heinricher et al., 2009; Song et al., 2013).

The PAG plays a crucial role in descending and ascending pain pathways (Lee et al., 2000; Monhemius et al., 2001). PAG activation is able to inhibit nociceptive neurons in the dorsal horn (Basbaum and Fields, 1984; Lin et al., 1994). In the present study, oxaliplatin increased the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA and protein expression levels within this midbrain structure. Although we did not assess the functionality of these G-protein coupled receptors in the present study, previous findings have shown an increase in the phosphorylation of specific intracellular mediators in the PAG in oxaliplatin-induced neuropathy (Norcini et al., 2009). In addition, given the role of the PAG in nociceptive ascending pathways (Basbaum et al., 2009), we suggest that the increase in 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA and protein expression levels may be a consequence of increased impulses from the dorsal horn triggered by neuropathic pain.

Oxaliplatin reduced the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression levels in the amygdaloid complex. A general decrease in activity in various cortical areas and in the amygdaloid nuclei has previously been reported in patients with neuropathic pain (Liu et al., 2013). In addition, the amygdaloid nuclei also present functional and morphological variations (Neugebauer et al., 2009) in neuropathic pain conditions. Therefore, decreasing the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA expression levels in the amygdaloid complex after three weeks of oxaliplatin treatment, as observed in the present study, could indicate the onset of functional and morphological alterations within this limbic subcortical area.

Antidepressants generally have high efficacies, producing few side effects (Leventhal et al., 2007) during chronic pain treatment. Curiously the efficacy of this class of drugs seems to be prevalent

in chronic pain states compared to acute pain states. For instance, citalopram was ineffective in a model of visceral pain in rats (Kall et al., 2007), but attenuated the thermal hyperalgesia in chronic constriction pain (Bomholt et al., 2005). A similar profile was observed with fluoxetine, which has been effective in fibromyalgia clinical trials (Arnold et al., 2012), but did not produce any effect on nociceptive response assessed in the tail flick test (Rodrigues-Filho and Takahashi, 1999). In other hand, previous studies have reported the analgesic effects of fluoxetine treatment in several neuropathic pain tests (Dharmshaktu et al., 2012; Tembhurne and Sakarkar, 2011). Taken together, these findings are suggestive that the analgesic effects of SSRIs may be dependent on the nociceptive test or the pain type. Corroborating the studies showing that antidepressants attenuate neuropathic pain (McCleane, 2008; Pedersen et al., 2005), the present study showed that the repeated treatment with fluoxetine significantly prevented the oxaliplatin-induced nociception assessed in the paw pressure, cold plate and Von Frey tests.

It has been demonstrated that fluoxetine produces anorexic effect (Clifton et al., 1989), which can reflect in body weight loss during the first week of treatment. However, it has been shown that long-term treatment with fluoxetine fails to change body weight or even produce an increase in weight gain (Zimmermann et al., 2003). The results obtained in the present study showed that this SSRI did not affect body weight gain in Sprague-Dawley rats. This result is consistent with the lack of effects of fluoxetine to alter the body weight loss induced by the anticancer drug.

Besides to blocking the reuptake of serotonin, some SSRIs bind to other neurotransmitter receptors and enzymes, suggesting that these secondary technical features may explain some of the differences of specific properties among them (Stahl, 1998). For instance, fluoxetine can act as a serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist (Ni and Miledi, 1997; Palvimaki et al., 1999). In line with these findings, it has been demonstrated that chronic treatment with fluoxetine and citalopram up-regulates 5-HT<sub>2C</sub> receptor in the choroid plexus in rats (Laakso et al., 1996; Palvimaki et al., 2005). In the present study, fluoxetine was able to reduce (instead of increase) the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA and protein expression levels induced by oxaliplatin treatment in the SC. These results suggest that fluoxetine may intensify the stimulation of the descending inhibitory pathway from areas such as the PAG, which in turn could lead to a reduction in the 5-HT<sub>2C</sub> receptor mRNA and protein expression levels in the SC.

Repeated treatment with fluoxetine also induced an increase in the 5-HT<sub>2C</sub> protein expression levels within the amygdala. This neurochemical effect seems to be related to the antinociceptive property of fluoxetine, since it was recently demonstrated that the analgesic effects of SSRIs occur through to the blockade of 5-HT<sub>2C</sub> receptor in the amygdala in rats exposed to a test of arthritis pain (Gregoire and Neugebauer, 2013).

Finally, previous studies have demonstrated that chronic administration of SSRIs and other antidepressants enhances 5-HT efflux in forebrain areas associated with emotional processing (Bosker et al., 2001; Dremencov et al., 2003; Hjorth et al., 2000; Zaneli et al., 2010). If so, the mechanisms associated to the effects of fluoxetine on 5-HT<sub>2C</sub> expression observed in the present study might be related to the enhancement of 5-HT release within the PAG and amygdala as well as to the blockade of 5-HT<sub>2C</sub> receptor in these limbic brain areas.

## 5. Conclusion

In conclusion, the present results demonstrated that fluoxetine treatment was able to prevent the nociceptive effects of oxaliplatin-induced neuropathy. The results obtained with the

neurochemical analyses are suggestive that fluoxetine may have produced its effects through the blockade of the increase of 5-HT<sub>2C</sub> receptor expression levels induced by oxaliplatin in the spinal cord. However, further immunohistochemical studies are encouraged to confirm this hypothesis. Also, we hypothesize that the increase in 5-HT<sub>2C</sub> receptor expression levels within the PAG and amygdala, two important areas related to descending inhibitory pathway of pain (Heinricher et al., 2009), observed after chronic treatment with fluoxetine is related to the decreasing of the mechanical hypersensitivity and pain threshold alterations induced by oxaliplatin. Further studies involving pharmacological manipulations of the 5-HT<sub>2C</sub> receptors (e.g., using selective 5-HT<sub>2C</sub> agonists and antagonists) would be important to clarify the role of this serotonin receptor subtype in pain modulation.

## Acknowledgments

D. Baptista received a scholarship from FAPESP (2012/06009-7). A. Canto-de-Souza and R. L. Nunes-de-Souza received CNPq research fellowships CNPQ (451500/2013-0 and 305597/2012-4, respectively). This work was supported by the Italian Ministry of Instruction, University and Research.

## References

- Abdel-Salam, O.M., Baiuomy, A.R., Arbid, M.S., 2004. Studies on the anti-inflammatory effect of fluoxetine in the rat. *Pharmacol. Res.* 49, 119–131.
- Adelsberger, H., Quasthoff, S., Grosskreutz, J., Lepier, A., Eckel, F., Lersch, C., 2000. The chemotherapeutic oxaliplatin alters voltage-gated Na(+) channel kinetics on rat sensory neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 406, 25–32.
- Apkarian, A.V., Hashmi, J.A., Baliki, M.N., 2011. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain* 152, S49–S64.
- Arnold, L.M., Williams, D.A., Hudson, J.L., Martin, S.A., Clauw, D.J., Crofford, L.J., Wang, F., Emir, B., Lai, C., Zabolocki, R., Mease, P.J., 2012. Development of responder definitions for fibromyalgia clinical trials. *Arthritis Rheum.* 64, 885–894.
- Bardin, L., Lavarenne, J., Eschaliere, A., 2000. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain* 86, 11–18.
- Barnes, N.M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38, 1083–1152.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284.
- Basbaum, A.I., Fields, H.L., 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 309–338.
- Bomholt, S.F., Mikkelsen, J.D., Blackburn-Munro, G., 2005. Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain. *Neuropharmacology* 48, 252–263.
- Bosker, F.J., Cremers, T.I.F.H., Jongasma, M.E., Westerink, B.H.C., Wikstrom, V.H., den Boer, J.A., 2001. Acute and chronic effects of citalopram on postsynaptic 5-hydroxytryptamine (1A) receptor-mediated feedback: a microdialysis study in the amygdala. *J. Neurochem.* 76, 1645–1653.
- Brasch-Andersen, C., Møller, M., Christiansen, L., Thinggaard, M., Otto, M., Brøsen, K., Sindrup, S., 2011. A candidate gene study of serotonergic pathway genes and pain relief during treatment with escitalopram in patients with neuropathic pain shows significant association to serotonin receptor 2C (HTR2C). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 67, 1131–1137.
- Cavaletti, G., Tredici, G., Petruccioli, M.G., Donde, E., Tredici, P., Marmiroli, P., Minoia, C., Ronchi, A., Bayssas, M., Etienne, G.G., 2001. Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur. J. Cancer* 37, 2457–2463.
- Clemett, D.A., Punhani, T., Duxon, M.S., Blackburn, T.P., Fone, K.C., 2000. Immunohistochemical localisation of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor protein in the rat CNS. *Neuropharmacology* 39, 123–132.
- Clifton, P.G., Barnfield, A.M., Philcox, L., 1989. A behavioural profile of fluoxetine-induced anorexia. *Psychopharmacology (Berl)* 97, 89–95.
- Dharmshaktu, P., Tayal, V., Kalra, B.S., 2012. Efficacy of antidepressants as analgesics: a review. *J. Clin. Pharmacol.* 52, 6–17.
- Di Cesare Mannelli, L., Zanardelli, M., Failli, P., Ghelardini, C., 2012. Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. *Prot. Eff. Silibinin J. Pain* 13, 276–284.
- Di Cesare Mannelli, L., Zanardelli, M., Ghelardini, C., 2013. Nicotine is a pain reliever in trauma- and chemotherapy-induced neuropathy models. *Eur. J. Pharmacol.* 711, 87–94.
- Dremencov, E., Gur, E., Lerer, B., Newman, M.E., 2003. Effects of chronic antidepressants and electroconvulsive shock on serotonergic neurotransmission in the rat hippocampus. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 729–739.
- Freitas, R.L., Bassi, G.S., de Oliveira, A.M., Coimbra, N.C., 2008. Serotonergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus recruits in situ 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors to modulate the post-ictal antinociception. *Exp. Neurol.* 213, 410–418.
- Ghelardini, C., Desaphy, J.F., Muraglia, M., Corbo, F., Matucci, R., Dipalma, A., Bertucci, C., Pistolozzi, M., Nesi, M., Norcini, M., Franchini, C., Camerino, D.C., 2010. Effects of a new potent analog of tocinamide on hNav1.7 sodium channels and in vivo neuropathic pain models. *Neuroscience* 169, 863–873.
- Green, G.M., Scarth, J., Dickenson, A., 2000. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission; state-dependent actions via dorsal horn 5-HT<sub>3</sub> receptors in the anaesthetized rat. *Pain* 89, 81–88.
- Gregoire, S., Neugebauer, V., 2013. 5-HT<sub>2CR</sub> blockade in the amygdala conveys analgesic efficacy to SSRIs in a rat model of arthritis pain. *Mol. Pain* 9, 41.
- Heinricher, M.M., Tavares, I., Leith, J.L., Lumb, B.M., 2009. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res. Rev.* 60, 214–225.
- Hjorth, S., Bengtsson, H.J., Kullberg, A., Carlzon, D., Peilott, H., Auerbach, S.B., 2000. Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. *J. Psychopharmacol.* 14, 177.
- Jeong, C.Y., Choi, J.J., Yoon, M.H., 2004. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 502, 205–211.
- Joseph, E.K., Chen, X., Bogen, O., Levine, J.D., 2008. Oxaliplatin acts on IB4-positive nociceptors to induce an oxidative stress-dependent acute painful peripheral neuropathy. *J. Pain* 9, 463–472.
- Kall, E., Lindstrom, E., Martinez, V., 2007. The serotonin reuptake inhibitor citalopram does not affect colonic sensitivity or compliance in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 570, 203–211.
- Kannarkat, G., Lasher, E.E., Schiff, D., 2007. Neurologic complications of chemotherapy agents. *Curr. Opin. Neurol.* 20, 719–725.
- Kong, X.Y., Chen, W.J., Hultborn, M., Zhang, M., H., 2010. Concomitant but differential upregulation of serotonin 2A and 2C receptors after sacral spinal transection of rats. *Soc. Neurosci.*
- Laakso, A., Palvimaki, E.P., Kuoppamaki, M., Syvalahti, E., Hietala, J., 1996. Chronic citalopram and fluoxetine treatments upregulate 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the rat choroid plexus. *Neuropsychopharmacology* 15, 143–151.
- Lee, B.H., Park, S.H., Won, R., Park, Y.G., Sohn, J.H., 2000. Antiallodynic effects produced by stimulation of the periaqueductal gray matter in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* 291, 29–32.
- Leighton, G.E., Rodriguez, R.E., Hill, R.G., Hughes, J., 1988. k-Opioid agonist produce antinociception after i.v. and i.c.v. but not intrathecal administration in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 93, 553–560.
- Leventhal, L., Smith, V., Hornby, G., Andree, T.H., Brandt, M.R., Rogers, K.E., 2007. Differential and synergistic effects of selective norepinephrine and serotonin reuptake inhibitors in rodent models of pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 1178–1185.
- Lin, Q., Peng, Y., Willis, W.D., 1994. Glycine and GABA antagonists reduce the inhibition of primate spinothalamic tract neurons produced by stimulation in periaqueductal gray. *Brain Res.* 654, 286–302.
- Liu, J., Hao, Y., Du, M., Wang, X., Zhang, J., Manor, B., Jiang, X., Fang, W., Wang, D., 2013. Quantitative cerebral blood flow mapping and functional connectivity of postherpetic neuralgia pain: a perfusion fMRI study. *Pain* 154, 110–118.
- McCleane, G., 2008. Antidepressants as analgesics. *CNS Drugs* 22, 139–156.
- Monhemius, R., Green, D.L., Roberts, M.H., Azami, J., 2001. Periaqueductal grey mediated inhibition of responses to noxious stimulation is dynamically activated in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* 298, 70–74.
- Nakae, A., Nakai, K., Tanaka, T., Hosokawa, K., Mashimo, T., 2013. Serotonin 2C receptor alternative splicing in a spinal cord injury model. *Neurosci. Lett.* 532, 49–54.
- Neugebauer, V., Galhardo, V., Maione, S., Mackey, S.C., 2009. Forebrain pain mechanisms. *Brain Res. Rev.* 60, 226–242.
- Ni, Y.G., Mileti, R., 1997. Blockage of 5HT<sub>2C</sub> serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2036–2040.
- Norcini, M., Vivoli, E., Galeotti, N., Bianchi, E., Bartolini, A., Ghelardini, C., 2009. Supraspinal role of protein kinase C in oxaliplatin-induced neuropathy in rat. *Pain* 146, 141–147.
- Obata, H., Ito, N., Sasaki, M., Saito, S., Goto, F., 2007. Possible involvement of spinal noradrenergic mechanisms in the antiallodynic effect of intrathecally administered 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists in the rats with peripheral nerve injury. *Eur. J. Pharmacol.* 567, 89–94.
- Obata, H., Saito, S., Sakurazawa, S., Sasaki, M., Usui, T., Goto, F., 2004. Antiallodynic effects of intrathecally administered 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists in rats with nerve injury. *Pain* 108, 163–169.
- Palvimaki, E.P., Kuoppamaki, M., Syvalahti, E., Hietala, J., 1999. Differential effects of fluoxetine and citalopram treatments on serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor occupancy in rat brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2, 95–99.
- Palvimaki, E.P., Majasuo, H., Syvalahti, E., Hietala, J., 2005. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor-mediated phosphoinositide hydrolysis in rat choroid plexus after fluoxetine and citalopram treatments. *Pharmacol. Res.* 51, 419–425.
- Pasetto, L.M., D'Andrea, M.R., Rossi, E., Monfardini, S., 2006. Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 59, 159–168.
- Paxinos, G., Watson, C. (Eds.), 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Pedersen, L.H., Nielsen, A.N., Blackburn-Munro, G., 2005. Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. *Psychopharmacology* 182, 551–561.

- Porreca, F., Ossipov, M.H., Gebhart, G.F., 2002. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* 25, 319–325.
- Ren, L.Q., Wienecke, J., Chen, M., Moller, M., Hultborn, H., Zhang, M., 2013. The time course of serotonin 2C receptor expression after spinal transection of rats: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 236, 31–46.
- Rodrigues-Filho, R., Takahashi, R.N., 1999. Antinociceptive effects induced by desipramine and fluoxetine are dissociated from their antidepressant or anxiolytic action in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2, 263–269.
- Sakurai, M., Egashira, N., Kawashiri, T., Yano, T., Ikesue, H., Oishi, R., 2009. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain* 147, 165–174.
- Sommer, C., 2006. Is serotonin hyperalgesic or analgesic? *Curr. Pain Headache Rep.* 10, 101–106.
- Song, Z., Ansah, O.B., Meyerson, B.A., Pertovaara, A., Linderoth, B., 2013. The rostroventromedial medulla is engaged in the effects of spinal cord stimulation in a rodent model of neuropathic pain. *Neuroscience* 247, 134–144.
- Stahl, S.M., 1998. Using secondary binding properties to select a not so selective serotonin reuptake inhibitor. *J. Clin. Psychiatry* 59, 642–643.
- Suzuki, R., Rygh, L.J., Dickenson, A.H., 2004. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 613–617.
- Tembhurne, S.V., Sakarkar, D.M., 2011. Effect of fluoxetine on an experimental model of diabetes-induced neuropathic pain perception in the rat. *Indian J. Pharm. Sci.* 73, 621–625.
- Vera-Portocarrero, L.P., Zhang, E.T., Ossipov, M.H., Xie, J.Y., King, T., Lai, J., Porreca, F., 2006. Descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains nerve injury-induced central sensitization. *Neuroscience* 140, 1311–1320.
- Zanoveli, J.M., Pobbe, R.L.H., de Bortoli, V.C., Carvalho, M.C., Brandao, M.L., Zangrossi, H., 2010. Facilitation of 5-HT1A-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *Int. J. Neuropsychoph.* 13, 1079–1088.
- Zimmermann, U., Kraus, T., Himmerich, H., Schuld, A., Pollmacher, T., 2003. Epidemiology, implications and mechanisms underlying drug-induced weight gain in psychiatric patients. *J. Psychiatr. Res.* 37, 193–220.