



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

**MODULAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT_{1A} E
5-HT_{2C} DO COMPLEXO AMIGDALÓIDE SOBRE OS EFEITOS DA
FLUOXETINA NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO
CONFINAMENTO DE CAMUNDONGOS AOS BRAÇOS DO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Lígia Renata Rodrigues Tavares

**SÃO CARLOS, SP
2016**



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

**MODULAÇÃO DOS RECEPTORES 5-HT_{1A} E
5-HT_{2C} DO COMPLEXO AMIGDALÓIDE SOBRE OS EFEITOS DA
FLUOXETINA NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO
CONFINAMENTO DE CAMUNDONGOS AOS BRAÇOS DO
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
Coorientação: Pós-Doutoranda Daniela Baptista de Souza**

**SÃO CARLOS, SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T231m Tavares, Ligia Renata Rodrigues
Modulação dos receptores 5-HT1A e 5-HT2C DO
complexo amigdalóide sobre os efeitos da fluoxetina
na antinocicepção induzida pelo confinamento de
camundongos aos braços do labirinto em cruz elevado /
Ligia Renata Rodrigues Tavares. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
60 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Antinocicepção. 2. Serotonina. 3. Fluoxetina.
4. Amígdala. 5. Camundongos. I. Título.

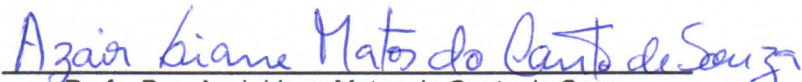


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

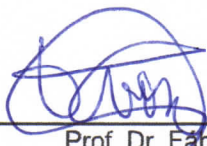
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

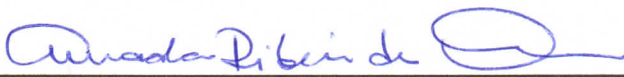
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ligia Renata Rodrigues Tavares, realizada em 23/03/2016:



Prof. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
UFSCar



Prof. Dr. Fabio Cardoso Cruz
IFSC/USP



Prof. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira
UFSCar

Ao meu querido avô João Rodrigues da Cruz,
que embora ausente sempre estará presente
em minhas lembranças e em meu coração.

*A morte não é nada.
Eu somente passei
para o outro lado do Caminho.*

*Eu sou eu, vocês são vocês.
O que eu era para vocês,
eu continuarei sendo.*

*Me dêem o nome
que vocês sempre me deram,
falem comigo
como vocês sempre fizeram.*

*Vocês continuam vivendo
no mundo das criaturas,
eu estou vivendo
no mundo do Criador.*

*Não utilizem um tom solene
ou triste, continuem a rir
daquilo que nos fazia rir juntos.*

*Rezem, sorriam, pensem em mim.
Rezem por mim.*

*Que meu nome seja pronunciado
como sempre foi,
sem ênfase de nenhum tipo.
Sem nenhum traço de sombra
ou tristeza.*

*A vida significa tudo
o que ela sempre significou,
o fio não foi cortado.
Porque eu estaria fora
de seus pensamentos,
agora que estou apenas fora
de suas vistas?*

*Eu não estou longe,
apenas estou
do outro lado do Caminho...*

*Você que aí ficou, siga em frente,
a vida continua, linda e bela
como sempre foi.*

- Santo Agostinho -

Agradecimentos

À Deus, ao nosso Senhor Jesus Cristo e a Santa Rita de Cássia, por me amparar nos momentos difíceis, me dar forças e mostrar o caminho para superar as dificuldades.

À professora Profa Dra Azair, por abrir as portas de seu laboratório e acreditar em mim, quando muitos descreditaram. Por sua orientação, atenção e paciência. Muito obrigada por tudo.

À pós-doutoranda Daniela, pela co-orientação, por me mostrar e auxiliar a desvendar os mistérios da ciência. Por nossas conversas, por seu companheirismo e amizade. Sou imensamente grata por sua ajuda.

À banca examinadora da minha qualificação, por seus ensinamentos, colaborações e sugestões de grande valia para este trabalho.

À minha amiga e técnica do laboratório, Lara, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis, na hora do choro, das risadas, das gordices e passeios. Você esteve comigo sempre. Obrigada e desculpe-me por tudo.

Aos meus amigos de laboratório Aura, Caroline, Elke, Isabela, Kairo, Lucas, Marília, Rimenez e Vítor, por todos os auxílios, pelas conversas, por todas as gordices e por sempre estarem ao meu lado dando força e apoio. Sou eternamente grata por todos os ensinamentos.

À Tatiani, por sua amizade, companheirismo e auxílio nos momentos em que parecia não haver luz. Você me mostrou o caminho. Muito obrigada.

Aos meus amigos do laboratório de Farmacologia-UNESP em Araraquara, Lucas e Willian, por nossas horas de estudo, nossas conversas, nossos passeios, nossa viagem ao Rio de Janeiro. Obrigada pelo apoio e por acreditarem em mim.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo. Especialmente ao meu pai e minha mãe, por me oferecerem a oportunidade de estudar. Obrigada por permitirem que meu sonho se tornasse realidade.

Ao meu querido namorado, noivo e futuro marido Fabio, por sempre me incentivar e estar o tempo todo ao meu lado, incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Este desafio nos fortaleceu ainda mais. Muito obrigada por tudo.

À Ana Paula, Osmara e a todos os meus amigos pelo apoio e incentivo incondicional.

Ao Alexandre pela competência profissional na secretaria do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

EPÍGRAFE

*“Existe no silêncio
uma profunda sabedoria
que às vezes ele se transforma
na mais profunda resposta”*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Vias neurais da dor.....	12
1.2. Modulação da nocicepção.....	14
1.3. Amígdala.....	16
1.4. Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	18
1.5. Sistema Serotonérgico.....	19
1.6. Serotonina e Nocicepção.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODO.....	25
3.1. Sujeitos.....	26
3.2. Ética.....	26
3.3. Drogas.....	26
3.4. Cirurgia e Microinjeção.....	26
3.5. Labirinto em Cruz Elevado.....	27
3.6. Teste Nociceptivo.....	28
3.7. Histologia.....	28
3.8. Delineamento Experimental.....	29
3.8.1. Experimento 1.....	29
3.8.2. Experimento 2.....	29
3.8.3. Experimento 3.....	30
3.8.4. Experimento 4.....	30
3.9. Análise Estatística.....	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Histologia.....	33
4.2. Experimento 1.....	34
4.3. Experimento 2.....	35
4.4. Experimento 3.....	36
4.5. Experimento 4.....	37

5.	DISCUSSÃO.....	39
6.	CONCLUSÕES.....	47
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
Anexo 1.....		60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Labirinto em Cruz Elevado.....28
- Figura 2:** (A) Esquema de seções coronais representando alguns dos sítios de injeção na amígdala de camundongos. Os círculos em preto representam as áreas de infusão da droga na estrutura-alvo. Os círculos em cinza representam sítios de injeção fora da estrutura-alvo (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). O número de círculos é inferior ao número de acertos devido à sobreposição dos pontos. (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando um sítio de injeção na amígdala de um camundongo. As secções ocorreram a -1,06mm posterior ao bregma.....34
- Figura 3:** Efeito do 8-OH-DPAT, administrado intra-amígdala sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=10-12). As barras representam as médias e o erro padrão da media (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.....34
- Figura 4.** Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mk/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-amígdala de 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da media (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado.* $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle.....35
- Figura 5:** Efeito do MK-212, administrado intra-amígdala sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=8-13). As barras representam as médias e o erro padrão da media (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.....36
- Figura 6:** Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mk/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-amígdala de MK-212 (0,63 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da media (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado.* $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. $1P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo salina+MK-212.....37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais formados no Experimento 1	29
Tabela 2. Grupos experimentais formados no Experimento 2	30
Tabela 3. Grupos experimentais formados no Experimento 3.....	30
Tabela 4. Grupos experimentais formados no Experimento 4.....	31

Resumo

Estudos têm demonstrado que os subtipos de receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} e 5HT_{2C} localizados na amígdala estão envolvidos na modulação de comportamentos defensivos avaliados em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado (LCE). Além disso, evidências demonstram que a exposição a situações ameaçadoras podem resultar em inibição da dor. Este estudo avaliou os efeitos da fluoxetina sobre a modulação da nocicepção pelos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} da amígdala em camundongos confinados nos braços abertos (BA) e fechados (BF) do LCE. Camundongos machos da linhagem suíço-albino receberam 0,1ul de injeções intra-amígdala de 8-OH-DPAT (agonista do receptor 5HT_{1A}) nas doses de 5,6 ou 10 nmol e em seguida, uma injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo), 0,6% (0,1 ml/10g por peso corpóreo, i.p.). Após a confirmação do início das contorções, os camundongos foram confinados no BA ou BF do LCE durante 5 minutos para o registro do número de contorções abdominais (Experimento 1). Este protocolo sucedeu-se para os demais experimentos. Subsequentemente, os animais receberam injeções combinadas de fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c.) e 10 nmol de 8-OH-DPAT intra-amígdala (Experimento 2). No experimento 3, os animais receberam injeções intra-amígdala de 0,21 ou 0,63mol de MK-212 (agonista do receptor 5-HT_{2C}) e injeções combinadas de fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c.) e 0,63nmol de MK-212 intra-amígdala (Experimento 4). Os nossos resultados mostraram que as injeções intra-amígdala de 8-OH-DPAT acentuaram a nocicepção nos animais confinados em ambos os braços do LCE. A administração combinada de fluoxetina, e 8-OH-DPAT intra-amígdala não alterou os efeitos observados deste agonista do receptor 5HT_{1A}. A microinjeção de MK-212 aumentou a antinocicepção induzida pelo BA, enquanto a administração combinada de fluoxetina e MK-212 intra-amígdala reverteu o aumento da antinocicepção induzida pelo BA observado com a microinjeção de MK-212 intra-amígdala. Estes resultados mostram que a antinocicepção induzida pelo BA do LCE pode ser mediada tanto pelos receptores 5-HT_{1A} como por receptores 5-HT_{2C} localizados na amígdala de camundongos. Entretanto, o bloqueio do aumento da antinocicepção induzida por situações aversivas promovido pela fluoxetina ocorreu apenas na interação com os receptores 5-HT_{2C}.

Palavras-chave: Antinocicepção, Labirinto em cruz elevado, Serotonina, Fluoxetina, Amígdala, Camundongos.

Abstract

Previous studies have implicated the 5HT_{1A} and 5HT_{2C} serotonin receptors subtypes located within the amygdala in the modulation of defensive behaviors in rodents exposed to the elevated plus-maze (EPM). Further studies have shown that exposure to a threatening stimulus can result in pain inhibition. This study evaluated the effects of intra-amygdala injections of 5HT_{1A} and 5HT_{2C} receptor agonists on open arms antinociception (OAA) in the EPM, and possible alterations of this response with concomitant fluoxetine treatment. Male Swiss mice received 0.1 µl intra-amygdala injections of either 5.6 or 10 nmol of 8-OHDPAT, a 5-HT_{1A} receptor agonist, and an i.p. injection of 0.6% acetic acid, a nociceptive stimulus. After confirming the start of writhing, half of the animals in each group were confined to the OA and half to the EA of the EPM, to record the number of writhes during a five-minute period (Experiment 1) A similar experimental protocol was repeated in the experiments described below. Subsequently, the animals received combined injections of fluoxetine (2.5mg/kg) and 10 nmol of 8-OHDPAT (Experiment 2). In Experiment 3, the animals received injections of either 0.21 or 0.63 nmol of MK-212, a 5-HT_{2C} receptor agonist, and combined injections of fluoxetine (2.5mg/kg) and 0.63 nmol of MK-212 (Experiment 4). Our results showed that intra-amygdala infusions of 8-OH-DPAT enhanced nociception in both arms. Combined administration of fluoxetine and 8-OH-DPAT did not alter the observed effects. Injection of MK-212 increased the OAA, while combined administration of fluoxetine and MK-212 reversed the increase in OAA observed with MK-212 injection. These findings suggest that OAA is mediated by 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors located in the amygdala. Fluoxetine interacted with 5-HT_{2C} receptors, blocking the increase of OAA induced by activation of this serotonin receptor subtype.

Keywords: Antinociception, Elevated plus-maze, Serotonin, Fluoxetine, Amygdala, Mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1. VIAS NEURAIS DA NOCICEPÇÃO

A palavra dor pode ser utilizada para descrever uma variedade de sensações e aspectos emocionais associados a um tipo de injúria sofrida em decorrência de um ferimento, ou até sensações anormais de síndromes neuropáticas (CERVERO, 2000). De acordo com a Associação Internacional para Estudos da Dor (do inglês: International Association for the Study of Pain – IASP, 2012) “A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano potencial de fato, ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano”.

Em processos relacionados à sobrevivência, a dor apresenta valor adaptativo, e muitas vezes sofre interferência de eventos que não envolvem somente a transmissão dos estímulos nociceptivos, mas também do seu processamento sensorial e emocional (HUYSER; PARKER, 1999; MILLAN, 1999). Desta maneira, devido a sua natureza essencialmente desagradável, a dor tem a função adaptativa de alarme, que impele o indivíduo a evitar e a reconhecer objetos e situações que possam causá-la, prevenindo o agravamento ou o surgimento de novas lesões (MELZACK E WALL, 1991), alertando sobre estímulos que podem provocar lesão tecidual (estímulos nocivos), permitindo assim que sejam adotados mecanismos de defesa ou fuga (MILLAN, 1999).

Embora seja desagradável, a dor é importante para a sobrevivência de vários animais, uma vez que se trata de um mecanismo de aviso sobre a ocorrência de estímulos lesivos resultantes do meio externo ou do próprio organismo (LENT, 2001). Nessa concepção, a dor é considerada uma ocorrência multifatorial, cuja sensação e percepção encontram variações para cada indivíduo, de acordo com as influências de fatores biológicos, psicológicos e sociais, o que leva a uma impossibilidade de uma relação direta e proporcional entre dor e lesão tecidual (MELZACK E WALL, 1991).

Portanto, a dor é uma experiência consciente composta pela interação de componentes discriminativos, que permite ao indivíduo reconhecer o estímulo como doloroso e localizar em qual região do corpo está e, afetivo-emocional e cognitivos, que compreende uma série de respostas defensivas, que vão desde a retirada de um membro até respostas emocionais complexas, como situações de luta ou fuga, visando assim, a autopreservação (BASBAUM; FIELDS, 1984).

No fim do século XIX, sugeriu-se a existência de nociceptores, receptores sensoriais capazes de detectar lesão tecidual ou estímulos potencialmente nocivos. Após detecção do estímulo por estes nociceptores, a informação nociceptiva seria conduzida para o

sistema nervoso central (SNC), onde seria interpretada. Posteriormente, constatou-se que a existência de nociceptores não seria apenas na pele, mas também em mucosas, membranas e órgãos viscerais (MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990).

Os nociceptores podem ser definidos como receptores sensoriais que são ativados por estímulos nocivos e, apresentam-se como terminações nervosas livres equivalentes a parte mais distal de um neurônio aferente de primeira ordem (MESSLINGER, 1997). Essas fibras nervosas são classificadas com base em seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução. As fibras mielinizadas A-delta, são de maior calibre (2-6 μm de diâmetro) e conduzem estímulos nocivos térmicos e mecânicos com uma velocidade em torno de 5 a 30 m/s. A ativação das fibras A-delta promove uma sensação de dor cortante e bem localizada. As fibras do tipo C, são amielinizadas, de menor calibre (0,4-1,2 μm de diâmetro), de baixa velocidade de condução (menor que 2 m/s), são conhecidas como nociceptores polimodais, pois respondem tanto a estímulos nocivos, mecânicos, térmicos (acima de 45°C) e químicos de alta intensidade, e a estímulos não nocivos, como o toque, estímulo mecânico leve ou até mesmo alodinia, causada por um estímulo que normalmente não produziria dor (WILLIS, 1985; MILLAN, 1999).

Estas fibras chegam de uma maneira altamente organizada no corno dorsal da medula espinal, através da divisão lateral da raiz posterior dos nervos espinais. As fibras A-delta e C dividem-se e avançam, ascendente ou descendente, de um a três segmentos espinais. Os corpos celulares dos neurônios que recebem as primeiras aferências nociceptivas situam-se no corno dorsal da medula nas zonas mais superficiais. As lâminas I e II recebem fibras C e algumas fibras A-delta. Outras fibras A-delta penetram mais profundamente no corno dorsal (lâmina V). As células presentes nas lâminas I e V dão origem as principais vias de projeção do corno dorsal para o tálamo (KANDELL et al., 2000). Os

neurotransmissores envolvidos nas aferências nociceptivas primárias são diversos, particularmente, a substância P, somatostatina, glutamato, entre outras substâncias e sensibilizam os nociceptores que são responsáveis pela hiperalgesia e pela vasodilatação observadas em lesões (MEYER et al., 2006; TEIXEIRA, 2006) e parecem ser transmissores das aferências primárias ou facilitadores da expressão de estímulos nociceptivos (FURST, 1999). Com isso, após uma lesão, a dor é transmitida até o corno dorsal através destas fibras aferentes primárias, sendo conduzida até o encéfalo por projeções ascendentes da dor que são amplamente complexas (MILLAN, 1999).

Atualmente, são conhecidas as seguintes vias ascendentes da dor: trato espino-talâmico, trato espino-mesencefálico, espino-parabraquial, espino-hipotalâmico e trato espino-reticular (MILLAN, 1999). Dentre elas, os tratos espino-talâmico, espino-reticular e espino-mesencefálico têm sido considerados as vias mais importantes na transmissão aferente da informação nociceptiva (WILLIS, 1985).

O trato espino-talâmico envolve o feixe neo-espino-talâmico, mais recente evolutivamente e o trato espino-reticular envolve o feixe paleo-espino-talâmico, mais antigo evolutivamente. Há evidências de que as projeções do trato paleo-espino-talâmico e do feixe espino-reticular estejam mais envolvidas nos aspectos afetivo-emocionais da dor do que em seu caráter sensorio-discriminativo (PRICE; DUBNER, 1977).

Neste sentido, enquanto projeções ascendentes processam a transmissão da dor para estruturas superiores do SNC, vias descendentes inibitórias da modulação da dor fazem o caminho inverso das projeções ascendentes e levam a inibição da nocicepção. Além do sistema inibitório descendente da dor, evidências demonstram a existência de um sistema facilitatório da nocicepção (BOLLES; FANSELOW, 1980).

Portanto, o sistema modulador da nocicepção através das vias descendentes exerce um controle bidirecional, sendo recrutado para suprimir respostas a estímulos nociceptivos em situações caracterizadas por ameaça de lesão ou estresse (BOLLES; FANSELOW, 1980), ou contribuindo para o aumento da resposta nociceptiva em várias condições como uma estimulação nociva prolongada, inflamação, injúria de nervos, entre outros. Estas vias inibitórias e facilitatórias, são tonicamente ativas, porém a modulação entre estas vias pode ser constantemente modificada em diferentes estados emocionais, comportamentais e patológicos (HEINRICHER et al., 2009).

Parte das estruturas envolvidas na modulação facilitatória e inibitória da dor são as mesmas (HEINRICHER et al., 2009), com isso, a modulação da nocicepção recebe impulsos diretos e indiretos de vias envolvidas com a transmissão da nocicepção, através de conexões com o hipotálamo, estruturas límbicas, como amígdala, substância cinzenta periaquedutal (SCP), córtex cingulado anterior e insula anterior, proporcionando um mecanismo em que fatores como situações de alerta, expectativa e atenção podem regular o processamento da transmissão nociceptiva (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

1.2. MODULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO

As projeções ascendentes enviam as informações nociceptivas para estruturas superiores do SNC, enquanto que as vias inibitórias descendentes modulam de modo distinto estas informações e levam a inibição da nocicepção até a medula. O mecanismo envolvido na inibição da dor tem sido alvo de alguns estudos desde a descoberta de que a ativação de estruturas límbicas acarreta em inibição da nocicepção (KELLY, 1986; RODGERS, 1995).

A partir desta informação, evidências demonstram que a nocicepção é considerada um mecanismo de demarcação de limites, importante para a manutenção da vida de muitos animais, pois estes quando são confrontados com ameaças ao seu bem estar, a integridade física ou à sobrevivência, além de exibirem respostas comportamentais, como fuga, luta, congelamento, vocalização e também respostas neurovegetativas, como taquicardia, hipertensão e defecação, denominados comportamentos recuperativos (KELLY, 1986; RODGERS, 1995), apresentam também uma diminuição na percepção da dor ou antinocicepção (KELLY, 1986; RODGERS, 1995).

Visto que os estímulos nociceptivos proporcionam um conjunto de reflexos de retirada, fuga e repouso e outros comportamentos recuperativos, a nocicepção apresenta claro valor adaptativo, permitindo ao animal exibir reações defensivas, como congelamento, luta e fuga, mesmo que uma lesão tenha ocorrido, aumentando assim, suas chances de sobrevivência (BOLLES; FANSELOW, 1980).

Neste contexto se insere a importância do controle inibitório descendente da nocicepção, um importante mecanismo em que a interação entre processos induzidos por estímulos nociceptivos e por estímulos de medo pode levar à sua inibição ou à analgesia (CANTO-DE-SOUZA et al., 1998; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009; MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2009; BAPTISTA et al., 2012), ressaltando que dor e os transtornos emocionais apresentam relações recíprocas, sendo que o medo e o estresse inibem ou diminuem a sensibilidade à dor (HAYTHORNTHWAITE; SIEBER; KERNS, 1991; RHUDY; MEAGHER, 2003), evidenciando assim a importância deste estudo.

Evidências sugestivas de que estados emocionais aversivos [ex., choque nas patas (FANSELOW, 1984)] inibem a dor foram intensamente investigadas por Bolles e Fanselow (BOLLES; FANSELOW, 1980). Estes autores sugeriram que esta inibição está relacionada à ativação de mecanismos analgésicos endógenos. Com a descoberta dos opióides endógenos, muitos modelos animais vêm sendo desenvolvidos e empregados no estudo da resposta nociceptiva, com a principal finalidade de selecionar drogas analgésicas que se

mostrem mais eficazes para o tratamento da dor em humanos (FRAZER; HARRIS, 1967; SHIH et al, 2008).

A antinocicepção induzida pelo medo é considerada um componente das reações de defesa. Sem a existência de um sistema de inibição das transmissões nociceptivas, os animais, ao entrarem em confronto com um predador, não poderiam adquirir comportamentos de recuperação, induzidos pelo sofrimento, ao invés de apresentarem comportamentos defensivos, induzido pelo medo, podendo mostrar a sua fragilidade a futuras injúrias e possivelmente à morte (FANSELON; BOLLES, 1979).

Evidências substanciais sugerem que a alteração da resposta neural comportamental e subjetiva da dor por estímulos sensoriais concomitantes e por situações de alerta, expectativa e atenção é consequência da ativação de redes no SNC que modulam a transmissão nociceptiva. Neste sentido, indivíduos que sofreram alguma injúria traumática durante competições ou combates frequentemente relatam ausência de dor, apesar de esse mesmo dano ser extremamente doloroso em outras circunstâncias (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

A exposição a situações ameaçadoras de natureza inata ou aprendida acarreta na exibição de um repertório de comportamentos defensivos espécie-específicos, alterações autonômicas e em inibição da dor, sendo concomitantemente relacionado às reações de extrema importância para a sobrevivência de uma espécie (DEAKIN; GRAEFF, 1991). Embora tenha sido demonstrada a existência de uma relação recíproca entre dor e distúrbios afetivos em modelos animais (BOCCALON et al., 2006; NARITA et al., 2006; HASNIE et al., 2007; BENBOUZID et al., 2008), poucos estudos têm demonstrado quais os mecanismos envolvidos na modulação da ansiedade/medo sobre a nocicepção.

1.3. COMPLEXO AMIGDALÓIDE

Uma variedade de funções tem sido atribuída à amígdala, entre elas os processos relacionados à memória, atenção, interpretação do significado emocional de estímulos sensoriais, elaboração e produção de reações emocionais de medo (LEDOUX, 2000). A amígdala faz parte do sistema límbico proposto por MacLean, 1949, porém não era considerada uma área límbica importante até meados da década de 1930. Neste período demonstrou-se sua importância para a síndrome de Kluver-Bucy, distúrbio comportamental que ocorre quando ambos os lobos temporais, esquerdo e direito do cérebro, não funcionam adequadamente (BUCY; KLUVER, 1937, 1938). A região amigdalóide encefálica foi

identificada no século XIX por Burdach (1819-1822), sendo nomeada, de acordo com a língua grega, devido à sua semelhança a uma estrutura em formato de amêndoa, área hoje reconhecida como composta de subnúcleos ao invés de uma região inteira (SWANSON; PETROVICH, 1998).

A amígdala é composta de grupos heterogêneos e complexos de núcleos e áreas corticais, localizando-se bilateralmente ao lobo temporal anterior do encéfalo, próximo à formação hipocampal (AMARAL; BASSET, 1989; AMARAL; INSAUSTI, 1992).

A presença de uma via comum entre a SCP e a amígdala sugere uma modulação do complexo amigdalóide com as áreas límbicas e a SCP (GRAEFF et al., 1993; SAH et al., 2003), sendo possível a ocorrência de uma interação entre o complexo amigdalóide e a SCP dorsal, compondo assim uma das principais estruturas a expressarem as reações de defesa (LEDOUX, 1993; RIZVI et al., 1991; GRAEFF, 1993). Fanselow (1991), sugere que a amígdala teria a função de avaliar o grau de ameaça dos vários estímulos que indicam o perigo, processando e enviando essas informações para a SCP, a qual seria responsável por organizar devidamente a resposta comportamental defensiva.

As informações sensoriais alcançam a amígdala principalmente através do núcleo lateral, e tem-se o núcleo central como via de saída dessas informações já processadas pelos outros núcleos amigdalóides, tais como o núcleo basolateral. Informações polimodais, altamente processadas, de relevância afetiva e cognitiva alcançam a amígdala via tálamo e áreas corticais superiores (SHI; DAVIS, 1999; LEDOUX, 2000). Através de prolongamentos das vias do sistema espinohipotálâmico e espinotalâmico, o circuito correspondente ao núcleo lateral, basolateral e central recebe informações referentes à dor provenientes do tálamo e córtex insular (MILLAN, 1999; SHI; DAVIS, 1999; LEDOUX, 2000). Outra evidência também demonstra que aferências nociceptivas diretas vindas da medula espinal e do tronco encefálico inervam a amígdala (NEUGEBAUER et al, 2004).

Através destas informações aferentes nociceptivas, estudos indicam que a amígdala está envolvida em um papel importante no processamento central da dor, sendo que esta estrutura límbica participa da via ascendente e descendente da dor, por ser uma estrutura encefálica que recebe, integra e modula as informações nociceptivas (NEUGEBAUER et al., 2004). Considerada como um substrato neural de interações entre dor e emoção, é considerada amígdala nociceptiva (HEINRICHER; McGARAUGHTY, 1999; FIELDS, 2000; MEAGHER et al., 2000), além de estar implicada na modulação da nocicepção através do aumento da dor

(hiperalgesia) e da diminuição da dor (hipoalgesia ou analgesia), executando um papel crucial no controle inibitório descendente da dor (NEUGEBAUER et al., 2004).

A amígdala, um complexo subcortical de núcleos, tem se mostrado envolvida no mecanismo da antinocicepção induzida pelo medo, além de ser um complexo de interface entre os estímulos sensoriais e emocionais (LEDOUX, 1989). Além disso, evidências tem demonstrado que a estimulação desta estrutura pode induzir reações de medo ou ansiedade (DAVIS, 1992), acompanhada por analgesia (HELMSTETTER; BELLGOWAN, 1993), preconizando assim sua participação no sistema de defesa e na modulação da nocicepção. Nesse sentido, Myers et al. (MYERS et al., 2007) demonstraram que a ativação do núcleo central da amígdala aumenta a resposta visceromotora ao teste de distensão colorretal, enquanto a desativação deste mesmo núcleo atenuou as respostas afetivo-emocionais relacionadas à dor (NEUGEBAUER et al., 2009), sugerindo que a amígdala processa os estímulos nociceptivos aferentes e participa tanto da modulação do componente sensorial como do componente emocional da dor.

1.4. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Entre as formas de antinocicepção induzida por estímulos ambientais, a antinocicepção desencadeada por estímulos de respostas ao medo é amplamente estudada e com isso tem-se desenvolvidos vários testes para esta finalidade (BOLLES; FANSELOW, 1980). Neste sentido, a procura por modelos animais que permitam avaliar a influência do medo sobre a nocicepção resultou no emprego do teste do labirinto em cruz elevado. O LCE foi originalmente proposto por Handley; Mithani (1984), tendo sido posteriormente validado por métodos farmacológicos, fisiológicos e comportamentais por Pellow et al. (1985) e Lister (1987) para o estudo da ansiedade em ratos e camundongos, respectivamente.

O modelo é também utilizado para avaliar o perfil ansiolítico e ansiogênico de drogas (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005) permitindo avaliar a influência da aversão sobre a nocicepção (STEPHENS et al., 1986; LEE; RODGERS, 1990; CONCEIÇÃO et al., 1992). Assim, Lee e Rodgers (1990) demonstraram que a exposição de camundongos ao LCE desencadeia reações comportamentais defensivas e produz antinocicepção avaliada pelo teste da retirada da cauda (*tail-flick test*).

Em experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, camundongos expostos ao LCE não exibem marcante redução da resposta nociceptiva, verificada pelo teste da formalina. No entanto, quando confinados aos braços abertos do LCE (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009) ou expostos ao LCE aberto (LCEa: com 4 braços abertos) (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; 2009; MENDES-GOMES et al., 2011) verifica-se antinocicepção de elevada magnitude.

O LCEa é similar ao LCE, apresentando os quatro braços abertos, e não permite ao animal esquivar-se do ambiente ameaçador (braços abertos). Além da intensa resposta antinociceptiva, camundongos expostos ao LCEa também apresentam elevadas concentrações de corticosterona plasmática (MENDES-GOMES et al., 2011), confirmando a natureza aversiva deste ambiente e corroborando evidências anteriores que indicam serem os estados emocionais aversivos dependentes do tipo de estressores aos quais estão associados, isto é, se escapáveis ou não (HENRY; STEPHENS, 1977; BLANCHARD et al., 1993; LOVICK, 1993; TESKEY; KAVALIERS, 1995).

As investigações sobre os substratos da resposta antinociceptiva exibida por roedores expostos ao LCE tem mostrado que esse tipo de inibição da dor é insensível às injeções sistêmicas de antagonistas de receptores opióides, quando confinados no BA do LCE (NUNES-de-SOUZA et al., 2000) ou quando expostos ao LCEa (CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009) ou do agonista benzodiazepínico midazolam quando expostos ao LCEa (MENDES-GOMES, NUNES-DE-SOUZA, 2005). Por outro lado, a antinocicepção eliciada pelo confinamento no BA do LCE é atenuada com injeção sistêmica de baixas doses do agonista do receptor 5HT_{1A} da serotonina 8-OH-DPAT (NUNES-de-SOUZA et al., 2000), assim como a injeção intra-amígdala de midazolam (NUNES-de-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009).

1.5. SISTEMA SEROTONÉRGICO

A neurotransmissão serotonérgica origina-se no mesencéfalo, precisamente nos núcleos da rafe, região caracterizada por apresentar alta densidade de corpos neuronais serotonérgicos e projetar aferências para outras áreas do encéfalo. A serotonina é um neurotransmissor abundante no SNC e participa no processo de neuroplasticidade em neurônios serotonérgicos, assim como no processo de desenvolvimento e maturação de

diversos sistemas neuronais (MAZER et al., 1997; WHITAKER; AZMITIA 1986; WHITAKER; AZMITIA et al., 1996).

O sistema serotoninérgico é composto por 15 subtipos que se diferenciam em alguns aspectos como afinidade pela serotonina, por agentes agonistas e antagonistas, localização e disposição nos neurônios pré ou pós-sinápticos (HOYER et al., 2002; HANNON; HOYER, 2008). São divididos em 6 classes de receptores metabotrópicos, ligados a proteína de guanosina (5-HT₁ [5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}], 5-HT₂ [5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}], 5-HT₄, 5-HT₅ [5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}], 5-HT₆ e 5-HT₇) e uma classe de receptor do tipo ionotrópico, ligado ao canal iônico (5-HT₃ [5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}]) (HOYER, HANNON, MARTIN, 2002).

Dentre os diferentes subtipos de receptores existentes, os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} têm sido amplamente estudados com relação à modulação dos processos de ansiedade (DEAKIN et al., 1992; GRAEFF, 1997; MILLAN, 2003), entretanto os estudos envolvendo o papel da serotonina na modulação da dor são marcados por resultados inconsistentes (SOMMER, 2004; 2006).

Os receptores 5-HT_{1A} são localizados especialmente no núcleo central, enquanto que os receptores 5-HT_{2C} são amplamente localizados no núcleo basolateral (LI et al., 1997, 2003). Com isso, na busca pela elucidação do envolvimento dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}, alguns resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa demonstram o complexo papel da serotonina na modulação da ansiedade em camundongos expostos ao LCE, após a administração de agonistas e antagonistas de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} em diferentes estruturas do SNC (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; CANTO-DE-SOUZA et al., 2002; NUNES-DE-SOUZA et al., 2002; CORNELIO; NUNES-DE-SOUZA, 2007; NUNES-DE-SOUZA et al., 2008; MENDES-GOMES et al., 2011).

Os receptores 5-HT_{1A} localizam-se principalmente na região somatodendrítica dos neurônios, são acoplados à proteína de guanosina (Gi/o) que após ativação inibem a adenilato ciclase, reduzindo a formação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), promovendo a abertura dos canais de potássio (hiperpolarização) e inibindo canais de cálcio (ALBERT et al., 1990). Pré-sinápticamente, os receptores 5-HT_{1A} são denominados autorreceptores inibitórios dos neurônios serotoninérgicos e encontram-se no mesencéfalo, mais precisamente nos núcleos dorsal e mediano da rafe, controlando a liberação da serotonina para a fenda sináptica (HANNON; HOYER, 2008). Os receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos são heterorreceptores encontrados mais densamente em neurônios das regiões corticais, núcleo

septal, amígdala e hipocampo podendo modular a liberação de outros neurotransmissores (CELADA; BORTOLOZZI; ARTIGAS, 2013).

Os receptores metabotrópicos 5-HT_{2C}, após ativação aumentam a atividade da fosfolipase C, elevando a concentração intracelular de cálcio (HANNON; HOYER, 2008). Estes receptores são amplamente distribuídos e podem ser encontrados em áreas como córtex cerebral, hipocampo, amígdala, entre outros (HANNON; HOYER, 2008).

Resultados da literatura relacionando a atuação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} localizados na amígdala apresentam dados discrepantes, pois a estimulação desta estrutura com o agonista 8-OH-DPAT provocou efeitos ansiogênicos, porém não atenuou a resposta antinociceptiva em camundongos confinados aos braços abertos do LCE (NUNES DE SOUZA et al., 2000). Entretanto no estudo de Zangrossi et al. (1999), os autores relatam que o 8-OH-DPAT produziu efeito ansiolítico, pois aumentou o tempo gasto nos braços abertos do LCE. Resultado semelhante foi observado com o 8-OH-DPAT apresentando características ansiolíticas em ratos avaliados no labirinto em T- Elevado (ANDRADE STRAUSS et al. (2013).

Em relação ao subtipo de receptor 5-HT_{2C} os resultados apresentam maior consistência em relação às reações de defesa (VICENTE; ZANGROSSI; 2012). Assim, os resultados demonstram que agonistas, como IL-639, WAY-161503 e MK-212 (agonistas seletivos 5-HT_{2C}) e mCPP (agonista não seletivo 5-HT_{2B/C}) microinjetados na amígdala apresentam características ansiogênicas (DE MELLO CRUZ et al., 2005), estando muitas vezes associados a estímulos nociceptivos aversivos (CHRISTIANSON et al., 2010). No estudo recente de Vicente e Zangrossi, (2012), a microinjeção do agonista MK-212 no núcleo basolateral da amígdala de ratos facilitou a aquisição da esquiiva inibitória no labirinto em T- Elevado, sugerindo efeitos ansiogênicos.

1.6. SEROTONINA E NOCICEPÇÃO

A utilização de drogas inibidoras seletivas da recaptação de serotonina (ISRS) tem sido objeto de vários estudos, principalmente por serem utilizadas na terapêutica de transtornos de ansiedade e depressão (NASH; HACK, 2002; HOMBERG et al., 2010). Além disso, alguns estudos observaram o papel de antidepressivos na modulação das vias da dor (TOMKINS et al, 2001; SALERNO et al., 2002; MCCLEANE, 2008), visto que, esta classe de drogas apresentou efeitos antinociceptivos em estudos clínicos (JUNG et al., 1997;

STONE et al., 2003) e em estudos com animais (DUMAN et al., 2004; KESIM et al., 2005; OTSUKA et al., 2001).

O mecanismo de ação destes fármacos envolve o aumento da concentração de serotonina na fenda sináptica, devido ao bloqueio de sua recaptação (KRISHNAN; NESTLER, 2008). Neste sentido, tanto a SCP, quanto a amígdala recebem projeções de fibras provenientes do núcleo dorsal da rafe através dos tratos periventricular e prosencefálico (AZMITIA, 1978). Com isso, Deakin e Graeff, (1991) sugeriram que frente a estímulos aversivos estas vias serotoninérgicas seriam ativadas, ocasionando um aumento da liberação de serotonina em ambas as estruturas. Portanto a ativação dessas vias modularia diferentes respostas comportamentais defensivas. Especificamente, na SCP, o aumento da concentração de serotonina inibiria a expressão de comportamentos ocasionados por ameaças reais ou proximais. Já na amígdala este aumento proporcionaria a expressão de comportamentos que ocorrem em resposta a estímulos potenciais ou distantes e que envolvem conflito entre a aproximação e a esquiva (GRAY; McNAUGHTON, 2000). Conseqüentemente, a serotonina exerceria um papel dual, visto que integraria diferentes tipos de reações comportamentais de defesa (DEAKIN; GRAEFF, 1991).

A utilização desta ampla classe de fármacos, que incluem o citalopram, fluoxetina, paroxetina, sertralina, entre outros, na terapêutica de diversas síndromes dolorosas se dá uma vez que, a depressão é um sintoma frequente em pacientes com dor crônica, sugerindo assim que esses estados possuem alguns mecanismos bioquímicos em comum (BLACKBURN-MUNRO; BLACKBURN-MUNRO, 2001; SUZUKI et al., 2004).

Neste sentido, Pedersen et al. (2005) observou o efeito antinociceptivo promovido pela administração aguda de fluoxetina em ratos submetidos ao teste de retirada da cauda e teste de formalina na pata (PEDERSEN et al., 2005). A ação da fluoxetina sobre as respostas nociceptivas têm sido investigada em roedores (HACHE ET AL. 2012; MCCLEANE, 2000; SAWYNOK et al. 1999; SCHREIBER; PICK 2006; SIKKA et al. 2011; SINGH et al. 2001), em que este fármaco apresentou um aumento dose-dependente da antinocicepção (SCHREIBER; PICK, 2006).

Outro aspecto interessante desta classe de fármacos envolve a interação dos mesmos com receptores serotoninérgicos. Neste sentido, está o estudo de Vicente e Zangrossi (2012, 2014) que demonstraram que os ISRS interagem com os receptores 5HT_{1A} e 5HT_{2C} na amígdala de ratos. Outras evidências demonstraram que a microinjeção intra-substância cinzenta periaquedutal de 8-OH-DPAT acentuou as respostas ansiolíticas após a

administração crônica de fluoxetina e sertralina, sugerindo assim a ocorrência de uma modulação desta classe de fármacos com os receptores 5HT_{1A} e 5HT₂ (ZANOVELI et al., 2007, 2010).

Recentemente, verificou-se o envolvimento dos receptores 5HT_{1A} e 5HT_{2C} com a fluoxetina na SCPd (Baptista-de-Souza et al., 2015). Estes autores evidenciaram através do tratamento sistêmico combinado de fluoxetina e o agonista dos receptores 5HT_{1A}, 8-OH-DPAT intra-SCP que a fluoxetina é capaz de reverter completamente a antinocicepção induzida pelo confinamento ao BA do LCE. E o que os receptores 5-HT_{2C} localizados na SCPd, exercem uma modulação tônica sobre este tipo de antinocicepção, e a atividade deste subtipo de receptor serotoninérgico, interfere na ação dos receptores 5-HT_{1A}, presentes na SCPd. Além do mais, sugerem que a fluoxetina é capaz de atuar como antagonista dos receptores 5-HT_{2C}, revertendo o aumento da antinocicepção induzido pelo tratamento intra-SCPd de MK-212 (agonista 5-HT_{2C}).

Diante das evidências descritas acima, podemos afirmar que a fluoxetina bloqueia a recaptção de serotonina, produzindo antinocicepção em roedores. Entretanto necessita ser investigado quais os subtipos de receptores estão envolvidos na resposta de inibição da nocicepção. Assim, permanece desconhecido qual o papel dos receptores 5HT_{1A} e 5HT_{2C} localizados na amígdala sobre a nocicepção e antinocicepção e as possíveis interações destes subtipos de receptores serotoninérgicos com o tratamento concomitante com fluoxetina em camundongos confinados nos braços abertos e fechados do LCE.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo avaliou os efeitos da fluoxetina sobre a modulação da nocicepção pelos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} da amígdala em camundongos confinados nos braços abertos (BA) e fechados (BF) do LCE.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos das microinjeções de 8-OH-DPAT (agonista do receptor 5HT_{1A}) na amígdala sobre a antinocicepção induzida pelo confinamento nos braços abertos do LCE.

Avaliar os efeitos das microinjeções de MK-212 (agonista do receptor 5HT_{2C}) na amígdala sobre a antinocicepção induzida pelo confinamento nos braços abertos do LCE.

Avaliar as possíveis alterações das respostas das microinjeções de 8-OH-DPAT e MK-212 com o tratamento concomitante de fluoxetina sobre a antinocicepção e nocicepção em camundongos expostos ao LCE.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Sujeitos

Foram utilizados camundongos da cepa Suíço-albino, machos, pesando 25-30 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar. Os animais foram agrupados em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm), mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1 °C), umidade ($55 \pm 5\%$), luz (ciclo claro escuro de 12/12horas, luzes acesas às 7:00 e apagadas às 19:00 horas) e livre acesso ao alimento e água, exceto durante os curtos períodos do teste.

3.2. Ética

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar (processo nº 029/2014, Anexo 1). Os experimentos seguiram as normas e preceitos especificados pela diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

3.3. Drogas

Para o tratamento intra-amígdala foram utilizados:

- 8-OH-DPAT (agonista 5-HT_{1A}) – bromidrato de (\pm)-8-hidroxi-2-(di-n-propil-amino) tetralina [Sigma PM: 328,3 g (nas doses de 5,6 e 10 nmol)].
- MK-212 (agonista 5-HT_{2C}) (6-cloro-2-(1-piperazinil)-pirazina) [Tocris, Cookson, Ballwin, USA (nas doses de 0,21 e 0,63 nmol)].

No tratamento sistêmico utilizou-se Fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c.; Sigma/RBI), diluído em salina (0,9% NaCl), (SINGH et al., 2001).

As doses utilizadas foram baseadas em estudos prévios (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; SINGH et al., 2001; GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2009).

Com exceção da fluoxetina, as demais drogas foram preparadas em veículo (solução fisiológica com 2% de Tween 80) e 0,1µL foi microinjetado bilateralmente. O mesmo veículo foi injetado nos animais do grupo controle (grupo veículo).

3.4. Cirurgia e microinjeção

Os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente). Após a tricotomia da região da cabeça, os camundongos foram fixados a um aparelho estereotáxico (Insight Instruments,

Brasil) e os mesmos passaram por cirurgia para a implantação intracraniana bilateralmente de cânula-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento (Insight Instruments, Brasil). As cânulas foram direcionadas para o complexo amigdalóide e as seguintes coordenadas estereotáxicas foram utilizadas: AP = - 1,3mm; LM= -3,3mm; DV= -2,8mm, tendo o bregma como referência (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

A ponta das cânulas-guia foram posicionadas a $\pm 2,0$ mm dorsal à estrutura alvo. As cânulas foram fixadas no crânio por uma prótese de resina acrílica autopolimerizável presa a um parafuso de aço inoxidável fixado a calota craniana. Para evitar problemas com obstrução, entupimento e reduzir contaminação, foi introduzido em cada cânula-guia um mandril de aço inoxidável do mesmo comprimento da cânula o qual foi removido durante o procedimento de injeção.

Ao final da cirurgia, os animais receberam injeções do analgésico cetoprofeno (5 mg/kg, i.p.) (LU et al., 2004; GARBER et al., 2010) e do antibiótico ceftriaxona (4 mg/kg, i.p.) (STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014), para evitar possíveis infecções. Os animais permaneceram em recuperação por 4 a 5 dias após a cirurgia, e posteriormente foram submetidos ao teste comportamental.

No dia do teste, em todos os experimentos, as injeções foram realizadas simultaneamente nos dois hemisférios por meio de duas agulhas de injeção (33-gauge). As agulhas foram inseridas dentro de cada uma das cânulas-guia para a injeção bilateral de soluções na amígdala, sendo que o comprimento de cada agulha ultrapassou 2,0 mm a ponta da cânula-guia. Cada agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10) a duas microseringas Hamilton (10 μ L). Para o controle do volume e do tempo de injeção das drogas foi utilizada uma bomba de microinjeção digital (BI2000 Insight Equipamentos) 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 das soluções por 60 segundos, permanência da agulha de injeção por 90 segundos, para se evitar o refluxo das drogas, enquanto o animal foi contido manualmente pelo experimentador com auxílio de uma flanela. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno antes, durante e depois das injeções confirmou o fluxo da solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2008).

3.5. Labirinto em Cruz Elevado

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



Figura 1: Labirinto em Cruz Elevado

3.6. Teste Nociceptivo

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

Durante os experimentos foi realizado o registro do número de contorções abdominais dos sujeitos. Após cada intervalo do confinamento aos BA e BF, os compartimentos foram limpos com álcool a 20% (v/v) e secos com papel toalha. Os experimentos foram filmados por uma câmera conectada a um computador alocado em uma sala adjacente à sala de testes, e os resultados coletados foram analisados posteriormente.

3.7. Histologia

Após o término dos testes comportamentais, os animais receberam injeção bilateral intra-amígdala de 0,1 µl de uma solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o

procedimento descrito para a injeção de drogas. Os animais foram eutanasiados com o uso de uma câmara de CO₂, seus cérebros removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%). Posteriormente, os encéfalos foram levados ao criostato (Leica CM1850), onde secções coronais de 60µm foram realizadas e adequadamente montadas em lâminas, para verificação no microscópio (Olympus BX41TF) do sítio de microinjeção, segundo o Atlas de Paxinos e Franklin (2001). Foram incluídos nas análises estatísticas somente os dados dos animais que tiveram a ponta da microinjeção localizada no complexo amigdalóide, nos dois hemisférios cerebrais.

3.8. Delineamento Experimental

3.8.1. Experimento 1: Avaliação dos efeitos intra-amígdala de 8-OH-DPAT sobre a nocicepção e a antinocicepção.

Quatro ou cinco dias após a cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia na amígdala cada camundongo recebeu injeções intra-amígdala de veículo ou 8-OH-DPAT nas doses de 5,6 ou 10 nmol, e, após 5 minutos, uma injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo), 0,6% (0,1 ml/10g por peso corpóreo, i.p.). Após a confirmação do início das contorções, os camundongos foram confinados ao BA ou ao BF do LCE durante 5 minutos para o registro do número de contorções abdominais. Imediatamente após o término do experimento, os encéfalos dos camundongos foram removidos para posterior análise histológica.

Quando as contorções não ocorreram em até 5 minutos, os animais foram descartados do experimento. Entretanto, neste estudo apenas dois animais do Experimento 1, dois animais do Experimento 2 e um animal do experimento 3 não contorceam.

O mesmo protocolo experimental descrito acima foi repetido para os experimentos descritos abaixo.

Tabela 1. Grupos experimentais formados no Experimento 1

Tratamento (nmol/0,1µL)	Confinamento no LCE	
	BA	BF
Veículo	n= 10	n= 10
8-OH-DPAT 5,6	n= 12	n= 12
8-OH-DPAT 10	n= 12	n= 10

Os números representam o total de camundongos utilizados por grupo.

3.8.2. Experimento 2: Avaliação dos efeitos das injeções combinadas de fluoxetina 2,5mg/kg e 8-OH-DPAT intra-amígdala sobre a nocicepção e a antinocicepção.

Os camundongos receberam tratamento subcutâneo com salina ou fluoxetina (2,5mg/Kg, i.p.) e após 30 minutos injeções intra-amígdala de veículo ou 8-OH-DPAT (10nmol), dose selecionada no Experimento 1. O procedimento para avaliar a nocicepção e a antinocicepção induzida pelo confinamento no BA ou BF do LCE foi semelhante ao descrito para o Experimento 1.

Tabela 2. Grupos experimentais formados no Experimento 2

Tratamento	Confinamento no LCE	
	BA	BF
Salina + Veículo	n= 9	n= 10
Salina + 8-OH-DPAT (10nmol/0,1µL)	n= 11	n= 12
Fluoxetina (2,5 mg/Kg) + Veículo	n= 8	n= 10
Fluoxetina (2,5 mg/Kg) + 8-OH-DPAT (10nmol/0,1µL)	n= 9	n= 9

Os números representam o total de camundongos utilizados por grupo

3.8.3. Experimento 3: Avaliação dos efeitos intra-amígdala de MK-212 sobre a nocicepção e a antinocicepção.

Os camundongos receberam injeções intra-amígdala de veículo ou MK-212 nas doses de 0,21 ou 0,63 nmol e, após 5 minutos, injeção de ácido acético (estímulo nociceptivo), 0,6% (0,1 ml/10g por peso corpóreo), (i.p.). O procedimento para avaliar a nocicepção e a antinocicepção induzida pelo confinamento no BA ou BF do LCE foi semelhante ao descrito para o Experimento 1.

Tabela 3. Grupos experimentais formados no Experimento 3

Tratamento (nmol/0,1µL)	Confinamento no LCE	
	BA	BF
Veículo	n= 8	n= 13
MK-212 0,21	n= 11	n= 11
MK-212 0,63	n= 11	n= 11

Os números representam o total de camundongos utilizados por grupo.

3.8.4. Experimento 4: Avaliação dos efeitos das injeções combinadas de fluoxetina 2,5mg/kg e MK-212 intra-amígdala sobre a nocicepção e a antinocicepção.

Os camundongos receberam tratamento subcutâneo com salina ou fluoxetina (2,5mg/Kg, i.p.) e após 30 minutos injeções intra-amígdala de veículo ou MK-212 na dose de 0,63nmol (dose selecionada no Experimento 3). O procedimento para avaliar a nocicepção e a antinocicepção induzida pelo confinamento no BA ou BF do LCE foi semelhante ao descrito para o Experimento 1.

Tabela 4: Grupos experimentais formados no Experimento 4

Tratamento	Confinamento no LCE	
	BA	BF
Salina + Veículo	n= 9	n= 12
Salina + MK-212 (0,63nmol/0,1µL)	n= 10	n= 10
Fluoxetina (2,5 mg/Kg) + Veículo	n= 9	n= 9
Fluoxetina (2,5 mg/Kg) + MK-212 (0,63nmol/0,1µL)	n= 9	n= 8

Os números representam o total de camundongos utilizados por grupo.

3.9. Análise Estatística

Os dados obtidos nos experimentos 1 e 3 foram avaliados por uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores (tratamento x local de confinamento). Os dados obtidos nos experimentos 2 e 4 foram avaliados por uma análise de variância (ANOVA) de três fatores (tratamento sistêmico x tratamento intra-amígdala x local de confinamento). Nos casos de significância, a análise foi seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Os valores de *P* menores ou iguais a 0,05 foram considerados como significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Histologia

As análises histológicas confirmaram que 285 camundongos receberam a implantação das cânulas bilateralmente na amígdala para a realização dos Experimentos 1 a 4 (Fig. 2A e 2B).

Sessenta e seis animais foram utilizados no Experimento 1 para investigar os efeitos do 8-OH-DPAT intra-amígdala (veículo, 5,6 e 10 nmol) sobre a nociceção e antinociceção conforme distribuição apresentada na Tabela 1.

Setenta e oito animais foram utilizados no Experimento 2 para avaliar os efeitos das injeções combinadas de fluoxetina (2,5mg/Kg, s.c.) e 8-OH-DPAT (10 nmol) intra-amígdala sobre a nociceção e antinociceção conforme distribuição apresentada na Tabela 2.

Sessenta e cinco animais foram utilizados no Experimento 3 para investigar os efeitos do MK-212 intra-amígdala (veículo, 0,21 e 0,63 nmol) sobre a nociceção e antinociceção conforme distribuição apresentada na Tabela 3. Setenta e seis camundongos foram utilizados no Experimento 4 para avaliar os efeitos das injeções combinadas de fluoxetina (2,5mg/Kg, s.c.) e MK-212 (0,63 nmol) intra-amígdala sobre a nociceção e antinociceção conforme distribuição apresentada na Tabela 4.

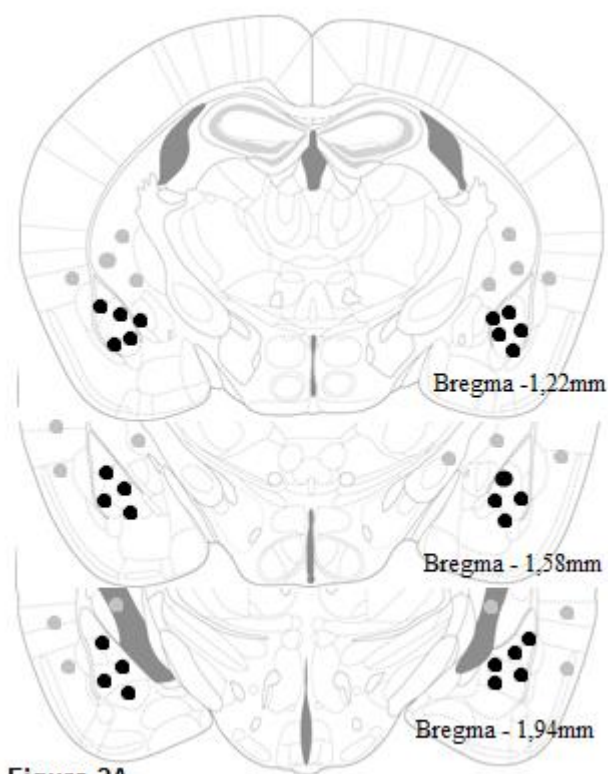


Figura 2A



Figura 2B

Figura 2: (A) Esquema de seções coronais representando alguns dos sítios de injeção na amígdala de camundongos. Os círculos em preto representam as áreas de infusão da droga na estrutura-alvo. Os círculos em cinza representam sítios de injeção fora da estrutura-alvo (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). O número de círculos é inferior ao número de acertos devido à sobreposição dos pontos. (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando um sítio de injeção na amígdala de um camundongo. As secções ocorreram a -1,06mm posterior ao bregma.

4.2. Experimento 1: Efeitos do 8-OH-DPAT intra-amígdala sobre a nocicepção e antinocicepção em camundongos.

A ANOVA de duas vias (local do confinamento x tratamento) mostrou diferença significativa do local do confinamento ($F_{1,60} = 266,55$, $P < 0,05$), do tratamento ($F_{2,60} = 60,37$, $P < 0,05$) e efeitos da interação entre confinamento x tratamento ($F_{2,60} = 5,81$, $P < 0,05$). Comparações posteriores (teste de Duncan) confirmaram que o confinamento de camundongos no BA produziu menor número de contorções abdominais quando comparados aos confinados no BF, independente do tratamento recebido. Os animais confinados no BA e BF que receberam 8-OH-DPAT (10nmol) apresentaram aumento no número de contorções quando comparados aos animais que receberam veículo o que caracteriza a atenuação da antinocicepção (Figura 3).

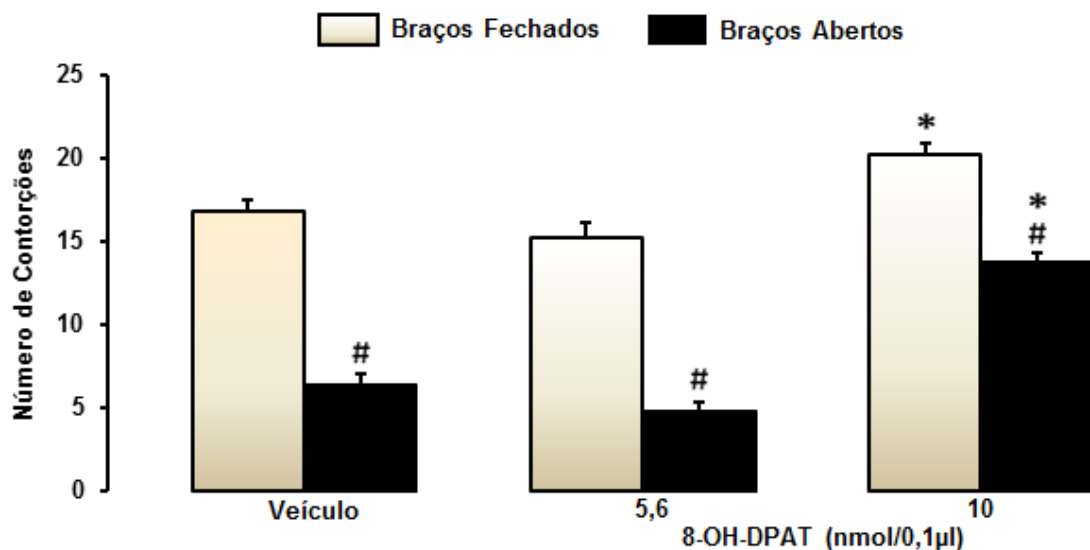


Figura 3. Efeito do 8-OH-DPAT, administrado intra-amígdala sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=10-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle (veículo).

4.3. Experimento 2: Efeitos das injeções combinadas de fluoxetina (2.5mg/Kg, s.c.) e 8-OH-DPAT (10 nmol) intra-amígdala sobre a nocicepção e antinocicepção em camundongos.

A ANOVA de três vias (local de confinamento x tratamento sistêmico x tratamento intra-amígdala) mostrou diferença significativa do local de confinamento ($F_{1,70}=101,08$, $P<0,05$) e do tratamento intra-amígdala ($F_{1,70}=62,93$, $P<0,05$). Ausências de efeitos foram observados para o tratamento sistêmico ($F_{1,70}=0,17$, $P>0,05$), da interação entre o local de confinamento x tratamento sistêmico ($F_{1,70}=2,14$, $P>0,05$), para a interação entre o local de confinamento x tratamento intra-amígdala ($F_{1,70}=3,07$, $P>0,05$), para a interação entre o tratamento sistêmico x tratamento intra-amígdala ($F_{1,70}=0,085$, $P>0,05$) e para a interação entre local de confinamento x tratamento sistêmico x tratamento intra-amígdala ($F_{1,70}=0,007$, $P>0,05$]. Comparações posteriores (teste de Duncan) confirmaram que o confinamento de camundongos no BA produziu menor número de contorções abdominais quando comparados aos confinados no BF, independente do tratamento recebido. Assim como no Experimento 1, os animais que receberam 8-OH-DPAT (10nmol) apresentaram um aumento no número de contorções quando comparados aos animais que receberam veículo, independentemente do confinamento no BA ou BF. Os animais tratados com fluoxetina e 8-OH-DPAT (10nmol) não apresentaram alterações quando comparados ao grupo salina+8-OH-DPAT(Figura 4).

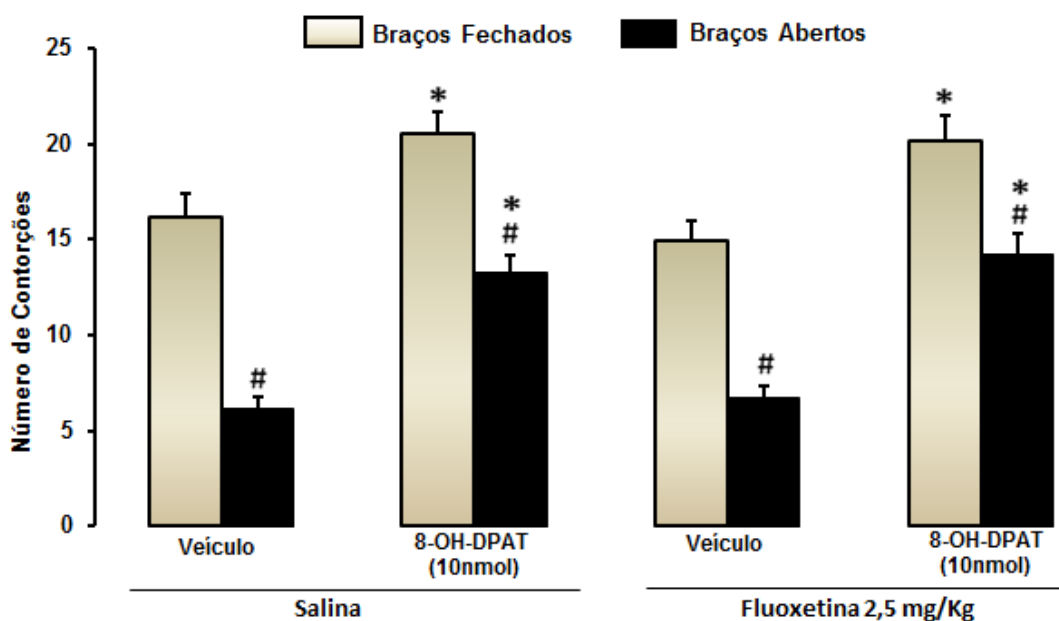


Figura 4. Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mk/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-amígdala de 8-OH-DPAT (10 nmol) sobre antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da media (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P<0,05$

comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado.* $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle.

4.4. Experimento 3: Efeitos do MK-212 intra-amígdala sobre a nocicepção e antinocicepção em camundongos.

A ANOVA de duas vias (local do confinamento x tratamento) mostrou diferença significativa do local do confinamento ($F_{1,59}=334,32$, $P < 0,05$), do tratamento ($F_{2,59}=6,48$, $P < 0,05$) e ausência de efeitos da interação entre confinamento x tratamento ($F_{2,59}=1,66$, $P > 0,05$). Comparações posteriores (teste de Duncan) confirmaram que o confinamento de camundongos no BA produziu menor número de contorções abdominais quando comparados aos confinados no BF, independente do tratamento recebido. Os animais confinados no BA e que receberam MK-212 (0.63 nmol) apresentaram uma diminuição no número de contorções quando comparados aos animais que receberam veículo o que caracteriza aumento da antinocicepção (Figura 5).

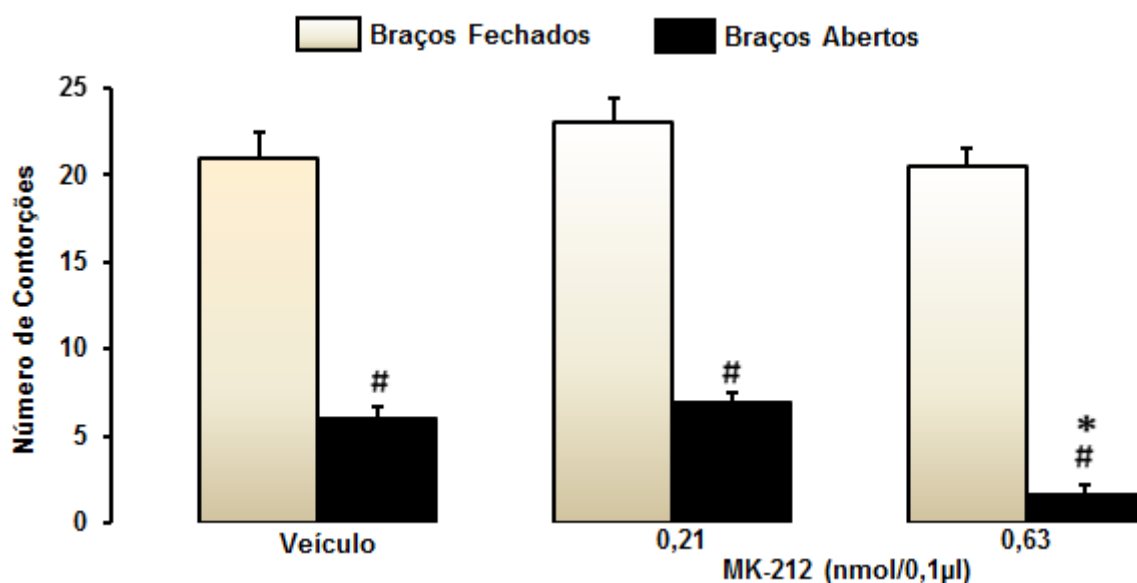


Figura 5. Efeito do MK-212, administrado intra-amígdala sobre a antinocicepção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=8-13). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle (veículo).

4.5. Experimento 4: Efeitos das injeções combinadas de fluoxetina (2.5mg/Kg) subcutânea e MK-212 (0.63 nmol) intra-amígdala sobre a nocicepção e antinocicepção

A ANOVA de três vias (local de confinamento x tratamento sistêmico x tratamento intra-amígdala) mostrou diferença significativa do local de confinamento

($F_{1,68}=292,34$, $P<0,05$), do tratamento sistêmico ($F_{1,68}=6,53$, $P<0,05$) e interação entre tratamento sistêmico x tratamento intra-amígdala ($F_{1,68}=9,74$, $P<0,05$). Ausências de efeitos foram observadas para o tratamento intra-amígdala ($F_{1,68}=1,67$, $P>0,05$), da interação entre local de confinamento x tratamento sistêmico ($F_{1,68}=0,18$, $P>0,05$), local de confinamento x tratamento intra-amígdala ($F_{1,68}=0,05$, $P>0,05$) e também ausência de efeitos para a interação entre o local de confinamento x tratamento sistêmico x tratamento intra-amígdala ($F_{1,68}=1,32$, $P>0,05$). Comparações posteriores (teste de Duncan) revelaram que os animais confinados no braço aberto apresentaram menor número de contorções abdominais quando comparados ao braço fechado, independente do tratamento recebido. O tratamento intra-amígdala de salina+MK-212, promoveu diminuição no número de contorções nos animais expostos ao braço aberto, quando comparados ao grupo controle, enquanto o tratamento com fluoxetina+MK-212 reverteu este efeito seletivamente (Figura 6).

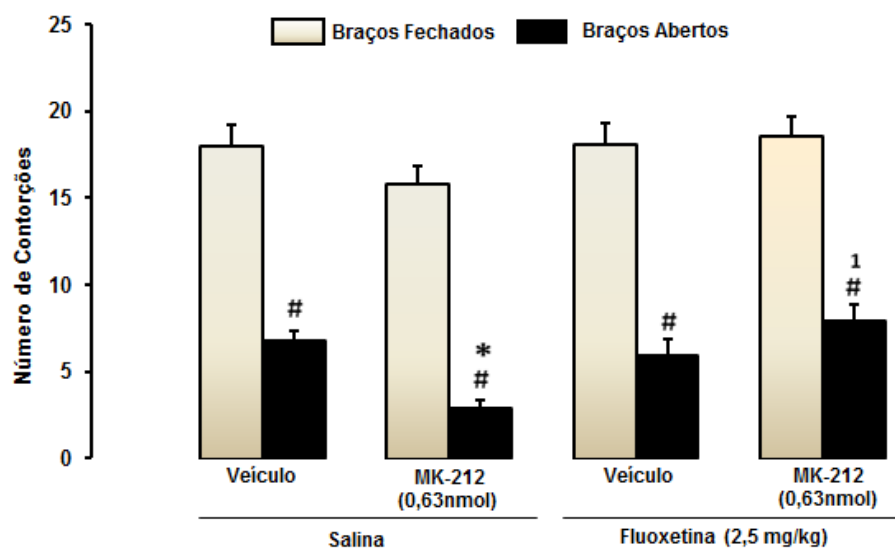


Figura 6. Efeito do tratamento agudo com fluoxetina (2,5 mg/kg, s.c.) concomitante ao tratamento intra-amígdala de MK-212 (0,63 nmol) sobre antinociceção em camundongos confinados nos braços aberto ou fechado do LCE (n=8-12). As barras representam as médias e o erro padrão da média (M+EPM) do número de contorções abdominais. # $P<0,05$ comparado ao respectivo grupo confinado no braço fechado. * $P<0,05$ comparado ao respectivo grupo controle. 1 $P<0,05$ comparado ao respectivo grupo salina+MK-212.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que enquanto a microinjeção do agonista dos receptores 5-HT_{1A} da amígdala (8-OH-DPAT) acentuou a nocicepção, ou seja, ocasionou um aumento no número de contorções nos animais confinados em ambos os braços, a maior dose de MK-212, agonista dos receptores 5-HT_{2C}, intensificou a antinocicepção, sendo este último efeito completamente bloqueado pela administração subcutânea de fluoxetina na dose de 2,5mg/Kg.

Corroborando achados da literatura (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; BAPTISTA et al., 2009; BAPTISTA et al., 2012), verificamos neste estudo que o confinamento de camundongos aos braços abertos do LCE promove diminuição no número de contorções abdominais, quando comparados ao respectivo grupo confinado ao braço fechado do LCE, independente do tratamento recebido.

A investigação acerca do papel dos receptores 5-HT_{1A} sobre a antinocicepção foi realizada no estudo de Nunes de Souza et al. 2000. Estes autores evidenciaram que a ativação do receptor 5-HT_{1A} através de injeções subcutâneas de 8-OH-DPAT (agonista dos receptores 5-HT_{1A}) na menor dose (0,05mg/Kg) produziu aumento do número de contorções em camundongos confinados no BA, sugerindo assim atenuação da antinocicepção, enquanto que a maior dose (1,0mg/Kg) aumentou a antinocicepção. Estes achados demonstraram que esse subtipo de receptor poderia modular de modo distinto as respostas nociceptivas, pois estas respostas parecem advir da localização destes receptores, dependendo principalmente da ação da droga utilizada, pois estes podem atuar pré ou pós sinápticamente (De Vry, 1995).

Segundo De Vry, 1995, a administração sistêmica de diferentes doses de agonistas dos receptores 5-HT_{1A} podem exercer diferentes efeitos sobre a neurotransmissão serotoninérgica. Estes efeitos caracterizados como dose-dependentes já foram descritos por outros estudos (GLASER; DE VRY, 1992; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000), que também destacaram o efeito dual do agonista 8-OH-DPAT. Esta dupla localização no neurônio proporciona aos receptores 5-HT_{1A}, um efeito duplo na estimulação destes receptores serotoninérgicos. Quando os neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos são estimulados, ocorre a inibição da atividade elétrica dos neurônios dos núcleos da rafe, reduzindo a liberação de serotonina. O estímulo dos receptores pós-sinápticos ativa a via de segundos mensageiros, através do acoplamento com a proteína Gi/o, resultando em uma hiperpolarização neuronal e consequente inibição neuronal (DE VRY, 1995; HANNON; HOYER, 2008).

Em outro estudo, a administração sistêmica de serotonina foi investigada e os resultados mostraram que a injeção intradérmica de serotonina produziu efeito hiperalgésico

dose-dependente, sugerindo ser dependente de um efeito excitatório direto no neurônio aferente primário. Este efeito hiperalgésico também pode ocorrer através da administração de agonistas seletivos dos receptores 5-HT_{1A}, como 8-OH-DPAT e DP-5-CT, através do teste da retirada da pata (TAIWO; LEVINE, 1992). Assim, esta resposta, relacionando os receptores 5-HT_{1A} com a hipernocicepção poderia ser modulada pelos efeitos hiperalgésicos diretos, bem como, pelos efeitos facilitatórios da serotonina através de seus mediadores periféricos (SOMMER; 2006).

Neste sentido, com o objetivo de esclarecer qual estrutura límbica estaria envolvida nas respostas defensivas, Nunes de Souza et al. 2000 realizaram microinjeção de 8-OH-DPAT (5,6nmol) na amígdala e não observaram alteração da resposta nociceptiva em camundongos confinados nos braços do LCE. Entretanto esta mesma dose promoveu efeito ansiogênico em camundongos avaliados no LCE. Desta forma os autores sugeriram uma dissociação dos mecanismos que participam da modulação da ansiedade daqueles que participam do controle da nocicepção no complexo amigdalóide. Assim como descrito no estudo de Nunes de Souza et al. 2000, no nosso estudo (Experimento 1) a dose de 5,6 nmol de 8-OH-DPAT intra-amígdala também não alterou a antinocicepção induzida pelo confinamento no BA do LCE.

No entanto, resultados contraditórios, como os relatados anteriormente, têm sido observados na tentativa de correlacionar o papel da serotonina na amígdala. Assim, observamos que o problema pode estar relacionado com a diferença entre os testes empregados e o subtipo de receptor envolvido, considerando que a serotonina pode ocasionar efeitos pro-nociceptivos e antinociceptivos, dependendo principalmente do local de atuação do receptor (SUSUZI et al., 2004). Com isso, alguns estudos enfatizam que a neurotransmissão descendente serotoninérgica é responsável por desempenhar um papel importante no controle da nocicepção, principalmente que a interrupção deste sistema provocaria uma hiperalgesia (FASMER et al., 1984, 1985; SUZUKI et al., 2004).

Em relação aos processos associados à nocicepção, evidências sugerem que a neurotransmissão serotoninérgica, seus receptores, e suas interações com outros neurotransmissores são essenciais para a nocicepção e antinocicepção (SPATH, 2002). E desta maneira, demonstram que há presença de receptores 5-HT_{1A} no corno dorsal da medula, modulando a dor (DAVAL et al., 1987; HOYER, 1988). Neste sentido, a participação do receptor 5-HT_{1A} nas vias da dor é marcada por resultados contraditórios (MILLAN et al.,

1991) em que há achados que sugerem um papel analgésico (Archer et al., 1987; FASMER et al., 1985) ou hiperalgésico (FASMER et al., 1986).

Algumas evidências demonstram o envolvimento dos receptores do tipo 5-HT_{1A} em processos antinociceptivos (BURITOVA et al., 2003). Com isso, fica estabelecida a importância da ativação do receptor 5-HT_{1A} como um mecanismo de antinocicepção modulado por estruturas centrais (BARDIN et al., 2003), pois os receptores 5-HT_{1A} estão amplamente presentes em áreas límbicas, como a amígdala e no núcleo mesencefálico (dorsal e medial) da rafe (HANNON; HOYER, 2008; BARNES; SHARP, 1999).

Com isso, em nosso estudo observamos que a maior dose de 8-OH-DPAT (10 nmol) exerceu efeito hipernociceptivo, promovendo um aumento no número de contorções nos animais confinados em ambos os braços, abertos ou fechados, o que indica um papel direto deste subtipo de receptor serotoninérgico sobre as vias relacionadas à nocicepção.

Considerando que o receptor 5-HT_{1A} está acoplado a proteína de guanosina (Gi/o, inibitória), cuja ligação do agonista seletivo 8-OH-DPAT ocasiona um efluxo de potássio, promovendo assim uma hiperpolarização celular e consequente inibição do disparo neuronal (BARNES AND SHARP, 1999; RAYMOND et al., 2001; ARTIGAS, 2013), sugerimos que possa ter ocorrido inativação da neurotransmissão serotoninérgica na amígdala, produzindo como resposta comportamental um efeito pró-nociceptivo.

Outros estudos demonstraram que lesões nesta área são capazes de exercer um papel de aumento de respostas relacionadas à dor em diferentes modelos animais (FOX; SORENSON, 1994; TANIMOTO, 2003; NAKAGAWA et al., 2003). Neste sentido, recentemente nosso grupo de pesquisa também demonstrou que microinjeções de cloreto de cobalto (produz inativação temporária neuronal) no complexo amigdalóide de camundongos, aumentam o número de contorções abdominais (PELARIN et al., 2015).

Em resumo, sugerimos que o 8-OH-DPAT promoveu aumento no número de contorções quando administrado na amígdala devido à ocorrência de hiperpolarização neuronal, decorrente da inativação da neurotransmissão serotoninérgica que é relevante para o controle do circuito descendente inibitório da dor (FIELDS, 2004; MCGARAUGHTY et al., 2004) desencadeando, assim, exacerbação da resposta nociceptiva sensorial.

Neste sentido, a hiperpolarização da amígdala levaria a um enfraquecimento das vias descendentes inibitórias da dor, diminuindo a influência dessas vias na ascensão do estímulo pelas lâminas do corno dorsal da medula, acarretando em aumento do número de contorções abdominais nos camundongos.

Algumas evidências sugerem que os efeitos terapêuticos observados com a administração de fluoxetina parecem advir de sua interação com os subtipos de receptores serotoninérgicos, principalmente os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} (CHEN et al., 1995; DE VRY et al., 2004). Portanto, no segundo experimento, nós avaliamos os efeitos da injeção sistêmica de fluoxetina na dose de 2,5 mg/Kg combinada à injeção intra-amígdala de 8-OH-DPAT na dose de 10 nmol (dose esta que induziu a atenuação da antinocicepção), com o objetivo de investigar a influência desta interação na antinocicepção. Nossos resultados demonstraram que a fluoxetina não alterou a antinocicepção induzida pelo BA e também não reverteu o aumento da nocicepção observada no BF, sugerindo assim, que a fluoxetina não modula as respostas nociceptivas relacionadas aos receptores 5-HT_{1A} na amígdala.

O conjunto de resultados do Experimento 2, sugerem a ocorrência de uma dissociação dos mecanismos de atuação da fluoxetina, pois esta não interage com o receptor 5-HT_{1A} na nocicepção, porém modula as respostas de ansiedade quando administrada cronicamente na SCP em ratos no teste do labirinto em T-Elevado (ZANOVELI et al., 2007; ZANOVELI et al., 2010). Outro estudo mais recente, buscando investigar os efeitos da interação da fluoxetina com os receptores 5-HT_{1A} na SCP demonstrou através de injeções intra-SCP dorsal do agonista 8-OH-DPAT que a fluoxetina reverteu a antinocicepção induzida pela BA do LCE, sugerindo uma diminuição da aversividade induzida pela BA (BAPTISTA et al., 2015). Estes resultados ressaltam a interação da fluoxetina com o subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}. Porém, em nosso estudo, sugerimos que a fluoxetina na dose de 2,5mg/Kg não participa deste tipo de inibição da dor dependente da ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} do complexo amigdalóide.

Em nosso terceiro experimento, avaliamos o efeito da injeção intra-amígdala do agonista seletivo para os receptores 5-HT_{2C} (MK-212) e observamos que a maior dose deste agonista diminuiu o número de contorções nos animais confinados no BA do LCE, acarretando assim em um aumento da antinocicepção induzida pelo confinamento ao BA do aparato. Este resultado é semelhante aquele obtido em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, quando foi observado aumento da antinocicepção obtida pela ativação do receptor 5-HT_{2C}, porém na SCP (BAPTISTA et al., 2012).

Embora nossos resultados com relação à antinocicepção sejam semelhantes àqueles observados com ativação destes receptores na SCP, o papel deste subtipo de receptor serotoninérgico sobre as respostas de ansiedade quanto comparadas aquelas observadas na amígdala são bastante distintas. Neste sentido, estudos demonstraram que enquanto a

administração de agonista 5-HT_{2C} intra-SCP exerce um efeito ansiolítico (MENDES-GOMES et al 2011; GOMES; NUNES DE SOUZA, 2009), no complexo amigdalóide essa classe de receptores parece exercer um efeito ansiogênico (MCGARAUGHTY etl al., 2004; DE MELLO CRUZ et al., 2005; CORNÉLIO; NUNES DE SOUZA, 2007). Ainda nessa direção, estudos utilizando técnicas de biologia molecular demonstraram um aumento na expressão de receptores 5-HT_{2C} da amígdala de animais que passaram por uma sessão de estresse (HARADA et al., 2008), fortalecendo a hipótese da participação destes receptores no complexo amigdalóide na modulação dos processos de ansiedade.

Neste sentido, sugerimos que o aumento da antinocicepção induzida pelo confinamento aos braços abertos do LCE observado com a maior dose de MK-212 está diretamente relacionado ao aumento da ansiedade promovido pela ativação dos receptores 5-HT_{2C} nesta estrutura prosencefálica. Tal relação se distingue daquela observada na SCP em que este receptor exerceria uma modulação distinta sobre os processos de dor e ansiedade.

No experimento 4, nós avaliamos o efeito da injeção sistêmica de fluoxetina na dose de 2,5mg/Kg combinada à injeção intra-amígdala de MK-212 na dose de 0,63nmol (dose esta que acentuou a antinocicepção no experimento 3), e observamos que a fluoxetina foi capaz de reverter o efeito do MK-212. Tais achados se contrapõem aqueles observados em outros estudos em que foi observada uma exacerbação das respostas ansiolíticas e panicolíticas induzidas por microinjeções intra-SCP de agonistas 5-HT₂ em ratos expostos ao labirinto em T-Elevado (DE BORTOLI et al., 2006; ZANOVELI et al., 2007; ZANOVELI et al., 2010). Estas evidências demonstram a importância da distinção das diferentes estruturas, bem como os diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos envolvidos, além das diferentes doses e drogas utilizadas sobre as respostas defensivas apresentadas.

Assim, diante do aumento da antinocicepção obtida com a administração de MK-212 na dose de 0,63nmol, nossa hipótese era que após a administração de fluoxetina de 2,5mg/Kg ocorresse um aumento nas concentrações de serotonina, pois esta em seu mecanismo de ação bloquearia a recaptação da serotonina (CARLSSON, 1970), levando assim a uma exacerbação da antinocicepção. No entanto, observamos em nosso estudo, que a administração da fluoxetina foi capaz de prejudicar a resposta do agonista 5-HT_{2C}, e não acentuar a antinocicepção, conforme nossa hipótese. Com isso, na tentativa de elucidar o efeito produzido pela fluoxetina, verificamos um papel secundário exercido pela fluoxetina, em que pode estar atuando como antagonista dos receptores 5-HT_{2C} na amígdala.

Evidências em relação à função secundária exercida pela fluoxetina foram investigadas por Ni; Miledi, 1997, que demonstraram através de técnicas de eletrofisiologia que a fluoxetina inibiu a ligação da serotonina no subtipo de receptor 5-HT_{2C} expressos em membranas do córtex de ratos, sugerindo com estas análises, que a fluoxetina pode atuar como um antagonista competitivo e reversível dos receptores 5-HT_{2C}. Ainda nesta direção, Palvimaki et al., 1999, sugeriram que a fluoxetina apresenta este efeito secundário, pois após o tratamento com a fluoxetina ocorreu uma ocupação de 43% dos receptores 5-HT_{2C}, no plexo coroidal de ratos.

Na tentativa de fortalecer a hipótese de que a fluoxetina estaria atuando como um antagonista dos receptores 5-HT_{2C}, Baptista et al., 2015, realizaram injeções intra-SCP dorsal de SB-242080 (um antagonista seletivo de receptores 5-HT_{2C}) combinada com injeções intra-SCP dorsal de MK-212 em camundongos e observaram que como a fluoxetina, o SB-242080 reverteu completamente o aumento da antinocicepção induzida pelo MK-212. Estes autores sugerem que a fluoxetina exerce um bloqueio nos receptores 5-HT_{2C} prejudicando o aumento da antinocicepção induzida por esse subtipo de receptor.

Considerando as evidências que descrevem o antagonismo exercido pela fluoxetina (NI; MILEDI, 1997; PALVIMAKI et al., 1999; BAPTISTA et al., 2015), sugerimos que esta característica possa ter acarretado em uma reversão do aumento da antinocicepção observado com a administração intra-amígdala de MK-212.

6. CONCLUSÕES

Os nossos resultados demonstraram que o confinamento de camundongos no braço aberto do LCE produziu antinocicepção.

Entretanto, enquanto a ativação dos receptores 5-HT_{1A} da amígdala com 8-OH-DPAT (10 nmol) acentuou a nocicepção, a ativação dos receptores 5-HT_{2C} da amígdala com MK-212 (0,63 nmol), aumentaram este efeito antinociceptivo.

A fluoxetina (2,5 mg/Kg) é capaz de atuar como antagonista dos receptores 5-HT_{2C}, revertendo o aumento da antinocicepção induzido pelo tratamento intra-amígdala de MK-212. Porém, não foi capaz de reverter o efeito pró-nociceptivo produzido pelo tratamento intra-amígdala de 8-OH-DPAT.

Em conjunto nossos resultados sugerem que os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C} localizados na amígdala exercem papéis distintos sobre as respostas nociceptivas, e que a fluoxetina interage com os receptores 5-HT_{2C} interferindo na modulação da antinocicepção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, P. R. et al. Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. **J. of Biol. Chemistry**, v. 265, n. 10, p. 5825-5832, 1990.
- AMARAL, D. G.; BASSETT, J. L. Cholinergic innervation of the monkey amygdala: An immunohistochemical analysis with antisera to choline acetyltransferase. **J. Comp. Neurol.**, v. 281, n.3, p. 337-361, 1989.
- AMARAL, D. G.; INSAUSTI, R. Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. **Exp. Brain Res.**, v. 88, n. 2, p. 375-88, 1992.
- ARTIGAS, F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacol. & therap.**, v. 137, p. 119-131, 2013.
- AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **J. of Compar. Neurology**, v. 179, n. 3, p. 641-667, 1978.
- 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 6 2009.
- 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. 42-47, Nov 1 2012.
- BAPTISTA D, et al. Fluoxetine alters the effects of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors located within the dorsal periaqueductal gray (dPAG) on antinociception induced by fear in mice. 2015. Dados não publicados.
- BARDIN, L. et al. Profound, non-opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT_{1A} agonist F 13640 in the formalin model of tonic nociceptive pain. **Pharmacol.**, v. 67, n.4, p. 182-94, 2003.
- BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacol.**, v. 38, n. 8, p. 1083-1152, Aug 1999.
- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual review of neurosci.**, v. 7, n. 1, p. 309-338, 1984.
- BLACKBURN-MUNRO, G.; BLACKBURN-MUNRO, R. E. Chronic pain, chronic stress and depression: coincidence or consequence?. **J Neuroendocrinol**, v. 13, n. 12, p. 1009-23, Dec 2001.
- BLANCHARD, D.C. et al. Subordination stress: Behavioural, brain and neuroendocrine correlates. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 58, n.1-2, p.113-121, 1993.
- BOCCALON, S.; SCAGGIANTE, B.; PERISSIN, L. Anxiety stress and nociceptive responses in mice. **Life sciences**, v. 78, n. 11, p. 1225-1230, 2006.
- BOLLES, R.C.; FANSELOW, M. S. A Perceptual-Defensive-Recuperative Model of Fear and Pain. **Behav. and Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 291-301, 1980.
- BUCY, P.C.; KLUVER, H. An anatomical investigation of the temporal lobe in the monkey (*Macaca mulatta*). **J. Comp. Neurol.**, v. 103, n. 2, p. 151-251, 1955.

BURDACH, K.F. **Vom Baue und Leben des Gehirns**. Leipzig. 1819-1822.

BURITOVA, J.; TARAYRE, J.P.; BESSON, J.M.; COLPAERT, F. The novel analgesic and high-efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist, F 13640 induces c-Fos protein expression in spinal cord dorsal horn neurons. **Brain Res.**, v. 974, n. 1-2, p. 212-21, 2003.

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

CANTO-DE-SOUZA A, NUNES-DE-SOUZA R.L., PELA I.R., GRAEFF F.G. Involvement of the midbrain periaqueductal gray 5-HT_{1A} receptors in social conflict induced analgesia in mice. **Eur. J.of Pharmacol.**, v. 345, p. 253-6, 1998.

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

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

CELADA, P; BORTOLOZZI, A.; ARTIGAS, F. Serotonin 5-HT_{1A} receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. **CNS drugs**, v. 27, n. 9, p. 703-716, 2013.

CERVERO, F. Neurobiología del dolor. **Rev. Neurol.**, v. 30, n. 6, p.551-555, 2000.

CHEN, Ye et al. Further evidence that fluoxetine interacts with a 5-HT_{2C} receptor in glial cells. **Brain Res. Bulletin**, v. 38, n. 2, p. 153-159, 1995.

CHRISTIANSON J.P, R. T, et al. 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. **Biol. psychiatry**, v. 67, p. 339-345, 2010.

CONCEICAO, I. M., et al. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 8, p. 831-4, 1992.

CORNELIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiogenic-like effects of mCPP microinfusions into the amygdala (but not dorsal or ventral hippocampus) in mice exposed to elevated plus-maze. **Behav Brain Res**, v. 178, n. 1, p. 82-89, Mar 12 2007.

CORNELIO, A. M.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Open elevated plus maze- induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? **Physiol Behav**, Oxford, v. 96, n.3, p. 440-447, 2009.

DAVAL, G. et al. Autoradiographic evidence of serotonin 1 binding sites on primary afferent fibres in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Neurosci. letters**, v. 83, n. 1, p. 71-76, 1987.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annual review of neuroscience**, v. 15, p. 353-375, 1992.

DE ANDRADE STRAUSS, C.V.; VICENTE, M.A.; ZANGROSSI, H. Activation of 5-HT_{1A} receptors in the rat basolateral amygdala induces both anxiolytic and antipanic-like effects. **Behav. Brain Res**, v. 246, p. 103-110, 2013.

DE BORTOLI, V. C.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H., JR. Effects of fluoxetine and buspirone on the panicolytic-like response induced by the activation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacol (Berl)**, v. 183, n. 4, p. 422-8, Jan 2006.

DE MELLO CRUZ A.P. et al. Behavioral effects of systemically administered MK-212 are prevented by ritanserin microinfusion into the basolateral amygdala of rats exposed to the elevated plus-maze. **Psychopharmacol.**, v. 182, p. 345-354, 2005.

DE VRY, J. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. **Psychopharmacol.**, v. 121, n. 1, p. 1-26, 1995.

DE VRY, J. et al. 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. **Eur Neuropsychopharmacol.**, v. 14, n. 6, p. 487-95, Dec 2004.

DEAKIN J.F.W, SIMPSON M.D.C, ROYSTON M.C, SLATERP, MCKENNA P.J, BROPHY J. Social signalling and schizophrenia: The significance of neurochemical and morphological abnormalities of the basolateral circuit. **Schizophrenia Res.** 1991;4:357-360.

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

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G.; GUIMARAES, F. S. 5-HT receptor subtypes and the modulation of aversion. **C. serotonin receptors and psychotropic drugs**, p. 147-174, 1992.

DUMAN EN, KESIM M, KADIOGLU M, YARIS E, KALYONCU NI, ERCIYES N. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. **J. Pharmacol Sci**, v. 94, p. 161-165, 2004.

FANSELOW, M.S.; BOLLES, R.C. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 93, n. 4, p. 736-44, 1979.

FANSELOW, Michael S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: **The midbrain periaqueductal gray matter**. Springer US, p. 151-173, 1991.

FASMER, O. B.; BERGE, G.-O.; HOLE, K. Tonic regulation of nociception by descending monoaminergic pathways. **Pain**, v. 18, p. 326, 1984.

FASMER, O. B.; BERGE, O.-G.; HOLE, K. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5, 6-dihydroxytryptamine: different effects in the formalin and tail-flick tests. **Neuropharmacol.**, v. 24, n. 8, p. 729-734, 1985.

FASMER, O. B. et al. Effects of the putative 5-HT 1A receptor agonist 8-OH-2-(di-n-propylamino) tetralin on nociceptive sensitivity in mice. **Pharmacol Bioch. and Beh.**, v. 25, n. 4, p. 883-888, 1986.

FIELDS H. State-dependent opioid control of pain. **Nature Rev. Neurosc.**, v. 5, p. 565-575, 2004.

FIELDS HL. Pain modulation: expectation, opioid analgesia and virtual pain. **Prog. Brain Res.** 2000;122, 254-254.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed). **Wall and Melzack's textbook of pain**, v. 5, p.1-18, 2006.

FILE S.E.; JAMES T.A.; MACLEOD N.K. Depletion in amygdaloid 5-hydroxytryptamine concentration and changes in social and aggressive behaviour. **J. of Neural transmission**, v. 50, p. 1-12, 1981.

FOX R.J.; SORENSON C.A. Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. **Brain Res.**, v. 648, p. 215-221, 1994.

FRASER, H. F.; HARRIS, L. S. Narcotic and Narcotic Antagonist Analgesics. **Annual Rev. of Pharmacol.**, v. 7, p. 277, 1967.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 129-141, 1999.

GARBER J.C. et al. Guide for the care and use of laboratory animals. **The National Academic Press, Washington DC**, v. 8, p. 220, 2010.

GLASER, T.; DE VRY, J. Neurobiology of 5-HT 1A receptors. In: **Serotonin 1A receptors in depression and anxiety**. Raven Press New York, p. 35-53, 1992.

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.

GRAEFF F.G.; VIANA M.B.; MORA P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neurosc. & Biobehav. Reviews**, v. 21, p. 791-799, 1997.

GRAEFF F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Braz. J. of Med. Biol. Res.**, v. 14, p. 239-265, 1981.

GRAEFF, F.G. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res.**, vol. 58, n. 1-2, p. 123-31, 1993.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety: An enquiry into the function of the septo-hippocampal system**. n. 33, Oxford university press, 2003.

GREEN G.M.; SCARTH J.; DICKENSON A. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission; state-dependent actions via dorsal horn 5-HT₃ receptors in the anaesthetized rat. **Pain**, v. 89, p.81-88, 2000.

HACHE G., et al. Antinociceptive effects of fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression. **Neuroreport.**, v. 23, p. 525-529, 2012.

HACK S, NASH LT. The pharmacological treatment of anxiety disorders in children and adolescents. **Expert opinion on pharmacot**, v. 3, p. 555-571, 2002.

- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.
- HANNON J, HOYER D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behav, Brain Res.**, v. 195, p. 198-213, 2008.
- HARADA K, YAMAJI T, MATSUOKA N. Activation of the serotonin 5-HT_{2C} receptor is involved in the enhanced anxiety in rats after single-prolonged stress. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, v. 89, p. 11-16, 2008.
- HASNIE, F. S. et al. Mechanical and cold hypersensitivity in nerve-injured C57BL/6J mice is not associated with fear-avoidance- and depression-related behaviour. **Br. J. Anaesth.**, v. 98, n. 6, p. 816, 2007.
- HAYTHORNTHWAITE, J.A.; SIEBER, W.J.; KERNS, R.D. Depression and the chronic pain experience. **Pain**, vol. 46, n. 2, p. 177-184, 1991.
- HEINRICHER M.M. et al. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res. Reviews**, v. 60, p. 214-225, 2009.
- HEINRICHER, M.M.; MCGARAUGHTY, S. Pain-modulating neurons and behavioral state. **Handbook Behav. State Control**, p. 487-503, 1999.
- HELMSTETTER F.J.; BELLGOWAN, P.S. Lesions of the amygdala block conditional hypoalgesia on the tail flick test. **Brain Res.**, v. 612, p. 253-7, 1993.
- HENRY, J.P.; STEPHENS, P.M. **Stress health and the social environment: A sociobiological approach to medicine**. New York: Springer-Verlag, 1977.
- HODGES H, GREEN S, GLENN B. Evidence that the amygdala is involved in benzodiazepine and serotonergic effects on punished responding but not on discrimination. **Psychopharmacol.**, v. 92, p. 491-504, 1987.
- HOMBERG, J. R.; SCHUBERT, D.; GASPAR, P. New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. **Trends Pharmacol. Sci**, v. 31, n. 2, p. 60-5, Feb 2010.
- HOYER D, HANNON JP, MARTIN G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol. Biochem. and Beh.**, v. 71, p. 533-554, 2002.
- HOYER, D. Functional correlates of serotonin 5-HT₁ recognition sites. **J. of Receptor Res.**, v. 8, n. 1-4, p. 59-81, 1988.
- HUYSER, B.A., PARKER, J.C. Negative affect and pain in arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, vol. 25, n. 1, p. 105-121, 1999.
- JUNG AC, STAIGER T, SULLIVAN M. The efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors for the management of chronic pain. **J Gen Intern Med.**, v. 12, p. 384-9, 1997.
- KANDELL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Princip. of Neural Sci.** 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2000.

KESIM M, DUMAN EN, KADIOGLU M, YARIS E, KALYONCU NI, ERCIYES N. The different roles of 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 97, p. 61-6, 2005.

KRISHNAN, Vaishnav; NESTLER, Eric J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.**, vol. 23, p. 155-84, 2000.

LEDOUX, J.E. Cognitive-emotional interactions in the brain. **Cog. & Emot.**, v. 3, p. 267-289, 1989.

LEDOUX, J.E. Emotional memory systems in the brain. **Behav. Brain Res.**, vol. 58, n. 1-2, p. 69-79, 1993.

LEE, Claire; RODGERS, R. J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacol.**, v. 102, n. 4, p. 507-513, 1990.

LENT, R. Os sentidos do corpo: Estrutura e função do sistema somestésico. In: LENT, R. (Ed.). **Cem bilhões de neurônios: Conceitos fundamentais**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 209-239.

LI, Q. et al. Fluoxetine gradually increases [125I]DOI-labelled 5-HT_{2A/2C} receptors in the hypothalamus without changing the levels of G_q- and G₁₁-proteins. **Brain Res**, v. 775, n. 1-2, p. 225-8, Nov 14 1997.

LI, Q. et al. Brain region-specific alterations of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in serotonin transporter knockout mice. **J. of Neurochem.**, v. 84, n. 6, p. 1256-1265, 2003.

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

LOVICK, T.A. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: Role in adaptative behavioural responses. **Prog. Neurobiol.**, Amsterdam, v. 40, n.5, p. 631-644, 1993.

LU, W. L. et al. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen beta-cyclodextrin inclusion complexes in animals. **Biol. Pharm. Bull**, v. 27, n. 10, p. 1515-20, Oct 2004.

MacLEAN, P.D. Psychosomatic disease and the visceral brain; recent developments bearing on the Papez theory of emotion. **Psychosom. Med.**, vol. 11, n. 6, p. 338-53, 1949.

MAZER C. et al. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. **Brain Res.**, v. 760, p. 68-73, 1997.

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

MCCLEANE, G. Peripheral antinociceptive actions of desimipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. **Pain**, v. 85, n. 1-2, p. 311, 2000.

MCGARAUGHTY S, FARR DA, HEINRICHER MM. Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. **Brain Res.**, v. 1009, p. 223-227, 2004

McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci.**, v. 13, n. 6, p. 199-201, 1990.

McQuade R, Sharp T. Functional Mapping of Dorsal and Median Raphe 5-Hydroxytryptamine Pathways in Forebrain of the Rat Using Microdialysis. **J. of Neurochem.**, v. 69, p. 791-796, 1997.

MEAGHER, M. W. et al. Shock-induced hyperalgesia in rats: Dorsolateral funiculus lesions unveil hyperalgesia after long shock. In: **Society for Neuroscience Abstracts**, p. 653, 2000.

MENDES-GOMES, J. et al. Corticosterone does not change open elevated plus maze-induced antinociception in mice. **Horm. Behav.**, v. 60, n. 4, p. 408-13, Sep 2011.

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

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R. L. Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation. **Behav. Brain Res.**, v. 203, n. 2, p. 180-187, Nov 5 2009.

MERSKEY, H. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, Suppl. 3: S1-S225, 1986.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthetist.**, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

MEYER, Richard A. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. **Wall and Melzack's textbook of pain**, v. 5, p. 3-34, 2006.

MILLAN, MJ. The neurobiology and control of anxious states. **Prog. Neurobiol.**, v. 70, p. 83-244, 2003.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, vol. 57, n. 1, p. 1-167, 1999.

MILLAN, M.J. et al. 5-hydroxytryptamine (5-HT) 1A receptors and the tail-flick response. I. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin HBr-induced spontaneous tail-flicks in the rat as an in vivo model of 5-HT_{1A} receptor-mediated activity. **J. Pharmacol. Experim. Therap.**, v. 256, n. 3, p. 973-982, 1991.

MYERS, B.; DITTMAYER, K.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. Involvement of amygdaloid corticosterone in altered visceral and somatic sensation. **Behav. Brain. Res.**, v. 181, n. 1, p. 163-7, 2007.

NAKAGAWA A, UNO A, HORII A, KITAHARA T, KAWAMOTO M, UNO Y, KUBO T. Fos induction in the amygdala by vestibular information during hypergravity stimulation. **Brain Res.**, v. 986, p. 114-123, 2003.

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

- NEUGEBAUER, V. et al. Forebrain pain mechanisms. **Brain Res. Rev.**, v. 60, n. 1, p. 226-42, 2009.
- NEUGEBAUER, V., WEIDONG, L., GARY, C.B., HAN, J.S. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, vol. 10, n.3, p. 221-234, 2004.
- NI, Y. G.; MILEDI, R. Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, n. 5, p. 2036-40, Mar 4 1997.
- NISHI M, WHITAKER-AZMITIA PM, AZMITIA EC. Enhanced synaptophysin immunoreactivity in rat hippocampal culture by 5-HT_{1A} agonist, S100b, and corticosteroid receptor agonists. **Synapse**, v. 23, p. 1-9, 1996.
- 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. **Psychopharmacol.**, v. 150, n. 3, p. 300-310, Jun 2000.
- NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; RODGERS, R. J. Effects of intra-hippocampal infusion of WAY-100635 on plus-maze behavior in mice. Influence of site of injection and prior test experience. **Brain Res**, v. 927, n. 1, p. 87-96, Feb 8 2002.
- NUNES-DE-SOUZA, V. 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.
- OTSUKA N, KIUCHI Y, YOKOGAWA F, MASUDA Y, OGUCHI K, HOSOYAMADA A. Antinociceptive efficacy of antidepressants: assessment of five antidepressants and four monoamine receptors in rats. **J. Anesth.**, v. 15, p. 154-8, 2001.
- PALVIMAKI, E. P. et al. Differential effects of fluoxetine and citalopram treatments on serotonin 5-HT_{2C} receptor occupancy in rat brain. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v. 2, n. 2, p. 95-99, Jun 1999.
- PAXINOS G, FRANKLIN KB. The mouse brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**. San Diego. 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. **Psychopharmacol.**, v. 182, n. 4, p. 551-561, Nov 2005.
- PELARIN V, BAPTISTA-DE-SOUZA D, CANTO-DE-SOUZA A. Differential roles of amygdala and insula in the modulation of empathy for pain in mice. **Physiology and Behaviour**, 2015. (Artigo submetido para publicação).
- PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosc. Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.
- POMPEIANO M.; PALACIOS J.M.; MENGOD G. Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. **Mol. Brain Res.**, v. 23, p. 163-178, 1994.
- PRICE, D.D.; DUBNER, R. Neurons that subserve the sensory-discriminative aspects of pain. **Pain**, 3(4): 307-38, 1977.

RAYMOND, J. R. et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacol. Ther.**, v. 92, n. 2-3, p. 179-212, Nov-Dec 2001.

Rhudy J.L.; Meagher M.W. Negative affect: effects on an evaluative measure of human pain. **Pain**, v. 104, p. 617-626, 2003.

RIZVI, T.A. et al. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **J. Comp. Neurol.**, vol. 303, n. 1, p. 121-31, 1991.

SAH, P. et al. The amygdala complex: anatomy and physiology. **Physiol. Rev.**, vol. 83, n. 3, p. 803834, 2003.

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

SAWYNOK, J.; ESSER, M. J.; REID, A. R. Peripheral antinociceptive actions of desipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. **Pain**, v. 82, n. 2, p. 149-158, 1999.

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

SHI, C.; DAVIS, M. Pain pathways involved in fear conditioning measured with fear-potentiated startle: lesion studies. **J. Neurosci.**, vol. 19, n. 1, p. 420-430, 1999.

SHIH, Y. Y. I. et al. Brain nociceptive imaging in rats using F-18-fluorodeoxyglucose small-animal positron emission tomography. **Neurosci.**, v. 155, n. 4, p. 1221-1226, Sep 9 2008.

SIKKA, P. et al. Study of antinociceptive activity of SSRI (fluoxetine and escitalopram) and atypical antidepressants (venlafaxine and mirtazepine) and their interaction with morphine and naloxone in mice. **J. Pharmacy Bioallied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 412, 2011.

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

SOMMER C, KRESS M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci. Letters** 2004;361:184-187.

SOMMER C, KRESS M. Is serotonin hyperalgesic or analgesic? **Curr. Pain Headache Rep.**, v. 10, n. 2, p. 101-6, Apr 2006.

SPATH, M. Current experience with 5-HT₃ receptor antagonists in fibromyalgia. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, v. 28, n. 2, p. 319-28, 2002.

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

STEPHENS, D. N. et al. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity?. **Psychopharmacol.**, v. 90, n. 2, p. 166-169, 1986.

STONE KJ, VIERA AJ, PARMAN CL. Off-label applications for SSRIs. **Am. Fam. Physician**, v. 68, p. 498-504, 2003.

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

SWANSON, L.W., PETROVICH, G.D. What is the amygdala? **Trends Neurosci.**, vol. 21, n. 8, p. 323-31, 1998.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. **Neurosci.**, v. 48, n. 2, p. 485-490, 1992.

TANIMOTO S. et al. Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical somatic and visceral pains in rats. **Eur. J. Neuroscience**, v. 18, p. 2343-2350, 2003.

TEIXEIRA, J. M. Fisiopatologia da dor aguda e crônica. **Manual para clínico. Atheneu, São Paulo**, p. 9-23, 2006.

TOMKINS, G.E. et al. Treatment of chronic headache with antidepressants: a meta-analysis. **Am. J. Med**, v. 111, n. 1, p. 54-63, Jul 2001.

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

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

VICENTE M.A.; ZANGROSSI H. Involvement of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors of the basolateral nucleus of the amygdala in the anxiolytic effect of chronic antidepressant treatment. **Neuropharmacol.**, v. 79, p. 127-35, 2014.

WHITAKER-AZMITIA PM, AZMITIA EC. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. **Neurosci. Letters**, v. 67, p. 307-312, 1986.

WHITAKER-AZMITIA PM, Druse M, Walker P, Lauder JM. Serotonin as a developmental signal. **Behav. Brain Res.**, v. 73, n. 12, p. 19-29, 1996.

WILLIS, W.D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 308(1136): 253-70, 1985.

ZANGROSSI H.; VIANA M.B.; GRAEFF F.G. Anxiolytic effect of intra-amygdala injection of midazolam and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin in the elevated T-maze. **Europ. J. Pharmacol.**, v. 369, p. 267-270, 1999.

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

ZANOVELI, J. M. et al. Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. **Int. J. Neuropsychopharmacol**, v. 13, n. 8, p. 1079-88, Sep 2010.



ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO
CARLOS PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA
*Comissão de Ética no Uso de
Animais*

Via Washington Luís, km. 235 - Caixa
Postal 676 Fones: (016) 3351.8025 /
3351.9679

Fax: (016) 3351.8025

CEP 13560-970 - São Carlos -

SP - Brasil ceua@ufscar.br -

www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais n° 029/2014

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa *Avaliação dos efeitos da fluoxetina nos receptores 5-HT1A e 5-HT2C da amígdala sobre a antinocicepção em camundongos*, submetido pelo pesquisador **Ligia Renata Rodrigues Tavares**.

São Carlos, 16 de Setembro de 2014

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

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais