

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

Heloísa Máximo Ribeiro

Envolvimento da neurotransmissão ocitocinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na modulação da ansiedade e nocicepção induzidas pelo convívio com o coespecífico com dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

São Carlos, SP
2025

Heloísa Máximo Ribeiro

Envolvimento da neurotransmissão ocitocinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na modulação da ansiedade e nocicepção induzidas pelo convívio com o coespecífico com dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF-UFSCar/UNESP), da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

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

São Carlos-SP

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Heloísa Máximo Ribeiro, realizada em 20/05/2025.

Comissão Julgadora:

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

Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta (UNESP)

Prof. Dr. Diego Cardozo Mascarenhas (UEM)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

*À minha família, presente e eterna, humana e não-
humana.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que por meio de Nossa Senhora Aparecida aliviou minhas dores para que eu desse prosseguimento aos seus planos para minha vida, mesmo com todas as peculiaridades e intricamentos inerentes a esse ser.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF), que me acolheram com gentileza juntamente com a Prof.^a Heloísa, minha xará, coordenadora-presidente do PIPGCF, que confiou em meu trabalho, intelectual e artístico. Obrigada.

Às Comissões Executiva (CE) e de Pós-graduação (CPG), das quais pude participar como representante discente suplente, junto à minha fiel e escudeira, amiga e alma partilhada, Rosa. Obrigada pela parceria que se tornou eterna.

Ao Laboratório de Psicologia da Aprendizagem e minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Azair Canto de Souza, que partilharam um pouco do que construíram ao longo de décadas com uma completa desconhecida e quase-completa alheia ao mundo da psicologia.

Aos meus colegas de programa, mestrandos e doutorandos, vocês são luz.

Às minhas novas amigas construídas em meio a muitas alegrias e angústias: Isa, Lê e Cá, vocês foram céu estrelado em noite de vendaval.

Às Dr.^a (s) Maria Alice e Hirla, que confiaram no meu trabalho e me apoiaram de todo coração para a conclusão deste texto. Obrigada, queridas.

À minha família presente, que não mediu e nem mede esforços para me ver feliz: Vinícius, Elaine, Joaquim, Luiz Filipe, Letícia, Idail, Luiz, Simone, Anderson, Murilo, Viviane, Junior, Miguel, Leia e BB; e à minha família eterna, em especial à vó Tonha, uma rosa do deserto; ao Fredy, o cão feroz e incompreendido; e ao Peggy, minha doce e insólita alma gêmea azul; vocês fazem falta. Obrigada, do fundo do meu coração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo (nº do processo: 88887.841802/2023-00 e 0001).

“(...) Conheço pessoalmente a dor.

A sua residência, longe,

Em caminhos inesperados.

Às vezes sento-me à sua porta, na sombra das suas árvores

E ouço dizer:

“Quem visse, como vês, a dor, já não sofriria”.

E olho para ela, imensamente.

Conheço há muito tempo a dor.

Conheço-a de perto.

Pessoalmente.”

(Cecília Meireles)

RESUMO

A dor é considerada uma “experiência sensorial e emocional” que pode ou não estar relacionada a um dano tecidual. Empatia é definida como “o compartilhamento de emoções entre indivíduos e a adoção do ponto de vista do outro”, sendo fundamental para a convivência destes. Estudos apontam que camundongos que convivem com o parceiro com dor crônica, apresentam aumento da ansiedade e da nocicepção. A ocitocina, um neurohormônio agonista dos receptores ocitocinérgicos, produzido e liberado pelo sistema hipotálamo-neuro-hipófise, está envolvida nos processos afetivos, estresse, cognição e comportamento social, e sua redução relaciona-se a transtornos psiquiátricos como depressão e ansiedade. O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) é um dos principais sítios de produção da ocitocina. Levando em consideração que processos nociceptivos promovem o aumento da síntese de ocitocina pelo PVN, e que o convívio com o parceiro com dor crônica promove aumento de FosB nessa região, este estudo teve como objetivo avaliar o envolvimento da neurotransmissão ocitocinérgica do PVN na modulação da ansiedade e nocicepção induzidas pelo convívio com o coespecífico com dor crônica em camundongos machos e fêmeas. Para isso, camundongos machos e fêmeas suíço-albinos foram alojados em quartetos após o desmame. Em cada quarteto, um animal passou pela cirurgia de constrição do nervo isquiático, tornando-se demonstrador da dor, ou pela cirurgia semelhante, tornando-se um controle Sham, após 14 dias de convívio. Os animais observadores (Ob-Sham e Ob-CNC) tiveram uma cânula implantada no crânio, direcionada ao PVN, e no 28º dia de experimento receberam injeções intra-PVN de salina 0,9%, ocitocina (1,0 µg/0,1µL) e/ou atosibana (0,4 µg/0,1µL, antagonista tendencioso dos receptores de ocitocina). Posteriormente, foram avaliados no LCE e pelo teste de contorções abdominais para comportamentos do tipo-ansiedade e nocicepção, respectivamente. Como resultado, o convívio com coespecífico com dor promoveu a hipernocicepção nos machos e nas fêmeas, e aumento dos comportamentos do tipo-ansiedade em machos. Além disso, as injeções intra-PVN de ocitocina foram capazes de reverter a hipernocicepção em ambos os sexos. Quanto aos comportamentos do tipo ansiedade, a ocitocina falhou em reduzi-los nos machos, mas promoveu redução nas fêmeas Ob-CNC em relação ao controle Ob-CNC salina. A atosibana reduziu a hipernocicepção dos machos e modificou alguns comportamentos avaliados no LCE de machos e fêmeas. As injeções combinadas de atosibana e ocitocina realizadas nos machos tendeu a aumentar os comportamentos tipo-ansiedade nos Ob-Sham e reduzi-los nos Ob-CNC, não apresentando efeitos na nocicepção. Portanto, o presente trabalho encontrou evidências da participação do sistema ocitocinérgico do PVN no controle da hipernocicepção e dos comportamentos do tipo-ansiedade em camundongos machos e fêmeas que conviveram com coespecífico com dor crônica.

Palavras-chave: empatia; dor; ansiedade; fêmeas; camundongos; ocitocina; PVN; atosibana.

ABSTRACT

Pain is considered a “sensory and emotional experience” that may or may not be related to tissue damage. Empathy is defined as “the sharing of emotions between individuals and the adoption of the other individual's point of view”, which is fundamental to their coexistence. Studies show that mice living with a partner in chronic pain exhibit increased anxiety-like behaviors and hypernociception. Oxytocin, a neurohormone agonist of oxytocinergic receptors, produced and released by the hypothalamus-neurohypophysis system, is involved in affective processes, stress, cognition and social behavior, and its reduction is related to psychiatric disorders such as depression and anxiety. The paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) is one of the sites of oxytocin production. Considering that nociceptive processes promote an increase in oxytocin synthesis in the PVN, and that living with a partner with chronic pain promotes an increase in FosB in the same region, this study aimed to evaluate the involvement of oxytocinergic neurotransmission in the PVN in the modulation of anxiety and nociception induced by living with a partner with chronic pain in male and female mice. To this end, male and female Swiss-Albino mice were housed in quartets after weaning. In each quartet, one animal underwent sciatic nerve constriction surgery, becoming a pain demonstrator, or similar surgery, becoming a Sham control, after 14 days of cohabitation. The observer animals (Ob-Sham and Ob-CNC) had a cannula implanted in the skull, directed to the PVN, and on the 28th day of the experiment received intra-PVN injections of saline 0.9%, oxytocin (1.0 µg/0.1 µL) and/ or atosiban (0.4 µg/0.1 µL, oxytocin receptor biased antagonist). Subsequently, they were evaluated in the EPM and by the writhing test for anxiety-like behaviors and nociception, respectively. As a result, living with a conspecific with pain promoted hypernociception in males and females, and increased anxiety-like behaviors in males. In addition, intra-PVN injections of oxytocin were able to reverse hypernociception in both sexes. Regarding anxiety-like behaviors, oxytocin failed to reduce them in males but did reduce them in Ob-CNC females compared to the Ob-CNC saline control. Atosiban reduced hypernociception in males and changed some behaviors assessed in the EPM of males and females. Combined injections of atosiban and oxytocin in males tended to increase anxiety-like behaviors in Ob-Sham and reduce it in Ob-CNC, with no effect on nociception. Therefore, the present study found evidence of the participation of the PVN oxytocinergic system in the control of hypernociception and anxiety-like behaviors in male and female mice that lived with a conspecific in chronic pain.

Key-words: empathy; pain; anxiety-like behaviors; females; mice; oxytocin; PVN; atosiban.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado das vias da dor e estruturas-chave da "matriz da dor".	20
Figura 2 – Estrutura da classificação da dor crônica segundo a IASP.....	23
Figura 3 - Classificação da dor neuropática crônica segundo a CID-11.....	25
Figura 4 - Modelo para unificação das diferentes perspectivas utilizadas na interpretação da empatia, enfatizando a percepção-ação como uma classe superordenada.....	36
Figura 5 - Modelo da “Boneca Russa” para a evolução da empatia.	37
Figura 6 - Representação esquemática das cascatas intracelulares ativadas após a ligação da ocitocina ao seu receptor.	49
Figura 7 - Injeções realizadas.....	63
Figura 8 - Delineamento Experimental.....	66
Figura 9 - Levantamento de óbitos por momento: convívio, constrição e estereotaxia.....	69
Figura 10 - Representação esquemática das regiões acessadas através da cirurgia estereotáxica.	83

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 - Cirurgia estereotáxica em camundongo.....	58
Imagem 2 - Cirurgia de constrição do nervo isquiático.	59
Imagem 3- Aparato para divisão das caixas-moradia durante o teste nociceptivo do observador.	62
Imagem 4 - Testes comportamentais.....	62
Imagem 5 - Injeção intra-PVN.	64
Imagem 6 - Exemplo de acerto do sítio de injeção (PVN).	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição do tipo de estímulo para cada nociceptor e as fibras que os conduzem. ..	18
Quadro 2 - Constituição dos axônios aferentes primárias e suas respectivas características, seus estímulo para ativação e limite térmico.	19
Quadro 3 - Terminologias utilizadas por diversos autores para se referirem à empatia subdivididas de acordo com uma visão percepção-ação dos fenômenos.	35
Quadro 4 - Manifestações comportamentais da empatia nos animais não-humanos.	38
Quadro 5 - Exemplos de estímulos para a liberação de ocitocina no SNC e no sangue.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação dos pesos dos camundongos machos.	71
Tabela 2 - Variação dos pesos dos camundongos fêmeas.	72
Tabela 3 - Valores de latência, basal e pós-operatória, dos grupos Sham e CNC machos, e respectivos valores de p das comparações.....	74
Tabela 4 - Valores de latência, basal e pós-operatória, dos grupos Sham e CNC fêmeas, e respectivos valores de p das comparações.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de observadores utilizados divididos de acordo com o sexo, o tipo de convívio e a droga injetada.	68
Gráfico 2 - Número de demonstradores utilizados divididos de acordo com o sexo e o tipo de cirurgia (Sham ou CNC).	69
Gráfico 3 - Variação dos pesos dos camundongos machos.	71
Gráfico 4 - Variação dos pesos dos camundongos fêmeas.	72
Gráfico 5 - Comparação entre as medidas repetidas de latência de retirada da pata (antes e após a cirurgia) e entre as latências pós-operatória dos machos dos grupos Sham e CNC.	73
Gráfico 6 - Comparação entre as medidas repetidas de latência de retirada da pata (antes e após a cirurgia) e entre as latências pós-operatória das fêmeas dos grupos Sham e CNC.	74
Gráfico 7 - Medidas convencionais e etológicas obtidas através do LCE de camundongos machos que receberam injeções combinadas intra-PVN e conviveram em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.	77
Gráfico 8 - Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, no número de contorções de camundongos machos avaliados no teste de contorções abdominais após conviverem em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.	78
Gráfico 9 - Medidas convencionais e etológicas obtidas através do LCE de camundongos fêmeas que receberam injeções combinadas intra-PVN e conviveram em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.	80
Gráfico 10 - Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, no número de contorções de camundongos fêmeas avaliadas no LCE após conviverem em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.	82

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

Δ ou δ - Delta

γ - Gama

♂ - Macho

♀ - Fêmea

$\pm$ - Mais ou menos

® - Marca registrada

SUMÁRIO

1

1 INTRODUÇÃO · 17

1.1 DOR · 17

1.1.1 Definição e fisiologia · 17

1.1.2 Classificação · 21

1.1.2.1 Duração: Aguda e Crônica · 21

1.1.2.1.1 Dor Nociceptiva · 23

1.1.2.1.2 Dor Neuropática · 24

1.1.2.1.3 Dor Nociplástica · 26

1.1.2.2 Mecanismos Fisiopatológicos · 22

1.1.4 Epidemiologia e Relevância do Estudo da Dor · 27

1.1.4.1 Diferenças no Processamento da Dor Entre os Sexos · 28

1.2 ANSIEDADE · 30

1.2.1 Definição e Fisiologia · 30

1.2.2 Ansiedade Patológica · 32

1.2.3 Modelos Animais · 32

1.3 EMPATIA · 34

1.3.1 Conceitos e Modelo de Percepção-Ação · 34

1.3.2 A Evolução do Conceito de Empatia e sua Expressão nas Diversas Espécies · 36

1.3.3 Neuroanatomia · 39

1.3.4 A Importância da Empatia nas Relações Sociais · 40

1.4 OCITOCINA · 41

1.4.1 Contextualização e Fisiologia · 41

1.4.1.1.4 Mecanismos, Estímulos e Regiões Envolvidos na Liberação no SNC · 45

1.4.2 A Ocitocina no SNC · 42

1.4.2.1 Sítios de Síntese no SNC · 43

1.4.2.2 Receptores: Bioquímica e Distribuição · 43

1.4.2.3 Projeções · 44

1.4.2.4 Mecanismos de Ação · 48

1.4.3 A Ocitocina nos Tecidos Periféricos · 50

1.4.3.1 Sítios de Síntese e Receptores · 50

1.4.3.2 Estímulos para Liberação · 51

1.4.3.3 Mecanismos de Ação · 51

1.4.4 O Sistema Ocitocinérgico do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo · 52

1.4.5 Antagonistas · 53

2

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS · 55

2.2 Objetivos Gerais · 55

2.3 Objetivos Específicos · 55

2.3.1 Machos · 55

2.3.2 Fêmeas · 55

3

3. MATERIAIS E MÉTODOS · 56

3.1 ANIMAIS · 56

3.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS	56
3.3	FÁRMACOS	57
3.4	CIRURGIAS	57
3.4.1	Cirurgia Estereotáxica	57
3.4.2	Cirurgia de Constrição do Nervo Isquiático	59
3.5	TESTES	60
3.5.1	Demonstradores	60
3.5.1	Teste da Placa Quente	60
3.5.2	Observadores	60
3.5.2.1	Teste para Avaliação dos Comportamentos do Tipo-ansiedade	60
3.5.2.2	Teste Nociceptivo	61
3.6	INJEÇÃO INTRA-PVN	62
3.7	HISTOLOGIA	64
3.8	PROCEDIMENTOS GERAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	65
3.9	DADOS: ARMAZENAMENTO, PROCESSAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	66

4

4.	RESULTADOS	68
4.1	INFORMAÇÕES GERAIS	68
4.1.1	Número de Animais	68
4.1.2	Monitoramento do Peso	70
4.1.2.1	Machos	70
4.1.2.2	Fêmeas	72
4.2	DEMONSTRADORES	73
4.2.1	Comparação das latências de retirada da pata: antes e após a constrição do nervo isquiático no mesmo grupo e entre as latências 14 dias após a cirurgia de camundongos Sham e CNC	73
4.2.1.1	Machos	73
4.2.1.2	Fêmeas	74
4.3	OBSERVADORES	75
4.3.1	Machos	76
4.3.1.1	Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, nos comportamentos do tipo-ansiedade avaliados através do LCE em animais que conviveram com coespecífico com dor crônica ou Sham	76
4.3.1.1.1	Efeitos das injeções combinadas de salina e ocitocina (S-OXT) nos comportamentos do tipo-ansiedade	76
4.3.1.1.2	Efeitos das injeções combinadas de salina e atosibana (S-ATOS) nos comportamentos do tipo-ansiedade	76
4.3.1.1.3	Efeitos das injeções combinadas de atosibana e ocitocina (ATOS-OXT) nos comportamentos do tipo-ansiedade	76
4.3.1.2	Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, na nocicepção avaliada através do teste de contorções abdominais em animais que conviveram com coespecífico com dor crônica	78
4.3.1.2.1	Efeitos das injeções combinadas de salina e ocitocina (S-OXT) na nocicepção	78
4.3.1.2.2	Efeitos das injeções combinadas de atosibana e salina (ATOS-S) na nocicepção	78
4.3.1.2.3	Efeitos das injeções combinadas de atosibana e ocitocina (ATOS-OXT) na nocicepção	79
4.3.2	Fêmeas	79
4.3.2.2	Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, nos comportamentos do tipo-ansiedade avaliados através do LCE em animais que conviveram com coespecífico com dor crônica ou Sham	79
4.3.2.2.1	Efeitos das injeções combinadas de salina e ocitocina (S-OXT) nos comportamentos do tipo-ansiedade	79
4.3.2.2.2	Efeitos das injeções combinadas de atosibana e salina (ATOS-S) nos comportamentos do tipo-ansiedade	80
4.3.2.3	Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, na nocicepção avaliada através do teste de contorções abdominais em animais avaliados no que conviveram com coespecífico com dor crônica	82
4.3.2.3.1	Efeitos das injeções combinadas de salina e ocitocina (S-OXT) na nocicepção	82
4.3.2.3.2	Efeitos das injeções combinadas de atosibana e salina (ATOS-S) na nocicepção	82

6

6 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS · 94

7

7 CONCLUSÃO · 95

8

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS · 96

9

9 ANEXOS · 107

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). · 107

ANEXO B – Medidas convencionais e etológicas obtidas através do LCE de camundongos machos que receberam injeções combinadas intra-PVN e conviveram em quartetos com coespecífico CNC ou Sham. · 108

ANEXO C – Valores de H para a comparação entre os animais machos que receberam salina (controle) e os animais que receberam os diferentes tratamentos farmacológicos, dentro do mesmo grupo experimental (Ob-Sham ou Ob-CNC). · 109

ANEXO D – Medidas convencionais e etológicas obtidas através do LCE de camundongos fêmeas que receberam injeções combinadas intra-PVN e conviveram em quartetos com coespecífico CNC ou Sham. · 110

ANEXO E – Valores de H para a comparação entre os animais fêmeas que receberam salina (controle) e os animais que receberam os diferentes tratamentos farmacológicos, dentro do mesmo grupo experimental (Ob-Sham ou Ob-CNC). · 111

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR

1.1.1 Definição e fisiologia

Segundo a Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a, ou semelhante à associada a, danos teciduais reais ou potenciais”¹. Apesar de considerada uma experiência negativa, a dor possui uma função fisiológica importante, funcionando como um mecanismo protetivo que visa reconhecer e sinalizar estímulos potencialmente deletérios à homeostase do organismo a tempo de o indivíduo formular uma resposta contra o agente danoso². Assim, a capacidade de percepção de estímulos externos e da diferenciação entre inócuos e danosos possibilita aos organismos uma melhor adaptação ao ambiente e consequentemente, maior chance de sobrevivência.

Neurônios são células altamente especializadas consideradas primordiais para a percepção do ambiente externo por participarem desde a recepção do estímulo, doloroso ou não, até em seu processamento e consequentemente sua modulação. A condução e o processamento da informação captada são possíveis tanto pela sua capacidade de transdução de um estímulo externo em um impulso elétrico quanto pela sua divisão funcional que permite a condução desse estímulo até as vias cerebrais superiores e posteriormente a resposta de tais vias até a periferia. Assim, o neurônio pode ser dividido em regiões funcionais, além de ser classificado em dois principais grupos, de acordo com sua especialização no que tange a direção de condução do estímulo, que serão abordadas a seguir^{3,4}.

A divisão funcional do neurônio compreende três principais regiões: corpo celular (ou soma), dendritos - ambos responsáveis por receberem a transmissão sináptica do neurônio pré-sináptico, e axônio (com ou sem mielina), que conduz o impulso elétrico através do mesmo

neurônio. Já sua classificação principal compreende dois tipos de neurônios especializados: neurônios sensoriais, com terminações axônicas capazes de captarem estímulos externos e direcioná-los ao corno dorsal da medula espinhal (neurônios aferentes primários) e posteriormente conectá-la às vias cerebrais superiores (neurônios aferentes secundários), para o processamento da informação; já os neurônios motores levam a informação das vias cerebrais superiores e da medula espinhal até os respectivos órgãos efetores, como os músculos³.

A percepção dos estímulos ambientais pelos neurônios sensoriais envolve a participação de receptores somatossensoriais especializados na percepção de estímulos mecânicos (incluindo a propriocepção), térmicos, químicos e dolorosos presentes em seus terminais axônicos e distribuídos em diversos órgãos periféricos, como a pele, os músculos e as articulações. Estão presentes também nestas regiões estruturas denominadas nociceptores, que consistem em receptores especializados para a identificação exclusiva de estímulos álgicos de diferentes tipos, os quais são classificados em térmicos, mecânicos e polimodais, de acordo com o estímulo que os ativam (quadro 1)⁴.

Quadro 1 - Descrição do tipo de estímulo para cada nociceptor e as fibras que os conduzem.

Tipo de nociceptor	Estímulo	Fibra
<i>Térmico</i>	Temperaturas acima de 45°C (115°F) e abaixo de 5°C (41°F)	Aδ e C
<i>Mecânico</i>	Pressão intensa	Aδ
<i>Polimodal</i>	Estímulos de alta intensidade: térmicos (quente ou frio), mecânicos ou químicos	C

Fonte Kandel, *et al.* (2021).

Nota Elaborado por Ribeiro, H.M.

Os nociceptores podem ser ativados isoladamente de acordo com sua classe ou, em diversas situações, a depender da intensidade do estímulo, podem ser ativadas as três simultaneamente. A ativação, por sua vez, gera duas diferentes “fases” de transmissão do

estímulo: a primeira, conhecida como “primeira dor” - transmitida por fibras A δ a partir de nociceptores térmicos e/ou mecânicos, que consiste em um estímulo de curta duração, agudo e acentuado; e um estímulo secundário, conhecido como “segunda dor”, transmitido por fibras C a partir de nociceptores polimodais, prolongado, incômodo e mais difuso⁴. Alguns autores afirmam que a primeira e a segunda dor são percebidas pelo organismo em tempos ligeiramente diferentes graças às diferentes velocidades de condução do estímulo por cada tipo de fibra. O quadro 2 compreende um resumo dos diferentes tipos de axônios aferentes primários e suas respectivas características de mielinização, diâmetro, velocidade de condução do impulso nervoso, tipos de estímulo e limiares de temperatura para ativação^{5,6}.

Quadro 2 - Constituição dos axônios aferentes primários e suas respectivas características, seus estímulo para ativação e limite térmico.

Axônios aferentes primários	Características	Estímulo	Limite térmico
<i>Fibras Aα e Aβ</i>	Mielinizadas Grande diâmetro Condução muito rápida	Propriocepção, toque suave	Não há
<i>Fibras Aδ</i>	Pouco mielinizadas Médio diâmetro (1-6 μ m) Condução rápida (5-36 m/s)	Nocicepção (mecânica, térmica e química)	~53°C Tipo I ~43°C Tipo II
<i>Fibras C</i>	Não mielinizadas Pequeno diâmetro (0.2-1 μ m) Condução lenta (0.2-1 m/s)	Temperatura inócua, prurido, nocicepção (mecânica, térmica e química)	~43°C

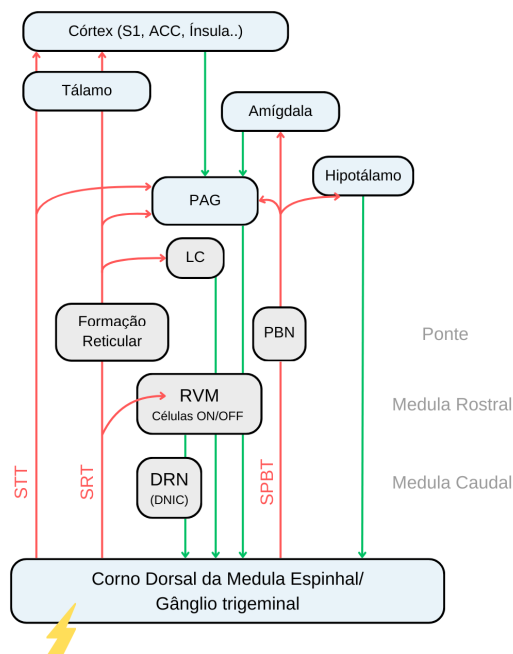
Fonte Orr, *et al.* (2017) e Karcz, *et al.* (2024).

Nota Elaborado por Ribeiro, H.M.

Considerando os mecanismos neurofisiológicos da dor, pode-se afirmar que a nocicepção engloba quatro estágios: (1) transdução, no qual o estímulo nocivo inicial (mecânico, térmico ou polimodal) é captado pelos nociceptores e convertido em eventos químicos no tecido, para então ser transformado em impulsos elétricos nos neurônios; (2) transmissão, do sinal que passou por transdução através das vias neuronais, envolvendo

terminais pré e pós-sinápticos até sua chegada nas vias cerebrais superiores; (3) modulação, que envolve as modificações da atividade neuronal através das vias de transmissão citadas, podendo promover tanto uma regulação positiva quanto negativa da dor; (4) e a percepção, que ocorre através de uma ativação complexa de diversas regiões corticais responsáveis pela experiência consciente e subjetiva da dor, como os córtices somatossensorial primário e secundário, regiões límbicas como cíngulo, ínsula e amígdala, tronco cerebral, hipocampo, córtices orbitofrontal, anterolateral e pré-frontal, entre outras^{3,6}.

Figura 1 - Esquema simplificado das vias da dor e estruturas-chave da "matriz da dor".



Vias ascendentes em vermelho e descendentes em verde. Os quadros azuis representam vias inervadas por fibras ocitocinérgicas. LC, locus coeruleus; PAG, substância cinzenta periaquedutal; PBN, núcleo parabraquial; RVM, medula rostroventral; STT, trato espino-talâmico; SRT, trato espino-reticular; SPBT, trato espino-parabraquial.

Fonte Poisbeau, *et al.* (2017)

Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

Dessa forma, após um estímulo, a dor é transmitida até o corno dorsal da medula através de fibras aferentes primárias e posteriormente até o encéfalo por suas vias ascendentes, denominadas tratos, onde é processada em diversas estruturas⁷. Os tratos espino-talâmico, espino-reticular e espino-mesencefálico são considerados importantes para essa transmissão aferente da nocicepção⁸. Como consequência, vias descendentes, inibitórias ou facilitadoras da dor, formulam e enviam a resposta até a periferia, seja para suprimir a resposta nociceptiva,

seja para mantê-la ou aumentá-la em condições de estímulo prolongado⁹. A Figura 1 representa um diagrama simplificado das vias da dor superiores e de estruturas importantes que compõem a chamada “matriz da dor”¹⁰.

Quando os estímulos externos se tornam exacerbados e provocam mudanças duradouras no organismo, as vias da dor podem sofrer modificações em diversos níveis, envolvendo desde os neurônios sensoriais primários até a medula e o cérebro, perdendo seu importante papel adaptativo¹¹. Em muitas ocasiões, a dor duradoura pode atuar como uma fonte de desequilíbrio ao organismo, tornando-se em muitos casos a própria doença². Dessa forma, a dor passou a ser classificada em diversas modalidades através de sistemas de classificação, com o objetivo principal de possibilitar a identificação de suas causas e a prescrição de terapêuticas eficientes para cada caso^{5,12}.

1.1.2 Classificação

Classificar a dor é um processo importante principalmente para a prática clínica, porém muitas vezes desafiador graças aos mecanismos dinâmicos e complexos que a envolvem⁵. Assim, a fim de proporcionar um tratamento efetivo para a dor, é importante considerar todos os aspectos que a envolvem, desde sua etiologia e duração, até fatores de risco individuais de cada paciente^{5,13}.

1.1.2.1 Duração: Aguda e Crônica

A classificação da dor quanto à sua duração é fundamental para diferenciar a dor fisiológica (aguda) da dor patológica (crônica). A dor aguda associa-se a um dano pontual e imediato, podendo ser dividida nas fases inicial e subaguda: na fase inicial, que dura poucos segundos, o cérebro envia sinais de alerta para o corpo sobre a possível ameaça; na fase subaguda, que pode durar por horas, o corpo ativa mecanismos de proteção para recuperar os danos sofridos³. Dessa forma, observa-se o papel protetivo da dor quando presente por curtos

períodos. Quando a dor persiste ou se repete por períodos maiores que três meses, deixa de ser considerada aguda e passa a ser classificada como crônica¹².

A IASP apresentou de maneira sistemática uma classificação para os diferentes tipos de dor crônica para a Classificação Internacional de Doenças (CID-11), seja ela apresentada como sintoma de uma patologia ou sendo a própria doença¹². Dessa forma, a dor crônica pode ainda ser classificada em primária, na qual é concebida como uma doença, ou em síndromes de dor crônica secundárias, onde apresenta-se inicialmente como um sinal clínico de outra doença (Figura 1, coluna esquerda e direita, respectivamente)¹².

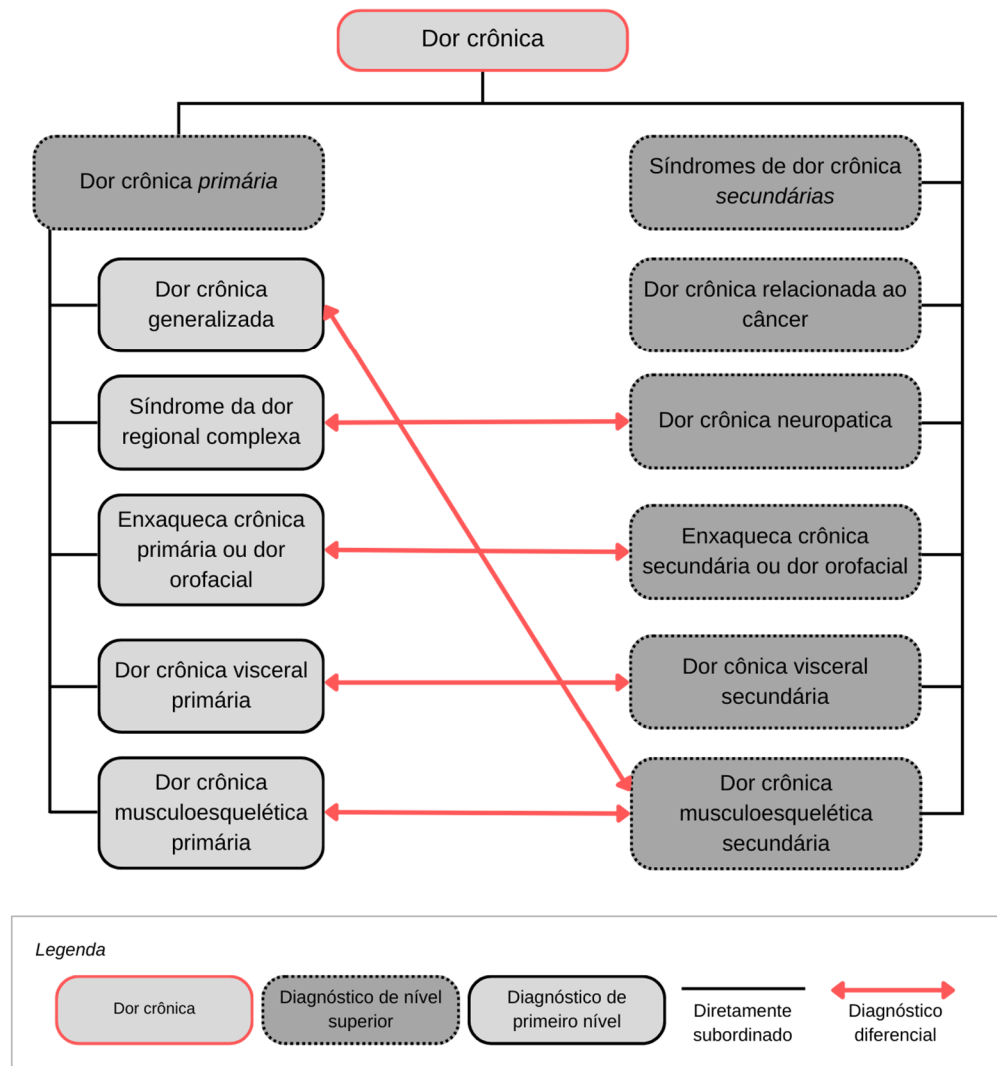
Treede e colaboradores (2019) apresentaram ainda diagnósticos secundários e terciários para processos crônicos complexos como a dor relacionada ao câncer e a dor crônica neuropática, além de apresentarem pontuações para a classificação da severidade da dor em intensidade, níveis de distresse, interferência nas atividades diárias, curso temporal e presença de fatores psicossociais¹². A partir disso, observa-se como a dor crônica pode ser deletéria aos indivíduos que convivem com ela, e o quão complexo e longo pode ser seu processo diagnóstico.

1.1.2.2 Mecanismos Fisiopatológicos

Estudos mais recentes e guidelines sobre a dor procuram abordá-la de uma forma mais direcionada em relação à sua etiopatologia. Observa-se uma diversidade de artigos sobre doenças crônicas que possuem a dor como sintoma ou comorbidade, a exemplo têm-se a neuropatia diabética, a dor relacionada ao câncer, a dor pélvica e a dor orofacial¹⁴⁻¹⁷. Essa tendência ocorre com o objetivo de entender a dor de uma maneira mais especializada no que tange seus mecanismos fisiopatológicos, melhorando os métodos diagnósticos e terapêuticos a serem aplicados⁵.

Apesar de se encontrar na literatura diversos mecanismos que permitem a classificação de diferentes tipos de dor^{2,3,5,6,18}, para o presente trabalho serão destacadas as três classificações reconhecidas pela IASP: nociceptiva, neuropática e nociplástica^{1,18,19}.

Figura 2 – Estrutura da classificação da dor crônica segundo a IASP.



Fonte Treede, *et al.* (2019)

Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

1.1.2.1.1 Dor Nociceptiva

A dor nociceptiva é a resposta normal do corpo a um estímulo nocivo, seja nos órgãos superficiais como pele e músculos, seja nos órgãos internos, como as vísceras ou os ossos^{5,19}.

Seu mecanismo de ocorrência envolve a transdução, transmissão, percepção e modulação citados anteriormente. Suas duas subcategorias envolvem a dor somática, referente a lesões no sistema musculoesquelético (superficiais, como um corte na pele, ou profundas, como uma fratura de quadril), e visceral, ou “dor referida” visceral, relacionada a lesões internas nos órgãos⁵.

O termo “dor referida” origina-se do fato de existir uma convergência das aferências nociceptivas somáticas e visceral na mesma região medular, fazendo com que a dor visceral seja percebida como uma dor em uma região superficial do corpo, não sendo que os centros superiores identifiquem qual a origem exata do estímulo⁴. Por fim, sobre a dor visceral, existe um tipo específico de nociceptores denominados silentes, ativados principalmente por processos inflamatórios e agentes químicos, os quais acredita-se estarem associados à hiperalgesia secundária e sensibilização central, presentes principalmente na dor crônica^{3,4}.

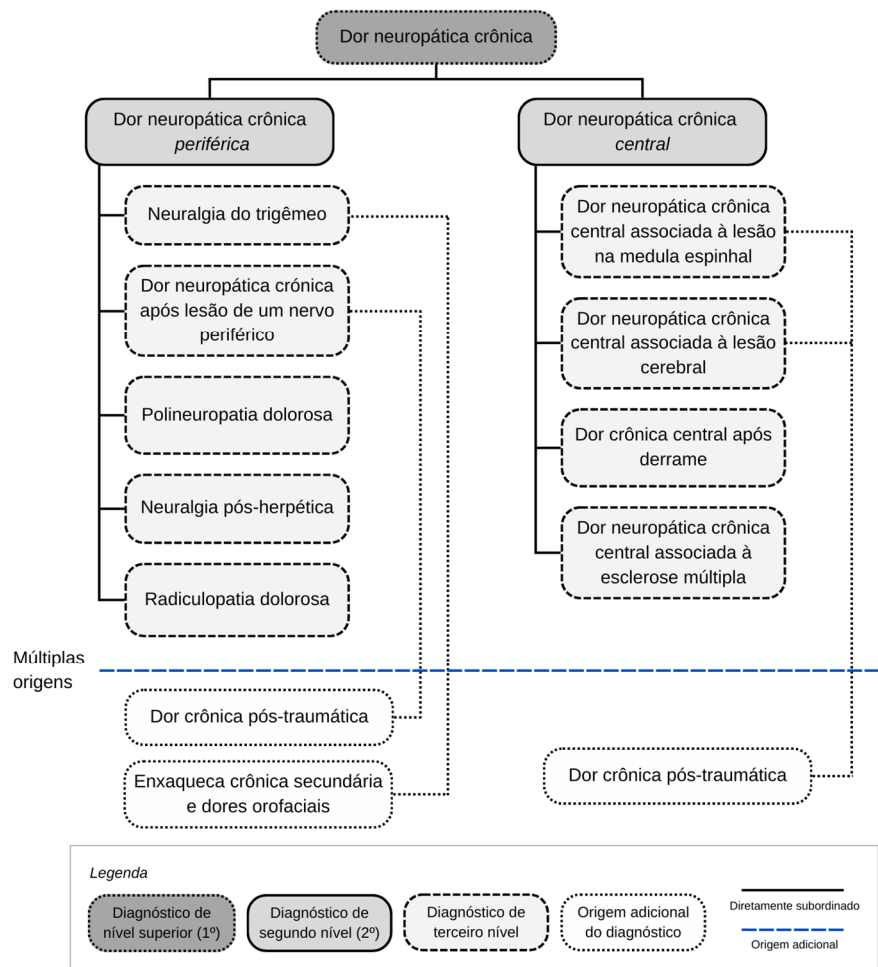
1.1.2.1.2 Dor Neuropática

A dor neuropática origina-se de danos diretos ao sistema somatossensorial, prejudicando não somente suas funções, mas modificando a sensibilidade do indivíduo à dor²⁰. Essa modalidade é dividida em duas grandes categorias: doenças do sistema nervoso periférico e central²⁰, brevemente explicitadas na figura 2. Além do mais, ambas categorias também podem apresentar duas classes de sinais sensoriais: positivos ou negativos^{20,21}.

Os sinais sensoriais positivos decorrem de um aumento da sensibilidade à nocicepção, podendo-se citar: alodinia, na qual estímulos não dolorosos desencadeiam uma resposta dolorosa; hiperalgesia, na qual ocorre um aumento da intensidade da sensação de dor, seja por um estímulo nociceptivo ou não; e dor paroxística, onde estímulos não nociceptivos desencadeiam surtos rápidos e curtas sensações de choques elétricos^{21,22}. Já os sinais sensoriais negativos envolvem déficit na função nociceptiva, podendo-se citar: hipoestesia, com redução

da sensibilidade a estímulos não dolorosos, vibratórios (“*pall-hypoesthesia*”) ou térmicos (“*termo-hypoesthesia*”); ou hipoalgesia, onde ocorre redução da sensibilidade a estímulos dolorosos. A parestesia (sensação de formigamento) também é um sinal da presença de neuropatia, porém, apesar de incômoda, não é um sinal doloroso²¹.

Figura 3 - Classificação da dor neuropática crônica segundo a CID-11.



Fonte Scholz, *et al.* (2019)

Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

Assim, observa-se a dor neuropática como um exemplo clássico de dor patológica principalmente por estar presente em doenças crônicas que envolvem processos inflamatórios importantes e desequilíbrios metabólicos, como o diabetes, as intoxicações, traumas extensos

como amputações (“dor do membro fantasma”), tumores, dor regional complexa, neuralgias (trigêmeo e pós-herpética), esclerose múltipla e derrame^{3,4,20}.

1.1.2.1.3 Dor Nociplástica

O conceito de dor nociplástica foi proposto em 2016 para descrever estados de dor crônica que não se enquadravam nos conceitos de dor nociceptiva e dor neuropática, mas que apresentavam alteração na função nociceptiva a partir da avaliação clínica^{18,19}. Assim, por definição, tem-se:

“Dor que surge a partir de uma nocicepção alterada apesar de não haver evidências claras de dano tecidual real ou potencial que cause a ativação de nociceptores periféricos ou evidência de doença ou lesão do sistema somatossensorial que leve à dor”¹⁹

O terceiro descritor da dor foi proposto para ser utilizado em indivíduos que apresentem dor crônica com evidências de alteração no processamento da nocicepção. Além disso, alguns indivíduos podem desenvolver a dor nociplástica por uma alteração no processamento nociceptivo desencadeada por uma dor nociceptiva, por exemplo, fazendo com que seja considerada não apenas a dor nociceptiva, mas uma segunda via ativada pela disseminação da hipersensibilidade, a da dor nociplástica. Por isso, o novo descritor não é sinônimo de dor idiopática nem deve ser utilizado para dor de origem desconhecida, já que é necessária a constatação de modificação nos mecanismos da nocicepção para seu diagnóstico¹⁹.

A dor nociplástica pode se manifestar em quaisquer tipos de dor crônica, sendo mais frequente em diagnósticos como fibromialgia, cistite intersticial/síndrome da bexiga dolorosa, síndrome do intestino irritável, dor lombar crônica, dor de cabeça tensional e enxaqueca, e disfunção temporomandibular. Em tais casos, a dor passou a ser definida como primária, fato que a considera o problema principal, e não a consequência de outra patologia. Além da dor, os

indivíduos frequentemente apresentam fadiga, distúrbios do sono, disfunção cognitiva, depressão e ansiedade¹³.

Quanto as alterações referentes às redes cerebrais de pessoas com dor nociplástica, estudos de neuroimagem apontaram aumento da conectividade funcional entre as regiões das redes de modo padrão, composta principalmente pelo córtex pré-frontal medial e cíngulo posterior/precuneus (*default mode network* – DMN)²³, de saliência (*saliency network* – SLN)²⁴, que possui centros nos córtices insular e cíngulo anterior, e da rede sensório-motora (*sensorimotor network* – SMN)²⁵, ligada aos córtices sensoriais e motores primários. Além do mais, existem evidências da presença de alterações no sistema modulador descendente da dor, responsável por regular a atividade no corno dorsal da coluna vertebral e consequentemente como o estímulo periférico chega ao cérebro, que pode promover déficits na modulação descendente da dor ou facilitação da de sua percepção²⁶. Por fim, pessoas com dor nociplástica apresentam redução nos níveis de noradrenalina e serotonina²⁷ e aumento dos níveis de opióides endógenos²⁸, ambos no líquido.

Desse modo, apesar de não se entender exatamente quais mecanismos patológicos desencadeiam a ocorrência da dor nessa modalidade, o sexo feminino, estresse elevado durante as fases iniciais da vida, traumas, sono de baixa qualidade, sensibilidade somática aumentada e inatividade física são fatores de risco¹³.

1.1.4 Epidemiologia e Relevância do Estudo da Dor

A partir deste momento, pode-se perceber a complexidade dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia da dor. Para além de suas multifaces, observa-se um aumento no número de indivíduos que a experimentam em diferentes níveis, os quais apresentam consequentemente limitações em sua rotina, redução de sua qualidade de vida e aumento dos gastos econômicos com a saúde, tornando a dor uma questão de saúde pública^{29,30}. Estudos recentes apontam que

cerca de 20,5% da população dos Estados Unidos apresenta dor na maioria dos dias ou todos os dias, fato que torna a dor crônica uma das doenças mais comuns no país³⁰.

No Brasil, uma revisão sistemática apontou a prevalência de 35,7% para a dor crônica em adultos e de 47,32% em idosos. Os autores reportaram ainda uma associação entre dor crônica e: sexo feminino, idade avançada, baixa escolaridade, atividade ocupacional intensa ou pesada, consumo excessivo de álcool para mulheres, tabagismo para homens e ex-fumante para ambos os sexos, obesidade abdominal, ansiedade, humor e transtorno mental; pouco tempo para lazer, sedentarismo e autopercepção negativa da saúde²⁹.

Pereira e colaboradores (2017) constataram que indivíduos com dor apresentam 2,1 vezes mais transtornos de ansiedade, 3,3 vezes mais transtornos de humor e 2,7 vezes mais transtornos mentais, à época, do DSM-IV (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders*)³¹. Stubbs e colaboradores (2017) afirmaram ainda que, em comparação com a ausência de depressão, pacientes com depressão subsindrômica, episódio depressivo breve e episódio depressivo apresentam respectivamente 2,16, 1,45 e 2,11 vezes mais chances de apresentarem dor intensa. Além disso, o artigo pontuou a associação significativa entre dor intensa e depressão em 44 de 47 países estudados³².

1.1.4.1 Diferenças no Processamento da Dor Entre os Sexos

Como apresentado anteriormente, o sexo é um dos fatores de risco para o desenvolvimento da dor crônica. Além disso, apesar de a literatura apresentar evidências de que haja diferenças no processamento e na percepção da dor entre ambos os sexos, os mecanismos pelos quais essa diferença ocorre ainda são incertos³³⁻³⁹. Em termos gerais, sabe-se que mais mulheres do que homens apresentam cefaleia do tipo tensional e enxaqueca, distúrbios temporomandibulares, síndrome do intestino irritável, artrite reumatoide e fibromialgia,

enquanto mais homens buscam tratamento para cefaleia em salvas, úlceras, pancreatite e neuralgia pós-herpética do trigêmeo³³.

Mogil (2012), em um artigo de opinião, propôs três explicações mutuamente exclusivas para o fato de a dor crônica ser mais prevalente em pacientes do sexo feminino⁴⁰: (1) o fato de as mulheres buscarem mais ajuda médica e conseqüentemente referirem quadros de dor mais do que os homens; (2) serem mais suscetíveis a síndromes que possuem a dor crônica como sintoma; (3) apresentarem maior sensibilidade ou menor tolerância a dor, causados tanto por características do sexo biológico quanto por diferenças nas vias ascendentes da transmissão da dor, da modulação descendente ou de fenômenos psicológicos associados (como experiências prévias e estado psicológico atual)³⁹.

Filligim e Ness (2000) revisaram pesquisas com animais de experimentação e humanos e encontraram evidências que apontam para os hormônios sexuais como uma influência importante no processamento da dor e da analgesia em fêmeas³⁴. Mogil e colaboradores (2000) encontraram diferenças na nocicepção térmica e no efeito antinociceptivo da morfina nos diferentes sexos em associação a diferentes genótipos⁴¹.

Ademais, Sorge e Totsch (2016) apontaram evidências da participação do sistema imune na modulação da transição e manutenção da dor crônica, juntamente com a influência dos hormônios sexuais na modificação da atividade de tais células. Os autores afirmam que mulheres (naturalmente com maiores níveis de estrogênio e menores de testosterona) apresentam níveis mais altos de IFN- γ e conseqüente predisposição a maiores níveis de células Th-1 (pró-inflamatórias), fato que não ocorre em homens pelos maiores níveis de testosterona e conseqüente supressão da diferenciação das células TCD41, alterando a distribuição das células para o subtipo Th-2 (antinflamatório)³⁶. Assim, acredita-se que as diferenças no sistema imune causadas pelos diferentes hormônios sexuais não afetem somente o surgimento de

doenças relacionadas a esse sistema, como a predisposição de mulheres para doenças autoimunes⁴² e de homens para a sepse⁴³, mas também na mediação da dor pelo SNC.

Apesar de todas as evidências apontadas para as diferenças no processamento da dor entre os sexos, as pesquisas de base ainda enfrentam um problema quanto a amostragem de seus participantes: a não inclusão de indivíduos do sexo feminino⁴⁴. Mogil e Chanda (2005) construíram uma importante revisão sobre o uso dos machos e fêmeas em pesquisas de base: analisando-se os artigos publicados na revista *Pain*, que utilizam animais de experimentação, nos últimos dez anos da publicação da revisão, observou-se que 79% deles utilizam apenas machos. Além disso, 5% utilizaram ambos os sexos sem diferenciar seus resultados, e 3% não referiram o sexo dos animais. Buscando minimizar a não inclusão de fêmeas em estudos científicos, Becker *et al.* (2005) descreveram métodos e procedimentos que podem auxiliar pesquisadores a incluírem a investigação das diferenças sexuais em suas pesquisas envolvendo tanto animais quanto humanos⁴⁵. Assim, questionar-se sobre as possíveis diferenças sexuais dentro dos objetivos de cada pesquisa é uma atitude que se mostra fundamental para os tempos atuais.

Em conclusão, observa-se a dor não apenas como uma resposta fisiológica intrínseca, mas como um mecanismo multifacetado que engloba aspectos físicos e psicológicos individuais. Sua complexidade fisiopatológica atrelada ao seu potencial incapacitante e ao aumento de sua incidência tornam necessários estudos que abordem todas as suas faces. Otimizar seu diagnóstico e prognóstico permitirá a redução de seus efeitos deletérios melhorando a qualidade de vida de seus portadores.

1.2 ANSIEDADE

1.2.1 Definição e Fisiologia

A ansiedade é definida como “um estado mental que é suscitado em antecipação de ameaça ou de ameaça potencial, resultando em estado de maior vigilância mesmo na ausência de ameaça imediata”⁴⁶⁻⁴⁸. Ela é caracterizada por um aumento no estado de vigilância do indivíduo, implicando tanto em alterações psicológicas, como aumento das preocupações e dos pensamentos negativos, quanto em alterações fisiológicas como sudorese, alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca, consideradas fundamentais para o preparo para situações potenciais de luta ou fuga^{46,48}. Além de preparar o corpo para uma situação potencial, a ansiedade também possui uma relação estreita com a eficiência e a performance em determinadas tarefas⁴⁹.

Yerkes e Dodson postularam em 1908 um modelo que relaciona ansiedade, estímulo e performance: à medida que a força do estímulo aumenta, a formação de hábitos e/ou a performance melhoram até um ponto máximo, a partir do qual a intensidade do estímulo é tão elevada que a ansiedade gerada leva a efeitos deletérios na formação do hábito, criando uma curva no formato de U invertido⁵⁰. Apesar de muito citada, a lei de Yerkes-Dodson é também muito criticada atualmente graças a estaticidade e generalidade de seus dados, que causam uma consequente aplicação inadequada em certos casos⁵¹. Alguns autores propuseram outras teorias baseadas em exemplos práticos e experimentação que se tornaram mais aceitas por englobarem as variabilidades individuais e as mudanças que o desempenho pode sofrer ao longo do tempo apesar da intensidade do estímulo^{52,53}.

Dessa forma, a ansiedade é considerada um mecanismo fisiológico importante para a ativação dos sistemas de alerta responsáveis por detectar ameaças à homeostase. Além disso, a reação ansiogênica de cada organismo à cada estímulo, bem como a intensidade das alterações fisiológicas por ela provocadas, variam de acordo com o histórico individual, sendo difícil prever o nível de ansiedade que cada situação irá gerar para cada organismo⁴⁹. Quando os níveis

de ansiedade permanecem elevados de maneira persistente, deletéria e desproporcional à situação enfrentada, pode-se considerar o fenômeno como sendo patológico^{48,54}.

1.2.2 Ansiedade Patológica

Segundo o Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais (DSM-5):

“Os transtornos de ansiedade se diferenciam do medo ou da ansiedade adaptativos por serem excessivos ou persistirem além de períodos apropriados ao nível de desenvolvimento. Eles diferem do medo ou da ansiedade provisórios, com frequência induzidos por estresse, por serem persistentes (p. ex., em geral durando seis meses ou mais), embora o critério para a duração seja tido como um guia geral, com a possibilidade de algum grau de flexibilidade (...). Como os indivíduos com transtornos de ansiedade em geral superestimam o perigo nas situações que temem ou evitam, a determinação primária do quanto o medo ou a ansiedade são excessivos ou fora de proporção é feita pelo clínico, levando em conta fatores contextuais culturais.”⁵⁴

O DSM-5 classifica a ansiedade patológica em diferentes transtornos de acordo com os tipos de objetos ou situações que induzem medo e ansiedade, com os comportamentos de esquiva gerados e com a ideação cognitiva associada, sendo eles: transtorno de ansiedade de separação (TAS), mutismo seletivo, fobia específica, transtorno de ansiedade social (fobia social), transtorno de pânico (TP), agorafobia, transtorno de ansiedade generalizada (TAG), transtorno de ansiedade devido a outra condição médica, outro transtorno de ansiedade especificado, transtorno de ansiedade não especificado⁵⁴.

Apesar de cada diagnóstico apresentar estímulos desencadeantes e características diferentes, as manifestações somáticas, cognitivas e comportamentais afetam de maneira deletéria a qualidade de vida dos pacientes, prejudicando suas relações sociais, suas capacidades cognitivas e sua situação econômica, devido a gastos com consultas, exames e medicamentos^{48,55,56}.

1.2.3 Modelos Animais

Considerando a importância do estudo da ansiedade e seus transtornos relacionados, diversos modelos animais foram desenvolvidos buscando-se compreender a ocorrência do fenômeno. Cada modelo desenvolvido possui vantagens e desvantagens específicas que devem ser levadas em consideração de acordo com os objetivos do estudo. Como alguns exemplos de modelos animais utilizados para a avaliação dos comportamentos do tipo-ansiedade pode-se citar: modelos incondicionados, ou etologicamente fundamentados, como modelo de estresse induzido por predador, isolamento social e de separação materna dos neonatos; e modelos condicionados, ou de aprendizagem associativa, como estresse de restrição, ansiedade condicionada ao medo e derrota social. Existem também modelos específicos para a avaliação dos efeitos de diferentes drogas, além da possibilidade de uso animais geneticamente modificados para a expressão dos comportamentos tipo-ansiedade (seja para o aumento ou redução). Cada modelo pode utilizar um ou mais testes comportamentais que avaliem diversos parâmetros relacionados à ansiedade, tendo como exemplos o campo aberto, a caixa claro-escuro, o labirinto-zero elevado, o teste de alimentação suprimida por novidade e o labirinto em cruz elevado (LCE), dentre diversos outros⁵⁷.

O LCE, utilizado para avaliar comportamentos do tipo-ansiedade, é um aparato capaz de evocar simultaneamente medo e curiosidade. Ele se baseia na tendência natural dos roedores de explorarem ambientes novos e em sua aversão inata a locais desprotegidos (como os braços abertos)⁵⁸. Assim, o aparato é capaz de avaliar tanto a ansiedade quanto a outros comportamentos: o aumento da ansiedade reduz a permanência dos animais nos braços abertos (aumentando a permanência nos fechados e no centro, e reduzindo as entradas nos abertos), e modifica comportamentos exploratórios, denominados como medidas etológicas, reduzindo comportamentos desprotegidos e de avaliação de risco⁵⁸⁻⁶¹. Por fim, a atividade locomotora dos animais pode ser avaliada pelo registro das entradas nos braços fechados e pelo total de entradas⁶², considerada uma medida convencional. Todas essas medidas passivas de serem

coletadas por meio do LCE podem ser utilizadas em diversos modelos experimentais: testes farmacológicos, para se observar os efeitos de agentes ansiolíticos e possíveis efeitos motores, testes comportamentais de modelos animais geneticamente modificados, como modelos para o autismo, entre outros⁵⁷.

1.3 EMPATIA

1.3.1 Conceitos e Modelo de Percepção-Ação

O conceito de empatia vem sendo estudado ao longo de muitos anos, e recebeu contribuições não apenas da fisiologia, mas da filosofia, teologia, psicologia, etologia e neurociência⁶³. A primeira descrição do conceito de empatia foi feita por Lipps a partir do termo alemão “*Einfühlung*”, traduzido para o inglês como “*feeling into*”, que enfatizava a natureza involuntária da ação de “sentir pelo outro”, sem necessitar de aprendizado, associação ou raciocínio para que ocorresse⁶⁴. Apesar da ideia inicial, algumas teorias passaram a considerar que a empatia permitiria que um indivíduo acessasse a mente de outro e simulasse como se sentiria em seu lugar, privilegiando mecanismos cognitivos em detrimento da emoção, e consequentemente excluindo crianças pequenas e espécies não humanos do fenômeno⁶⁵. A partir de então, autores diversos passaram a investigar se a empatia seria primariamente um fenômeno cognitivo ou emocional⁶³.

Para além da problemática em se definir sua natureza e os níveis cognitivos necessários para sua ocorrência, têm-se o questionamento a respeito de quais comportamentos poderiam ou não ser considerados empáticos, já que os artigos se utilizavam de diversos termos para se referirem a comportamentos específicos, classificando-os como empáticos ou não a depender de critérios e embasamentos próprios (Quadro 3)⁶³.

Assim, objetivando definir se os comportamentos relacionados à empatia descritos na literatura, simples ou complexos do ponto de vista cognitivo, seriam ou não considerados

comportamentos empáticos, Preston e De Waal (2002) combinaram dados a respeito da fisiologia e neuroanatomia funcional e desenvolveram o modelo de “percepção-ação” para o conceito de empatia. Assim, nesse modelo, afirma-se que:

“A percepção assistida do estado do objeto ativa automaticamente as representações do sujeito sobre o estado, a situação e o objeto, e a ativação dessas representações automaticamente inicia ou gera as respostas autonômicas e somáticas associadas, a menos que sejam inibidas”.⁶³

Quadro 3 - Terminologias utilizadas por diversos autores para se referirem à empatia subdivididas de acordo com uma visão percepção-ação dos fenômenos.

Termo	Definição	Distinção eu/outro?	Correspondência entre estados?	Ajuda?	Sinônimos
Contágio Emocional	O estado do sujeito resulta da percepção do estado do objeto	Não	Sim	Não	Angústia pessoal Emoção vicária Transferência emocional
Simpatia	O sujeito sente "pena" do objeto. Enfoque para a situação do objeto do que no seu estado físico	Sim	Não	Depende	-
Empatia	O estado do sujeito resulta da percepção assistida do estado do objeto	Sim	Nível representativo, não necessariamente visível	Aumenta com a familiaridade, similaridade e importância	-
Empatia Cognitiva	O sujeito representa o estado do objeto através de processos top-down	Sim	Não	Depende	Empatia verdadeira Tomada de perspectiva
Comportamento pró-social	Tomada de ação para reduzir o sofrimento do objeto	Normalmente	Não necessariamente	Sim	Ajuda, socorro

Fonte Preston & De Waal (2002)

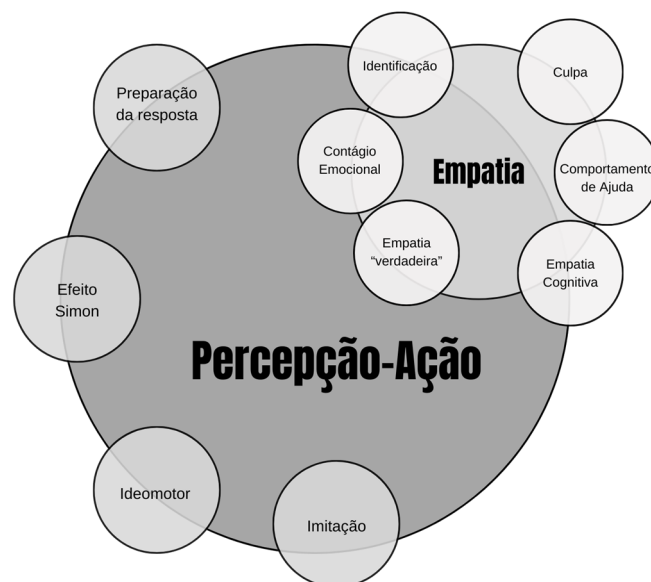
Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

Nesse aspecto têm-se o objeto como sendo o indivíduo primário que vivenciou a emoção, e o sujeito como o indivíduo secundário que experimentou/compreendeu a emoção/o estado do objeto através da empatia. Complementarmente, os autores afirmam que a relação ou

dependência entre o sujeito e o objeto são tidas como fundamentais para a empatia, observando-se que quanto mais relacionados forem o sujeito e o objeto, mais fácil será para o sujeito processar o estado do objeto e formular uma resposta⁶³.

Através desse modelo, a empatia pôde ser interpretada como um conceito amplo, passando a abrigar todos os comportamentos – desde os mais básicos como a imitação, até os cognitivamente complexos, como a tomada de perspectiva – que necessitem da percepção-ação como mecanismo básico (Figura 3)⁶³.

Figura 4 - Modelo para unificação das diferentes perspectivas utilizadas na interpretação da empatia, enfatizando a percepção-ação como uma classe superordenada.



Fonte Preston & De Waal (2002)

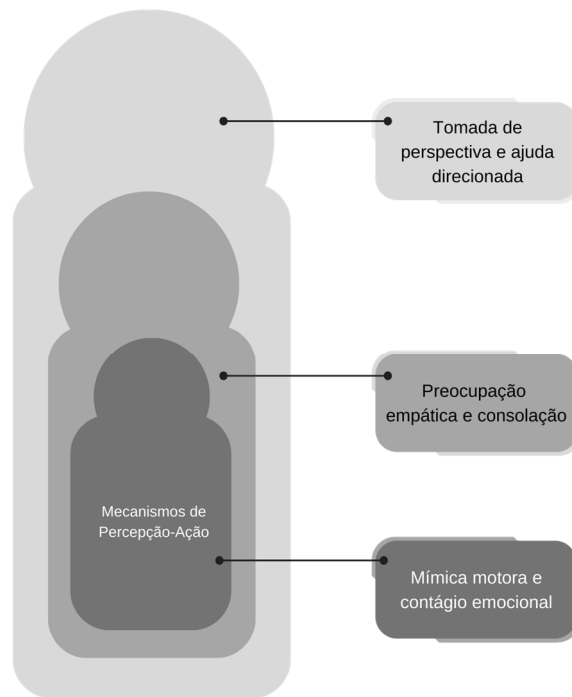
Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

1.3.2 A Evolução do Conceito de Empatia e sua Expressão nas Diversas Espécies

A definição mais recente de empatia a considera como sendo “o compartilhamento de emoções entre indivíduos e a adoção do ponto de vista do outro”⁶⁶, e não uma dedução cognitiva a partir do estado emocional de outro indivíduo⁶⁷. Essa definição construída por De Waal e Preston (2017) buscou ainda se referir à empatia como um termo “guarda-chuva”, que abriga

fenômenos emocionais e cognitivos e refere-se a diversos processos que partem de observadores percebendo estados emocionais de outros indivíduos e ativando suas próprias representações de tal estado⁶⁶.

Figura 5 - Modelo da “Boneca Russa” para a evolução da empatia.



Fonte De Waal & Preston (2017)

Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

Considerando-se a empatia como um termo “guarda-chuva”, os autores partiram do conceito de percepção-ação citado anteriormente para elencarem em “camadas” comportamentos considerados funcionalmente integrados (através da empatia), mas que evoluíram exigindo diferentes níveis de processamento cognitivo. Para isso, utilizam-se do modelo da “Boneca Russa” no qual: a “boneca”, ou camada, mais interna refere-se ao mecanismo básico de percepção-ação – que induz um estado semelhante no observador em relação ao objeto – e representa comportamentos básicos como a mímica motora e o contágio emocional; e as “bonecas” mais externas representam comportamentos que exigem maiores níveis de processamento cognitivo, maior capacidade de diferenciação entre o próprio sujeito e

objeto, e maior capacidade de regulação das emoções, como ocorre na preocupação empática e na tomada de perspectiva (Figura 4)⁶⁶.

Quadro 4 - Manifestações comportamentais da empatia nos animais não-humanos.

Comportamento	Definição	Mecanismos	Espécies não-humanas
Espelhamento	Correspondência rápida com as expressões faciais e mapeamento dos movimentos	Mímica motora	Chimpanzés Orangotangos Babuínos-gelada Macacos
Contágio de bocejos	Bocejar em resposta ao bocejo de outro indivíduo	Mímica motora	Chimpanzés, Macacos, Cães, Periquitos
<i>State Matching</i>	Compartilhamento do estado emocional de outro indivíduo	Contágio emocional	Camundongos, Ratos, Frangos
Consolação	Confortar um indivíduo em dificuldade	Preocupação empática que se baseia no contágio emocional e requer autorregulação	Chimpanzés, Bonobos, Macacos, Cães, Elefantes, Ratos, Camundongos, Galinhas
Ajuda aprendida	Liberar outro indivíduo ou aliviar sua dor	Ajuda motivada pelo contágio emocional e requer autorregulação e aprendizagem por tentativa e erro	Macacos Ratos
Ajuda direcionada	Ajuda adaptada à necessidade ou situação específica de outro indivíduo	Ajuda motivada pelo contágio emocional e requer autorregulação e tomada de perspectiva	Símios Cebíneos Golfinhos Elefantes

Fonte De Waal & Preston (2017)

Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

Portanto, a “boneca-russa” representa o grande fenômeno da empatia, a qual abriga desde comportamentos simples até mais complexos. Apesar de exigirem diferentes níveis de processamento cognitivo, todas as “bonecas” externas abrigam em seu interior a primeira “boneca”: o mecanismo de percepção-ação. Assim, o novo modelo criado para elencar comportamentos que se inserem no fenômeno da empatia e sua nova definição aprimorada permitiram explicar sua ocorrência não somente em humanos, mas também em animais não humanos. A partir disso, diversos comportamentos considerados expressões da empatia foram

relatados tanto por pesquisas experimentais quanto por observação em diversas espécies (Quadro 4)⁶⁶.

Saber que a empatia ocorre não somente em animais humanos mostra o quão diversos são seus mecanismos e suas funções dentro de cada dinâmica social. Além disso, o estudo de sua ocorrência nas diversas espécies possibilita a troca de conhecimentos adquiridos através da saúde única e da medicina translacional, possibilitando o desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapêuticos mais eficientes para possíveis patologias associadas.

1.3.3 Neuroanatomia

Considerando a diversidade de comportamentos descritos dentro do fenômeno da empatia e seus respectivos níveis de complexidade no que tange circuitos neurais, diversas regiões do SNC estão envolvidas na neuroanatomia da empatia⁶³. Em 1992 foi descrita pela primeira vez uma classe de células presentes no SNC de macacos que eram ativadas tanto através de ações direcionadas a objetos, quanto pela observação de outro indivíduo, experimentador⁶⁸ ou animal⁶⁹, realizando a mesma ação direcionada ou uma ação semelhante. Tais células foram denominadas “*mirror neurons*”, ou neurônios espelho, termo que enfatiza sua capacidade de refletir ações observadas e ativar substratos neurais envolvidos no planejamento e na execução de ações⁶⁹.

Os estudos mais atuais sobre o mecanismo de espelho mostram que as informações observadas, que possuem relação com o outro, são mapeadas nos substratos neurais envolvidos no processamento de eventos relacionados ao próprio indivíduo, e envolvem conexões cerebrais com regiões associadas à ação motora, às sensações, emoções, decisões e representações espaciais em diversas espécies⁷⁰. Assim, espécies como roedores, aves e morcegos, para além dos humanos e outros primatas, apresentam uma distribuição diferente de tais células no tecido

cerebral e consequentemente uma rede de conexões específica com uma complexidade variável⁷¹.

A descoberta dos neurônios espelho foi um marco que transformou os rumos de diversas pesquisas tanto com animais, mas principalmente com humanos. Os principais tópicos relacionados aos neurônios espelho envolvem percepção (auditiva, especial, toque), domínios de linguagem (gestos, discursos, vocalização), cognição (memória, aprendizagem, imagens), emoções, ação motora e cognição social (imitação, empatia, compreensão da ação)⁷⁰.

Aproximadamente 60% dos estudos existentes envolvendo neurônios espelho foram performados na área da saúde com humanos, além disso, aproximadamente 30% dos estudos envolveram pesquisas comportamentais e o estudo de patologias associadas aos tópicos citados, como o autismo, derrames e doenças neurodegenerativas⁷¹. Assim, apesar de alguns autores acreditarem que a temática dos neurônios espelho se esgotou, Bonini e colaboradores (2022) reiteram sua importância, por iniciarem a discussão sobre percepção social e os consequentes substratos neurais envolvidos⁷¹.

Como exemplos de substratos neurais muito estudados no fenômeno da empatia, e que vão além da temática dos neurônios espelho, têm-se diferentes regiões do córtex cingulado, córtex pré-frontal, ínsula, amígdala, locus coeruleus e tálamo participando da regulação de comportamentos inseridos nesse contexto⁷². Apesar das evidências, muitos estudos ainda precisam ser realizados a fim de se explicar o papel exato de cada região encefálica, uni ou bilateral, bem como de suas projeções, tanto nos mecanismos fisiológicos quanto nos patológicos associados à empatia.

1.3.4 A Importância da Empatia nas Relações Sociais

Do ponto de vista evolutivo, a capacidade de perceber e reagir às emoções expressas por outros indivíduos aperfeiçoa a interação entre ambos, facilitando a comunicação, expressão

de comportamentos e consequentemente, melhorando as chances de sobrevivência das espécies⁷³. Disfunções nos mecanismos neurais da empatia são tão significativos que podem induzir transtornos, como o do espectro autista (TEA)⁷⁴, psicopatias⁷⁵, transtorno de personalidade narcisista⁷⁶, transtorno de personalidade antissocial e transtorno bipolar⁷⁷. Assim, como brevemente abordado acima, apesar de cada transtorno possuir características diagnósticas específicas, todos apresentam como aspecto comum uma redução na capacidade de interação social, evidenciando como a empatia, em seus diferentes níveis, é fundamental para as relações entre indivíduos⁷⁸.

A dor e a ansiedade, fenômenos aprofundados anteriormente, também podem ser experimentados através da empatia^{66,79}. A exemplo, camundongos que convivem com um coespecífico com dor crônica apresentam hipernocicepção e aumento dos comportamentos do tipo ansiedade quando avaliados em seus respectivos testes^{59,80-84}. Além do aumento das respostas associadas à ansiedade e da hipernocicepção produzidas pela observação de um indivíduo com dor, alguns indivíduos podem apresentar comportamentos pró-sociais com o objetivo de beneficiar o outro indivíduo, seja oferecendo conforto, ajuda direcionada ou compartilhando algo quando ajuda material é necessária⁸⁵.

1.4 OCITOCINA

1.4.1 Contextualização e Fisiologia

Após serem abordadas temáticas envolvendo a dor, a ansiedade e a empatia, bem como diversas neurotransmissões e regiões cerebrais envolvidas em tais processos, objetivou-se encontrar um ponto de ancoragem entre os três tópicos que fosse capaz de unir, através da neurociência, seus processos fisiológicos e/ou patológicos. Nesse contexto, a ocitocina (OXT), um hormônio e neurotransmissor^{86,87}, passará a ser abordada como um ponto de união fundamental que relaciona os assuntos explorados até o momento.

Acredita-se que a ocitocina foi descoberta por volta de 1906 por um farmacologista britânico, Sir Henry Dale, a partir da obtenção de um extrato da pituitária, o qual foi injetado via intravenosa em gatos e promoveu aumento da pressão arterial e contrações uterinas⁸⁸. Quase 50 anos após a descoberta, na década de 1950, o bioquímico Vincent du Vigneaud sequenciou e sintetizou a OXT após isolá-la de lobos posteriores de pituitárias liofilizados⁸⁹⁻⁹¹. Em 1955, du Vigneaud recebeu o prêmio Nobel em química por ser o primeiro a isolar e sintetizar um hormônio polipeptídico⁹². Assim, atualmente sabe-se que a OXT é uma molécula composta por nove aminoácidos, distribuídos em uma região linear (3 aminoácidos: glicina, leucina e prolina) com um N-terminal (amida), e uma região cíclica (6 aminoácidos: duas cisteínas, tirosina, isoleucina, glutamina, asparagina) que conecta duas cisteínas através de uma ponte dissulfeto⁸⁷.

Os estudos seguintes e as primeiras aplicações da ocitocina acabaram por circundar as descobertas iniciais sobre seu papel em mecanismos reprodutivos, como no trabalho de parto, para as contrações uterinas, e na amamentação, por sua atuação nos mecanismos de ejeção do leite^{93,94}. Porém, além de atuar em processos reprodutivos de diversas espécies, a OXT também tem um papel fundamental na regulação de diversos comportamentos, sociais ou não⁹⁵, que serão abordados com maior profundidade mais a diante.

Visto sua participação em processos intrínsecos dos organismos, estudos com animais e humanos foram extensamente performados, e graças ao alto nível de homologia da ocitocina entre as espécies, tanto invertebrados quanto vertebrados, seus resultados puderam ser utilizados de forma translacional^{87,95}. Portanto, a partir do exposto, serão apresentadas informações mais aprofundadas sobre a OXT, seus sítios de produção, seus receptores e mecanismos de ação, divididos de acordo com suas duas principais regiões de atuação: o SNC e os outros tecidos.

1.4.2 A Ocitocina no SNC

1.4.2.1 Sítios de Síntese no SNC

Em mamíferos, a OXT é majoritariamente produzida no hipotálamo, especificamente em dois núcleos bilaterais: supraóptico (SON) e paraventricular (PVN)^{96,97}. Além disso, duas populações neuronais são responsáveis pela produção ocitocinérgica. A primeira, e maior produtora, é a de neurônios magnocelulares, os quais estão presentes em ambos os núcleos⁹⁸. A segunda abriga neurônios parvocelulares, que se diferenciam dos magnocelulares por serem menores; são encontrados no PVN e dispersos em regiões hipotalâmicas e extra-hipotalâmicas^{97,99–101}.

1.4.2.2 Receptores: Bioquímica e Distribuição

O receptor de ocitocina (OXTR) é composto por sete hélices transmembrana (TMH1-7), possuindo três alças extracelulares (2 a 7) e três alças intracelulares (1 a 6), apresentando a mesma conformação tanto no SNC quanto nos outros tecidos⁸⁷. O OXTR é acoplado a uma proteína G, com uma subunidade $G\alpha$ e uma $G\beta/\gamma$. Além disso, O OXTR pode se acoplar a diferentes tipos de proteína G, como G_q , G_s e G_i , que irão determinar a atividade estimulatória ou inibitória¹⁰². Apenas recentemente foram encontradas evidências da atividade da G_i no cérebro de camundongos após o uso do antagonista tendencioso denominado atosibana¹⁰³.

Ainda que as dificuldades metodológicas impliquem negativamente na obtenção de informações detalhadas sobre a distribuição dos OXTR no cérebro, principalmente no que tange a especificidade de anticorpos necessários para tais fins¹⁰⁴, Jurek e Neumann (2018) apresentaram uma extensa revisão sobre a intensidade da expressão nas diferentes regiões cerebrais e em diversas espécies⁸⁷. De todas as regiões que apresentam evidências de possuírem os OXTR, os autores enfatizam e discutem a literatura sólida existente sobre quatro principais: hipotálamo, córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e amígdala.

Apesar da importância do PVN na produção de OXT, a expressão de OXTR nessa região é relativamente baixa^{105–107} e aparentemente não apresenta diferença entre machos e fêmeas nulíparas de camundongos¹⁰⁸. Além do PVN, os OXTR também foram descritos no núcleo ventromedial do hipotálamo de ratos e porquinhos-da-índia^{109–111}, dentre outras regiões⁸⁷. Já no CPF, a expressão de OXTR foi descrita em camundongos, ratos e ratos-do-campo. Estudos encontraram uma relação entre a distribuição dos OXTR no CPF em fêmeas e o comportamento social-sexual¹¹², enquanto em machos, a relação foi estabelecida envolvendo a regulação de comportamentos do tipo-ansiedade¹¹³. O hipocampo apresenta OXTR em todas as suas subregiões (CA1, CA2, CA3, subiculum e giro denteado), com descrição nas mais diversas espécies⁸⁷. Por fim, a expressão de OXTR na amígdala encontra-se majoritariamente em suas regiões central e medial de ratos e camundongos^{114–116}, possuindo papel fundamental na regulação de comportamentos sociais¹¹⁷ e na expressão do medo¹¹⁸.

Uma última consideração importante sobre os OXTR no SNC envolve seu padrão de expressão de acordo com a fase de desenvolvimento do indivíduo. Jurek e Neumann (2018) apontam em sua revisão que a expressão dos receptores no cérebro embrionário/juvenil é maior em regiões que possuem relação com a recompensa e a memória (social e espacial). Já no adulto, a expressão é maior em regiões corticais ligadas à tomada de decisões sociais^{87,117}, e em termos gerais, significativamente reduzida quando comparado ao cérebro neonato/juvenil, a depender da região^{119,120}.

1.4.2.3 Projeções

Tão importante quanto a discussão sobre a localização dos OXTR é a discussão sobre a direção das projeções de neurônios ocitocinérgicos. Neurônios magnocelulares do PVN projetam-se até a neurohipófise⁹⁸. Já os neurônios parvocelulares do PVN, apesar de não possuírem projeções para a neurohipófise, projetam-se para o tronco cerebral e a medula

espinhal¹²¹, estando envolvidos em funções autonômicas, na regulação da dor e na analgesia^{87,103}. Os neurônios parvocelulares também se ligam ao PVN contralateral e ao SON ipsilateral formando conexões que regulam a atividade neuronal ocitocinérgica^{103,122}.

Um mecanismo evolutivo importante dos neurônios ocitocinérgicos envolve a proximidade de seus axônios e/ou dendritos do terceiro ventrículo, funcionando tanto como sensor bioquímico para os níveis de OXT no líquido, quanto para a liberação direta dos polipeptídeos nele¹²³. Além disso, os neurônios magnocelulares possuem árvores dendríticas estendidas que controlam a liberação de OXT nos próprios núcleos SON e PVN^{124,125}, as quais são importantes em situações específicas de recrutamento neuronal, como na lactação¹²⁶ e no parto¹²⁷. Assim, essa liberação somatodendrítica permite uma regulação autócrina e parácrina dos neurônios ocitocinérgicos.

A partir do PVN também partem projeções para o CPF, bulbo olfatório (OB), núcleo acumbens (NAc), córtex cingulado (CC), amígdala, substância cinzenta periaquedutal (SCP), área tegmental ventral (VTA), hipocampo (HPC) entre outras⁸⁷.

1.4.1.1.4 Mecanismos, Estímulos e Regiões Envolvidos na Liberação no SNC

Após a síntese da OXT nos respectivos núcleos e armazenamento em vesículas densas, sua liberação no SNC ocorre através do transporte neuronal e consequente liberação axonal ou dendrítica (ou somatodendrítica)⁸⁷.

No transporte neuronal, as projeções dos neurônios magnocelulares que chegam até a neurohipófise levam a OXT para ser armazenada nos terminais e posteriormente liberada na corrente sanguínea conforme necessidade. O deslocamento das vesículas contendo OXT pelo axônio (para a liberação axonal) ou a permanência delas nos dendritos (para armazenamento ou liberação dendrítica/somatodendrítica) depende de um mecanismo envolvendo as proteínas quinases A (PKA) ou C (PKC). A ligação da PKA na AKAP150 favorece a conexão desse

complexo à ANXA1, que se liga à vesícula contendo OXT e a Kinesina-2, e permite o transporte axonal (anterógrado). Já a ligação da PKC na AKAP150 impede a ligação do complexo na Kinesina-2, fazendo com que a ANXA1 se ligue à vesícula e a outro complexo de proteínas que a direciona para os dendritos para serem armazenadas ou liberadas através deles ou do próprio soma¹²⁸.

Para a liberação axonal das vesículas de OXT têm-se potenciais de ação gerados nos corpos celulares de neurônios hipotalâmicos promovendo a abertura de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes e um consequente influxo dos íons. As vesículas contendo OXT se fundem à membrana neuronal e são liberadas nos capilares hipofisários por meio de uma interação entre diversas proteínas – como o complexo de proteínas SNARE^{129,130}. É importante ressaltar que as terminações dos neurônios magnocelulares na neurohipófise estão intimamente ligadas aos capilares sanguíneos da região, formando um contato neurohemal entre o axônio e as células endoteliais^{87,131}.

A liberação dendrítica de OXT também depende do influxo de Ca^{2+} , seja pelos canais voltagem dependentes ou pelos canais de Ca^{2+} associados aos canais de potencial receptor transiente vaniloide tipo 2 (*transient receptor potential vanilloid type-2, TrpV2*), ativados após a ligação da OXT no OXTR. Esse mecanismo de liberação somato-dendrítica evidencia a capacidade de auto excitação do tecido neuronal para a liberação de OXT^{87,132,133}. Além do influxo de Ca^{2+} , a liberação intracelular dos estoques do íon também pode desencadear a exocitose de vesícula de OXT¹²⁹, bem como os receptores transmembrana CD38, que catalisam a formação de segundos mensageiros importantes para a liberação do Ca^{2+} dos estoques intracelulares¹³⁴.

Além do mais, elementos do citoesqueleto regulam o transporte intracelular das vesículas maduras de OXT e sua fusão com a membrana, participando tanto da liberação

somatodendrítica quanto da axonal, tendo como exemplo a F-actina¹²⁹. Assim, os mecanismos citados explicitam como a liberação dendrítica depende menos dos potenciais de ação e do impulso elétrico do que a liberação axonal^{87,129}.

Quadro 5 - Exemplos de estímulos para a liberação de ocitocina no SNC e no sangue.

Estímulo	Espécie	Região Cerebral	OXT plasmática
Acasalamento	Rato	PVN	Sim
Amamentação	Rato	Septo, hipocampo dorsal, SON, PVN	Sim
Nascimento, amamentação, alimentação, separação do cordeiro	Ovelha	Substância negra, bulbo olfatório, BNST, área pré-óptica medial	Sim
Estresse (vibração, nado forçado)	Rato	Amígdala, PVN, SON	Sim
Adrenalectomia/corticosterona	Rato	PVN	Sim
Interação social	Rato, camundongo	Septo lateral	Sim
Estimulação Hiperosmótica	Rato	Septo, hipocampo dorsal, SON, PVN	Sim
Estimulação elétrica ou ontogenética do PVN	Rato	Septo, amígdala, núcleo o trato solitário	Não

Fonte Jurek & Neumann (2018)

Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

Os estímulos fisiológicos que desencadeiam os mecanismos de liberação apresentados acima foram descritos em diversas espécies, sendo muitos deles concomitantes para a liberação central e sistêmica do neurohormônio (Quadro 5). Além dos estímulos clássicos como parto, amamentação e acasalamento, estresse físico e emocional e estimulação osmótica também foram capazes de ativar o sistema ocitocinérgico⁸⁷.

Por fim, as regiões do SNC nas quais ocorre a liberação de OXT foram estudadas de acordo com sua inervação, ou não, por neurônios ocitocinérgicos, pela expressão de OXTR ou pelos efeitos comportamentais ou fisiológicos importantes mediados pela OXT. Assim, nas regiões do OB, HPC, NAc, amígdala, SON e neurohipófise são encontradas não somente projeções dos neurônios ocitocinérgicos e OXTR, mas pode-se inferir a ocorrência da liberação do neurotransmissor⁸⁷.

1.4.2.4 Mecanismos de Ação

Para o SNC – após o estímulo ativar a liberação das vesículas contendo OXT e estas se ligarem aos seus receptores – os mecanismos de ação intracelulares envolvem como desfecho principal a ativação de cascatas com alvo citoplasmático ou nuclear, como a transcrição de genes-alvo, que conseqüentemente modulam, direta ou indiretamente, o comportamento dos indivíduos.

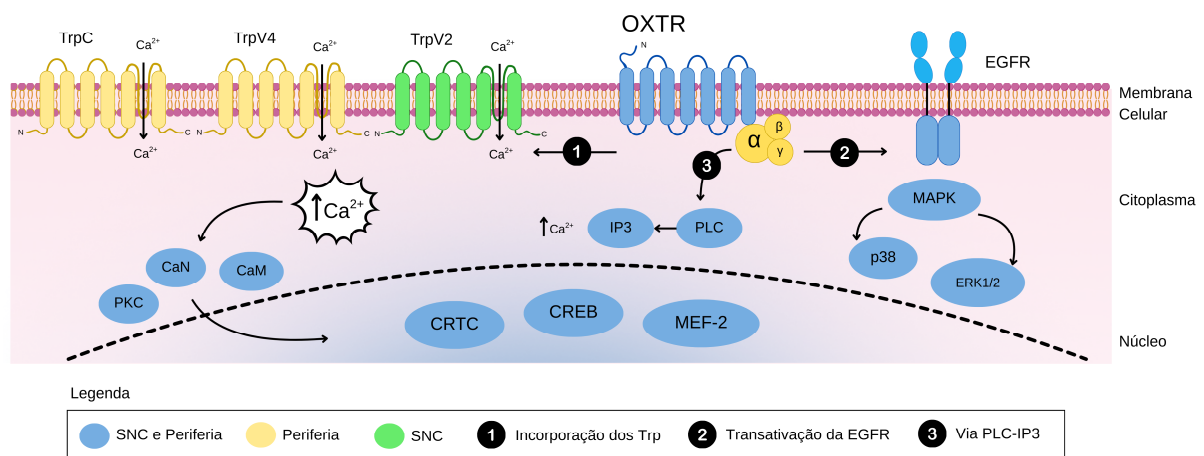
Assim, após ligação da OXT nos OXTR ocorre a incorporação na membrana celular dos TrpV2 com conseqüente ativação de cascatas de Ca^{2+} , podendo-se citar a PKC, a calcineurina (CaN) e a cascata da quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKI, II, III e IV). Além da incorporação dos TrpV, a ligação da OXT também induz a transativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor, EGRF*), que ativa cascatas da proteína quinase ativada por mitógenos (*mitogen activated protein kinases, MAPK*), no caso a quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (*extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2*), e a proteína quinase p38⁸⁷.

Por sua vez, as cascatas descritas ativam a transcrição dos fatores: coativadores transcricionais regulados por AMP cíclico (*cyclic-AMP-regulated transcriptional coactivators, CRTC*), proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMP cíclico (*cyclic AMP responsive element binding protein, CREB*) e fator intensificador de miócitos 2 (*myocyte enhancer factor*

2, *MEF-2*), que culminam na transcrição de genes alvo e consequente síntese proteica. Cada proteína sintetizada possui uma classificação de acordo com sua função, bem como um contexto funcional do qual participa⁸⁷.

No que tange o acoplamento com a proteína G, após a ligação OXT-OXTR, a subunidade $G\beta/\gamma$ é desacoplada, ativando a $G\alpha$. A partir disso, ambas subunidades G desencadeiam a geração de Inositol-3-fosfato (IP_3) a partir da fosfolipase C (PLC). Os receptores de IP_3 são então ativados, desencadeando mecanismos de liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Acredita-se que a via do IP_3 para liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares esteja presente também em neurônios sensoriais de ratos¹³⁵ e em astrócitos hipotalâmicos¹³⁶. A Figura 6 apresenta de maneira resumida os mecanismos descritos.

Figura 6 -Representação esquemática das cascatas intracelulares ativadas após a ligação da ocitocina ao seu receptor.



Fonte Jurek & Neumann (2018) e Liu *et al.* (2023).

Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M.

As evidências na literatura apontam para a participação da OXT em diversos domínios, tanto em humanos quanto em animais. Sabe-se que a OXT participa de comportamentos sociais em humanos como reconhecimento facial, contato visual, laços sociais e românticos e parentalidade; na emocionalidade, como estresse social e medo; e em outros comportamentos,

como a ingestão de alimentos, o processo de retirada de medicamentos, a percepção da dor, a atividade do eixo HPA e a ativação da amígdala. Nos animais, a OXT participa de comportamentos sociais como memória e preferência social, comportamento sexual, agressividade e cuidado materno; na redução da ansiedade, no medo e no estresse; e nos mesmos outros comportamentos citados para os humanos⁸⁷.

1.4.3 A Ocitocina nos Tecidos Periféricos

Como explanado anteriormente, a OXT possui efeitos não somente no SNC, mas em outros tecidos do organismo. Quando se fala da atuação da OXT nos tecidos periféricos, apesar de muito conhecida pelo seu papel na lactação e nas contrações uterinas para o momento do parto, pouco se discute sobre sua síntese, expressão dos OXTR e mecanismos de ação para além de suas funções reprodutivas.

1.4.3.1 Sítios de Síntese e Receptores

Os principais sítios de síntese periférica da OXT são: ovários, útero, placenta, testículos, coração, fibroblastos e queratinócitos dérmicos, timo e glândula adrenal^{87,137}. Já os OXTR possuem a mesma conformação dos receptores encontrados no SNC. No que tange as células miometriais, o OXTR se acopla não somente às $G_{\alpha q}$, mas também às $G_{\alpha i}$ ($G_{\alpha i1}$, $G_{\alpha i2}$, $G_{\alpha i3}$, $G_{\alpha oA}$ e $G_{\alpha oB}$), com evidências mais robustas de sua atividade inibitória para sua atuação periférica¹³⁸. Quanto a sua distribuição, têm-se uma diversidade de regiões que apresentam os OXTR além do útero, citando como exemplos: células da mácula densa do córtex renal¹³⁹, cardiomiócitos^{140,141}, osteoclastos e osteoblastos^{142,143}, retina¹⁴⁴, adipócitos¹⁴⁵, papilas gustativas¹⁴⁶, dentre outros⁸⁷.

Assim, a ocitocina que atua nos tecidos periféricos pode ter origem de produção tanto local quanto no SNC, sendo esta advinda da neurohipófise. A OXT advinda da neurohipófise chega até os sítios de atuação através da corrente sanguínea por mecanismos já descritos.

1.4.3.2 Estímulos para Liberação

Como já discutido, alguns dos estímulos responsáveis por promovem a liberação da OXT no SNC também podem estimular sua liberação pela neurohipófise no sangue (quadro 5). Apesar da possível liberação simultânea, suas dinâmicas nas duas grandes regiões possuem algumas diferenças, principalmente no que tange o tipo de estímulo capaz de promovê-la e no tempo entre a liberação central e a periférica⁸⁷.

Além dos estímulos reprodutivos, hipovolemia ou hiperosmolaridade¹⁴⁷ e alterações pressóricas nos barorreceptores que se comunicam com o cérebro¹³⁷ também são capazes de promover a liberação de OXT pela neurohipófise. Diversos autores apontam ainda uma relação entre os níveis de OXT no plasma e a atividade das glândulas adrenais, do pâncreas e dos adipócitos, sem, no entanto, especificarem ao certo os mecanismos que desencadeiam a liberação da OXT e sua relação com os mecanismos envolvidos no controle da atividade de tais sistemas¹³⁷. Por fim, alguns estímulos são capazes de promover não somente a liberação de OXT, mas de aumentar o número de OXTR de alguns tecidos periféricos como o útero, que aumenta sua sensibilidade à OXT durante o trabalho de parto, elevando sua densidade de OXTR miometriais^{137,148}

1.4.3.3 Mecanismos de Ação

De uma maneira geral, os mecanismos de ação da OXT periférica envolvem a ativação de cascatas de Ca^{2+} a partir de sua ligação ao OXTR. Os mecanismos envolvendo a proteína G são semelhantes aos do SNC, nos quais a subunidade $G\alpha$ desencadeia reações da IP_3 e mecanismos de liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Para os tecidos periféricos

contráteis, o cálcio liberado liga-se à calmodulina, formando um complexo responsável por promover a contração muscular, importante para as contrações uterinas e das células mioteliais que circundam os ductos mamários⁸⁷.

Para além dos mecanismos da proteína G, após a ativação dos OXTR, canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes também são ativados¹⁴⁹, juntamente com canais Trp canônicos (TrpC1, TrpC3-6)¹⁵⁰⁻¹⁵³ e Trp vaniloide (TrpV4), permitindo um influxo de Ca^{2+} intracelular e aumentando a disponibilidade do íon para a formação do complexo com a calmodulina⁸⁷. A partir do aumento do Ca^{2+} intracelular, diversas cascatas são ativadas, como a da PKC¹⁵⁴ e da calcineurina¹⁵⁵, também citadas para o SNC. Existem evidências de que diversas vias da MAPK também são ativadas nos tecidos periféricos (MEF-2, ERK5, β -arrestina, p38, Akt, ERK1/2), sendo algumas semelhantes às do SNC⁸⁷ (Figura 6).

Os principais desfechos da ativação de tais cascatas envolvem tanto a contração muscular direta pelo aumento do Ca^{2+} intracelular, quanto a transcrição de proteínas responsáveis por diversos mecanismos, podendo-se citar: contração muscular, angiogênese, formação óssea, proteção cardíaca e até mesmo inflamação⁸⁷. Por fim, outros mecanismos de ação da OXT nos tecidos periféricos envolvem sua liberação em pulsos pelo hipotálamo, promovendo a ejaculação, a espermição e o transporte dos espermatozoides até o epidídimo, além de relacionar-se às contrações prostáticas e a fisiopatologia de hiperplasias benignas no órgão¹³⁷. Nos tecidos mamários, além da OXT ser responsável pela ejeção do leite¹³⁷, é considerada um fator potencialmente protetivo no surgimento do câncer de mama^{156,157}.

1.4.4 O Sistema Ocitocinérgico do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

Como brevemente abordado, sabe-se que o PVN é um dos principais sítios de síntese da OXT no SNC. Para além da produção ocitocinérgica, o PVN se conecta diretamente com a região pré-límbica do córtex pré-frontal (CPF), liberando ocitocina na região e

consequentemente atuando na redução da dor crônica e aguda¹⁵⁸; possui uma população de neurônios parvocelulares especializada que controla a atividade dos neurônios magnocelulares e consequentemente o processamento da dor aguda, promovendo analgesia¹⁰³; sua estimulação elétrica promove redução da dor neuropática em ratos¹⁵⁹; e possui um papel importante na regulação do metabolismo corpóreo, incluindo o controle da ingestão de alimentos e do gasto energético, sem afetar a atividade locomotora, e a regulação da ingestão de sacarose¹⁶⁰.

Além de atuar diretamente em mecanismos da dor, o sistema ocitocinérgico do PVN modula mecanismos envolvendo a empatia. Baptista-de-Souza e colaboradores (2022) encontraram um aumento na expressão de FosB no PVN de camundongos machos que conviveram com coespecífico com dor crônica, apresentando também hipernocicepção⁸². Em contrapartida, Zhang e colaboradores (2024) recentemente descreveram o papel desse sistema na modulação da empatia para o medo, também em camundongos machos, mas não para a dor¹⁶¹. Dessa forma, apesar de o PVN participar de mecanismos de controle da nocicepção, seu envolvimento na empatia para a dor e para ansiedade permanecem incertos.

1.4.5 Antagonistas

Considerando-se a importância do sistema ocitocinérgico tanto para os comportamentos em geral quanto para os mecanismos reprodutivos, agonistas e antagonistas sintéticos foram muito estudados ao longo do tempo visando-se principalmente em suas aplicabilidades clínicas. Nesse sentido, o Atosibana, uma droga sintética produzida a partir da modificação de alguns sítios da OXT, foi desenvolvido como um antagonista tendencioso dos OXTR, por ser antagonista $G_{\alpha q}$ e agonista $G_{\alpha i}$ ¹⁶².

Inicialmente, o Atosibana foi utilizado como agente tocolítico para a prevenção de contrações uterinas causadoras de partos prematuros^{163,164}. Apesar das evidências, revisões sistemáticas posteriores apontaram que o Atosibana não foi capaz de reduzir a incidência de

partos prematuros quando comparado aos grupos que receberam placebo¹⁶⁵. Além disso, foi demonstrado que o Atosibana não foi capaz de impedir a síntese de prostaglandinas, COX-2 e citocinas inflamatórias como a IL-6, que possuem sua produção estimulada pela ligação OXT-OXTR, enfatizando sua falha em impedir essa ligação¹⁶⁶.

Por outro lado, o Atosibana utilizado via intraperitoneal em ratos prejudicou a consolidação, mas não a reconsolidação da memória contextual do medo¹⁶⁷, e reduziu a percepção do tempo e a interação social em indivíduos socialmente competentes, reforçando o papel da OXT na cognição social¹⁶⁸. Outro estudo mostrou que a administração intra hipocampal de Atosibana inibiu os efeitos antiepiléticos da OXT, além disso, a administração prévia do Atosibana impediu os efeitos antiepiléticos do Diazepam¹⁶⁹. Estes resultados mostram a importante interação da OXT no hipocampo, principalmente no que tange a gravidade dos comportamentos epiléticos. Esse resultado pode ser utilizado para associar o papel da OXT em transtornos como o TEA, e a relação desse com episódios de convulsão em casos graves do transtorno¹⁷⁰.

A partir do exposto, pôde-se compreender como a dor e a ansiedade podem ser experimentadas através da empatia, além de se evidenciar a importância da neurotransmissão ocitocinérgica, e consequentemente do PVN como seu principal sítio de síntese, para a ocorrência de tais fenômenos. Apesar do número elevado de trabalhos que abordem a presente temática como fenômenos individuais, muito pouco se sabe sobre como o sistema ocitocinérgico do PVN modula os fenômenos da dor e da ansiedade experimentados através do convívio.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESES

A partir das informações disponíveis na literatura sobre a farmacodinâmica da ocitocina (agonista dos OXTR) e do atosibana (antagonista dos OXTR), foram estabelecidas as seguintes hipóteses: (1) a administração de ocitocina intra-PVN produziria efeitos ansiolítico e antinociceptivo nos camundongos machos e fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica; (2) seu antagonista, atosibana, reverteria tais efeitos nas condições citadas.

2.2 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o envolvimento do sistema ocitocinérgico do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) na modulação da ansiedade e nocicepção induzidas pelo convívio com o coespecífico com dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.3.1 Machos

Avaliar o efeito das injeções combinadas intra-PVN de: solução salina e atosibana, solução salina e ocitocina, e de atosibana e ocitocina; na modulação dos comportamentos do tipo-ansiedade e da nocicepção após convívio com coespecífico com dor crônica.

2.3.2 Fêmeas

Avaliar o efeito das injeções combinadas intra-PVN de: solução salina e atosibana, e solução salina e ocitocina; na modulação dos comportamentos do tipo-ansiedade e da nocicepção após convívio com coespecífico com dor crônica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 372 camundongos machos e 276 camundongos fêmeas da cepa Suíço albino, (20-50g), provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar. Os animais foram alojados em caixas-viveiro de polipropileno (41 x 34 x 16 cm, 4 por gaiola), sendo que machos e fêmeas ficaram em salas separadas no biotério setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C), e luz (ciclo claro/escuro de 12 horas, luzes acesas às 7h00), com livre acesso a água e alimento, exceto durante os períodos de teste. Os experimentos foram realizados durante a fase de luz do ciclo claro (7h às 19h). Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (Nº 4211010823).

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram alojados em quartetos nas caixas-viveiro a partir de 21 dias após o nascimento (21 a 28 dias). Após 14 dias de convívio, os animais foram divididos em dois grupos: CNC e Sham. O primeiro grupo é o “*Cagemate Nerve Constriction – CNC*”, no qual, após os 14 dias de convívio, um dos animais do quarteto foi submetido à constrição do nervo ciático, conforme procedimento descrito abaixo, tornando-o o um demonstrador da dor. No grupo Sham, após 14 dias de convivência, um dos animais de cada quarteto foi submetido a um procedimento cirúrgico semelhante ao de constrição do nervo ciático, apenas com exposição do nervo, sem sua constrição, tornando este animal um controle para o animal demonstrador da dor.

Assim, os grupos experimentais foram formados por quatro camundongos alojados na mesma caixa. Cada caixa, portanto, possuiu um animal considerado “demonstrador” (Sham ou CNC) e três animais considerados “observadores” (Ob-CNC e Ob-Sham), os quais passaram pela cirurgia estereotáxica, pela injeção de drogas intra-PVN, e pelos testes de avaliação da nocicepção e avaliação dos comportamentos do tipo-ansiedade. A mesma divisão ocorreu para camundongos machos e fêmeas.

3.3 FÁRMACOS

Para o tratamento intra-PVN foram utilizados: ocitocina (agonista dos OXTR) [(1-((4R,7S,10S,13S,16S,19R)-19-amino-7-(2-amino-2-oxoetil)-10-(3-amino-3-oxopropil)-16-(4-hidroxibenzil)-13-[(1S)-1-metilpropil]-6,9,12,15,18-pentaoxo-1,2-dithia-5,8,11,14,17-pentaaazaciclicosan-4-yl}carbonil)-L-prolil-L-leucilglicinamida), PM:1007,19g, Cayman Chemical], dissolvida em salina (0,9% NaCl) na dose de 1,0 µg/0,1µL; Atosibana (antagonista dos OXTR) [(Ácido1-(3-mercaptopropanoico)-2-(O-etil-D-tirosina)-4-L-treonina-8-L-ornitina-ocitocina), PM:994,199 g, Santa Cruz], dissolvido em salina (0,9% NaCl) na dose de 0,4 µg/0,1µL; e solução salina a 0,9% (NaCl, PM:58,44g, Êxodo Científica)¹⁷¹⁻¹⁷⁵.

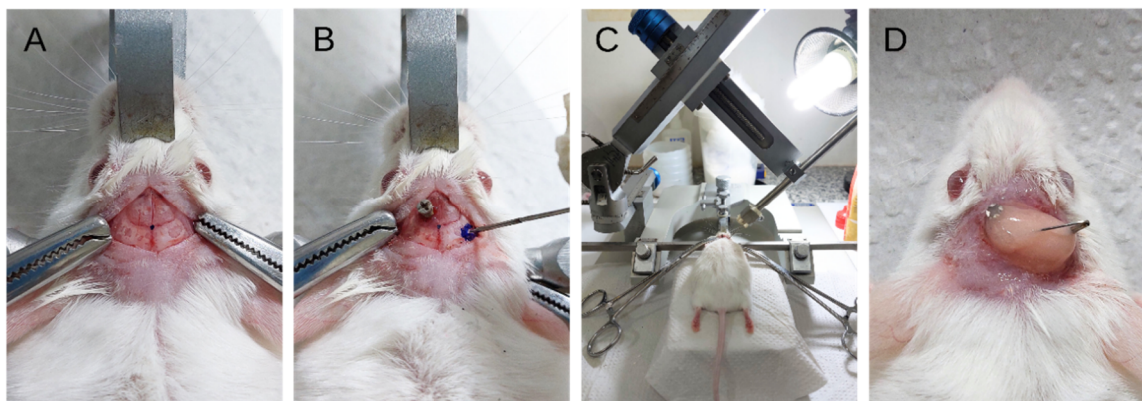
Para a cirurgia estereotáxica foram utilizados: cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p., anestésico; Dopalen®, Ceva, Brasil), xilazina (10 mg/kg, i.p., relaxante muscular; Xilazin®, Syntec, Brasil)¹⁷⁶, cetoprofeno (5 mg/kg, s.c., antiinflamatório; Biofen 10%, Biofarm, Brasil)¹⁷⁷ e ceftriaxona (4 mg/kg, i.m., antibiótico; Eurofarma)¹⁷⁸. Para a cirurgia de constrição do nervo ciático foram utilizadas as mesmas drogas e suas respectivas doses, com exceção ao cetoprofeno.

3.4 CIRURGIAS

3.4.1 Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente). Após a tricotomia da região dorsal do crânio (ossos frontal e parietais), realizou-se antissepsia com digliconato de clorexidina 2% (Riohex® 2%, Rioquímica, Brasil). Os camundongos foram fixados a um aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos, Brasil) e passaram por microcirurgia para a implantação unilateral intracraniana de cânula-guia (25-gauge) de 7 mm de comprimento, direcionada para o PVN (Imagem 1, A), nas seguintes coordenadas estereotáxicas: anteroposterior (AP) = -0,4 mm; lateral (L) = -3,6 mm; dorsoventral (DV) = -0,65mm; ângulo = 44°; em referência ao bregma¹⁷⁹. Juntamente com a implantação da cânula, os camundongos passaram pela implantação de um micro parafuso de sustentação na região oposta à de fixação da cânula (Imagem 1, B). Após a implantação da cânula, foi colocado um mandril de aço em seu interior (8mm) a fim de fechá-lo e selar a comunicação com o meio externo (Imagem 1, D). A cânula, o parafuso e o mandril foram então fixados no crânio utilizando-se resina acrílica e líquido autopolimerizável (Triunfo Dent's®, Brasil). Ao final da cirurgia, os animais receberam analgesia com cetoprofeno e antibioticoterapia profilática com ceftriaxona.

Imagem 1 - Cirurgia estereotáxica em camundongo.



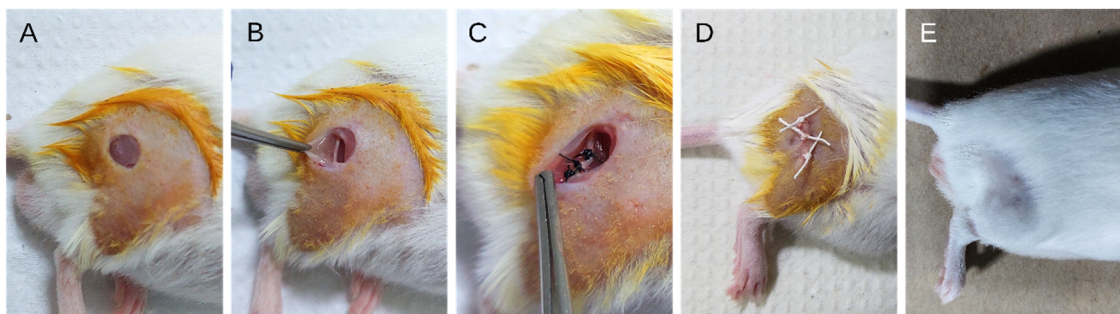
(A) tricotomia, incisão de pele e localização do bregma (ponto); (B) colocação do parafuso e da cânula-guia unilateral; (C) posicionamento do animal no estereotáxico e demonstração da angulação do aparato; (D) aspecto final da cirurgia com a construção do capacete de resina.

Fonte *arquivo pessoal.*

3.4.2 Cirurgia de Constrição do Nervo Isquiático

Para reproduzir o modelo de dor crônica, o método de Bennet e Xie (1988), modificado para camundongos foi utilizado^{83,180}. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) e divididos em dois grupos: CNC (*cage mate nerve constriction*) e Sham. No grupo CNC, após a anestesia, foi realizada tricotomia e antissepsia com digliconato de clorexidina 2% (Riohex® 2%, Rioquímica, Brasil), ou solução alcóolica de iodopovidona 1% (Rioquímica, Brasil), da região lateral femoral do membro pélvico direito do animal. Posteriormente, realizou-se uma incisão de pele de aproximadamente 8mm utilizando-se bisturi em aço carbono nº22 (Dercarpack®, Brasil) na região tricotomizada. Após, realizou-se a dissecação da fáscia entre o glúteo e bíceps femoral, em sua região média, com tesoura e pinça cirúrgicas para a exposição do nervo isquiático, próximo à sua trifurcação. Em seguida foram realizadas três ligaduras ao longo do nervo isquiático¹⁸¹, a partir de sua trifurcação em direção à coluna vertebral, utilizando-se fio estéril monofilamentar de nylon 6.0 (Shalon®, Sertix®, Brasil). No grupo denominado Sham, o procedimento realizado foi idêntico, com exceção à constrição do nervo isquiático. Ao final, para ambos os grupos, foi realizada a sutura de pele e a antibioticoterapia profilática com ceftriaxona, conforme posologia descrita anteriormente.

Imagem 2 - Cirurgia de constrição do nervo isquiático.



(A) tricotomia e incisão de pele; (B) divulsão da fáscia e exposição do nervo; (C) realização das três suturas; (D) aspecto final da cirurgia com a sutura de pele; (E) aspecto da cirurgia após 14 dias.

Fonte arquivo pessoal.

3.5 TESTES

3.5.1 Demonstradores

3.5.1 Teste da Placa Quente

O teste da placa quente é um teste nociceptivo utilizado nesse contexto para verificar a efetividade da cirurgia de constrição do nervo nos animais CNC e Sham (Imagem 4, A). No teste, o animal CNC ou Sham foi colocado sobre uma placa na temperatura de $52\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ e foi filmado. O animal permaneceu na placa até apresentar um dos seguintes comportamentos: autolimpeza ou lambedura de uma das patas, ou até um tempo limite de 30 segundos (para evitar lesões). A partir da filmagem, foi mensurada a latência (segundos) para o comportamento^{81,182}.

O teste foi realizado tanto antes da cirurgia de constrição, para verificar o valor basal de latência de retirada da pata (latência basal), quanto 14 dias após a cirurgia de constrição, para verificar os efeitos da cirurgia na nocicepção do demonstrador (latência pós-operatória).

3.5.2 Observadores

3.5.2.1 Teste para Avaliação dos Comportamentos do Tipo-ansiedade

O labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado para avaliação dos comportamentos do tipo-ansiedade (Imagem 4, B). O aparato consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados, todos construídos em madeira com paredes transparentes (30 x 5 x 15 cm) de vidro, elevado a 38,5cm do solo por um suporte também de madeira⁵⁸. Durante o teste, o animal foi posicionado individualmente ao centro do aparato com a cabeça voltada à um dos braços abertos, e foi filmado por um sistema de câmera conectada a um computador, localizado na sala adjacente a sala de testes, por 5 minutos (300 segundos).

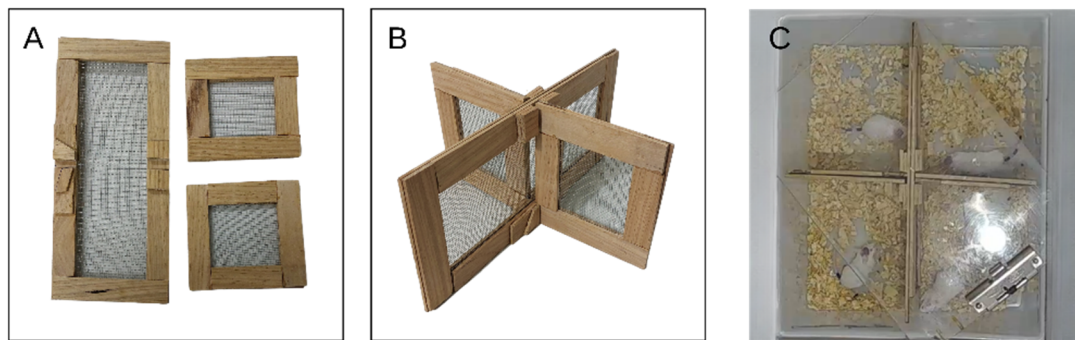
Posteriormente, as filmagens foram avaliadas pela experimentadora para registro de comportamentos convencionais, ou espaço-temporais, e etológicos. Nos comportamentos convencionais, têm-se: o número total de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um dos braços é definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço); a porcentagem de entrada nos braços abertos e fechados $[(\text{aberto}/\text{total}) \times 100]$ e de tempo gasto nos braços abertos e fechados; e o tempo de permanência na parte central do labirinto $[300 - (\text{TBA} + \text{TBF})]$. As medidas etológicas analisadas foram: as frequências de mergulhar (movimento exploratório com a cabeça/ombros para fora dos braços abertos), esticar (*stretched attend posture - SAP*: postura exploratória caracterizada pelo corpo do animal estendido para frente com consequente retorno à posição original, sem locomoção efetiva), levantar-se (movimento em que o animal fica apoiado sobre os membros pélvicos), tempo de autolimpeza (autolimpeza geral ou anogenital maior que 2 segundos) e imobilidade⁶². Os parâmetros foram divididos de acordo com a realização nos braços abertos (denominados desprotegidos) ou fechados/centro (protegidos)⁶².

3.5.2.2 Teste Nociceptivo

A nocicepção no animal observador (Ob-CNC e Ob-Sham) foi avaliada pelo teste de contorções abdominais (Imagem 4, C), descrito por Vander-Wende e Margolin (1956)¹⁸³. O teste consiste na injeção via intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6% (10 ml/kg)^{59,61}. Cada experimento foi gravado por meio de um sistema de câmera conectada a um computador, localizado na sala adjacente a sala de testes, por 5 minutos (300 segundos). A análise dos vídeos consistiu na contagem do número total de contorções abdominais realizada pelo animal durante os 5 minutos. Durante o teste, o animal permaneceu na caixa junto com os três outros coespecíficos, porém separados por uma divisória construída em madeira e malha metálica, a qual criou quatro compartimentos na caixa moradia e permitiu que os animais mantivessem contato visual, físico, olfativo e auditivo com seus companheiros sem que estivessem próximos

à ponto de comprometerem o experimento (Imagem 3). Os animais observadores do grupo CNC que receberam injeções de salina e não apresentarem contorções foram removidos da análise estatística. Nos dias 26, 26 e 28 do experimento (dois dias antes e no dia dos testes), todos os animais passaram por um período de 15 minutos de habituação ao aparato (imagem 3).

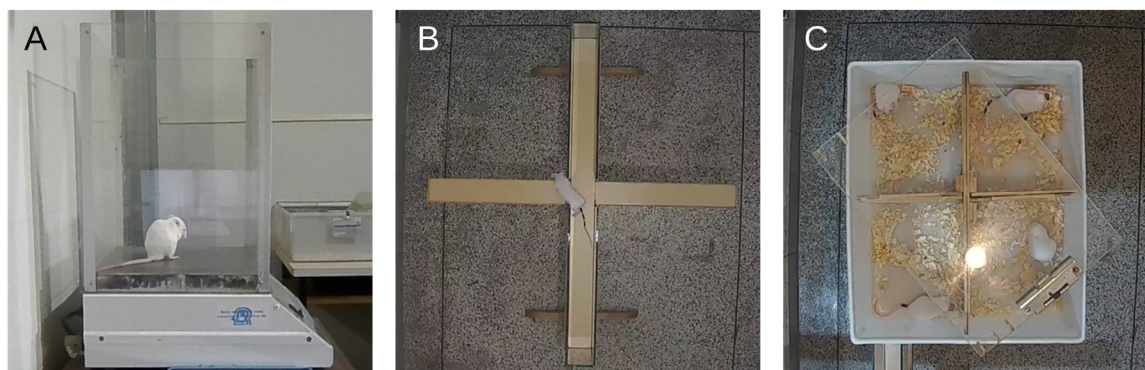
Imagem 3 - Aparato para divisão das caixas-moradia durante o teste nociceptivo do observador.



(A) divisória desmontada; (B) divisória montada; (C) divisória na caixa.

Fonte *arquivo pessoal.*

Imagem 4 - Testes comportamentais.



(A) Placa quente; (B) LCE; (C) Teste de contorções abdominais.

Fonte *arquivo pessoal.*

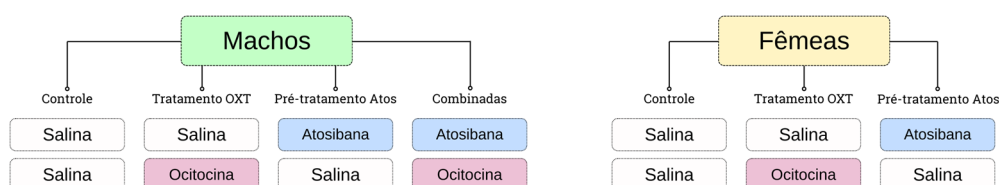
3.6 INJEÇÃO INTRA-PVN

Antes dos testes comportamentais, os observadores receberam injeções centrais combinadas das drogas descritas anteriormente, formando os seguintes grupos: Machos – salina seguida de salina, salina seguida de ocitocina, atosibana seguida de salina, ou atosibana seguida

de ocitocina; Fêmeas – salina seguida de salina, salina seguida de ocitocina, e atosibana seguida de salina (Figura 7). Para ambos os grupos, a droga controle das injeções de salina-ocitocina e atosibana-salina foi a salina-salina. Assim, para cada sexo obteve-se o grupo controle (salina-salina), os grupos tratamento, com agonista dos OXTR (salina-ocitocina), e os grupos pré-tratamento com antagonista (atosibana-salina).

Para os experimentos, foi utilizada uma dose efetiva de ocitocina e uma dose inefetiva de atosibana como pré-tratamento, a fim de realizar o experimento de injeções combinadas e observar se mesmo sem efeito farmacológico, o atosibana seria capaz de se ligar aos OXTR e impedir os efeitos da OXT. Por questões explicitadas nas limitações do presente trabalho, apenas os machos passaram por esta etapa. Nesse caso, o grupo controle foi atosibana-salina, além do grupo salina-salina.

Figura 7 - Injeções realizadas.



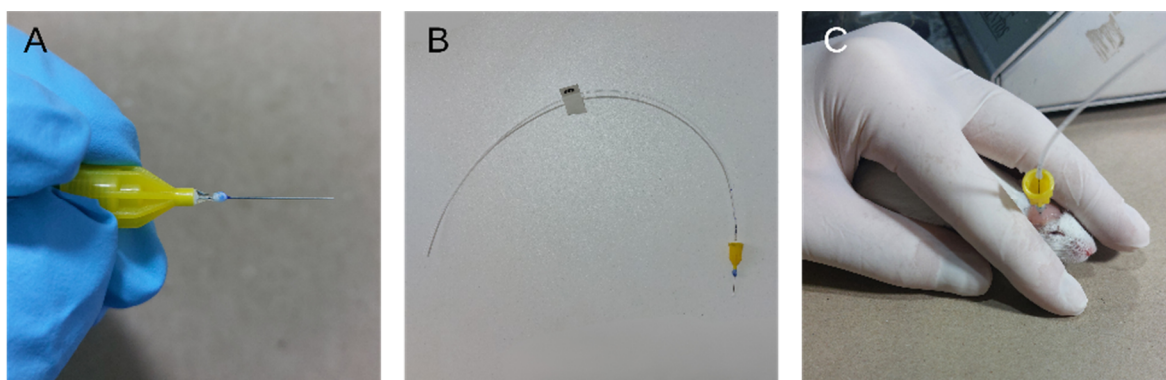
Fonte *arquivo pessoal.*

Para a realização das injeções, foi utilizada agulha gengival 30G (0,3x16mm; AllPrime, Brasil) delimitada a um comprimento de 11,04mm (Imagem 5, A), previamente acoplada a um tubo de polietileno (PE-10) e selada com resina acrílica e adesivo instantâneo (Imagem 5, B). O sistema foi então acoplado a uma seringa de micro injeção de 5µL (Hamilton®, Sigma-Aldrich, Alemanha) e posicionado em uma bomba de micro injeção digital (BI 2000, Insight Equipamentos, Brasil) programada para injeção 0,1µL em 60 segundos.

Assim, cada animal foi contido gentilmente pela pesquisadora para a remoção do mandril de proteção da cânula, utilizando-se um alicate de corte, e posterior injeção da droga

(Imagem 5, C). Cada injeção de cada droga durou 60 segundos, aguardando-se 90 segundos adicionais para a remoção da agulha, a fim de evitar o refluxo da solução. Para os machos, foram injetadas solução salina seguida de ocitocina, ou atosibana seguida de salina, ou atosibana seguida de ocitocina. No caso das fêmeas, foram injetadas solução salina seguida de ocitocina ou atosibana seguida de salina. Considerando o tempo para cada injeção mais o tempo de espera, o tempo total do procedimento de injeção foi de aproximadamente de 5 minutos (300 segundos).

Imagem 5 - Injeção intra-PVN.



(A) agulha para injeção delimitada; (B) sistema de injeção; (C) contenção do animal para injeção.

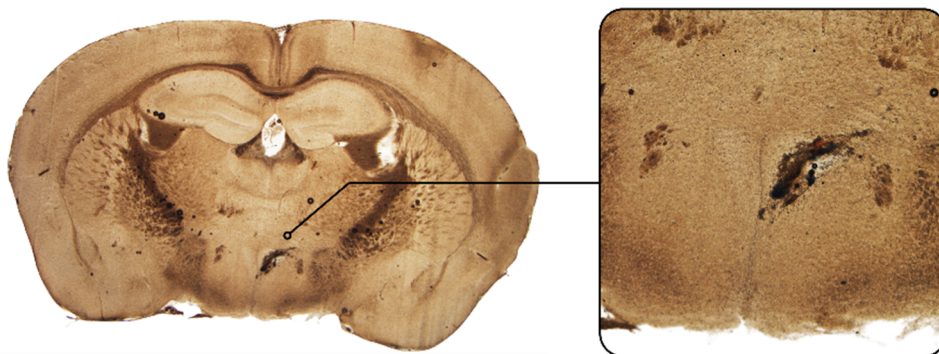
Fonte *arquivo pessoal.*

3.7 HISTOLOGIA

Após o término dos experimentos, foi realizada a eutanásia de todos os camundongos, observadores e demonstradores, utilizando a câmara de CO₂ (45 L, 100% CO₂, 9 L/min – RN nº 13, 20/09/2013). Após o procedimento, observadores (Ob-Sham e Ob-CNC) receberam uma infusão de 0,1µL de uma solução de azul de Evans a 1,5% intra-PVN. Posteriormente, seus encéfalos foram removidos e acomodados em recipientes contendo solução de formalina (10%) por no mínimo 1 hora, para posteriormente serem transferidos para uma solução de sacarose 30% por, no mínimo, 48 horas, sob refrigeração⁸³. Posteriormente, os encéfalos foram seccionados (60µm) em criostato a $-20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Leica®, CM1850) para análise histológica dos sítios de injeção^{59,81-83}. As secções foram avaliadas com o auxílio de um microscópio

(Olympus, BX41TF) para a visualização da dispersão do azul de Evans, indicando o local da injeção central de drogas (Imagem 6)¹⁷⁹. Os camundongos cujas injeções não atingiram o PVN foram excluídos do estudo.

Imagem 6 - Exemplo de acerto do sítio de injeção (PVN).



Bregma = -1,1mm.

Fonte *arquivo pessoal.*

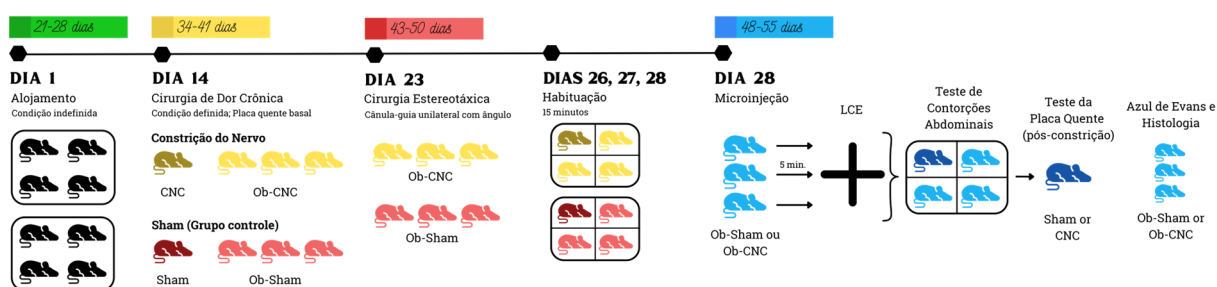
3.8 PROCEDIMENTOS GERAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado monitoramento do peso dos animais observadores, antes da estereotaxia e no dia do teste; e dos demonstradores, antes da constrição e no dia do teste. Para o monitoramento do peso após a estereotaxia, os animais foram marcados com cores diferentes e determinado número de traços na região da cauda. Os animais demonstradores não receberam marcações pois a tricotomia da cirurgia de constrição permaneceu visível até o dia do teste (Imagem 2, E).

Assim, após a chegada com 21 dias de idade, os animais foram alojados em quartetos (dia 1) e conviveram sem interferências, em uma denominada “condição indefinida” até o dia 14 do experimento. No dia 14, foram formados os grupos CNC e Sham a partir da realização da cirurgia de constrição ou da cirurgia Sham em um dos animais de cada caixa. Nesse momento, os observadores passaram a conviver com um coespecífico com dor crônica ou não. No dia 23, os animais observadores (3 por caixa) passaram pela cirurgia estereotóxica para

implantação da cânula-guia, foram pesados e tiveram suas caudas marcadas. No dia 28 foram realizados os testes com todos os animais da caixa: os demonstradores foram submetidos ao teste da placa quente; os observadores receberam a injeção intra-PVN, foram submetidos ao teste do LCE e retornaram para uma caixa separada. Após todos os animais observadores passarem pelo LCE, foram submetidos ao teste de contorções abdominais na presença do demonstrador. Ao final do experimento, todos os animais passaram pela eutanásia e os observadores receberam a injeção de azul de Evans para posterior visualização dos sítios de injeção. O delineamento experimental descrito encontra-se ilustrado esquematicamente na Figura 8.

Figura 8 - Delineamento Experimental.



As etiquetas coloridas sobre cada dia de experimento apontam as respectivas idades (em dias) dos animais.

Fonte *arquivo pessoal.*

3.9 DADOS: ARMAZENAMENTO, PROCESSAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos vídeos foi feita através do software Wondershare© (Filmora, versão 13.6.4) juntamente com dois aplicativos para Android utilizados na contagem dos comportamentos: Multi Timer Cronômetro (LemonClip, versão 2.12.6) e Contador: contador de cliques (UXAPPS LTD, versão 1.2.3). Além disso, todas as informações coletadas nos experimentos, como peso, intercorrências, vídeos, entre outras, foram armazenadas em unidade externa e computador pessoal de posse da aluna, e em nuvem (Onedrive, Microsoft®), a qual foi compartilhada com sua orientadora.

Os dados coletados foram analisados através do software Statistica© (Statsoft, versão 12.5.192.7). A análise da normalidade dos dados foi feita por grupo utilizando o teste Shapiro-Wilk. No caso de variáveis não paramétricas, utilizou-se: Wilcoxon para comparação de variáveis dependentes; Kolmogorov-Smirnov para comparação de dois grupos independentes; e Kruskal-Wallis para comparação de mais de dois grupos independentes^{184,185}. Quando as variáveis foram paramétricas, utilizou-se: teste t de Student para amostras dependentes e para comparação de dois grupos independentes. Valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

Para a seleção dos grupos controle, foram escolhidos animais observadores considerados acertos na cirurgia estereotáxica e que foram testados junto com o animal que recebeu droga ou em uma data de teste próxima. No caso dos animais que receberam quaisquer umas das drogas, todos os dados de acertos foram utilizados, com exceção do controle salina-atosibana para o grupo atosibana-ocitocina, devido número elevado de animais; nesse caso, a seleção se deu pela mesma forma do grupo controle salina.

Para a elaboração dos gráficos, utilizou-se o software GraphPad Prism© (GraphPad Software, versão 10.3.1.509), para as tabelas e quadros, utilizou-se o Excel (Microsoft®, versão 2502) e para as figuras, imagens e edições no geral, foi utilizado o Canva (Canva, https://www.canva.com/pt_br/).

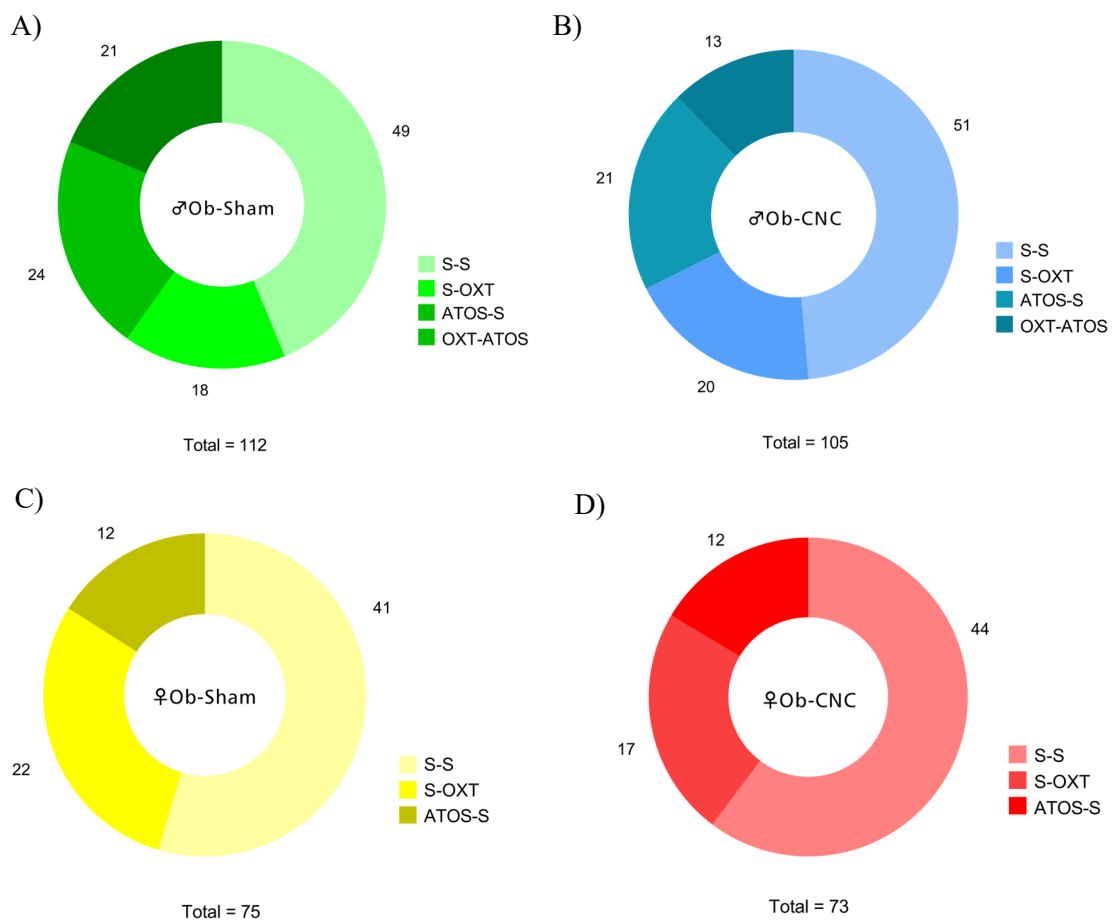
4. RESULTADOS

4.1 INFORMAÇÕES GERAIS

4.1.1 Número de Animais

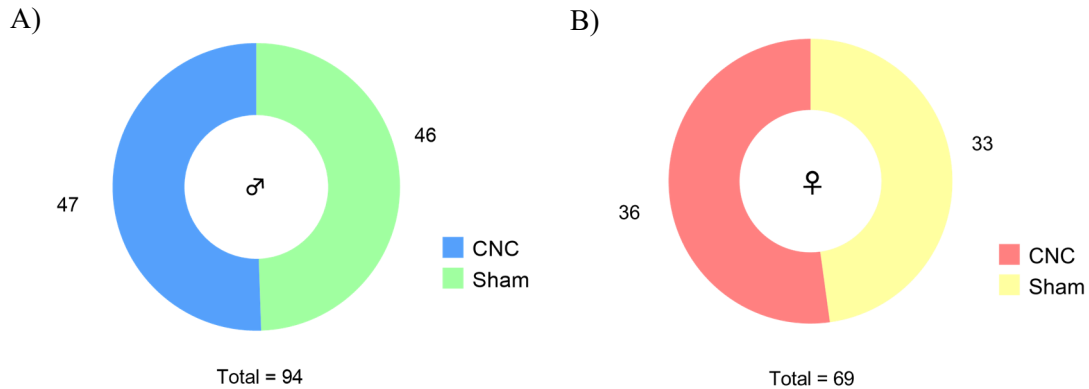
Para os experimentos, foi utilizado um total de 648 animais, sendo 372 machos e 276 fêmeas. Destes, 365 animais foram observadores e passaram pela estereotaxia (217 machos e 148 fêmeas) (gráfico 1) e 162 foram demonstradores, passando pela constrição ou pela cirurgia Sham (gráfico 2).

Gráfico 1 - Número de observadores utilizados divididos de acordo com o sexo, o tipo de convívio e a droga injetada.



(A) machos Ob-Sham; (B) machos Ob-CNC; (C) fêmeas Ob-Sham; (D) fêmeas Ob-CNC. S-S, salina e salina; S-OXT, salina e ocitocina; ATOS-S, atosibana e salina; ATOS-OXT, atosibana e ocitocina; Ob-Sham, observador do Sham; Ob-CNC, observador do CNC; ♀, fêmeas; ♂, machos.

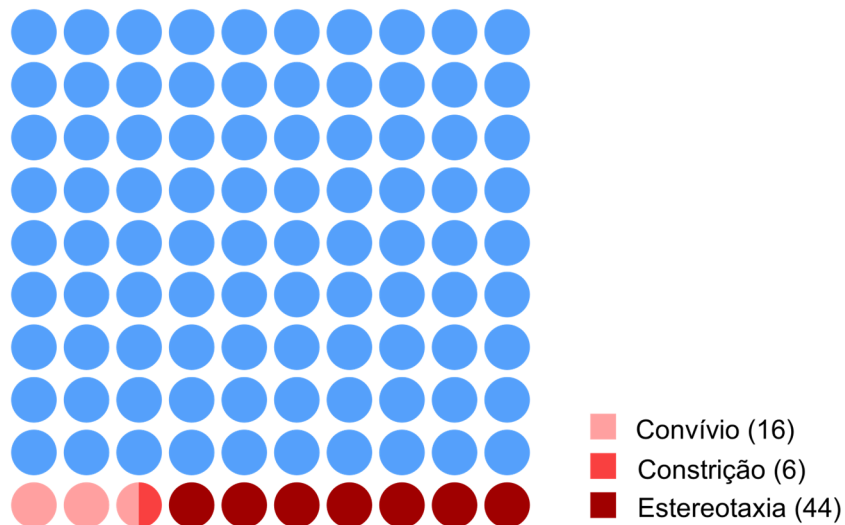
Gráfico 2 - Número de demonstradores utilizados divididos de acordo com o sexo e o tipo de cirurgia (Sham ou CNC).



(A) machos; (B) fêmeas. S-S, salina e salina; S-OXT, salina e ocitocina; ATOS-S, atosibana e salina; ATOS-OXT, atosibana e ocitocina; Ob-Sham, observador do Sham; Ob-CNC, observador do CNC; ♀, fêmeas; ♂, machos.

Do total de animais, 55 observadores foram utilizados no início (31 machos e 24 fêmeas) para estabelecimento das coordenadas da cirurgia estereotáxica e aprendizado da técnica, os quais não entraram na porcentagem de acertos (devido a um total de 100% de erro). O número de óbitos foi de 66 animais, gerando um percentual de 10,19% do total de animais utilizados. Destes, 2,47% vieram a óbito por causas desconhecidas durante o alojamento (n=16), 0,93% durante ou após a constrição do nervo (n=6) e 6,79% durante ou após a estereotaxia (n=44) (Figura 9).

Figura 9 - Levantamento de óbitos por momento: convívio, constrição e estereotaxia.



Os animais foram alojados inicialmente em quartetos, porém, devido aos óbitos, alguns experimentos foram realizados em duplas ou trios, totalizando: 112 quartetos, 39 trios e 7 duplas. Destes, apenas 99 quartetos, 32 trios e 5 duplas foram consideradas válidas (após exclusão dos animais utilizados inicialmente). Após o estabelecimento das coordenadas estereotáxicas e do início dos acertos, a porcentagem de acertos da estereotaxia foi de 50,00% para machos e 43,62% para fêmeas. As regiões aproximadas de acertos e erros da cirurgia estereotáxica estão representadas na Figura 10. Por fim, para a análise estatística, foram utilizados 76 machos e 46 fêmeas como observadores, 48 machos e 29 fêmeas como demonstradores.

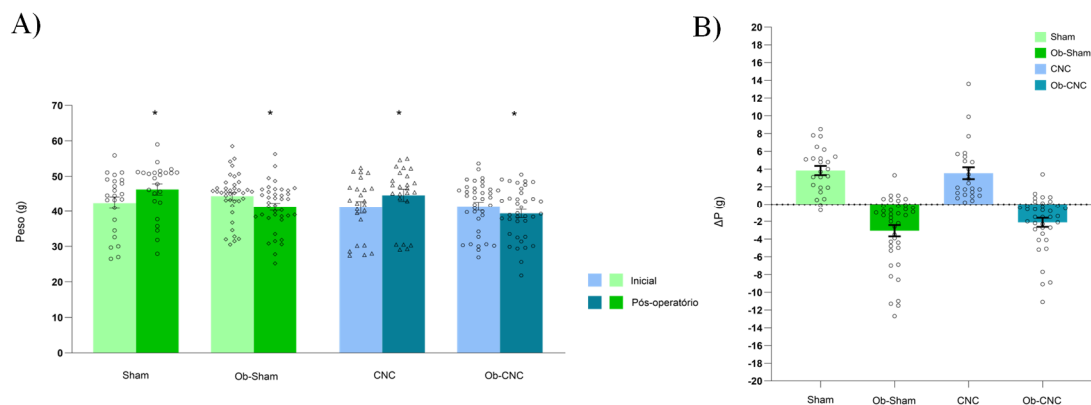
4.1.2 Monitoramento do Peso

Todos os animais utilizados no estudo, machos e fêmeas, passaram pela pesagem ao menos em dois momentos: os demonstradores foram pesados antes da cirurgia e 14 dias após o procedimento, no dia dos testes comportamentais; e os observadores foram pesados no dia da cirurgia estereotáxica e 5 dias após o procedimento, também no dia dos testes (gráfico 3, A para machos e gráfico 4, A para fêmeas). Além dos pesos, também foi calculada a diferença entre peso final (pós-operatório) e peso inicial (antes das respectivas cirurgias), gerando um valor denominado Δ Peso (ΔP) (gráfico 3, B e gráfico 4, B), e a porcentagem de peso perdido, a fim de se identificar visualmente e estatisticamente as variações de peso nos animais. As tabelas 1 e 2 apresentam os valores médios dos pesos e respectivos erros-padrão, o valor de p para as comparações entre medidas antes e após a cirurgia, o valor de ΔP e porcentagem de peso perdido, todos para cada grupo (Sham, CNC, Ob-Sham e Ob-CNC), para machos e fêmeas, respectivamente.

4.1.2.1 Machos

Os valores de p mostraram um ganho de peso significativo para ambos os grupos de demonstradores (Sham e CNC) (gráfico 3 e tabela 1), sem haver uma diferença significativa entre os pesos finais, o ΔP e a % de peso de ambos os grupos de demonstradores ($p > 0,1$). Para os observadores, a análise apontou que animais de ambos os grupos, Ob-Sham e Ob-CNC, perderam peso em relação a primeira medida ($p = 0,000014$ e $p = 0,000116$). Por fim, não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre os pesos finais, ΔP e a % de peso dos animais observadores. O gráfico 3 apresenta de maneira ilustrada as informações de peso inicial e pós-operatório (A), e ΔP (B), presentes na tabela 1.

Gráfico 3 - Variação dos pesos dos camundongos machos.



(A) medidas antes e após a cirurgia; (B) comparação dos valores final menos inicial (Δ Peso). Valores apresentados como média $\pm$ EPM (Teste Kolmogorov-Smirnov para grupos independentes – Sham e CNC, Ob-Sham e Ob-CNC; Teste de Wilcoxon para variáveis dependentes – Peso basal e Peso pós-operatório). ΔP , delta-Peso (peso final-peso inicial). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos [(*) entre o peso 14 dias após a constrição e peso inicial do mesmo grupo].

Tabela 1 - Variação dos pesos dos camundongos machos.

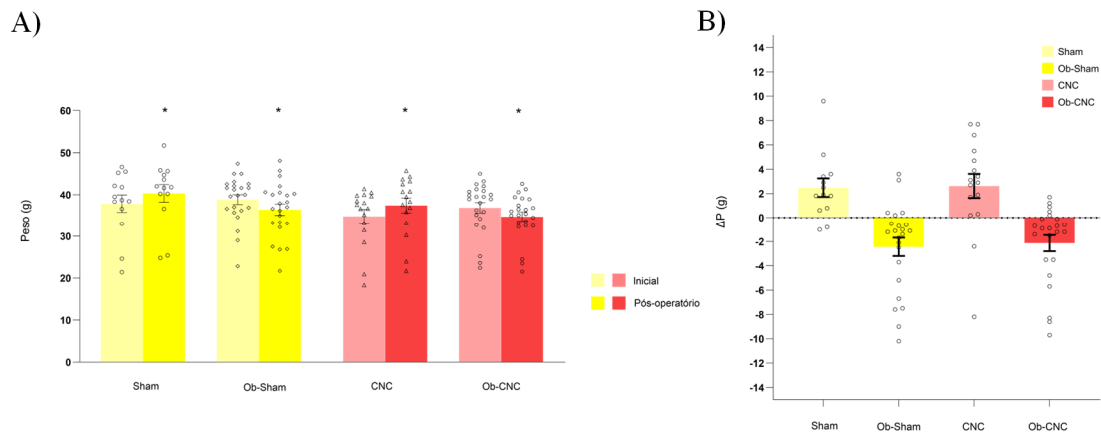
Condição	Peso Basal	Peso pós-operatório	p	ΔP	%
Sham (n=24)	42,48 $\pm$ 8,34	46,31 $\pm$ 7,70	0,000034*	3,83 $\pm$ 2,55	9,87 $\pm$ 7,29
CNC (n=24)	41,11 $\pm$ 8,33	44,64 $\pm$ 8,35	0,000018*	3,53 $\pm$ 3,28	9,20 $\pm$ 9,84
Ob-Sham (n=39)	44,37 $\pm$ 6,60	41,31 $\pm$ 6,72	0,000014*	-3,06 $\pm$ 3,97	-6,71 $\pm$ 8,49
Ob-CNC (n=37)	41,44 $\pm$ 7,21	39,33 $\pm$ 7,24	0,000116*	-2,11 $\pm$ 3,10	-5,00 $\pm$ 7,29

Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão (Teste Kolmogorov-Smirnov para grupos independentes – Sham e CNC, Ob-Sham e Ob-CNC; Teste de Wilcoxon para variáveis dependentes – Peso basal e Peso pós-operatório). ΔP , delta-Peso (peso final-peso inicial). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (*) entre o peso 14 dias após a constrição e peso inicial do mesmo grupo.

4.1.2.2 Fêmeas

A variação dos pesos das fêmeas foi semelhante à dos machos: fêmeas Sham e CNC ganharam peso em relação à primeira pesagem ($p=0,006$ e $p=0,015$), e fêmeas Ob-Sham e Ob-CNC perderam peso ($p=0,002$ e $p=0,004$). Também não foram encontradas diferenças significativas entre os pesos dos observadores (Ob-Sham e Ob-CNC) e entre os pesos dos demonstradores (Sham e CNC), entre seus valores de ΔP e de % ($p>0,10$). O gráfico 4 apresenta de maneira ilustrada as informações de peso inicial e pós-operatório (A), e ΔP (B), presentes na tabela 2.

Gráfico 4 -Variação dos pesos dos camundongos fêmeas.



(A) medidas antes e após a cirurgia; (B) comparação dos valores final menos inicial (Δ Peso). Valores apresentados como média $\pm$ EPM (Teste Kolmogorov-Smirnov para grupos independentes – Sham e CNC, Ob-Sham e Ob-CNC; Teste de Wilcoxon para variáveis dependentes – Peso basal e Peso pós-operatório). ΔP , delta-Peso (peso final-peso inicial). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos [(*) entre o peso 14 dias após a constrição e peso inicial do mesmo grupo].

Tabela 2 - Variação dos pesos dos camundongos fêmeas.

Condição	Peso Basal	Peso pós-operatório	<i>p</i>	ΔP	%
Sham (n=13)	37,82 $\pm$ 7,63	40,31 $\pm$ 7,64	0,006420*	2,48 $\pm$ 2,75	7,10 $\pm$ 7,19
CNC (n=16)	34,78 $\pm$ 6,87	37,39 $\pm$ 7,02	0,015086*	2,62 $\pm$ 3,99	8,49 $\pm$ 11,04
Ob-Sham (n=23)	38,83 $\pm$ 5,63	36,39 $\pm$ 6,49	0,002127*	-2,44 $\pm$ 3,64	-6,29 $\pm$ 9,25
Ob-CNC (n=23)	36,85 $\pm$ 6,14	34,73 $\pm$ 5,40	0,004051*	-2,13 $\pm$ 3,22	-5,59 $\pm$ 7,75

Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão (Teste Kolmogorov-Smirnov para grupos independentes – Sham e CNC, Ob-Sham e Ob-CNC; Teste de Wilcoxon para variáveis dependentes – Peso basal e Peso pós-operatório). ΔP , delta-Peso (peso final-peso inicial). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (*) entre o peso 14 dias após a constrição e peso inicial do mesmo grupo.

4.2 DEMONSTRADORES

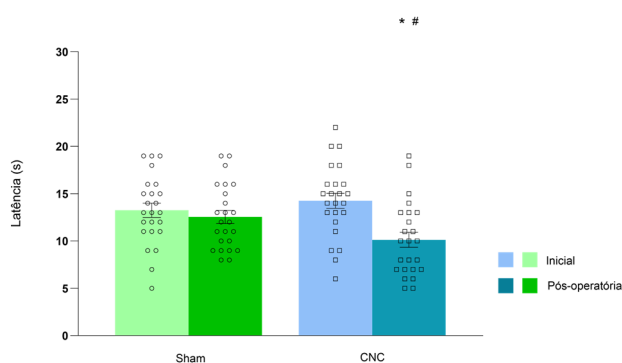
4.2.1 Comparação das latências de retirada da pata: antes e após a constrição do nervo isquiático no mesmo grupo e entre as latências 14 dias após a cirurgia de camundongos Sham e CNC

Os gráficos 5 e 6 apresentam as comparações entre os valores de latência basal e pós-operatória de cada grupo. Nas tabelas 3 e 4 são apresentados os valores médios de latência com seus respectivos erros-padrão, e valores de p para a comparação dos valores antes e após a cirurgia, dentro do mesmo grupo (Sham ou CNC, comparação horizontal e p vertical) e para a comparação dos valores de latência antes e após a cirurgia entre os grupos (comparação vertical e p horizontal).

4.2.1.1 Machos

O teste t de Student apontou uma diferença significativa entre os valores de latência pós-operatória dos grupos Sham e CNC ($t_{(46)}=2,2829$, $p=0,0271$). Além disso, apontou que não há uma alteração significativa na latência do grupo Sham após a cirurgia ($t_{(24)}=0,9120$, $p=0,3712$), porém no grupo CNC, o valor de latência reduziu significativamente ($t_{(24)}=4,7710$, $p=0,000082$).

Gráfico 5 - Comparação entre as medidas repetidas de latência de retirada da pata (antes e após a cirurgia) e entre as latências pós-operatórias dos machos dos grupos Sham e CNC.



Valores apresentados como média $\pm$ EPM (Teste t de Student para grupos independentes e para medidas repetidas). A latência pós-operatória foi feita 14 dias após a cirurgia, no dia dos testes comportamentais dos observadores. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. (*) entre medidas inicial e pós-operatória; (#) entre medidas pós-operatórias de CNC e Sham.

Tabela 3 - Valores de latência, basal e pós-operatória, dos grupos Sham e CNC machos, e respectivos valores de p das comparações.

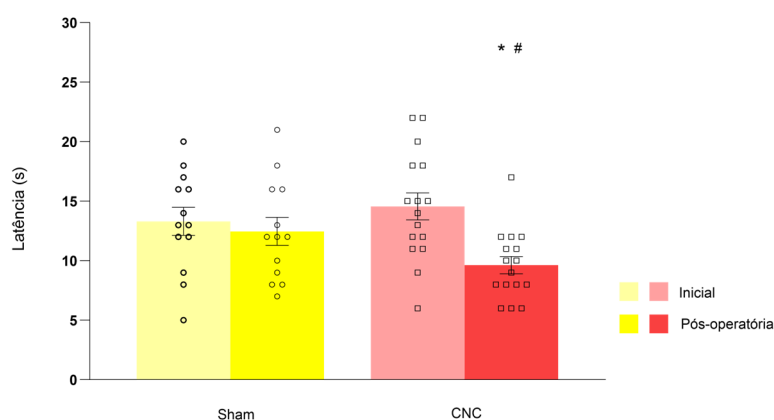
	Sham (n=35)	CNC (n=30)	<i>p</i>
Latência Basal	13,25 ± 3,67	14,25 ± 3,89	0,3648
Latência Pós-operatória	12,54 ± 3,43	10,12 ± 3,89	0,0271*
<i>p</i>	0,3712	0,000082*	

Comparação de medidas não repetidas entre grupos diferentes (*p* vertical) e entre medidas repetidas para o mesmo grupo (*p* horizontal). Valores apresentados como média ± desvio padrão (Teste t de Student para grupos independentes e para medidas repetidas). A latência pós-operatória foi feita 14 dias após a cirurgia, no dia dos testes comportamentais dos observadores. Valores de $p \leq 0,05$ (*) foram considerados estatisticamente significativos.

4.2.1.2 Fêmeas

O teste t de Student apontou uma diferença significativa entre os valores de latência: pós-operatória dos grupos Sham e CNC ($t_{(27)}=2,1314$, $p=0,042$); e entre os valores de latência basal e pós-operatória do grupo CNC ($t_{(16)}=5,2918$, $p=0,00009$). Não foram encontradas diferenças entre os valores de latência basal e pós-operatória para o grupo Sham ($t_{(13)}=1,0584$, $p=0,3106$).

Gráfico 6 - Comparação entre as medidas repetidas de latência de retirada da pata (antes e após a cirurgia) e entre as latências pós-operatórias das fêmeas dos grupos Sham e CNC.



Comparação de medidas não repetidas entre grupos diferentes (*p* vertical) e entre medidas repetidas para o mesmo grupo (*p* horizontal). Valores apresentados como média ± EPM (Teste t de Student para grupos independentes e para medidas repetidas). A latência pós-operatória foi feita 14 dias após a cirurgia, no dia dos testes comportamentais dos observadores. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. (*) entre medidas inicial e pós-operatória; (#) entre medidas pós-operatórias de CNC e Sham.

Tabela 4 - Valores de latência, basal e pós-operatória, dos grupos Sham e CNC fêmeas, e respectivos valores de p das comparações.

	Sham (n=17)	CNC (n=21)	p
Latência Basal	13,31 ± 4,23	14,56 ± 4,55	0,4524
Latência Pós-operatória	12,46 ± 4,25	9,63 ± 2,90	0,0423*
p	0,3106	0,000090*	

Comparação de medidas não repetidas entre grupos diferentes (p vertical) e entre medidas repetidas para o mesmo grupo (p horizontal). Valores apresentados como média ± desvio padrão (Teste t de Student para grupos independentes e para medidas repetidas). A latência pós-operatória foi feita 14 dias após a cirurgia, no dia dos testes comportamentais dos observadores. Valores de $p \leq 0,05$ (*) foram considerados estatisticamente significativos.

4.3 OBSERVADORES

Os anexos B e D apresentam os valores médios e respectivos erros-padrão das medidas convencionais e etológicas registradas no LCE de camundongos machos e fêmeas, respectivamente (%TBA, % de tempo nos braços abertos; %TBF, % de tempo nos braços fechados; %TC, % de tempo no centro; %EBA, % de entrada nos braços abertos; %EBF, % de entrada nos braços fechados; TE, total de entradas). Os valores de H obtidos através do teste de Kruskal-Wallis representam a comparação das médias entre Ob-Sham e Ob-CNC que receberam a mesma combinação de drogas. Os anexos C e E apresentam apenas os valores de H obtidos através do teste de Kruskal-Wallis para comparações entre as diferentes injeções dentro do mesmo grupo (Ob-Sham ou Ob-CNC) em machos e fêmeas. Para todas as tabelas, valores de H com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os gráficos 8 e 10 representam visualmente as medidas registradas no LCE de machos e fêmeas que possuíram diferença estatisticamente significativa para pelo menos uma das condições e comparações apresentadas, cujos valores médios, erros e valores de H estão expressos nas tabelas 5 a 8. Os gráficos 9 e 11 representam os números de contorções abdominais para cada grupo (Ob-Sham e Ob-CNC) em cada condição de tratamento.

4.3.1 Machos

4.3.1.1 Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, nos comportamentos do tipo-ansiedade avaliados através do LCE em animais que conviveram com coespecífico com dor crônica ou Sham

4.3.1.1.1 *Efeitos das injeções combinadas de salina e ocitocina (S-OXT) nos comportamentos do tipo-ansiedade*

Pôde-se observar que camundongos machos que conviveram com coespecífico com dor crônica (Ob-CNC) e receberam injeções combinadas de salina-salina (S-S) apresentaram menor porcentagem de tempo nos braços abertos ($H=11,34$, $p=0,0412$) (gráfico 7, A), maior porcentagem de tempo nos braços fechados ($H=4,16$, $p=0,0413$) (gráfico 7, B) e maior tempo de autolimpeza protegida em relação ao Ob-Sham que recebeu S-S ($H=8,27$, $p=0,004$) (gráfico 8, F). Os Ob-CNC que receberam tratamento S-OXT apresentaram aumento do total de entradas em relação aos Ob-CNC que receberam S-S ($H=5,70$, $p=0,0169$) (gráfico 7, D). Nenhum outro efeito do tratamento com S-OXT foi observado nos grupos.

4.3.1.1.2 *Efeitos das injeções combinadas de salina e atosibana (S-ATOS) nos comportamentos do tipo-ansiedade*

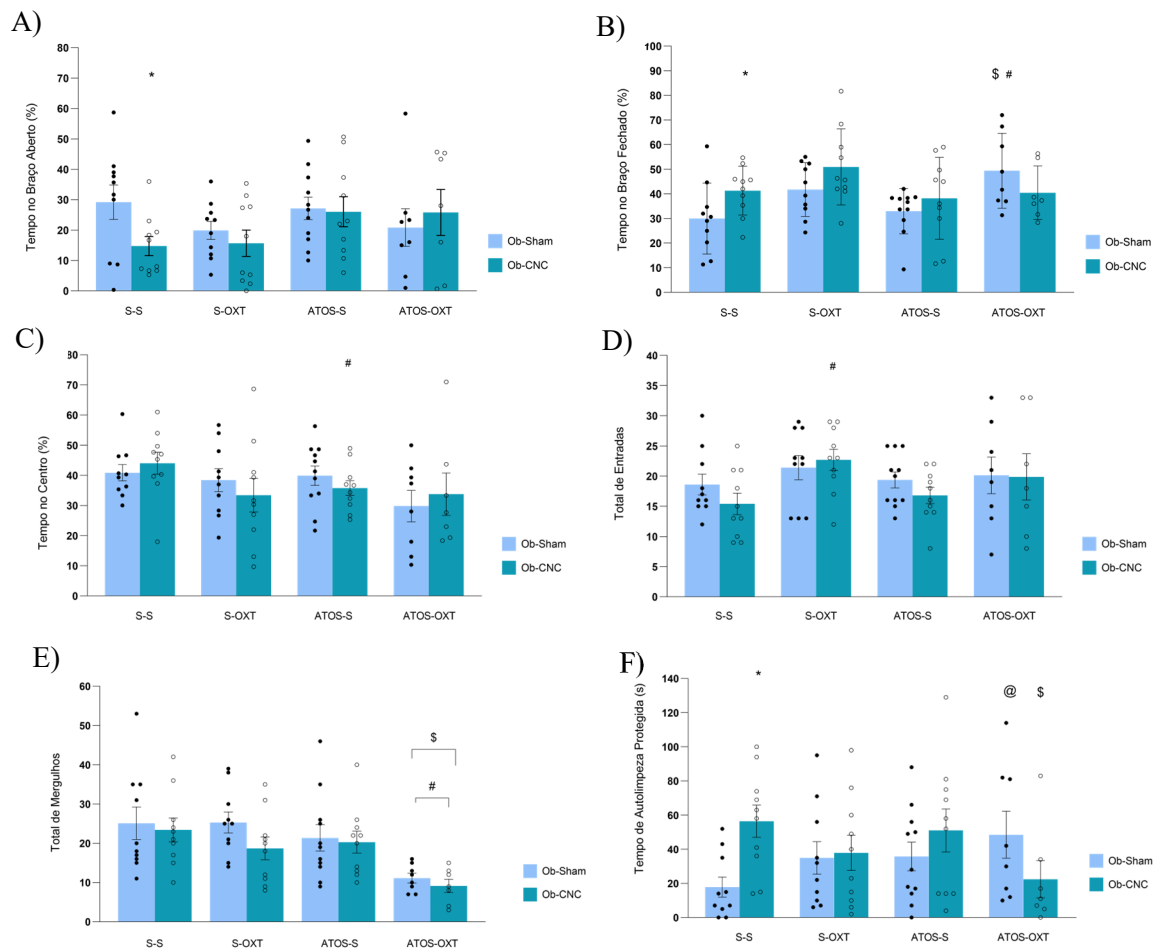
Os animais Ob-CNC que receberam atosibana seguido de salina (ATOS-S) apresentaram redução na porcentagem de tempo no centro em relação ao controle S-S ($H=4,64$, $p=0,0311$) (gráfico 7, C). Por fim, um efeito único no aumento da porcentagem de esticar desprotegido também foi observado no grupo Ob-CNC ($H=3,85$, $p=0,0497$).

4.3.1.1.3 *Efeitos das injeções combinadas de atosibana e ocitocina (ATOS-OXT) nos comportamentos do tipo-ansiedade*

No grupo Ob-Sham, as injeções combinadas de ATOS-OXT promoveram um aumento na porcentagem de tempo nos braços fechados tanto em relação ao controle S-S ($H=6,41$, $p=0,0113$) quanto em relação ao controle ATOS-S ($H=4,26$, $p=0,0388$) (gráfico 7, B). Além disso, mostrou um possível efeito no aumento do tempo de autolimpeza protegida nesses animais quando comparados ao controle S-S ($H=3,82$, $p=0,0504$) (gráfico 7, F). Já no grupo

Ob-CNC, as injeções promoveram redução no tempo de autolimpeza protegida quando comparado ao grupo controle S-S ($H=5,03$, $p=0,0248$) (gráfico 7, F). As injeções combinadas de atosibana e salina ATOS-OXT promoveram aumento do total de mergulhos nos Ob-Sham e nos Ob-CNC, tanto quando comparados aos respectivos controles S-S ($H=9,1641$, $p=0,0025$; $H=9,46$, $p=0,0021$) quanto quando comparados aos controles ATOS-S ($H=6,16$, $p=0,0130$; $H=6,96$, $p=0,0083$) (gráfico 7, E).

Gráfico 7 - Medidas convencionais e etológicas obtidas através do LCE de camundongos machos que receberam injeções combinadas intra-PVN e conviveram em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.



(A) tempo nos braços abertos (%); (B) tempo nos braços fechados (%); (C) tempo no centro (%); (D) total de entradas; (E) total de mergulhos; (F) tempo de autolimpeza protegida (s). Valores apresentados como média $\pm$ EPM e valores de H obtidos pelo teste Kruskal-Wallis (Tabelas 4 e 5). S, Salina; OXT, ocitocina; ATOS, atosibana; Ob-Sham, observador do animal Sham; Ob-CNC, observador do animal CNC. Valores de H com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos: (*) comparação entre Ob-Sham e Ob-CNC do mesmo grupo; (#) comparação entre animal tratado e seu respectivo controle (S-S para S-OXT e ATOS-S, e ATOS-S para ATOS-OXT); (\$) comparação entre animal tratado e grupo salina. (@) comparação entre indivíduo tratado e controle salina com $p=0,0504$.

4.3.1.2 Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, na nocicepção avaliada através do teste de contorções abdominais em animais que conviveram com coespecífico com dor crônica

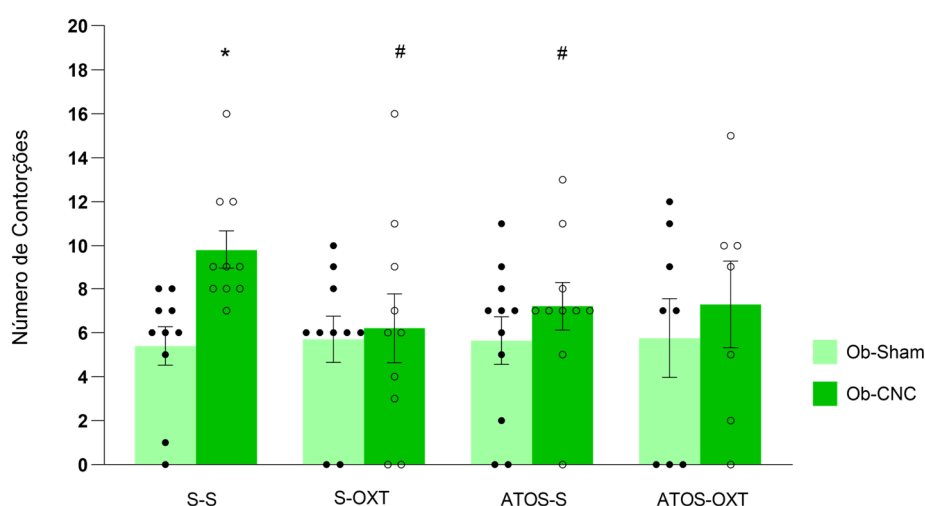
4.3.1.2.1 Efeitos das injeções combinadas de salina e ocitocina (S-OXT) na nocicepção

Os animais Ob-CNC que receberam salina apresentaram um número maior de contorções abdominais em relação ao controle Ob-Sham ($H=11,34$, $p=0,0008$) (gráfico 8). Apesar do tratamento com S-OXT não apresentar efeito nos animais Ob-Sham, provocou uma redução no número de contorções dos animais Ob-CNC em relação ao controle S-S ($H=4,3840$, $p=0,0363$) (gráfico 8).

4.3.1.2.2 Efeitos das injeções combinadas de atosibana e salina (ATOS-S) na nocicepção

As injeções de ATOS-S promoveram efeito apenas no grupo Ob-CNC, causando uma redução no número de contorções em relação ao controle S-S ($H=4,99$, $p=0,2554$) (gráfico 8). Nenhum outro efeito foi encontrado para as injeções de ATOS-S entre os grupos Ob-Sham e Ob-CNC e as outras injeções.

Gráfico 8 - Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, no número de contorções de camundongos machos avaliados no teste de contorções abdominais após conviverem em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.



Valores apresentados como média $\pm$ EPM e valores de H obtido pelo teste Kruskal-Wallis. S, Salina; OXT, ocitocina; ATOS, atosibana; Ob-Sham, observador do animal Sham; Ob-CNC, observador do animal CNC. Valores de H com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos: (*) comparação entre Ob-Sham e Ob-CNC do mesmo grupo; (#) comparação entre animal tratado e seu respectivo controle (S-S para S-OXT e ATOS-S, e ATOS-S para ATOS-OXT).

4.3.1.2.3 Efeitos das injeções combinadas de atosibana e ocitocina (ATOS-OXT) na nocicepção

As injeções combinadas de ATOS-OXT não promoveram efeito na nocicepção dos camundongos machos que conviveram com Ob-Sham ou Ob-CNC em relação ao controle ATOS-S ($p=0,8$ e $p=0,84$), em relação ao S-S ($p=0,62$ e $p=0,52$) e ao S-OXT ($p=0,61$ e $p=0,65$).

4.3.2 Fêmeas

4.3.2.2 Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, nos comportamentos do tipo-ansiedade avaliados através do LCE em animais que conviveram com coespecífico com dor crônica ou Sham

4.3.2.2.1 Efeitos das injeções combinadas de salina e ocitocina (S-OXT) nos comportamentos do tipo-ansiedade

As fêmeas Ob-CNC que receberam S-S não apresentaram diferenças significativas na maior parte dos comportamentos analisados quando comparadas às fêmeas Ob-Sham que receberam S-S, com exceção do total de levantamentos, que foi maior no grupo Ob-CNC ($H=4,1721$, $p=0,0411$) (anexo D, gráfico 9, F).

Quanto aos efeitos das injeções de S-OXT têm-se no grupo Ob-CNC: aumento da porcentagem de tempo nos braços abertos ($H=4,088$, $p=0,0432$) (gráfico 10, A), redução na porcentagem de tempo nos braços fechados ($H=4,90$, $p=0,0268$) (gráfico 10, B), aumento da porcentagem de entradas no braços abertos ($H=4,48$, $p=0,0343$) (gráfico 10, D), redução da porcentagem de entradas nos braços fechados ($H=4,48$, $p=0,0343$) (gráfico 10, E), aumento do total de mergulhos ($H=4,72$, $p=0,0298$) (gráfico 10, G) com redução da porcentagem de mergulhos protegidos ($H=6,52$, $p=0,0106$) (gráfico 10, H), e redução no tempo de autolimpeza protegida ($H=4,69$, $p=0,0302$) (gráfico 9, I) em relação ao grupo S-S (anexos D e E).

No grupo Ob-Sham, as injeções de S-OXT reduziram a porcentagem de tempo no centro ($H=3,89$, $p=0,0484$) (gráfico 10, C), a porcentagem de mergulhos protegidos ($H=4,50$, $p=0,0337$) (gráfico 9, H), e aumentou o total de levantamentos ($H=9,90$, $p=0,0017$) (gráfico 9, F) em relação ao controle S-S (anexos D e E).

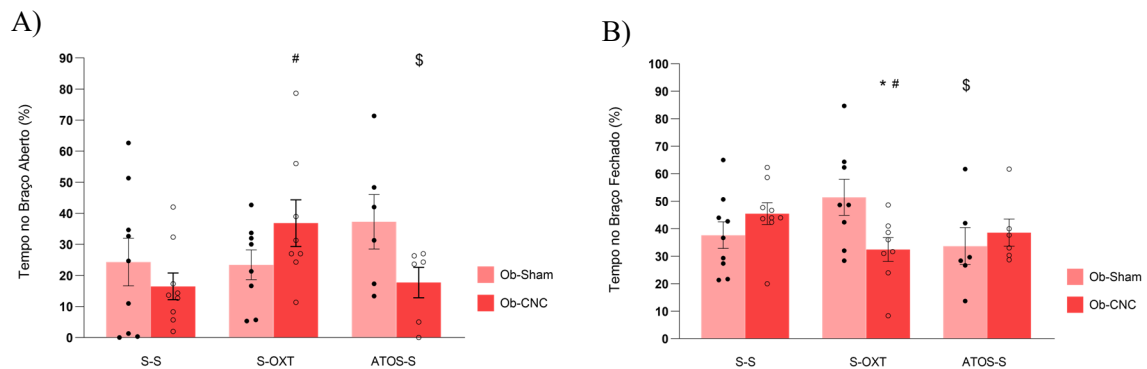
Por fim, comparando-se os efeitos das injeções de S-OXT entre Ob-Sham e Ob-CNC, observou-se uma diferença significativa entre a porcentagem de tempo nos braços fechados ($H=4,37$, $p=0,0352$) (gráfico 10, B) e no total de mergulhos ($H=4,41$, $p=0,0356$) (gráfico 9, G).

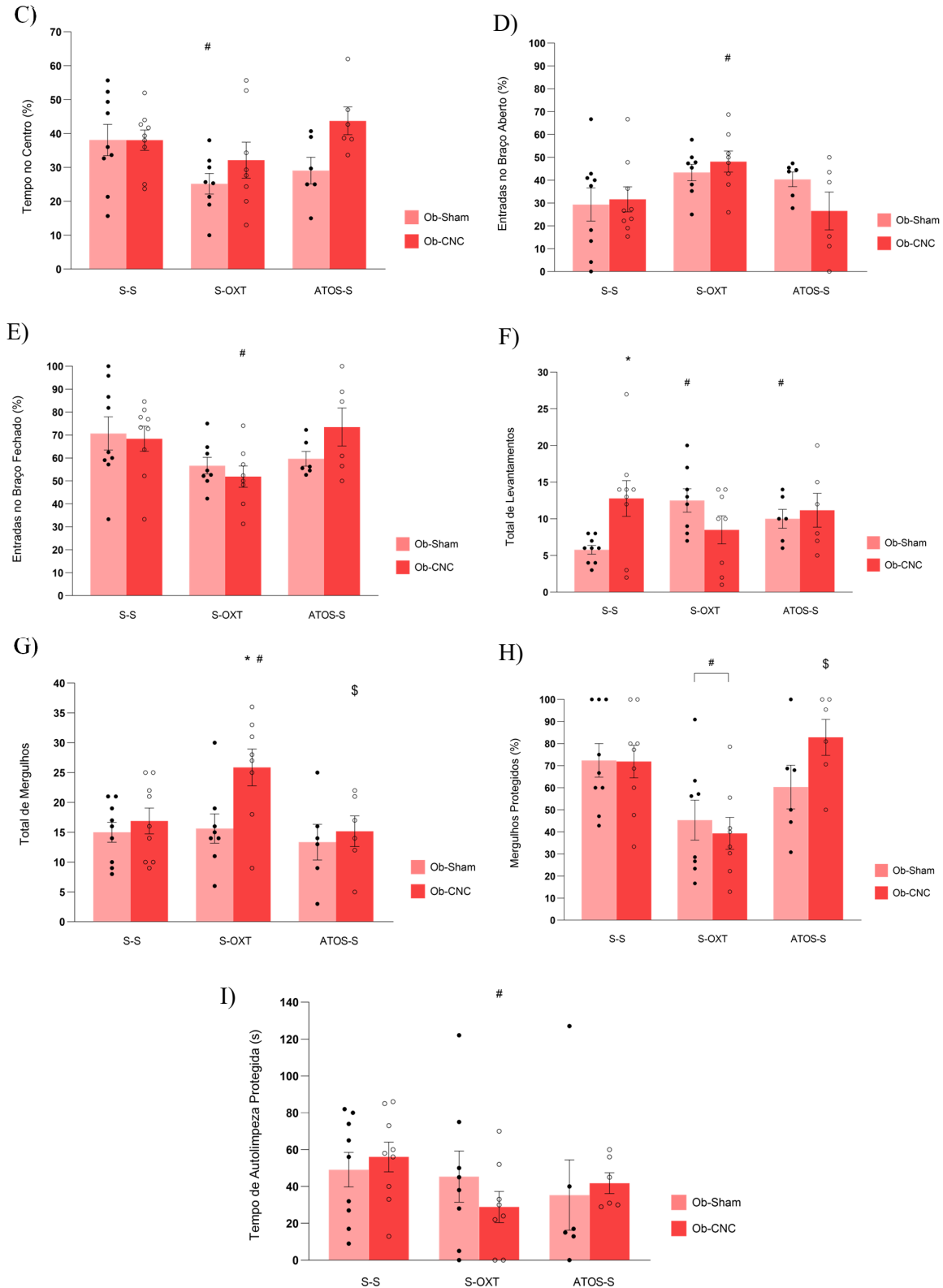
4.3.2.2.2 Efeitos das injeções combinadas de atosibana e salina (ATOS-S) nos comportamentos do tipo-ansiedade

A atosibana não teve efeito nos comportamentos do tipo-ansiedade avaliados no LCE nos Ob-CNC, nem entre Ob-CNC e Ob-Sham, quando comparados ao controle S-S, mas apresentou aumento no total de levantamentos dos Ob-Sham ($H=5,69$, $p=0,0170$) (anexos D e E, gráfico 9, F).

Quando comparados aos efeitos da S-OXT, no grupo Ob-Sham, a atosibana apresentou menor porcentagem de tempo nos braços fechados ($H=4,02$, $p=0,0449$) (gráfico 9, B); e no grupo Ob-CNC, menor porcentagem de tempo nos braços abertos ($H=4,58$, $p=0,0322$) (gráfico 9, A), menor valor total de mergulhos ($H=4,81$, $p=0,0282$) (gráfico 9, G), maior porcentagem de mergulhos protegidos ($H=4,67$, $p=0,0066$) (gráfico 9, H), e maior porcentagem de esticar protegido ($H=4,67$, $p=0,0307$) (anexos D e E).

Gráfico 9 - Medidas convencionais e etológicas obtidas através do LCE de camundongos fêmeas que receberam injeções combinadas intra-PVN e conviveram em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.





(A) tempo nos braços abertos (%); (B) tempo nos braços fechados (%); (C) tempo no centro; (D) entradas nos braços abertos (%); (E) entradas nos braços fechados (%); (F) total de levantamentos; (G) total de mergulhos; (H) mergulhos protegidos (%); (I) tempo de autolimpeza protegida (s). Valores apresentados como média $\pm$ EPM e valores de H obtidos pelo teste Kruskal-Wallis (Tabelas 6 e 7). S, Salina; OXT, ocitocina; ATOS, atosibana; Ob-Sham, observador do animal Sham; Ob-CNC, observador do animal CNC. Valores de H com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos: (*) comparação entre Ob-Sham e Ob-CNC do mesmo grupo; (#) comparação entre animal tratado e seu respectivo controle salina; (\$) comparação entre animal tratado com atosibana e respectivo controle salina.

4.3.2.3 Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, na nocicepção avaliada através do teste de contorções abdominais em animais avaliados no que conviveram com coespecífico com dor crônica

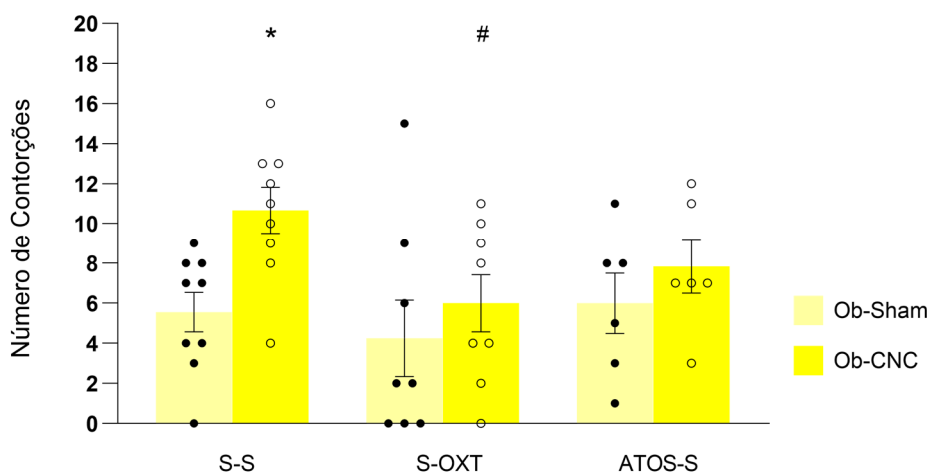
4.3.2.3.1 Efeitos das injeções combinadas de salina e ocitocina (S-OXT) na nocicepção

Fêmeas Ob-CNC que receberam injeções de S-S apresentaram número maior de contorções do que as fêmeas Ob-Sham que receberam a mesma injeção ($H=8,07$, $p=0,0045$) (gráfico 10). As injeções de S-OXT promoveram redução no número de contorções das fêmeas Ob-CNC ($H=4,95$, $p=0,0260$), mas não nas Ob-Sham ($H=1,14$, $p=0,2854$) (gráfico 10).

4.3.2.3.2 Efeitos das injeções combinadas de atosibana e salina (ATOS-S) na nocicepção

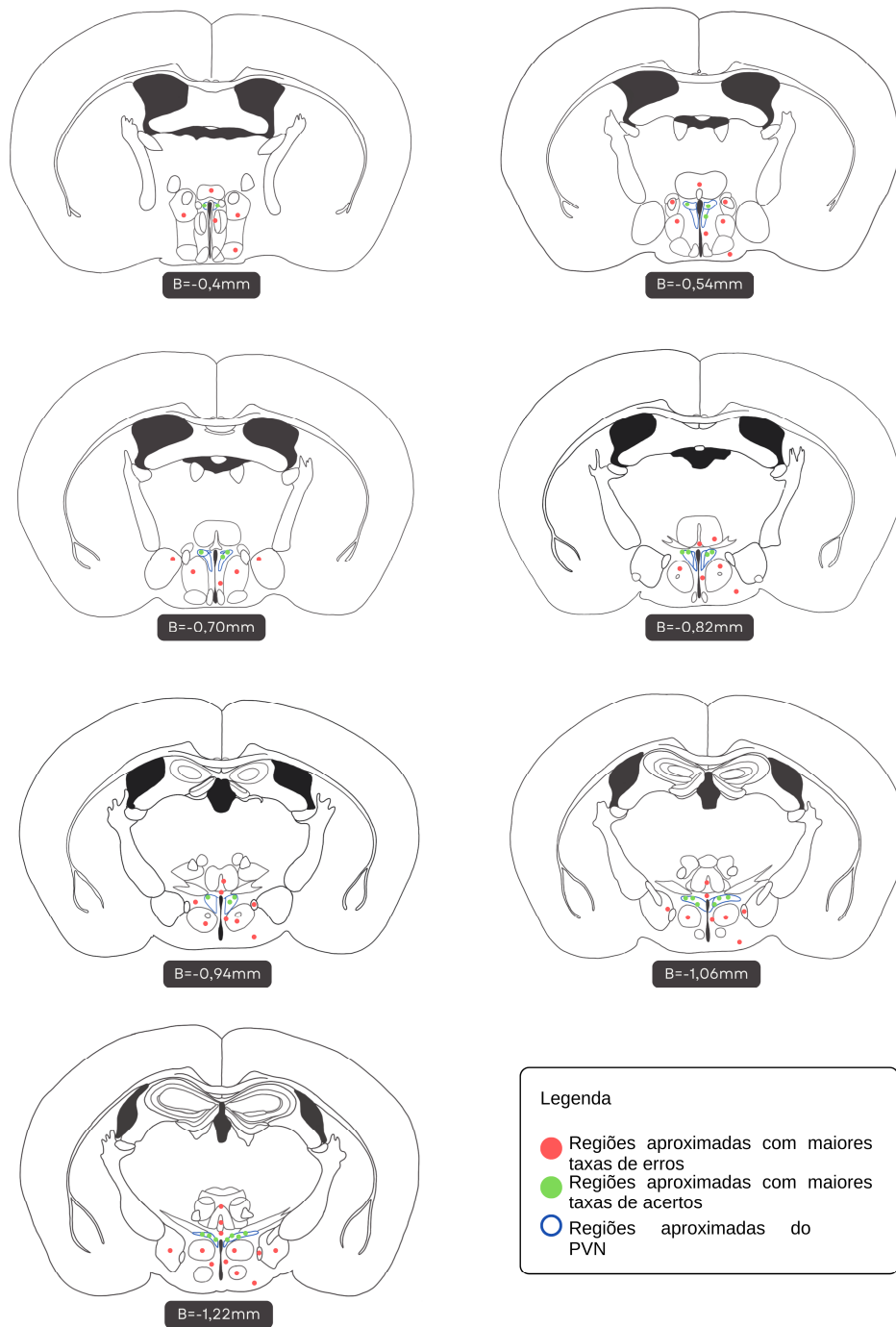
As injeções intra-PVN de ATOS-S não promoveram alterações no número de contorções abdominais nos animais Ob-Sham nem nos Ob-CNC, em comparação com o controle S-S ($p=0,76$ e $p=0,096$) e em comparação com os animais que receberam S-OXT ($p=0,29$ e $p=0,47$) (gráfico 10).

Gráfico 10 - Efeitos das injeções combinadas de salina, ocitocina e atosibana, intra-PVN, no número de contorções de camundongos fêmeas avaliadas no LCE após conviverem em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.



Valores apresentados como média $\pm$ EPM e valores de H obtido pelo teste Kruskal-Wallis. S, Salina; OXT, ocitocina; ATOS, atosibana; Ob-Sham, observador do animal Sham; Ob-CNC, observador do animal CNC. Valores de H com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos: (*) comparação entre Ob-Sham e Ob-CNC do mesmo grupo; (#) comparação entre animal tratado e seu respectivo controle (S-S).

Figura 10 – Representação esquemática das regiões acessadas através da cirurgia estereotáxica.



Fonte Paxinos e Franklin (2004, 2008, 2018).

Nota Traduzido e adaptado por Ribeiro, H.M. (*)

(*) Os bregmas e as respectivas estruturas apresentados na Figura são uma representação aproximada do conteúdo descrito por Paxinos e Franklin em seu atlas de coordenadas estereotáxicas do ano de 2004. Suas versões mais atualizadas (2008 e 2019) foram utilizadas para a verificação da efetividade da cirurgia. As regiões demarcadas em azul que representam a localização aproximada do PVN foram confirmadas na última versão publicada.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou comportamentos do tipo-ansiedade e nocicepção de camundongos machos e fêmeas que receberam injeções intra-PVN de ocitocina ou atosibana após terem convivido por 28 dias com um coespecífico. Dos 28 dias, os 14 dias iniciais criaram familiaridade entre os animais, e os últimos 14 dias reproduziram o modelo empatia para dor, já que um dos coespecíficos passou por uma cirurgia de constrição do nervo isquiático (que mimetiza mecanismos de dor crônica neuropática). Além disso, os camundongos conviveram em quartetos, de forma que, para cada animal demonstrador da dor, existiram três animais observadores.

Os resultados obtidos mostram que o convívio com o coespecífico com dor crônica promoveu aumento dos comportamentos do tipo-ansiedade em camundongos machos, observados através da redução da porcentagem de tempo nos braços abertos e aumento do tempo de autolimpeza protegida em relação aos Ob-Sham; e hipernocicepção nos camundongos machos e fêmeas, observada através do aumento do número de contorções abdominais no teste nociceptivo. Assim, tais resultados confirmam que os fenômenos da transferência social da dor e da ansiedade ocorrem não apenas em camundongos que convivem em duplas^{59,80-83}, mas também em quartetos.

Resultados descritos previamente pelo grupo de pesquisa envolvendo empatia, neurotransmissão ocitocinérgica, nocicepção e ansiedade mostraram que a administração sistêmica de atosibana (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg, i.p.) aumentou os comportamentos tipo-ansiedade em camundongos machos Ob-Sham e não interferiu nos comportamentos dos Ob-CNC¹⁸⁶. Além disso, o atosibana (0,25 e 1,0mg/kg, i.p.) promoveu hipernocicepção apenas em camundongos machos Ob-Sham, sem apresentar efeitos nos animais Ob-CNC, tanto machos quanto fêmeas¹⁸⁷. Ambos os estudos sugeriram que os animais que conviveram com o coespecífico com dor apresentaram níveis de OXT elevados, de forma que as doses utilizadas

de ATOS não foram capazes de reverter a hipernocicepção induzida pelo convívio, apesar de não terem realizado avaliações específicas para confirmar tais hipóteses. Tais conclusões apontaram para a neurotransmissão ocitocinérgica como sendo uma potencial moduladora de respostas relacionadas ao convívio com o coespecífico com dor, explicitando a necessidade de estudos direcionados à investigação do envolvimento de regiões específicas do SNC nesse contexto.

Como descrito anteriormente, diversos estudos comprovam a participação do PVN em processos de dor, principalmente na promoção de analgesia através da liberação de OXT^{10,103,159,188,189}. Apesar dos indícios de participação da OXT e do PVN em processos álgicos, a hipernocicepção promovida pelo convívio não advém de um estímulo físico em si, mas da observação de outro indivíduo em dor. Assim, um dos objetivos desse estudo foi investigar se o sistema ocitocinérgico do PVN também modularia o aumento das respostas de nocicepção (hipernocicepção) e tipo-ansiedade (ansiogênica) induzidas pelo convívio com o coespecífico com dor crônica. Para isso, e considerando os estudos previamente conduzidos pelo grupo, injeções de OXT e ATOS (agonista e antagonista dos OXTR) intra-PVN foram utilizadas a fim de avaliar a participação desta estrutura, e da neurotransmissão ocitocinérgica, na empatia para dor.

Dessa forma, o presente trabalho encontrou evidências da participação do sistema ocitocinérgico do PVN na modulação da hipernocicepção induzida pelo convívio com coespecífico com dor crônica. Machos e fêmeas Ob-CNC que receberam injeções intra-PVN de OXT apresentaram reversão do comportamento hipernociceptivo induzido pelo convívio, reduzindo o número de contorções abdominais quando comparados ao seus respectivos controles salina. O número de contorções abdominais aumentado pelo convívio com o parceiro com dor -no animal Ob-CNC em relação ao Ob-Sham- foi reduzido pela ocitocina de maneira que, animais Ob-Sham e Ob-CNC que receberam OXT não apresentaram diferenças estatísticas

significativas entre seus respectivos valores de contorções. Os animais Ob-Sham, por outro lado, não apresentaram alteração do número de contorções após receberem a OXT intra-PVN em relação ao seu controle salina.

Esse resultado mostra que, a via ocitocinérgica do PVN modula as respostas associadas a empatia, promovendo a hipernocicepção no animal observador. Quando se injetou um agonista dos OXTR (no caso a OXT), a via do PVN promoveu analgesia apenas no animal que experimentou o fenômeno da empatia. Apesar de possuir um efeito analgésico anteriormente descrito, a OXT no PVN não promoveu analgesia nos Ob-Sham possivelmente por não interferir nas outras vias da dor (descritas anteriormente na Figura 1), que permanecem ativadas e processando o estímulo ascendente. Assim, o efeito analgésico da OXT intra-PVN foi seletivo, ou seja, só foi registrado nos animais cuja via apresentou hiperativação induzida nos camundongos Ob-CNC pelo modelo utilizado de empatia para dor, não sendo observado nos camundongos Ob-Sham, no funcionamento fisiológico sem ativação da via nociceptiva.

Quanto às injeções de ATOS (antagonista dos OXTR) envolvendo a nocicepção, observou-se efeito apenas em machos, reduzindo o número de contorções abdominais. Este resultado abre discussão para um tema que Busneli e colaboradores (2011) apresentaram em seu artigo. A OXT é capaz de ligar-se a subunidades tanto estimulatórias quanto inibitórias da proteína G (G_q e todos os subtipos de $G_{i/o}$), sendo que a ATOS, por sua vez, é capaz de ligar-se apenas às subunidades G_{i1} ou G_{i3} ¹³⁸. Esse fato mostra que o efeito antinociceptivo da OXT pode ter ocorrido não apenas pela liberação de OXT, mas também pela redução ou bloqueio da atividade dos receptores OXT através de seus mecanismos inibitórios envolvendo $G_{i/o}$. Assim, o efeito antinociceptivo da injeção de ATOS relaciona-se em potencial à redução ou bloqueio da atividade dos receptores OXT na hiperativação do PVN por mecanismos envolvendo $G_{i/o}$.

Quanto à participação do sistema ocitocinérgico do PVN na nocicepção, Chow e colaboradores (2012) demonstraram o papel de mecanismos envolvendo a angiotensina IV na

atenuação da hiperalgesia promovida por processo inflamatório em ratos. Os autores apontaram que a estimulação elétrica do PVN produziu efeitos analgésicos graças a liberação de OXT na medula espinhal, os quais foram prolongados pela administração de angiotensina IV, por possivelmente reduzir a degradação da ocitocina na medula. Além disso, a co-administração de angiotensina IV (25,8 nmol, i.c.v.) e ocitocina (0,125 nmol, i.c.v.) potencializou os efeitos anti-hipernociceptivos da OXT, os quais foram completamente abolidos quando a angiotensina IV foi coadministrada com atosibana (0,5 nmol, i.c.v.).

Como exposto anteriormente, o LCE foi o aparato utilizado para avaliar os comportamentos do tipo-ansiedade, tanto convencionais quanto etológicos descritos na literatura. Além de tais parâmetros, este estudo também avaliou a autolimpeza (*grooming*) dos animais durante a exposição ao LCE, que apesar de ser considerado complexo, também é tido como um comportamento recuperativo em camundongos, relacionando-se a regulação da ansiedade após um evento estressor¹⁹⁰.

Ainda que o convívio com coespecífico com dor crônica não tenha aumentado os comportamentos do tipo-ansiedade em camundongos fêmeas, o tratamento com OXT foi capaz de reduzi-los apenas nos Ob-CNC, em relação aos seguintes comportamentos, aumento da porcentagem de tempo nos braços abertos e diminuição nos fechados, aumento da porcentagem de entrada nos braços abertos e diminuição nos fechados, redução da porcentagem de mergulhos protegidos e de levantamentos, e no tempo de autolimpeza protegida, comportamentos associados a redução da ansiedade e atividade exploratória geral^{58,182}, sugerindo efeito ansiolítico da OXT. Este resultado corrobora com outros da literatura que utilizaram injeção sistêmica e/ou central de OXT, em roedores submetidos no LCE e em outros modelos utilizados para avaliar a ansiedade¹⁹¹⁻¹⁹⁴.

Entretanto, nas fêmeas Ob-Sham, a OXT reduziu a porcentagem de mergulhos protegidos, aumentou o número de levantamentos, e reduziu a porcentagem de tempo no centro

(aumentando de maneira não significativa a porcentagem de tempo nos braços fechados), enquanto não modificou as entradas nos braços abertos e fechados (apesar da tendência em aumentar nos abertos e reduzir nos fechados). Assim, nos Ob-Sham que receberam OXT, vários comportamentos etológicos relacionados a avaliação de risco em ambientes protegidos foram alterados, provavelmente por uma ação nos receptores OXT modulando comportamentos associados à ansiedade¹⁹¹.

O fato de o tratamento com OXT ter modificado um maior número de comportamentos relacionados à ansiedade apenas nas fêmeas Ob-CNC sugere uma hiperativação do PVN induzida pela empatia para dor; hiperativação essa incapaz de aumentar os comportamentos do tipo-ansiedade dos Ob-CNC em relação ao Ob-Sham, mas capaz de ser revertida pela injeção de OXT. O único efeito da ATOS nas fêmeas foi no aumento do total de levantamentos dos Ob-Sham em relação ao controle salina, possivelmente por atuar reduzindo ou bloqueando a atividade dos receptores OXT, mobilizando os mecanismos de G_i , já que a OXT também aumentou o número de levantamentos nesse grupo. O efeito do antagonista pode ter sido inespecífico, e novas investigações necessitam ser realizadas testando outras doses, mas o resultado mostra a possível atuação do PVN relacionada não apenas a empatia, mas diretamente nos comportamentos relacionados à ansiedade¹⁹⁵.

Hipóteses que possam explicar os efeitos da OXT e da ATOS nos animais Ob-Sham envolvem a participação do PVN não apenas na empatia, mas em outros processos, como o medo e a ansiedade, possivelmente devido à ligação do sistema ocitocinérgico do PVN ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O LCE e sua capacidade de gerar medo e ansiedade possivelmente estimularam a região do PVN (considerando sua conexão ao eixo HPA e consequente ativação a partir de estímulos estressores)⁸⁷, a qual foi ativada não apenas pelo fenômeno da empatia, mas pela ansiedade em si, principalmente nos animais que não conviveram com o coespecífico com dor. Assim, os efeitos das injeções de OXT e ATOS nos

animais fêmeas Ob-Sham e Ob-CNC (diferentes ou iguais entre si) demonstram que a via do PVN foi ativada de diferentes formas, tornando-a passiva de ser regulada também de maneiras diferentes entre os grupos.

No caso dos camundongos machos, os Ob-CNC apresentaram efeito do convívio com coespecífico com dor no LCE, expressando um aumento dos comportamentos tipo-ansiedade em relação aos Ob-Sham, diferente do encontrado em fêmeas. O aumento dos comportamentos do tipo-ansiedade foi um resultado esperado para os machos, por já ter sido descrito previamente na literatura^{59,80,82,84}. Esse aumento foi observado pela redução da porcentagem de tempo nos braços abertos (com aumento nos braços fechados) e aumento do tempo de autolimpeza protegida. No entanto, a OXT no PVN falhou em alterar os comportamentos relacionados a ansiedade, tais como, a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, e os comportamentos exploratórios, aumentando apenas a atividade locomotora dos animais Ob-CNC observada através do aumento do total de entradas no LCE. Já a ATOS foi capaz apenas de reduzir a porcentagem de tempo no centro dos Ob-CNC em relação ao controle salina, aumentando de maneira não significativa a porcentagem de tempo nos braços abertos; e de aumentar a porcentagem de esticar desprotegido.

Quanto as injeções combinadas, o objetivo inicial envolvia utilizar uma dose da ATOS sem efeito intrínseco nos comportamentos tipo-ansiedade e nocicepção para verificar sua capacidade de inibição dos OXTR. No entanto, por questões descritas nas limitações desse estudo, utilizou-se a mesma dose que apresentou alguns efeitos comportamentais tanto no LCE quanto nas contorções, apenas em machos. Para o caso das contorções, as injeções combinadas reduziram seu número em relação ao controle salina, mas de maneira não significativa, deixando de existir o efeito antinociceptivo observado nas injeções separadas. Esse fato poderá ser mais bem explicado com estudos envolvendo seletividade da OXT e da ATOS, bem como

a possibilidade de interação entre tais drogas e outros tipos de receptores, como os vasopressinérgicos⁸⁷.

No que tange o LCE, as injeções de ATOS-OXT foram capazes de aumentar a porcentagem de tempo nos braços fechados dos Ob-Sham e reduzir o total de mergulhos de ambos os observadores em relação aos dois controles (S-S e ATOS-S). Além disso, observou-se a redução do tempo de autolimpeza protegida nos Ob-CNC e a tendência ao aumento nos Ob-Sham, ambos em relação ao controle S-S, mas não em relação ao controle ATOS-S. Esse último resultado mostra que a injeção combinada de ATOS-OXT promoveu um efeito não observado anteriormente com as injeções separadas, o qual mostrou-se diferente de acordo com o tipo de convívio do animal: tendeu a aumentar comportamentos relacionados a ansiedade nos Ob-Sham e reduzi-los nos Ob-CNC.

A explicação hipotética para esse resultado envolve uma ligação inicial da ATOS aos OXTR, promovendo inibição da ativação da via. As injeções seguintes de OXT fazem com que o neurotransmissor se ligue aos receptores remanescentes, gerando um efeito que tende ao aumento da ansiedade nos Ob-Sham e à redução nos Ob-CNC. Essa resposta pode ocorrer por uma diferença no número de receptores entre os diferentes animais, a qual estaria possivelmente aumentada nos Ob-CNC e aparentemente priorizaria a atuação ansiolítica da OXT, através da ligação às G_q , um mecanismo que precisa ser mais estudado e comprovado ou não.

Estudos envolvendo injeções centrais de ocitocina e atosibana, no que tange o PVN, são escassos, fato que, apesar de dificultar o aprofundamento do entendimento dos mecanismos relacionados aos resultados encontrados no presente trabalho possibilita discussões que abrem caminhos para trabalhos subsequentes. Algumas publicações envolvendo comportamentos tipo-ansiedade, ocitocina e atosibana (em diversas doses, vias de administração e espécies), podem apresentar pontuações interessantes sobre a temática. Mak e colaboradores (2012) demonstraram os efeitos tipo-ansiolíticos da Carbetocina (análogo sintético da OXT)

administrado via intra-cerebroventricular (i.c.v.) (32µg e 100 µg), e do atosibana (1 mg/kg, i.v.), em ratos avaliados no LCE¹⁹⁶. Babic e colaboradores (2015) relataram o aumento da expressão de RNAm dos OXTR na região hipotalâmica de ratos expostos ao estresse de restrição, além de sua redução em animais tratados com atosibana (14 dias, 600 µg/kg/dia, i.c.v.) em relação ao grupo controle, sem serem observadas diferenças significativas entre os grupos na avaliação no LCE¹⁹⁷.

No mais, Tang e colaboradores (2025) apontaram que a administração intranasal de OXT promoveu efeitos analgésicos e tipo-ansiolíticos em camundongos com dor (causada por uma incisão na pata) por meio da abertura de canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ de grande condutância [BK(Ca)] na sub-região CA3 do hipocampo. O estudo apontou uma redução dos OXTR no hipocampo dos camundongos que passaram pela incisão, além de apresentarem hipersensibilidade à retirada mecânica da pata e aumento dos comportamentos do tipo-ansiedade avaliados através do LCE e do campo aberto. Dessa forma, a administração intranasal de OXT melhorou a dor pós-operatória e a ansiedade de forma dose-dependente (0,5, 1,5, e 2,5 µg/g), e as administrações de atosibana (100 µM) ou do bloqueador dos BK(Ca), denominado Paxilline (10 µM), intra-CA3, reduziram tais efeitos da OXT nos animais que tiveram a pata incisionada¹⁹⁸.

Os resultados obtidos através do teste da placa quente mostraram efetividade na cirurgia de constrição do nervo isquiático, devido à redução na latência de retirada da pata dos animais CNC, tanto em relação ao valor basal, mensurado antes da cirurgia, quanto em relação à latência dos animais Sham também avaliada no dia dos testes comportamentais dos observadores (quatorze dias após a cirurgia). Esse resultado apresenta conformidade com o esperado^{82,83}, além de adicionar a aferição da latência basal como mais uma comprovação de que a cirurgia simula de maneira eficiente um processo de dor crônica nos animais demonstradores.

Apesar de não ser um dos principais objetivos deste trabalho, o monitoramento do peso dos animais foi realizado a fim de determinar sua importância para futuros experimentos envolvendo os modelos de empatia. Na medicina veterinária, o monitoramento do peso é um indicador importante de bem-estar geral dos animais, seja na prática clínica ou no uso de animais de experimentação, principalmente para se observar a recuperação dos animais após procedimentos invasivos, como cirurgias^{199,200}.

Nesse sentido, apesar de os animais demonstradores passarem por um procedimento que gera dor crônica, eles apresentaram ganho de peso, sem, no entanto, serem observadas diferenças entre os animais Sham e CNC, machos ou fêmeas. Apesar de não demandar técnicas dispendiosas e um longo tempo para aferição, o monitoramento do peso dos animais ainda é um parâmetro pouco utilizado na literatura de animais de laboratório, fato que dificulta a comparação dos novos resultados sobre oscilações de peso nos diferentes protocolos experimentais. Estudos sobre dor crônica em humanos tendem a referir-se à obesidade como uma comorbidade relacionada aos quadros de dor crônica, associadas a relação da dor com a redução da atividade física geral²⁰¹, fato que não foi observado, já que animais CNC apresentaram mesmo ganho de peso que animais Sham. Como foram realizadas apenas duas medidas de peso nos animais demonstradores e em um curto período, acredita-se que a ausência de diferenças significativas em tais medidas possa ter ocorrido tanto pelo pequeno número de medidas coletadas quanto pelo curto espaço de tempo entre as aferições.

O presente estudo também monitorou o peso dos animais observadores, antes da estereotaxia e no dia do teste (cinco dias após a cirurgia). Nesse caso, observou-se que tanto os animais que observaram os Sham quanto os que observaram os CNC apresentaram perda de peso, sem diferença significativa entre os grupos. Esse fato pode indicar uma necessidade de maior tempo de recuperação após a cirurgia estereotóxica para os animais, objetivando-se melhor recuperação global de tais indivíduos. Uma melhor recuperação permitirá uma análise

mais robusta dos reais efeitos da empatia para a dor não somente na avaliação do peso dos animais observadores, mas nos outros parâmetros coletados^{199,200}.

É importante salientar que os camundongos utilizados estavam em fase de desenvolvimento (do desmame a idade adulta) e, apesar de poucos estudos abordarem os efeitos sistêmicos de processos patológicos crônicos em animais de experimentação jovens, pesquisas recentes em humanos apontam que a presença de uma lesão crônica pode interferir negativamente no desenvolvimento corpóreo natural durante a infância, como descrito em crianças com doenças crônicas e/ou agudas incapacitantes²⁰², podendo levar à alterações sistêmicas duradouras nos indivíduos adultos.

Em suma, um monitoramento a longo prazo do peso dos animais juntamente com a coleta de outros parâmetros (como escore corporal, alterações na pelagem, níveis de atividade na caixa-moradia e testes de marcha), os quais não envolveram os objetivos iniciais desse estudo, poderiam melhor avaliar seu bem-estar geral e promover cada vez mais melhores condições aos animais de experimentação²⁰³⁻²⁰⁵.

6 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo encontrou algumas limitações durante sua execução, tais como: a dificuldade em se acessar a região do PVN, devido ao seu tamanho e localização (ventral e em bregmas com grande extensão de ventrículos); a dificuldade em se obter um tamanho amostral maior do que o apresentado nesse trabalho, em consequência do baixo número de acertos da estrutura; machos e fêmeas apresentaram diferenças anatômicas sutis, que para a presente cirurgia tornaram-se um obstáculo envolvendo o número de acerto das fêmeas, tornando-o significativamente menor que o dos machos, e impedindo inclusive a conclusão de todas as combinações de injeções planejadas para o projeto deste estudo; por fim, o tempo disponível para a conclusão dos experimentos acabou tornando-se insuficiente para a execução de todo planejamento. Apesar disso, informações importantes para a compreensão do fenômeno de empatia para dor no que tange comportamentos do tipo-ansiedade e nocicepção foram obtidas, abrindo questionamentos para que novos estudos que utilizem técnicas mais sofisticadas, tais como, optogenética, eletroestimulação e neurotraçadores, possam ser realizados para ampliar o entendimento específico da ativação e inativação do PVN em modelos de empatia.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que o convívio em quartetos com um coespecífico com dor crônica promoveu hipernocicepção em camundongos machos e fêmeas, e aumento dos comportamentos do tipo-ansiedade em camundongos machos. Sabendo-se que a empatia para dor ocorre também em quartetos, estudos futuros podem utilizar-se dessa metodologia tanto para reduzirem o número de animais utilizados em experimentos quanto para entenderem a empatia como um fenômeno não apenas bidirecional, mas multidirecional, permitindo seu aprofundamento em contextos sociais complexos, como ambientes hospitalares e casas de acolhimento.

Além disso, a OXT intra-PVN foi capaz de reverter a hipernocicepção em camundongos machos e fêmeas que conviveram com parceiro com dor; reduziu os comportamentos do tipo-ansiedade nas fêmeas que conviveram com parceiro com dor, mas falhou em reverter os comportamentos do tipo-ansiedade dos machos avaliados no LCE. As injeções de ATOS intra-PVN apresentaram efeitos inespecíficos e isolados no LCE de machos e fêmeas, mas foi capaz de reduzir a hipernocicepção induzida pelo parceiro com dor em camundongos machos. Por fim, as injeções combinadas de ATOS-OXT em machos potencialmente aumentaram os comportamentos do tipo-ansiedade nos Ob-Sham e reduziram nos Ob-CNC.

Portanto, o presente trabalho encontrou evidências da participação do sistema ocitocinérgico do PVN no controle da hipernocicepção e dos comportamentos do tipo-ansiedade em camundongos machos e fêmeas que conviveram com coespecífico com dor crônica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raja, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* vol. 161 1976–1982 Preprint at <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939> (2020).
2. Clauw, D. J., Essex, M. N., Pitman, V. & Jones, K. D. Reframing chronic pain as a disease, not a symptom: rationale and implications for pain management. *Postgraduate Medicine* vol. 131 185–198 Preprint at <https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1574403> (2019).
3. Yam, M. F. *et al.* General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms19082164> (2018).
4. Kandel, E. R., Koester, J. D., Mack, S. H. & Siegelbaum, S. A. *Principles of Neural Science*. (McGraw Hill, 2021).
5. Orr, P. M., Shank, B. C. & Black, A. C. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Critical Care Nursing Clinics of North America* vol. 29 407–418 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.08.002> (2017).
6. Karcz, M. *et al.* Pathophysiology of Pain and Mechanisms of Neuromodulation: A Narrative Review (A Neuron Project). *Journal of Pain Research* vol. 17 3757–3790 Preprint at <https://doi.org/10.2147/JPR.S475351> (2024).
7. Willis, W. D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **308**, 253–270 (1985).
8. Millan, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* **57**, 1–164 (1999).
9. Bolles, R. C. & Fanselow, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behavioral and Brain Sciences* **3**, 291–301 (1980).
10. Poisbeau, P., Grinevich, V. & Charlet, A. Oxytocin Signaling in Pain: Cellular, Circuit, System, and Behavioral Levels. *Curr Top Behav Neurosci* **35**, 193–211 (2017).
11. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* (2001).
12. Treede, R. D. *et al.* Chronic pain as a symptom or a disease: The IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain* vol. 160 19–27 Preprint at <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384> (2019).
13. Kaplan, C. M. *et al.* Deciphering nociplastic pain: clinical features, risk factors and potential mechanisms. *Nature Reviews Neurology* vol. 20 347–363 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41582-024-00966-8> (2024).
14. Rosenberger, D. C., Blechschmidt, V., Timmerman, H., Wolff, A. & Treede, R. D. Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *Journal of Neural Transmission* vol. 127 589–624 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02145-7> (2020).
15. Mestdagh, F., Steyaert, A. & Lavand’homme, P. Cancer Pain Management: A Narrative Review of Current Concepts, Strategies, and Techniques. *Current Oncology* vol. 30 6838–6858 Preprint at <https://doi.org/10.3390/curroncol30070500> (2023).
16. Grinberg, K., Sela, Y. & Nissanholtz-Gannot, R. New Insights about Chronic Pelvic Pain Syndrome (CPPS). *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, 3005 (2020).
17. Matsuka, Y. Orofacial Pain: Molecular Mechanisms, Diagnosis, and Treatment 2021. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms23094826> (2022).

18. Fitzcharles, M. A. *et al.* Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. *The Lancet* vol. 397 2098–2110 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00392-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00392-5) (2021).
19. Kosek, E. *et al.* Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain* vol. 157 1382–1386 Preprint at <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000507> (2016).
20. Scholz, J. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain. *Pain* vol. 160 53–59 Preprint at <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365> (2019).
21. Arning, K. & Baron, R. *Evaluation of Symptom Heterogeneity in Neuropathic Pain Using Assessments of Sensory Functions*. (2009).
22. Sandkühler, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* **89**, 707–758 (2009).
23. Raichle, M. E. *et al.* A Default Mode of Brain Function. *National Academy of Sciences* www.pnas.org (1996).
24. Menon, V. & Uddin, L. Q. Saliency, switching, attention and control: a network model of insula function. *Brain structure & function* vol. 214 655–667 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00429-010-0262-0> (2010).
25. Napadow, V. *et al.* Intrinsic brain connectivity in fibromyalgia is associated with chronic pain intensity. *Arthritis Rheum* **62**, 2545–2555 (2010).
26. Tracey, I. & Mantyh, P. W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron* vol. 55 377–391 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.012> (2007).
27. Russell, J. *et al.* Cerebrospinal Fluid Biogenic Amine Metabolites in Fibromyalgia/Fibrositis Syndrome and Rheumatoid Arthritis. (1992).
28. Baraniuk, J. N., Whalen, G., Cunningham, J. & Clauw, D. J. Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. *BMC Musculoskelet Disord* **5**, (2004).
29. Santiago, B. V. M. *et al.* Prevalence of chronic pain in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Clinics* vol. 78 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.clinsp.2023.100209> (2023).
30. Yong, R. J., Mullins, P. M. & Bhattacharyya, N. Prevalence of chronic pain among adults in the United States. *Pain* **163**, E328–E332 (2022).
31. Pereira, F. G., França, M. H., de Paiva, M. C. A., Andrade, L. H. & Viana, M. C. Prevalence and clinical profile of chronic pain and its association with mental disorders. *Rev Saude Publica* **51**, (2017).
32. Stubbs, B. *et al.* Depression and pain: primary data and meta-analysis among 237 952 people across 47 low- and middle-income countries. *Psychol Med* **47**, 2906–2917 (2017).
33. Cairns, B. E. & Gazerani, P. Sex-related differences in pain. *Maturitas* vol. 63 292–296 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.06.004> (2009).
34. Fillingim, R. B. & Ness, T. J. *Sex-Related Hormonal Influences on Pain and Analgesic Responses*. www.elsevier.com/locate/neubiorev.
35. Fillingim, R. B., King, C. D., Ribeiro-Dasilva, M. C., Rahim-Williams, B. & Riley, J. L. Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. *Journal of Pain* vol. 10 447–485 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.12.001> (2009).
36. Sorge, R. E. & Totsch, S. K. Sex Differences in Pain. *Journal of Neuroscience Research* vol. 95 1271–1281 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jnr.23841> (2017).
37. Eliot, L. The trouble with sex differences. *Neuron* vol. 72 895–898 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.12.001> (2011).
38. Mogil, J. S. & Bailey, A. L. Sex and gender differences in pain and analgesia. in *Progress in Brain Research* vol. 186 140–157 (Elsevier B.V., 2010).

39. Mogil, J. S. Sex differences in pain and pain inhibition: Multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 13 859–866 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrn3360> (2012).
40. Berkley, K. J. Sex differences in pain. in *Behavioral and Brain Sciences* vol. 20 371–380 (1997).
41. Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M. & Sternberg, W. F. *Sex Differences in Thermal Nociception and Morphine Antinociception in Rodents Depend on Genotype*. www.elsevier.com/locate/neubiorev (2000) doi:10.1016/s0149-7634(00)00015-4.
42. Gleicher, N. & Barad, D. H. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun* **28**, 1–6 (2007).
43. Angele, M. K., Pratschke, S., Hubbard, W. J. & Chaudry, I. H. Gender differences in sepsis: Cardiovascular and immunological aspects. *Virulence* vol. 5 12–19 Preprint at <https://doi.org/10.4161/viru.26982> (2014).
44. Mogil, J. S. & Chanda, M. L. The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain* vol. 117 1–5 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.06.020> (2005).
45. Becker, J. B. *et al.* Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology* vol. 146 1650–1673 Preprint at <https://doi.org/10.1210/en.2004-1142> (2005).
46. Russell, J. A. A circumplex model of affect. *J Pers Soc Psychol* **39**, 1161–1178 (1980).
47. Nardi, A. E., Fontenelle, L. F. & Crippa, J. A. S. New trends in anxiety disorders. *Brazilian Journal of Psychiatry* **34**, 5–6 (2012).
48. Quevedo, J. & Izquierdo, I. *Neurobiologia Dos Transtornos Psiquiátricos*. (Artmed, Porto Alegre, 2020).
49. Rowland, D. L. & van Lankveld, J. J. D. M. Anxiety and performance in sex, sport, and stage: Identifying common ground. *Frontiers in Psychology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.01615> (2019).
50. Yerkes, R. M. & Dodson, J. D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. *Journal of Comparative Neurology and Psychology* **18**, 459–482 (1908).
51. Corbett, M. From law to folklore: Work stress and the Yerkes-Dodson Law. *Journal of Managerial Psychology* **30**, 741–752 (2015).
52. Lazarus, R. S. How emotions influence performance in competitive sports. *Sport Psychologist* **14**, 229–252 (2000).
53. Strack, F. *et al.* *Reflective and Impulsive Determinants of Social Behavior*. *Personality and Social Psychology Review* vol. 8 (2004).
54. American Psychiatric Association. *Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais: DSM-5*. (Artmed, Porto Alegre, 2014).
55. de Souza, I. M. & Machado-De-Sousa, J. P. Brazil: world leader in anxiety and depression rates. *Brazilian Journal of Psychiatry* **39**, 384–384 (2017).
56. Wittchen, H. U. *et al.* The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* **21**, 655–679 (2011).
57. Zhao, H., Zhou, M., Liu, Y., Jiang, J. & Wang, Y. Recent advances in anxiety disorders: Focus on animal models and pathological mechanisms. *Animal Model Exp Med* **6**, 559–572 (2023).
58. Lister, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* **92**, 180–185 (1987).
59. Baptista-De-Souza, D. *et al.* Mice undergoing neuropathic pain induce anxiogenic-like effects and hypernociception in cagemates. *Behavioural Pharmacology* **26**, 664–672 (2015).

60. Silveira, L. M. *et al.* Anterior cingulate cortex, but not amygdala, modulates the anxiogenesis induced by living with conspecifics subjected to chronic restraint stress in male mice. *Front Behav Neurosci* **16**, (2023).
61. Nunes-De-Souza, R. L. *et al.* Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology (Berl)* **150**, 300–310 (2000).
62. Rodgers, R. J. & Johnson, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* **52**, 297–303 (1995).
63. Preston, S. D. & de Waal, F. B. M. Empathy: Its ultimate and proximate bases. *Behav Brain Sci* **25**, 1–20 (2002).
64. Lipps, T. Einfühlung, innere Nachahmung und Organenempfindungen. Preprint at <https://philpapers.org/rec/LIPEIN> (1903).
65. Feinberg, T. E. & Keenan, J. P. The Lost Self: Pathologies of the Brain and Identity: Pathologies of the Brain and Identity. Preprint at <https://philpapers.org/rec/FEITLS> (2005).
66. De Waal, F. B. M. & Preston, S. D. Mammalian empathy: Behavioural manifestations and neural basis. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 18 498–509 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.72> (2017).
67. Zahavi, D. Simulation, projection and empathy. *Conscious Cogn* **17**, 514–522 (2008).
68. Di Pellegrino, G., Fadiga, L., Fogassi, L., Gallese, V. & Rizzolatti, G. *Experimental Brain Research Understanding Motor Events: A Neurophysiological Study. Exp Brain Res* vol. 91 (1992).
69. Gallese, V., Fadiga, L., Fogassi, L. & Rizzolatti, G. *Action Recognition in the Premotor Cortex. Brain* vol. 119 <http://brain.oxfordjournals.org/> (1996).
70. Bonini, L. The Extended Mirror Neuron Network: Anatomy, Origin, and Functions. *Neuroscientist* vol. 23 56–67 Preprint at <https://doi.org/10.1177/1073858415626400> (2017).
71. Bonini, L., Rotunno, C., Arcuri, E. & Gallese, V. Mirror neurons 30 years later: implications and applications. *Trends in Cognitive Sciences* vol. 26 767–781 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tics.2022.06.003> (2022).
72. Paradiso, E., Gazzola, V. & Keysers, C. Neural mechanisms necessary for empathy-related phenomena across species. *Current Opinion in Neurobiology* vol. 68 107–115 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.02.005> (2021).
73. Eisenberg, Nancy. & Strayer, Janet. Empathy and its development. 406 (1987).
74. Schnitzler, T. & Fuchs, T. Autism as a Disorder of Affective Empathy. *Psychopathology* vol. 57 53–62 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000533655> (2024).
75. Tiihonen, J. *et al.* Neurobiological roots of psychopathy. *Mol Psychiatry* **25**, 3432–3441 (2020).
76. di Giacomo, E., Andreini, E., Lorusso, O. & Clerici, M. The dark side of empathy in narcissistic personality disorder. *Frontiers in Psychiatry* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1074558> (2023).
77. Carbone, E. A. *et al.* Antisocial personality disorder in bipolar disorder: A systematic review. *Medicina (Lithuania)* vol. 57 1–17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/medicina57020183> (2021).
78. Lockwood, P. L. The anatomy of empathy: Vicarious experience and disorders of social cognition. *Behavioural Brain Research* **311**, 255–266 (2016).
79. Bernhardt, B. C. & Singer, T. The neural basis of empathy. *Annual Review of Neuroscience* vol. 35 1–23 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150536> (2012).

80. Zaniboni, C. R., Pelarin, V., Baptista-de-Souza, D. & Canto-de-Souza, A. Empathy for pain: Insula inactivation and systemic treatment with midazolam reverses the hyperalgesia induced by cohabitation with a pair in chronic pain condition. *Front Behav Neurosci* **12**, (2018).
81. Benassi-Cezar, G., Carmona, I. M., Baptista-de-Souza, D., Nunes-de-Souza, R. L. & Canto-de-Souza, A. Differential modulation of the anterior cingulate and insular cortices on anxiogenic-like responses induced by empathy for pain. *Neuropharmacology* **192**, (2021).
82. Baptista-de-Souza, D., Rodrigues Tavares, L. R., Canto-de-Souza, L., Nunes-de-Souza, R. L. & Canto-de-Souza, A. Behavioral, hormonal, and neural alterations induced by social contagion for pain in mice. *Neuropharmacology* **203**, (2022).
83. Rodrigues Tavares, L. R. *et al.* 5-HT₃ receptor within the amygdaloid complex modulates pain hypersensitivity induced by empathy model of cohabitation with a partner in chronic pain condition in mice. *Soc Neurosci* **16**, 534–548 (2021).
84. Langford, D. J. *et al.* Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science (1979)* **312**, 1967–1970 (2006).
85. Wu, Y. E. & Hong, W. Neural basis of prosocial behavior. *Trends in Neurosciences* vol. 45 749–762 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.06.008> (2022).
86. Marsh, N., Marsh, A. A., Lee, M. R. & Hurlemann, R. Oxytocin and the Neurobiology of Prosocial Behavior. *Neuroscientist* **27**, 604–619 (2021).
87. Jurek, B. & Neumann, I. D. The Oxytocin Receptor: From Intracellular Signaling to Behavior. *Physiol Rev* **98**, 1805–1908 (2018).
88. Dale, H. H. On some physiological actions of ergot. *J Physiol* **34**, 163 (1906).
89. du Vigneaud, V., Ressler, C., Swan, J. M., Roberts, C. W. & Katsoyannis, P. G. The Synthesis of Oxytocin. *J Am Chem Soc* **76**, 3115–3121 (1954).
90. Du Vigneaud, V. *et al.* The Synthesis of an Octapeptide Amide With The Hormonal Activity of Oxytocin. *J Am Chem Soc* **75**, 4879–4880 (1953).
91. Du Vigneaud, V., Ressler, C. & Trippett, S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *Journal of Biological Chemistry* **205**, 949–957 (1953).
92. Vincent du Vigneaud – Facts. *Nobel Prize Outreach 2025* <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1955/vigneaud/facts/> (2025).
93. A Schafer, B. E. & Mackenzie, K. The action of animal extracts on milk secretion. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* **84**, 16–22 (1911).
94. Ott, I. & Scott, J. C. The action of infundibulin upon the mammary secretion. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **8**, 48–49 (1910).
95. Lee, H. J., Macbeth, A. H., Pagani, J. H. & Scott Young, W. Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* **88**, 127–151 (2009).
96. Mohr, E., Peters, A., Morris, J. F. & Richter, D. Somatic nonhomologous crossing-over between neuropeptide genes in rat hypothalamic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11403 (1994).
97. Sofroniew, M. V. Morphology of vasopressin and oxytocin neurones and their central and vascular projections. *Prog Brain Res* **60**, 101–114 (1983).
98. Grinevich, V., Desarménien, M. G., Chini, B., Tauber, M. & Muscatelli, F. Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. *Front Neuroanat* **8**, 164 (2015).
99. de Vries, G. J. & Buijs, R. M. The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res* **273**, 307–317 (1983).

100. Knobloch, H. S. *et al.* Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron* **73**, 553–566 (2012).
101. Knobloch, H. S. & Grinevich, V. Evolution of oxytocin pathways in the brain of vertebrates. *Front Behav Neurosci* **8**, 74873 (2014).
102. Liu, X. Y. *et al.* Dual Oxytocin Receptor-G Protein Signaling in the Autoregulation of Activities of Oxytocin Neurons. *Neuroendocrinology* vol. 114 134–157 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000534490> (2024).
103. Eliava, M. *et al.* A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron* **89**, 1291–1304 (2016).
104. Yoshida, M. *et al.* Evidence that oxytocin exerts anxiolytic effects via oxytocin receptor expressed in serotonergic neurons in mice. *J Neurosci* **29**, 2259–2271 (2009).
105. Schorscher-Petcu, A., Dupré, A. & Tribollet, E. Distribution of vasopressin and oxytocin binding sites in the brain and upper spinal cord of the common marmoset. *Neurosci Lett* **461**, 217–222 (2009).
106. Jurek, B. *et al.* Oxytocin Regulates Stress-Induced Crf Gene Transcription through CREB-Regulated Transcription Coactivator 3. *The Journal of Neuroscience* **35**, 12248 (2015).
107. Loup, F., Tribollet, E., Dubois-Dauphin, M. & Dreifuss, J. J. Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. *Brain Res* **555**, 220–232 (1991).
108. Mitre, M. *et al.* A Distributed Network for Social Cognition Enriched for Oxytocin Receptors. *J Neurosci* **36**, 2517–2535 (2016).
109. Tribollet, E. *et al.* Functional neuronal binding sites for oxytocin in the ventromedial hypothalamus of the guinea pig after gonadectomy. *Brain Res* **588**, 346–350 (1992).
110. Dreifuss, J. J., Tribollet, E., Dubois-Dauphin, M. & Raggenbass, M. Receptors and neural effects of oxytocin in the rodent hypothalamus and preoptic region. *Ciba Found Symp* **168**, (1992).
111. Arsenijevic, Y., Dreifuss, J. J., Vallet, P., Marguerat, A. & Tribollet, E. Reduced binding of oxytocin in the rat brain during aging. *Brain Res* **698**, 275–279 (1995).
112. Marlin, B. J., Mitre, M., D’Amour, J. A., Chao, M. V. & Froemke, R. C. Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature* **520**, 499–504 (2015).
113. Li, K., Nakajima, M., Ibañez-Tallon, I. & Heintz, N. A Cortical Circuit for Sexually Dimorphic Oxytocin-Dependent Anxiety Behaviors. *Cell* **167**, 60-72.e11 (2016).
114. Gould, B. R. & Zingg, H. H. Mapping oxytocin receptor gene expression in the mouse brain and mammary gland using an oxytocin receptor-lacZ reporter mouse. *Neuroscience* **122**, 155–167 (2003).
115. Young, L. J., Muns, S., Wang, Z. & Insel, T. R. Changes in Oxytocin Receptor mRNA in Rat Brain During Pregnancy and the Effects of Estrogen and Interleukin-6. *J Neuroendocrinol* **9**, 859–865 (1997).
116. Terenzi, M. G. & Ingram, C. D. Oxytocin-induced excitation of neurones in the rat central and medial amygdaloid nuclei. *Neuroscience* **134**, 345–354 (2005).
117. Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R. & Young, L. J. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* **21**, 8278–8285 (2001).
118. Viviani, D. *et al.* Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science* **333**, 104–107 (2011).
119. TRIBOLLET, E., DUBOIS-DAUPHIN, M., DREIFUSS, J. J., BARBERIS, C. & JARD, S. Oxytocin receptors in the central nervous system. Distribution, development, and species differences. *Ann N Y Acad Sci* **652**, 29–38 (1992).

120. Lukas, M., Bredewold, R., Neumann, I. D. & Veenema, A. H. Maternal separation interferes with developmental changes in brain vasopressin and oxytocin receptor binding in male rats. *Neuropharmacology* **58**, 78–87 (2010).
121. Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Wiegand, S. J. & Price, J. L. Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Res* **198**, 190–195 (1980).
122. Honda, K., Sudo, A. & Ikeda, K. Oxytocin Cells in the Supraoptic Nucleus Receive Excitatory Synaptic Inputs from the Contralateral Supraoptic and Paraventricular Nuclei in the Lactating Rat. *J Reprod Dev* **59**, 569 (2013).
123. Landgraf, R. & Neumann, I. D. Vasopressin and oxytocin release within the brain: A dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front Neuroendocrinol* **25**, 150–176 (2004).
124. Ludwig, M. & Leng, G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci* **7**, 126–136 (2006).
125. Neumann, I., Russell, J. A. & Landgraf, R. Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: a microdialysis study. *Neuroscience* **53**, 65–75 (1993).
126. Moos, F. & Richard, P. Paraventricular and supraoptic bursting oxytocin cells in rat are locally regulated by oxytocin and functionally related. *J Physiol* **408**, 1–18 (1989).
127. Neumann, I., Douglas, A. J., Pittman, Q. J., Russell, J. A. & Landgraf, R. Oxytocin released within the supraoptic nucleus of the rat brain by positive feedback action is involved in parturition-related events. *J Neuroendocrinol* **8**, 227–233 (1996).
128. Makani, V. *et al.* Annexin A1 Complex Mediates Oxytocin Vesicle Transport. *J Neuroendocrinol* **25**, 1241–1254 (2013).
129. Ludwig, M., Apps, D., Menzies, J., Patel, J. C. & Rice, M. E. Dendritic Release of Neurotransmitters. *Compr Physiol* **7**, 235–252 (2016).
130. Zhang, Z., Bhalla, A., Dean, C., Chapman, E. R. & Jackson, M. B. Synaptotagmin IV: A Multifunctional Regulator of Peptidergic Nerve Terminals. *Nat Neurosci* **12**, 163 (2009).
131. Hatton, G. I. Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog Neurobiol* **34**, 437–504 (1990).
132. Van Den Burg, E. H., Stindl, J., Grund, T., Neumann, I. D. & Strauss, O. Oxytocin Stimulates Extracellular Ca²⁺ Influx Through TRPV2 Channels in Hypothalamic Neurons to Exert Its Anxiolytic Effects. *Neuropsychopharmacology* **40**, 2938–2947 (2015).
133. Lambert, R. C., Dayanithi, G., Moos, F. C. & Richard, P. A rise in the intracellular Ca²⁺ concentration of isolated rat supraoptic cells in response to oxytocin. *J Physiol* **478**, 275 (1994).
134. Ruis, H., Broeders, G., Corbey, R., Rolland, R. & Doesburg, W. Oxytocin enhances onset of lactation among mothers delivering prematurely. *Br Med J (Clin Res Ed)* **283**, 340–342 (1981).
135. Ayar, A. *et al.* Oxytocin activates calcium signaling in rat sensory neurons through a protein kinase C-dependent mechanism. *J Physiol Biochem* **70**, 43–48 (2014).
136. Di Scala-Guenot, D., Mougnot, D. & Strosser, M. -T. Increase of intracellular calcium induced by oxytocin in hypothalamic cultured astrocytes. *Glia* **11**, 269–276 (1994).
137. Gimpl, G. & Fahrenholz, F. The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. *Physiol Rev* **81**, 629–683 (2001).
138. Busnelli, M. *et al.* Functional selective oxytocin-derived agonists discriminate between individual G protein family subtypes. *J Biol Chem* **287**, 3617–3629 (2012).

139. Ostrowski, N. L., Young, W. S. & Lolait, S. J. Estrogen increases renal oxytocin receptor gene expression. *Endocrinology* **136**, 1801–1804 (1995).
140. Jankowski, M., Broderick, T. L. & Gutkowska, J. Oxytocin and cardioprotection in diabetes and obesity. *BMC Endocr Disord* **16**, (2016).
141. Cicutti, N. J., Smyth, C. E., Rosaeg, O. P. & Wilkinson, M. Oxytocin receptor binding in rat and human heart. *Can J Cardiol* **15**, 1267–1273 (1999).
142. Colaianne, G. *et al.* The oxytocin-bone axis. *J Neuroendocrinol* **26**, 53–57 (2014).
143. Colucci, S., Colaianne, G., Mori, G., Grano, M. & Zallone, A. Human osteoclasts express oxytocin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 442–445 (2002).
144. Halbach, P. *et al.* Oxytocin Expression and Function in the Posterior Retina: A Novel Signaling Pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**, 751 (2015).
145. Eckertova, M., Ondrejckova, M., Krskova, K., Zorad, S. & Jezova, D. Subchronic treatment of rats with oxytocin results in improved adipocyte differentiation and increased gene expression of factors involved in adipogenesis. *Br J Pharmacol* **162**, 452–463 (2011).
146. Sinclair, M. S. *et al.* Oxytocin Signaling in Mouse Taste Buds. *PLoS One* **5**, e11980 (2010).
147. Verbalis, J. G. & Dohanics, J. Vasopressin and oxytocin secretion in chronically hyposmolar rats. *Am J Physiol* **261**, (1991).
148. Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M. J. & Okayama, H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* **356**, 526–529 (1992).
149. Sanborn, B. M. Hormonal signaling and signal pathway crosstalk in the control of myometrial calcium dynamics. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 305–314 (2007).
150. Murtazina, D. A. *et al.* TRPC1, STIM1, and ORAI influence signal-regulated intracellular and endoplasmic reticulum calcium dynamics in human myometrial cells. *Biol Reprod* **85**, 315–326 (2011).
151. Shlykov, S. G., Yang, M., Alcorn, J. L. & Sanborn, B. M. Capacitative cation entry in human myometrial cells and augmentation by hTrpC3 overexpression. *Biol Reprod* **69**, 647–655 (2003).
152. Ulloa, A. *et al.* Reduction in TRPC4 expression specifically attenuates G-protein coupled receptor-stimulated increases in intracellular calcium in human myometrial cells. *Cell Calcium* **46**, 73–84 (2009).
153. Chung, D. *et al.* Attenuation of canonical transient receptor potential-like channel 6 expression specifically reduces the diacylglycerol-mediated increase in intracellular calcium in human myometrial cells. *Endocrinology* **151**, 406–416 (2010).
154. Devost, D., Carrier, M. E. & Zingg, H. H. Oxytocin-Induced Activation of Eukaryotic Elongation Factor 2 in Myometrial Cells Is Mediated by Protein Kinase C. *Endocrinology* **149**, 131–138 (2008).
155. Pont, J. N. A., McArdle, C. A. & Bernal, A. L. Oxytocin-Stimulated NFAT Transcriptional Activation in Human Myometrial Cells. *Molecular Endocrinology* **26**, 1743–1756 (2012).
156. Murrell, T. G. C. The potential for oxytocin (OT) to prevent breast cancer: a hypothesis. *Breast Cancer Res Treat* **35**, 225–229 (1995).
157. Liu, H., Gruber, C. W., Alewood, P. F., Möller, A. & Muttenthaler, M. The oxytocin receptor signalling system and breast cancer: a critical review. *Oncogene* **39**, 5917–5932 (2020).
158. Liu, Y. *et al.* Oxytocin promotes prefrontal population activity via the PVN-PFC pathway to regulate pain. *Neuron* **111**, 1795–1811.e7 (2023).
159. Miranda-Cardenas, Y. *et al.* Oxytocin and electrical stimulation of the paraventricular hypothalamic nucleus produce antinociceptive effects that are reversed by an oxytocin antagonist. *Pain* **122**, 182–189 (2006).

160. Worth, A. A., Feetham, C. H., Morrissey, N. A. & Luckman, S. M. Paraventricular oxytocin neurons impact energy intake and expenditure: projections to the bed nucleus of the stria terminalis reduce sucrose consumption. *Front Endocrinol (Lausanne)* **15**, 1449326 (2024).
161. Zhang, L. *et al.* Oxytocin neurons in the paraventricular nucleus and fear empathy among male mice. *J Psychiatry Neurosci* **49**, E192–E207 (2024).
162. Reversi, A. *et al.* The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a ‘biased agonist’ mechanism. *J Biol Chem* **280**, 16311–16318 (2005).
163. Scott, J. E., Grigsby, P. L., Hirst, J. J. & Jenkin, G. Inhibition of prostaglandin synthesis and its effect on uterine activity during established premature labor in sheep. *J Soc Gynecol Investig* **8**, 266–276 (2001).
164. Cid-Jofré, V., Moreno, M., Reyes-Parada, M. & Renard, G. M. Role of Oxytocin and Vasopressin in Neuropsychiatric Disorders: Therapeutic Potential of Agonists and Antagonists. *Int J Mol Sci* **22**, 12077 (2021).
165. Papatsonis, D., Flenady, V., Cole, S. & Liley, H. Oxytocin receptor antagonists for inhibiting preterm labour. *Cochrane Database Syst Rev* (2005).
166. Kim, S. H. *et al.* The oxytocin receptor antagonist, Atosiban, activates pro-inflammatory pathways in human amnion via G(αi) signalling. *Mol Cell Endocrinol* **420**, 11–23 (2016).
167. Rasie Abdullahi, P., Eskandarian, S., Ghanbari, A. & Rashidy-Pour, A. Oxytocin receptor antagonist atosiban impairs consolidation, but not reconsolidation of contextual fear memory in rats. *Brain Res* **1695**, 31–36 (2018).
168. Liu, R., Yuan, X., Chen, K., Jiang, Y. & Zhou, W. Perception of social interaction compresses subjective duration in an oxytocin-dependent manner. *Elife* **7**, (2018).
169. Erfanparast, A., Tamaddonfard, E. & Henareh-Chareh, F. Intra-hippocampal microinjection of oxytocin produced antiepileptic effect on the pentylenetetrazol-induced epilepsy in rats. *Pharmacol Rep* **69**, 757–763 (2017).
170. Lukmanji, S. *et al.* The co-occurrence of epilepsy and autism: A systematic review. *Epilepsy Behav* **98**, 238–248 (2019).
171. Abbasnezhad, A., Khazdair, M. R. & Kianmehr, M. The role of nitric oxide on the oxytocin induce analgesia in mice. *Iran J Basic Med Sci* **19**, 238 (2016).
172. Amini-Khoei, H. *et al.* Oxytocin mitigated the depressive-like behaviors of maternal separation stress through modulating mitochondrial function and neuroinflammation. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **76**, 169–178 (2017).
173. Tunstall, B. J. *et al.* Oxytocin blocks enhanced motivation for alcohol in alcohol dependence and blocks alcohol effects on GABAergic transmission in the central amygdala. *PLoS Biol* **17**, (2019).
174. Amini-Khoei, H. *et al.* Experiencing neonatal maternal separation increased pain sensitivity in adult male mice: Involvement of oxytocinergic system. *Neuropeptides* **61**, 77–85 (2017).
175. Rahimian, R. *et al.* Oxytocinergic system mediates the proconvulsant effects of sildenafil: The role of calcineurin. *Horm Behav* **122**, (2020).
176. Animals, N. R. C. (US) C. for the U. of the G. for the C. and U. of L. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (2011) doi:10.17226/12910.
177. Lu, W. L. *et al.* Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of ketoprofen beta-cyclodextrin inclusion complexes in animals. *Biol Pharm Bull* **27**, 1515–1520 (2004).
178. Stepanovic-Petrovic, R. M., Micov, A. M., Tomic, M. A., Kovacevic, J. M. & Boškovic, B. D. Antihyperalgesic/antinociceptive effects of ceftriaxone and its synergistic interactions with different analgesics in inflammatory pain in rodents. *Anesthesiology* **120**, 737–750 (2014).

179. Paxinos, G. & Franklin, K. B. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. (Academic Press, San Diego, 2001).
180. Bennett, G. J. & Xie, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**, 87–107 (1988).
181. Konig, H. E. & Liebich, H. G. *Anatomia Dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido*. (Artmed, Porto Alegre, 2016).
182. Kuraishi, Y., Harada, Y., Aratani, S., Satoh, M. & Takagi, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. *Brain Res* **273**, 245–252 (1983).
183. Vander Wende, C. & Margolin, S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. *Fed Proc* **15**, (1956).
184. Zar, J. H. *Biostatistical Analysis*. (Pearson, New Jersey, 2010).
185. Callegari-Jacques, S. M. *Bioestatística: Princípios e Aplicações*. (Artmed, Porto Alegre, 2003).
186. Magno, G. D. Avaliação do papel da neurotransmissão de ocitocina na modulação da ansiedade induzida em camundongos pelo modelo de empatia para dor. (São Carlos, 2021).
187. Ruteski, T. F. Avaliação do papel da neurotransmissão ocitocinérgica na nocicepção induzida pelo modelo de dor crônica em camundongos machos e fêmeas. (São Carlos, 2022).
188. Brown, D. C. & Perkowski, S. Oxytocin content of the cerebrospinal fluid of dogs and its relationship to pain induced by spinal cord compression. *Vet Surg* **27**, 607–611 (1998).
189. Espinosa De Los Monteros-Zúñiga, A., Martínez-Lorenzana, G., Condés-Lara, M. & González-Hernández, A. Intrathecal Oxytocin Improves Spontaneous Behavior and Reduces Mechanical Hypersensitivity in a Rat Model of Postoperative Pain. *Front Pharmacol* **11**, (2020).
190. Sun, J. *et al.* Excitatory SST neurons in the medial paralemniscal nucleus control repetitive self-grooming and encode reward. *Neuron* **110**, 3356–3373.e8 (2022).
191. Sabihi, S., Durosko, N. E., Dong, S. M. & Leuner, B. Oxytocin in the prelimbic medial prefrontal cortex reduces anxiety-like behavior in female and male rats. *Psychoneuroendocrinology* **45**, 31–42 (2014).
192. Blume, A. *et al.* Oxytocin reduces anxiety via ERK1/2 activation: Local effect within the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *European Journal of Neuroscience* **27**, 1947–1956 (2008).
193. Jurek, B. *et al.* Differential contribution of hypothalamic MAPK activity to anxiety-like behaviour in virgin and lactating rats. *PLoS One* **7**, (2012).
194. Beyer, C. E. *et al.* Angiotensin IV elevates oxytocin levels in the rat amygdala and produces anxiolytic-like activity through subsequent oxytocin receptor activation. *Psychopharmacology (Berl)* **209**, 303–311 (2010).
195. Yu, L. *et al.* Propofol Alleviates Anxiety-Like Behaviors Associated with Pain by Inhibiting the Hyperactivity of PVNCRH Neurons via GABAA Receptor $\beta 3$ Subunits. *Adv Sci (Weinh)* **11**, (2024).
196. Mak, P., Broussard, C., Vacy, K. & Broadbear, J. H. Modulation of anxiety behavior in the elevated plus maze using peptidic oxytocin and vasopressin receptor ligands in the rat. *Journal of Psychopharmacology* **26**, 532–542 (2012).
197. Babic, S., Pokusa, M., Danevova, V., Ding, S. T. & Jezova, D. Effects of atosiban on stress-related neuroendocrine factors. *Journal of Endocrinology* **225**, 9–17 (2015).
198. Tang, Y. Bin *et al.* Intranasal oxytocin alleviates postsurgical pain and comorbid anxiety in mice: Participation of BK(Ca) channels in the hippocampus. *Neuropharmacology* **265**, 110243 (2025).

199. Neves, S. M. P., Mancini Filho, J. & Wenzel de, E. *Manual de Cuidados e Procedimentos Com Animais de Laboratório Do de Produção e Experimentação Da FCF-IQ/USP*. (Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013).
200. Andrade, Antenor. *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. (Editora Fiocruz, 2002).
201. Andersen, R. E., Crespo, C. J., Bartlett, S. J., Bathon, J. M. & Fontaine, K. R. Relationship between body weight gain and significant knee, hip, and back pain in older Americans. *Obes Res* **11**, 1159–1162 (2003).
202. Headey, D. *et al.* Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. *Lancet* **396**, 519–521 (2020).
203. Hart, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* **12**, 123–137 (1988).
204. Beynen, A. C. *et al.* Assessment of discomfort in gallstone-bearing mice: A practical example of the problems encountered in an attempt to recognize discomfort in laboratory animals. *Lab Anim* **21**, 35–42 (1987).
205. Ahloy-Dallaire, J., Klein, J. D., Davis, J. K. & Garner, J. P. Automated monitoring of mouse feeding and body weight for continuous health assessment. *Lab Anim* **53**, 342–351 (2019).

9 ANEXOS

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Universidade Federal de São Carlos

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Envolvimento da neurotransmissão ocitocinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na modulação da ansiedade e nocicepção induzida pelo convívio com o coespecífico com dor crônica em camundongos machos e fêmeas.", protocolada sob o CEUA nº 4211010823 (ID 001899), sob a responsabilidade de **Azair Liane Matos do Canto de Souza e equipe; Lara Maria Silveira; Heloísa Máximo Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 25/08/2023.

We certify that the proposal "Involvement of oxytocinergic neurotransmission from the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the modulation of nociception induced by living with a conspecific with chronic pain in male and female mice.", utilizing 880 Heterogenics mice (440 males and 440 females), protocol number CEUA 4211010823 (ID 001899), under the responsibility of **Azair Liane Matos do Canto de Souza and team; Lara Maria Silveira; Heloísa Máximo Ribeiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/25/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**Vigência da Proposta: de **08/2023 a 12/2025** Área: **Psicologia**

Origem:	Biotério Central da UFSCAR	sexo:	Machos	idade:	20 a 21 dias	Quantidade:	440
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	14 a 45 g		
Linhagem:	Suíço Albino						
Origem:	Biotério Central da UFSCAR	sexo:	Fêmeas	idade:	20 a 21 dias	Quantidade:	440
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	14 a 45 g		
Linhagem:	Suíço-Albino						

São Carlos, 25 de setembro de 2023



Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



ANEXO B – Medidas convencionais e etológicas obtidas através do LCE de camundongos machos que receberam injeções combinadas intra-PVN e conviveram em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.

Medidas		Salina-Salina			Salina-Ocitocina			Atosibana-Salina			Atosibana-Ocitocina		
		Ob-Sham n= 10	Ob-CNC n=10	H	Ob-Sham n=10	Ob-CNC n=10	H	Ob-Sham n= 11	Ob-CNC n=10	H	Ob-Sham n=8	Ob-CNC n=7	H
Tempo	TBA (%)	29,17 ± 17,91	14,73 ± 9,87	11,3443*	19,87 ± 9,35	15,67 ± 13,72	0,6304	27,12 ± 12,32	26,03 ± 15,62	0,1241	20,83 ± 17,53	25,81 ± 19,99	0,124
	TBF (%)	29,97 ± 14,41	41,27 ± 9,90	4,1688*	41,73 ± 10,93	50,93 ± 15,45	1,6514	32,97 ± 9,23	38,17 ± 16,63	1,1171	49,38 ± 15,20	40,43 ± 10,89	1,1171
	TC (%)	40,87 ± 8,64	44,00 ± 11,54	1,7513	38,40 ± 12,06	33,40 ± 17,70	0,7562	39,91 ± 10,67	35,80 ± 7,83	0,7145	29,79 ± 14,72	33,76 ± 18,64	0,1205
Entradas	EBA (%)	47,00 ± 23,71	35,67 ± 15,15	1,4661	28,94 ± 13,25	22,38 ± 19,89	0,7562	43,99 ± 13,87	42,84 ± 6,81	0,0795	32,72 ± 15,99	38,97 ± 38,97	0,4821
	EBF (%)	53,00 ± 23,71	34,33 ± 15,15	1,4661	71,06 ± 13,25	77,62 ± 19,89	0,7562	56,01 ± 13,87	57,16 ± 6,81	0,0795	67,28 ± 15,99	61,03 ± 24,97	0,4821
	TE	18,60 ± 5,46	15,40 ± 5,62	1,6639	21,40 ± 6,35	22,70 ± 5,48	0,1453	19,36 ± 4,41	16,80 ± 4,32	1,3668	20,13 ± 8,54	19,86 ± 10,12	0,0033
Medidas etológicas	Total de mergulhos	25,10 ± 13,06	23,40 ± 9,55	0,0358	25,30 ± 8,51	18,70 ± 9,12	2,7719	21,36 ± 11,14	20,30 ± 8,87	0,0049	11,13 ± 3,44	9,14 ± 4,53	0,6621
	% Mergulhos protegidos	60,05 ± 62,05	73,14 ± 20,77	0,5161	62,72 ± 14,43	61,65 ± 29,53	0,0514	54,47 ± 25,31	57,50 ± 23,02	0,0607	60,03 ± 22,91	51,79 ± 31,98	0,2716
	Total de esticar	5,10 ± 3,63	5,10 ± 3,00	0,0522	8,40 ± 4,58	7,50 ± 5,13	0,0359	4,91 ± 2,47	5,30 ± 2,58	0,1032	5,25 ± 2,55	4,00 ± 2,52	1,2511
	% Esticar protegido	65,17 ± 39,02	76,31 ± 30,80	0,2939	76,04 ± 21,97	66,37 ± 41,95	0,0134	55,57 ± 33,24	49,25 ± 33,91	0,1270	61,01 ± 32,22	47,62 ± 41,31	0,6986
	Total de Levantamentos	11,7 ± 8,92	10,20 ± 6,05	0,0229	11,90 ± 6,12	15,30 ± 6,67	0,0357	10,73 ± 4,61	12,40 ± 6,00	0,4085	15,13 ± 9,43	17,00 ± 9,00	0,4087
	Tempo de Autolimpeza Protegida (s)	17,80 ± 18,72	56,40 ± 29,80	8,2763*	34,90 ± 30,12	37,90 ± 32,51	0,8499	35,73 ± 27,82	51,00 ± 39,79	0,6600	48,50 ± 39,02	22,43 ± 28,89	2,4452
	Imobilidade (s)	0,60 ± 1,90	0,30 ± 0,95	0,0052	0,80 ± 2,53	0,00 ± 0,00	1,0000	0,36 ± 1,21	0,00 ± 0,00	0,9090	0,00 ± 0,00	1,57 ± 4,16	1,1428

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Valores de H obtidos pelo teste Kruskal-Wallis. Os valores de H referem-se à comparação da mesma condição de injeção em animais Ob-Sham e Ob-CNC. S, Salina; OXT, ocitocina; ATOS, atosibana; Ob-Sham, observador do animal Sham; Ob-CNC, observador do animal CNC. Valores de H com $p \leq 0,05^*$ foram considerados estatisticamente significativos.

ANEXO C – Valores de H para a comparação entre os animais machos que receberam salina (controle) e os animais que receberam os diferentes tratamentos farmacológicos, dentro do mesmo grupo experimental (Ob-Sham ou Ob-CNC).

Medidas		Ob-Sham				Ob-CNC			
		S-S e S-OXT	S-S e ATOS-S	S-S e ATOS-OXT	ATOS-S e ATOS-OXT	S-S e S-OXT	S-S e ATOS-S	S-S e ATOS-OXT	ATOS-S e ATOS-OXT
Tempo	TBA (%)	2,0628	0,1239	1,5473	1,7454	0,2417	2,8972	0,7723	0,0381
	TBF (%)	3,4325	1,1171	6,4191*	4,2688*	1,9601	0,7001	0,1169	0,0023
	TC (%)	0,2060	0,0198	1,8967	1,9721	2,7657	4,6449*	2,4380	1,1523
Entradas	EBA (%)	3,5741	0,4483	2,2839	2,8703	2,5200	0,4639	0,2380	0,3814
	EBF (%)	3,5741	0,4483	2,2839	2,8703	2,5200	0,4639	0,1930	0,3814
	TE	0,6977	0,2143	0,1269	0,0000	5,7086*	0,5744	0,6940	0,1950
Medidas etológicas	Total de mergulhos	0,2063	0,5491	9,1641*	6,1633*	1,4650	0,5735	9,4615*	6,9684*
	% Mergulhos protegidos	0,0228	0,7140	0,0712	0,2064	0,8234	2,8950	1,3714	0,2891
	Total de esticar	3,0434	0,0113	0,0981	0,1113	1,6689	0,0525	0,7018	0,6295
	% Esticar protegido	0,1494	0,7455	0,2996	0,2990	0,0014	3,6426	1,6688	0,0398
	Total de Levantamentos	0,0229	0,0012	1,0538	1,1686	2,6554	0,7602	2,6088	1,2672
	Tempo de Autolimpeza Protegida (s)	2,2978	2,9939	3,8289@	0,2883	1,7513	0,3243	5,0380*	2,1534
	Imobilidade (s)	0,0052	0,1909	0,8000	0,7272	1,0000	1,0000	0,1214	1,4285

Os valores de H apresentados foram calculados a partir das medidas convencionais e etológicas expressas no anexo B. S, Salina; OXT, ocitocina; ATOS, atosibana; Ob-Sham, observador do animal Sham; Ob-CNC, observador do animal CNC. Valores de H com $p \leq 0,05^*$ foram considerados estatisticamente significativos. (@) comparação entre indivíduo tratado e controle salina com $p=0,0504$.

ANEXO D – Medidas convencionais e etológicas obtidas através do LCE de camundongos fêmeas que receberam injeções combinadas intra-PVN e conviveram em quartetos com coespecífico CNC ou Sham.

Medidas		Salina-Salina			Salina-Ocitocina			Atosibana-Salina		
		Ob-Sham n= 9	Ob-CNC n=9	H	Ob-Sham n=8	Ob-CNC n=8	H	Ob-Sham n= 6	Ob-CNC n=6	H
Tempo	TBA (%)	24,30 ± 23,05	16,48 ± 12,86	0,0955	23,42 ± 13,55	36,83 ± 21,22	1,1045	37,28 ± 21,50	17,72 ± 11,96	2,5640
	TBF (%)	37,63 ± 14,50	45,48 ± 11,89	1,4269	51,42 ± 18,51	32,42 ± 12,21	4,4378*	33,67 ± 16,41	38,56 ± 12,11	1,0871
	TC (%)	38,07 ± 13,86	38,04 ± 9,00	0,0000	25,17 ± 8,60	30,75 ± 12,93	0,5404	29,06 ± 9,64	43,72 ± 10,02	3,7052
Entradas	EBA (%)	29,29 ± 21,69	31,61 ± 16,35	0,0702	43,34 ± 10,14	48,12 ± 13,12	0,8960	40,35 ± 7,89	26,52 ± 20,31	1,6410
	EBF (%)	70,71 ± 21,69	68,39 ± 16,35	0,0702	56,66 ± 10,14	51,88 ± 13,12	0,8960	59,65 ± 7,89	73,48 ± 20,31	1,6410
	TE	14,78 ± 26,18	18,22 ± 5,07	1,7689	17,88 ± 5,57	21,00 ± 1,74	0,9080	19,17± 3,55	18,17 ± 5,81	0,2315
Medidas etológicas	Total de mergulhos	15,00 ± 5,05	16,89 ± 6,53	0,6394	15,63 ± 6,95	25,88 ± 8,72	4,4182*	13,33 ± 7,34	15,17 ± 6,31	0,3152
	% Mergulhos protegidos	72,40 ± 22,77	71,89 ± 22,27	0,0500	45,34 ± 25,60	39,32 ± 20,42	0,1764	60,33 ± 24,23	82,83 ± 19,90	2,8772
	Total de esticar	5,78 ± 3,19	4,22 ± 3,07	0,8695	3,13 ± 1,55	6,00 ± 3,59	2,8331	3,67 ± 3,01	6,83 ± 3,06	3,1465
	% Esticar protegido	73,84 ± 28,72	73,15 ± 37,22	0,0356	65,83 ± 34,58	48,13 ± 36,12	1,0163	59,13 ± 47,05	85,83 ± 24,58	1,4373
	Total de Levantamentos	5,78 ± 1,79	12,78 ± 7,33	4,1721*	12,50 ± 4,50	8,50 ± 5,40	1,2268	10,00 ± 3,16	11,17 ± 5,64	0,0580
	Tempo de Autolimpeza Protegida (s)	49,11± 28,23	56,00 ± 24,20	0,3824	3,13 ± 5,94	28,88 ± 23,85	0,8986	35,33 ± 46,74	41,83 ± 13,88	2,0769
	Imobilidade (s)	5,22 ± 11,04	0,00 ± 0,00	3,3667	1,63 ± 4,60	0,00 ± 0,00	1,0000	1,83 ± 3,25	1,00 ± 2,45	0,3975

Valores apresentados como média ± desvio padrão. Valores de H obtidos pelo teste Kruskal-Wallis. Os valores de H referem-se à comparação da mesma condição de injeção em animais Ob-Sham e Ob-CNC. S, Salina; OXT, ocitocina, ATOS, atosibana; Ob-Sham, observador do animal Sham; Ob-CNC, observador do animal CNC. Valores de H com $p \leq 0,05$ * foram considerados estatisticamente significativos.

ANEXO E – Valores de H para a comparação entre os animais fêmeas que receberam salina (controle) e os animais que receberam os diferentes tratamentos farmacológicos, dentro do mesmo grupo experimental (Ob-Sham ou Ob-CNC).

Medidas		Ob-Sham			Ob-CNC		
		S-S e S-OXT	S-S e S-ATOS	S-OXT e ATOS-S	S-S e S-OXT	S-S e S-ATOS	S-OXT e ATOS-S
Tempo	TBA (%)	0,0092	1,1250	1,3500	4,0883*	0,0555	4,5879*
	TBF (%)	2,0858	0,3472	4,0218*	4,9041*	2,7170	0,1500
	TC (%)	3,8959*	1,6835	0,2672	1,3333	0,5878	3,2666
Entradas	EBA (%)	2,6759	2,3472	1,0713	4,4814*	0,2817	3,5118
	EBF (%)	2,6759	2,3472	1,0713	4,4814*	0,2817	3,5118
	TE	1,2305	1,1310	0,0377	0,9432	0,0000	0,3458
Medidas etológicas	Total de mergulhos	0,0373	0,4231	0,5097	4,7222*	0,1716	4,8166*
	% Mergulhos protegidos	4,5091*	0,5985	1,6666	6,5263*	1,1475	7,3661*
	Total de esticar	3,0909	1,4141	0,0176	0,7948	1,7558	0,1102
	% Esticar protegido	0,0000	0,3717	0,0000	2,7674	0,3587	4,6709*
	Total de Levantamentos	9,9014*	5,6980*	0,9458	2,1437	0,1716	0,6026
	Tempo de Autolimpeza Protegida (s)	0,2280	1,5339	0,5052	4,6990*	2,0071	1,5108
	Imobilidade (s)	1,0698	0,0196	0,5163	0,0000	1,5000	1,3333

Os valores de H apresentados foram calculados a partir das medidas convencionais e etológicas expressas no anexo D. S, Salina; OXT, ocitocina; ATOS, atosibana; Ob-Sham, observador do animal Sham; Ob-CNC, observador do animal CNC. Valores de H com $p \leq 0,05^*$ foram considerados estatisticamente significativos.