

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

ELKE MAYUMI FURUYA DA CUNHA

Avaliação do papel do receptor 5-HT_{2c} da substância cinzenta periaquedutal sobre a antinocicepção induzida pelo predador (rato) em camundongos submetidos ao modelo de dor neuropática

**São Carlos – SP
2014**

ELKE MAYUMI FURUYA DA CUNHA

Avaliação do papel do receptor 5-HT_{2c} da substância cinzenta periaquedutal sobre a antinocicepção induzida pelo predador (rato) em camundongos submetidos ao modelo de dor neuropática

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

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

São Carlos – SP
2014

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

F992ap Furuya-da-Cunha, Elke Mayumi.
Avaliação do papel do receptor 5-HT_{2c} da substância cinzenta periaquedutal sobre a antinocicepção induzida pelo predador (rato) em camundongos submetidos ao modelo de dor neuropática / Elke Mayumi Furuya da Cunha. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
57 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Neurofisiologia. 2. Antinocicepção. 3. Substância cinzenta periaquedutal. 4. Teste de exposição ao rato. I. Título.

CDD: 612.8 (20^a)

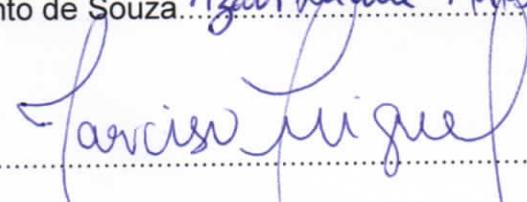
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

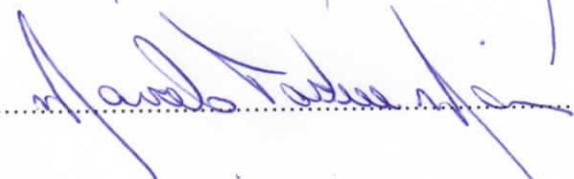
Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Elke Mayumi Furuya da Cunha

Dia 08/05/2014

Prof^a. Dr^a. Azair Liane Matos do Canto de Souza..... 

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel..... 

Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin..... 

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

AGRADECIMENTOS

À Deus,

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

Aos professores Carlos Cesar Crestani, Marcelo Tadeu Marin e Luiz Fernando Takase pelas contribuições no exame de qualificação,

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

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

Aos meus amigos do laboratório, Marília, Vinícius, Daniela, Rimenez, Lucas, Cilene e Vanessa pelo apoio, amizade e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho,

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

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

Aos meus filhos, minhas bênçãos queridas,

À minha sogra, pelo apoio, pelo acolhimento, por ter se tornado minha segunda mãe,

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

Ao Alexandre, pela competência profissional na secretaria do PIPGCF,

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

RESUMO

Furuya-da-Cunha, E. M. **Avaliação do papel do receptor 5-HT_{2C} da substância cinzenta periaquedutal sobre a antinociceção induzida pelo predador (rato) em camundongos submetidos ao modelo de dor neuropática.** 2014. 57f. Dissertação (mestrado) - Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UFSCar/UNESP, SP, 2014.

A dor neuropática é um tipo de dor crônica que pode ocasionar comorbidades como a ansiedade e a depressão e, conseqüentemente, grandes prejuízos a qualidade de vida da população atingida. Apesar de ser refratária a maioria dos tratamentos farmacológicos convencionais, há estudos que descrevem a eficácia dos medicamentos que atuam na transmissão serotoninérgica, como os antidepressivos, no tratamento da dor neuropática. A serotonina é um neurotransmissor com papel importante na modulação dos estímulos nociceptivos, assim como dos comportamentos relacionados ao medo e a ansiedade. Há evidências de que situações aversivas, como a exposição ao predador, podem causar antinociceção como reação defensiva. Dessa forma, vários trabalhos têm demonstrado que situações de medo/ansiedade, podem inibir a nociceção e a serotonina (5-HT) produz esse efeito antinociceptivo em estruturas do sistema nervoso central, tais como a substância cinzenta periaquedutal (SCP). Neste sentido, estudos do nosso grupo mostraram que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} da SCP está envolvida nos efeitos ansiolíticos e na antinociceção induzida pelo medo/ansiedade observados em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado. Entretanto não se conhece qual o papel desses receptores da SCP na modulação da antinociceção induzida pela exposição ao predador (rato) em camundongos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ativação dos receptores 5-HT_{2C} da SCP, sobre a antinociceção e as respostas defensivas em camundongos submetidos a constrição do nervo ciático. Para isso, camundongos machos Suíço-albinos foram submetidos a constrição do nervo ciático (CNC) no primeiro dia do experimento e, sete dias depois, receberam implantação de cânula guia na SCP. Quatro dias após a estereotaxia, os camundongos receberam microinjeção de veículo ou mK212 e foram expostos ao predador. O teste consistiu em duas fases: a) habituação ao aparato, durante 10 minutos, por 3 dias consecutivos, iniciado no dia seguinte após a estereotaxia; b) exposição ao predador ou ao estímulo neutro durante 10 minutos. Os resultados obtidos após passarem pela análise de variância (ANOVA) de três fatores (condição x estímulo x tratamento), mostraram que os camundongos que passaram por CNC exibiram aumento do reflexo de coçar, comportamento indicativo de dor crônica. A exposição desses animais ao predador (rato) produziu antinociceção nos camundongos CNC e aumentou os comportamentos relacionados ao medo/ansiedade tais como, tempo de permanência na área protegida e em contato com a grade e frequência de esticar, quando comparados aos camundongos expostos ao estímulo neutro (rato de brinquedo). O tratamento intra-SCP com mK212 (0,21 e 0,63nmol) não produziu alterações significativas na antinociceção e no medo/ansiedade avaliados durante a exposição ao rato. Entretanto, apenas a menor dose de mK212 (0,21nmol) foi capaz de aumentar o reflexo de coçar, produzindo hiperalgesia nos camundongos CNC expostos ao estímulo neutro. Desta forma, sugerimos que os receptores 5-HT_{2C} da SCP parecem modular de forma diferenciada este tipo de antinociceção e medo/ansiedade em camundongos. Porém novos estudos devem ser realizados, utilizando subtipos de receptores mais seletivos e talvez outros modelos de nociceção para ampliar e esclarecer o papel dos receptores 5-HT_{2C} nos processos que modulam a antinociceção induzida por estímulos aversivos.

Palavras-chave: Antinociceção. Substância cinzenta periaquedutal. Receptores 5-HT_{2C}. Constrição crônica do nervo ciático. Teste de exposição ao rato.

ABSTRACT

Furuya-da-Cunha, E. M. **Evaluation of the role of 5-HT_{2C} receptors in periaqueductal gray matter on antinociception induced by predator (rat) in mice submitted to a model of neuropathic pain.** 2014. 57f. Dissertation (MS) Joint Graduate Program in Physiological Sciences UFSCar/UNESP, SP, 2014.

Neuropathic pain is a type of chronic pain that can cause comorbidities such as generalized anxiety and depression, and, consequently, it produces considerable damage to the quality of life of affected people. Despite it being refractory to most conventional pharmacological treatments, studies evidence that serotonergic drugs, like antidepressants, are effective in treatment of this type of pain. Serotonin is a neurotransmitter with an important role in the modulation of nociceptive stimuli as well as the behaviors related to fear and anxiety. There is evidence that aversive situations, such as predator exposure may cause antinociception as a defensive reaction. Thus, several studies have demonstrated that fear or anxiety stimulus can cause antinociception and the serotonin (5-HT) produces this antinociceptive effect in structures of the central nervous system, such as the periaqueductal gray matter (PAG). In this sense, studies from our group demonstrate that activation of 5-HT_{2C} receptors in PAG is involved in anxiolytic effects and in fear and anxiety-induced antinociception in mice exposed to the elevated plus maze. However, it is unknown what the role of PAG serotonergic receptors in the modulation of antinociception induced by exposure to predator (rat). Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of activation of 5-HT_{2C} receptors of PAG on the antinociception and defensive behaviors in mice submitted to sciatic nerve constriction. For this, Swiss-albino male mice were submitted to sciatic nerve constriction on the first day of the experiment and, seven days later, they received implantation of guide cannula in the PAG. Four days after stereotactic surgery, mice received intra-PAG injection of vehicle or mK212 and were exposed to the predator. The test consisted of two phases: a) habituation to the apparatus for 10 minutes for 3 consecutive days, which started the next day after stereotactic surgery; b) exposure to predators or neutral stimulus for 10 minutes. The analysis of variance (ANOVA) of three factors (condition x stimulation x treatment) showed that chronic constriction injured (CCI) mice exhibited increased of scratching behavior, that is indicative of chronic pain. The exposure of these animals to the predator (rat) produced antinociception in CCI mice and increased behaviors related to fear and anxiety such as time spent in protected area and total number of stretched attend posture (SAP) and decreased time of contact with the grid, when compared to mice exposed to neutral stimulus (toy rat). Treatment with mK212 intra-PAG (0.21 and 0.63 nmol) produced no significant change in antinociception and fear and anxiety assessed during exposure to rat. However, the mK212 0.21nmol dose treatment increased scratching behavior, indicating hyperalgesia in CCI mice exposed to toy rat. Thus, we suggest that 5-HT_{2C} receptors of PAG appear to modulate differently this type of antinociception and fear and anxiety in mice. However, further studies should be conducted using more selective subtypes of serotonergic receptors and perhaps other models of nociception to enlarge and clarify the role of 5-HT_{2C} receptors in the processes that modulate antinociception induced by aversive stimuli.

Key words: Antinociception; Periaqueductal gray matter; 5-HT_{2C} receptors; Chronic constriction injury of the sciatic nerve; Rat exposure test

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Foto 1. Caixa de teste presa-predador	27
Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental.	28
Figura 2. Representação esquemática dos sítios de injeção na SCP de camundongos. Acertos: círculos escuros. Erros: círculos cinzas. Os cortes coronais representados estão entre 4,04 e 4,48 mm em relação ao bregma no atlas de Paxinos e Franklin, 2001. Os pontos da ilustração representam apenas uma parte dos locais atingidos.	30
Figura 3. Efeito da microinjeção de veículo ou de mK212 (0,21nmol e 0,63nmol) na SCP de camundongos SHAM ou CNC sobre a frequência do reflexo de coçar no teste de exposição ao predador. Os valores estão representados pela média \pm EPM (n=7-9). *P<0,05 comparado ao respectivo grupo controle. #P<0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. &P<0,05 comparado ao respectivo grupo SHAM. CNC= constrição do nervo ciático; V= veículo.	31
Figura 4. Efeito da microinjeção de veículo ou de mK212 (0,21nmol e 0,63nmol) na SCP de camundongos SHAM ou CNC em relação ao tempo de permanência no ambiente protegido no teste de exposição ao predador. Os dados estão representados como a média \pm EPM (n = 7-9). *P<0,05 comparados ao respectivo grupo veículo. #P<0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. &P<0,05 comparado ao respectivo grupo SHAM. CNC= constrição do nervo ciático; V= veículo.	33
Figura 5. Efeito da microinjeção de veículo ou de mK212 (0,21nmol e 0,63nmol) na SCP de camundongos SHAM ou CNC em relação ao tempo de contato com a grade no teste de exposição ao predador. Os dados estão representados como a média \pm EPM (n = 7-9). #P<0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. &P<0,05 comparado ao respectivo grupo SHAM. CNC= constrição do nervo ciático; V= veículo.	34
Tabela 1. Efeito da microinjeção de veículo ou de mK212 (0,21nmol e 0,63nmol) na SCP de camundongos SHAM ou CNC em relação aos comportamentos etológicos no teste de exposição ao predador. Os dados estão representados como a média \pm EPM (n = 7-9). #P<0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. CNC= constrição do nervo ciático; RB= rato de brinquedo; RV= rato de verdade.	35

LISTA DE ABREVIACOES

5-HT – 5-hidroxitriptamina, serotonina

CNC – constrição do nervo ciático

IASP – Associação Internacional para Estudo da Dor

LCE – labirinto em cruz elevado

RB – rato de brinquedo

RV – rato de verdade

RVM – bulbo rostro-ventromedial

SAP – stretched attend posture

SCP – substância cinzenta periaquedutal

V – veículo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. DOR NEUROPÁTICA	12
1.2. VIA SEROTONÉRGICA DE MODULAÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA	15
1.3. MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA	18
1.4. VIAS SEROTONÉRGICAS X REAÇÕES DE DEFESA	19
1.5. TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO	21
1.6. OBJETIVO	23
1.6.1. Objetivo geral	23
1.6.2. Objetivos específicos	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. SUJEITOS	24
2.2. ÉTICA	24
2.3. DROGA	24
2.4. CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO	24
2.5. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE DROGAS	25
2.6. APARATO E PROCEDIMENTO GERAL	26
2.6.1. Análise comportamental	28
2.7. HISTOLOGIA	28
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
3. RESULTADOS	30
3.1. MEDIDA NOCICEPTIVA	31
3.2. MEDIDAS ESPAÇO-TEMPORAIS	32
3.3. MEDIDAS ETOLÓGICAS	34
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÃO	44
6. REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOR NEUROPÁTICA

A dor tem sido objeto de estudos dos profissionais de saúde há milhares de anos. Hipócrates, na Grécia antiga, já referia que aliviar a dor é uma obra divina. Segundo a Sociedade Brasileira para Estudo da Dor (SBED), tem-se verificado um aumento do interesse e progresso nos estudos da dor, nas últimas décadas. Isso se deve, principalmente, ao aumento populacional e da taxa de sobrevivência da população em geral.

A dor, segundo a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada com dano tecidual potencial de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tal dano (Loeser e Treede, 2008). O componente sensorial (perceptivo-discriminativo) permite identificar o estímulo como doloroso e o discrimina em relação ao tempo, espaço e intensidade e o componente emocional (aversivo-cognitivo-motivacional) que atribui emoções à experiência dolorosa, é responsável pela resposta comportamental frente à dor (Fernandez e Turk, 1992). Embora a dor seja uma experiência desagradável, ela possui seu papel fisiológico de alertar o organismo, provocando uma cascata de reações que podem limitar a lesão e suas consequências. Dessa forma, a dor possui um claro valor adaptativo, evidenciado pelo fato de indivíduos portadores de analgesia congênita possuírem baixa expectativa de vida (Basbaum *et al.*, 2009).

Entretanto, quando a dor aguda evolui para a dor crônica, passa a expressar uma característica patológica. Dores crônicas afetam a qualidade de vida da população atingida, apresentam baixas taxas de recuperação e produzem elevada taxa de mortalidade associada (Elliott *et al.*, 2002; Torrance *et al.*, 2006).

Entre as variedades de dores crônicas, a dor neuropática parece ser a mais debilitante. Há alta prevalência de relatos da dor neuropática, dentre as dores crônicas que afetam a população (Torrance *et al.*, 2006; Bouhassira *et al.*, 2008). Torrance *et al.* (2006) realizaram um estudo na Inglaterra e observaram que 17% dos relatos de dor crônica correspondiam à dor neuropática, com prevalência em mulheres, idosos e indivíduos de baixo nível sócio-econômico.

Quando a lesão ocorre diretamente no sistema nervoso central ou periférico, pode levar ao desenvolvimento da dor neuropática. A IASP define este tipo de dor como aquela causada por uma lesão ou doença no sistema somatossensorial (Jensen *et al.*, 2011).

A patogênese da dor neuropática é extremamente complexa e envolve alterações estruturais, fisiológicas e farmacológicas do eixo neuronal nociceptivo (Myers *et al.*, 2006). Além disso, a dor neuropática pode estar associada a alterações na sensibilidade a estímulos dolorosos, como o aumento da sensibilidade a estímulos nocivos (hiperalgesia), sensação dolorosa a estímulos inócuos (alodinia) e dor espontânea (parestesia e disestesia) (Millan, 1999).

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

Na dor neuropática ocorre um aumento na síntese dos mediadores inflamatórios, como substância P, bradicinina, prostaglandinas, fatores de crescimento, histamina, glutamato, serotonina, entre outros, também conhecido por “sopa inflamatória”, e o limiar de ativação dos nociceptores diminui, com consequente sensibilização periférica nociceptiva (Basbaum *et al.*, 2009).

Durante a estimulação crônica dos nociceptores no corno dorsal da medula, ocorre uma série de alterações adaptativas que facilitam a transmissão nociceptiva para estruturas modulatórias centrais, como o tálamo e área parabraquial (Nickel *et al.*, 2012). Estão envolvidos nessa plasticidade neuronal os receptores para glutamato, substância P e vários mecanismos intracelulares ativados pela fosfolipase C, fosfoquinase C, via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e óxido nítrico sintetase, que resultam em processos de potencialização a longo prazo (LTP) (Millan, 1999). Dessa forma, ocorre um aumento da excitabilidade dos neurônios presentes no corno dorsal da medula, não só através das fibras A δ e C, mas também pelas fibras A beta (A β), responsáveis pela transmissão de estímulos táteis, não nociceptivos (Nickel *et*

al., 2012). Essa sensibilização central pode estar relacionada com a hiperalgesia, característica da dor neuropática (Basbaum *et al.*, 2009).

No corno dorsal da medula, interneurônios GABAérgicos são responsáveis por uma inibição tônica dos estímulos nociceptivos periféricos. Na patogenia da dor neuropática ocorre uma desinibição da transmissão GABAérgica e glicinérgica, com consequente desinibição da transmissão nociceptiva (Basbaum *et al.*, 2009). Além disso, a lesão neuronal provoca a desmielinização de fibras A δ e fibras A β causando, assim, uma transmissão cruzada de estímulos nociceptivos e estímulos táteis (Ueda, 2008). Estes processos podem estar relacionados com a alodinia, sensação dolorosa a estímulos inócuos.

As células gliais presentes no corno dorsal da medula também estão envolvidas na sensibilização central. A micróglia e os astrócitos estão mais estreitamente relacionados com esse processo. A lesão neuronal periférica produz a ativação da micróglia, que aumenta a sinalização para os neurônios de 2^a. ordem (responsáveis pela transmissão dos estímulos nociceptivos do corno dorsal da medula para as estruturas encefálicas), através da liberação de fatores neurotróficos e interleucinas. Dessa forma, ocorre um fortalecimento da transmissão ascendente do estímulo nociceptivo (Basbaum *et al.*, 2009).

Outra característica importante da dor neuropática é a presença de parestesias ou disestesias ou dor espontânea (Kupers *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2012). Esses reflexos ocorrem devido a uma excitabilidade ectópica dos neurônios aferentes anormal, causados por uma descarga espontânea nas fibras A β (sensíveis a estímulos táteis). Quando a descarga espontânea ocorre nas fibras A δ e C resulta em uma dor lancinante e com sensação de queimação (Nickel *et al.*, 2012). Com o aumento da excitabilidade neuronal das fibras que transmitem os estímulos nociceptivos a medula, ocorre uma expansão dos campos receptivos dos nociceptores (Kuner, 2010). Além disso, na dor neuropática ocorre uma alteração na expressão e distribuição de canais de sódio relacionados a dor patológica, no local da lesão neuronal, que podem estar envolvidos no desenvolvimento das parestesias e disestesias (Bridges *et al.*, 2001; Nickel *et al.*, 2012).

Além dos mecanismos descritos, a dor neuropática está associada ao desenvolvimento de desordens afetivas como a depressão e ansiedade generalizada, que geram prejuízos ainda maiores à qualidade de vida da população atingida (McWilliams *et al.*, 2003; Tunks *et al.*, 2008). O caminho oposto também pode ocorrer, ou seja, há

evidências de que 70 a 80% de pacientes com depressão sofrem também de algum tipo de dor crônica (Kirmayer *et al.*, 1993). Esta associação também foi observada em modelos animais, tendo em vista que Suzuki *et al.* (2007) observaram o desenvolvimento de distúrbios afetivos, como ansiedade e depressão, em camundongos submetidos a dor neuropática.

Além disso, este tipo de dor é refratária à maioria dos analgésicos convencionais, inclusive analgésicos potentes como os opióides (Bridges *et al.*, 2001; Smith, 2012). Nesse sentido, drogas que atuam na neurotransmissão serotoninérgica, como os antidepressivos têm sido extensamente utilizados com resultados eficazes no tratamento da dor neuropática (Sindrup *et al.*, 2005; Matsuzawa-Yanagida *et al.*, 2008; Finnerup *et al.*, 2010; Dharmshaktu *et al.*, 2012). Os principais medicamentos antidepressivos utilizados são: a) antidepressivos tricíclicos e b) inibidores seletivos e não-seletivos da recaptação de serotonina e/ou noradrenalina. Estes medicamentos atuam inibindo a recaptação de serotonina e/ou noradrenalina pelo botão pré-sináptico, aumentando a concentração deste neurotransmissor na fenda sináptica (Dharmshaktu *et al.*, 2012).

Dessa forma, Jones *et al.* (2009) observaram que o tratamento crônico (14 dias) com desipramina i.p. (antidepressivo tricíclico) produziu uma significativa atenuação da alodinia mecânica em ratos submetidos a lesão do nervo espinal. O tratamento com fluvoxamina (inibidor seletivo da recaptação de serotonina), sistêmico ou intratecal, também foi efetivo em produzir efeitos antialodínicos em ratos submetidos a dor neuropática, efeitos estes revertidos pelo pré-tratamento com cetanserina (antagonista serotoninérgico 5-HT_{2A/2C}), sugerindo que os efeitos antinociceptivos da fluvoxamina podem ocorrer através dos receptores 5-HT_{2A/2C} (Honda *et al.*, 2006).

A eficácia analgésica dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, na clínica, é menor que os não-seletivos, que atuam inibindo a recaptação de serotonina e noradrenalina. No entanto, em estudos realizados com camundongos que perdem seus neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso central (SNC) na idade adulta, foi observada uma diminuição da analgesia em resposta ao tratamento com opióides e antidepressivos, sugerindo que os neurônios serotoninérgicos centrais tem papel importante na modulação descendente dos estímulos nociceptivos e participam da analgesia induzida pelos opióides e antidepressivos (Zhao, Chiechio, *et al.*, 2007; Zhao, Gao, *et al.*, 2007).

1.2. VIA SEROTONÉRGICA DE MODULAÇÃO DA DOR NEUROPÁTICA

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma monoamina sintetizada no interior das células a partir do aminoácido triptofano. Quando liberada na fenda sináptica exerce seus efeitos através da interação com vários tipos e subtipos de receptores presentes nas membranas pré ou pós-sinápticas (para uma revisão ver (Barnes e Sharp, 1999; Hoyer *et al.*, 2002). É um neurotransmissor amplamente distribuído no SNC, em estruturas como a amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal (SCP), mas a principal fonte de serotonina são os núcleos da rafe localizados no tronco encefálico dorsal (Artigas, 2013).

Há evidências de que as fibras serotonérgicas descendentes do tronco encefálico (SCP e bulbo rostró ventro-medial – RVM) atuam no controle inibitório dos estímulos nociceptivos no corno dorsal da medula (Cui *et al.*, 1999). Além disso, é conhecido o efeito sinérgico das vias serotonérgicas com as vias que modulam a analgesia opióide, onde a SCP tem um papel essencial (Kuner, 2010). O sistema SCP – RVM atua modulando a nocicepção no corno dorsal da medula através das vias inibitórias (células OFF) e vias facilitatórias (células ON) (Fields *et al.*, 2006). No entanto, essa modulação não é exclusivamente serotonérgica (Cui *et al.*, 1999) e há evidências de que a maior parte das células ON e OFF (Cui *et al.*, 1999) são glicinérgicas e GABAérgicas (Ossipov *et al.*, 2010).

Entretanto, devido a grande variedade de tipos e subtipos de receptores para serotonina (5-HT) e sua ampla distribuição pelos SNC e sistema nervoso periférico (SNP) (Barnes e Sharp, 1999; Hoyer *et al.*, 2002), os efeitos da ativação destes receptores podem ser pronociceptivos ou antinociceptivos (Sommer, 2004).

Dessa forma, Millan (1999), em sua revisão de 1999, descreveu o papel de alguns receptores serotonérgicos nas vias envolvidas na modulação da dor neuropática. A ativação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (metabotrópicos, acoplados a proteína G_q ligada a fosfolipase C) do corno dorsal da medula (presentes nas projeções neuronais para o SNC, em interneurônios excitatórios ou em fibras aferentes periféricas) resulta em efeitos pronociceptivos e modulação das vias descendentes facilitatórias. O mesmo efeito ocorre com a ativação dos receptores 5-HT₃ (ionotrópicos, ligados a canais de Ca⁺²) presentes no corno dorsal da medula. Por outro lado, a ativação dos receptores 5-

HT_{1A} (metabotrópicos, acoplados a proteína G_i), presentes nos neurônios superficiais do corno dorsal, produz efeitos inibitórios. Assim, a inibição destes receptores localizados em interneurônios inibitórios está envolvida no processo de sensibilização neuronal do corno dorsal e alodinia, modificações da sensibilidade dolorosa características da dor neuropática.

No entanto, considerando a plasticidade neuronal decorrente da dor crônica, a ativação dos receptores serotoninérgicos presentes no corno dorsal da medula pode produzir efeitos diferentes. Por exemplo, Liu et al. (2002) observou que a injeção intratecal de antagonistas dos receptores 5-HT_{1A} atenuou a analgesia induzida pela injeção intra-SCP de morfina em ratos. Além destes receptores, vários trabalhos tem mostrado a participação dos receptores 5-HT_{2C} na modulação da dor neuropática. A injeção intratecal de agonistas 5-HT_{2C} produziu efeitos anti-alodínicos em ratos submetidos a diferentes modelos de dor neuropática (Obata *et al.*, 2004; Nakai *et al.*, 2010). E foi observado um aumento na expressão destes receptores em diferentes regiões da medula espinal de ratos submetidos a lesão medular (Nakae *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2013).

Tem sido demonstrada que a associação de antidepressivos (fluoxetina, reboxetina, venlafaxina e bupropiona) pode ser eficaz no tratamento da alodinia e hiperalgesia induzidas pela dor neuropática em ratos (Pedersen *et al.*, 2005). Além disso, Matsuzawa-Yanagida *et al.* (2008) utilizaram diferentes classes de antidepressivos: imipramina (antidepressivo tricíclico), milnacipran (inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina) e paroxetina (inibidor seletivo da recaptção de serotonina) para o tratamento crônico de roedores submetidos a dor neuropática e demonstraram que estes antidepressivos podem ser efetivos, tanto no tratamento da ansiedade associada a dor neuropática, como na redução da hiperalgesia e alodinia presentes nessa patologia. E ainda, Ardid *et al.* (2001) utilizaram associação de clomipramina (inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina) e um antagonista 5-HT_{1A} (WAY-100635) para aumentar o efeito antinociceptivo e diminuir a latência para a visualização dos primeiros resultados com tratamento, em ratos submetidos a dor neuropática.

Entretanto, há poucos trabalhos que relacionam os receptores serotoninérgicos encefálicos na modulação da dor neuropática. Estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a ativação dos receptores 5-HT_{1A} da SCPventrolateral não alterou a antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade em camundongos submetidos ao modelo

de constrição do nervo ciático e expostos ao predador (Canto-De-Souza e Reis, 2012). Assim, os resultados apontam para o não envolvimento desse subtipo de receptor para modular este tipo de dor em camundongos. *No entanto, permanece desconhecido o envolvimento de outros subtipos de receptores serotoninérgicos da SCP nesta modulação.*

1.3. MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA

Vários trabalhos tem investigado a participação da serotonina na modulação da dor neuropática em roedores, utilizando o próprio neurotransmissor ou drogas com ação nos receptores serotoninérgicos (Ardid *et al.*, 2001; Obata *et al.*, 2004; Nitanda *et al.*, 2005; Nakai *et al.*, 2010) ou animais “knockout” para proteínas envolvidas nos mecanismos serotoninérgicos (Vogel *et al.*, 2003). Assim, já foi observado efeito antinociceptivo após injeção intratecal de agonistas 5-HT_{2C} em ratos submetidos a dor neuropática (Obata *et al.*, 2004; Nakai *et al.*, 2010) e ausência de hiperalgesia térmica em camundongos deficientes para o transportador de 5-HT submetidos à dor neuropática (Vogel *et al.*, 2003), sugerindo o envolvimento dos receptores serotoninérgicos na modulação deste tipo de dor.

Nesse sentido, como um dos modelos animais utilizados para indução de dor neuropática já descrita na literatura temos a lesão parcial do nervo ciático através da sua constrição crônica (Bennett e Xie, 1988), e vários autores têm utilizado este modelo para investigar os mecanismos que modulam este tipo de dor (Sommer e Schafers, 1998; Ardid *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2003; Nitanda *et al.*, 2005; Canto-De-Souza e Reis, 2012).

O modelo de constrição crônica do nervo ciático foi descrito pela primeira vez por Bennet e Xie, em 1988, em ratos. E, posteriormente, foi adaptado para camundongos (Sommer e Schafers, 1998). O modelo consiste na compressão do nervo ciático através de ligaduras ao redor do nervo com fio estéril não reabsorvível. A constrição crônica do nervo ciático leva ao desenvolvimento de alterações nociceptivas características da dor neuropática, como hiperalgesia, alodinia e comportamentos indicativos de dor espontânea.

Dessa forma, vários trabalhos tem relacionado as alterações presentes na patogenia da dor neuropática com o modelo de constrição do nervo ciático. Sugimoto *et*

al. (1990) observaram uma degeneração neuronal no corno dorsal da medula após a constrição crônica do nervo ciático, sugerindo que essa alteração neuroanatômica pode levar a sensibilização central. Outros estudos mostraram que essa degeneração de fibras aferentes nociceptivas pode levar a uma transmissão cruzada dos estímulos nociceptivos periféricos (Ueda, 2008). *Porém, ainda não são conhecidos os efeitos da ativação de receptores serotoninérgicos específicos, como o 5-HT_{2C}, presentes na SCP sobre a nociceção no modelo de constrição crônica do nervo ciático.*

1.4. VIAS SEROTONÉRGICAS X REAÇÕES DE DEFESA

Além do seu papel na modulação da dor, a serotonina também possui papel chave no processamento das emoções. No entanto, os efeitos da serotonina nos processos emocionais, como a ansiedade e o medo, estão relacionados com o tipo de estímulo aversivo (condicionado ou incondicionado), com a estrutura alvo e com o tipo de receptor ativado (Deakin e Graeff, 1991). Diante das evidências apresentadas na literatura naquele momento, os autores citados propuseram a teoria do papel dual da serotonina na modulação da ansiedade. Assim, de maneira geral, a serotonina produz resultados diferentes no comportamento dependendo da estrutura do sistema nervoso central onde exerce sua função, por exemplo, produz aumento dos comportamentos relacionados a ansiedade, ou seja, efeito ansiogênico quando atua sobre a amígdala e o hipocampo, e atenuação dos comportamentos ansiogênicos, ou seja, efeito ansiolítico quando atua sobre a SCPdorsal.

Anatomicamente, algumas estruturas encefálicas responsáveis pelo processamento e modulação da dor também estão envolvidas no chamado sistema encefálico de defesa, estruturas estas que incluem a amígdala, a SCP e o hipotálamo (Deakin e Graeff, 1991). Estímulos nociceptivos e estímulos aversivos inatos são capazes de ativar as estruturas relacionadas ao sistema encefálico de defesa, dentre elas, a SCP, e provocar uma série de alterações comportamentais, hormonais e neurovegetativas, que preparam o organismo para a luta ou para a fuga frente a estímulos aversivos; ou para exibir comportamentos recuperativos frente a estímulos nociceptivos (Siegfried *et al.*, 1990; Deakin e Graeff, 1991).

Estudos realizados com modelos animais submetidos a dor neuropática mostraram o envolvimento do córtex frontal, do tálamo e da SCP na modulação deste

tipo de dor, pelo aumento da expressão de c-fos, um marcador de atividade neuronal, nestas estruturas (Narita *et al.*, 2003).

A SCP é, portanto, uma estrutura mesencefálica, que recebe direta e indiretamente, estímulos nociceptivos do corno dorsal da medula. Além de estar reciprocamente interconectada com outras estruturas como o hipotálamo e núcleos da rafe e estruturas corticais do sistema límbico, dentre elas, o córtex frontal e a amígdala, integrando os estímulos nociceptivos com o processamento das emoções, como o medo e a ansiedade (Millan, 1999).

Estudos clínicos mostraram que a estimulação elétrica da SCP provoca sentimento de medo extremo e morte iminente, semelhantes as sensações presentes em ataques de pânico (Nashold *et al.*, 1969). Além disso, a estimulação elétrica ou química da SCP em modelos animais ativa o sistema encefálico de defesa e produz reações comportamentais de luta e fuga, respostas características a estímulos aversivos incondicionados de medo (Graeff, 2004; Carvalho-Netto *et al.*, 2006). Estas respostas, da mesma forma como ocorre em ataques de pânico, são resistentes ao tratamento com ansiolíticos moderados. No entanto, drogas com ação nas vias serotoninérgicas produzem atenuação das respostas comportamentais ao medo incondicionado, por exemplo, a injeção intra-SCPd de 5-HT, de agonistas serotoninérgicos ou inibidores da receptação de 5-HT, prejudicam a fuga causada pela estimulação elétrica da SCPd, após a microinjeção, em ratos (Graeff *et al.*, 1996).

A antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade é uma das reações produzidas pela ativação do sistema encefálico de defesa. Assim, embora a dor seja uma reação protetora para limitar a lesão, a analgesia também apresenta papel importante ao organismo em situações aversivas, aumentando as chances de sobrevivência do indivíduo e, conseqüentemente da espécie (Bolles e Fanselow, 1980). Os comportamentos recuperativos dispensados para o cuidado de uma lesão não são vantajosos para o organismo frente a uma ameaça real ou potencial.

Nesse sentido, vários trabalhos têm demonstrado que a ansiedade e/ou medo podem promover antinocicepção em roedores (Canto-De-Souza *et al.*, 1998; Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2009; Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2009; Baptista *et al.*, 2012). Embora a ansiedade e o medo sejam emoções correlatas, é possível fazer uma distinção entre essas duas emoções: entende-se por medo a sensação que ocorre na presença de um perigo real e proximal, caracterizado por comportamentos de fuga e luta defensiva; e ansiedade é o sentimento de apreensão por uma ameaça

potencial e resulta em estados de hipervigilância e comportamentos de avaliação de risco (Blachard *et al.*, 1990).

Estudos clínicos têm evidenciado que os efeitos dessas duas emoções sobre a nocicepção é controverso. Quando o circuito responsável por modular o medo é fortemente ativado, por um choque elétrico, por exemplo, os efeitos produzidos são de antinocicepção. E quando há uma ameaça de ocorrer o choque elétrico, ativando os circuitos modulatórios da ansiedade, os efeitos produzidos são de aumento da nocicepção (Rhudy e Meagher, 2000).

Estudos do nosso grupo têm demonstrado a participação da serotonina na modulação dos comportamentos defensivos. Canto-de-Souza *et al.* (2002) observaram que a injeção de WAY-100635, um antagonista dos receptores 5-HT_{1A}, no núcleo mediano da rafe, produziu efeito ansiolítico em camundongos expostos ao LCE, por bloquear autorreceptores somatodendríticos e aumentar a liberação de serotonina pelos neurônios da rafe em estruturas pós-sinápticas (hipocampo, amígdala e SCP, por exemplo).

Nunes-de-Souza *et al.* (2011) sugerem que há projeções serotonérgicas do núcleo mediano da rafe para a SCP que podem estar envolvidas na modulação da ansiedade e da antinocicepção em camundongos, tendo sido observado efeito ansiolítico através da ativação da SCP via receptores 5-HT_{2C} (Nunes-De-Souza *et al.*, 2008; Gomes e Nunes-De-Souza, 2009) e aumento da antinocicepção induzida por estímulos aversivos (Baptista *et al.*, 2012). Embora os últimos resultados pareçam contraditórios, é possível que a serotonina tenha papéis distintos na modulação da ansiedade e da antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade (Baptista *et al.*, 2012).

Entretanto, mesmo diante dessas evidências do papel da serotonina e da SCP na modulação integrada da nocicepção e das reações de defesa, os mecanismos precisos pelos quais essa modulação ocorre, ainda apresenta resultados controversos e desconhecidos.

1.5. TESTE DE EXPOSIÇÃO AO RATO

Para melhor compreensão da neurobiologia dos comportamentos relacionados ao medo/ansiedade vários modelos de exposição ao predador tem sido utilizados, com variações no estímulo aversivo: gato ou seu odor (Adamec *et al.*, 2004; Beijamini e Guimaraes, 2006) ou rato (Yang *et al.*, 2004; Carvalho-Netto *et al.*, 2007).

Yang *et al.* (2004) validaram um modelo de exposição ao rato que permite que o camundongo escolha entre se aproximar do estímulo aversivo ou se esquivar. O aparato possui um compartimento de exploração, separado do alojamento do rato por uma tela de arame, que permite a aproximação do camundongo ao rato. Ligada ao compartimento de exploração por um túnel, há uma toca, utilizada para fuga do camundongo. Este modelo permite eliciar diferentes comportamentos defensivos como avaliação de risco, fuga, congelamento (Yang *et al.*, 2004; Carvalho-Netto *et al.*, 2007) e, inclusive, a antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade (Kavaliers e Choleris, 1997; Kavaliers *et al.*, 1997; Canto-De-Souza e Reis, 2012), além de produzir aumento nos níveis de corticosterona (Amaral *et al.*, 2010).

Há evidências de que o comportamento de avaliação de risco expressado pelos camundongos frente ao estímulo aversivo, e a resposta de fuga frente ao perigo proximal, podem estar relacionados ao transtorno de ansiedade generalizada e ao pânico, respectivamente (Blanchard *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2013). Nesse sentido, resultados apresentados por Blanchard *et al.* (2004) sugerem que este modelo possui boa previsibilidade farmacológica, uma vez que o tratamento sistêmico com ansiolíticos clássicos como o diazepam (agonista benzodiazepínico) e a buspirona (agonista 5-HT_{1A}), produziram diminuição de comportamentos relacionados com a ansiedade, como avaliação de risco e esquiva. E ainda, Campos *et al.* (2013) mostraram que o tratamento sistêmico agudo com alprazolam (agonista benzodiazepínico de alta potência) e crônico com fluoxetina (inibidor seletivo da receptação de serotonina), fármacos estes com ação panicolítica, produziram diminuição dos comportamentos defensivos dos camundongos expostos a este modelo.

Após a exposição ao predador, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e das vias envolvidos no sistema encefálico de defesa (Figueiredo *et al.*, 2003). Nesse sentido, Carvalho-Netto *et al.* (2007) mostraram que a injeção intra-SCPdorsal de um agonista do receptor para o fator liberador de corticotropina (CRF) aumenta comportamentos de esquiva nos camundongos expostos ao rato, sugerindo que o sistema CRFérgico da SCPdorsal está envolvido na modulação dos comportamentos relacionados ao medo/ansiedade e no processamento das emoções.

Apesar do aparato utilizado no presente trabalho ser diferente do modelo validado por Yang *et al.* (2004), nós realizamos um experimento piloto, utilizando camundongos da mesma linhagem e os mesmos ratos predadores, e pudemos observar

que o perfil dos comportamentos eliciados pelos dois modelos de aparato foi semelhante (resultados não apresentados na dissertação).

Além disso, resultados recentes do nosso grupo mostraram que a injeção de midazolam (agonista benzodiazepínico) no hipocampo ventral (Canto-De-Souza e Fachini, 2010) e intra-amidala (Canto-De-Souza e Barbalho, 2013) produziram efeitos ansiolíticos no teste de exposição ao rato, efeitos estes que foram revertidos pelo pré-tratamento com ondansetron (antagonista 5-HT₃) e flumazenil (antagonista benzodiazepínico), respectivamente. Em outro estudo, foi observado que a ativação dos receptores 5-HT_{1A} da SCPventrolateral de camundongos pode atenuar os comportamentos defensivos sem alterar a antinocicepção induzida pela exposição ao predador (Canto-De-Souza e Reis, 2012). Dessa forma, os resultados do nosso grupo de pesquisa corroboram com os resultados obtidos utilizando o aparato validado por Yang et al. (Yang *et al.*, 2004).

Diante do exposto, *permanece desconhecido o papel dos receptores 5-HT_{2C} da SCP sobre a antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade em camundongos expostos ao estímulo aversivo (rato).*

1.6. OBJETIVO

1.6.1. Objetivo geral:

Avaliar o papel dos receptores 5-HT_{2C} da substância cinzenta periaquedutal sobre a antinocicepção e as respostas defensivas em camundongos submetidos à constrição crônica do nervo ciático.

1.6.2. Objetivos específicos:

Para isso, foram realizadas as seguintes investigações:

- Investigar o efeito das injeções de mK212 (0,21 e 0,63nmol/0,1µL) na substância cinzenta periaquedutal sobre a antinocicepção induzida pela exposição ao predador em camundongos submetidos a constrição do nervo ciático.
- Investigar o efeito das injeções de mK212 (0,21 e 0,63nmol/0,1µL) na substância cinzenta periaquedutal sobre as respostas defensivas, induzidas pela exposição ao predador em camundongos submetidos a constrição do nervo ciático.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. SUJEITOS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Suíço-albino, pesando de 25 a 35 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. Os animais foram alojados em caixas coletivas (41x34x16cm, de 10 a 15 por caixa), mantidos em condições controladas de temperatura (24 +/- 1°C), umidade (55 +/- 5%), luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e livre acesso ao alimento e água, exceto durante as sessões de teste.

2.2. ÉTICA

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

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCar), protocolo número 019/2008.

2.3. DROGA

A droga utilizada foi o mK212 (6-Cloro-2-(1-piperazinil) cloridrato de pirazina; Tocris Cookson Inc., USA), agonista dos receptores 5-HT_{2C}, nas doses de 0,21 e 0,63nmol. As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios da literatura (Gomes e Nunes-de-Souza, 2009; em comunicação pessoal com os autores, fomos informados que as doses publicadas estão erradas e as doses corretas daquele estudo são as que utilizamos neste trabalho.). Todas as doses foram preparadas em veículo, solução salina (0,9% NaCl) com adição de 10% de Tween 80, solução que foi utilizada como controle dos grupos experimentais.

Os ratos utilizados nos experimentos receberam injeção subcutânea de apomorfina (Siegfried Zofinger, Switzerland), dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%), utilizada para manter os ratos em atividade uniforme durante as sessões de teste. A apomorfina foi administrada na dose de 3,0mg/kg, quinze minutos antes do início do teste.

2.4. CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO

O método utilizado para a reprodução do modelo de dor neuropática foi o de Bennet e Xie (1988), modificado para camundongos (Sommer e Schafers, 1998).

No primeiro dia do protocolo experimental, os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilasina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.) e o nervo ciático direito foi exposto na altura do meio da coxa. Foi realizada a constrição do nervo através de três ligaduras ao redor do nervo, com fio estéril não inflamatório e não reabsorvível mononylon 6.0 com distância de 1mm entre elas. As ligaduras foram realizadas até o animal manifestar uma leve flexão da pata a ser lesionada. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo SHAM e grupo constricto (CNC). Nos camundongos do grupo SHAM, o nervo ciático foi exposto, conforme procedimento descrito acima, sem sofrer constrição.

Após o término do procedimento cirúrgico, os camundongos receberam uma injeção de ceftriaxona, na dose de 4mg/kg, i.m, para evitar infecções e auxiliar na recuperação pós-operatória.

2.5. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE DROGAS

No 7º. dia após a constrição do nervo ciático, os camundongos receberam implantação craniana de cânula-guia (25-gauge x 7 mm; Insight Equipamentos, Brasil) na SCP, com auxílio do aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos, Brasil). Os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.) e a cânula foi fixada em seu crânio com cimento acrílico odontológico. As coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula-guia na SCP, segundo o atlas de Paxinos e Franklin (2001), foram: 4,1mm posterior ao bregma; 1,3mm lateral a linha média e 1,2mm ventral a superfície craniana com ângulo de 26°. A ponta da cânula-guia foi posicionada 2,0 mm dorsal à estrutura alvo. Um mandril de aço inoxidável (33-gauge; Fishtex®, Brasil) foi inserido dentro da cânula-guia para evitar problemas com obstrução e para reduzir contaminação.

Após o término do procedimento cirúrgico, os camundongos receberam uma injeção de ceftriaxona, na dose de 4mg/kg, i.m, para evitar infecções e auxiliar na recuperação pós-operatória.

No 11º. dia após a constrição do nervo ciático foi realizado o procedimento de microinjeção. A agulha de injeção (33-gauge, aço inoxidável, Insight Equipamentos,

Brasil), cujo comprimento ultrapassa em 2,0 mm a ponta da cânula-guia, foi inserida dentro da mesma para a infusão de veículo ou mK212 na SCP. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10), a microseringa Hamilton de 10 μ L acomodada em uma bomba de infusão (BI 2000 – Insight Equipamentos, Brasil), que foi programada para injetar 0,1 μ L de solução durante um período de 60 segundos.

O procedimento de microinjeção consistiu na remoção do mandril, inserção da agulha de injeção, injeção da solução por 60 segundos, permanência da agulha de injeção por mais 60 segundos após o término da injeção e inserção do mandril, enquanto o camundongo foi contido manualmente pelo experimentador com uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois da injeção confirmou o fluxo da solução (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000).

2.6. APARATO E PROCEDIMENTO GERAL

O teste de exposição ao rato foi realizado numa caixa retangular de madeira (59 x 29 x 18cm), modificada de Beijamini e Guimarães (2006). A caixa é dividida em três compartimentos, sendo: local de alojamento do rato (20 x 29 x 18cm) circundada por uma grade de metal; área central para exploração pelo camundongo (29 x 29 x 18cm), separada do alojamento do rato por uma grade de metal e um ambiente protegido do camundongo (9,8 x 29 x 18cm) localizado do lado oposto ao alojamento do rato e separado da área de exploração por uma divisória de madeira com uma pequena passagem para o camundongo.

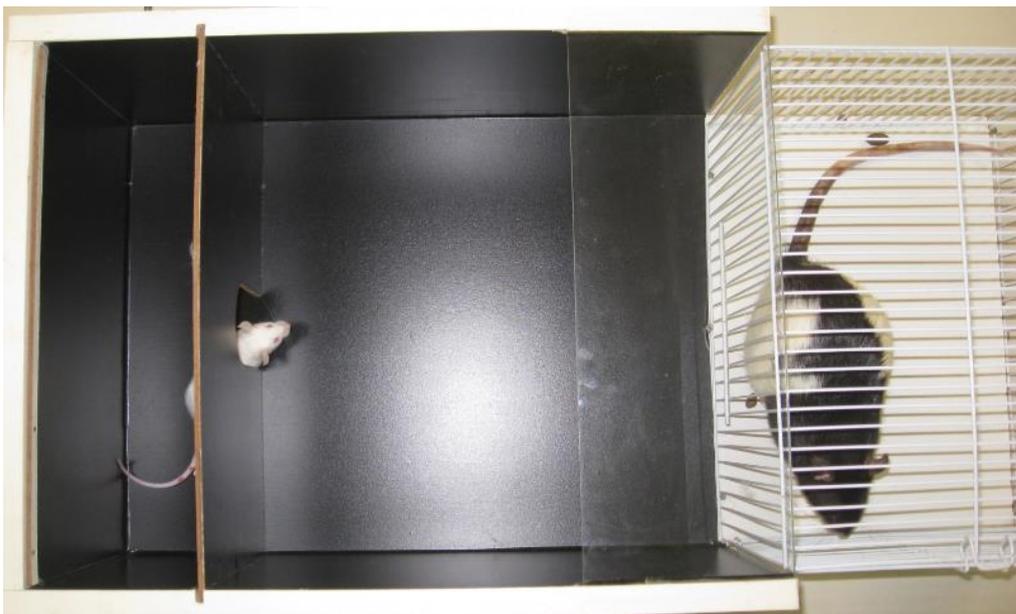


Foto 1. Caixa de teste presa-predador.

Todos os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo claro/escuro sob iluminação moderada (20 lux medido no centro da área de exploração do aparato). Os testes foram gravados através de um circuito filmadora-computador para posterior análise. Cada parte do aparato foi higienizada com solução de álcool 20%, após cada exposição.

O teste de exposição ao rato é dividido em duas fases:

- **Fase 1:** habituação. Do 8°. ao 10°. dia, após a cirurgia de constrição do nervo, os camundongos foram conduzidos até a sala experimental e submetidos individualmente ao procedimento de habituação ao aparato. Cada camundongo foi colocado no centro da área de exploração por um período de 10 minutos, para livre exploração, com a presença de um estímulo neutro na área de alojamento do rato. O estímulo neutro corresponde a um rato de brinquedo, com medidas e aparência semelhantes a um rato de verdade.
- **Fase 2:** teste de exposição ao rato. No 11°. dia após a constrição do nervo ciático, os camundongos foram distribuídos em dois grupos aleatoriamente, e metade foi exposta ao estímulo neutro (rato de brinquedo) e a outra metade foi exposta ao estímulo aversivo: um rato da linhagem *Long Evans*, pesando de 500 a 550 g. O rato foi colocado na área de alojamento do rato, após receber injeção de apomorfina (3,0 mg/kg, s.c). Os camundongos receberam injeção intra-SCP de veículo ou mK212 e, cinco minutos após, foram colocados individualmente no centro da área de exploração por um período de dez minutos.

2.6.1. Análise comportamental

Os comportamentos foram avaliados pela análise dos vídeos com o auxílio do programa X-Plo-Rat 1.1.0 (Garcia *et al.*, 2005).

Os comportamentos analisados envolvem medidas nociceptivas, espaço-temporais e etológicas, conforme descrito abaixo:

Medida nociceptiva: reflexo de coçar (scratching behavior) com a pata lesionada, comportamento este expressado pelos animais que passam pela constrição do nervo ciático. Corresponde ao movimento espontâneo de rápidas sacudidas da pata lesionada no ar. Os camundongos com constrição do nervo ciático que não exibiram o reflexo de coçar durante a exposição ao estímulo neutro foram excluídos do estudo.

Medidas espaço-temporais: tempo de permanência no ambiente protegido, tempo de permanência na área de exploração e tempo de contato com a grade que

separa a área de exploração com área de alojamento do rato. O critério utilizado para avaliar a passagem do camundongo de um compartimento para outro foi o cruzamento pela divisória de separação com as quatro patas do animal. O tempo de contato com a grade incluiu o contato com o focinho e os comportamentos de levantar e escalar a grade.

Medidas etológicas: frequência total de esticar (stretched attend postures, SAP; o camundongo estica o corpo para frente e retorna a posição original sem locomoção) e frequência total de levantar (elevação do corpo sobre as patas traseiras).

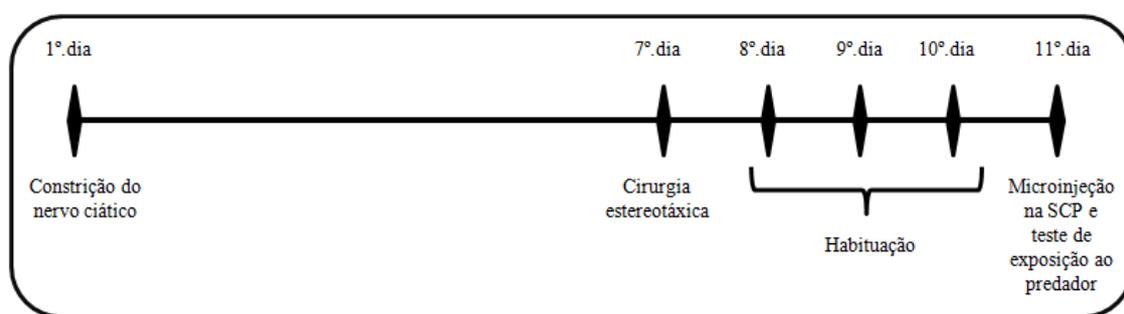


Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental.

2.7. HISTOLOGIA

Após o término dos testes todos os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.) e receberam uma infusão de 0,1µL de uma solução de azul de Evans a 2%, de acordo com o procedimento descrito anteriormente para administração central de drogas. Após a infusão intra-SCP, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, decapitados, seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) para posteriormente, utilizando o micrótomo, sofrerem secções coronais ao longo do trajeto da cânula. As secções foram avaliadas com o auxílio de um microscópio (Olympus B202) e a visualização da dispersão do azul de Evans indicou o local da injeção central de drogas, segundo o atlas de Paxinos e Franklin (2001). Os camundongos cujas injeções não atingiram a SCP foram excluídos do estudo.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de três fatores, sendo fator 1: condição do camundongo (SHAM ou CNC), fator 2: estímulo [exposição ao rato de brinquedo (RB) ou ao rato (RV)] e fator 3: tratamento (veículo ou mK212). Para os valores significativos de F, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos. Todos os dados foram representados pela média \pm erro padrão da média (EPM).

3. RESULTADOS

A análise histológica confirmou a canulação positiva na SCP de 93 camundongos (Fig.2) e o índice de acerto 70% do total de animais utilizados. Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos:

- Camundongos SHAM expostos ao RB que receberam veículo intra-SCP (n=8) ou mK212 nas doses de 0,21nmol (n=8) e de 0,63nmol (n=9);
- Camundongos CNC expostos ao RB que receberam veículo intra-SCP (n=7) ou mK212 nas doses de 0,21nmol (n=8) e de 0,63nmol (n=7);
- Camundongos SHAM expostos ao RV que receberam veículo intra-SCP (n=7) ou mK212 nas doses de 0,21nmol (n=8) e de 0,63nmol (n=7);
- Camundongos CNC expostos ao RV que receberam veículo intra-SCP (n=9) ou mK212 nas doses de 0,21nmol (n=7) e de 0,63nmol (n=8);

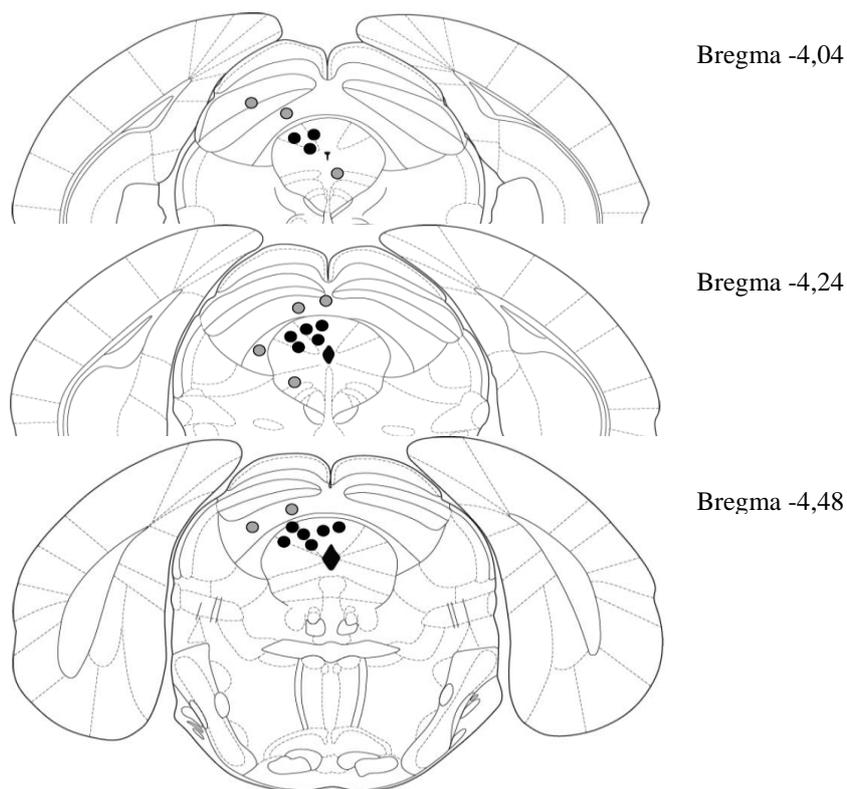


Figura 2. Representação esquemática dos sítios de injeção na SCP de camundongos. Acertos: círculos escuros. Erros: círculos cinzas. Os cortes coronais representados estão entre 4,04 e 4,48 mm em relação ao bregma no atlas de Paxinos e Franklin, 2001. Os pontos da ilustração representam apenas uma parte dos locais atingidos

3.1. MEDIDA NOCICEPTIVA

A Figura 3 ilustra o resultado da injeção de mK212 na SCP de camundongos SHAM ou CNC submetidos ao teste de exposição ao predador em relação à frequência do reflexo de coçar. A ANOVA de três fatores (condição x estímulo x tratamento) mostrou efeito significativo para a condição SHAM/CNC [$F(1,81)=38,49$, $p<0,05$], estímulo RB/RV [$F(1,81)=36,61$, $p<0,05$] e interação entre condição x estímulo [$F(1,81)=20,45$, $p<0,05$] e entre estímulo x tratamento [$F(2,81)=3,42$, $p<0,05$], mas não para a interação entre os três fatores, condição x estímulo x tratamento, [$F(2,81)=2,72$, $p=0,07$]. Apesar do efeito entre a interação estímulo e tratamento, não ocorreu efeito para o fator tratamento com mK212 [$F(2,81)=1,73$, $p=0,18$].

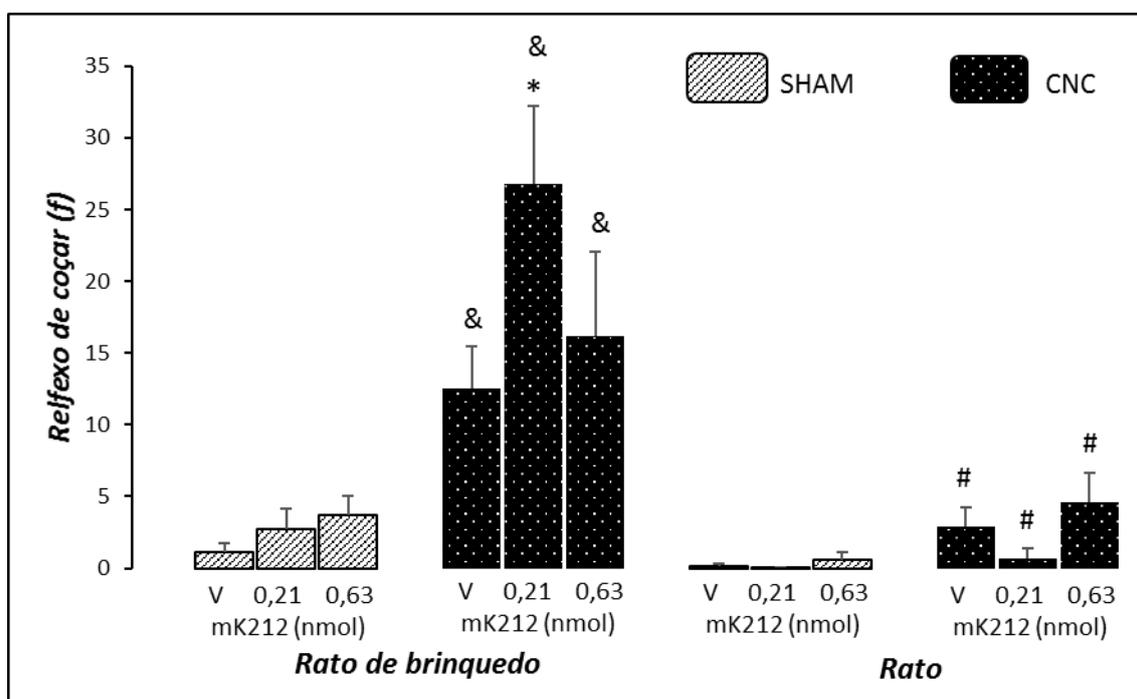


Figura 3. Efeito da microinjeção de veículo ou de mK212 (0,21nmol e 0,63nmol) na SCP de camundongos SHAM ou CNC sobre a frequência do reflexo de coçar no teste de exposição ao predador. Os valores estão representados pela média \pm EPM ($n=7-9$). * $P<0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. # $P<0,05$ comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. & $P<0,05$ comparado ao respectivo grupo SHAM. CNC=constrição do nervo ciático; V=veículo.

O *post hoc* de Duncan confirmou o efeito da condição, mostrando que a frequência do reflexo de coçar foi estatisticamente maior nos camundongos CNC, independente do tipo de estímulo, exposição ao rato de brinquedo ou ao rato,

comparados aos seus respectivos grupos SHAM ($p < 0,05$). Além disso, o reflexo de coçar foi estatisticamente menor nos camundongos CNC expostos ao rato, quando comparados aos respectivos grupos CNC expostos ao rato de brinquedo ($p < 0,05$). Apesar da ANOVA não apresentar efeito significativo para o tratamento ocorreu efeito significativo para a interação entre o estímulo x tratamento, assim realizamos o *post hoc* que mostrou efeito apenas na dose de 0,21nmol de mK212 para os camundongos CNC expostos ao rato de brinquedo ($p < 0,05$), quando comparados ao seu respectivo grupo veículo (controle).

3.2. MEDIDAS ESPAÇO-TEMPORAIS

A Figura 4 ilustra o resultado da injeção de mK212 na SCP de camundongos SHAM ou CNC submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao tempo de permanência no ambiente protegido. A ANOVA de três fatores mostrou efeito significativo para o estímulo RB/RV [$F(1,81)=82,82$, $p < 0,05$], mas não mostrou efeito significativo para a condição SHAM/CNC [$F(1,81)=0,06$, $p=0,79$] e o tratamento [$F(2,81)=1,19$, $p=0,31$]. Entretanto, a ANOVA mostrou interação entre condição x tratamento [$F(2,81)=5,62$, $p < 0,05$] e entre condição x estímulo x tratamento [$F(2,81)=3,91$, $p < 0,05$].

O teste de Duncan mostrou que independente da injeção intra-SCP, veículo ou mK212 nas duas doses, os camundongos SHAM e CNC expostos ao rato permaneceram mais tempo no ambiente protegido quando comparados aos respectivos camundongos SHAM e CNC expostos ao rato de brinquedo ($p < 0,05$), com exceção dos camundongos CNC expostos ao rato que receberam a dose mais baixa de mK212 (0,21nmol).

Apesar da ANOVA não apresentar efeito do tratamento, ocorreu efeito da interação entre os três fatores possibilitando a realização do teste de *post hoc*. Assim, a dose de 0,21nmol de mK212 na SCP, produziu diminuição do tempo de permanência no ambiente protegido para os camundongos SHAM expostos ao rato de brinquedo, quando comparado ao seu respectivo veículo ($p < 0,05$). Enquanto que, para os camundongos CNC expostos ao rato de brinquedo, a mesma dose de mK212 produziu aumento do tempo de permanência no ambiente protegido quando comparado ao veículo ($p < 0,05$). O teste de Duncan mostrou que não ocorreu alteração significativa

para o tempo de permanência no ambiente protegido para os grupos SHAM e CNC, expostos ao rato de brinquedo, tratados com mK212 na dose de 0,63nmol. Além disso, nenhuma das doses de mK212 (0,21 e 0,63nmol) injetadas na SCP dos camundongos SHAM ou CNC expostos ao rato, alterou o tempo de permanência no ambiente protegido, quando comparados ao respectivo veículo.

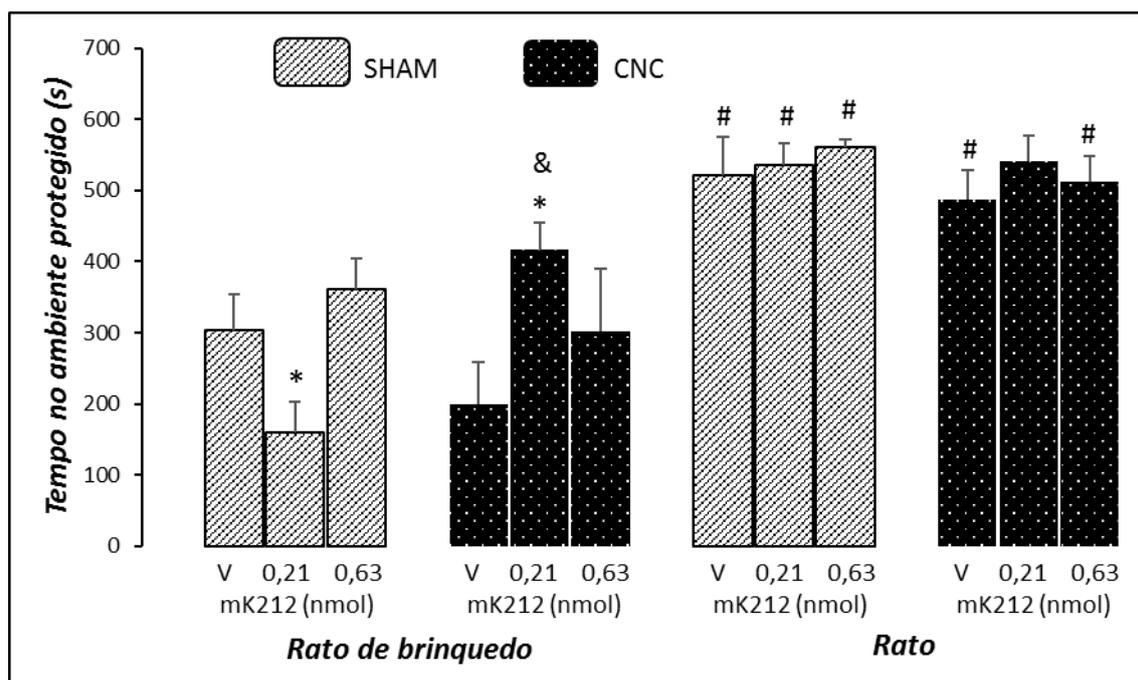


Figura 4. Efeito da microinjeção de veículo ou de mK212 (0,21nmol e 0,63nmol) na SCP de camundongos SHAM ou CNC em relação ao tempo de permanência no ambiente protegido no teste de exposição ao predador. Os dados estão representados como a média \pm EPM ($n = 7-9$). * $P < 0,05$ comparados ao respectivo grupo veículo. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. & $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo SHAM. CNC=constrição do nervo ciático; V=veículo.

A Figura 5 ilustra o resultado da injeção de mK212 na SCP de camundongos SHAM ou CNC submetidos ao teste de exposição ao predador em relação ao tempo de contato com a grade que separa a área de exploração do camundongo com a área de alojamento do rato. A ANOVA de três fatores mostrou efeito significativo para a condição SHAM/CNC [$F(1,81)=4,87$, $p<0,05$], estímulo RB/RV [$F(1,81)=49,08$, $p<0,05$] e interação entre condição x estímulo [$F(1, 81)=6,11$, $p<0,05$], porém não mostrou efeito significativo para o tratamento [$F(2, 81)=2,3932$, $p=0,097$] e para a interação entre condição x estímulo x tratamento [$F(2, 81)=2,18$, $p=0,12$].

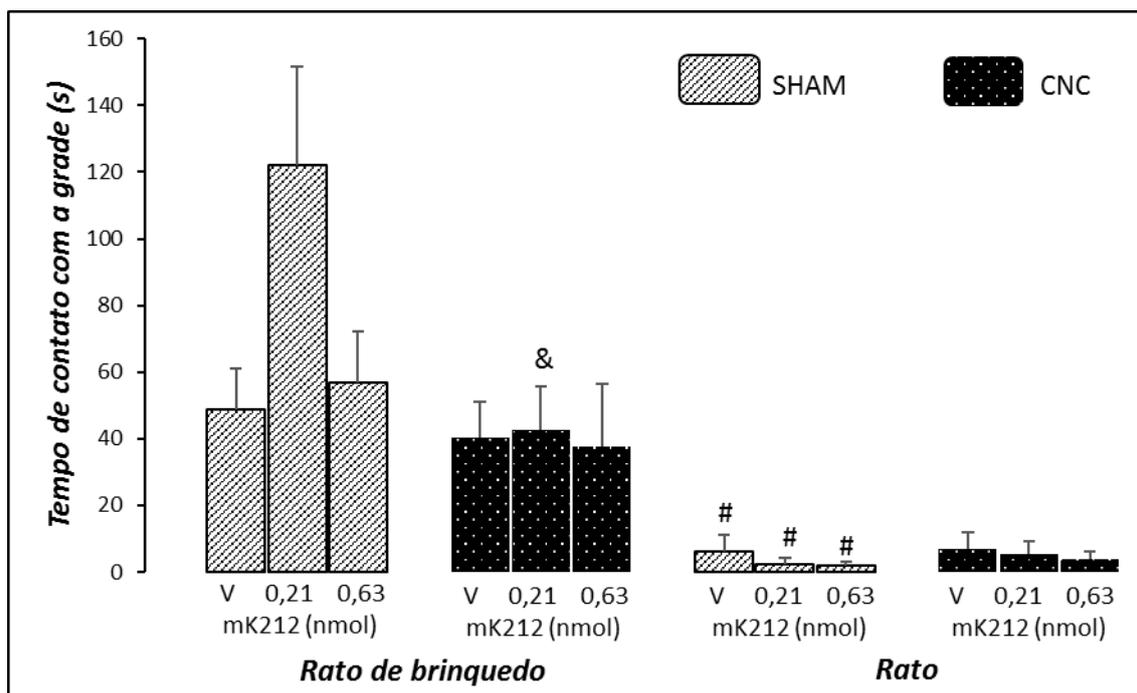


Figura 5. Efeito da microinjeção de veículo ou de mK212 (0,21nmol e 0,63nmol) na SCP de camundongos SHAM ou CNC em relação ao tempo de contato com a grade no teste de exposição ao predador. Os dados estão representados como a média \pm EPM ($n = 7-9$). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. & $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo SHAM. CNC=constrição do nervo ciático; V=veículo.

O *post hoc* mostrou que os camundongos SHAM expostos ao rato permaneceram menos tempo em contato com a grade quando comparados aos respectivos grupos SHAM expostos ao rato de brinquedo ($p < 0,05$). Apesar de não ter sido confirmado pelo teste de Duncan, esse efeito também foi observado para os camundongos CNC expostos ao rato nos grupos, veículo ($p = 0,09$) e mK212 (0,21nmol, $p = 0,08$), onde os valores de p ficaram próximos da significância.

O efeito da interação entre condição x estímulo mostrou que ocorreu diminuição no contato com a grade apenas para os camundongos CNC expostos ao rato de brinquedo e tratados com mK212 (0,21 nmol), quando comparados ao grupo SHAM expostos ao mesmo estímulo.

3.3. MEDIDAS ETOLÓGICAS

A tabela 1 mostra o resultado da injeção de mK212 na SCP de camundongos SHAM ou CNC submetidos ao teste de exposição ao predador em relação aos comportamentos etológicos de esticar e levantar.

Para a frequência total de esticar a ANOVA de três fatores mostrou efeito significativo para a condição SHAM/CNC [$F(1,81)=5,12$, $p<0,05$] e para o estímulo RB/RV [$F(1,81)=53,75$, $p<0,05$], mas não mostrou efeito significativo para o tratamento [$F(2,81)=0,43$, $p=0,64$] nem para a interação entre condição x estímulo x tratamento [$F(2,81)=1,55$, $p=0,22$].

Apesar da ANOVA ter mostrado efeito da condição, o *post hoc* confirmou somente o efeito do estímulo. Assim, os camundongos expostos ao rato aumentaram a frequência de esticar, quando comparados aos camundongos expostos ao rato de brinquedo ($p<0,05$), independente da condição e do tratamento utilizado.

Tabela 1. Efeito da microinjeção de veículo ou de mK212 (0,21nmol e 0,63nmol) na SCP de camundongos SHAM ou CNC em relação aos comportamentos etológicos no teste de exposição ao predador.

Estímulo	Condição	Tratamento	Comportamentos etológicos	
			Total de esticar	Levantar (f)
RB	SHAM	Veículo	0,0 ± 0,0	29,13 ± 5,68
RB	SHAM	0,21	0,13 ± 0,13	35,25 ± 5,37
RB	SHAM	0,63	4,22 ± 1,85	31,22 ± 6,82
RB	CNC	Veículo	5,14 ± 2,39	16,0 ± 4,29
RB	CNC	0,21	6,00 ± 2,37	27,63 ± 3,58
RB	CNC	0,63	3,43 ± 1,93	15,43 ± 3,95
RV	SHAM	Veículo	10,43 ± 3,2 #	27,5 ± 8,23
RV	SHAM	0,21	15,75 ± 2,61 #	22,63 ± 5,63
RV	SHAM	0,63	13,14 ± 3,76 #	22,0 ± 7,07
RV	CNC	Veículo	17,11 ± 3,30 #	23,22 ± 3,54
RV	CNC	0,21	14,70 ± 3,50 #	31,29 ± 6,19
RV	CNC	0,63	19,38 ± 4,81 #	24,63 ± 4,13

Os dados estão representados como a média ± EPM (n = 7-9). #P < 0,05 comparado ao respectivo grupo exposto ao rato de brinquedo. CNC=constrição do nervo ciático; RB=rato de brinquedo; RV=rato de verdade.

Para a frequência de levantar, a ANOVA não mostrou efeito significativo para os três fatores, condição [$F(1,81)=3,09$, $p=0,08$], estímulo RB/RV [$F(1,81)=0,0018$,

$p=0,96$] e tratamento [$F(2,81)=1,19$, $p=0,31$], nem para a interação entre condição x estímulo x tratamento [$F(2,81)=0,44$, $p=0,64$]. Entretanto ocorreu efeito significativo para a interação entre condição x estímulo [$F(1,81)=4,20$, $p<0,05$].

Apesar da ANOVA mostrar efeito da interação entre condição x estímulo, o *post hoc* não confirmou este efeito.

4. DISCUSSÃO

Os nossos resultados mostram que os camundongos submetidos a cirurgia de constrição do nervo ciático (CNC) que receberam injeção intra-SCP de veículo ou mK212, apresentam aumento da frequência em coçar quando comparados ao respectivo grupo SHAM, indicando que a CNC, um modelo de dor neuropática, é capaz de induzir o aumento da nocicepção. A exposição dos camundongos com CNC ao seu predador (rato), produziu efeito antinociceptivo e aumento da ansiedade/medo caracterizadas por aumento do tempo gasto no ambiente protegido da caixa e da frequência total de esticar e pela diminuição do tempo de contato com a grade, local que separa a área de exploração do camundongo com a área de alojamento do rato. A ativação dos receptores 5-HT_{2C} da SCP com as duas doses de mK212 (0,21 e 0,63 nmol) não produziu alterações significativas sobre a nocicepção e os comportamentos relacionados ao medo/ansiedade avaliados nos camundongos CNC, durante a exposição ao predador (rato). Entretanto, quando os camundongos CNC foram expostos ao rato de brinquedo, apenas a menor dose de mK212 (0,21nmol) aumentou o reflexo de coçar produzindo hiperalgesia.

Os camundongos que foram submetidos a constrição do nervo ciático apresentaram aumento do reflexo de coçar, comparados aos camundongos SHAM (Figura 3). Estes resultados corroboram com estudos anteriores que mostraram que a constrição crônica do nervo ciático produz dor neuropática (Bennett e Xie, 1988; Liu *et al.*, 2002; Nitanda *et al.*, 2005; Canto-De-Souza e Reis, 2012). O reflexo de coçar, é um movimento espontâneo de sacudir rapidamente a pata lesionada no ar, observado em ratos e camundongos, e é um índice que reflete a dor espontânea (Kupers *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2012), que em humanos, é um sintoma frequentemente descrito por pacientes com dor neuropática.

Estudos têm demonstrado que a exposição ao predador, um estímulo aversivo inato e incondicionado, aumenta os índices comportamentais relacionados ao medo e a ansiedade (Yang *et al.*, 2004; Canto-De-Souza e Fachini, 2010; Pobbe *et al.*, 2011; Canto-De-Souza e Barbalho, 2013). E essa situação de medo também promove antinocicepção como uma reação de defesa (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2009; Baptista *et al.*, 2012; Canto-De-Souza e Reis, 2012; Canto-De-Souza e Barbalho, 2013).

No presente trabalho, verificamos que os camundongos expostos ao rato, permaneceram mais tempo na área protegida, menos tempo em contato com a grade que separa a área de exploração do camundongo com a área de alojamento do rato e aumento da frequência de esticar, um comportamento interpretado como avaliação de risco. Resultados semelhantes já foram descritos na literatura com a utilização de modelo diferente. Neste sentido foi observado que a exposição do camundongo ao predador (rato) produziu aumento significativo na avaliação de risco, no congelamento, na esquiva (tempo de permanência na toca) e diminuição do tempo de contato com a grade (Yang *et al.*, 2004). Embora o aparato utilizado no nosso estudo para exposição ao predador não seja idêntico ao validado por Yang *et al.* (2004), os nossos resultados corroboram com os estudos destes pesquisadores. Além disso, em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa onde foi empregado o modelo de exposição ao predador, conforme descrito nesse estudo, encontramos resultados semelhantes referentes a avaliação da ansiedade/medo (Canto-De-Souza e Fachini, 2010; Canto-De-Souza e Reis, 2012; Canto-De-Souza e Barbalho, 2013).

Além dos resultados obtidos referentes a ansiedade/medo, os nossos resultados mostraram que ocorreu diminuição da frequência do reflexo de coçar quando os camundongos foram expostos ao rato, indicando que este estímulo, aversivo e incondicionado, promove a antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade. Resultado semelhante foi demonstrado por Canto-de-Souza e Reis (2012) e Canto-de-Souza e Barbalho (2013), embora neste último trabalho, a nocicepção tenha sido induzida por injeção de ácido acético (i.p.), modelo de nocicepção aguda e visceral.

Este efeito antinociceptivo induzido por um estímulo aversivo também já foi descrito em outros trabalhos onde camundongos foram confinados ao braço aberto ou fechado do labirinto em cruz elevado padrão (Nunes-De-Souza *et al.*, 2000; Baptista *et al.*, 2009) ou expostos aos quatro braços abertos (LCEa) (Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2005). Porém, diferente do presente estudo, naqueles trabalhos o estímulo nociceptivo utilizado foi a injeção intra-peritoneal de ácido acético ou a injeção de formalina na pata, respectivamente.

Há vários trabalhos que avaliaram o papel dos receptores serotoninérgicos na modulação da dor e da ansiedade. No entanto, os resultados são controversos, e um dos motivos pode ser devido aos vários subtipos de receptores amplamente distribuídos pelo

sistema nervoso central e periférico (Barnes e Sharp, 1999; Hoyer *et al.*, 2002). Contudo, existem evidências da participação dos receptores 5-HT_{2C} na modulação da dor neuropática (Obata *et al.*, 2004; Nakae *et al.*, 2008).

Neste sentido, a injeção intratecal de agonistas dos receptores 5-HT_{2C} (mK212 e mCPP) em ratos submetidos a lesão do nervo espinal resultou em efeitos antialodínicos observados com a utilização do teste com filamentos de von Frey (Obata *et al.*, 2004). Além disso, há estudos que demonstram que a expressão dos receptores 5-HT_{2C} na medula espinal está aumentada em ratos submetidos a lesão medular crônica (Nakae *et al.*, 2008), sugerindo que essas vias são responsáveis pela inibição descendente dos estímulos nociceptivos.

O sistema substância cinzenta periaquedutal (SCP) – bulbo rostral ventromedial (RVM) modula os estímulos nociceptivos no corno dorsal da medula através de vias descendentes inibitórias e facilitatórias (Fields *et al.*, 2006), sendo que o efeito antinociceptivo consequente da ativação da SCP está relacionado com a liberação de noradrenalina, serotonina e aminoácidos inibitórios no corno dorsal da medula (Cui *et al.*, 1999). Há evidências de que a neuropatia periférica produz alterações plásticas no sistema serotoninérgico descendente de modulação nociceptiva, diminuindo seus efeitos inibitórios, levando ao desenvolvimento da sensibilização central (Liu *et al.*, 2010).

Liu *et al.* (2010) observaram que a ligação do nervo espinal em ratos, um modelo de dor neuropática, produz uma diminuição da resposta dos neurônios WDR (wide dynamic range) das fibras C nociceptivas frente a ação da 5-HT e seus agonistas, como 5-HT_{1A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₃ e 5-HT₄. Assim como, os efeitos dos antagonistas 5-HT_{1B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃ e 5-HT₄ em inibir a resposta antinociceptiva induzida pela 5-HT nos neurônios WDR, também foi atenuada após a lesão medular. Além de ocorrer uma queda no conteúdo de serotonina e seu principal metabólito, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), na porção lombar do corno dorsal da medula após a ligação do nervo espinal em ratos. Dessa forma, estes resultados sugerem que a inibição das vias inibitórias descendentes serotoninérgicas, que ocorrem após a lesão medular em ratos, pode estar envolvida no processo de sensibilização central presente na dor neuropática.

No nosso trabalho, as injeções na SCP de mK212, apenas na dose de 0,21nmol, produziram aumento na frequência do reflexo de coçar nos camundongos CNC expostos ao estímulo neutro (rato de brinquedo) (Figura 3). Considerando que a CNC também poderia causar a inibição das vias inibitórias descendentes serotoninérgicas (Liu *et al.*,

2010), nosso resultado sugere que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} presentes na SCP parece estar envolvida na modulação nociceptiva pelas vias facilitatórias descendentes. No entanto, outros estudos são necessários para esclarecer o papel dos receptores 5-HT_{2C} da SCP nas vias modulatórias nociceptivas.

Esse efeito hiperalgésico não foi observado com a injeção de mK212 na dose de 0,63nmol. Apesar desse agonista apresentar capacidade de ligação principalmente nos receptores do subtipo 5-HT_{2C}, e ser conhecido como um agonista preferencial 5-HT_{2C} (Gomes e Nunes-De-Souza, 2009), outros estudos mostram que também apresenta capacidade de ligação em subtipos de receptores 5-HT_{2A} (Conn e Sanders-Bush, 1987). Assim, provavelmente, essa ausência de efeito com a maior dose seja devido a ação desse agonista em outros subtipos de receptores serotoninérgicos como os receptores 5-HT_{2A} ou outros sistemas modulatórios como, por exemplo, o sistema encefálico defensivo. Entretanto, serão necessários novos estudos para averiguar esta hipótese.

Além do seu papel na dor neuropática, os receptores 5-HT_{2C} da SCP também estão envolvidos no controle dos comportamentos relacionados a ansiedade e ao medo. Neste sentido, Nunes-de-Souza et al. (2008) utilizaram o mCPP, um agonista 5-HT_{2B/2C}, microinjetado na SCP de camundongos expostos ao LCE e mostraram que esse tratamento diminuiu os índices de ansiedade (porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos), sem alterar os demais comportamentos, efeitos estes revertidos com o pré-tratamento intra-SCP com cetanserina, antagonista 5-HT_{2A/2C}, sugerindo que a ativação dos receptores 5-HT_{2C} apresenta papel ansiolítico. Da mesma forma, foi observado que o tratamento intra-SCP com mK212 (0,21 e 0,63nmol), produziu efeitos ansiolíticos em camundongos expostos e reexpostos no LCE (Gomes e Nunes-De-Souza, 2009).

No entanto, resultados diferentes dos citados acima também foram observados por outros autores. Assim, Yamashita et al. (2011) injetaram mK212 (1 and 10nmol) na SCP de ratos expostos ao labirinto em T e observaram aumento da esQUIVA inibitória, comportamento relacionado com o transtorno de ansiedade generalizada (Graeff *et al.*, 1998), sugerindo efeito ansiogênico. Neste mesmo estudo, o tratamento com mK212 não apresentou efeito sobre a fuga, comportamento relacionado com o transtorno do pânico (Graeff *et al.*, 1998).

No nosso estudo a injeção intra-SCP de mK212 (0,21nmol) em camundongos SHAM expostos ao estímulo neutro (rato de brinquedo) produziu efeito ansiolítico, o

qual foi caracterizado pela diminuição do tempo no ambiente protegido da caixa (Figura 4) e aumento no tempo em contato com a grade (Figura 5). Embora possamos considerar que estes camundongos SHAM não estejam sob os efeitos da dor crônica ou de estímulos aversivos, o procedimento de microinjeção pode ter produzido um estado maior de ansiedade nos camundongos, possibilitando a visualização do efeito ansiolítico produzido pela ativação do receptor 5-HT_{2C} da SCP (Nunes-De-Souza *et al.*, 2008; Gomes e Nunes-De-Souza, 2009).

No entanto, a mesma dose de mK212 produziu hiperalgesia nos camundongos CNC expostos ao estímulo neutro, como já descrito anteriormente. Uma possível explicação para este efeito pode estar relacionada a mobilidade dos animais. O aumento da expressão da resposta de nocicepção pode ter provocado menor mobilidade nestes camundongos, considerando que este grupo permaneceu maior tempo no ambiente protegido e menor tempo em contato com a grade comparado ao seu respectivo grupo SHAM. Entretanto, a hipótese levantada acima não se confirma, pois os nossos resultados mostram que a constrição do nervo ciático e o tratamento com mK212 não produziram alterações no comportamento exploratório dos camundongos, considerando que a frequência de levantar, um índice de mobilidade (Palanza *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2001), não apresentou diferenças significativas comparando os grupos em relação a sua condição, SHAM ou CNC, ou em relação ao tratamento farmacológico recebido.

Além das injeções intra-SCP de mK212 (0,21nmol) produzirem hiperalgesia nos camundongos CNC expostos ao estímulo neutro, esta medida de nocicepção encontra correlação com o local do aparato onde foi feito o registro. Assim, os camundongos desse grupo apresentaram aumento do tempo de permanência no ambiente protegido, de dimensões menores e menor luminosidade, comparado a superfície de exploração. Embora o tempo de permanência no ambiente protegido seja um índice comportamental relacionado ao medo/ansiedade, o efeito descrito para esta dose de mK212, está relacionado com o efeito hiperalgésico observado, demonstrando a interação entre a condição CNC e o tratamento com este agonista serotoninérgico.

No presente trabalho, os camundongos expostos ao rato permaneceram mais tempo no ambiente protegido, apresentaram menor contato com a grade, efeito que foi próximo da significância no grupo CNC ($p=0,09$, para o grupo veículo e $p=0,08$, para o grupo mK212 0,21nmol) e aumentaram a frequência do total de esticar, quando

comparados aos camundongos expostos ao estímulo neutro (rato de brinquedo), independente da condição do camundongo (SHAM ou CNC) ou da dose de mK212 utilizada. Dessa forma, nenhum dos efeitos ansiolítico ou ansiogênico foram observados com a ativação dos receptores 5-HT_{2C} da SCP nos camundongos expostos ao estímulo aversivo.

Uma possível explicação para a ausência de efeito deste agonista 5-HT_{2C} sobre as medidas de medo/ansiedade observadas neste estudo, as quais são diferentes dos relatos da literatura talvez se devam aos diferentes modelos de ansiedade utilizados (Nunes-De-Souza *et al.*, 2008; Gomes e Nunes-De-Souza, 2009; Yamashita *et al.*, 2011). Levando em consideração os nossos resultados, podemos sugerir que o estímulo aversivo utilizado (presença do rato), o predador natural do camundongo, seja mais aversivo que a exposição ao labirinto em cruz elevado (LCE), o que pode ter dificultado o aparecimento do efeito ansiolítico nesse trabalho conforme descrito em outros estudos (Nunes-De-Souza *et al.*, 2008; Gomes e Nunes-De-Souza, 2009). Além disso, o teste de exposição do camundongo ao rato pode ter promovido por si só, uma estimulação exacerbada da SCP e, conseqüentemente, dos receptores serotoninérgicos, produzindo antinocicepção como reação de defesa, conforme já descrito na literatura (Siegfried *et al.*, 1990; Deakin e Graeff, 1991). Assim, quando foi realizado o tratamento com o mK212 intra-SCP, este efeito da serotonina pode ter sido potencializado, dificultando a reversão do efeito antinociceptivo induzido pelo medo/ansiedade quando comparado ao efeito obtido com a injeção intra-SCP de veículo.

A ativação da SCP por estímulos aversivos também produz antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade como reação de defesa (Siegfried *et al.*, 1990; Deakin e Graeff, 1991). Dessa forma, os receptores 5-HT_{2C} desta estrutura, também estão envolvidos nesta modulação (Mendes-Gomes e Nunes-De-Souza, 2005; Baptista *et al.*, 2012). Baptista *et al.* (2012) observaram o efeito da ativação dos receptores 5-HT_{2C} da SCP na antinocicepção induzida pelo confinamento no braço aberto do LCE. Os camundongos confinados no braço aberto do LCE que receberam a injeção intra-SCP de mCPP (agonista 5-HT_{2B/2C}) apresentaram menor número de contorções abdominais após injeção de ácido acético (i.p.), quando comparados ao seu respectivo grupo controle. Dessa forma, a ativação dos receptores 5-HT_{2C} da SCP aumentou a antinocicepção induzida pelo confinamento no braço aberto do LCE. Os autores sugerem que esse

efeito ocorre pela facilitação dos mecanismos antinociceptivos endógenos ativados por situações aversivas.

Neste estudo, a injeção intra-SCP de mK212 na dose de 0,21nmol, diminuiu a frequência do reflexo de coçar, entretanto, não foi estatisticamente significativo. Como já discutido anteriormente, o estímulo da exposição ao rato parece ser mais aversivo que o braço aberto do LCE, entretanto Baptista et al. (2012) confinaram o camundongo no braço aberto do LCE, enquanto no nosso estudo o camundongo possuía uma rota de fuga (a área protegida), o que pode ter diminuído a aversividade do aparato, impossibilitando a visualização do efeito do tratamento com o mK212.

Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza (2005) discutem que o medo, e não a ansiedade, pode induzir a antinocicepção, mostrando que o LCE com os quatro braços abertos (oLCE) é capaz de diminuir os comportamentos nociceptivos dos camundongos submetidos a injeção de formalina na pata, comparados aos camundongos expostos ao LCE padrão (sLCE) e ao LCE com os quatro braços fechados (eLCE).

Num outro estudo, Pobbe et al. (2011) mostraram que a injeção intra-SCP de DOI (agonista 5-HT_{2A/2C}) tem efeito ansiolítico em camundongos submetidos a bateria de testes de defesa para camundongos (MDTB) e não tem efeito quando os camundongos são expostos ao teste de exposição ao rato (RET). Seguindo a mesma linha de discussão, os autores afirmam que o MDTB é mais aversivo que o RET, pois o primeiro não permite que o camundongo se esconda do rato, enquanto o RET possui a toca e maravalha no aparato possibilitando um esconderijo para o camundongo.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, concluímos:

- A constrição do nervo ciático (CNC) em camundongos, promoveu aumento do reflexo de coçar, resposta nociceptiva característica desse modelo de dor neuropática.
- A exposição dos camundongos com constrição do nervo ciático ao estímulo aversivo (rato) produziu antinocicepção induzida pelo medo/ansiedade, assim como outros comportamentos, tais como, aumento da permanência no ambiente protegido e da frequência de esticar e diminuição do tempo de contato com a grade.
- O tratamento intra-SCP com mK212 (0,21 e 0,63nmol) não produziu alterações significativas nos parâmetros avaliados durante a exposição ao estímulo aversivo. Entretanto, quando os camundongos CNC foram expostos ao estímulo neutro, apenas a menor dose de mK212 (0,21nmol) aumentou o reflexo de coçar produzindo hiperalgesia.
- Diante do exposto, sugerimos que os receptores 5-HT_{2C} da SCP parecem modular de forma diferenciada este tipo de antinocicepção e medo/ansiedade em camundongos. Entretanto, novos estudos devem ser realizados, utilizando subtipos de receptores mais seletivos e talvez outros modelos de nocicepção para ampliar e esclarecer o papel dos receptores 5-HT_{2C} nos processos que modulam a antinocicepção induzida por estímulos aversivos.

6. REFERÊNCIAS

ADAMEC, R.; WALLING, S.; BURTON, P. Long-lasting, selective, anxiogenic effects of feline predator stress in mice. **Physiol Behav**, v. 83, n. 3, p. 401-10, Dec 15 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581662> >.

AMARAL, V. C.; SANTOS GOMES, K.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Horm Behav**, v. 57, n. 2, p. 128-33, Feb 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19804780> >.

ARDID, D. et al. Potentiation of the antinociceptive effect of clomipramine by a 5-HT(1A) antagonist in neuropathic pain in rats. **Br J Pharmacol**, v. 132, n. 5, p. 1118-26, Mar 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226143> >.

ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacol Ther**, v. 137, n. 1, p. 119-31, Jan 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022360> >.

BAPTISTA, D. et al. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: Influence of prior test experience. **Brain Res**, v. 1294, p. 29-37, Oct 19 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635465> >.

BAPTISTA, D.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Activation of 5-HT(2C) receptors in the dorsal periaqueductal gray increases antinociception in mice exposed to the elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 235, n. 1, p. 42-7, Nov 1 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22800924> >.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083-152, Aug 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462127> >.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, Oct 16 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19837031> >.

BEIJAMINI, V.; GUIMARAES, F. S. c-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. **Behav Brain Res**, v. 170, n. 1, p. 52-61, Jun 3 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546272> >.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, Apr 1988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2837713> >.

BLACHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; RODGERS, R. J. Pharmacological and neural control of anti-predator defense in the rat. **Agressive Behavior**, v. 16, n. 3-4, p. 165-175, 1990.

BLANCHARD, D. C. et al. **Diazepam and buspirone effects in c57bl/6j mice in the rat exposure test (RET)**. 34 st Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington, DC: Society for Neuroscience 2004.

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

BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-7, Jun 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17888574> >.

BRIDGES, D.; THOMPSON, S. W.; RICE, A. S. Mechanisms of neuropathic pain. **Br J Anaesth**, v. 87, n. 1, p. 12-26, Jul 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11460801> >.

CAMPOS, K. F. et al. Ethopharmacological evaluation of the rat exposure test: a prey-predator interaction test. **Behav Brain Res**, v. 240, p. 160-70, Mar 1 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23195112> >.

CANTO-DE-SOUZA, A.; BARBALHO, C. A. **Antinociception and defensive behaviors induced by a predator (rat) are attenuated by intra-amygdala injection**

of midazolam in mice: Blockade with flumazenil. 43th Annual Meeting Neuroscience. SFN-Neuroscience San Diego, California 2013.

CANTO-DE-SOUZA, A.; FACHINI, G. **Anxiolytic-like effects of ventral hippocampus (VH) midazolam infusions in mice on defensive responding in the rat exposure test.** 40 st Annual Meeting of the Society for Neuroscience-2010. San Diego: Society for Neuroscience: 1018-9 p. 2010.

CANTO-DE-SOUZA, A.; LUIZ NUNES-DE-SOUZA, R.; RODGERS, R. J. Anxiolytic-like effect of way-100635 microinfusions into the median (but not dorsal) raphe nucleus in mice exposed to the plus-maze: influence of prior test experience. **Brain Res**, v. 928, n. 1-2, p. 50-9, Feb 22 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844471> >.

CANTO-DE-SOUZA, A. et al. Involvement of the midbrain periaqueductal gray 5-HT1A receptors in social conflict induced analgesia in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 345, n. 3, p. 253-6, Mar 26 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9592023> >.

CANTO-DE-SOUZA, A.; REIS, L. M. **Activation of 5-HT1A receptors within the ventrolateral periaqueductal grey (vlPAG) matter attenuates defensive behavior without changing fear-induced antinociception in mice.** 42 st Annual Meeting of the Society for Neuroscience. New Orleans: Society for Neuroscience, Washington, DC: 1842-3 p. 2012.

CARVALHO-NETTO, E. F. et al. Effects of intra-PAG infusion of ovine CRF on defensive behaviors in Swiss-Webster mice. **Behav Brain Res**, v. 176, n. 2, p. 222-9, Jan 25 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095103> >.

CARVALHO-NETTO, E. F. et al. Physical environment modulates the behavioral responses induced by chemical stimulation of dorsal periaqueductal gray in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 85, n. 1, p. 140-7, Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949654> >.

CONN, P. J.; SANDERS-BUSH, E. Relative efficacies of piperazines at the phosphoinositide hydrolysis-linked serotonergic (5-HT-2 and 5-HT-1c) receptors. **J**

Pharmacol Exp Ther, v. 242, n. 2, p. 552-7, Aug 1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3039120> >.

CUI, M. et al. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, n. 2, p. 868-76, May 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215665> >.

DEAKIN, J. F.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defence. **J Psychopharmacol**, v. 5, n. 4, p. 305-15, Jan 1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282829> >.

DHARMSHAKTU, P.; TAYAL, V.; KALRA, B. S. Efficacy of antidepressants as analgesics: a review. **J Clin Pharmacol**, v. 52, n. 1, p. 6-17, Jan 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415285> >.

ELLIOTT, A. M. et al. The course of chronic pain in the community: results of a 4-year follow-up study. **Pain**, v. 99, n. 1-2, p. 299-307, Sep 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12237208> >.

FERNANDEZ, E.; TURK, D. C. Sensory and affective components of pain: separation and synthesis. **Psychol Bull**, v. 112, n. 2, p. 205-17, Sep 1992. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1454892> >.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I.; HEINRICHER, M. M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: MCMAHON, S. B. e KOLTZENBURG, M. (Ed.). **Wall & Melzack's Textbook of pain**. 5a. ed. Philadelphia, USA: Elsevier, 2006. p.125-42.

FIGUEIREDO, H. F. et al. Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5249-58, Dec 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960031> >.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v. 150, n. 3, p. 573-81, Sep 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705215> >.

GARCIA, A. M.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiol Behav**, v. 85, n. 3, p. 265-70, Jun 30 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927214> >.

GOMES, K. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductal gray in the elevated plus-maze test-retest paradigm in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 33, n. 7, p. 1261-9, Oct 1 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19625008> >.

GRAEFF, F. G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 3, p. 239-59, May 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225969> >.

GRAEFF, F. G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 1, p. 129-41, May 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8728550> >.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H., JR. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, n. 2, p. 237-46, 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9884116> >.

HONDA, M. et al. Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, exerts its antiallodynic effects on neuropathic pain in mice via 5-HT_{2A/2C} receptors. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 4, p. 866-72, Sep 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16846619> >.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 4, p. 533-54, Apr 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11888546> >.

JENSEN, T. S. et al. A new definition of neuropathic pain. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2204-5, Oct 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764514> >.

JONES, K. L. et al. Identification of discrete sites of action of chronic treatment with desipramine in a model of neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 2, p. 405-13, Feb 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930746> >.

KAVALIERS, M.; CHOLERIS, E. Sex differences in N-methyl-D-aspartate involvement in kappa opioid and non-opioid predator-induced analgesia in mice. **Brain Res**, v. 768, n. 1-2, p. 30-6, Sep 12 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9369297> >.

KAVALIERS, M.; COLWELL, D. D.; PERROT-SINAL, T. S. Opioid and non-opioid NMDA-mediated predator-induced analgesia in mice and the effects of parasitic infection. **Brain Res**, v. 766, n. 1-2, p. 11-8, Aug 22 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9359582> >.

KIRMAYER, L. J. et al. Somatization and the recognition of depression and anxiety in primary care. **Am J Psychiatry**, v. 150, n. 5, p. 734-41, May 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8480818> >.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat Med**, v. 16, n. 11, p. 1258-66, Nov 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20948531> >.

KUPERS, R. et al. Photochemically-induced ischemia of the rat sciatic nerve produces a dose-dependent and highly reproducible mechanical, heat and cold allodynia, and signs of spontaneous pain. **Pain**, v. 76, n. 1-2, p. 45-59, May 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9696458> >.

LEE, K. S.; HUANG, Y. H.; YEN, C. T. Periaqueductal gray stimulation suppresses spontaneous pain behavior in rats. **Neurosci Lett**, v. 514, n. 1, p. 42-5, Apr 11 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22390899> >.

LIU, F. Y. et al. Decrease in the descending inhibitory 5-HT system in rats with spinal nerve ligation. **Brain Res**, v. 1330, p. 45-60, May 12 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230801> >.

LIU, Z. Y. et al. Involvement of 5-hydroxytryptamine(1A) receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. **Neuroscience**, v. 112, n. 2, p. 399-407, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044457> >.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, Jul 31 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18583048> >.

MATSUZAWA-YANAGIDA, K. et al. Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 8, p. 1952-65, Jul 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17957217> >.

MCWILLIAMS, L. A.; COX, B. J.; ENNS, M. W. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. **Pain**, v. 106, n. 1-2, p. 127-33, Nov 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581119> >.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Res**, v. 1047, n. 1, p. 97-104, Jun 14 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15893297> >.

_____. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation. **Behav Brain Res**, v. 203, n. 2, p. 180-7, Nov 5 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410607> >.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, n. 1, p. 1-164, Jan 1999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9987804> >.

MYERS, R. R.; CAMPANA, W. M.; SHUBAYEV, V. I. The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. **Drug Discov Today**, v. 11, n. 1-2, p. 8-20, Jan 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478686> >.

NAKAE, A. et al. Serotonin_{2C} receptor mRNA editing in neuropathic pain model. **Neurosci Res**, v. 60, n. 2, p. 228-31, Feb 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18045717> >.

NAKAI, K. et al. 5-HT_{2C} receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Eur J Pain**, v. 14, n. 10, p. 999-1006, Nov 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20488736> >.

NARITA, M. et al. Change in the expression of c-fos in the rat brain following sciatic nerve ligation. **Neurosci Lett**, v. 352, n. 3, p. 231-3, Dec 11 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625026> >.

NASHOLD, B. S., JR.; WILSON, W. P.; SLAUGHTER, D. G. Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. **J Neurosurg**, v. 30, n. 1, p. 14-24, Jan 1969. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4885810> >.

NICKEL, F. T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 81-91, Feb 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672666> >.

NITANDA, A. et al. Contribution of the peripheral 5-HT_{2A} receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem Int**, v. 47, n. 6, p. 394-400, Nov 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051396> >.

NUNES-DE-SOUZA, R. L. et al. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 150, n. 3, p. 300-10, Jun 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10923758> >.

NUNES-DE-SOUZA, V. et al. Blockade of 5-HT₂ receptors in the periaqueductal grey matter (PAG) abolishes the anxiolytic-like effect of 5-HT_{1A} receptor antagonism in the median raphe nucleus in mice. **Behav Brain Res**, v. 225, n. 2, p. 547-53, Dec 1 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839779> >.

NUNES-DE-SOUZA, V. et al. 5-HT₂ receptor activation in the midbrain periaqueductal grey (PAG) reduces anxiety-like behaviour in mice. **Behav Brain Res**, v. 187, n. 1, p. 72-9, Feb 11 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17935799> >.

OBATA, H. et al. Antiallodynic effects of intrathecally administered 5-HT_{2C} receptor agonists in rats with nerve injury. **Pain**, v. 108, n. 1-2, p. 163-9, Mar 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109520> >.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21041960> >.

PALANZA, P.; GIOIOSA, L.; PARMIGIANI, S. Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance. **Physiol Behav**, v. 73, n. 3, p. 411-20, Jun 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438369> >.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. Elsevier Science, 2001.

PEDERSEN, L. H.; NIELSEN, A. N.; BLACKBURN-MUNRO, G. Anti-nociception is selectively enhanced by parallel inhibition of multiple subtypes of monoamine transporters in rat models of persistent and neuropathic pain. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 182, n. 4, p. 551-61, Nov 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16133135> >.

POBBE, R. L. et al. Involvement of dorsal raphe nucleus and dorsal periaqueductal gray 5-HT receptors in the modulation of mouse defensive behaviors. **Eur**

Neuropsychopharmacol, v. 21, n. 4, p. 306-15, Apr 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570114> >.

REN, L. Q. et al. The time course of serotonin 2C receptor expression after spinal transection of rats: an immunohistochemical study. **Neuroscience**, v. 236, p. 31-46, Apr 16 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23337537> >.

RHUDY, J. L.; MEAGHER, M. W. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. **Pain**, v. 84, n. 1, p. 65-75, Jan 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601674> >.

ROY, V. et al. Environmental enrichment in BALB/c mice: effects in classical tests of anxiety and exposure to a predatory odor. **Physiol Behav**, v. 74, n. 3, p. 313-20, Oct 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714494> >.

SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H. R.; NUNES DE SOUZA, R. L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 481-90, Winter 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2287485> >.

SINDRUP, S. H. et al. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 96, n. 6, p. 399-409, Jun 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910402> >.

SMITH, H. S. Opioids and neuropathic pain. **Pain Physician**, v. 15, n. 3 Suppl, p. ES93-110, Jul 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22786465> >.

SOMMER, C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. **Mol Neurobiol**, v. 30, n. 2, p. 117-25, Oct 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475622> >.

SOMMER, C.; SCHAFERS, M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. **Brain Res**, v. 784, n. 1-2, p. 154-62, Feb 16 1998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518588> >.

SUGIMOTO, T.; BENNETT, G. J.; KAJANDER, K. C. Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine. **Pain**, v. 42, n. 2, p. 205-13, Aug 1990. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2247318> >.

SUZUKI, T. et al. Experimental neuropathy in mice is associated with delayed behavioral changes related to anxiety and depression. **Anesth Analg**, v. 104, n. 6, p. 1570-7, table of contents, Jun 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513660> >.

TORRANCE, N. et al. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. **J Pain**, v. 7, n. 4, p. 281-9, Apr 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618472> >.

TUNKS, E. R.; CROOK, J.; WEIR, R. Epidemiology of chronic pain with psychological comorbidity: prevalence, risk, course, and prognosis. **Can J Psychiatry**, v. 53, n. 4, p. 224-34, Apr 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478825> >.

UEDA, H. Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. **Mol Pain**, v. 4, p. 11, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18377664> >.

VOGEL, C. et al. Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice. **J Neurosci**, v. 23, n. 2, p. 708-15, Jan 15 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12533631> >.

YAMASHITA, P. S.; DE BORTOLI, V. C.; ZANGROSSI, H., JR. 5-HT_{2C} receptor regulation of defensive responses in the rat dorsal periaqueductal gray.

Neuropharmacology, v. 60, n. 2-3, p. 216-22, Feb-Mar 2011. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20850460> >.

YANG, M. et al. The rat exposure test: a model of mouse defensive behaviors. **Physiol Behav**, v. 81, n. 3, p. 465-73, May 2004. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15135018> >.

ZHAO, Z. Q. et al. Mice lacking central serotonergic neurons show enhanced inflammatory pain and an impaired analgesic response to antidepressant drugs. **J Neurosci**, v. 27, n. 22, p. 6045-53, May 30 2007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537976> >.

ZHAO, Z. Q. et al. Central serotonergic neurons are differentially required for opioid analgesia but not for morphine tolerance or morphine reward. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 36, p. 14519-24, Sep 4 2007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17724336> >.