



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA - PPGPsi
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS – CECH
LINHA 3: NEUROCIÊNCIA COMPORTAMENTAL E COGNITIVA
GRUPO DE PSICOBIOLOGIA



**EMPATIA EM CAMUNDONGOS: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA AMÍGDALA E
CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE
INDUZIDA PELO CONVÍVIO COM PARCEIRO SUBMETIDO A UM MODELO DE
ESTRESSE CRÔNICO**

Lara Maria Silveira

São Carlos - SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOLOGIA - PPGPsi
CENTRO DE EDUCAÇÃO E CIÊNCIAS HUMANAS – CECH
LINHA 3: NEUROCIÊNCIA COMPORTAMENTAL E COGNITIVA
GRUPO DE PSICOBIOLOGIA



**EMPATIA EM CAMUNDONGOS: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA AMÍGDALA E
CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE
INDUZIDA PELO CONVÍVIO COM PARCEIRO SUBMETIDO A UM MODELO DE
ESTRESSE CRÔNICO**

Lara Maria Silveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Psicologia. Linha 3: Neurociência Comportamental e Cognitiva da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Psicologia.

Orientação: Profa. Dra. Azair L. M. do Canto de Souza

São Carlos - SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Educação e Ciências Humanas
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Lara Maria Silveira, realizada em 18/12/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza (UFSCar)

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel (UFU)

Prof. Dr. Fábio Cardoso Cruz (UNIFESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia.

Dedico a minha mãe, Maria Izabel, pelo incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por chegar até aqui com saúde e concretizar este trabalho. Ainda a Ele pela minha fé, que não me deixou esmorecer diante das dificuldades.

Aos camundongos que fizeram parte deste trabalho, contribuindo para a pesquisa científica.

A minha avó Ezilda (*in memoriam*) que, lá de cima, me acompanha com seu olhar terno.

A minha mãe que, com todo amor, esteve ao meu lado me apoiando nessa caminhada. A ela minha eterna gratidão.

Ao meu cachorrinho Theo pelas doses diárias de alegria que ajudaram a me fortalecer durante essa trajetória.

A minha chefe e orientadora Azair pela oportunidade de fazer o mestrado, por acreditar em mim, pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos membros da banca pela disponibilidade e atenção.

Ao Professor Ricardo Nunes de Souza por permitir que eu realizasse parte de minha pesquisa em seu laboratório.

À Dra. Daniela Baptista pela ajuda e colaboração.

Aos meus amigos do LPA, Luis, Paulo, Isa, Gi, Cecilia, Fer, Paulo, Lucas pela ajuda, amizade, pelas gordices e risadas. A companhia de vocês tornou tudo mais leve e prazeroso.

À querida amiga Ligia pela amizade, ajuda e apoio em todos os momentos.

As minhas amigas Vanessa, Marília e Bárbara, presentes valiosos que a vida me deu. A amizade de vocês me fortalece em quaisquer circunstâncias.

À técnica por todo suporte (risos)

Ao Programa de Pós Graduação em Psicologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (001) pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica ao que faz que realmente importa.”

Madre Teresa de Calcutá

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

SILVEIRA, L.M. EMPATIA EM CAMUNDONGOS: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA AMÍGDALA E CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR NA MODULAÇÃO DA ANSIEDADE INDUZIDA PELO CONVÍVIO COM PARCEIRO SUBMETIDO A UM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO. 73 FOLHAS. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – UFSCAR – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS. 2020.

RESUMO

Empatia é a capacidade de reconhecer o estado emocional do outro, sendo fundamental para a interação social e sobrevivência da espécie. O estudo da empatia em roedores pode ser realizado por meio de modelos que avaliam respostas de ansiedade promovidas pela coabitação com um parceiro em estresse crônico. Evidências demonstraram o envolvimento da amígdala e do córtex cingulado anterior (CCA) nos comportamentos relacionados a ansiedade e na empatia. O presente trabalho investigou o papel da amígdala e do CCA na ansiedade induzida pelo convívio com parceiro submetido ao estresse crônico de contenção. Camundongos machos da linhagem Suíço-albinos foram alojados aos pares e conviveram por 28 dias. No 15º dia, foram divididos em dois grupos: estresse e controle. O grupo estresse foi constituído pelos sujeitos estresse e observador estresse (alojados na mesma caixa-moradia), sendo que o sujeito estresse passou por sessões de estresse no tubo por 14 dias durante 1 hora, na presença de seu parceiro de caixa. O grupo controle foi composto pelos sujeitos controle e observador controle (alojados na mesma caixa-moradia), sendo que nenhum dos animais passou por estresse. No 29º dia, no experimento 1, os sujeitos observador estresse e observador controle foram submetidos ao protocolo de imunofluorescência para verificar a ativação neuronal, através da quantificação de proteína FosB na amígdala e no CCA. No experimento 2, no 24º dia, os sujeitos observador estresse e observador controle foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia na amígdala e CCA. No 29º dia, os animais receberam injeção intra-amígdala ou intra-CCA de salina ou CoCl_2 e, após 5 minutos, foram avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE). Os resultados demonstraram que convívio com coespecífico em estresse de contenção não alterou a expressão de células positivas para a proteína FosB na amígdala; entretanto promoveu diminuição na quantificação de FosB no CCA comparados aos animais que conviveram com controle. O convívio com parceiro submetido ao estresse crônico levou a diminuição da porcentagem de entradas (%EBA) e de tempo gasto nos braços abertos (%TBA), sem alterar as entradas nos braços fechados (EBF) do LCE, além do aumento de %SAP (stretched attend posture) protegido e da porcentagem de mergulho protegido. A inativação da amígdala com CoCl_2 não alterou a %EBA, a %TBA e as EBF, enquanto a inativação do CCA com CoCl_2 produziu aumento da %EBA e %TBA, sem alterar as EBF, além disso houve diminuição da porcentagem de mergulho protegido nos animais que conviveram com parceiro em estresse crônico. Nossos resultados sugerem que o convívio com parceiro submetido ao estresse crônico de contenção promoveu aumento das respostas relacionadas à ansiedade em camundongos expostos ao LCE. A inativação da amígdala não foi capaz de atenuar a ansiedade promovida pelo convívio, entretanto a inativação do CCA atenuou a ansiedade dos animais. Os resultados sugerem que o CCA desempenha um importante papel na ansiedade induzida pelo convívio com parceiro submetido ao estresse crônico.

Palavras-chave: amígdala; córtex cingulado anterior; estresse crônico; ansiedade; empatia; camundongos.

SILVEIRA, L.M. EMPATHY IN MICE: EVALUATION OF THE ROLE OF AMYGDALA AND ANTERIOR CINGULATE CORTEX IN MODULATION OF ANXIETY INDUCED BY THE LIVED WITH PARTNER SUBMITTED TO A CHRONIC STRESS MODEL. 73 FOLHAS. DISSERTAÇÃO (MESTRADO) – UFSCAR – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS. 2020.

ABSTRACT

Empathy is the ability to recognize the other's emotional state, being fundamental to social interaction and survival of the species. The study of empathy in rodents can be carried out using models that assess anxiety responses promoted by cohabitation with a chronic stress partner. Evidence has shown the amygdala and anterior cingulate cortex (ACC) involvement in anxiety-like behaviors and empathy. The present study investigated the role of the amygdala and the ACC in anxiety induced by living with a conspecific subjected to chronic restraint stress. Male Swiss mice were housed in pairs and lived for 28 days. On the 15th day, they were divided into two groups: stress and control. The stress group consisted of the stress and stress observer subjects (they shared the same housing box), being that the stress subject underwent stress sessions in the tube for 14 days for 1 hour in the presence of their partner living. The control group was presented by the control and observer control subjects (housed in the same housing box); none of the animals experienced stress. In the 29th day, in experiment 1, the stress observer and control observer subjects were submitted to the immunofluorescence protocol to verify neuronal activation by quantifying of FosB protein in the amygdala and ACC. In experiment 2, on the 24th day, the stress observer and control observer subjects underwent stereotaxic surgery to implant guide cannulas in the amygdala and ACC. On the 29th day, the animals received intra-amygdala or intra-ACC injection of saline or CoCl_2 and, after 5 minutes, were evaluated in the elevated plus maze (EPM). The results revealed that living with conspecific in restraint stress did not alter the expression of positive cells for the Fos B protein in the amygdala; however, it promoted a decrease in FosB quantification in the ACC compared to animals that lived with control. Living with a pair in chronic stress led to a reduction in the percentage of entries (%OAE) and time spent in the open arms (% OAT), without changing the entries in the closed arms (CAE) of the EPM, in addition to the increase in % SAP (stretched attend posture) protected and the percentage of protected head-dipping. Amygdala inactivation with CoCl_2 did not change %OAE, %OAT, and CAE. In contrast, the inactivation of ACC with CoCl_2 displayed an increase in %OAE and %OAT, without altering CAE. Also, there was a decrease in protected head-dipping in animals that lived with a pair in chronic stress. Our results suggest that living with a pair submitted to chronic restraint stress raised increased responses related to anxiety in mice exposed to EPM. Amygdala inactivation was not able to mitigate the anxiety induced by living together; however, the inactivation of the ACC attenuated the anxiety like-behavior. These results are suggestive that ACC plays a significant role in anxiety induced by living with a pair subjected to chronic stress.

Keywords: amygdala; anterior cingulate cortex; chronic stress; anxiety; empathy; mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tubo de PVC utilizado para contenção dos animais.....	31
Figura 2: Labirinto em cruz elevado.....	35
Figura 3: Sujeitos experimentais: grupo estresse e grupo controle.....	37
Figura 4: Linha do tempo representando as etapas do experimento 1.....	37
Figura 5: Linha do tempo representando as etapas do experimento 2.....	38
Figura 6: Avaliação da concentração de FosB na amígdala de camundongos.....	41
Figura 7: Ativação neuronal na amígdala de camundongos.....	41
Figura 8: Avaliação da concentração de FosB no córtex cingulado anterior de camundongos.....	42
Figura 9: Ativação neuronal no córtex cingulado anterior de camundongos.....	42
Figura 10: Representação esquemática dos sítios de injeção na amígdala de camundongos e fotomicrografia de uma secção coronal, representando os locais de injeção dentro da amígdala.....	44
Figura 11: Efeitos da administração intra-amígdala de salina ou cloreto de cobalto sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos no labirinto em cruz elevado.....	45
Figura 12: Efeitos da administração intra-amígdala de salina ou cloreto de cobalto sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos no labirinto em cruz elevado.....	46
Figura 13: Efeitos da administração intra-amígdala de salina ou cloreto de cobalto, sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em estresse crônico em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados no labirinto em cruz elevado.....	47
Figura 14: Representação esquemática dos sítios de injeção no córtex cingulado anterior de camundongos e fotomicrografia de uma secção coronal, representando os locais de injeção dentro do córtex cingulado anterior.....	50
Figura 15: Efeitos da administração intra-córtex cingulado anterior de salina ou cloreto de cobalto sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido	

ao estresse crônico em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entrada nos braços abertos no labirinto em cruz elevado.....51

Figura 16: Efeitos da administração intra-córtex cíngulado anterior de salina ou cloreto de cobalto sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos no labirinto em cruz elevado.....52

Figura 17: Efeitos da administração intra-córtex cíngulado anterior de salina ou cloreto de cobalto, sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em estresse crônico em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados no labirinto em cruz elevado.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média dos pesos no primeiro e último dia de estresse e média do ganho de peso durante o período de estresse.....	40
Tabela 2: Média dos pesos no primeiro e último dia de estresse e média do ganho de peso durante o período de estresse.....	43
Tabela 3: Efeitos da administração intra-amígdala de salina ou cloreto de cobalto sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado.....	48
Tabela 4: Média dos pesos no primeiro e último dia de estresse e média do ganho de peso durante o período de estresse.....	49
Tabela 5: Efeitos da administração intra-córtex cingulado anterior de salina ou cloreto de cobalto sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH** - Hormônio adrenocorticotrófico
- ANOVA** – Análise de variância
- AP** – Antero posterior
- CCA** – Córtex cingulado anterior
- dCCA** – Córtex cingulado anterior dorsal
- vCCA** - Córtex cingulado anterior ventral
- CCM** – Córtex cingulado médio
- CeA** – Núcleo central da amígdala
- Cg1** – área cingulada 1
- Cg2** – área cingulada 2
- cm** – Centímetros
- CoCl₂** - Cloreto de Cobalto
- CRH**- Hormônio liberador de corticotrofina
- DSM-5** – Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais
- DV** – Dorso ventral
- EBA** – Entradas nos braços abertos
- EBF** – Entradas nos braços fechados
- HHA** - Hipotálamo-hipófise-adrenal
- HPA** - Hipotálamo-pituitária-adrenal
- i.p.** – Intraperitoneal
- Kg** – Quilograma
- L** – Lateral
- LCE** – Labirinto em cruz elevado
- LCEa** – Labirinto em cruz elevado aberto
- mg** – Miligrama
- mM** – Milimolar
- mm** – Milímetro
- NaCl** - Cloreto de Sódio
- PBS** - Tampão fosfato de sódio
- SAP** – Stretched attend postures (esticar)
- TAG** – Transtorno de ansiedade generalizada
- TAS** – Transtorno de ansiedade social

TC – Tempo gasto no centro

μL – Microlitros

°C – Graus Celsius

%EBA – Porcentagem de entradas nos braços abertos

%TBA – Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Empatia.....	12
1.2 Empatia em roedores	15
1.3 Ansiedade	17
1.3.1 Teste de ansiedade: labirinto em cruz elevado	19
1.4 Estresse	20
1.4.1 Modelo de estresse: contenção no tubo	22
1.5 Amígdala	22
1.6 Córtex cingulado anterior	25
1.7 Hipótese.....	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Sujeitos	30
3.2 Ética.....	30
3.3 Fármacos.....	30
3.4 Estresse de contenção.....	31
3.5 Ganho de peso.....	31
3.6 Imunoflorescência.....	32
3.7 Cirurgia estereotáxica.....	33
3.8 Injeção de salina ou cloreto de cobalto	33
3.9 Labirinto em cruz elevado	34
3.10 Histologia	35
3.11 Delineamento experimental.....	36
3.12 Análise estatística	38
4. RESULTADOS	40
4.1 Exeperimento 1.....	40
4.2 Experimento 2.....	43
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8. ANEXO	73

1. Introdução

1.1 Empatia

A empatia vem sendo estudada desde a década de 80 e o crescente interesse acerca do assunto vem da valorização das relações pessoais no mundo atual (SHAMAY-TSOORY, 2011; BERNHARDT; SINGER, 2012). Entretanto, ainda há muita curiosidade e discrepância sobre o tema, pois não há uma definição universalmente aceita, apenas um consenso de que todas as formas de empatia envolvem a capacidade de entender o outro emocionalmente (DAVIS, 1980; LANGFORD et al., 2006; PANKSEPP et al., 2011; BARTAL et al., 2011; ZAKI et al., 2012).

Do ponto de vista evolutivo, é importante que o indivíduo seja capaz de perceber as suas próprias emoções e daqueles ao seu redor, a fim de facilitar as relações interpessoais e viabilizar comportamentos como a reprodução e a fuga do predador, importantes para a sobrevivência da espécie. A habilidade de reconhecimento e uso dos próprios estados emocionais e dos outros para guiar os pensamentos e regular o comportamento é denominada inteligência emocional (GARDNER, 1983; PLUTINICK, 1992; PRESTON; DE WALL, 2002). Segundo Goleman (2006), a inteligência emocional pode ser dividida em inteligência intrapessoal e inteligência interpessoal, sendo que a primeira envolve a capacidade de distinguir seus próprios sentimentos (ex: prazer e dor), também permite detectar e simbolizar conjuntos mais complexos de sentimentos; enquanto a inteligência interpessoal refere-se à capacidade de monitorar o humor¹ e o temperamento² de outras pessoas e utilizar esse conhecimento visando à previsão de seu comportamento futuro.

¹ Disposição a responder emocionalmente de uma determinada maneira que pode durar horas, dias, ou mesmo semanas, talvez em um nível baixo e sem a pessoa saber o que motivou o estado (VANDENBOS, 2010, p. 490).

² Fundamento básico da personalidade, em geral suposto como sendo biologicamente determinado e presente no início da vida, incluindo características como nível de energia, responsividade emocional, tempo de resposta e disposição para explorar. No comportamento animal, temperamento é definido como o padrão constitucional de reações de um indivíduo, com uma variedade semelhante de características (VANDENBOS, 2010, p. 901-902).

Nesse sentido, a empatia, característica central da inteligência emocional, consiste na habilidade de comunicação, intimamente ligada ao aparecimento de vínculos afetivos, ou seja, é um processo afetivo/cognitivo de modulação social das respostas emocionais (GRENIER; LUTHI, 2010). Shamay-Tsoory (2011) aplica o termo empatia às reações cognitivas e emocionais de um indivíduo ante as experiências observadas do outro. Alguns autores ainda relacionam a empatia a uma gama de fenômenos, sendo uns emocionais, como o contágio emocional (por exemplo, bebês começam a chorar quando ouvem outro bebê chorando) e outros cognitivos, como a simpatia e a compaixão (GARDNER, 1983; SHAMAY-TSOORY, 2011; SAITO et al., 2016). Zaki e Ochsner (2012) propuseram a divisão da empatia em três processos: o mentalizar (mentalizing) que caracteriza a capacidade de perceber e entender o estado emocional do outro; o compartilhamento de experiências (*experience sharing*), que é definido pela habilidade de sentir o que o outro está sentindo; e o comportamento pró-social (*prosocial concern*) que se configura como a motivação para agir frente ao estado do outro.

Quanto ao aspecto neurobiológico, estudos recentes envolvendo os mecanismos encefálicos da empatia ofereceram algumas hipóteses sobre o porquê da percepção de si mesmo e dos outros estarem relacionadas. Preston e De Wall (2002) propuseram que a empatia é baseada no mecanismo de percepção-ação. Isso significa que a observação de um estado motor, perceptivo ou emocional experienciado por um indivíduo ativa as mesmas estruturas e processos neurais no observador, como quando este desenvolve a mesma ação ou experimenta a mesma emoção (PRESTON; DE WALL, 2002; GALLESE et al., 2004; CATTANEO; RIZZOLATTI, 2009; MOYA-ALBIOL et al., 2010).

Essa capacidade do sistema nervoso de representar ações observadas nos outros em seu próprio sistema motor está relacionada a um grupo específico de neurônios conhecidos como neurônios-espelho, que podem atuar não só na codificação dos atos motores observados, mas também permitir ao observador entender as intenções do outro por meio de

mecanismos de aprendizagem observacional (MOYA-ALBIOL et al., 2010). Os neurônios-espelho foram reconhecidos pela primeira vez no córtex pré-motor ventral e lóbulo parietal inferior de macacos. Estes neurônios eram ativados quando o animal executava uma determinada ação e quando observava uma ação semelhante realizada pelo pesquisador (RIZZOLATTI et al., 1996; CATTANEO; RIZZOLATTI, 2009).

Estudos de neuroimagem demonstraram a existência de um sistema espelho em humanos composto por dois principais sítios: um formado pelo lobo parietal, córtex pré-motor e parte caudal do giro frontal inferior (sistema espelho parietofrontal) e o outro pela ínsula e o córtex frontal medial anterior (sistema espelho límbico). O sistema espelho parietofrontal está relacionado ao reconhecimento de comportamentos voluntários como movimento, enquanto o sistema espelho límbico está envolvido com o reconhecimento de comportamentos afetivos e ao uso da linguagem (CATTANEO; RIZZOLATTI, 2009).

Os sistemas citados são reconhecidos como “regiões espelhadas clássicas”, porém, foi proposto recentemente, que a atividade espelho é generalizada no cérebro humano (KEYSERS; GAZZOLA, 2009; MOLENBERGHS et al. 2012). Estudos usaram uma variedade de tarefas para investigar regiões cerebrais com "propriedade espelho" e mostraram que diferentes áreas são ativadas de acordo com o estímulo apresentado. Por exemplo, atividades que exigiam a observação e/ou execução de uma ação motora ativaram, além das áreas clássicas (lóbulo parietal inferior, giro frontal inferior posterior e córtex pré-motor ventral), o córtex pré-motor dorsal, o lóbulo parietal superior, a porção posterior do giro temporal médio e o cerebelo; enquanto atividades focadas na observação e/ou execução de expressões de emoção revelaram ativação em regiões envolvidas no processamento emocional como amígdala, córtex ínsular e giro cingulado (VAN DER GAAG et al., 2007; MOLENBERGHS et al. 2012).

Além da presença de neurônios-espelho, trabalhos com humanos utilizando ressonância magnética funcional relataram que a observação de outros indivíduos com dor pode motivar o comportamento de ajuda. Ainda, estudos com cônjuges compararam a atividade cerebral relacionada à dor no participante que recebeu um estímulo doloroso e no parceiro que apenas observou, apontando uma ativação compartilhada nas redes neurais do casal (FLOR et al., 1987; SINGER et al., 2004; LAMM et al., 2011).

Considerando os achados em humanos, que incluem a presença de neurônios-espelho e a influência emocional da dor, evidências também revelaram a presença de neurônios com propriedade espelho em roedores, além de comportamento pró-social diante de coespecíficos em sofrimento, sugerindo que esses animais podem apresentar comportamento empático (BARTAL et al., 2011; PANKSEPP et al., 2011; USHAKOV et al., 2013; CARRILLO et al., 2019).

1.2 Empatia em Roedores

Acredita-se que os seres humanos dominam os processos de competição entre as espécies devido às habilidades interpessoais de cooperar e entender o outro, que são essenciais para as relações sociais e a formação de sociedades, permitindo a sobrevivência da espécie. Entretanto, essas habilidades não são exclusivas dos seres humanos, visto que já foram demonstradas em primatas não-humanos e outros mamíferos (LANGFORD et al., 2006; SHAMAY-TSOORY, 2011; ZAKI; OCHSNER, 2012).

Evidências demonstraram que roedores possuem os pré-requisitos necessários para expressar empatia, pois são animais sociais, capazes de aprender com os outros e agir de acordo com os estímulos emocionais de seus coespecíficos (PANKSEPP et al., 2011; MOGIL, 2012). Assim, estudos mostraram que ratos (RICE; GAINER 1962; BARTAL et al., 2011) e camundongos (ROTH; FLORES, 2019) podem exibir comportamento pró-social em

resposta a um coespecífico em sofrimento, sugerindo que eles possuem a habilidade de empatia.

Pesquisas sugerem que a empatia em roedores sofre influência da familiaridade, sendo que esses animais apresentam um comportamento análogo ao de um coespecífico observado, mas não ao observarem um estranho. Por exemplo, a observação de um camundongo que recebeu injeção de ácido acético pode provocar hiperalgesia (aumento do número de contorções) em um coespecífico que recebeu o mesmo estímulo, entretanto, isso não ocorre entre animais estranhos (LANGFORD et al., 2006).

Estudos mostraram que camundongos congelam ao observar um coespecífico recebendo choques nas patas, sugerindo que o medo pode ser adquirido indiretamente através da observação (JEON et al., 2010). Tomiyoshi et al. (2009) relataram que camundongos que conviveram com parceiro no qual foi inoculado um tumor exibiram redução da exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado, indicando que o convívio com par em sofrimento produziu aumento da ansiedade. Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que parceiros de caixa-moradia de camundongos submetidos à dor crônica apresentaram hiperalgesia no teste de contorções e aumento das respostas relacionadas à ansiedade no labirinto em cruz elevado (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015).

Para compreender como se dá essa “troca” de informação emocional entre os animais, estudos avaliaram diferentes modalidades sensoriais individualmente - visão, audição e olfato. Demonstrou-se papel importante da visão na mediação dessa comunicação (LANGFORD et al., 2006; BARTAL et al., 2011), porém há evidências de que o olfato e a audição também participam desse processo (SAITO et al., 2016; SMITH et al., 2016; PISANSKY et al., 2017). Smith et al. (2016) mostraram que sinais olfativos emitidos por camundongos com hiperalgesia são suficientes para provocar hipersensibilidade em camundongos alojados e testados na mesma sala. Ainda foi demonstrado que o contágio emocional em ratos pode ocorrer por meio

de vocalizações ultrassônicas específicas, as quais emitem informações sobre o estado afetivo dos animais (SAITO et al., 2016; PISANSKY et al., 2017).

Diante das evidências apresentadas, é plausível supor que o comportamento de roedores pode ser modulado pelo estado afetivo de seus coespecíficos, o que demonstra um compartilhamento emocional entre os animais. Assim, podemos estabelecer modelos animais de empatia, por meio dos quais é possível avaliar respostas comportamentais, como por exemplo respostas relacionadas à ansiedade.

1.3 Ansiedade

A ansiedade é um fenômeno presente na vida do homem desde, talvez, seu surgimento e evolução e não consequência da vida moderna. Constitui uma importante resposta inata, já que a antecipação de um possível ataque por predadores possibilitou o surgimento de estratégias eficazes de enfrentamento ou fuga, garantindo a integridade física e continuidade da espécie (DRACTU; LADER, 1993).

Embora o termo ansiedade traga uma conotação negativa, ela é uma resposta habitual dos indivíduos ao seu meio, com importante valor adaptativo, pois adverte sobre a possibilidade de danos físicos, dor, impotência, punição, frustração e ameaças à integridade, estimulando o organismo a tomar medidas necessárias para impedir tais ameaças ou reduzir suas consequências (BRANDÃO, 2004; CORR, 2011).

Normalmente, a ansiedade é caracterizada por um estado subjetivo de tensão ou apreensão, vago ou difuso, desencadeado em antecipação de ameaça potencial, frequentemente acompanhado por um conjunto de respostas comportamentais como evitação, vigilância, compulsão, além de outras alterações como aumento da frequência respiratória, aceleração dos batimentos cardíacos, tensão muscular, sudorese e fadiga (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; BRANDÃO, 2004; GROSS; HEN, 2004). A resposta de ansiedade

diferencia-se do medo, pois, enquanto esta caracteriza antecipação de ameaça futura, o medo caracteriza uma resposta emocional à ameaça iminente real ou percebida (APA, 2014).

Em certa medida, a ansiedade pode ser considerada normal e até necessária para o desempenho em tarefas cognitivas. No entanto, quando a resposta comportamental é inadequada, em virtude de sua intensidade ou duração, a ansiedade adquire um caráter patológico (transtorno), afetando o desempenho individual nas tarefas da vida cotidiana (BRANDÃO, 2004; GROSS; HEN, 2004; CAMPOS et al., 2013). “Os transtornos de ansiedade são aqueles que compartilham características de medo e ansiedade excessivos e perturbações comportamentais relacionadas” (APA, 2014, p. 189).

A partir do DSM-5, são considerados transtornos de ansiedade: transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de pânico, transtorno de ansiedade de separação, mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade social (TAS), transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento e transtorno de ansiedade devido a outra condição médica. Esses transtornos constituem o maior grupo de distúrbios mentais que afetam os indivíduos, sendo uma das principais causas de incapacidade (APA, 2014; CRASKE et al., 2019).

Estudos básicos e clínicos permitem a compreensão da neurobiologia da ansiedade e dos distúrbios relacionados. Além disso, modelos animais mostraram que em transtornos de ansiedade pode ocorrer hiperativação de algumas áreas cerebrais como tálamo, amígdala, hipocampo, córtex cingulado anterior (CCA), estriado, córtex sensorial e motor e córtex insular, estruturas envolvidas no processamento e geração de emoções (BROOKS; STEIN, 2015). Essas regiões têm maior ou menor envolvimento na modulação da ansiedade dependendo do transtorno ao qual estão associadas. Por exemplo, em humanos, ocorre hiperativação da amígdala em resposta a estímulos sociais no TAS (MACHADO-DE-SOUSA et al., 2014; BROOKS; STEIN, 2015); já no TAG, os pacientes apresentam desregulação

emocional que estaria associada à redução da ativação do CCA, estrutura envolvida no processamento cognitivo (CCA dorsal) e emocional (CCA rostral) (BISHOP et al., 2004; BROOKS; STEIN, 2015).

Carneiro de Oliveira et al. (2017) avaliaram respostas de ansiedade em roedores por meio de um modelo de compartilhamento emocional. Os autores mostraram que camundongos que observaram coespecíficos submetidos ao estresse crônico (contenção no tubo) apresentaram aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado. Semelhante a outros achados, os autores demonstraram que roedores respondem ao sofrimento de seus comuns, sugerindo sua habilidade de empatia.

1.3.1 Teste de ansiedade: labirinto em cruz elevado

Dentre os modelos para avaliar ansiedade em roedores, o labirinto em cruz elevado (LCE) é o mais amplamente utilizado. O LCE foi desenvolvido a partir de estudos sobre padrões exploratórios, cuja premissa básica era que um novo ambiente evoca simultaneamente medo e curiosidade. O teste foi inicialmente proposto por Montgomery (1955) (labirinto em Y), sendo modificado e validado para ratos (PELOW et al., 1985) e camundongos (LISTER, 1987). O teste é baseado na tendência natural dos roedores de explorar ambientes novos e na aversão inata de locais desprotegidos (representados pelos braços abertos). O LCE para avaliação da ansiedade em camundongos, consiste em dois braços abertos (30 cm x 5 cm x 0,25 cm) unidos perpendicularmente a dois braços fechados (paredes transparentes) (30 cm x 5 cm x 15 cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira (LISTER, 1987).

Os índices de ansiedade avaliados compreendem medidas espaço-temporais dos braços abertos (% de entradas e de tempo gasto nos braços abertos) e a atividade locomotora é avaliada pelo número de entradas nos braços fechados (LISTER, 1987; FILE, 1992). O aumento da exploração dos braços abertos indica redução da ansiedade, assim, a

administração de medicamentos ansiolíticos (ex: benzodiazepínicos) em doses não sedativas, aumenta a exploração desses braços. Alterações nas entradas nos braços fechados indicam efeitos não específicos na atividade locomotora. Além das medidas clássicas, também é registrada a imobilidade e comportamentos relacionados ao padrão defensivo de avaliação de risco, como as frequências de mergulhar (movimento de mover a cabeça em direção ao solo) e esticar (stretched attend - SAP: movimento de esticar o corpo sem se locomover) (LISTER, 1987; FILE, 1992; TREIT et al., 1993; RODGERS; JOHNSON, 1995).

1.4 Estresse

Todos os organismos vivos respondem a muitos estímulos estressores, extrínsecos e intrínsecos, que constantemente desafiam seu complexo equilíbrio interno, denominado homeostase. Assim, o termo estresse é utilizado para definir estímulos ameaçadores ou reconhecidos como ameaça à homeostase do organismo (LIPP, 1996; NICOLAIDES et al., 2015).

A exposição ao estresse resulta em uma infinidade de respostas, sendo uma das mais características a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (eixo HPA), que funciona da seguinte forma: diante de um estressor ocorre a ativação de estruturas corticais e límbicas responsáveis pela detecção de ameaças, como por exemplo, o córtex pré-frontal e o núcleo basolateral da amígdala, que enviam projeções para neurônios específicos do hipotálamo no núcleo paraventricular. A estimulação desta região resulta na liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na circulação portal, estimulando a glândula pituitária. Na pituitária anterior, o CRH estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que é conduzido pela circulação até o córtex da glândula adrenal, promovendo a liberação de corticosteroides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores), que preparam o organismo para situações futuras por meio de sua ação sobre estruturas como a amígdala,

córtex pré-frontal e hipocampo (COOK, 2004; CHOTIWAT; HARRIS, 2006; JOELS et al., 2006; GUILLIAMS; EDWRADS, 2010; NICOLAIDES et al., 2015).

O estresse ainda ativa o sistema nervoso autônomo simpático, que é responsável pela liberação de adrenalina e noradrenalina na circulação. Desta forma, os hormônios do estresse atuam de forma coordenada, controlando ações rápidas via sistema nervoso simpático, e lentas, via eixo HPA (GRAEFF, 2007; GUILLIAMS; EDWARDS, 2010; NICOLAIDES et al., 2015).

Além disso, a exposição ao estresse pode promover mudanças comportamentais. Estudos com roedores mostraram que a exposição a estressores pode induzir alterações nas respostas de ansiedade (VAN DIJKEN et al., 1992; MARTIJENA et al., 1997; PADOVAN; GUIMARÃE, 2000; CHOTIWAT; HARRIS, 2006; NICOLAIDES et al., 2015). Por exemplo, camundongos expostos a 2 horas de estresse de contenção por 3 dias consecutivos apresentaram diminuição das entradas nos braços abertos e aumento de tempo gasto nos braços fechados do LCE quando comparados aos animais controle (sem estresse) (CHOTIWAT; HARRIS, 2006).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que, quando camundongos convivem em duplas e um deles é submetido ao estresse de contenção, ocorre aumento do comportamento ansioso tanto no animal contido como em seu parceiro. Essa influência do estresse sobre a resposta de ansiedade entre animais coespecíficos pode ocorrer devido à habilidade que os roedores apresentam de compartilhar estados afetivos (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017).

Assim, modelos animais têm sido desenvolvidos para avaliar respostas comportamentais em roedores utilizando estímulos variados (restrição, choque, exposição a predadores etc.) a fim de induzir estresse nesses animais.

1.4.1 Modelo de estresse: contenção no tubo

Dentre os modelos que induzem o estresse em roedores, a contenção é um dos procedimentos mais comumente empregados para induzir alterações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas. O estresse de contenção é induzido mantendo o animal em um tubo cilíndrico ou semi-cilíndrico com orifícios de ventilação (HARRIS et al., 2004; CHOTIWAT; HARRIS, 2006; CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017).

A contenção pode ser utilizada para induzir estresse agudo ou crônico, dependendo da duração da exposição. Após o estresse de contenção, os animais podem exibir hiper-responsividade a estressores leves subsequentes. Assim, ratos expostos a 2 horas de contenção apresentaram um déficit exploratório no campo aberto, enquanto camundongos expostos à contenção crônica exibiram níveis mais altos de ansiedade no LCE (PADOVAN; GUIMARÃE, 2000; HARRIS et al., 2004; CHOTIWAT; HARRIS, 2006; CAMPOS et al., 2013; CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, animais submetidos à contenção podem apresentar aumento significativo da corticosterona após exposição a testes comportamentais posteriores (CHOTIWAT; HARRIS, 2006).

Neste trabalho utilizamos o modelo de contenção para induzir estresse crônico em camundongos, que foram contidos em tubos de PVC cilíndricos por 1 hora durante 14 dias.

1.5 Amígdala

Estudos acerca da neurobiologia do medo e da ansiedade revelaram as estruturas envolvidas na modulação do comportamento emocional, destacando-se, entre elas, a amígdala, área com forma amendoada e localizada bilateralmente ao lobo temporal anterior do encéfalo próxima à formação hipocampal (TREIT et al., 1993; RAUCH et al., 2003; LeDOUX, 2007; NEUGEBAUER, 2007; BROOKS; STEIN, 2015).

A amígdala é uma estrutura complexa, envolvida em uma gama de funções e formada por núcleos, que são organizados em região córtico-medial (núcleo cortical, medial e central) e região basolateral (núcleo lateral, basal e acessório). Esses núcleos ainda podem ser divididos em subnúcleos. Por exemplo, o núcleo lateral apresenta três subdivisões: dorsal, ventro-lateral e medial, sendo que o lateral dorsal apresenta duas regiões: superior e inferior, cada uma delas com diferentes papéis na memória do medo (AMARAL; BASSETT, 1989; AMARAL; INSAUSTI, 1992; LeDOUX, 2007; NEUGEBAUER, 2007; BROOKS; STEIN, 2015).

Cada região da amígdala faz conexões com diferentes estruturas e essas conexões definem funções, permitindo que diversos tipos de informações sejam processadas pela amígdala. Assim, o núcleo lateral recebe as informações sensoriais que chegam à amígdala (informações visuais, auditivas, olfativas, referentes ao sabor e somatosensoriais), já os núcleos central e basal apresentam conexões de saída. Enquanto as conexões de saída da amígdala central com o tronco cerebral controlam reações emocionais (ex: congelamento na presença de um predador), as conexões da amígdala basal com o estriado estão envolvidas no controle de ações (ex: como correr para a segurança) (LeDOUX, 2007; NEUGEBAUER, 2007; BROOKS; STEIN, 2015).

Estudos funcionais de neuroimagem em humanos relataram a hiperativação da amígdala em transtornos de ansiedade. Foi demonstrada ativação exagerada da estrutura no TAG, TAS, transtorno do pânico e na fobia específica (RAUCH et al., 2003; BROOKS; STEIN, 2015). Além disso, ocorre ativação da amígdala na aprendizagem observacional do medo, em que uma pessoa assiste vídeos de outra experienciando o medo (OLSSON; PHELPS, 2007) ou observa fotografias de expressões faciais emocionalmente negativas. A ativação da amígdala pela simples observação do medo sugere a importância dessa estrutura

no compartilhamento emocional (ZALD; PARDO, 1997; OCHSNER et al., 2004; FITZGERALD et al., 2006; PILLAY et al., 2006).

Pesquisas com animais também ofereceram informações importantes sobre a participação da amígdala na modulação do medo e da ansiedade. Foi demonstrado que a estimulação da amígdala em roedores produz respostas semelhantes ao medo e ansiedade (ROSEN; SCHULKIN, 1998), enquanto lesões na estrutura reduzem os comportamentos relacionados à ansiedade (JANAK; TYE, 2015). Além disso, foi demonstrado papel da amígdala no compartilhamento emocional. Jeon et al. (2010) mostraram que quando um camundongo presencia seu coespecífico recebendo choque nas patas ocorre ativação da amígdala, sugerindo a participação da estrutura em comportamentos relacionados à empatia. De maneira semelhante, Pelarin et al. (2014), investigaram o papel da amígdala na modulação da empatia pela nocicepção em camundongos. Os autores mostraram que camundongos que conviveram com coespecífico submetido à dor crônica pela constrição do nervo ciático apresentaram hipernocicepção no teste de contorções abdominais. Além disso, demonstraram aumento do número de contorções nos animais após a inativação da amígdala com CoCl_2 , evidenciando o importante papel da estrutura na nocicepção induzida pela observação.

Considerando os achados de estudos com humanos e animais, já foi bem descrita a participação da amígdala na modulação da ansiedade (TREIT et al., 1993; RAUCH et al., 2003; LEDOUX, 2007; NEUGEBAUER, 2007; BARBALHO et al., 2009; BROOKS; STEIN, 2015). No entanto, as pesquisas vão além e buscam, por meio de modelos de empatia em roedores, elucidar o papel da amígdala na modulação das emoções compartilhadas (ex: medo e ansiedade).

1.6 Córtex Cingulado Anterior (CCA)

Além da amígdala, outra área relacionada com o processamento de informações afetivas é o córtex cingulado anterior (CCA) (PHELPS et al., 2004; SIMMONS et al., 2008). Em humanos, o CCA juntamente com o córtex cingulado médio (CCM) caracterizam as regiões mais anteriores do córtex cingulado, alternativamente descritas como vCCA (CCA ventral) e dCCA (CCA dorsal), porém essa nomenclatura raramente é utilizada para ratos e camundongos. Em roedores, a nomenclatura comumente aplicada divide o CCA em área cingulada 1 (Cg1) e área cingulada 2 (Cg2) (VAN HEUKELUM et al., 2020).

O CCA tem sido de grande interesse em pesquisas porque está envolvido em uma gama de processos cognitivos, incluindo atenção direcionada, monitoramento de conflitos, memória de trabalho, auto monitoramento, bem como modulação e controle emocional (VAN VEEN et al., 2001; FAN et al., 2003; OSAKA et al., 2003). Pesquisas mostraram a participação do CCA rostral no processamento de informações focadas internamente (atenção focada no “eu”), enquanto o CCA dorsal atua no processamento de informações externamente relevantes (SIMMONS et al., 2008).

Estudos de ressonância magnética funcional em humanos evidenciaram o papel do CCA na modulação da ansiedade. Demonstrou-se que lesões no CCA produzem efeito ansiolítico e aumento de ativação da estrutura foi relatada em transtornos de ansiedade (HAY et al., 1993; BISHOP et al., 2004; MOCHCOVITCH et al., 2014; ZHUO, 2016). Além disso, foi observada hiperatividade do CCA na comunicação emocional do medo, ou seja, quando indivíduos observam expressões faciais de medo (JACKSON et al., 2004; SINGER et al., 2004; SIVASELVACHANDRAN et al., 2018).

Neste sentido, Singer et al. (2004) compararam a atividade cerebral de indivíduos recebendo um estímulo doloroso, com a atividade cerebral dos mesmos indivíduos recebendo um sinal indicando que um ente querido experienciava dor. Os autores mostraram, por meio

de imagens funcionais, ativação do CCA rostral em ambas as situações, sugerindo a participação da estrutura na dor emocionalmente compartilhada.

Estudos com modelos animais também forneceram evidências da participação desta estrutura em diferentes comportamentos. Rudebeck et al. (2006) relataram a participação do CCA na interação social. Em pesquisa com macacos, os autores observaram que lesões na estrutura afetam a maneira como os animais valorizam as informações sociais. Com o intuito de avaliar a participação do CCA na modulação emocional em roedores, Benassi-Cezar et al. (2020) utilizaram um modelo de empatia pela nocicepção em camundongos. Os autores mostraram que a inativação do CCA com CoCl_2 atenuou o comportamento ansioso em animais que conviveram com coespecífico submetido à dor crônica. Além disso, o estudo avaliou o padrão de ativação do CCA por meio da imunomarcagem com FosB e mostrou diminuição da expressão da proteína no CCA em animais que conviveram com parceiro em dor. Esses achados sugerem o envolvimento da estrutura na influência emocional em roedores.

Levando em conta as evidências apresentadas, consideramos este trabalho relevante para compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na modulação da ansiedade e da influência emocional. Ainda, o entendimento desses processos - ansiedade e empatia - permite compreender as patologias associadas a eles, como os transtornos de ansiedade (já citados anteriormente), a personalidade antissocial e o autismo, condições em que há comprometimento do reconhecimento das emoções e sentimentos de outras pessoas (LOCKWOOD, 2016). Assim, modelos animais que avaliam ansiedade e compartilhamento emocional são uma ferramenta útil para direcionar pesquisas em busca de terapias e intervenções adequadas.

1.7 Hipótese

Tendo em vista o crescente interesse da literatura sobre empatia em animais, nosso grupo de pesquisa estabeleceu um modelo de empatia para avaliar respostas comportamentais em camundongos.

Inicialmente, utilizamos um protocolo de empatia pela nocicepção. Avaliamos a influência do convívio com camundongo submetido à dor crônica pela constrição do nervo ciático sobre o comportamento de seu parceiro (companheiro de caixa-moradia). Então, demonstramos que camundongos que conviveram com coespecífico em dor crônica, apresentaram aumento do número de contorções no teste de contorções abdominais e aumento das respostas de ansiedade no teste do LCE (PELARIN, 2014; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; CARMONA et al., 2016; ZANIBONI et al., 2016; SILVEIRA et al., 2018; TAVARES et al., 2018; ZANIBONI et al., 2018; BENASSI-CEZAR et al., 2020; PETRILLI et al., 2020; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2020).

A partir desses resultados e, considerando que a dor é um estímulo estressor (VACHON-PRESSEAU et al., 2013), utilizamos um modelo de estresse crônico para avaliar a empatia em camundongos. Demonstramos que o convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico induzido pela contenção no tubo promove hipernocicepção e comportamento semelhante à ansiedade em animais avaliados no teste de contorções e no LCE respectivamente (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017). Entretanto, permanecem desconhecidas as áreas cerebrais envolvidas na modulação da ansiedade promovida pelo convívio com o estresse crônico em camundongos.

Considerando as evidências citadas sobre a participação da amígdala e do CCA na modulação da ansiedade e no contágio emocional em roedores, nossas hipóteses são:

- *O convívio com coespecífico em estresse crônico altera o padrão de ativação da amígdala e do CCA em camundongos.*

- A inativação da amígdala e do CCA atenua o comportamento semelhante à ansiedade promovido pelo convívio com coespecífico em estresse crônico.

Então, foi realizada imunomarcção com FosB na amígdala e no CCA - a técnica de imunohistoquímica permite mostrar, por meio de interações antígeno-anticorpo, a localização de proteínas específicas em tecidos (COONS et al., 1941); também foi realizada inativação das estruturas com cloreto de cobalto (CoCl_2) - o CoCl_2 é um sal que promove uma inibição não-seletiva e reversível da estrutura, uma vez que impede a liberação de neurotransmissor na fenda-sináptica, impedindo, conseqüentemente, a sinapse (KRETZ, 1984; CRESTANI et al., 2010).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel da amígdala e do córtex cingulado anterior na modulação da ansiedade promovida pelo convívio com coespecífico submetido a um modelo de estresse crônico.

2.2 Objetivos Específicos

Experimento 1. Avaliar o padrão de ativação da amígdala e do CCA pela técnica de imunofluorescência para FosB em camundongos que conviveram com coespecífico em estresse crônico.

Experimento 2. Avaliar o efeito da inativação da amígdala e do CCA pela injeção intra-estrutura de CoCl_2 , na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de estresse crônico, em camundongos expostos ao LCE.

3. Material e Métodos

3.1 Sujeitos

Foram utilizados 204 camundongos machos, da linhagem suíço-albino, com três semanas de idade, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os animais foram alojados no biotério setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem e mantidos em condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas), com livre acesso à água e alimento, exceto durante as breves sessões de teste.

3.2. Ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos – CEUA/UFSCar (CEUA Nº 7821030418). O procedimento experimental seguiu 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.

3.3 Fármacos

- Cloridrato de Cetamina (100 mg/kg, i.p., anestésico, Syntec, Brasil);
- Cloridrato de Xilazina (10 mg/kg, i.p., relaxante muscular, Vetbrands, Brasil);
- Cetoprofeno (5,0 mg/kg, i.p., anti-inflamatório, Vencofarma, Brasil);
- Ceftriaxona (4 mg/kg, i.p., antibiótico, Teuto, Brasil);
- Cloreto de Cobalto (CoCl_2 , 1mM/0,1 μL , intracraniana, Sigma-Aldrich, USA);

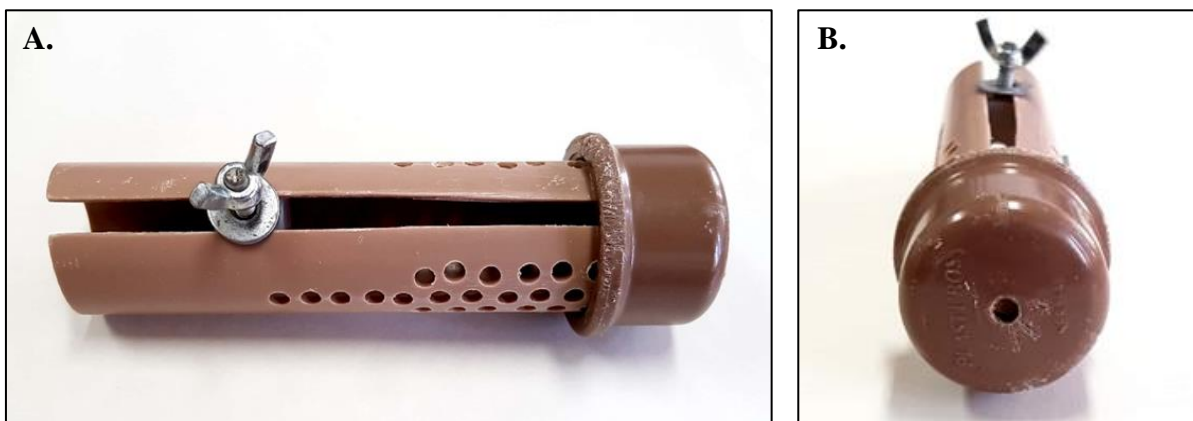
As drogas foram administradas apenas nos animais que passaram por cirurgia estereotáxica e teste comportamental. Todas as drogas foram dissolvidas em salina (NaCl

0,9%) e as doses utilizadas foram selecionadas de acordo com estudos prévios (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; CRESTANI et al., 2010; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014).

3.4 Estresse de contenção

Foi utilizado o modelo de contenção no tubo, em que o animal é colocado no interior de um tubo de PVC [14 cm (comprimento) x 3 cm (diâmetro)] (**Figura 1**) durante 14 dias, 1 hora/dia em sua própria caixa-moradia, na presença de seu parceiro, porém em outra sala, ou seja, os animais são retirados do biotério durante as sessões de estresse (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 1: A. Tubo de PVC utilizado para contenção dos animais. B. Orifício que permite a respiração do animal.



Fonte: autoria própria

3.5 Ganho de peso

Para avaliar se o estresse de contenção realizado foi eficaz, todos os sujeitos foram pesados após a primeira e a última sessão de estresse (15º e 28º dia). O ganho de peso foi calculado com base na equação [(peso no décimo quarto dia) - (peso no primeiro dia)]. Alterações no ganho de peso são uma ferramenta útil para indicar que um protocolo de estresse tem efeitos fisiológicos, pois os animais que passam pela contenção ganham menos peso que os demais, o que ocorre devido a um aumento no gasto de energia e uma

diminuição na ingestão de alimentos durante os dias de contenção (HARRIS et al., 2001; HARRIS et al., 2006; CHOTIWAT; HARRIS, 2006; CARNEIRO-DE-OLIVEIRA et al., 2017).

3.6 Imunofluorescência

Os camundongos foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100/10mg/kg, i.p.) e em seguida foram perfundidos com 100 mL de tampão fosfato de sódio (PBS) (3,2 g de KH_2PO_4 ; 7,1 g de K_2HPO_4 ; 9,1 g de NaCl em 100 mL de água destilada) e com 400 ml de paraformaldeído 4% (4 g de NaOH; 40 g de paraformaldeído; 16,8 g de NaH_2PO_4). Os encéfalos foram removidos, fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora, transferidos para solução de sacarose 30% e armazenados a 4°C por 2 dias. As regiões de interesse (amígdala e CCA) foram seccionadas em fatias coronais de 35 μm de espessura em um criostato (Leica CM1850). As fatias foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com PBS em agitação branda e em seguida incubadas com solução bloqueadora (soro de cabra 3%; Triton X-100 0,25% dissolvidos em PBS) por 1 hora à temperatura ambiente em agitação. Após o bloqueio de 1 hora, as fatias foram incubadas com anticorpo primário (FosB, diluição 1:1000; Abcam, Cat. nº EPR15905, EUA) diluído em solução bloqueadora a 4°C overnight (24 horas) em agitação branda no agitador. Após essa incubação de 24 horas, as fatias foram lavadas com PBS por 6 vezes de 5 minutos em agitação e incubadas com um anticorpo secundário biotínico anti-coelho IgG (Alexa-Fluor 488, diluição 1:1000; Abcam, EUA) diluído em solução bloqueadora por 2 horas a temperatura ambiente sob agitação branda. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS por 6 vezes de 5 minutos em agitação e posteriormente, transferidas para solução de PBS e depositadas em lâminas salinizadas ou gelatinizadas com gelatina e alumíniocromico e cobertas com Fluoroshield com DAPI e

lamínulas. A imunomarcagem de Fos-B foi capturada usando um microscópio de fluorescência (Zeiss Axioskop 2) acoplado a uma câmera e o software Axio Vision Rel. Zeiss foi usado para quantificar a marcação FosB - positiva.

3.7 Cirurgia estereotáxica

Os camundongos foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100/10mg/kg, i.p.). Posteriormente, foram submetidos à tricotomia da região da cabeça e cirurgia estereotáxica (estereotáxico Insight Instruments, Brasil) para implantação bilateral intracraniana de cânulas-guia (25-gauge, 7 mm de comprimento, Insight Equipamentos, Brasil), as quais foram direcionadas à **amígdala**: anteroposterior (AP) = -1,3 mm e lateral (L) = \pm 3,3 mm em relação ao bregma e dorsoventral (DV) = -2,8 mm em relação à base do crânio do animal; e ao **córtex cingulado anterior**: AP = + 1,0 mm e L = \pm 0,2 mm em relação ao bregma e DV = - 1,2 mm em relação à base do crânio do animal. Essas medidas foram calculadas de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001). As cânulas foram fixadas com resina acrílica auto-polimerizante (JET, Brasil) no crânio do animal. Um mandril de aço inoxidável (33-gauge; Fishtex®, Brasil) foi inserido dentro de cada cânula-guia para evitar possíveis obstruções e contaminações, sendo removido para o procedimento de injeção, durante o teste.

Ao final da cirurgia, os animais receberam injeção de anti-inflamatório Cetoprofeno (5,0 mg/kg, i.p.) e antibiótico Ceftriaxona (4 mg/kg, i.p.), para evitar infecções e auxiliar na recuperação pós-cirúrgica (LU et al., 2004; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014).

3.8 Injeção de salina ou cloreto de cobalto

Para investigar o papel específico da amígdala e do córtex cingulado anterior, os animais receberam injeções de salina (NaCl 0,9%) ou cloreto de cobalto (CoCl₂ 1mM) cinco

minutos antes da exposição ao LCE. O procedimento de injeção consistiu em conter manualmente o animal, remover o mandril e inserir a agulha de injeção (33-gauge) dentro das cânulas-guia, sendo que a agulha ultrapassou em 1,0 mm a ponta das cânulas. Cada agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), à microsseringa Hamilton (10 μ L). Uma bomba de infusão (Insight BI2000) foi programada para injetar 0,1 μ L da solução por 60 segundos e permanência da agulha de injeção por 90 segundos, a fim de evitar refluxo da solução injetada (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; REIS; CANTO-DE-SOUZA, 2008).

O CoCl_2 é um sal que se dissocia em Co^{+2} e Cl^{-1} e promove uma inativação reversível e não-seletiva, uma vez que o Co^{+2} compete com o Ca^{+2} pelos canais cálcio-dependentes. Sem a entrada de Ca^{+2} na célula, não ocorre liberação dos neurotransmissores vesiculares na fenda sináptica, não ocorrendo a sinapse, porém sem afetar as fibras de passagem (KRETZ, 1984).

3.9 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Os animais foram expostos ao LCE (**Figura 2**) durante 5 minutos para avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade. O aparato consiste em dois braços abertos (30 cm x 5 cm x 0,25 cm) unidos perpendicularmente a dois braços fechados com paredes transparentes (30 cm x 5 cm x 15 cm), elevados a 38,5 cm do solo por um suporte de madeira. Foram avaliadas: a frequência total de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com as quatro patas para dentro do braço), a porcentagem de entrada nos braços abertos $[(\text{aberto}/\text{total}) \times 100]$ e de tempo gasto no braço aberto; os tempos de permanência nos braços fechados e na parte central do labirinto $[(\text{tempo}/300) \times 100]$ (LISTER, 1987).

Outros parâmetros comportamentais analisados foram: as frequências de mergulhar (movimento exploratório com a cabeça/ombros para fora dos braços abertos) e esticar (stretched attend - SAP: postura exploratória caracterizada pelo corpo do animal estendido

para frente, depois retrai à posição original sem locomoção efetiva, resposta associada à avaliação de risco) e imobilidade. Os braços fechados e o centro foram considerados áreas protegidas e os braços abertos áreas desprotegidas do labirinto (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

O teste foi gravado por um sistema de câmera conectado a um computador localizado em uma sala adjacente. A avaliação dos parâmetros comportamentais foi realizada a partir da observação das gravações, acompanhada do uso de um software de análise etológica X-Plor-Rat 3.0 (GARCIA et al., 2005).

Figura 2: labirinto em cruz elevado; aparato para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade



Fonte: autoria própria

3.10 Histologia

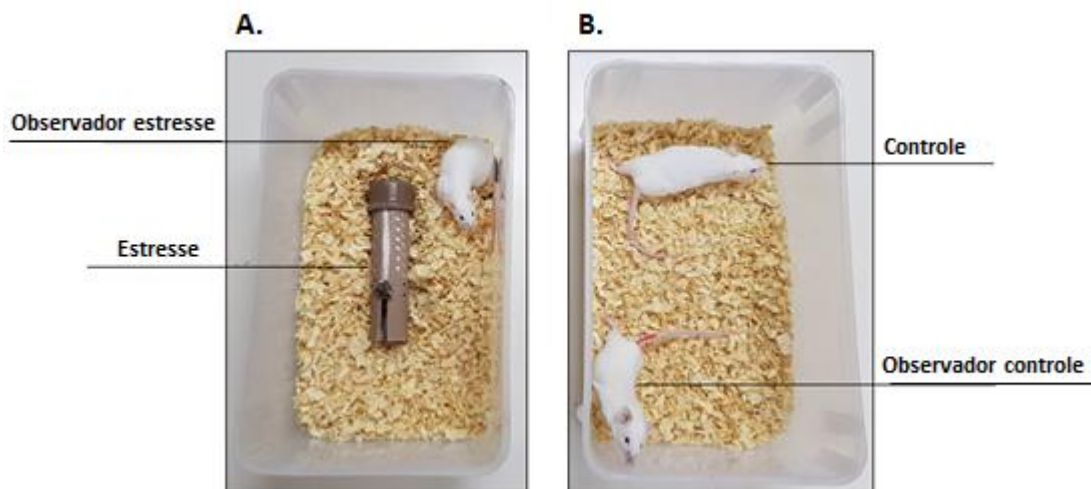
Após o término dos experimentos, os animais que passaram pelo teste comportamental (observador estresse e observador controle), foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (100/10mg/kg, i.p.) e, em seguida, receberam injeção intracraniana (na amígdala ou CCA) bilateral de 0,1 μ L de solução de azul de Evans 1,5%, de acordo com o procedimento descrito no **item 3.8**. Após receberem a solução corante, os animais foram

decapitados, seus cérebros removidos e armazenados em solução de formol 10%. Pelo menos 24 horas antes da secção dos encéfalos, eles foram transferidos para uma solução de sacarose 30% e então foram seccionados em sentido coronal ao longo do trajeto das cânulas com o uso de um criostato (Leica CM1850). Os cortes histológicos foram inspecionados com o uso de um microscópio óptico (Olympus BX41TF), e a dispersão do Azul de Evans indicou o local da injeção de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2001). Os animais cujas injeções não atingiram a estrutura de interesse foram excluídos da análise estatística.

3.11 Delineamento Experimental

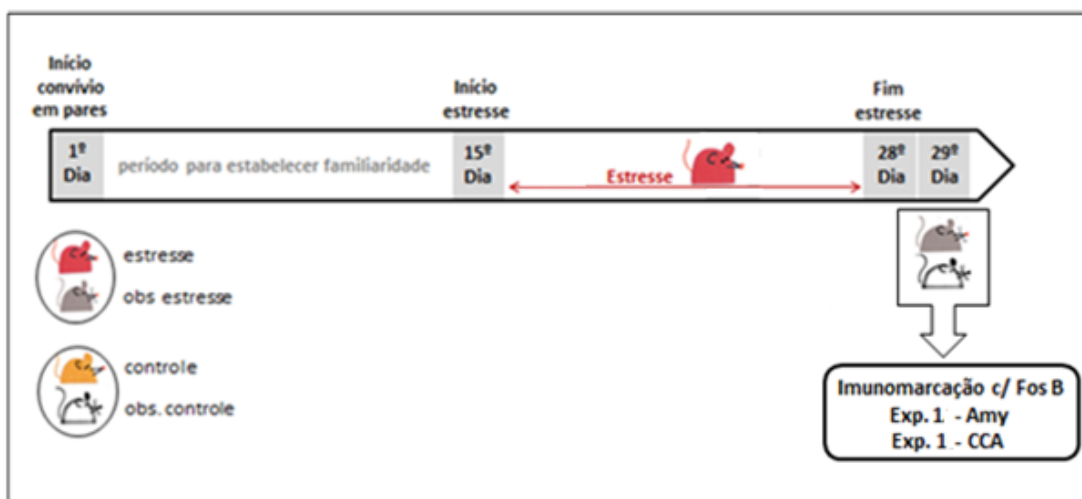
Após o desmame (21 dias pós-nascimento), os animais foram alojados aos pares em caixas-moradia (30 cm x 19 cm x 13 cm) e conviveram por 28 dias, sendo que os 14 primeiros dias serviram para estabelecer familiaridade entre os sujeitos (BARTAL et al., 2011). No 15º dia os animais foram divididos em dois grupos: **Estresse** e **Controle (Figura 3)**. O grupo estresse consistiu dos sujeitos: estresse e observador estresse (alojados na mesma caixa-moradia), sendo que o primeiro foi submetido a sessões de estresse (**item 3.4**) por 14 dias (15º ao 28º dia) durante 1 hora. As sessões de estresse ocorreram na caixa-moradia do animal, na presença do parceiro (observador estresse), em uma das salas do laboratório. O grupo controle foi composto pelos sujeitos: controle e observador controle (alojados na mesma caixa-moradia), sendo que nenhum dos sujeitos foi submetido ao estresse e, durante as sessões de estresse (1 hora/dia), este grupo permanecia em uma sala diferente daquela que estava o grupo estresse.

Figura 3: sujeitos experimentais. **A.** grupo estresse, composto pelo sujeito estresse e observador estresse. **B.** grupo controle, composto pelo sujeito controle e observador controle.



No **experimento 1**, após as sessões de estresse (29º dia), foi realizada a técnica de imunofluorescência para FosB na amígdala e no CCA conforme **item 3.6**. A **Figura 4** traz uma linha do tempo representando as etapas do experimento 1.

Figura 4: linha do tempo representando as etapas do experimento 1.

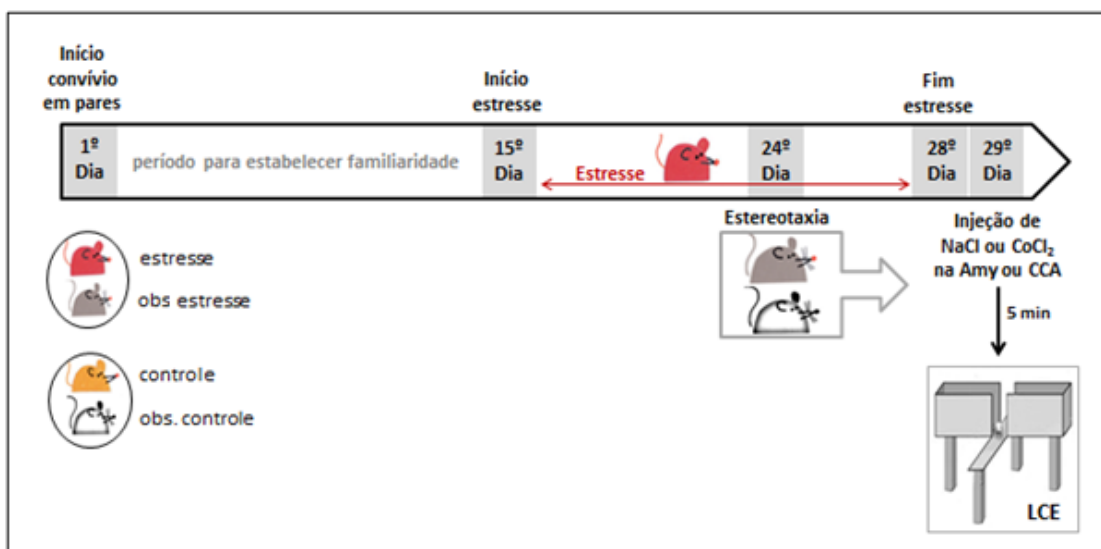


No **experimento 2**, no 24º dia de convivência, o sujeito observador estresse (**grupo estresse**) e o sujeito observador controle (**grupo controle**) passaram por cirurgia para implantação bilateral de cânulas-guia na amígdala e CCA conforme **item 3.7**. No 29º dia, foi

realizada injeção intra- amígdala ou intra-CCA de salina ou CoCl_2 (**item 3.8**) e, após 5 minutos, os animais foram colocados no LCE (**item 3.9**) para avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade e posteriormente foi realizada a histologia (**item 3.10**). A **Figura 5** traz uma linha do tempo representando as etapas do procedimento do experimento 2.

Todos os procedimentos foram realizados na fase clara do ciclo de luz.

Figura 5: linha do tempo representando as etapas do experimento 2.



Todos os sujeitos (**estresse, observador estresse, controle, observador controle**) foram pesados após a primeira e última sessão de estresse (15º dia e 28º dia). O ganho de peso foi considerado uma medida indicativa da efetividade do modelo de estresse (**item 3.5**).

3.12 Análise Estatística

Os dados referentes ao ganho de peso foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de um fator [fator 1: condição (controle/estresse)]. Os dados do experimento 1 foram analisados pelo teste t de Student para medidas não repetidas, e os dados do experimento 2 foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de dois fatores [fator 1: condição (controle/estresse); fator 2: tratamento (salina/ CoCl_2)]. Nos casos de significância

foram, em seguida, analisados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

4. Resultados

4.1 Experimento 1 - Investigação do padrão de ativação da amígdala e do CCA pela técnica de imunofluorescência para FosB em camundongos que conviveram com coespecífico em estresse crônico.

A **Tabela 1** mostra a média dos pesos dos animais no 1º e no 14º dia de estresse e a média do ganho de peso nesse intervalo de tempo. A média do ganho de peso dos animais foi calculada pela equação $\Sigma [(peso \text{ no vigésimo oitavo dia}) - (peso \text{ no décimo quinto dia})] / n^\circ$ de animais.

Tabela 1: Média dos pesos no primeiro e último dia de estresse e média do ganho de peso durante os 14 dias de estresse (n= 6-7/grupo). #p<0,05 comparado ao grupo controle. *p<0,05 comparado ao grupo estresse.

Grupo	Sujeito	1º Dia estresse	14º Dia estresse	Ganho de peso
Controle	Controle	35,4 ± 0,5	43,4 ± 0,5	7,9 ± 0,2
	Observador controle	36,1 ± 1,1	44,0 ± 1,1	7,9 ± 0,4
Estresse	Estresse	34,8 ± 1,5	38,4 ± 0,6	3,6 ± 0,3 #
	Observador estresse	33,7 ± 0,7	41,6 ± 0,7	7,9 ± 0,3 *

A ANOVA de um fator [fator 1: condição (controle/estresse)] revelou efeito da condição ($F_{3,26} = 42,36$; $p < 0,005$). Análises posteriores utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan mostraram que a média do ganho de peso dos sujeitos submetidos ao estresse crônico de contenção foi menor que a média do grupo controle, o que demonstra atenuação no ganho de peso desses sujeitos, indicando a efetividade do estresse de contenção.

Para investigação da concentração de FosB, foram avaliados 13 camundongos divididos da seguinte forma: 6 animais que conviveram com parceiro em estresse e 7 que conviveram com parceiro controle. Os cortes encefálicos da amígdala e do CCA foram extraídos dos mesmos sujeitos.

Amígdala

A **Figura 6** representa a quantificação de células positivas para FosB na amígdala de camundongos que conviveram com parceiro em estresse e a **Figura 7** mostra a ativação neuronal na amígdala dos animais. O teste t revelou que não houve diferença na concentração de FosB na amígdala de animais que conviveram com estresse quando comparados aos animais que conviveram com controle ($t_{10} = 0,38$; $p > 0,05$).

Figura 6: Número de células positivas para FosB por mm^2 na amígdala de camundongos que conviveram com parceiro em estresse. As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM; $n = 6-7$).

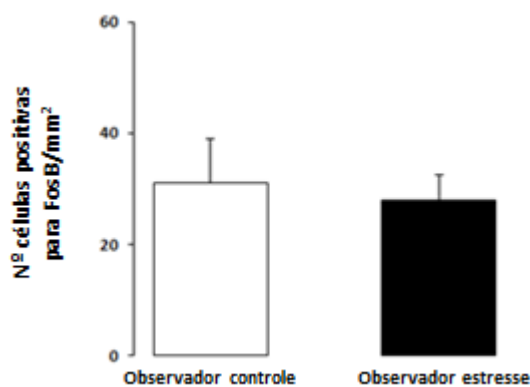
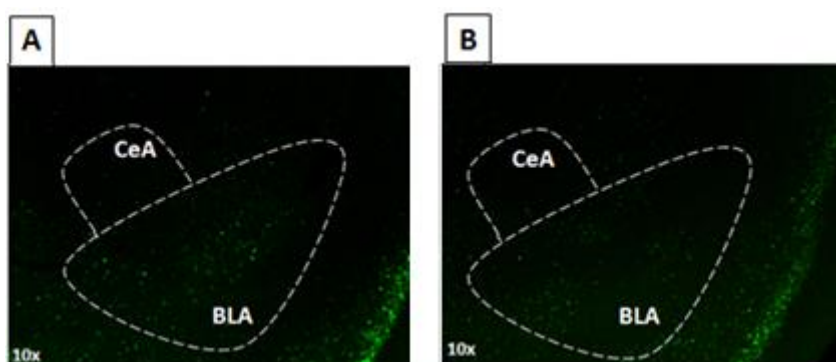


Figura 7: Ativação neuronal na amígdala de camundongos. **A.** encéfalo de sujeito que conviveu com controle (observador controle). **B.** encéfalo de sujeito que conviveu com estresse (observador estresse).



CCA

A **Figura 8** representa a quantificação de células positivas para FosB no CCA de camundongos que conviveram com parceiro em estresse e a **Figura 9** mostra a ativação neuronal no CCA dos animais. O teste t de Student revelou diminuição na concentração de FosB no CCA de animais que conviveram com parceiro em estresse quando comparados aos animais que conviveram com controle ($t_{11} = 3,18$; $p < 0,05$).

Figura 8: Número de células positivas para FosB por mm^2 no CCA de camundongos que conviveram com parceiro em estresse. As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM; $n = 6-7$). # $<0,05$ comparado ao controle.

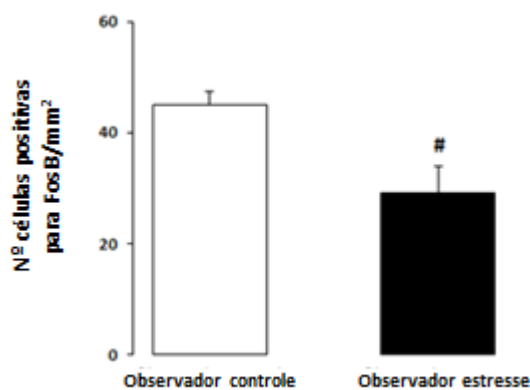
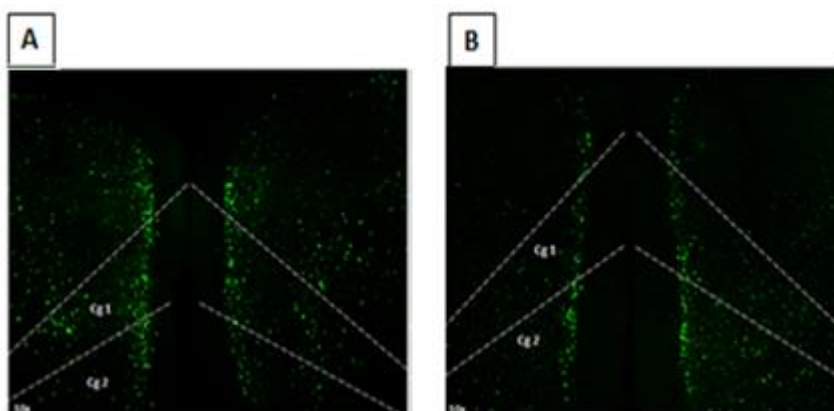


Figura 9: Ativação neuronal no CCA de camundongos. **A.** encéfalo de sujeito que conviveu com controle (observador controle). **B.** encéfalo de sujeito que conviveu com estresse (observador estresse).



4.2 Experimento 2 - Avaliação do efeito da inativação com CoCl_2 , intra-amígdala e intra-CCA, na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em quadro de estresse crônico, em camundongos expostos ao LCE.

Amígdala

A **Tabela 2** mostra a média dos pesos dos animais no 1º e no 14º dia de estresse e a média do ganho de peso nesse intervalo de tempo. A média do ganho de peso dos animais foi calculada pela equação $\Sigma [(\text{peso no vigésimo oitavo dia}) - (\text{peso no décimo quinto dia})] / n^\circ$ de animais.

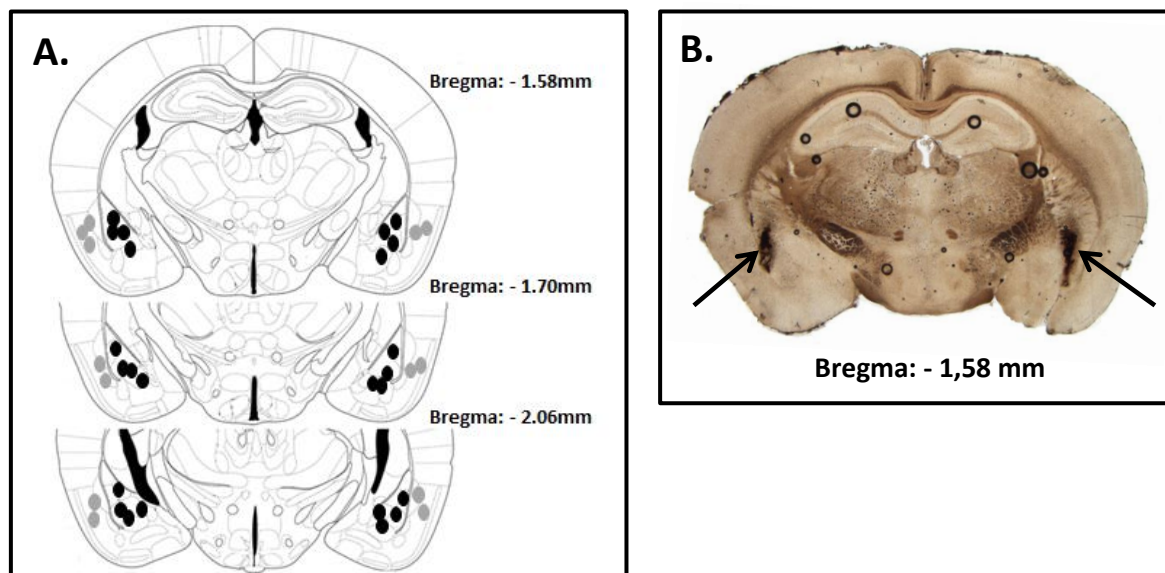
Tabela 2: Média dos pesos no primeiro e último dia de estresse e média do ganho de peso durante os 14 dias de estresse (n= 9-14/grupo). # p<0,05 comparado ao grupo controle. *p<0,05 comparado ao grupo estresse.

Grupo	Sujeito	1º Dia estresse	14º Dia estresse	Ganho de peso
Controle	Controle	40,1 ± 0,9	48,5 ± 0,9	8,4 ± 0,7
	Observador controle	38,8 ± 1,3	43,8 ± 1,7	4,9 ± 0,8 #
Estresse	Estresse	37,6 ± 1,3	40,3 ± 1,1	2,8 ± 0,7 #
	Observador estresse	39,2 ± 1,2	44,4 ± 1,5	5,2 ± 0,7 *

A ANOVA de um fator [fator 1: condição (controle / estresse)] revelou efeito da condição ($F_{3,52} = 9,29$; $p < 0,005$). Análises posteriores utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan mostraram que a média do ganho de peso dos sujeitos submetidos ao estresse crônico de contenção foi menor que a média do controle, o que demonstra uma atenuação no ganho de peso desses sujeitos, indicando a efetividade do estresse de contenção. Os sujeitos observadores do estresse, apresentaram maior ganho de peso em relação ao grupo estresse. Os sujeitos observadores do controle, apresentaram menor ganho de peso em relação ao grupo controle.

Para inativação da amígdala, a análise histológica confirmou a canulação positiva de 42 camundongos e o índice de acerto de 56% do total de animais utilizados.

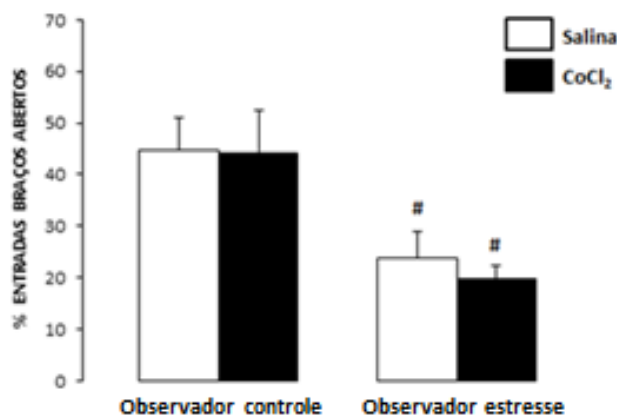
Figura 10: Representação esquemática dos sítios de injeção na amígdala de camundongos. **A.** Os círculos pretos representam os locais de injeção dentro da amígdala e os círculos cinza os locais fora da amígdala. Os cortes coronais representados estão entre -1,58 e -2,06 mm em relação ao bregma no atlas de Paxinos e Franklin, 2001. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos. **B.** Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo, as setas mostram os locais de injeção dentro da amígdala.



Os animais foram divididos de acordo com a condição (observador estresse/observador controle) e tratamento (salina/ CoCl_2) da seguinte forma: **observador estresse/salina** = 09; **observador estresse/ CoCl_2** = 14; **observador controle/salina** = 09; **observador controle/ CoCl_2** = 10.

A **Figura 11** mostra os efeitos da administração intra-amígdala de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) demonstrou que na porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) houve efeito significativo na condição ($F_{1,38} = 16,12$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 0,17$; $p > 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{1,38} = 0,08$; $p > 0,05$).

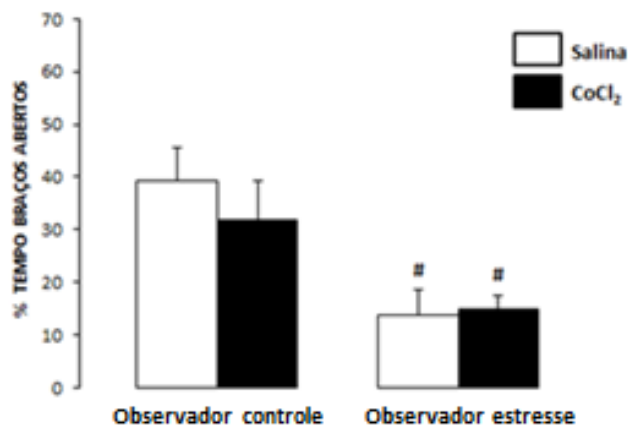
Figura 11: Efeitos da administração intra-amígdala de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M + EPM; n=9-14). #p<0,05 comparado ao observador controle.



Análises posteriores utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan mostraram que os animais que conviveram com o parceiro estressado e receberam salina e CoCl_2 intra-amígdala (observador estresse/salina e observador estresse/ CoCl_2) apresentaram diminuição da %EBA comparados aos seus respectivos grupos controle (observador controle/salina e observador controle/ CoCl_2) demonstrando a influência do convívio nas respostas relacionadas à ansiedade.

A **Figura 12** mostra os efeitos da administração intra-amígdala de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) revelou que na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) houve efeito significativo na condição ($F_{1,38} = 16,17$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para tratamento ($F_{1,38} = 0,38$; $p > 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{1,38} = 0,67$; $p > 0,05$).

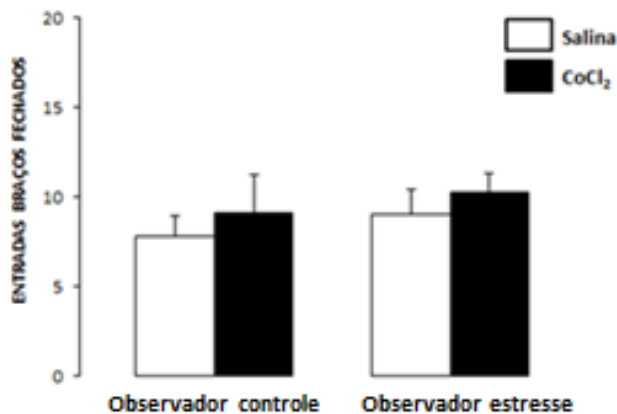
Figura 12: Efeitos da administração intra-amígdala de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M + EPM; n=9-14). #p<0,05 comparado ao observador controle.



Análises posteriores utilizando o teste de Duncan mostraram que os animais que conviveram com o parceiro estressado tratados com salina (observador estresse/salina) e com CoCl_2 (observador estresse/ CoCl_2) apresentaram diminuição da %TBA quando comparados aos respectivos grupos controle (observador controle/salina e observador controle/ CoCl_2) demonstrando o efeito do convívio.

A **Figura 13** mostra os efeitos da administração intra-amígdala de salina ou CoCl_2 , sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) revelou que para as entradas nos braços fechados (EBF), medida de atividade locomotora, não ocorreu efeito significativo para a condição ($F_{1,38} = 0,62$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 0,73$; $p > 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{1,38} = 0,00$; $p > 0,05$).

Figura 13: Efeitos da administração intra-amígdala de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em estresse crônico em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados (EBF) no LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M + EPM; n= 9-14).



A **Tabela 3** mostra os efeitos da administração intra-amígdala de salina ou CoCl_2 sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) não revelou efeito significativo para porcentagem de tempo gasto no centro (%TC) [condição ($F_{1,38} = 0,01$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 0,00$; $p > 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{1,38} = 0,40$; $p > 0,05$)]. Entretanto, a ANOVA revelou efeito significativo no total de mergulhos para condição ($F_{1,38} = 9,44$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para tratamento ($F_{1,38} = 0,02$; $p > 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{1,38} = 0,12$; $p > 0,05$). Para a porcentagem de mergulho protegido revelou efeito para condição ($F_{1,38} = 63,80$; $p < 0,05$), tratamento ($F_{1,38} = 7,76$; $p < 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{1,38} = 6,02$; $p < 0,05$). Para o total de SAP, revelou efeito para interação entre condição e tratamento ($F_{1,38} = 6,46$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para condição ($F_{1,38} = 0,04$; $p > 0,05$) e tratamento ($F_{1,38} = 1,00$; $p > 0,05$). Para a porcentagem de esticar protegido (%SAP protegido), revelou efeito para condição ($F_{1,38} = 9,99$; $p < 0,05$), sem efeito significativo

para o tratamento ($F_{1,38} = 1,38$; $p > 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{1,38} = 1,83$; $p > 0,05$);

Tabela 3. Efeitos da administração de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL) intra-amígdala sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. Os dados representam média \pm erro padrão da média. # $p < 0,05$ comparado ao observador controle. * $p < 0,05$ comparado ao salina.

Comportamento	Observador controle		Observador estresse	
	Salina	CoCl_2	Salina	CoCl_2
Tempo no centro (%)	15,6 \pm 2,9	17,3 \pm 3,5	17,7 \pm 2,8	15,8 \pm 2,1
Total de mergulhos	48,6 \pm 3,4	46,4 \pm 6,3	33,3 \pm 4,2 #	34,2 \pm 3,3
Mergulho protegido (%)	35,3 \pm 6,1	3,1 \pm 0,4 *	69,4 \pm 9,1 #	67,3 \pm 5,7 #
Total SAP	63,0 \pm 6,8	46,6 \pm 2,8 *	50,2 \pm 6,1	57,3 \pm 2,7
SAP protegido (%)	50,9 \pm 7,2	66,9 \pm 7,1	79,5 \pm 7,4 #	78,4 \pm 4,1

Comparações posteriores utilizando o teste de Duncan revelaram diminuição no total de mergulhos no grupo observador estresse/salina comparado ao grupo observador controle/salina e aumento da porcentagem de mergulho protegido nos animais que conviveram com parceiro estressado tratados com salina e com CoCl_2 (observador estresse/salina e observador estresse/ CoCl_2), em comparação aos respectivos grupos controle (observador controle/salina e observador controle/ CoCl_2). Com relação à porcentagem de SAP protegido, houve aumento do comportamento nos animais que conviveram com parceiro estressado e receberam salina (observador estresse/salina) em comparação ao grupo observador controle/salina. O tratamento com CoCl_2 não produziu efeito nos animais que conviveram com parceiro estressado, entretanto promoveu diminuição da porcentagem de mergulho protegido e do total de SAP nos animais que conviveram com parceiro controle (observador controle/ CoCl_2) em comparação ao controle/salina.

Córtex Cingulado Anterior

A **Tabela 4** mostra a média dos pesos dos animais no 1º e no 14º dia de estresse e a média do ganho de peso nesse intervalo de tempo. A média do ganho de peso dos animais foi calculada pela equação $\Sigma [(peso \text{ no vigésimo oitavo dia}) - (peso \text{ no décimo quinto dia})] / n^\circ$ de animais.

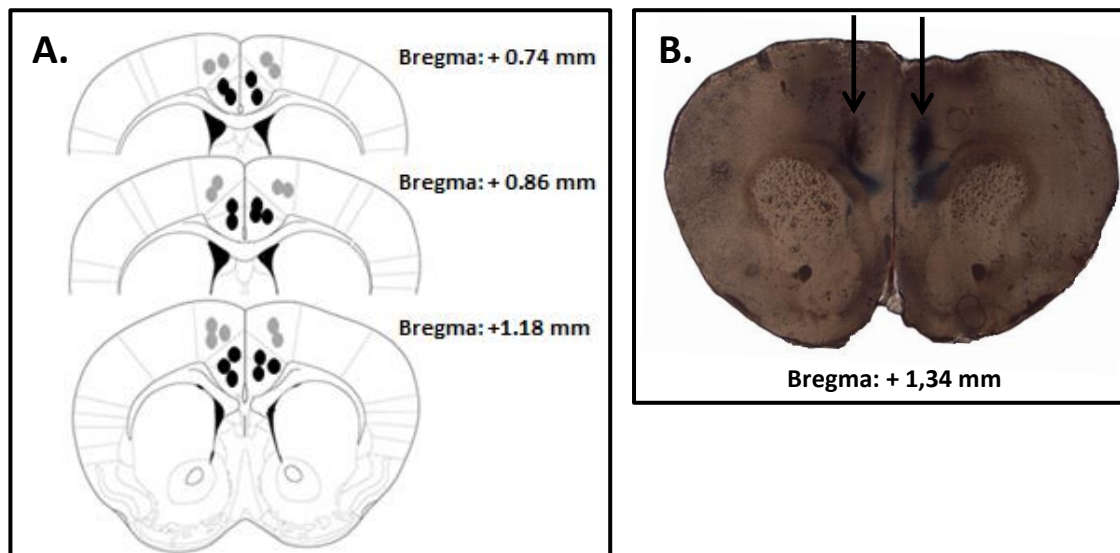
Tabela 4: Média dos pesos no primeiro e último dia de estresse e média do ganho de peso durante os 14 dias de estresse (n= 11-13/grupo). #p<0,05 comparado ao grupo controle. *p<0,05 comparado ao grupo estresse.

Grupo	Sujeito	1º Dia estresse	14º Dia estresse	Ganho de peso
Controle	Controle	36,5 ± 1,0	44,7 ± 1,1	8,1 ± 0,3
	Observador controle	34,6 ± 3,5	39,9 ± 4,1	5,3 ± 0,6 #
Estresse	Estresse	34,5 ± 1,2	36,4 ± 1,5	1,8 ± 0,6 #
	Observador estresse	37,2 ± 3,4	38,8 ± 4,0	6,2 ± 0,7 *

A ANOVA de 1 via [fator 1: condição (estresse/controle)] revelou efeito da condição ($F_{3,48} = 22,26$; $p < 0,005$). Análises posteriores utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan mostraram que a média do ganho de peso dos sujeitos submetidos ao estresse crônico de contenção foi menor que a média do grupo controle, o que demonstra uma atenuação no ganho de peso desses sujeitos, indicando a efetividade do estresse de contenção. Os sujeitos observadores do estresse, apresentaram maior ganho de peso em relação ao grupo estresse. Os sujeitos observadores do controle, apresentaram menor ganho de peso em relação ao grupo controle.

Para inativação do CCA, a análise histológica confirmou a canulação positiva de 47 camundongos e o índice de acerto de 67% do total de animais utilizados.

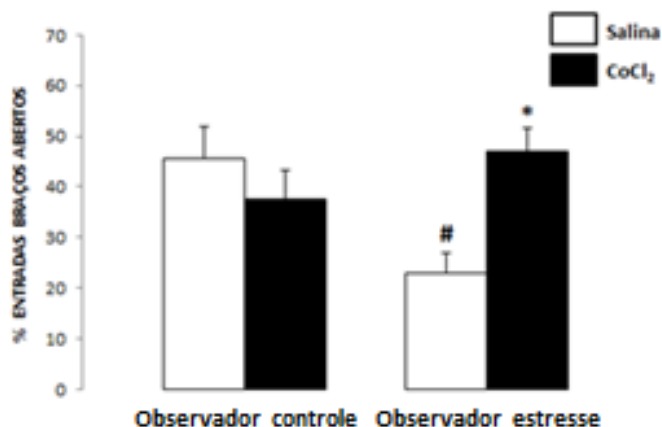
Figura 14: Representação esquemática dos sítios de injeção no CCA de camundongos. **A.** Os círculos pretos representam os locais de injeção dentro do CCA e os círculos cinza os locais fora do CCA. Os cortes coronais representados estão entre + 0,74 e + 1,18 mm em relação ao bregma no atlas de Paxinos e Franklin, 2001. Devido à sobreposição, o número de pontos representados é menor do que o número real de camundongos. **B.** Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo, as setas mostram os locais de injeção dentro do CCA.



Os animais foram divididos de acordo com a condição (observador estresse/observador controle) e tratamento (salina/CoCl₂) da seguinte forma: **observador estresse/salina** = 12; **observador estresse/CoCl₂** = 13; **observador controle/salina** = 11; **observador controle/CoCl₂** = 11.

A **Figura 15** mostra os efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl₂ sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) demonstrou que na porcentagem de entradas nos braços abertos (% EBA) houve efeito significativo na interação entre condição e tratamento ($F_{1,43} = 9,54$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para condição ($F_{1,43} = 1,62$; $p > 0,05$) e tratamento ($F_{1,43} = 2,49$; $p > 0,05$).

Figura 15: Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos avaliados sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M + EPM; n= 11-13). # $p < 0,05$ comparado ao observador controle/salina. * $p < 0,05$ comparado ao salina.

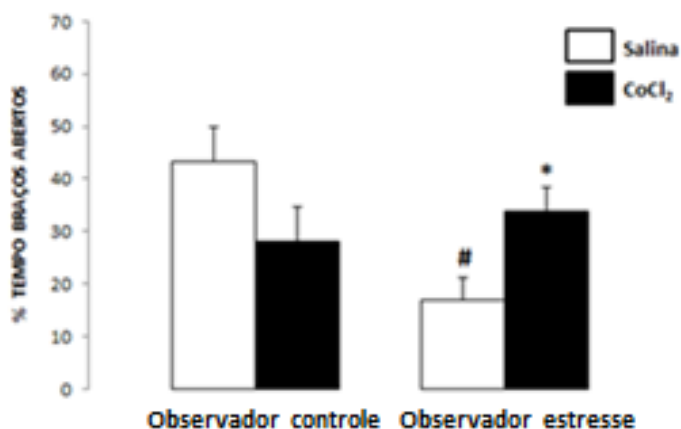


Análises posteriores utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan revelaram que os animais que conviveram com parceiro estressado tratados com salina (observador estresse/salina) apresentaram uma diminuição da %EBA comparados ao grupo observador controle/salina, sugerindo influência do convívio nas respostas relacionadas à ansiedade.

O tratamento intra-CCA com CoCl_2 produziu aumento da %EBA quando comparado ao tratamento com salina nos animais que conviveram com o parceiro em estresse, sugerindo que o CoCl_2 foi capaz de reverter a ansiedade promovida pelo convívio. O tratamento intra-CCA com CoCl_2 não alterou a %EBA nos animais que conviveram com o sujeito controle (observador controle/ CoCl_2) comparados ao grupo observador controle/salina.

A **Figura 16** mostra os efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) revelou que na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) houve efeito significativo na interação entre condição e tratamento ($F_{1,43} = 8,52$; $p < 0,05$), porém sem efeito significativo na condição ($F_{1,43} = 3,44$; $p > 0,05$) e no tratamento ($F_{1,43} = 0,02$; $p > 0,05$).

Figura 16: Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1mM/0,1 μL) sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos avaliados sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) do LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M + EPM; n=11-13). #p<0,05 comparado ao observador controle/salina. *p<0,05 comparado ao salina.

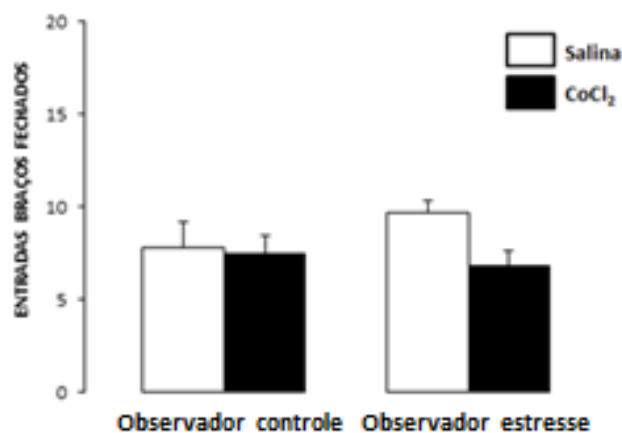


Análises posteriores utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan revelaram que os animais que conviveram com o parceiro em estresse tratados com salina (observador estresse/salina) apresentaram diminuição da %TBA quando comparados ao grupo observador controle/salina, demonstrando o efeito do convívio.

O tratamento intra-CCA com CoCl_2 produziu aumento da %TBA quando comparado ao tratamento com salina nos animais que conviveram com parceiro estressado, sugerindo que a inativação do CCA reverteu a ansiedade induzida pelo convívio. A injeção intra-CCA de CoCl_2 não alterou a %TBA nos animais que conviveram com controle (observador controle/ CoCl_2) quando comparados ao grupo observador controle/salina.

A **Figura 17** mostra os efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 , sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) revelou que para as entradas nos braços fechados (EBF), medida de atividade locomotora, não ocorreu efeito significativo para a condição ($F_{1,43} = 0,35$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,43} = 2,78$; $p > 0,05$) e interação entre condição e tratamento ($F_{1,43} = 1,68$; $p > 0,05$).

Figura 17: Efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL), sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico em estresse crônico em camundongos avaliados sobre as entradas nos braços fechados (EBF) no LCE. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M + EPM; n= 11-13).



A **Tabela 5** mostra os efeitos da administração intra-CCA de salina ou CoCl_2 sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. A ANOVA de dois fatores (condição x tratamento) não revelou efeito significativo na porcentagem de tempo no centro [condição ($F_{1,43} = 0,02$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,43} = 0,16$; $p > 0,05$), interação entre condição e tratamento ($F_{1,43} = 0,35$; $p > 0,05$)]. Entretanto, a ANOVA revelou efeito significativo para o total de mergulhos na interação entre condição e tratamento ($F_{1,43} = 8,37$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para a condição ($F_{1,43} = 2,80$; $p > 0,05$) e tratamento ($F_{1,43} = 0,44$; $p > 0,05$). Para a porcentagem de mergulho protegido revelou efeito para interação entre condição e tratamento ($F_{1,43} = 7,30$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para a condição ($F_{1,43} = 3,60$; $p > 0,05$) e tratamento ($F_{1,43} = 0,40$; $p > 0,05$). Para o total de SAP, a ANOVA não revelou efeito significativo [condição ($F_{1,43} = 1,26$; $p > 0,05$), tratamento ($F_{1,43} = 1,20$; $p > 0,05$), interação entre condição e tratamento ($F_{1,43} = 0,41$; $p > 0,05$)]. Para a porcentagem de esticar protegido (%SAP), revelou efeito para interação entre condição e tratamento ($F_{1,43} = 7,43$; $p < 0,05$), sem efeito significativo para a condição ($F_{1,43} = 2,50$; $p > 0,05$) e tratamento ($F_{1,43} = 0,05$; $p > 0,05$).

Tabela 5. Efeitos da administração de salina ou CoCl_2 (1 mM/0,1 μL) intra-CCA sobre a modulação da ansiedade induzida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. Os dados representam média \pm erro padrão da média. # $p < 0,05$ comparado ao observador controle/salina. * $p < 0,05$ comparado ao salina.

Comportamento	Observador controle		Observador estresse	
	Salina	CoCl_2	Salina	CoCl_2
Tempo no centro (%)	19,7 \pm 2,1	17,2 \pm 2,8	18,7 \pm 2,5	19,2 \pm 2,2
Total de mergulhos	45,5 \pm 4,4	36,1 \pm 5,7	26,3 \pm 3,2#	41,3 \pm 3,2 *
Mergulho protegido (%)	35,8 \pm 6,9	51,8 \pm 9,3	71,4 \pm 7,9#	45,6 \pm 6,6 *
Total SAP	45,2 \pm 4,2	38,4 \pm 2,9	47,1 \pm 4,9	45,3 \pm 3,2
SAP protegido (%)	52,5 \pm 6,2	67,7 \pm 7,6	78,7 \pm 4,7#	60,7 \pm 5,6

Comparações posteriores utilizando o teste de Duncan revelaram diminuição no total de mergulhos no grupo estresse/salina comparado ao grupo observador controle/salina e aumento no total de mergulhos nos animais que conviveram com parceiro estressado tratados com CoCl_2 (observador estresse/ CoCl_2) em relação ao observador estresse/salina. Houve aumento da porcentagem de mergulho protegido nos animais que conviveram com parceiro estressado tratados com salina (observador estresse/salina) em comparação ao grupo observador controle/salina. O tratamento com CoCl_2 promoveu uma diminuição da porcentagem de mergulho protegido nos animais que conviveram com parceiro estressado (observador estresse/ CoCl_2) comparados ao observador estresse/salina. Houve aumento da %SAP protegido nos animais que conviveram com parceiro estressado e receberam salina em comparação ao observador controle/salina;

5. Discussão

O presente estudo avaliou o papel da amígdala e do CCA na modulação da ansiedade induzida pela empatia em um modelo de estresse crônico em camundongos por meio da técnica de imunofluorescência para FosB e inibição reversível das estruturas com CoCl_2 . Os resultados mostraram que o convívio com parceiro em estresse não alterou o número de células positivas para FosB na amígdala, enquanto reduziu o número de células no CCA. O tratamento intra-amígdala com CoCl_2 não produziu efeito sobre as respostas de ansiedade, enquanto o tratamento intra-CCA com CoCl_2 atenuou o comportamento semelhante à ansiedade nos animais que conviveram com par em estresse.

Para avaliar se o estresse de contenção realizado foi efetivo, todos os sujeitos (estresse, observador, controle, observador controle) foram pesados após a primeira e a última sessão de estresse (15º e 28º dia). O ganho de peso neste período foi calculado com base na equação [(peso no vigésimo oitavo dia) – (peso no décimo quinto dia)]. Alterações no ganho de peso são uma ferramenta útil para indicar que um protocolo de estresse tem efeitos fisiológicos, pois os animais que passam pela contenção ganham menos peso que os demais, o que ocorre devido a um aumento no gasto de energia e uma diminuição na ingestão de alimentos durante os dias de contenção. Após o período de contenção, o consumo alimentar e o gasto energético retornam aos níveis pré-estresse e os animais voltam a ganhar peso na mesma proporção dos controles (HARRIS et al., 2004; CHOTIWAT; HARRIS, 2006; HARRIS et al., 2006; CRUZ et al., 2012; CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017). No nosso estudo a média do ganho de peso dos sujeitos submetidos ao estresse crônico foi menor que a média dos demais, o que demonstra uma atenuação no ganho de peso desses sujeitos, indicando a efetividade do estresse de contenção.

Com relação ao modelo de empatia utilizado, nossos resultados demonstraram que a convivência com um animal submetido ao estresse crônico de contenção promoveu aumento

das respostas relacionadas à ansiedade, sugerindo que o convívio com o estresse influencia as respostas comportamentais do parceiro. Os nossos resultados são semelhantes aos observados anteriormente por Carneiro de Oliveira et al. (2017) que utilizaram o mesmo modelo de estresse crônico de contenção para investigar a empatia em camundongos. Os autores mostraram que o convívio com camundongos submetidos ao estresse de contenção levou ao aumento das respostas relacionadas à ansiedade em animais expostos ao LCE, uma vez que os animais exploraram menos os braços abertos do aparato e apresentaram aumento de comportamentos de avaliação de risco. Além disso, apresentaram hipernocicepção no teste de contorções abdominais e alterações nos comportamentos defensivos no teste de exposição ao rato.

O modelo de contenção também foi utilizado por Bartal et al. (2011) com objetivo de demonstrar que ratos apresentam comportamento pró-social diante de coespecíficos em sofrimento. Ratos livres em uma arena aprendem rapidamente a abrir a porta de um compartimento onde estava preso seu parceiro, o que não ocorre quando os compartimentos contêm objetos ou estão vazios. Os autores relataram que a abertura da porta não é fácil, tornando aberturas acidentais improváveis e ainda observaram que quando os animais aprendem a abrir a porta, a latência de abertura diminui nas sessões seguintes. Além disso, o comportamento (abrir a porta) ocorre sem treinamento ou recompensa, sugerindo que os animais agem para cessar o sofrimento do parceiro. Este comportamento de ajuda exibido pelos animais trata-se de uma forma de empatia.

Outros autores avaliaram a influência do estado afetivo de roedores sobre o comportamento de coespecíficos. Langford et al. (2006) avaliaram a influência emocional da dor por meio de um modelo de dor aguda. Os autores demonstraram que a observação de um camundongo submetido à dor pela injeção de ácido acético provoca aumento das respostas nociceptivas (hiperalgesia) em um coespecífico que recebeu o mesmo estímulo. Os autores

ainda relataram que essa influência emocional não ocorre entre animais estranhos, sugerindo a importância da familiaridade para a empatia em roedores. Da mesma maneira, nosso grupo de pesquisa, demonstrou que camundongos que conviveram com coespecífico submetido à dor crônica (constricção do nervo ciático) apresentaram respostas ansiogênicas e hipernociceptivas quando expostos ao LCE e ao teste de contorções abdominais respectivamente (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015).

No experimento 1, avaliamos o padrão de ativação da amígdala e do CCA em camundongos que conviveram com parceiro em estresse crônico e observamos padrões distintos de ativação. A avaliação da amígdala não mostrou diferença significativa na quantificação de células positivas para FosB em animais que conviveram com parceiro em estresse em comparação aos animais que conviveram com controle.

Em estudo semelhante, Tavares et al. (2020) investigaram a ativação da amígdala em camundongos que conviveram com parceiro submetido à dor crônica induzida pela constricção do nervo ciático. Os autores observaram diminuição das células marcadas com FosB no núcleo central (CeA) esquerdo. Convém ressaltar, que em nosso trabalho avaliamos bilateralmente a amígdala sem distinção de núcleo e hemisfério. Além disso, nós utilizamos o modelo de estresse de contenção no tubo, enquanto Tavares et al. (2020) utilizaram um modelo de dor crônica. Essas diferenças metodológicas podem explicar a diferença nos resultados obtidos.

Em outro estudo, Kormos et al. (2016), encontraram aumento da concentração de FosB na amígdala de camundongos expostos ao estresse crônico variável. Diferenças metodológicas são uma possível explicação para a diferença dos resultados encontrados em nosso trabalho para o de Kormos et al. (2016). Enquanto estes utilizaram diferentes estímulos estressores, nós utilizamos o mesmo estímulo (contenção no tubo) durante os 14 dias de protocolo. Considerando que a exposição a um mesmo estressor repetidas vezes pode levar à habituação e

consequentemente à redução das respostas fisiológicas frente ao estressor (GRISSOM; BHATNAGAR, 2009), seria plausível supor que o nosso sujeito contido no tubo não sofreu alteração na ativação de uma estrutura relacionada ao estresse, a amígdala. Vale ressaltar que em nosso estudo avaliamos o padrão de ativação da amígdala no parceiro do animal submetido ao estresse e não podemos descartar que outras estruturas possam estar envolvidas com este padrão de ativação.

Por outro lado, a avaliação do CCA mostrou diminuição de células positivas para FosB no CCA de camundongos que conviveram com parceiro em estresse quando comparados aos animais que conviveram com controle. Benassi-Cezar et al. (2020) investigaram a ativação do CCA pela técnica de imunofluorescência para FosB em camundongos que conviveram com parceiro submetido à dor crônica. Os autores também relataram diminuição da concentração de FosB no CCA dos animais. Sendo a dor crônica um estímulo estressante, podemos considerar a metodologia dos trabalhos semelhante, assim, nossos resultados vão ao encontro dos achados de Benassi-Cezar et al. (2020).

Nossos resultados referentes à inativação química do CCA, apontaram participação da estrutura na modulação da ansiedade promovida pelo convívio com o estresse. Assim, esperávamos encontrar, nas análises de imunohistoquímica, maior ativação da estrutura em camundongos que conviveram com parceiro em estresse em comparação aos animais que conviveram com controle. Curiosamente, nossos resultados mostraram diminuição no padrão de ativação do ACC nos camundongos que conviveram com parceiro em estresse. Uma possível explicação pode estar relacionada aos sistemas glutamatérgico e gabaérgico. Considerando que as proteínas FosB estão localizadas principalmente em neurônios glutamatérgicos (ROBISON et al., 2013; VIALOU et al., 2015), seria plausível sugerir que a diminuição na marcação de FosB pode estar relacionada à ação inibitória de neurônios

gabaérgicos locais sobre a neurotransmissão glutamatérgica. No entanto, esta hipótese precisa ser confirmada com experimentos adicionais.

No experimento 2, avaliamos o efeito da inativação da amígdala na modulação da ansiedade promovida pelo convívio com parceiro submetido ao estresse crônico. Os animais que conviveram com parceiro submetido ao estresse e receberam salina ou CoCl_2 intra-amígdala apresentaram redução da %EBA e a %TBA, sugerindo que o convívio com o estresse produziu efeito ansiogênico. O tratamento intra-amígdala com CoCl_2 não alterou as respostas de ansiedade nos animais que conviveram com parceiro estressado nem nos animais que conviveram com controle, sugerindo que a amígdala não participa do compartilhamento emocional avaliado neste estudo.

Recentemente, Sorregotti et al. (2018) avaliaram o efeito da inativação da amígdala sobre a antinocicepção e os comportamentos defensivos em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado aberto (LCEa). Os autores mostraram que a resposta antinociceptiva e os comportamentos defensivos induzidos pela exposição ao LCEa, não foram alterados pela inativação bilateral da amígdala. Sem esquecer as diferenças metodológicas dos trabalhos, os nossos resultados mostraram que a inativação da amígdala não produziu efeito sobre os comportamentos relacionados à ansiedade nos animais que conviveram com parceiro em estresse expostos ao LCE corroborando com os resultados obtidos por Sorregotti et al. (2018).

Nossos achados diferem de estudos prévios que mostraram hiperativação da amígdala em respostas ansiogênicas (RAUCH et al., 2003; OLSSON; PHELPS, 2007; JANAK; TYE, 2015). Uma possível explicação para a ausência de efeitos da inativação da amígdala talvez se deva às diferenças nos procedimentos experimentais, como o estímulo apresentado (estresse de contenção ou outros) e o teste utilizado (LCE ou outros), uma vez que o conjunto de fatores influencia as respostas comportamentais dos animais. Cabe ressaltar ainda que a

amígdala é dividida em vários núcleos e em subnúcleos, que fazem conexões distintas. Essas conexões determinam as respostas eliciadas de acordo com as vias ativadas. Por exemplo, a ativação da via basolateral - núcleo central produz efeito ansiolítico, enquanto a ativação da via basolateral - hipocampo ventral resulta em efeito ansiogênico (SAH et al., 2003). Porém, no nosso estudo não foi possível especificar quais subnúcleos da amígdala foram inativados, uma vez que a estrutura é relativamente pequena, principalmente em camundongos.

No experimento 2, também avaliamos o papel do CCA na modulação da ansiedade promovida pelo convívio com coespecífico submetido ao estresse crônico de contenção. O tratamento intra-CCA com salina reduziu a exploração dos braços abertos do LCE (diminuiu %EBA e %TBA) nos animais que conviveram com parceiro estressado, sugerindo que o convívio com o estresse aumentou as respostas relacionadas à ansiedade. Os animais que conviveram com parceiro estressado tratados com CoCl_2 exploraram mais os braços abertos (aumentou %EBA e %TBA) quando comparados aos animais que receberam salina. Assim, a inativação do CCA produziu efeito ansiolítico, ou seja, atenuou a ansiedade promovida pelo convívio com o estresse, indicando a participação da estrutura na influência emocional em roedores neste trabalho. No entanto, nos animais que conviveram com controle, o tratamento com CoCl_2 não alterou as respostas relacionadas à ansiedade.

Uma possível explicação para ausência de efeito do tratamento intra-CCA com CoCl_2 nos animais que conviveram com sujeito controle é que, por não presenciarem seu parceiro em sofrimento (em contenção), esses animais não mostraram aumento do comportamento ansioso, apresentando apenas uma ansiedade basal. Possivelmente, sem aumento da ansiedade não houve hiperatividade do CCA, uma vez que a literatura relaciona a ativação da estrutura a maiores índices de ansiedade (KIM et al., 2011; ZHUO, 2016).

Semelhante ao nosso estudo, Benassi-Cezar et al. (2020) investigaram a participação do CCA na empatia pela nocicepção em camundongos. Inicialmente, o estudo mostrou que o

convívio com animal submetido à dor crônica produz aumento das respostas relacionadas à ansiedade em parceiros expostos ao LCE. Em seguida, os autores mostraram que a inativação do CCA com CoCl_2 promoveu aumento da exploração dos braços abertos, ou seja, reduziu o comportamento ansioso dos animais. Estes resultados, assim como os encontrados no nosso estudo, sugerem a participação do CCA na influência emocional em camundongos.

Outros autores também investigaram o papel do CCA no comportamento emocional de roedores. Kim et al. (2011) demonstraram que a inativação do CCA com muscimol, um agonista seletivo do receptor GABAA, produziu efeito ansiolítico em camundongos. Os animais que receberam muscimol intra-CCA exploraram mais os braços abertos do LCE quando comparados aos animais que receberam salina, sugerindo a participação dessa estrutura nas respostas relacionadas à ansiedade em camundongos.

Ainda foi demonstrada a participação do CCA na transferência emocional do medo em camundongos. Jeon et al. (2010), inicialmente, mostraram que camundongos congelam ao observarem coespecíficos (irmãos ou parceiros de acasalamento) recebendo choque nas patas, sugerindo que o medo também é aprendido pela observação. Os autores ainda notaram que a força da resposta do medo foi aumentada com o aumento da familiaridade entre os animais. Em seguida, foi realizada inativação do CCA por meio da injeção local de lidocaína, um bloqueador dos canais de sódio que impede a condutância nos corpos celulares e axônios (MARTIN; GHEZ, 1999). Os camundongos que receberam lidocaína apresentaram prejuízo da aprendizagem observacional do medo o que não ocorreu com os animais que receberam salina. Assim, a inativação do CCA promoveu um nível de ansiedade e medo semelhante ao dos animais controle, revertendo o medo adquirido pela observação (JEON et al., 2010).

Além disso, cabe ressaltar que a inativação reversível pela injeção intracerebral de drogas bloqueadoras tem sido amplamente empregada para elucidar o papel de áreas cerebrais em diferentes processos. Neste trabalho, a escolha do CoCl_2 , sal que promove uma inibição

reversível e não-seletiva, foi fundamentada em estudos anteriores (HAGIWARA; BYERLY, 1981; KRETZ, 1984; LOMBER, 1999; CRESTANI et al., 2010; PELARIN, 2014; SORREGOTTI et al., 2018; CEZAR et al., 2020).

Nosso trabalho, assim como os demais citados, apresentou evidências de que roedores respondem ao estado afetivo de seus comensais. Eles são capazes de entender o estado emocional e também agir para cessar o sofrimento do outro, características da empatia. Também demonstramos a participação do CCA na modulação da ansiedade e empatia em roedores, uma vez que a inativação da estrutura foi capaz de atenuar a ansiedade promovida pelo convívio com o estresse. Entretanto, outras estruturas também podem participar da modulação da empatia em roedores por meio de diferentes conexões.

6. Conclusão

O modelo de empatia avaliado foi eficaz, pois o convívio com camundongos submetidos ao estresse crônico aumentou as respostas relacionadas à ansiedade em parceiros expostos ao LCE. Este tipo de convívio com o estresse não alterou o padrão de ativação neuronal na amígdala, porém reduziu a ativação neuronal no CCA dos animais. A inativação da amígdala com CoCl_2 , não reverteu o aumento da ansiedade. Entretanto, a inativação do CCA atenuou a ansiedade promovida pelo convívio com estresse crônico em camundongos expostos ao LCE. Desta forma, sugerimos que o CCA apresenta importante papel no controle emocional de camundongos avaliados neste modelo.

7. Referências Bibliográficas

AMARAL, D. G.; BASSETT, J. L. Cholinergic innervation of the monkey amygdala: an immunohistochemical analysis with antisera to choline acetyltransferase. **Journal of comparative Neurology**, v. 281, n.3, p. 337-361, 1989.

AMARAL, D. G.; INSAUSTI, R. Retrograde transport of D-[3 H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. **Experimental brain research**, v.88, n. 2, p. 375-388, 1992.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais 5º Edição - DSM-5. **Artmed**. Porto Alegre, 2014.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Anxiogenic-like effects and hypernociception on cagemate induced by cohabitated with mice under neuropathic pain. **Behavioural Pharmacol**, v. 26, n. 7, p. 664-672, 2015.

BARBALHO, C. A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain research**, v. 1267, p. 65-76, 2009.

BARTAL, I. B.; DECETY, J.; MASON, P. Empathy and pro-social behavior in rats. **Science**, v. 334, p. 1427-1430, 2011.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1-2, p. 141-149, 2001.

BENASSI-CEZAR, G. et al. Differential modulation of the anterior cingulate and insular cortices on anxiogenic-like responses induced by empathy for pain. **Neuropharmacology**, 2020.

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

BISHOP, S. et al. Prefrontal cortical function and anxiety: controlling attention to threat-related stimuli. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 184, 2004.

BLANCO, M. B.; CANTO-DE-SOUZA, A. L. M. Ansiedade, memória e o transtorno de estresse pós-traumático. **CES Psicología**, v. 11, n. 2, p. 53-65, 2018.

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

BREDY, T. W.; BARAD, M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. **Learning & Memory**, v. 15, n. 1, p. 39-45, 2008.

BROOKS, S. J.; STEIN, D. J. A systematic review of the neural bases of psychotherapy for anxiety and related disorders. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 261, 2015.

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

CAMPOS, A. C. et al. Animal models of anxiety disorders and stress. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 35, p. S101-S111, 2013.

CARRILLO, M. et al. Emotional mirror neurons in the rat's anterior cingulate cortex. **Current Biology**, v. 29, n. 8, p. 1301-1312, 2019.

CARMONA, I.M.; BAPTISTA-DE-SOUZA, D.; CANTO-DE-SOUZA, A.L. Anxiogenic-like behaviors induced by living with a conspecific in neuropathic pain condition are attenuated by systemic injection of midazolam in mice. **The Journal of pain**, v.17, n. 4, p 58, 2016.

CARNEIRO DE OLIVEIRA, P. E. et al. A. Preliminary behavioral assessment of cagemates living with conspecifics submitted to chronic restraint stress in mice. **Neuroscience Letters**, v. 657, p. 204-210, 2017.

CATTANEO, L.; RIZZOLATTI, G. The mirror neuron system. **Archives of neurology**. v. 66, n. 5. p. 557-560. 2009.

CHOTIWAT, C.; HARRIS, R. B. Increased anxiety-like behavior during the post-stress period in mice exposed to repeated restraint stress. **Hormones and behavior**, v. 50, n. 3, p. 489-495, 2006.

COOK, C. J. Stress induces CRF release in the paraventricular nucleus, and both CRF and GABA release in the amygdala. **Physiology & Behavior**, v. 82, n. 4, p. 751-762, 2004.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 47, p. 200-202, 1941.

CORR, P. J. Anxiety: Splitting the phenomenological atom. **Personality and Individual Differences**, v. 50, n. 7, p. 889-897, 2011.

CRASKE, M. G. et al. Positive affect treatment for depression and anxiety: A randomized clinical trial for a core feature of anhedonia. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v.87, n. 5, p. 457, 2019

CRESTANI, C. C. et al. Acute reversible inactivation of the bed nucleus of stria terminalis induces antidepressant-like effect in the rat forced swimming test. **Behavioral and Brain Functions**, v. 6, n. 1, p. 30, 2010.

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

CRUZ, F. C. et al. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. **Int. J. Dev. Neurosci.** v. 30, p. 19–23, 2012.

DAVIS, M. H. A Multidimensional Approach to individual differences in empathy. **JSAS Catalog of Selected Documents in Psychology**, v. 10, p. 85, 1980.

DRATCU, L.; LADER, M. Ansiedade-conceito, classificação e biologia: uma interpretação contemporânea da literatura. **J. bras. psiquiatr**, p. 19-32, 1993.

FAN, J. et al. Mapping the genetic variation of executive attention onto brain activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n.12, p. 7406-7411, 2003.

FEINSTEIN, J. S. et al. Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 270-272, 2013.

FILE, S. E. Behavioral detection of anxiolytic action. **Experimental approaches to anxiety and depression**, 1992.

FITZGERALD, D. A. et al. Beyond threat: amygdala reactivity across multiple expressions of facial affect. **Neuroimage**, v. 30, n.4, p. 1441-1448, 2006.

FLOR, H.; TURK, D. C.; SCHOLZ, O. B. Impact of chronic pain on the spouse: Marital, emotional and physical consequences. **Journal of psychosomatic research**, v. 31, n. 1, p. 63-71, 1987.

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

GARCIA, A. M. B.; CARDENAS, F. R.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behaviour in the elevated plus-maze. **Physiology. Behavior.**, n.85, p. 265-270, 2005.

GARDNER, H. Frames of Mind. **Basic Books**. New York, 1983.

GOLEMAN, Daniel. **Emotional intelligence**. Bantam, 2006.

GONZALEZ-LIENCRES, C.; JUCKEL, G.; BRÜNE, M. Emotional contagion in mice: The role familiarity. **Behavioural Brain Research**, v. 203, p. 16-21, 2014.

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, 2007.

GRENIER, F.; LÜTHI, A. Mouse brains wired for empathy? **Nature Neuroscience**, v.13 n. 4, p. 406-408, 2010.

GRISSOM, N.; BHATNAGAR, S. Habituation to repeated stress: get used to it. **Neurobiology of learning and memory**, v. 92, n. 2, p. 215–24, set. 2009.

GROSS, C.; HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 545, 2004.

GUILLIAMS, T. G.; EDWARDS, L. Chronic stress and the HPA axis. **The standard**, v. 9, n. 2, p. 1-12, 2010.

HADJISTAVROPOULOS, T. et al. Biopsychosocial formulation of pain communication. **Psychological bulletin**, v. 137, n. 6, p. 910, 2011.

HAGIWARA, S.; BYERLY, L. Calcium channel. **Annual Review of neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 69-125, 1981.

HARRIS, R. B. et al. Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. **Hormones and behavior**, v. 49, n. 5, p. 615-625, 2006.

HARRIS, R. B. et al. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. **Physiology & behavior**, v. 81, n. 4, p. 557-568, 2004.

HAY, P. et al. Treatment of obsessive-compulsive disorder by psychosurgery. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 87, n. 3, p. 197-207, 1993.

HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 191-205, 2003.

JACKSON, P. L.; MELTZOFF, A. N.; DECETY, J. Perceiving others in painful situations activates the affective pain neural network. In **Poster presented at the annual meeting of the Cognitive Neuroscience Society**, San Francisco, CA, 2004.

JANAK, P. H.; TYE, K. M. From circuits to behaviour in the amygdala. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 284-292, 2015.

JEON, D. et al. Observational fear learning involves affective pain system and Ca v 1.2 Ca 2+ channels in ACC. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 4, p.482, 2010.

JOËLS, M. et al. Learning under stress: how does it work? **Trends Cogn Sci**, v. 10, n. 4, p.152-8, 2006.

KEYSERS, C.; GAZZOLA, V. Expanding the mirror: vicarious activity for actions, emotions, and sensations. **Current opinion in neurobiology**, v. 19, n. 6, p. 666-671, 2009.

KIM, S. S. et al. Neurabin in the anterior cingulate cortex regulates anxiety-like behavior in adult mice. **Molecular brain**, v. 4, n. 1, p. 6, 2011.

KORMOS, V. et al. Reduced response to chronic mild stress in PACAP mutant mice is associated with blunted FosB expression in limbic forebrain and brainstem centers. **Neuroscience**, v. 330, p. 335-358, 2016.

KRETZ, R. Local cobalt injection: a method to discriminate presynaptic axonal from postsynaptic neuronal activity. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 2, p. 129-135, 1984.

LAMM, C.; DECETY, J.; SINGER, T. Meta-analytic evidence for common and distinct neural networks associated with directly experienced pain and empathy for pain. **Neuroimage**, v. 54, n.3, p. 2492-2502, 2011.

LANGFORD, D. J. et al. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. **Science**, v. 312, 2006.

LEDOUX, J. The amygdala. **Current Biology**, v.17, n. 20, p. 868-874, 2007.

LIPP, M. E. Stress: conceitos básicos. **Pesquisas sobre stress no Brasil: saúde, ocupações e grupos de risco**. Campinas: Papyrus, 17-31, 1996.

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

LOCKWOOD, P. L. The anatomy of empathy: Vicarious experience and disorders of social cognition. **Behavioural brain research**, v. 311, p. 255-266, 2016.

LOMBER, S. G. The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. **Journal of neuroscience methods**, v. 86, n. 2, p. 109-117, 1999.

LU, K. et al. The acute effects of L-theanine in comparison with alprazolam on anticipatory anxiety in humans. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 19, n. 7, p. 457-465, 2004.

MACHADO-DE-SOUSA, J. P. et al. Increased amygdalar and hippocampal volumes in young adults with social anxiety. **PloS one**, v. 9, n. 2, e88523, 2014.

MARTIJENA, I. D. et al. Prior exposure to a brief restraint session facilitates the occurrence of fear in response to a conflict situation: behavioral and neurochemical correlates. **Brain research**, v. 752, n.1-2, p. 136-142, 1997.

MARTIN, J. H.; GHEZ, C. Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. **Journal of neuroscience methods**, v. 86, n. 2, p. 145-159, 1999.

MOCHCOVITCH, M. D. et al. Systematic review of fMRI studies in generalized anxiety disorder: evaluating its neural and cognitive basis. **Journal of Affective Disorders**, v. 167, p. 336-342, 2014.

MOLENBERGHS, P.; CUNNINGTON, R.; MATTINGLEY, J. B. Brain regions with mirror properties: a meta-analysis of 125 human fMRI studies. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v.36, n. 1, p.341-349, 2012.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 48, n. 4, p. 254, 1955.

MOYA-ALBIOL, L.; HERRERO, N.; BERNAL, M. C. The neural bases of empathy. **Revista de Neurologia**, v. 50, n. 2, p. 89-100, 2010.

NEUGEBAUER, V. The amygdala: different pains, different mechanisms. **Pain**, v. 127, n. 1-2, p.1, 2007

- NICOLAIDES, N. C. et al. Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 1-2, p. 6-19, 2015.
- NIEMINEN, A. L. et al. A novel cytotoxicity screening assay using a multiwell fluorescence scanner. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 115, p. 147–155, 1992.
- NUNES-DE-SOUZA, R.L. et al. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-oh-dpat and midazolam. **Psychop.** v. 150, n. 3, p. 300-310, 2000.
- OCHSNER, K. N. et al. For better or for worse: neural systems supporting the cognitive down- and up-regulation of negative emotion. **Neuroimage**, v. 23, n. 2, p. 483-99, 2004.
- OLSSON, A.; PHELPS, E. A. Social learning of fear. **Nature neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 1095-1102, 2007.
- OSAKA, M. et al. The neural basis of individual differences in working memory capacity: an fMRI study. **NeuroImage**, v. 18, n. 3, p. 789-797, 2003.
- OSBORN, J.; DERBYSHIRE, S. W. Pain sensation evoked by observing injury in others. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 268-274, 2010.
- PADOVAN C.M.; GUIMARÃES F.S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res.**, v. 33, p.79-83, 2000.
- PANKSEPP, J. B; LAHVIS, G. P. Rodent empathy and affective neuroscience. **Neuroscience & Biobehavioural Reviews**, 2011.
- PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. The mouse brain in stereotaxic coordinates. ed. 2. San Diego: **Academic**, 2001.
- PELARIN, V. Empathy in mice: evaluation of the role of the amygdala, insula and anterior cingulate cortex in nociception in mice exposed to the abdominal writhing test. **Dissertation**. Federal University of São Carlos, 2014.
- PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-67, 1985.
- PETRILLI, L. A. et al. Empathy for Pain: Systemic treatment with cannabidiol reverses the hyperalgesia induced by cohabitation with a pair in chronic pain condition. **Congresso da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento**, Campos do Jordão, SP, 2019.
- PHELPS, E. et al. Extinction learning in humans. **Neuron**, v. 43, n. 6, p. 97-905, 2004.
- PILLAY, S. S. et al. fMRI of fearful facial affect recognition in panic disorder: the cingulate gyrus–amygdala connection. **Journal of affective disorders**, v. 94, n.1-3, p. 173-181, 2006.
- PISANSKY, M. T. et al. Oxytocin enhances observational fear in mice. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2017.

- PLUTCHIK, R. Bases evolucionistas de la empatía. N. Eisenberg y J, Strayer (Eds.). **La empatía y su desarrollo**, p. 49-57, 1992.
- PRESTON, S.D.; DE-WAAL, F. B. M. Empathy: its ultimate and proximate bases. *Behavioral and brain. Science*. v. 25, n. 1, p. 1-20, 2002.
- RAUCH, S. L.; SHIN, L. M.; WRIGHT, C. I. Neuroimaging studies of amygdala function in anxiety disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 985, n. 1, p. 389-410, 2003.
- REIS, L. M.; CANTO-DE-SOUZA, A. Intra-periaqueductal gray matter injections of midazolam fail to alter anxiety in plus-maze experienced mice. **Brain research**, v. 1231, p. 93-102, 2008.
- RICE, G. E.; GAINER, P. "Altruism" in the albino rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 55, n. 1, p. 123, 1962.
- RIZZOLATTI, G. et al. Premotor cortex and the recognition of motor actions. **Cognitive brain research**, v. 3, n. 2, 131-141, 1996.
- ROBISON, A. J. et al. Behavioral and structural responses to chronic cocaine require a feedforward loop involving Δ FosB and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the nucleus accumbens shell. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 10, p. 4295-4307, 2013.
- RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.52, p.297-303, 1995.
- ROSEN, J. B.; SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychological review**, v. 105, n. 2, p. 325, 1998.
- ROTH, E.; FLORES, L. La empatía en los roedores: El papel de la familiaridad en la respuesta emocional y la conducta de ayuda en ratones mus musculus. **Ajayu Órgano de Difusión Científica del Departamento de Psicología UC BSP**, v. 17, n. 1, p. 26-50, 2019.
- RUDEBECK, P. H. et al. A role for the macaque anterior cingulate gyrus in social valuation. **Science**, v. 313, n. 5791, p. 1310-1312, 2006.
- SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological reviews**, v. 83, n.3, p.803-834, 2003.
- SAITO, Y. et al. Cognitive bias in rats evoked by ultrasonic vocalizations suggests emotional contagion. **Behavioural processes**, v. 132, p. 5-11, 2016.
- SALOVEY, P.; MAYER, J. D. Emotional intelligence. **Imagination, cognition and personality**, v. 9, n. 3, p. 185-211, 1989.
- SHAMAY-TSOORY, S. G. The neural bases for empathy. **Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 18-24, 2011.

SILVEIRA, L. M. et al. The role of GABAergic neurotransmission in insula and amygdaloid complex on social modulation of pain in mice that cohabited with a conspecific in chronic pain condition. Congresso da **Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento**, Santos, SP, 2018.

SIMMONS, A. et al. Anxiety vulnerability is associated with altered anterior cingulate response to an affective appraisal task. **Neuroreport**, v. 19, n. 10, p. 1033, 2008.

SINGER, T. et al. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. **Science**, v. 303, p 1157-1162, 2004.

SIVASELVACHANDRAN, S. et al. Behavioral and mechanistic insight into rodent empathy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 91, p. 130-137, 2018.

SMITH, M. L. et al. Social transfer of pain in mice. **Science advances**, v. 2, n. 10, e1600855, 2016.

SORREGOTTI, T. et al. Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze. **Behavioural brain research**, v. 338, p. 159-165, 2018.

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

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

TAVARES, L. R. R. et al. Amygdaloid complex modulates the empathy for pain through the 5-HT₃ receptor in mice. (Unpublished data)

TOMIYOSHI, M. Y. et al. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cagemate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 23, p. 558–567, 2009.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 44, n. 2, p. 463-469, 1993.

USHAKOV, V. L. et al. Network activity of mirror neurons depends on experience. **Journal of Integrative Neuroscience**, v. 12, n. 01, p. 35-46, 2013.

VACHON-PRESSEAU, E. et al. The stress model of chronic pain: evidence from basal cortisol and hippocampal structure and function in humans. **Brain**, v. 136, p.815-827, 2013.

VANDENBOS, G. R. **Dicionário de Psicologia da APA**. Porto Alegre: Artmed, v. 971, 2010.

VAN DER GAAG, C.; MINDERAA, R. B.; KEYSERS, C. Facial expressions: what the mirror neuron system can and cannot tell us. **Social neuroscience**, v. 2, n. 3-4, p. 179-222, 2007.

VAN DIJKEN, H. H. et al. Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: evidence in favor of anxiety. **Physiology & behavior**, v. 52, n. 5, p. 945-951, 1992.

VAN HEUKELUM, S. et al. Where is Cingulate Cortex? A Cross-Species View. **Trends in Neurosciences**, 2020.

VAN VEEN, V. et al. Anterior cingulate cortex, conflict monitoring, and levels of processing. **Neuroimage**, v. 14, n. 6, p. 1302-1308, 2001.

VIALOU, V. et al. Differential induction of FosB isoforms throughout the brain by fluoxetine and chronic stress. **Neuropharmacology**. v. 99, p. 28–37, 2015.

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

ZAKI, J.; WEBER, J.; OCHSNER, K. N. Task-dependent neural bases of perceiving emotionally expressive targets. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 6, p. 228, 2012.

ZALD, D. H.; PARDO, J. V.; Emotion, olfaction, and the human amygdala: amygdala activation during aversive olfactory stimulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 4119-4124, 1997.

ZANIBONI, C.; BAPTISTA-DE-SOUZA, D; CANTO-DE-SOUZA, A. Effects of midazolam on hipernociception induced by living with coespecific in neurophatic condition in mice. **Pain**, v.17, p.58, 2016.

ZANIBONI C. et al. Empathy for pain: Insula inactivation and systemic treatment with midazolam reverses the hiperalgnesia induced by cohabitation with a pair in chronic pain condition. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 12, p. 278, 2018.

ZHUO, M. Neural mechanisms underlying anxiety–chronic pain interactions. **Trends in neurosciences**, v. 39, n.3, p. 136-145, 2016.

8. Anexo

<p>Pró Reitoria Pesquisa</p>	<p><i>Comissão de Ética no Uso de Animais</i> Universidade Federal de São Carlos</p>	
<h3>CERTIFICADO</h3>		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Empatia em camundongos: Avaliação do papel da amígdala, ínsula e córtex cingulado anterior na modulação da ansiedade induzida pelo convívio com parceiro submetido ao modelo de estresse crônico", protocolada sob o CEUA nº 7821030418 (ID 000970), sob a responsabilidade de Lara Maria Silveira e equipe; Azair Liane Matos do Canto de Souza - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 21/08/2018.</p>		
<p>We certify that the proposal "Empathy in mice: Evaluation of the role of the amygdala, insula and anterior cingulate cortex in the modulation of anxiety induced by living with a partner submitted to a chronic stress model", utilizing 320 Heterogenics mice (320 males), protocol number CEUA 7821030418 (ID 000970), under the responsibility of Lara Maria Silveira and team; Azair Liane Matos do Canto de Souza - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/21/2018.</p>		
<p>Finalidade da Proposta: Pesquisa</p>		
<p>Vigência da Proposta: de 03/2018 a 03/2020 Área: Psicologia</p>		
<p>Origem: Biotério Central da UFSCar</p>		
<p>Espécie: Camundongos heterogênicos sexo: Machos idade: 6 a 8 semanas N: 320</p>		
<p>Linhagem: Swiss Peso: 35 a 50 g</p>		
<p>Local do experimento: Laboratório de Psicologia da Aprendizagem</p>		
<p>São Carlos, 26 de agosto de 2019</p>		
		
<p>Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de São Carlos</p>	<p>Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de São Carlos</p>	