



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



Defesa de Mestrado

O papel da neurotransmissão alfa-2 adrenérgica do córtex cingulado anterior na modulação da ansiedade e da nocicepção na empatia para a dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

Raphael Christhian Brandão de Souza

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

São Carlos – SP
2025



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



O papel da neurotransmissão alfa-2 adrenérgica do córtex cingulado anterior na modulação da ansiedade e da nocicepção na empatia para a dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

Raphael Christhian Brandão de Souza

Texto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Linha 3: Neurociência Comportamental e Cognitiva da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários para o exame de Defesa de Mestrado.

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

São Carlos – SP
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Relatório de Defesa de Dissertação Candidato: Raphael Christhian Brandão de Souza

Aos 27/06/2025, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Psicologia, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: O papel da neurotransmissão adrenérgica do córtex cingulado anterior na modulação da ansiedade e da nocicepção no contágio emocional da dor crônica em camundongos machos e fêmeas, apresentada pelo candidato Raphael Christhian Brandão de Souza. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca	Função	Instituição	Conceito	Resultado Final
Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza	Presidente	UFSCar	<u>A</u>	Aprovado
Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira	Titular	UFSCar	<u>A</u>	
Profa. Dra. Lígia Renata Rodrigues Tavares	Titular	UNESP	<u>A</u>	

Parecer da Comissão Julgadora*:

O mestrando utilizou slides adequados para apresentar seu trabalho de dissertação. Respondeu à arguição dos membros da banca, demonstrando conhecimento dos fundamentos teóricos e metodológicos relacionados ao tema de pesquisa desenvolvido.

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, Juan Rodrigo Reys Miguel, representante do Programa de Pós-Graduação em Psicologia, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

Representante do PPG: Juan Rodrigo Reys Miguel

Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira

Profa. Dra. Lígia Renata Rodrigues Tavares

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Azair Liane Matos do Canto de Souza, Amanda Ribeiro de Oliveira, Lígia Renata Rodrigues Tavares e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Documento assinado digitalmente
gov.br AZAIR LIANE MATOS DO CANTO DE SOUZA
Data: 29/07/2025 08:41:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza

(X) Não houve alteração no título () Houve alteração no título. O novo título passa a ser:

Observações:

- a) Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
b) Para gozar dos direitos do título de Mestre ou Doutor em Psicologia, o candidato ainda precisa ter sua dissertação ou tese homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deusa pela proteção, e por encher de força o meu coração.

Agradeço a minha avó Maria Elidalva de Souza (vovó Dadá) pelo suporte e pelo amor incondicional.

Agradeço a minha irmã Rafaela por ser a melhor irmã do mundo e aos meus familiares.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza pelo suporte, pela compreensão, pela paciência, pelos ensinamentos e pela oportunidade.

Agradeço a Lara Maria Silveira pela amizade e pelo suporte técnico.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório Isa Waku, Alessandra, Leonam, Joyce, Fernanda, Lígia, Camila, Profa. Amanda, Erinete, Jonatã, Letícia e Isabella pelo apoio.

Agradeço a banca de qualificação e de defesa.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Processo nº88887.842546/2023-00 e 001.

Agradeço ao PPGPsi - UFSCar.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Corte coronal do CCA de camundongo.....	24
Figura 2. Placa Quente.....	40
Figura 3. Estereotaxia do CCA de camundongo.....	41
Figura 4. Bomba de Microinjeção.....	42
Figura 5. Contorção abdominal.....	42
Figura 6. Labirinto em Cruz Elevado.....	43
Figura 7. Delineamento do experimento 1A e 1B.....	46
Figura 8. Latência de retirada da pata traseira direita nos camundongos machos (A) e fêmeas (B), Sham e constritos (CNC) avaliados no teste de placa quente antes da cirurgia da constrição do nervo isquiático (latência basal) e no 28º dia (latência final) após o término do teste de contorções abdominais nos grupos Ob-CNC e Ob-Sham.....	50
Figura 9. (A) Esquema de secções coronais representando alguns dos sítios de injeção no CCA de camundongos. Os círculos pretos representam os locais de injeção dentro do CCA e os círculos cinza representam os locais fora da estrutura (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando sítios de injeção no CCA de um camundongo.....	51
Figura 10. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, salina/clonidina (8 µg/0,1µL), ioimbina/salina (0,05 µg/0,1µL), e ioimbina/clonidina (0,05 e 8 µg/0,1µL) sobre a nocicepção em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.....	53
Figura 11. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, salina/clonidina (8 µg/0,1µL), ioimbina/salina (0,05 µg/0,1µL) e ioimbina/clonidina (0,05 e 8 µg/0,1µL) sobre a modulação da ansiedade em camundongos machos expostos ao labirinto em cruz elevado, (A) porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), (B) porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) e (C) frequência de entradas nos braços fechados (EBF), induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.....	55
Figura 12 Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, clonidina/salina (8µg/0,1µL), ioimbina/salina (0,05µg/0,1 L) e ioimbina/salina (0,05 e 8µg/0,1µL) sobre a nocicepção em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.....	61

Figura 13. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, salina/clonidina (8µg/0,1µL), ioimbina/salina (0,05µg/0,1µL) e ioimbina/clonidina (0,05 e 8µg/0,1µL) sobre a modulação da ansiedade em camundongos fêmeas expostos ao labirinto em cruz elevado, (A) porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), (B) porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) e (C) frequência de entradas nos braços fechados (EBF), induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, salina/clonidina (8µg/0,1µL), ioimbina (0,05 µg/0,1µL)/salina e ioimbina (0,05 µg/clonidina 8 µg/0,1µL) sobre a avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado, induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica59

Tabela 2. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, salina/clonidina (8µg/0,1µL), ioimbina (0,05 µg/0,1µL)/salina e ioimbina (0,05 µg/clonidina 8 µg/0,1µL) sobre a avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade em camundongos expostos ao LCE, induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP - Anteroposterior
Cg – Córtex Cingulado
CCA – Córtex Cingulado Anterior
Cg1 – Córtex cingulado 1
Cg2 – Córtex cingulado 2
CNC – Constrição do nervo isquiático
DV – Dorsoventral
EBA – Entrada nos braços abertos
EBF – Entrada nos braços fechados
i.p. – Intraperitoneal
L – Lateral
LCE – Labirinto em cruz elevado
mm – Milímetro
SNC – Sistema nervoso central
TC – Tempo gasto no centro
tImobi – Tempo total de imobilidade
TLev – Total de levantamentos
TM – Total de mergulhos
TSAP – Total de esticadas
µg - Microgramas
µL – Microlitros
°C – Graus Celsius
%EBA – Porcentagem de entradas no braços abertos
%TBA – Porcentagem de tempo nos braços abertos
%TC – Porcentagem de tempo no centro
%LevDesp – Porcentagem de levantar desprotegido
%LevProt – Porcentagem de levantar protegido
%MergDesp – Porcentagem de mergulhos desprotegidos
%MergProt – Porcentagem de mergulhos protegidos
%SAPDesp – Porcentagem de esticar desprotegido
%SAPProt – Porcentagem de esticar protegido

Brandão-de-Souza, R.C. O papel da neurotransmissão alfa-2 adrenérgica do córtex cingulado anterior na modulação da ansiedade e da nocicepção na empatia para a dor crônica em camundongos machos e fêmeas. 93 folhas. Defesa de mestrado - Psicologia - UFSCar – Universidade Federal de São Carlos. 2025.

RESUMO

A empatia enquanto uma capacidade de observar e inferir estados emocionais e mentais de outras pessoas vem sendo alvo de uma série de pesquisas, sendo possível observar esse fenômeno também em roedores. Estudos apontam que a convivência com um camundongo demonstrador de dor crônica produz hipernocicepção e aumento de comportamentos semelhantes à ansiedade, e que o córtex cingulado anterior (CCA) pode modular a empatia, a ansiedade e a nocicepção. Desse modo, considerando a alta densidade de receptores alfa-2 adrenérgicos no CCA e o papel destes receptores na modulação da ansiedade e da nocicepção, essa pesquisa investigou a participação da neurotransmissão alfa-2 adrenérgica do CCA na modulação da nocicepção e da ansiedade no modelo de empatia para a dor crônica. Para isso, camundongos machos e fêmeas suíço-albino foram alojados em quartetos durante um protocolo de convivência de 28 dias. No 14º dia, um dos animais do quarteto foi selecionado para ser o demonstrador de dor crônica (CNC) ou demonstrador Sham. No 24º, os camundongos observadores (Ob-CNC e Ob-Sham) passaram pela estereotaxia do CCA. No 26º, 27º e 28º dia, foi introduzida uma divisória na caixa-moradia por 15 minutos, para produzir habituação e viabilizar o teste de contorções abdominais nos camundongos Ob-CNC e Ob-Sham. No 28º dia, os animais Ob-CNC e Ob-Sham receberam injeção bilateral intra-CCA de salina/clonidina 8 µg/0,1µL (agonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos), ioimbina 0,05 µg/0,1µL (antagonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos)/salina, ioimbina 0,05 µg/clonidina 8 µg, salina/salina, e depois foram submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. Em seguida, receberam a injeção de ácido acético a 0,6% (10 ml/kg, intraperitoneal) para avaliação durante 5 minutos das contorções abdominais. Os camundongos CNC e Sham foram avaliados no teste de placa quente no 28º dia. Nossos resultados mostraram que a convivência em quartetos com um demonstrador de dor crônica induz hipernocicepção e aumenta respostas semelhantes à ansiedade em camundongos machos e fêmeas. A clonidina (8 µg) reduziu a hipernocicepção e a ansiedade, enquanto a ioimbina (0,05 µg) reverteu a antinocicepção produzida pela clonidina, porém não alterou a ansiedade na empatia para a dor, em camundongos machos e fêmeas. Portanto, a neurotransmissão alfa-2 adrenérgica do CCA participa de forma distinta da modulação da nocicepção e da ansiedade induzida no modelo de empatia para a dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

Palavras-chaves: empatia, clonidina, ioimbina, córtex cingulado anterior, nocicepção, camundongos.

Brandão-de-Souza, R.C. The role of alpha-2 adrenergic neurotransmission of the anterior cingulate cortex in modulating anxiety and nociception in empathy for chronic pain in male and female mice. 93 folhas. Defesa de mestrado - Psicologia - UFSCar – Universidade Federal de São Carlos. 2025.

ABSTRACT

Empathy, defined as the ability to observe and infer the emotional and mental states of others, has been the subject of numerous research studies, and this phenomenon can also be observed in rodents. Studies indicate that cohabitation with a cagemate experiencing chronic pain induces hypernociception and an increase in anxiety-like behaviors, and that the anterior cingulate cortex (ACC) modulates empathy, anxiety, and nociception. Therefore, considering the high density of alpha-2 adrenergic receptors in the ACC and their role in modulating anxiety and pain, this study investigated the involvement of alpha-2 adrenergic neurotransmission within the ACC in modulating nociception and anxiety in the empathy for chronic pain model. Thus, male and female Swiss-albino mice were housed in quartets during a 28-day cohabitation protocol. On the 14th day, one of the animals in the quartet was selected to be the chronic pain demonstrator (CNC) or Sham demonstrator. On day 24, the observer mice (Ob-CNC and Ob-Sham) underwent CCA stereotaxis. On days 26, 27, and 28, a partition was introduced into the housing cage for 15 minutes to induce habituation and enable the abdominal writhing test in Ob-CNC and Ob-Sham mice. On day 28, Ob-CNC and Ob-Sham animals received bilateral intra-CCA injections of saline/clonidine 8 µg/0.1 µL (alpha-2 adrenergic receptor agonist), yohimbine 0.05 µg/0.1 µL (alpha-2 adrenergic receptor antagonist)/saline, yohimbine 0.05 µg/clonidine 8 µg, saline/saline, and were then subjected to the elevated plus maze for 5 minutes. Next, they received an injection of 0.6% acetic acid (10 ml/kg, intraperitoneal) for evaluation of abdominal contortions over 5 minutes. CNC and Sham mice were evaluated in the hot plate test on day 28. Our results showed that cohabitation in quartets with a chronic pain demonstrator induces hypernociception and increased anxiety-like responses in male and female mice. Clonidine (8 µg) reduced hypernociception and decreased anxiety-like behaviors, whereas pre-treatment with yohimbine (0.05 µg) reversed clonidine-induced antinociception without altering anxiety-like behaviors in the observer mice. Hence, alpha-2 adrenergic neurotransmission in the ACC plays a distinct role in modulating nociception and anxiety induced by empathy for chronic pain model in both male and female mice.

Keywords: empathy, clonidine, yohimbine, anterior cingulate cortex, nociception, mice.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 AS DEFINIÇÕES DA DOR E A FISIOLÓGIA DA NOCICEPÇÃO.....	15
1.2 A EPIDEMIOLOGIA DA DOR CRÔNICA.....	16
1.3 AS VIAS ASCENDENTES DA DOR	17
1.4 O MODELO DE DOR CRÔNICA PARA ROEDORES.....	19
1.5 AS VIAS DESCENDENTES INIBITÓRIAS DA NOCICEPÇÃO.....	20
1.6 REGIÕES ENCEFÁLICAS E PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO.....	20
1.7 A ANSIEDADE E O MODELO ANIMAL PARA A ANSIEDADE.....	21
1.8 RECEPTORES ADRENÉRGICOS.....	22
1.9 CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR (CCA)	23
1.10 RECEPTORES ALFA-2 ADRENÉRGICOS E A NOCICEPÇÃO	25
1.11 ANSIEDADE RELACIONADA AOS RECEPTORES ALFA-2 ADRENÉRGICOS ..	26
1.12 AS CONCEPÇÕES SOBRE A EMPATIA	27
1.13 A EMPATIA EM ROEDORES.....	29
1.14 A INVESTIGAÇÃO DE ROEDORES FÊMEAS NA PESQUISA EXPERIMENTAL	32
1.15 HIPÓTESES.....	33
2. OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 ANIMAIS	38
3.2 FÁRMACOS	38
3.3. CONSTRIÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO	39
3.4 AVALIAÇÃO SENSORIAL BASAL	39

3.5 TESTE DA PLACA QUENTE	40
3.6 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	40
3.7 MICROINJEÇÃO	41
3.8 TESTE NOCICEPTIVO	42
LABIRINTO EM CRUZ EM ELEVADO (LCE)	43
3.10 HISTOLOGIA	44
3.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
3.11.1. Experimento 1A. Avaliar o efeito da injeção combinada intra-CCA de ioimbina seguida de clonidina na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.	45
3.11.2. Experimento 1B. Avaliar o efeito da injeção combinada intra-CCA de ioimbina seguida de clonidina na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.	46
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4. RESULTADOS	48
4.1. EFEITO DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO NOS CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS AVALIADOS NO TESTE DE PLACA QUENTE.	49
4.2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	51
4.3. Experimento 1. Efeito Avaliar o efeito da injeção combinada intra-CCA de ioimbina seguida de clonidina na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos machos e fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.	52
4.3.1 Experimento 1A. Efeito da injeção intra-CCA de ioimbina seguida de clonidina na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.	52
4.3.2 Experimento 1B. Efeito da injeção combinada intra-CCA de ioimbina (antagonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos) seguida de clonidina (agonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos), na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.	60
5. DISCUSSÃO	68
6. CONCLUSÃO.....	78
7. REFERÊNCIAS.....	80

8. ANEXOS.....	92
-----------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1 AS DEFINIÇÕES DA DOR E A FISIOLÓGIA DA NOCICEPÇÃO.

A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável e pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda permanece por um curto período e pode ser produzida, por exemplo, por corte na pele, enquanto a dor crônica é duradoura, não tem local definido e dura mais de seis meses (ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL PARA O ESTUDO DA DOR, 2020).

A modalidade sensorial ligada à dor é a nocicepção, que capta as informações de natureza nociva provenientes dos estímulos ambientais, sendo os seus receptores denominados de nociceptores, especializados em captar as informações nociceptivas térmicas, mecânicas e químicas (DRAY, 1995).

Os nociceptores, assim como outros receptores sensoriais, realizam a transdução de estímulos sensoriais. Estes receptores são majoritariamente terminações livres que se estendem por toda a pele e se despolarizam quando o estímulo que elicia sua resposta entra em contato com seu campo sensível (TEIXEIRA et al., 2009), isto é, diferentemente dos outros receptores sensoriais, que também podem captar sensações mecânicas e térmicas, os nociceptores apresentam um limiar de disparo a estes estímulos sensoriais somente a partir de um nível de estimulação nocivo (BESSON; HAOUCH, 1987). No entanto, é importante ressaltar que, no momento desta sinalização nociceptiva, diversos mecanismos biológicos são recrutados, que podem acarretar na sensibilização nociceptiva do organismo (WANG; THYAGARAJAN, 2020).

Os mecanismos de sensibilização estão relacionados ao aumento da sensibilidade à dor e ao seu processo de cronificação, por meio da liberação de mediadores inflamatórios que contribuem para o aumento da percepção da nocicepção no local onde ocorreu a lesão. Alguns desses mediadores são a histamina, a substância P e as prostaglandinas, que quando são liberadas na corrente sanguínea, provocam vasodilatação e edema, bem como alteram o limiar de disparo dos nociceptores, resultando em um processamento diferencial de

estímulos inócuos, que passam a ser interpretados como estímulos nociceptivos - processo denominado como alodinia (WANG; THYAGARAJAN, 2020).

Outra resposta que ocorre com a sensibilização das vias nociceptivas é a hiperalgesia. Nesta resposta, os estímulos nociceptivos são interpretados como mais dolorosos que o habitual (WANG; THYAGARAJAN, 2020). Uma maneira para avaliar tanto a alodinia, quanto a hiperalgesia em roedores, é por meio de testes que medem a resposta mecânica, por exemplo o teste vonFrey (CHEN et al., 1999) e térmica, por exemplo o teste da placa quente (KURAISHI et al., 1983; LIU et al., 2002). Nestes testes, geralmente a latência de resposta ao estímulo é reduzida com a sensibilização nociceptiva do animal.

1.2 A EPIDEMIOLOGIA DA DOR CRÔNICA

A dor crônica é uma condição que afeta a saúde física e emocional, bem como causa prejuízos econômicos e sociais. No Brasil, mais de 36% dos brasileiros convivem com a dor crônica, sendo mais prevalente em mulheres, pessoas com 50 anos, com baixo nível socioeconômico ou com sintomas depressivos (FERREIRA, 2016; HAYER et al., 2014; LIMA-COSTA et al., 2023). Nos Estados Unidos da América, a dor crônica é a principal razão pela qual as pessoas procuram assistência médica, com mais de 126 milhões de indivíduos apontando sentir algum nível de dor, e destes, 11,2% relatam conviver com a dor diariamente (NAHIN, 2015).

A dor crônica tem sido associada a uma série de condições, como a dor neuropática em diabetes, dor pós-operatória, distúrbio temporomandibular, dor em adolescentes e dor crônica de "alto impacto" (MOGIL, 2022). Além disso, a dor crônica também tem sido associada ao uso de opioides. No Brasil, das pessoas que relatam possuir dor crônica, 30% utilizam algum opioide para aliviar os sintomas (LIMA-COSTA et al., 2023).

Embora o efeito desejável com o tratamento com opioides seja a produção de analgesia, o seu uso está associado ao comprometimento tanto dos sentidos e do sistema

respiratório, como também à indução ao coma e ao risco de morte (NASCIMENTO; SAKATA, 2011; TORREÃO, 2003). Nesse sentido, a investigação de outras neurotransmissões e fármacos associados à analgesia podem ampliar as possibilidades de tratamento farmacológico, uma vez que viabilizam alternativas menos prejudiciais a saúde, como por exemplo, o tratamento utilizando a clonidina e antidepressivos (BARKIN; FAWCETT, 2000; GUAY, 2001).

1.3 AS VIAS ASCENDENTES DA DOR

As informações sensoriais dos estímulos nociceptivos são transmitidas por fibras nervosas do Sistema Nervoso Periférico. Essas fibras condutoras possuem calibre diferente umas das outras, podem ser mielinizadas ou amielínicas, bem como se diferem quanto à velocidade com que realizam a transmissão da informação. Para a mecanorrecepção, é apontado que as fibras aferentes sensoriais podem ser de quatro tipos (A- α , A- β , A- δ e fibra C). No entanto, para a nocicepção mecânica, térmica ou química, somente a fibra A- δ e a C são recrutadas (ADRIAENSEN et al., 1983; VAN HEES; GYBELS, 1981). A fibra aferente sensorial A- δ é finamente mielinizada, transmite informações nociceptivas de natureza térmica ou mecânica e é recrutada mais comumente na dor aguda, onde apresenta uma velocidade de condução que varia de 5 a 30m/s. A fibra do tipo C é mais lenta, apresenta maior participação na dor crônica e a velocidade de condução média é de 1m/s, e não apresenta bainha de mielina (ADRIAENSEN et al., 1983; VAN HEES; GYBELS, 1981; TRACEY, 2017).

Para se conectarem ao Sistema Nervoso Central (SNC), as fibras condutoras se encaminham aos gânglios espinais próximos à medula espinal, onde ficam os corpos celulares dos receptores sensoriais. Em seguida, o ramo proximal que deixa o gânglio adentra o corno dorsal da medula espinal, que fica inserida internamente na coluna vertebral (DEVOR, 1999).

Dentro do corno dorsal, a recepção das informações nociceptivas são organizadas em lâminas, que vão de I a VI (TEIXEIRA, 2009). Além disso, os neurônios presentes nessas lâminas se organizam estruturalmente e seus axônios constituem tratos que por condução ascendente transmitem as informações sensoriais, sejam inócuas ou não, em direção tanto ao tronco encefálico, quanto ao tálamo cerebral (KLAUMANN et al., 2008).

É importante destacar que cinco tratos ascendentes são os mais conhecidos - trato espinotalâmico; trato espinoreticular; trato espinomesencefálico; trato cervicotalâmico; e trato espinohipotalâmico – e cada um desempenha um papel essencial no que refere à nocicepção (KLAUMANN et al., 2008).

O **trato espinotalâmico** é uma via ascendente da nocicepção que possui axônios provenientes de neurônios nociceptivos térmicos e de amplo espectro dinâmico. Esse trato recebe aferências de neurônios das lâminas I, V e VII da medula espinal; e pelo cruzamento da linha mediana da medula espinal, ele ascende pelo quadrante anterolateral da substância branca, até encontrar o tálamo, enquanto que o **trato espinoreticular** recebe aferências de neurônios das lâminas VII e VIII, e sem cruzar totalmente a linha média da medula espinal, ascende pelo quadrante anterolateral da substância branca com destino à formação reticular e posteriormente ao tálamo cerebral (BESSION; CHAOUCH, 1987; CROSS, 1994).

O **trato cervicotalâmico** é composto por axônios provenientes do núcleo cervical lateral e recebe as informações nociceptivas das lâminas III e IV do corno dorsal. Esse trato ascende lateralmente através da substância branca nos dois segmentos cervicais superiores da medula espinal, e se encaminha ao mesencéfalo e a alguns núcleos talâmicos (HÁ, 1971).

O **trato espinohipotalâmico** transmite informações para o hipotálamo. É por meio das informações oriundas desse trato que o hipotálamo pode regular o Sistema Nervoso Autônomo e as respostas neuroendócrinas e cardiovasculares relacionadas à dor

persistente. Além disso, esse trato recebe aferências de neurônios das lâminas I, V e VIII do corno dorsal e ventral da medula espinal (KATTER et al., 1991).

O **trato espinomesencefálico** contém axônios de neurônios oriundos das lâminas I, IV, V e VI, e com participação da lâmina X e do corno ventral. Esse trato ascende no quadrante anterolateral e se projeta para a formação reticular do mesencéfalo, para a substância cinzenta periaquedutal, bem como para o núcleo parabraquial, o qual se conecta com o complexo amigdalóide (BOURNE et al., 2014). A conexão entre o núcleo parabraquial e o complexo amigdalóide parece ser importante para o processamento emocional, no qual algumas pesquisas demonstraram o papel desta estrutura cerebral na modulação da nocicepção e do medo em ratos, inclusive a partir da mediação dos receptores alfa-2 adrenérgicos (SCHULZ et al., 2002; DEYAMA et al., 2010).

1.4 O MODELO DE DOR CRÔNICA PARA ROEDORES

A dor crônica é uma condição marcada por sensações dolorosas espontâneas que afetam a qualidade de vida. Os modelos animais que reproduzem a dor crônica focam em representar algumas das propriedades dessa condição, como a constrição do nervo isquiático (BENNETT; XIE, 1988; SOMMER; SCHAFERS, 1998), ligadura parcial do nervo isquiático (SELTZER; DUBNER; SHIR, 1990), ligadura das raízes espinhais (KIM; CHUNG, 1992) e desnervação parcial do nervo (DECOSTERD; WOOLF, 2000).

O modelo de dor crônica por constrição do nervo isquiático em camundongos consiste em uma cirurgia para a exposição e amarração. O nervo isquiático pode ser encontrado próximo à fáscia entre o glúteo e bíceps femoral, na qual a sua amarração produz sensibilização da perna que passou pela cirurgia. O animal apresenta comportamento de arrastar e evitar apoiar a pata no solo. Após três dias da cirurgia já pode ser detectada a perda de fibras nociceptivas, e após 14 dias, há perda de 94% das fibras mielinizadas e 73% das fibras não mielinizadas (MUNGER et al., 1992).

1.5 AS VIAS DESCENDENTES INIBITÓRIAS DA NOCICEPÇÃO

No sistema nervoso central estão presentes algumas vias que participam da modulação descendente da nocicepção. Essas vias estão conectadas com uma série de estruturas cerebrais e possuem centros importantes para a nocicepção. O primeiro centro é situado nos núcleos ventrais da rafe e utiliza a neurotransmissão inibitória dos receptores 5-HT_{1A}, da serotonina, enquanto o segundo centro é o Locus Coeruleus, que se projeta para os neurônios das lâminas I e V do corno dorsal da medula espinal e atua por meio dos receptores alfa-2 adrenérgicos (GAMAL-ELTRABILY et al., 2021; KANDEL et al., 2014; LLORCA-TORRALBA et al., 2016).

Uma série de estruturas são apontadas pela literatura como participantes na modulação da via descendente inibitória nociceptiva, como o complexo amigdalóide, o córtex cingulado anterior, o córtex insular, hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (BOURNE; MACHADO; NAGEL; ORTIZ et al., 2007; WANG et al., 2017). A substância cinzenta periaquedutal quando estimulada produz analgesia, pelo bloqueio da resposta dos interneurônios da lâmina V do corno dorsal da medula espinal, a estímulos nocivos. Em parte, a atividade da substância cinzenta periaquedutal é mediada por neurônios serotoninérgicos na medula ventromedial rostral, contudo, neurônios gabaérgicos também estão presentes nessa estrutura e podem participar da modulação nociceptiva (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014).

1.6 REGIÕES ENCEFÁLICAS E PROCESSAMENTO NOCICEPTIVO

A substância cinzenta periaquedutal é apontada como uma estrutura mesencefálica relacionada ao processamento e à modulação tanto do medo, como da nocicepção (BANDLER, 1988; CANTO-DE-SOUZA et al., 1998). Os neurônios desta estrutura encefálica se projetam aos núcleos da rafe, na qual a função inibitória dos neurônios

serotoninérgicos se estende à medula espinal, em especial às lâminas I, II e V do corno dorsal, resultando numa inibição do disparo neuronal e, conseqüentemente, na atenuação da entrada sensorial nociceptiva (KANDEL et al., 2014).

Uma outra estrutura apontada como moduladora da recepção nociceptiva é o Locus Coeruleus. Os neurônios noradrenérgicos do Locus Coeruleus se projetam para os neurônios das lâminas I e V do corno dorsal da medula espinal, e por meio dos receptores alfa-2 adrenérgicos presentes na região, o LC participa da modulação da entrada sensorial nociceptiva através de mecanismos inibitórios de sinalização intracelular (GAMAL-ELTRABILY et al., 2021; LLORCA-TORRALBA et al., 2016).

O Locus Coeruleus (LC) é o principal centro de produção da noradrenalina encefálica, localizando-se no tronco encefálico. Essa estrutura emite projeções neuronais para praticamente todo o SNC, como o córtex cerebral, complexo amigdalóide, hipocampo e o tálamo (BENARROCH, 2009), sendo ele relacionado, também, ao funcionamento da memória de trabalho, sedação e da vasoconstrição, além de papéis na antinocicepção e na regulação da liberação pré-sináptica de neurotransmissores, tanto no encéfalo, como na medula espinal (GYIRES et al., 2009). Embora o LC seja o núcleo com maior quantidade de neurônios noradrenérgicos no tronco encefálico (núcleo A6) - contém cerca de 50% desses neurônios - existem outros núcleos noradrenérgicos (A1, A2, A3, A4, A5 e A7), onde essa divisão é válida tanto para roedores, como para primatas humanos e não-humanos (LLORCA-TORRALBA et al., 2016).

1.7 A ANSIEDADE E O MODELO ANIMAL PARA A ANSIEDADE

A ansiedade é uma emoção complexa relacionada à preocupação e à antecipação de eventos que representam ameaça aos indivíduos. Em seres humanos, essa emoção pode ser vista como normal ou patológica, na qual a normal é benéfica e auxilia no enfrentamento dos desafios diários, enquanto a patológica é prejudicial, pois impõe dificuldades ao processamento emocional. A ansiedade patológica é representada pelos transtornos ansiosos,

como o transtorno de ansiedade generalizada, transtorno obsessivo-compulsivo, fobia social, síndrome do pânico e a agorafobia, que podem alcançar a prevalência de 10% da população mundial (BAXTER et al., 2013), enquanto no Brasil, esta prevalência ultrapassa 27% (COSTA et al., 2019).

Em roedores, comportamentos semelhantes à ansiedade podem ser avaliados pela aversão natural destes animais por espaços abertos, desprotegidos e iluminados. O labirinto em cruz elevado é um teste utilizado para avaliar comportamentos de medo incondicionado e ansiedade, no qual o tempo e a frequência nos espaços abertos e fechados, ou protegidos e desprotegidos, são considerados como alguns dos indicadores para respostas ansiogênicas ou ansiolíticas nos animais. Outros comportamentos também podem ser investigados com relação à ansiedade neste teste, como os comportamentos exploratórios e de avaliação de risco: mergulho de cabeça, esticar e levantar (LISTER, 1987; RODGERS; JOHNSON, 1995).

1.8 RECEPTORES ADRENÉRGICOS

O sistema de receptores da adrenalina/noradrenalina pode ser dividido em duas classes, alfa (α) e beta (β), e ainda em subclasses, $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$ e $\alpha 2Dm$ e $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ (BYLUND, 1994). Os receptores adrenérgicos utilizam diferentes tipos de proteínas de guanosina (proteína G) para produzir alterações no meio intracelular. Por exemplo, o receptor alfa-1A, é mediado pela proteína de guanosina do tipo q (proteína Gq). Essa proteína ativa fosfolipase C, que degrada a fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂). Dessa degradação, são formados trifosfato de inositol (IP₃) e o diacilglicerol (DAG), que exercem suas ações estimulando a transdução de sinal no meio intra-celular (LLORCA-TORRALBA et al., 2016). O receptor alfa-2 atua pela mediação da proteína de guanosina inibitória (proteína Gi), que tem o papel de inibir a atividade da proteína de membrana adenilato ciclase, que quando ativa, converte adenosina trifosfato (ATP) em adenosina

monofosfato cíclica (AMPC). A inibição da adenilato ciclase reduz a sinalização intracelular, resultando na alteração da atividade de canais iônicos que estão diretamente ligados à modulação da excitação neuronal e das sinapses (LLORCA-TORRALBA et al., 2016).

Algumas pesquisas apontam o papel modulatório dos receptores alfa-2 adrenérgicos em diversas regiões do SNC, como no córtex cerebral, na substância cinzenta periaquedutal, no complexo amigdalóide, nos núcleos da rafe, no tálamo, no hipotálamo, em neurônios do corno dorsal da medula espinal, no LC (PERTOVAARA, 2006), no córtex pré-límbico (WU et al., 2019), no núcleo da estria terminal (SCHWEIMER et al., 2005), sendo que a expressão de RNA mensageiro e a densidade dos receptores alfa-2 adrenérgicos em diversas regiões cerebrais já foi quantificada por um estudo anterior (SCHEININ et al., 1998).

A relação entre o sistema adrenérgico e sua função modulatória pode acontecer tanto pela ação na projeção noradrenérgica, onde os autorreceptores alfa-2 adrenérgicos atuam na regulação da secreção de adrenalina/noradrenalina, como pela ação em neurônios não-adrenérgicos por heterorreceptores alfa-2 adrenérgicos (GYIRES et al., 2009; LLORCA-TORRALBA et al., 2016).

Existem evidências que os receptores alfa-2 adrenérgicos participam da regulação das sinapses de neurônios do córtex cingulado anterior (KOGA et al., 2020). Essa estrutura é importante para o processamento consciente dos sentimentos em humanos, bem como é apontada como uma estrutura relacionada à preocupação empática, como a compaixão e a afetividade em relação ao sofrimento do outro (MOYA-ALBIOL et al., 2010).

1.9 CÓRTEX CINGULADO ANTERIOR (CCA)

O CCA compõe parte do córtex cingulado, localizado ao redor do corpo caloso, e é parte importante do sistema límbico. Citoarquiteturalmente, o CCA é composto por neurônios piramidais predominantemente da camada V do córtex cerebral, e em menor presença nas camadas III e IV. Além disso, o CCA apresenta as divisões 23, 24, 25 32 e 33,

que também podem ser subdivididas, devido às suas distintas morfologias (KRIEGHOFF et al., 2011).

O córtex cingulado é dividido em quatro regiões anatomofuncionais distintas: córtex cingulado anterior subgenual (sACC), córtex cingulado anterior pré-genual (pACC), córtex cingulado médio (MCC) e córtex cingulado posterior (PCC). Convém ressaltar que o sACC apresenta um papel mais proeminente quanto ao processamento afetivo-emocional desagradável, além de possuir conexões diretas com o núcleo central da amígdala, com o núcleo parabraquial e com a SCP (VOGT, 2005). Em camundongos, o CCA (Figura 1) é dividido em duas regiões, Cg1 e Cg2. Cg1 é a porção superior e a Cg2 é a inferior (PAXINOS; FRANKIN, 2001).

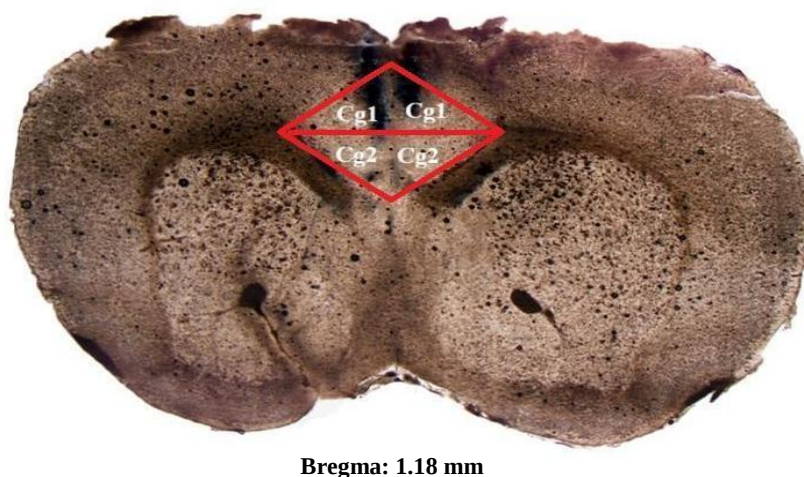


Figura 1 - Corte coronal do CCA de camundongo (**Fonte:** o próprio autor).

Além disso, o CCA recebe projeções noradrenérgicas do Locus Coeruleus e algumas evidências apontam o seu papel na modulação da nocicepção (WANG et al., 2017). O CCA também apresenta conexões neuronais com o núcleo accumbens (nAC), sendo essa rota neuronal relacionada à modulação da transferência social da dor. A inibição das fibras neuronais originadas no CCA que fazem conexões com o nAC atenua a transferência social para a dor, enquanto a ativação acentua essa transferência, efeitos que podem perdurar por mais de 48 horas (SMITH et al., 2021). Outro estudo demonstrou o papel do CCA na modulação da dor, no qual a administração de um agonista dos receptores alfa-2

adrenérgicos presentes nesta estrutura cerebral reduziu a sensibilidade nociceptiva de camundongos machos expostos ao teste de von Frey (WANG et al., 2017).

Em relação ao papel do CCA na modulação da ansiedade, a inibição desta estrutura com cloreto de cobalto (CoCl_2 , um bloqueador sináptico) resultou na diminuição das respostas tipo-ansiedade em camundongos machos expostos ao LCE no contágio emocional para a dor crônica (BENASSI-CEZAR et al., 2021). Embora o cloreto de cobalto atue predominantemente em neurônios glutamatérgicos e especificamente em neurotransmissões vesiculares, este achado aponta um importante o papel para o CCA na modulação da ansiedade. Nesse sentido, a investigação por outras neurotransmissões presentes nesta estrutura cerebral elucidaria com mais profundidade o seu papel tanto na modulação da nocicepção, como da ansiedade.

1.10 RECEPTORES ALFA-2 ADRENÉRGICOS E A NOCICEPÇÃO

Evidências sugerem que os receptores alfa-2 adrenérgicos podem modular a nocicepção. Neste sentido, foi demonstrado que a administração no núcleo magno da rafe de clonidina (7,5 μg , agonista alfa-2 adrenérgico) produziu efeito hipoalgésico em ratas Sprague-Dawley, enquanto o antagonista alfa-2 adrenérgico, ioimbina (3 μg ,) produziu hiperalgesia. O núcleo magno da rafe apresenta conexões descendentes inibitórias com a medula espinal e parece modular a entrada sensorial nociceptiva no corno dorsal medular, embora este efeito inibitório possa ser atenuado por projeções neuronais inibitórias de outras estruturas encefálicas, resultando em aumento geral da reatividade à nocicepção (SAGEN; PROUDFIT, 1985).

Outros trabalhos demonstraram que a clonidina intra-amídala e intra-CCA (0,5, 1,25 e 5 μg) produziu efeito antinociceptivo térmico (ORTIZ et al., 2007; WANG et al., 2017). Além disso, as pesquisas mostraram que independentemente da via de administração ou do antagonista utilizado, o efeito antinociceptivo da clonidina poderia ser bloqueado. Desta

forma, o bloqueio foi demonstrado com ioimbina (2mg/kg, i.p., ORTIZ et al., 2007; 25 µg/kg, intratecalmente, MAKAU et al., 2014), ou BRL-44408 (antagonista seletivo dos receptores α -2 adrenérgicos, intra-CCA, 0,5 e 10 µg/µl, WANG et al., 2017). Em conjunto, esses resultados sugerem que a ioimbina pode tanto alterar as respostas nociceptivas de roedores, como também reverter o efeito de agonistas dos receptores alfa-2 adrenérgicos.

1.11 ANSIEDADE RELACIONADA AOS RECEPTORES ALFA-2 ADRENÉRGICOS

Existem evidências que os receptores alfa-2 adrenérgicos presentes tanto no núcleo leito da estria terminal, quanto córtex pré-límbico, podem modular os comportamentos semelhantes à ansiedade de roedores (SCHWEIMER et al., 2005; WU et al., 2019). Além disso, o complexo amigdalóide parece estar envolvido na modulação da ansiedade, particularmente por sua conexão com o CCA (KRIEGHOFF et al., 2011; SMITH et al., 2021). Um estudo aponta papel ansiolítico para a administração em dose baixa da clonidina (agonista alfa-2 adrenérgico, 0,03 mg/kg, ip) em camundongos fêmeas avaliadas na caixa claro-escuro (ÂNGELIS, 1994). Enquanto camundongos de ambos os sexos sem a expressão dos receptores alfa-2 adrenérgicos apresentam aumento de comportamentos ansiosos quando avaliados no labirinto em cruz elevado, no teste de enterrar esferas e no campo aberto (LÄHDESMÄKI et al, 2002).

Estas evidências sugerem o papel dos receptores alfa-2 adrenérgicos na modulação da ansiedade, e considerando a densidade expressiva dos receptores alfa-2 adrenérgicos no CCA, bem como em outras estruturas apontadas como importantes para a modulação da ansiedade (SCHWEIMER et al., 2005; SMITH et al., 2021; WU et al., 2019), se faz necessária a investigação do seu papel no modelo de empatia para a dor em camundongos machos e fêmeas.

1.12 AS CONCEPÇÕES SOBRE A EMPATIA

A empatia tem sido estudada por diversas áreas do conhecimento, incluindo a filosofia, psicologia e a neurociência. As definições sobre este fenômeno são distintas e nem sempre há concordância entre os termos usados, contudo, o termo *Einfühlung* foi inicialmente utilizado para descrever a empatia, que se traduz em “sentir em”, referindo a um fenômeno de projeção de si-mesmo em um sentimento de alguém. Outras definições sobre a empatia a definem como “colocar-se no lugar do outro” e “projetar-se imaginativamente na situação do outro”, bem como em empatia cognitiva ou empatia emocional (PRESTON; DE WAAL, 2002).

A empatia cognitiva é referida como uma capacidade de inferência dos sentimentos ou da elaboração do estado mental de outros (EISENBERG; MURPHY; SHEPARD, 1997; SHAMAY-TSOORY, 2011), enquanto a empatia emocional consiste na correspondência de comportamentos entre coespecíficos, na qual a percepção emocional em alguém leva à ativação de representações próprias para o comportamento percebido (MEHABIAN; EPSTEIN, 1972; PRESTON; DE WAAL, 2002).

Em parte, a empatia cognitiva parece se relacionar com a *Teoria da Mente*, definida como a capacidade de se colocar no lugar de alguém, de entender seus objetivos, emoções e pensamentos. São propostas uma série de estruturas cerebrais envolvidas no processo de mentalizar a perspectiva do outro, como o córtex pré-frontal e junção temporoparietal. Além disso, esta teoria também se divide em *Teoria da Mente Afetiva* e *Teoria da Mente Cognitiva*, e se referem, respectivamente, à inferência sobre as emoções e à inferência sobre as intenções e crenças de outros (SHAMAY-TSOORY, 2011).

Um modelo amplamente discutido referente à definição da empatia é o Modelo de Percepção-Ação. Este modelo é marcado por teorias comportamentais, fisiológicas e da neurociência que foram desenvolvidas durante décadas, e inclui o contágio emocional, simpatia, empatia cognitiva e o comportamento de ajuda, em uma série de teorias e

evidências organizadas no componente motor e no componente emocional do comportamento empático (PRESTON; DE WAAL, 2002).

A evidência motora do Modelo de Percepção-Ação da empatia é apoiada em grande parte por estudos da psicologia cognitiva, que demonstraram a ativação de algumas áreas cerebrais, como o pré-frontal, parietal inferior, área pré-motora, córtex somatossensorial e cerebelar, em momentos de execução de tarefas de movimentação própria, observada em outra pessoa ou ainda imaginadas (PRESTON; DE WAAL, 2002). Em síntese, essas evidências apontam que as representações para a percepção e a ação compartilham circuitos neuronais comuns, ainda que a motivação para os comportamentos seja diferente (PRESTON; DE WAAL, 2002).

A evidência emocional do Modelo de Percepção-Ação reúne estudos envolvendo comportamento de seres humanos e não-humanos, bem como evidências da neurociência e as relacionadas às desordens empáticas. Alguns pesquisadores justificam as evidências do comportamento empático em seres não-humanos por experimentos conduzidos com chimpanzés, ratos e pombos, no qual os animais pressionavam a barra/alavanca mais rapidamente para cessar o sofrimento do seu coespecífico (MIRSKY et al., 1958; RICE; GAINER, 1962; WATANABE; ONO, 1986). Outras evidências apontam o envolvimento de neurônios-espelho em comportamentos empáticos, onde primatas apresentam a ativação de destes neurônios no córtex cerebral ao observar um coespecífico em perigo (PRESTON; DE WAAL, 2002), o que sugere um compartilhamento de redes neuronais a partir de uma correspondência emocional entre parceiros. Os neurônios-espelho podem ser encontrados no córtex intra-parietal, cíngulo anterior, córtex pré-motor e no córtex pré-frontal, e são ativados quando ações motoras de um coespecífico da espécie são observadas, reforçando a evidência motora da empatia (PRESTON; DE WAAL, 2002; SHAMAY-TSOORY, 2011).

Evidências da empatia em seres humanos podem ser inicialmente descritas por comportamentos de bebês. É conhecido que bebês recém-nascidos apresentam a capacidade de imitação do medo e da tristeza, bem como apresentam resposta à angústia (DE WALL, 1989; FIELD et al., 1982). Nesse sentido, cabe apontar que o córtex pré-frontal é uma estrutura relevante para a regulação de expressões emocionais, sendo que lesões nessa estrutura cerebral resultam em comportamentos de imitação compulsiva e expressão desmedida (PRESTON; DE WAAL, 2002), enquanto o córtex somatossensorial parece ser necessário para reconhecimento de emoções (ADOLPHS et al., 1997; 2000; GOTTMAN; LEVENSON, 1985). Além disso, o córtex cingulado anterior pode estar relacionado à antecipação de respostas aversivas (HUTCHISON et al., 1999). Tomadas em conjunto, estas evidências apontam para uma capacidade de seres humanos e não-humanos em identificar emoções e preparar o organismo para respostas adequadas às condições de compartilhamento emocional.

A empatia também tem sido investigada para compreender transtornos psicológicos caracterizados por prejuízos envolvendo a expressão e compreensão das emoções, como a psicopatia, o autismo e o transtorno de personalidade borderline (PRESTON; DE WAAL, 2002; SHAMAY-TSOORY, 2011). Nessas condições, indivíduos apresentam prejuízos na capacidade de entender o sofrimento de coespecíficos, assim como de aprender sobre o estado emocional de alguém (PRESTON; DE WAAL, 2002), o que torna a investigação de comportamentos empáticos importante para elucidar com mais especificidade os mecanismos relacionados à empatia, ao mesmo tempo em que contribui para a compreensão dos transtornos marcados pelo comprometimento desta capacidade.

1.13 A EMPATIA EM ROEDORES

Evidências sugerem que os roedores apresentam comportamentos empáticos, na qual a convivência entre coespecíficos permite o compartilhamento emocional. Este fenômeno,

chamado de contágio emocional, é largamente investigado pela literatura e contrapõe a ideia que o comportamento empático é exclusivo de seres humanos.

O contágio emocional em roedores é investigado por diversos modelos em diferentes contextos metodológicos, porém a sua característica principal é a convivência entre coespecífico (LAVIOLA et al., 2021; LECKER et al., 2021). Uma série de pesquisas abordam modelos de contágio emocional conjuntamente com outros para simular um contexto empatogênico (LAVIOLA et al., 2021; LECKER et al., 2021), como exemplo, a convivência em duplas ou quartetos com um demonstrador de um modelo de dor crônica (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2018; BRANDÃO-DE-SOUZA et al., 2023) ou de estresse crônico (BARTAL et al., 2011; SILVEIRA et al., 2023). Nestes estudos, parte-se do pressuposto que a convivência entre os roedores produz uma transferência emocional dos demonstradores para os observadores, que se traduz em alterações comportamentais.

Langford et al. (2006) foram referências na investigação do contágio emocional em roedores. A pesquisa avaliou a influência da familiaridade entre camundongos na emissão de respostas nociceptivas ao observar o seu parceiro em dor, na qual a convivência produziu hipernocicepção quando comparado com o grupo que não passou o tempo junto na mesma gaiola. Evidências também apontam que os sentidos podem influenciar a transferência emocional, onde a visão, a audição, o olfato e o contato físico demonstraram impactar o contágio emocional quando são bloqueados (BARROSSO et al., 2019; LANGFORD et al., 2006; LECKER et al., 2021; ZHOU et al., 2022).

Além do contágio emocional, o comportamento pró-social é investigado para reproduzir o comportamento empático na pesquisa experimental, na qual a resposta de auxílio a um coespecífico submetido a uma condição aversiva é avaliada para determinar a ocorrência da transferência emocional pela convivência, como por exemplo através da liberação de um coespecífico enjaulado (BARTAL et al., 2011). Além do mais, foi

observado que os roedores libertam com mais rapidez o companheiro de gaiola, mesmo sem contato social, e ainda compartilham seus alimentos, sugerindo uma evidência de comportamento pró-social entre roedores (BARTAL et al., 2011).

Estudos do grupo de pesquisa em Psicobiologia da UFSCar vem investigando o modelo de empatia para a dor em camundongos. Os trabalhos têm utilizado um protocolo de convivência de 28 dias, onde no 1º dia de convivência os camundongos são alojados em duplas ou quartetos. No 14º dia, um camundongo é selecionado como demonstrador de um modelo de dor crônica, pela constrição do nervo isquiático, ou um demonstrador Sham (controle). No 28º dia do protocolo, os animais são avaliados por testes comportamentais e nociceptivos. Os resultados destes trabalhos têm demonstrado que a convivência em dupla ou quarteto com um camundongo demonstrador de dor crônica produz hipernocicepção e aumento de comportamentos tipo-ansiedade (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2022; BRANDÃO-DE-SOUZA et al., 2023; TAVARES et al., 2021; ZANIBONI et al., 2018).

Além disso, o grupo de pesquisa em Psicobiologia da UFSCar também demonstrou que uma série de estruturas encefálicas, como o complexo amigdalóide, o córtex cingulado anterior e a ínsula, como também as neurotransmissões serotoninérgica, gabaérgica e endocanabinóide, estão envolvidas na modulação da nocicepção e da ansiedade no fenômeno de contágio emocional (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2022; BRANDÃO-DE-SOUZA et al., 2023; TAVARES et al., 2021; ZANIBONI et al., 2018).

Seguindo o trajeto do grupo de pesquisa, e considerando que a neurotransmissão noradrenérgica, através dos receptores alfa-2 adrenérgicos, participam da modulação do sistema descendente inibitório nociceptivo e da ansiedade, bem como que estão expressos em alta densidade no córtex cingulado anterior (SCHWEIMER et al., 2005; WU et al., 2019;

KRIEGHOFF et al., 2011; SMITH et al., 2021; SCHEININ et al., 1998; GAMAL-ELTRABILY et al., 2021; LLORCA-TORRALBA et al., 2016), se faz necessária a investigação do papel desta neurotransmissão presente no córtex cingulado anterior de camundongos no modelo de empatia para dor crônica.

1.14 A INVESTIGAÇÃO DE ROEDORES FÊMEAS NA PESQUISA EXPERIMENTAL

Enquanto as mulheres apresentam maior prevalência de dor crônica (LEÃO-FERREIRA et al., 2016), a pesquisa pré-clínica utilizou com exclusividade o roedor macho. De 1996 a 2005, a maioria das publicações de pesquisa referente à dor optou por ratos ou camundongos machos, ou mesmo não mencionaram os sexos em suas pesquisas (MOGIL, 2022). Um dos principais argumentos a favor da exclusão dos roedores fêmeas é a alta variabilidade entre sujeitos decorrente do ciclo estral. Essa exclusão gerou uma sub-representação dos roedores fêmeas na pesquisa experimental, impondo vieses à compreensão das informações apresentadas nos trabalhos que investigaram à dor. Contudo, embora o ciclo estral influencie os mecanismos biológicos da nocicepção, estas diferenças não aumentam a variabilidade no comportamento investigado, pelo menos não mais que o observado em roedores machos, que apresentam maior variabilidade entre os sujeitos do grupo, comparados com as fêmeas (MOGIL, 2022). Outras evidências mostraram ausência de diferenças entre roedores fêmeas intactas, ovariectomizadas e hamsters machos, mesmo quando as fêmeas foram agrupadas nas diferentes fases do ciclo estral (MOSHOFISKY, 2017).

Considerando as informações apresentadas sobre o número reduzido de estudos utilizando roedores fêmeas, e o aumento de solicitações da comunidade científica para ampliar o conhecimento sobre o comportamento das fêmeas, nesta pesquisa ambos os sexos foram utilizados.

1.15 HIPÓTESES

A dor crônica pode gerar aumento de angústia em quem passa por esta condição e também em quem convive com estas pessoas (IZZO et al., 2019; KRIKORIAN et al., 2010). A empatia neste contexto favorece o compartilhamento de emoções de diversas naturezas, que são importantes para o comportamento de grupo e para a conservação de relações interpessoais, que evolutivamente serviu para preservar a espécie humana, uma vez que o auxílio a um coespecífico de espécie produz condições mais favoráveis para a sobrevivência (PRESTON; DE WAAL, 2002; SHAMAY-TSOORY, 2011).

A empatia tem sido investigada no contexto da pesquisa experimental para demarcar as propriedades deste fenômeno e a sua base neurobiológica, que pode estar alterada em alguns transtornos psicológicos (SHAMAY-TSOORY, 2011). Adicionalmente, a investigação das neurotransmissões envolvidas na neurobiologia destes transtornos pode auxiliar na compreensão e na intervenção para estes contextos.

A investigação da empatia em roedores é uma maneira de reproduzir esse comportamento sob as condições de controle experimental, sendo a empatia para a dor crônica em camundongos um modo de investigar o compartilhamento emocional entre coespecíficos de espécie (LANGFORD et al., 2006). A convivência em duplas com demonstradores do modelo de dor crônica pela constrição do nervo isquiático produz aumento da nocicepção e da ansiedade em camundongos observadores (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2022). Neste estudo, uma implementação metodológica foi utilizada, baseando-se em estudo anterior que apontou que a convivência em quartetos com camundongos demonstradores de dor crônica também produz aumento da nocicepção e da ansiedade em camundongos observadores (BRANDÃO-DE-SOUZA et al., 2023), sendo esperado a reprodução deste resultado também neste estudo.

O CCA é apontado como uma estrutura que participa da modulação da empatia para a dor crônica, e a sua inibição com cloreto de cobalto produz efeitos tipo-ansiolíticos em camundongos machos expostos ao LCE (BENASSI-CEZAR et al., 2021). Além do mais, outros estudos apontam o papel do córtex cingulado anterior na modulação da nocicepção e da ansiedade (WANG et al., 2017; WU et al., 2019). Em conjunto, estas pesquisas sugerem o cingulado anterior como uma estrutura encefálica importante para a modulação de comportamentos tipo-empatia, bem como as respostas nociceptivas e as semelhantes à ansiedade. Adicionalmente, o CCA apresenta alta densidade de receptores alfa-2 adrenérgicos, e estes receptores também estão diretamente implicados na modulação da ansiedade e da nocicepção, através da utilização de agonistas e antagonistas (SCHEININ et al., 1998; SCHWEIMER et al., 2005; WANG et al., 2017; WU et al., 2019), sendo esperado, no presente estudo, que o agonista alfa-2 adrenérgico produza redução da hipernocicepção e do aumento da ansiedade, decorrente do convívio com o camundongo demonstrador de dor crônica, enquanto que o antagonista seja inefetivo para produzir alterações nas respostas comportamentais investigadas, porém quando administrado combinado com o agonista, ele seja efetivo para bloquear os receptores alfa-2 adrenérgicos e reverter seus efeitos nos comportamentos investigados, no modelo de empatia para a dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação da neurotransmissão alfa-2 adrenérgica do córtex cingulado anterior na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos machos e fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das injeções combinadas de ioimbina e clonidina, no córtex cingulado anterior, na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.
- Avaliar o efeito das injeções combinadas de ioimbina e clonidina, no córtex cingulado anterior, na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 211 camundongos da linhagem suíço albino (96 machos e 115 fêmeas), com três semanas de vida, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Estes camundongos foram alojados no biotério setorial do Laboratório de Psicologia da Aprendizagem (LPA), agrupados em gaiolas coletivas (41 x 34 x 16 cm, 4 por gaiola) e mantidos em condições de temperatura ($24^{\circ}\text{C} \pm 1$) e luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas), e com livre acesso ao alimento e água, com exceção dos momentos experimentais.

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEUA/UFSCar (CEUA N° 8413010823), obedecendo às diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 FÁRMACOS

Para o tratamento sistêmico, foram utilizados:

- Cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p., anestésico; Syntec, Brasil); xilazina (10 mg/Kg, i.p., relaxante muscular; Vetbrands, Brasil); cetoprofeno (5 mg/kg, i.p., antiinflamatório).

Para o tratamento intra-CCA foram utilizados:

- Clonidina (N -(2,6-diclorofenil)-4,5-di-hidro-1 H -imidazol-2-amina), agonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, PM (230,093 g, Cayman Chemical) 8 $\mu\text{g}/0,1\mu\text{L}$, dissolvida em salina (0,9% NaCl);
- Ioimbina (Éster metílico do ácido 17 α -hidroxi-ioimban-16 α - carboxílico), antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, PM (354,43 g, Cayman Chemical), 0,05 $\mu\text{g}/0,1\mu\text{L}$, dissolvida em salina (0,9% NaCl).

As doses foram baseadas em estudos prévios da literatura (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015, 2022; GARBER et al., 2011; MOLLACE et al., 1990; ORTIZ et al., 2007; STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014).

3.3. CONSTRIÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO

O método utilizado para reproduzir o modelo de dor crônica (BENNETT; XIE, 1988), foi modificado para camundongos (SOMMER; SCHAFERS, 1998). Para exposição do nervo isquiático direito próximo à sua trifurcação, os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.), e foi realizada uma cirurgia com secção da fáscia entre o glúteo e bíceps femural. Após o corte do tecido próximo ao nervo, a uma distância aproximada de 8 mm, a compressão do nervo foi realizada através de três amarrações com fio estéril não reabsorvível e não inflamatório mononylon 6.0.

A constrição do nervo isquiático produz nos animais comportamentos de lambar, sacudir a pata lesionada, e mancar da pata traseira ipsilateral, evitando colocar peso no lado lesionado.

Foi demonstrado sinais de alodinia mecânica, térmica e hiperalgesia térmica em ratos com lesão da pata, após dois dias de cirurgia (BENNETT; XIE, 1988). Após três dias da cirurgia ocorre perda das fibras A β , A δ e C (89%, 87% e 32%, respectivamente), e após 14 dias perda de 94% das fibras mielinizadas e 73% das fibras não mielinizadas (MUNGER et al, 1992). Além disso, para avaliar a nocicepção crônica, foi utilizado o teste da placa quente (BENNETT; XIE, 1988; LIU, et al, 2002; NITANDA, et al, 2005).

3.4 AVALIAÇÃO SENSORIAL BASAL

O registro da resposta sensorial anterior ao procedimento cirúrgico de constrição do nervo isquiático ou cirurgia sham foi realizada para verificar a sensibilidade do animal à dor

em condições normais, sem a reprodução do modelo de dor. Para isto, foi utilizado o teste da placa quente (KURAISHI et al., 1983; LIU et al., 2002).

3.5 TESTE DA PLACA QUENTE

O teste consiste em colocar o camundongo sobre uma chapa metálica aquecida a 52°C (LIU et al., 2002), até reagir ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lamber as patas. O tempo máximo de 30 segundos de permanência do camundongo sobre a placa quente, foi utilizado para evitar lesão nas patas (KURAISHI et al., 1983).

O teste é empregado para avaliar a efetividade da cirurgia de constrição do nervo isquiático.



Figura 2 - Placa quente.

3.6 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (100 mg/Kg e 10 mg/kg, i.p.), e posteriormente realizou-se a cirurgia para implantação bilateral no córtex cingulado anterior das cânulas-guia (25-gauge), 7 mm de comprimento, que foram fixadas no crânio por uma prótese de resina acrílica autopolimerizável. As coordenadas estereotáticas utilizadas foram as seguintes: anteroposterior = +0,7 mm, lateral = $\pm 0,3$ mm e dorsoventral = -1 mm, em relação ao bregma (PAXINOS; FRANKLIN (2001)).

Foi introduzido em cada cânula-guia um mandril de aço inoxidável para evitar problemas com obstrução, entupimento e reduzir a contaminação. O mandril foi removido durante o procedimento de microinjeção (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).

Ao final da cirurgia, os animais receberam injeções de cetoprofeno (5 mg/kg, s.c., analgésico) (GARBER et al., 2011) e ceftriaxona (4 mg/kg, i.m., antibiótico) (STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2014), para evitar possíveis infecções. Os animais permaneceram em recuperação por 4 dias após a cirurgia, antes do início dos experimentos (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).



Figura 3 - Estereotaxia do CCA de camundongo.

3.7 MICROINJEÇÃO

No dia do teste, a agulha de injeção (25-gauge) foi inserida dentro da cânula-guia, ultrapassando em 0,45 mm o comprimento da ponta da cânula-guia. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubo de polietileno (PE-10) a microsseringa Hamilton (5µL) que foi posicionada em uma bomba de microinjeção digital (BI2000 Insight Equipamentos) programada para injetar 0,1µL de solução durante um período de 60 segundos.

O procedimento de microinjeção no córtex cingulado anterior consistiu em remoção do mandril, inserção da agulha de microinjeção, injeção das soluções por 60 segundos, e permanência da agulha no sítio de injeção por 90 segundos para evitar possível refluxo da solução. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante e depois da injeção das soluções confirmaram o fluxo da solução (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000).



Figura 4 - Bomba de microinjeção.

3.8 TESTE NOCICEPTIVO

Para medir a nocicepção, foi utilizado o teste de contorções abdominais (VANDER WENDE; MARGOLIN, 1956). As contorções foram induzidas pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético a 0,6% (10 ml/kg) (VANDER WENDE; MARGOLIN, 1956; LANGFORD et al., 2006; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015).

Os animais permaneceram na caixa com os coespecíficos, após a injeção do ácido, até o início das contorções abdominais (máximo 5 minutos), e em seguida foram transportados na caixa com o parceiro com dor crônica ou sham, para a sala de testes. O teste de contorções foi filmado durante 5 minutos por uma câmera acoplada a um computador que estava na sala adjacente à sala de teste. Os sujeitos que não contorceram no período de 5 minutos antes do teste foram excluídos do estudo (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015).



Figura 5 - Contorção abdominal.

LABIRINTO EM CRUZ EM ELEVADO (LCE)

O labirinto em cruz elevado foi utilizado para avaliar comportamentos semelhantes à ansiedade em roedores. Este aparato é composto por dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) unidos ortogonalmente a dois braços fechados com paredes transparentes (30 x 5 x 15 cm), elevados a 38,5 cm do chão por um suporte de madeira (LISTER, 1987).

Os seguintes comportamentos foram registrados e avaliados: a frequência total de entradas nos braços abertos e fechados (é considerado uma entrada quando o camundongo coloca as quatro patas dentro de um dos braços e saída quando ele coloca duas patas para fora do braço), a porcentagem de entrada nos braços abertos $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$ e do tempo gasto no braço aberto; os tempos de permanência nos braços fechados e na parte central do labirinto $[(\text{tempo}/300) \times 100]$ (LISTER, 1987). Outros parâmetros comportamentais analisados foram: as frequências de mergulhos (movimento exploratório com a cabeça/ombros para fora dos braços abertos) e esticar (stretched attend – SAP: postura exploratória caracterizada pelo corpo do animal estendido para frente, depois retrai à posição original sem locomoção, resposta associada à avaliação de risco) e imobilidade. Os braços fechados e o centro foram considerados áreas protegidas do labirinto (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).

O teste foi gravado por uma filmadora conectada a um computador em uma sala adjacente. A avaliação das medidas comportamentais aconteceu pela observação das gravações, bem como pela utilização de um programa de análise comportamental X-Plo-Rat 3.0 (GARCIA et al., 2005).



Figura 6 - Labirinto em cruz Elevado.

3.10 HISTOLOGIA

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p.) e receberam injeção de 0,1μL de solução de 1% de azul de metileno, de acordo com o procedimento descrito anteriormente para administração central de fármacos. Posteriormente os animais foram eutanasiados em uma câmara de CO₂. Seus encéfalos foram removidos e fixados em solução de formalina (10%) por 24h e em sacarose por 48h. Com o uso do micrótomo (Leica CM1850), cada encéfalo foi seccionado em sentido coronal, e com base na cânula-guia. Essas secções foram analisadas utilizando um microscópio óptico (Olympus BX41TF), observando a indicação do corante azul de metileno e o local onde foi aplicada a injeção (PAXINOS; FRANKLIN, 2001).

3.11 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Posteriormente ao nascimento e desmame (21 dias), os animais foram alojados em quartetos por 14 dias, para estabelecimento de familiaridade, formando dois grupos para os experimentos:

Grupo Constrição do Nervo Isquiático (CNC) - após 14 dias de convivência um dos animais do quarteto foi submetido à cirurgia da constrição do nervo isquiático.

Grupo Sham - após 14 dias de convivência, um dos animais do quarteto foi submetido a uma cirurgia semelhante à constrição do nervo isquiático (item 3.3), com exposição, mas sem o procedimento de constrição do nervo. Esses grupos participaram dos experimentos descritos abaixo.

3.11.1. Experimento 1A. Avaliar o efeito da injeção combinada intra-CCA de ioimbina seguida de clonidina na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.

Após o período de desmame, os animais foram alojados em quartetos em caixa-moradia e mantidos no biotério setorial do LPA por 14 dias para estabelecer familiaridade (LANGFORD et al., 2006). Após 14 dias de convivência, um dos animais, tanto no grupo CNC, quanto Sham, foi submetido à cirurgia da constrição do nervo isquiático ou à cirurgia Sham e retornou à caixa-moradia. No 24º dia de convivência, os animais observadores dos grupos CNC (Ob-CNC) ou Sham (Ob-Sham) foram submetidos à cirurgia estereotóxica para implantação das cânulas-guia no CCA. No 26º, 27º e 28º dia do protocolo de convivência, foi introduzida uma divisória na caixa-moradia por 15 minutos, para produzir habituação e viabilizar o teste de contorções abdominais nos camundongos Ob-CNC e Ob-Sham. Após 4 dias de recuperação da cirurgia de estereotaxia, no 28º dia de convivência, os camundongos Ob-CNC e Ob-Sham receberam microinjeção de Salina/Salina, Salina/clonidina (8 µg/0,1µL), ioimbina (0,05 µg/0,1µL)/Salina, ioimbina (0,05 µg/0,1µL)/clonidina (8 µg/0,1µL), e depois de 5 minutos, foram submetidos ao LCE e posteriormente ao teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Além disso, tanto as respostas semelhantes à ansiedade, quanto contorções abdominais foram registradas por 5 minutos por meio de uma filmadora.

O teste da placa quente foi utilizado para avaliar a resposta sensorial basal dos camundongos demonstradores no 14º dia do protocolo, bem como a efetividade da cirurgia nos animais CNC e Sham, no 28º dia, após o término dos experimentos.

Ao final dos experimentos, os animais observadores (Ob-CNC e Ob-Sham) foram eutanasiados e os encéfalos retirados para a observação histológica.

Na figura 7, observamos o delineamento experimental do experimento 1A e 1B.

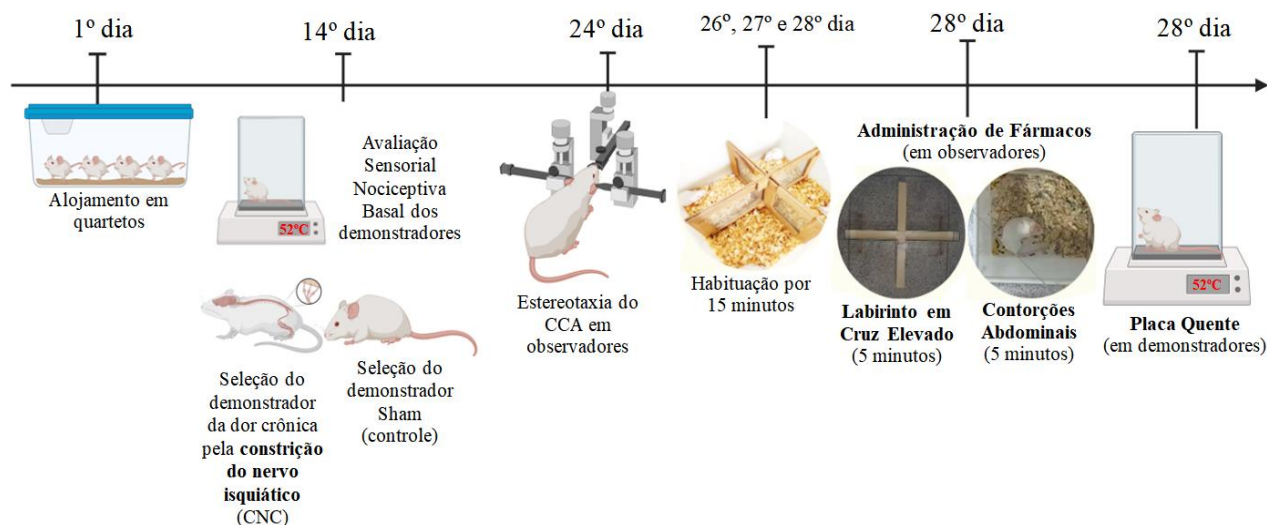


Figura 7. Delineamento do experimento 1A e 1B. (Fonte: o próprio autor).

3.11.2. Experimento 1B. Avaliar o efeito da injeção combinada intra-CCA de ioimbina seguida de clonidina na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.

Procedimento semelhante ao Experimento 1A, exceto que neste experimento foram utilizados camundongos fêmeas.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM). Nesta pesquisa, utilizou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk, adotando como critério $p < 0,05$ para estabelecer se a distribuição de dados amostrais para cada variável seguia uma distribuição normal.

Os resultados dos camundongos observadores (Ob-Sham e Ob-CNC) submetidos ao teste de contorções abdominais e ao LCE foram analisados pela ANOVA de três vias (Fator 1: convívio, Fator 2: pré-tratamento, Fator 3: tratamento). Os casos de significância foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Os resultados dos camundongos Sham e CNC expostos à placa quente foram analisados pela ANOVA de uma via com medidas repetidas. Os casos de significância foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

Os valores de P menor ou igual a 0,05 foram considerados como significativos.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DA HIPERALGESIA INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO DO NERVO ISQUIÁTICO NOS CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS AVALIADOS NO TESTE DE PLACA QUENTE.

Para avaliar a sensibilidade nociceptiva e a efetividade da cirurgia de constrição do nervo isquiático, realizamos o teste da placa quente antes da realização do procedimento cirúrgico nos demonstradores sham e CNC (avaliação nociceptiva basal, 14º dia), e no último dia dos experimentos (avaliação nociceptiva final, após a constrição do nervo isquiático, 28º dia). Nesse procedimento, foram utilizados 38 camundongos machos [sham (n= 19), e CNC (n= 19)] (Figura 8A); e 45 camundongos fêmeas [sham (n= 22), e CNC (n= 23)] (Figura 8B).

A ANOVA de uma via com medidas repetidas mostrou efeitos significativos para os camundongos machos para o fator condição [$F(1,36) = 7,87$, $p < 0,05$], e interação entre a condição e reteste nociceptivo [$F(1,36) = 23,17$, $p < 0,05$].

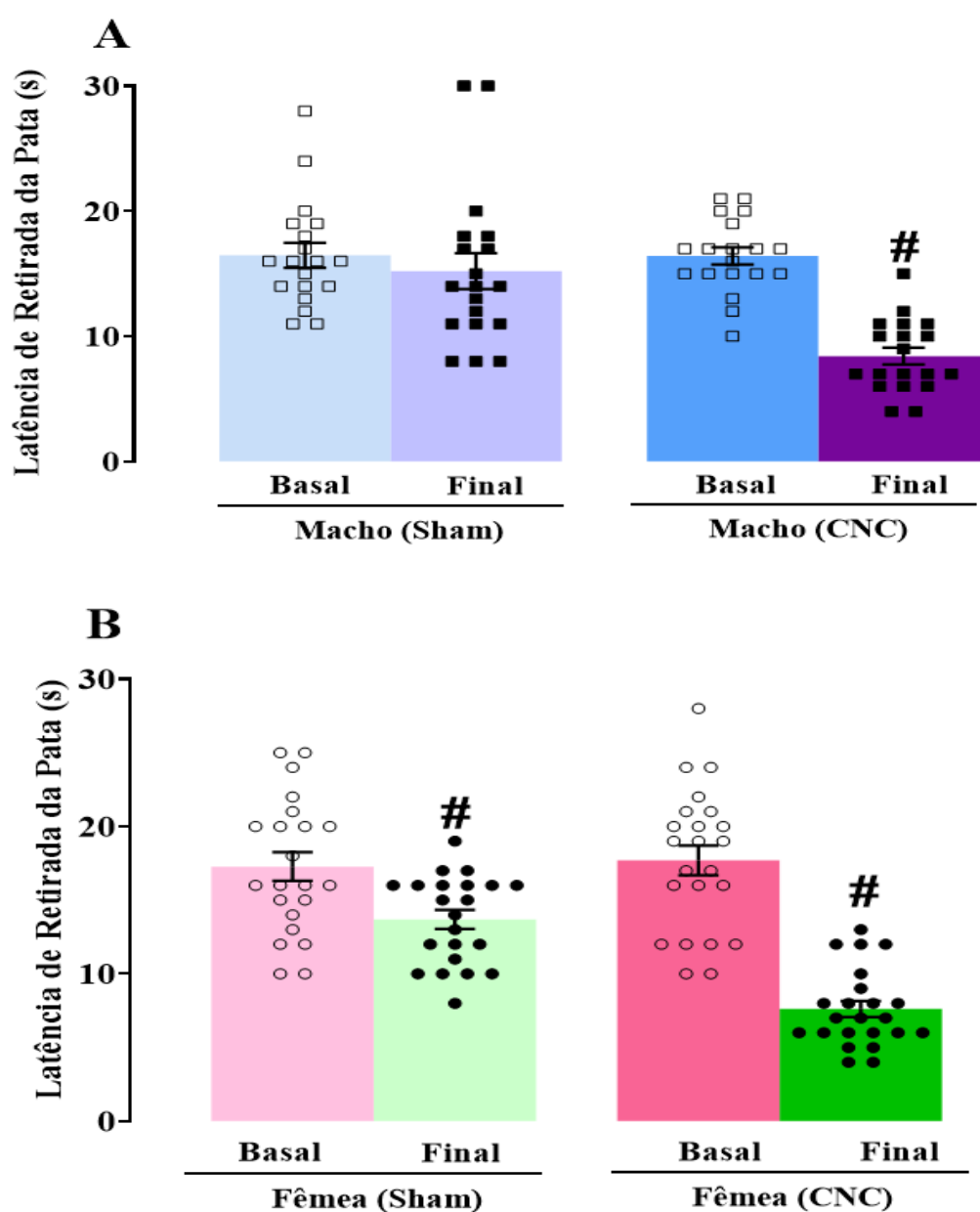
O teste post hoc de Duncan revelou diminuição da latência de retirada da pata traseira direita ao estímulo térmico nos camundongos constritos (CNC) comparados aos camundongos sham, confirmando a hipernocicepção induzida pela cirurgia de constrição do nervo isquiático (Figura 8A). O post hoc revelou diferença entre a latência de nocicepção basal e final avaliado no teste da placa quente, para os camundongos demonstradores machos CNC, sem alteração nos camundongos Sham (Figura 8A).

A ANOVA de uma via com medidas repetidas mostrou efeitos significativos para os camundongos fêmeas para o fator condição [$F(1,43) = 10,88$, $p < 0,05$], e interação entre a condição e reteste nociceptivo [$F(1,43) = 17,75$, $p < 0,05$] (Figura 8B).

O teste post hoc de Duncan revelou diminuição da latência de retirada da pata traseira direita ao estímulo térmico nos camundongos fêmeas constritos (CNC) comparados aos camundongos Sham, confirmando a hipernocicepção induzida pela cirurgia de constrição do nervo isquiático (Figura 8B). O post hoc revelou diferença entre a latência de

nocicepção basal e final avaliado no teste da placa quente, para os camundongos demonstradores fêmeas CNC e sham.

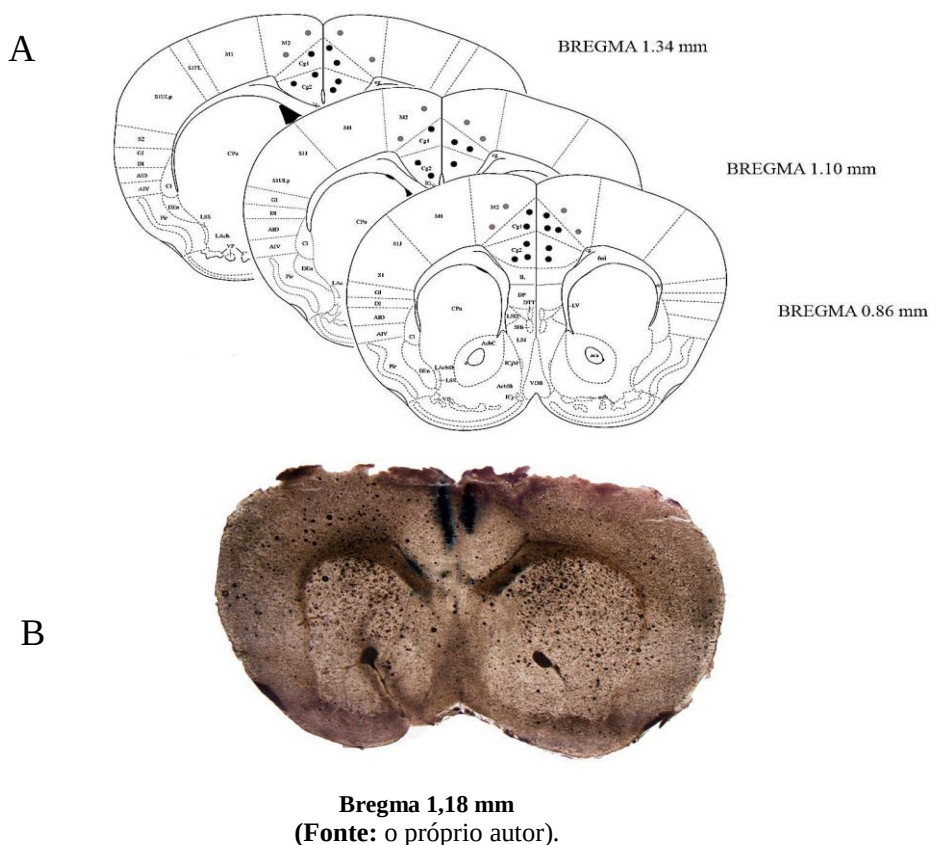
Figura 8. Latência de retirada da pata traseira direita nos camundongos machos (A) e fêmeas (B), Sham e constritos (CNC) avaliados no teste de placa quente antes da cirurgia da constrição do nervo isquiático (latência basal) e no 28º dia (latência final) após o término do teste de contorções abdominais nos grupos Ob-CNC e Ob-Sham. As barras com os pontos de dispersão representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm E.P.M$), (machos, $n = 19$ por grupo; fêmeas, $n = 22-23$). # $p < 0,05$ comparação da nocicepção final com a basal. CNC = camundongos com constrição no nervo isquiático, Sham = camundongos sem constrição do nervo isquiático. (ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste de Duncan).



4.2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

As análises histológicas confirmaram a canulação positiva bilateral para 128 camundongos, a saber: Experimento 1A [Ob-Sham Salina/Salina (n = 9), Ob-Sham Salina/Clonidina 8 (n = 7), Ob-Sham Ioimbina 0,05/Salina (n = 7), Ob-Sham Ioimbina 0,05/Clonidina 8 (n = 7), Ob-CNC Salina/Salina (n= 8), Ob-CNC Salina/Clonidina 8 (n = 7), Ob-CNC Ioimbina 0,05/Salina (n = 7), Ob-CNC Ioimbina 0,05/Clonidina 8 (n = 6)]. Experimento 1B [Ob-Sham Salina/Salina (n = 9), Ob-Sham Salina/Clonidina 8 (n = 11), Ob-Sham Ioimbina 0,05/Salina (n = 8), Ob-Sham Ioimbina 0,5/Clonidina 8 (n = 7), Ob-CNC Salina/Salina (n = 10), Ob-CNC Salina/Clonidina 8 (n = 11), Ob-CNC Ioimbina 0,05/Salina (n = 8), Ob-CNC Ioimbina 0,5/Clonidina 8 (n =6)]. O índice de acertos de injeção no CCA foi de 85% (Figura 9).

Figura 9. (A) Esquema de secções coronais representando alguns dos sítios de injeção no CCA de camundongos. Os círculos pretos representam os locais de injeção dentro do CCA e os círculos cinza representam os locais fora da estrutura (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). (B) Fotomicrografia de uma secção coronal de um sujeito representativo mostrando sítios de injeção no CCA de um camundongo (Bregma= 1,18mm).



4.3. EXPERIMENTO 1. EFEITO AVALIAR O EFEITO DA INJEÇÃO COMBINADA INTRA-CCA DE IOIMBINA SEGUIDA DE CLONIDINA NA MODULAÇÃO DA EMPATIA RELACIONADA À NOCICEPÇÃO E À ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS MACHOS E FÊMEAS QUE CONVIVERAM COM COESPECÍFICO EM DOR CRÔNICA.

4.3.1 Experimento 1A. Efeito da injeção intra-CCA de ioimbina seguida de clonidina na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.

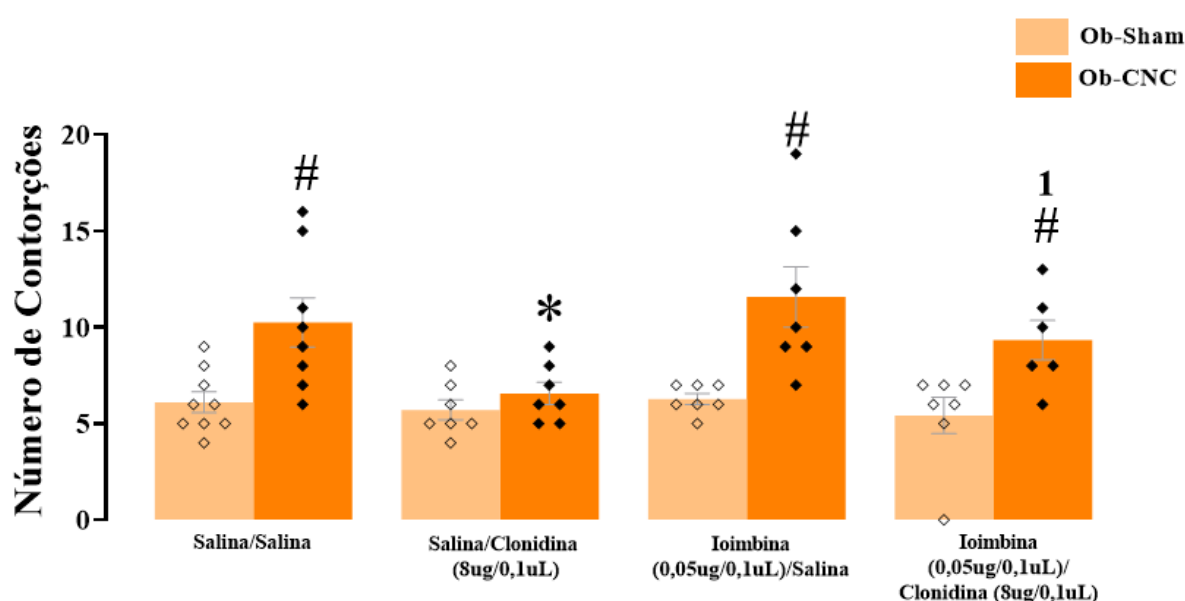
Para os camundongos machos, a ANOVA de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento) mostrou efeitos significativos para os fatores convívio [$F(1,50) = 28,71$; $p < 0,05$] e tratamento [$F(1,50) = 7,33$; $p < 0,05$], e ausência de efeito para os fatores: pré-tratamento [$F(1,50) = 2,25$; $p > 0,07$], interação entre convívio e pré-tratamento [$F(1,50) = 2,51$; $p > 0,05$], interação entre convívio e tratamento [$F(1,50) = 3,10$; $p = 0,08$], pré-tratamento e tratamento [$F(1,50) = 0,13$; $p > 0,05$], e convívio, pré-tratamento e tratamento [$F(1,50) = 0,51$; $p > 0,05$].

O teste de Duncan revelou aumento no número de contorções abdominais nos animais Ob-CNC Salina/Salina comparados com os animais Ob-Sham Salina/Salina, Ob-CNC Ioimbina (IOB 0,05 µg/Salina) comparados com os animais Ob-Sham IOB 0,05 µg/Salina, Ob-CNC IOB 0,05 µg/Clonidina 8 µg comparados com os animais Ob-Sham IOB 0,05 µg/Clonidina 8 µg (efeito do convívio).

O post hoc revelou que a administração de clonidina (8 µg) intra-CCA diminuiu o número de contorções abdominais nos animais Ob-CNC Salina/Clonidina (8 µg), comparados com os animais Ob-CNC Salina/Salina (efeito do tratamento). Enquanto a administração combinada de IOB (0,05 µg) e clonidina (8 µg), aumentou o número de contorções abdominais nos animais Ob-CNC IOB 0,05 µg/Clonidina 8 µg, comparados com os animais Ob-CNC Salina/Clonidina 8 µg (efeito do pré-tratamento).

O número de contorções abdominais não foi alterado nos animais Ob-Sham IOB 0,05 µg/Salina e Ob-Sham Salina/Clonidina 8 µg, comparados aos respectivos controles Ob-Sham Salina/Salina (Figura 10).

Figura 10. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, salina/clonidina (8 µg/0,1µL), ioimbina/salina (0,05 µg/0,1µL), e ioimbina/clonidina (0,05 e 8 µg/0,1µL) sobre a nocicepção em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica. As barras com os pontos de dispersão representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) do número de contorções abdominais em camundongos machos alojados em quartetos nos grupos Ob-Sham e Ob-CNC (n=6-9). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo Ob-Sham. * $P < 0,05$ comparado ao Ob-CNC salina/salina. ¹ $P < 0,05$ comparado ao Ob-CNC salina/clonidina 8 µg (ANOVA de três fatores, seguida do teste de Duncan). Ob-CNC= observador do camundongo com constrição do nervo isquiático; Ob-Sham= observador do camundongo sem constrição do nervo isquiático.



As Figuras 11 (A, B e C) representam os efeitos da administração intra-CCA de Salina/Salina, Salina/Clonidina 8, Ioimbina 0,05/Salina e Ioimbina 0,05/Clonidina 8 (µg/0,1 µL) sobre comportamentos relacionados a ansiedade em camundongos machos expostos ao labirinto em cruz elevado, induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.

Na Figura 11A, a ANOVA de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento) demonstrou efeito significativo na %EBA para o fator convívio [$F(1,50) = 10,54$; $p < 0,05$] e ausência de efeito para o fator pré-tratamento [$F(1,50) = 1,09$; $p > 0,05$], tratamento [$F(1,50) = 2,88$; $p > 0,05$] e para as interações entre os fatores: convívio e pré-tratamento [$F(1,50) = 0,01$; $p > 0,05$]; convívio e tratamento [$F(1,50) = 0,70$; $p > 0,05$]; pré-tratamento e

tratamento [$F(1,50) = 2,03$; $p > 0,05$] e convívio, pré-tratamento e tratamento [$F(1,50) = 0,95$; $p > 0,05$].

O teste de Duncan revelou diminuição na % entrada nos braços abertos nos animais Ob-CNC Salina/Salina comparados com os controles Ob-Sham Salina/Salina (efeito do convívio). Nenhum dos tratamentos alterou a % entrada nos braços abertos nos animais observadores Sham e CNC.

Na Figura 11B, a ANOVA de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento) demonstrou efeito significativo na %TBA para o fator convívio [$F(1,50) = 5,46$; $p < 0,05$] e para a interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F(1,50) = 9,16$; $p < 0,05$], e ausência de efeito para o fator pré-tratamento [$F(1,50) = 0,17$; $p > 0,05$], tratamento [$F(1,50) = 0,05$; $p > 0,05$] e para as interações entre os fatores: convívio e pré-tratamento [$F(1,50) = 0,34$; $p > 0,05$]; convívio e tratamento [$F(1,50) = 0,12$; $p > 0,05$]; e convívio, pré-tratamento e tratamento [$F(1,50) = 1,66$; $p > 0,05$].

O teste de Duncan revelou diminuição na % tempo nos braços abertos nos animais Ob-CNC Salina/Salina comparados com os controles Ob-Sham Salina/Salina (efeito do convívio).

O post hoc revelou que a administração de Salina/Clonidina (8 μ g) e IOB (0,05 μ g)/Salina intra-CCA diminuiu a % tempo nos braços abertos nos animais Ob-Sham Salina/Clonidina (8 μ g) (efeito do tratamento) e Ob-Sham IOB (0,05 μ g)/Salina (efeito do pré-tratamento), comparados com os respectivos animais Ob-Sham Salina/Salina. Nenhum dos tratamentos alterou a % tempo nos braços abertos nos animais observadores CNC, comparados aos respectivos controles Ob-Sham Salina/Salina (Figura 11B).

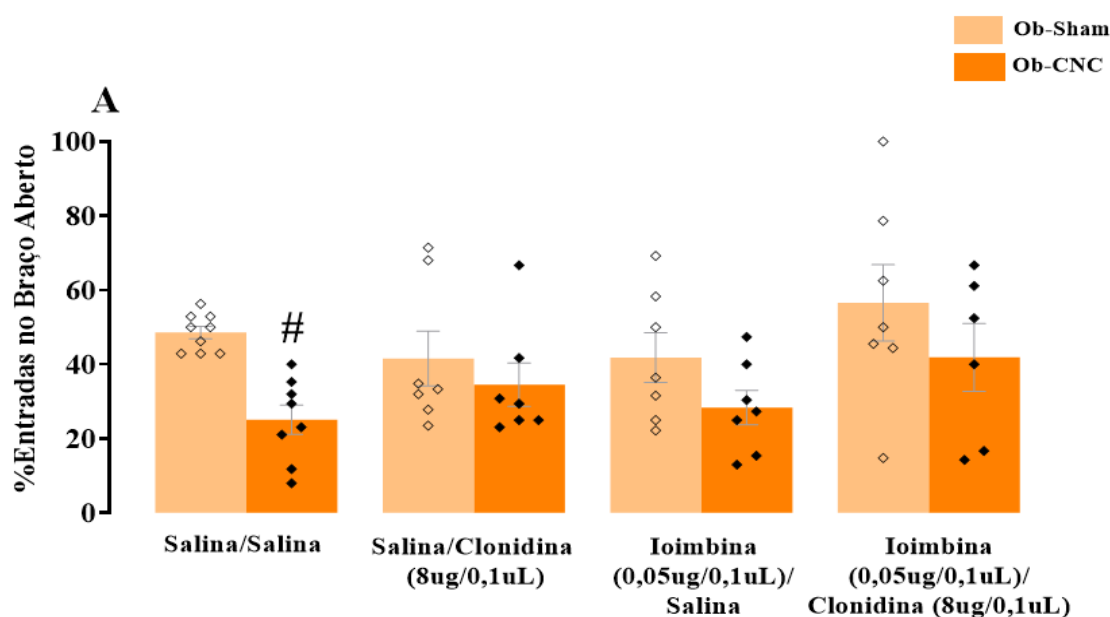
Na Figura 11C, de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento) demonstrou efeito significativo na EBF para o fator convívio [$F(1,50) = 5,40$; $p < 0,05$] e ausência de efeito para o fator pré-tratamento [$F(1,50) = 1,52$; $p > 0,05$], tratamento [$F(1,50) = 2,22$; $p >$

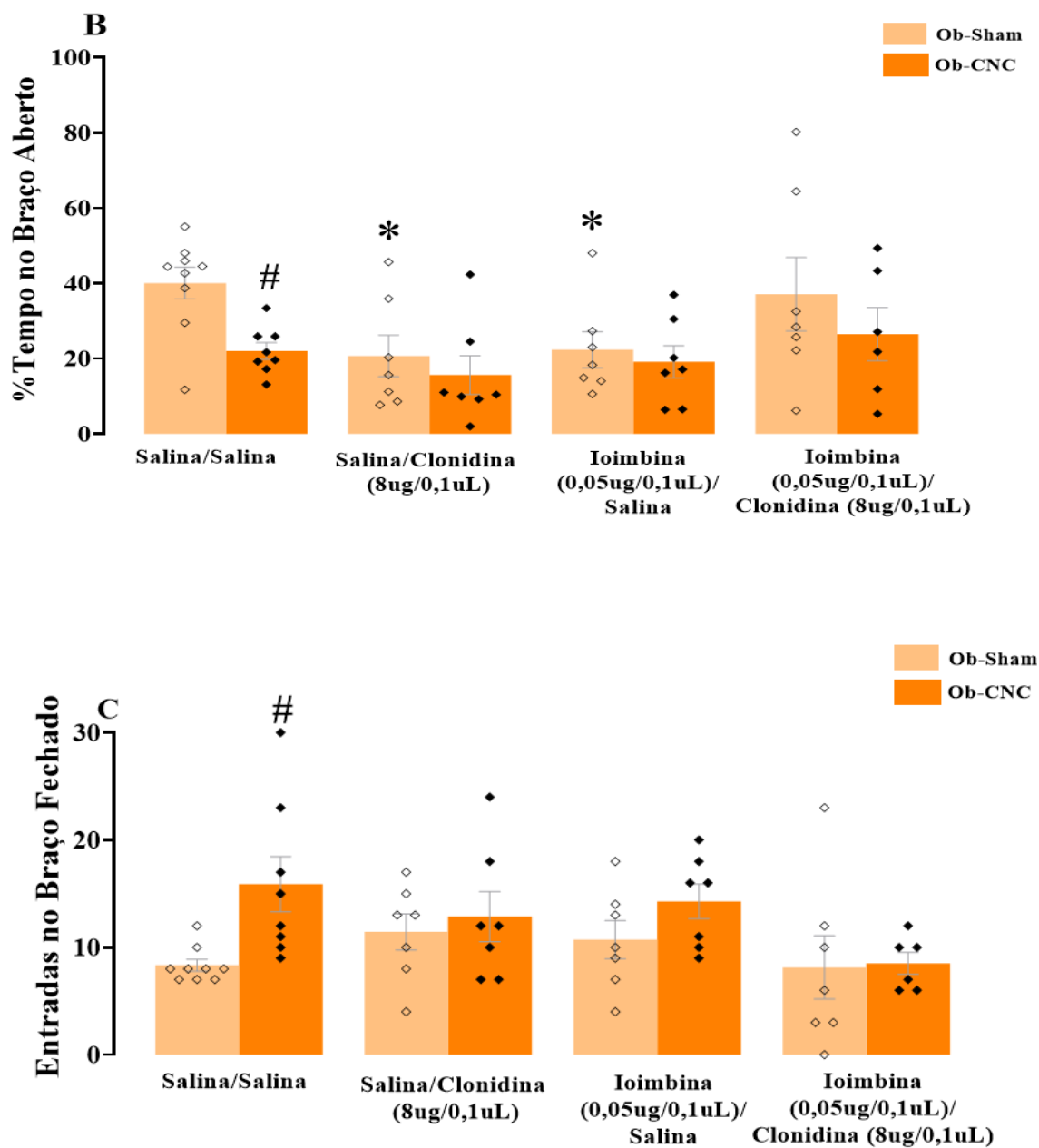
0,05] e para a interações entre os fatores: convívio e pré-tratamento [$F(1,50) = 0,82$; $p > 0,05$]; convívio e tratamento [$F(1,50) = 2,82$; $p > 0,05$]; pré-tratamento e tratamento [$F(1,50) = 2,31$; $p > 0,05$] e convívio, pré-tratamento e tratamento [$F(1,50) = 7,52$; $p > 0,05$].

O teste de Duncan revelou aumento nas entradas nos braços fechados nos animais Ob-CNC Salina/Salina comparados com os controles Ob-Sham Salina/Salina (efeito do convívio).

Nenhum dos tratamentos alterou as entradas nos braços fechados nos animais observadores Sham e CNC.

Figura 11. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, salina/clonidina (8 $\mu\text{g}/0,1\mu\text{L}$), ioimbina/salina (0,05 $\mu\text{g}/0,1\mu\text{L}$) e ioimbina/clonidina (0,05 e 8 $\mu\text{g}/0,1\mu\text{L}$) sobre a modulação da ansiedade em camundongos machos expostos ao labirinto em cruz elevado, (A) porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), (B) porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) e (C) frequência de entradas nos braços fechados (EBF), induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica. As barras com os pontos de dispersão representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm \text{EPM}$) em camundongos machos alojados em quartetos nos grupos Ob-Sham e Ob-CNC ($n=6-9$). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo Ob-Sham. * $P < 0,05$ comparado ao Ob-CNC salina/salina. (ANOVA de três fatores, seguida do teste de Duncan). Ob-CNC= observador do camundongo com constrição do nervo isquiático; Ob-Sham= observador do camundongo sem constrição do nervo isquiático.





A **Tabela 1** representa os efeitos da administração intra-CCA de Salina/Salina, Salina/Clonidina 8, Ioimbina 0,05/Salina e Ioimbina 0,05/Clonidina 8 ($\mu\text{g}/0,1 \mu\text{L}$) sobre a modulação da ansiedade em camundongos machos expostos ao labirinto em cruz elevado,

induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica.

A ANOVA de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento) revelou efeito significativo para as medidas espaço-temporais, para os seguintes comportamentos: %TC [pré-tratamento $F(1,50) = 5,35$; $p < 0,05$]; %SAPPProt [interação para convívio e tratamento $F(1,50) = 8,03$; $p < 0,05$]; TMerg [pré-tratamento $F(1,50) = 10,00$; $p < 0,05$]; %MergProt [convívio $F(1,50) = 5,41$; $p < 0,05$]; tImobi [pré-tratamento $F(1,50) = 4,46$; $p < 0,05$].

No entanto, mostrou ausência de efeito significativo para os seguintes comportamentos: %TC [convívio $F(1,50) = 1,45$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,50) = 0,02$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,50) = 0,13$; $p > 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,50) = 1,71$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 2,29$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 0,05$; $p > 0,27$]; TSAP [convívio $F(1,50) = 0,31$; $p > 0,05$; pré-tratamento $F(1,50) = 2,38$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,50) = 2,30$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,50) = 0,37$; $p > 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,52) = 0,98$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 0,29$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 0,61$; $p > 0,05$]; %SAPPProt [convívio $F(1,50) = 1,04$; $p > 0,05$; pré-tratamento $F(1,50) = 1,67$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,50) = 1,06$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,50) = 0,65$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 0,01$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 0,36$; $p > 0,05$]; TMerg [convívio $F(1,50) = 2,40$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,52) = 2,31$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,50) = 0,71$; $p > 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,50) = 0,28$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 0,38$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 2,82$; $p > 0,05$]; %MergProt [pré-tratamento $F(1,50) = 1,89$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,50) = 1,05$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,50) = 0,23$; $p > 0,05$];

interação entre convívio e tratamento $F(1,50) = 1,74$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 3,56$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 0,08$; $p > 0,05$]; TLEV [convívio $F(1,50) = 1,90$; $p > 0,05$; pré-tratamento $F(1,50) = 0,07$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,50) = 1,44$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,50) = 0,00$; $p > 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,50) = 0,08$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 2,19$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 1,03$; $p > 0,05$]; e Timobi [convívio $F(1,50) = 0,47$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,50) = 1,52$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,50) = 0,05$; $p > 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,50) = 0,42$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,50) = 0,03$; $p > 0,05$].

O post hoc foi realizado, considerando os efeitos de interação entre os fatores. O teste de Duncan revelou aumento para a %SAPProt nos animais Ob-CNC Salina/Salina comparados aos Ob-Sham Salina/Salina (efeito do convívio).

O post hoc revelou redução para %SAPProt nos camundongos Ob-CNC Salina/Clonidina 8, em comparação ao Ob-CNC Salina/Salina (efeito do tratamento); e TMerg [camundongos Ob-Sham Ioimbina 0,05/Salina em comparação ao Ob-Sham Salina/Salina; camundongos Ob-CNC IOB 0,05/Clonidina 8, em comparação ao Ob-CNC Salina/Clonidina (efeito do pré-tratamento).

Tabela 1. Efeito da administração combinada intra-CCA de Salina, Ioimbina (0,05µg/0,1 µL) seguida respectivamente de Salina, Clonidina (8µg/0,1µL) sobre a avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado, induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos machos que conviveram com coespecífico em dor crônica. Os valores representam as médias e o erro padrão da média (M±EPM) em camundongos machos alojados em quartetos nos grupos Ob-Sham e Ob-CNC (n=6-9). #P<0,05 comparado ao respectivo Ob-Sham. *P<0,05 comparado ao Ob-CNC salina/salina. ¹P<0,05 comparado ao Ob-CNC salina/Clonidina 8 µg (ANOVA de três fatores, seguida do teste de Duncan). Ob-CNC= observador do camundongo com constrição do nervo isquiático; Ob-Sham= observador do camundongo sem constrição do nervo isquiático; Sal/Sal= Salina/Salina; Sal/Clo 8= Salina/Clonidina 8 µg; IOB 0,05/Sal= IOB 0,05 µg /Salina; IOB 0,05/Clo 8= IOB 0,05 µg/Clonidina 8 µg.

Comportamentos	Ob-Sham				Ob-CNC			
	Tratamento (µg/0,1µL)							
	Sal/Sal	Sal/Clo 8	IOB 0,05/Sal	IOB 0,05/Clo 8	Sal/Sal	Sal/Clo 8	IOB 0,05/Sal	IOB 0,05/Clo 8
% Tempo no Centro	37,4 ± 4,1	45,2 ± 6,1	33,9 ± 5,9	34,5 ± 6,1	46,0 ± 2,2	48,1 ± 6,1	43,7 ± 4,6	30,9 ± 5,5
Total de Esticar	4,6 ± 1,0	5,0 ± 1,8	8,1 ± 1,9	6,3 ± 1,8	6,0 ± 2,3	6,1 ± 1,6	10,1 ± 0,8	4,3 ± 1,2
% Esticar Protegido	54,3 ± 12,9	73,3 ± 15,3	54,1 ± 8,8	65,3 ± 2,4	98,6 ± 1,4#	59,8 ± 10,6*	74,6 ± 10,0	48,3 ± 18,3
Total de Mergulhos	46,3 ± 4,9	38,4 ± 5,9	26,7 ± 9,1*	27,0 ± 4,9	32,6 ± 3,9	33,6 ± 5,3	32,6 ± 4,6	15,7 ± 2,4¹
% Mergulhos Protegidos	34,6 ± 6,0	59,3 ± 9,1	41,6 ± 8,7	42,5 ± 8,7	58,7 ± 1,5	65,9 ± 8,4	57,3 ± 8,7	47,0 ± 9,4
Total de Levantamentos	9,8 ± 2,4	17,1 ± 3,3	14,0 ± 3,0	12,1 ± 3,3	9,8 ± 1,5	12,3 ± 2,3	10,0 ± 3,0	10,8 ± 1,0
Imobilidade	4,7 ± 3,7	0,0 ± 0,0	9,0 ± 6,0	19,6 ± 16,9	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	19,2 ± 11,6

4.4.2 Experimento 1B. Efeito da injeção combinada intra-CCA de ioimbina (antagonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos) seguida de clonidina (agonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos), na modulação da empatia relacionada à nocicepção e à ansiedade em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.

Para os camundongos fêmeas, a ANOVA de três fatores [fator 1, convívio (Sham ou CNC)], [fator 2, pré-tratamento (Salina/Salina, Ioimbina 0,05/Salina ($\mu\text{g}/0,1\mu\text{L}$ intra-CCA)] e [fator 3, tratamento (Clonidina 8/Salina, Ioimbina 0,05/Salina e Ioimbina 0,05/Clonidina 8 ($\mu\text{g}/0,1 \mu\text{L}$ intra-CCA)] mostrou efeitos significativos para o fator convívio [$F(1,62) = 18,05$; $p < 0,05$], para a interação entre os fatores convívio e pré-tratamento [$F(1,62) = 5,399$; $p < 0,05$] e tendência de efeito para o fator pré-tratamento [$F(1,62) = 2,81$; $p = 0,09$], e ausência de efeito para o fator tratamento [$F(1,62) = 1,00$; $p > 0,05$], e para a interação entre os fatores: convívio e tratamento [$F(1,62) = 1,76$; $p > 0,05$]; pré-tratamento e tratamento [$F(1,62) = 1,76$; $p > 0,05$] e convívio, pré-tratamento e tratamento [$F(1,62) = 1,45$; $p > 0,05$].

O efeito da interação permite realizar o post hoc. O teste de Duncan revelou aumento no número de contorções abdominais nos camundongos Ob-CNC Salina/Salina, e Ob-CNC IOB 0,05 μg /Clonidina 8 μg comparados com os respectivos controles, Ob-Sham Salina/Salina e Ob-Sham IOB 0,05 μg /Clonidina 8 μg (efeito do convívio).

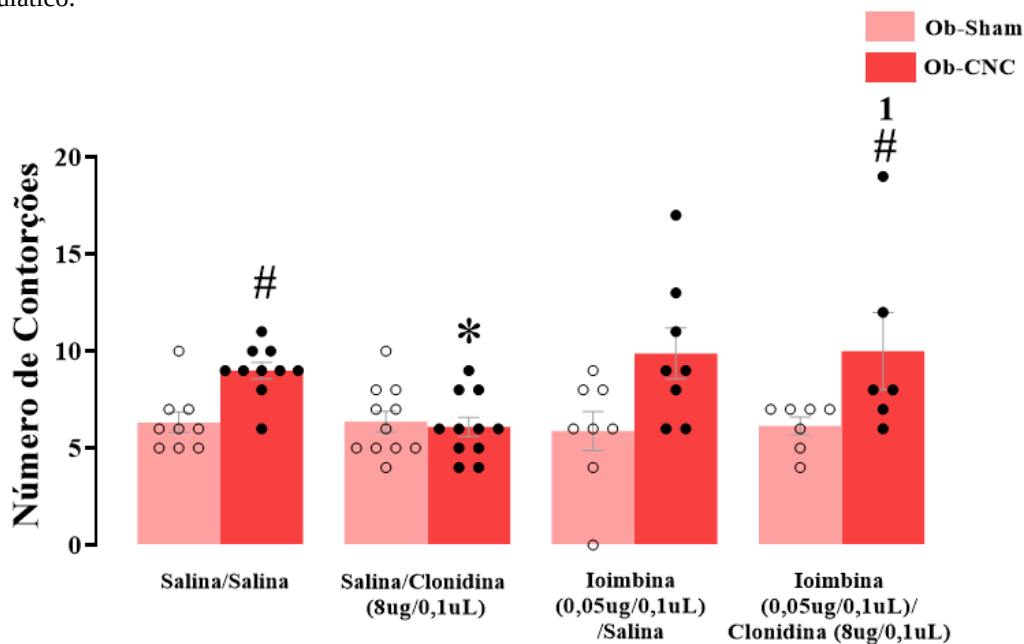
O post hoc revelou que a administração de clonidina (8 μg) intra-CCA diminuiu o número de contorções abdominais nos animais Ob-CNC Salina/Clonidina (8 μg), comparados aos camundongos Ob-CNC Salina/Salina (efeito do tratamento).

O número de contorções abdominais não foi alterado nos camundongos Ob-CNC IOB 0,05 μg /Salina comparados aos controles Ob-CNC Salina/Salina. Entretanto, a administração combinada de ioimbina (0,05 μg) e clonidina (8 μg), aumentou o número de

contorções abdominais nos camundongos Ob-CNC IOB 0,05 µg/Clonidina 8 µg comparados aos Ob-CNC Salina/Clonidina 8 µg (efeito do pré-tratamento).

O número de contorções abdominais não foi alterado nos camundongos Ob-Sham Salina/Clonidina 8 µg, Ob-Sham IOB 0,05 µg/Salina e Ob-Sham IOB 0,05 µg/Clonidina 8 µg, comparados aos respectivos controles Ob-Sham Salina/Salina (Figura 12).

Figura 12. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, clonidina/salina (8µg/0,1µL), ioimbina/salina (0,05µg/0,1µL) e ioimbina/clonidina (0,05 e 8µg/0,1µL) sobre a nocicepção em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica. As barras com os pontos de dispersão representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) do número de contorções abdominais em camundongos fêmeas alojados em quartetos nos grupos Ob-Sham e Ob-CNC ($n=6-10$). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo Ob-Sham. * $P < 0,05$ comparado ao Ob-CNC salina/salina. ¹ $P < 0,05$ comparado ao Ob-CNC salina/clonidina 8µg (ANOVA de três fatores, seguida do teste de Duncan). Ob-CNC= observador do camundongo com constrição do nervo isquiático; Ob-Sham= observador do camundongo sem constrição do nervo isquiático.



As Figuras 13 (A, B e C) representam os efeitos da administração intra-CCA de Salina/Salina, Salina/Clonidina 8, Ioimbina 0,05/Salina e Ioimbina 0,05/Clonidina 8 (µg/0,1 µL) sobre comportamentos relacionados a ansiedade em camundongos fêmeas expostos ao labirinto em cruz elevado, induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.

Na Figura 13A, a ANOVA de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento) demonstrou efeito significativo na %EBA para o fator convívio [$F(1,62) = 4,02$; $p < 0,05$] e para a interação entre convívio e tratamento [$F(1,62) = 9,45$; $p < 0,05$], e ausência de efeito para o fator pré-tratamento [$F(1,62) = 2,73$; $p > 0,05$], tratamento [$F(1,62) = 1,81$; $p > 0,05$] e para as interações entre os fatores: convívio e pré-tratamento [$F(1,62) = 0,69$; $p > 0,05$]; pré-tratamento e tratamento [$F(1,62) = 0,65$; $p > 0,05$]; e convívio, pré-tratamento e tratamento [$F(1,62) = 0,06$; $p > 0,05$].

O efeito da interação permite realizar o post hoc. O teste de Duncan revelou diminuição na % entrada nos braços abertos nos camundongos Ob-CNC Salina/Salina comparados com os controles Ob-Sham Salina/Salina (efeito do convívio). Nenhum dos tratamentos alterou a % entrada nos braços abertos nos camundongos observadores Sham e CNC.

Na Figura 13B, a ANOVA de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento) demonstrou efeito significativo na %TBA para o fator convívio [$F(1,62) = 6,62$; $p < 0,05$], pré-tratamento [$F(1,62) = 4,69$; $p < 0,05$] e para a interação entre os fatores convívio e tratamento [$F(1,62) = 8,23$; $p < 0,05$], e ausência de efeito para o fator tratamento [$F(1,62) = 0,03$; $p > 0,05$], e para as interações entre os fatores: convívio e pré-tratamento [$F(1,62) = 0,03$; $p > 0,05$]; pré-tratamento e tratamento [$F(1,62) = 0,45$; $p > 0,05$]; e convívio, pré-tratamento e tratamento [$F(1,62) = 0,95$; $p > 0,05$].

O efeito da interação permite realizar o post hoc. O teste de Duncan revelou diminuição na % tempo nos braços abertos nos camundongos Ob-CNC Salina/Salina comparados com os controles Ob-Sham Salina/Salina (efeito do convívio).

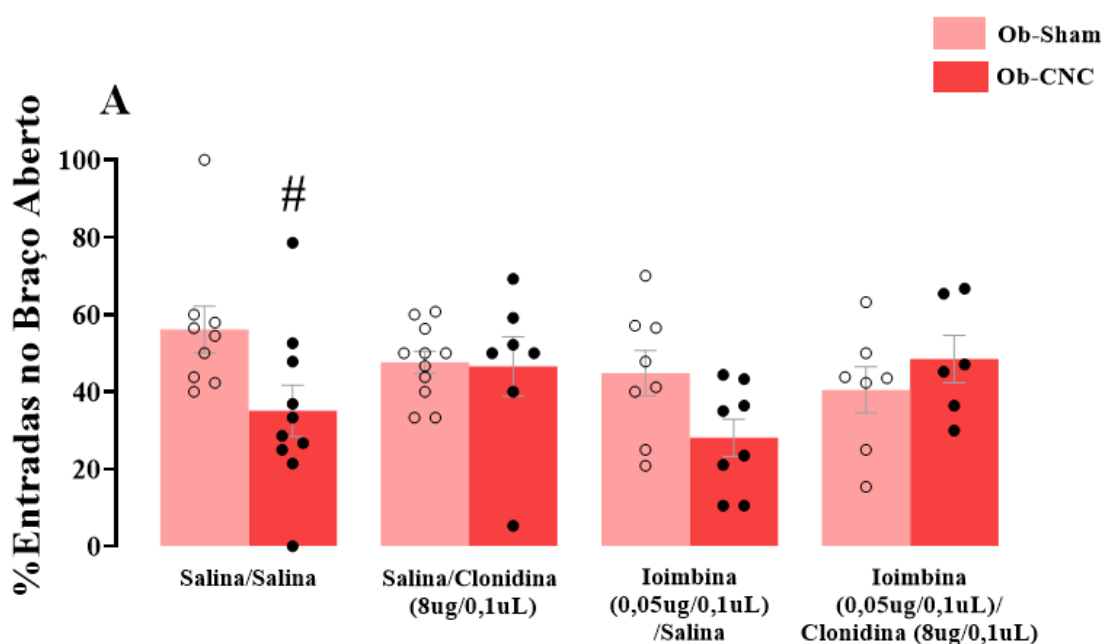
Nenhum dos tratamentos alterou a % tempo nos braços abertos nos camundongos observadores CNC. Entretanto, o post hoc revelou diminuição na % tempo nos braços

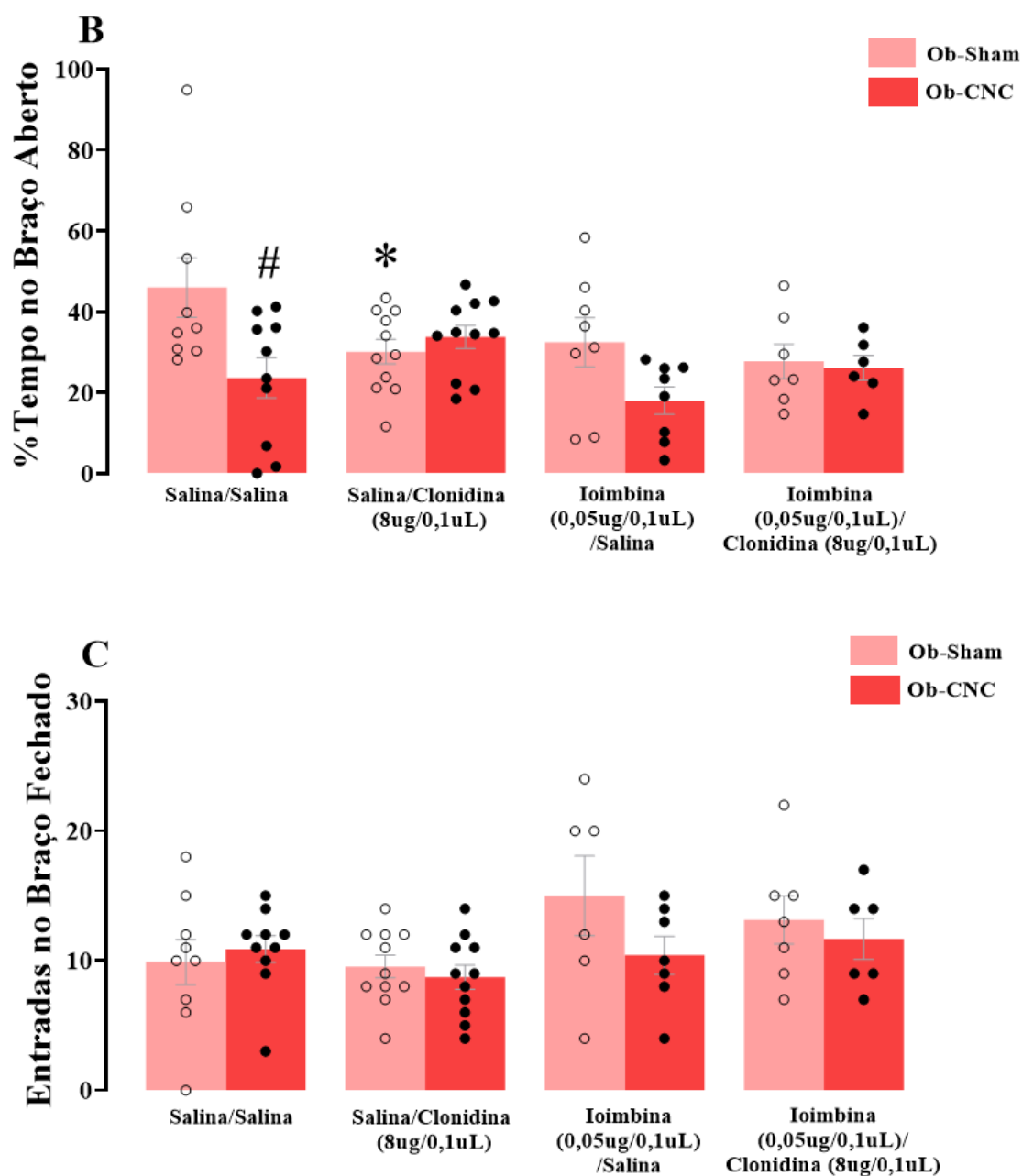
abertos nos camundongos Ob-Sham Salina/Clonidina (8 µg) comparados com os controles Ob-Sham Salina/Salina (efeito do tratamento).

Na Figura 13C, de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento) demonstrou efeito significativo na EBF para o fator pré-tratamento [$F(1,62) = 6,68$; $p < 0,05$] e ausência de efeito para o fator convívio [$F(1,62) = 0,23$; $p > 0,05$], tratamento [$F(1,62) = 0,23$; $p > 0,05$] e para as interações entre os fatores: convívio e pré-tratamento [$F(1,62) = 0,14$; $p > 0,05$]; convívio e tratamento [$F(1,62) = 2,83$; $p > 0,05$]; pré-tratamento e tratamento [$F(1,62) = 0,70$; $p > 0,05$] e convívio, pré-tratamento e tratamento [$F(1,62) = 0,52$; $p > 0,05$].

O teste de Duncan revelou que nenhum dos tratamentos alterou as entradas nos braços fechados nos camundongos observadores Sham e CNC.

Figura 13. Efeitos da injeção bilateral intra-CCA de salina/salina, salina/clonidina (8µg/0,1µL), ioimbina/salina (0,05µg/0,1 L) e ioimbina/clonidina (0,05 e 8µg/0,1µL) sobre a modulação da ansiedade em camundongos fêmeas expostos ao labirinto em cruz elevado, (A) porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA), (B) porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) e (C) frequência de entradas nos braços fechados (EBF), induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica. As barras com os pontos de dispersão representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) em camundongos fêmeas alojados em quartetos nos grupos Ob-Sham e Ob-CNC ($n=6-10$). # $P < 0,05$ comparado ao respectivo Ob-Sham. * $P < 0,05$ comparado ao Ob-Sham salina/salina. (ANOVA de três fatores, seguida do teste de Duncan). Ob-CNC= observador do camundongo com constrição do nervo isquiático; Ob-Sham= observador do camundongo sem constrição do nervo isquiático.





A **Tabela 2** representa os efeitos da administração intra-CCA de Salina/Salina, Salina/Clonidina 8, Ioimbina 0,05/Salina e Ioimbina 0,05/Clonidina 8 ($\mu\text{g}/0,1 \mu\text{L}$) sobre a

modulação da ansiedade em camundongos fêmeas expostos ao labirinto em cruz elevado, induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica.

A ANOVA de três fatores (convívio x pré-tratamento x tratamento)] revelou efeito significativo para as medidas espaço-temporais, para o seguinte comportamento: %TC [condição $F(1,62) = 4,66$; $p < 0,05$; interação entre condição e tratamento $F(1,62) = 4,29$; $p < 0,05$]; TSAP [pré-tratamento $F(1,62) = 4,79$; $p < 0,05$]; %SAPProt [interação para convívio e tratamento $F(1,62) = 5,51$; $p < 0,05$]; TMerg [pré-tratamento $F(1,62) = 22,21$; $p < 0,05$]; %MergProt [convívio $F(1,62) = 4,73$; $p < 0,05$; tratamento $F(1,62) = 4,79$; $p < 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,62) = 5,21$; $p < 0,05$]; TLEV [tratamento $F(1,62) = 4,36$; $p < 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 6,72$; $p < 0,05$].

No entanto, mostrou ausência de efeito significativo para os seguintes comportamentos: %TC [pré-tratamento $F(1,62) = 0,09$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,62) = 2,92$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,62) = 0,38$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,66$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,07$; $p > 0,05$]; TSAP [convívio $F(1,62) = 0,00$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,62) = 0,45$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,62) = 0,00$; $p > 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,52) = 0,06$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,03$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,81$; $p > 0,05$]; %SAPProt [convívio $F(1,62) = 0,53$; $p > 0,05$; pré-tratamento $F(1,62) = 0,00$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,62) = 2,20$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,62) = 1,52$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,36$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,00$; $p > 0,05$]; TMerg [convívio $F(1,62) = 0,10$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,62) = 0,00$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,62) = 0,00$; $p > 0,05$; interação

entre convívio e tratamento $F(1,62) = 0,16$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 1,72$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 1,95$; $p > 0,05$]; %MergProt [pré-tratamento $F(1,62) = 0,03$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,62) = 0,52$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,12$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,22$; $p > 0,05$]; TLEV [convívio $F(1,62) = 0,70$; $p > 0,05$; pré-tratamento $F(1,62) = 0,31$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,62) = 0,00$; $p > 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,62) = 0,42$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,74$; $p > 0,05$]; e tImobi [convívio $F(1,62) = 3,97$; $p > 0,05$; pré-tratamento $F(1,62) = 3,22$; $p > 0,05$; tratamento $F(1,62) = 0,13$; $p > 0,05$; interação entre convívio e pré-tratamento $F(1,62) = 2,64$; $p > 0,05$; interação entre convívio e tratamento $F(1,62) = 0,03$; $p > 0,05$; interação entre pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,00$; $p > 0,05$; interação entre convívio, pré-tratamento e tratamento $F(1,62) = 0,03$; $p > 0,05$].

O post hoc foi realizado, considerando os efeitos de interação entre os fatores. O teste de Duncan revelou redução para os seguintes comportamentos: %TC [Ob-CNC Salina/Clonidina 8 em comparação com Ob-CNC Salina/Salina (efeito do tratamento)]; TMerg [Ob-Sham Ioimbina 0,05/Salina em comparação com Ob-Sham/Salina/Salina; Ob-Sham Ioimbina 0,05/Clonidina 8 em comparação com Ob-Sham Salina/Clonidina 8; e Ob-CNC Ioimbina 0,05/Clonidina 8 em comparação com Ob-CNC Salina/Clonidina 8 (efeito do pré-tratamento)]; %MergProt [Ob-CNC Salina/Clonidina 8 em comparação com Ob-CNC Salina/Salina (efeito do tratamento)].

O teste de Duncan revelou tendência de aumento na %SAPProt nos camundongos Ob-CNC Salina/Salina, comparados com os controles Ob-Sham/Salina/Salina ($P=0,06$, efeito do convívio).

Tabela 2. Efeito da administração combinada intra-CCA de Salina, Ioimbina (0,05µg/0,1 µL) seguida respectivamente de Salina, Clonidina (8µg/0,1µL) sobre a avaliação de comportamentos relacionados a ansiedade em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado, induzida pelo modelo de empatia relacionada à nocicepção em camundongos fêmeas que conviveram com coespecífico em dor crônica. Os valores representam as médias e o erro padrão da média (M±EPM) em camundongos fêmeas alojados em quartetos nos grupos Ob-Sham e Ob-CNC (n=6-10). #P<0,05 comparado ao respectivo Ob-Sham. *P<0,05 comparado ao respectivo observador salina/salina. ¹P<0,05 comparado ao respectivo observador salina/Clonidina 8 (ANOVA de três fatores, seguida do teste de Duncan). Ob-CNC= observador do camundongo com constrição do nervo isquiático; Ob-Sham= observador do camundongo sem constrição do nervo isquiático; Sal/Sal= Salina/Salina; Sal/Clo 8= Salina/Clonidina 8 µg; IOB 0,05/Sal= Ioimbina 0,05 µg /Salina; IOB 0,05/Clo 8= Ioimbina 0,05 µg/Clonidina 8 µg.

Comportamentos	Ob-Sham				Ob-CNC			
	Tratamento (µg/0,1µL)							
	Sal/Sal	Sal/Clo 8	IOB 0,05/Sal	IOB 0,05/Clo 8	Sal/Sal	Sal/Clo 8	IOB 0,05/Sal	IOB 0,05/Clo 8
% Tempo no Centro	32,4 ± 5,5	31,9 ± 3,1	29,9 ± 2,6	32,5 ± 5,4	43,5 ± 4,1	29,5 ± 2,7*	43,0 ± 3,7	35,3 ± 4,1
Total de Esticar	8,8 ± 1,6	6,9 ± 1,8	3,9 ± 1,5	4,7 ± 1,2	7,9 ± 1,9	7,6 ± 1,8	5,3 ± 1,4	3,2 ± 1,5
% Esticar Protegido	38,0 ± 9,8	49,8 ± 10,0	52,9 ± 14,9	55,2 ± 9,3	73,1 ± 9,5	46,9 ± 9,7	68,2 ± 13,0	31,7 ± 15,6
Total de Mergulhos	46,9 ± 4,6	45,3 ± 3,7	26,0 ± 6,1*	25,0 ± 5,6¹	35,8 ± 3,6	47,5 ± 6,0	31,8 ± 4,5	23,5 ± 5,9¹
% Mergulhos Protegidos	38,0 ± 13,2	39,2 ± 5,8	35,5 ± 7,2	35,4 ± 7,3	62,5 ± 7,9	31,6 ± 5,3*	63,0 ± 6,6	41,7 ± 9,1
Total de Levantamentos	16,6 ± 3,0	12,7 ± 2,6	10,9 ± 2,3	20,1 ± 3,5	11,9 ± 1,8	13,8 ± 2,0	9,9 ± 1,8	18,3 ± 4,3
Total de Imobilidade	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,8	4,1 ± 2,7	4,5 ± 4,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,4

5. DISCUSSÃO

Esta pesquisa investigou o papel dos receptores alfa-2 adrenérgicos do córtex cingulado anterior na modulação da nocicepção e da ansiedade no modelo de empatia para a dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

Nossos resultados demonstram que os camundongos constrictos, machos e fêmeas, diminuíram a latência de levantamento da pata quando avaliados no teste de placa quente, confirmando que o convívio dos camundongos observadores (Ob-CNC), ocorreu com o demonstrador com dor (CNC). O convívio de camundongos machos e fêmeas em quartetos, quando um camundongo é o demonstrador de dor crônica, promoveu hipernocicepção, avaliada no teste de contorções abdominais, e comportamentos relacionados à ansiedade (efeito tipo-ansiógênico registrado no labirinto em cruz elevado - LCE), nos camundongos observadores machos e fêmeas (Ob-CNC) tratados com salina intra-CCA.

A administração de clonidina (Salina/Clonidina 8 µg), agonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos, intra-CCA produziu efeitos antinociceptivo e tipo-ansiolítico nos camundongos observadores de ambos os sexos que conviveram com o coespecífico com dor neuropática (Ob-CNC). Ausência de efeitos sobre a hipernocicepção, e os comportamentos exploratórios e de avaliação de risco registrados no LCE, foram obtidos com o antagonista parcial desses receptores, ioimbina (IOB 0,05µg/Salina) intra-CCA, independentemente do sexo dos camundongos Ob-CNC. Esta dose sem efeito intrínseco do antagonista, bloqueou o efeito antinociceptivo produzido pela clonidina (Salina/Clonidina 8 µg) nos camundongos Ob-CNC de ambos os sexos, sem alterar os comportamentos exploratórios avaliados no LCE.

Diante das evidências apresentadas, sugerimos que os receptores alfa-2 adrenérgicos do CCA participam, de forma distinta, da modulação da nocicepção e da ansiedade, induzida no modelo de empatia para a dor crônica em camundongos machos e fêmeas.

Neste estudo, a efetividade do procedimento cirúrgico na produção de nocicepção (BENNETT; XIE, 1988; SOMMER; SCHAFERS, 1998) foi confirmada com os resultados que mostraram diminuição na latência de retirada da pata traseira direita, após 14 dias de constrição do nervo isquiático nos camundongos machos e fêmeas CNC, quando comparados aos camundongos Sham (Figura 8 A e B). Realizamos também a avaliação nociceptiva basal dos camundongos demonstradores Sham e CNC, no qual foi demonstrado que os animais de ambos os sexos, antes da cirurgia da constrição do nervo isquiático, apresentavam maior latência na resposta nociceptiva, embora os camundongos demonstradores fêmeas Sham apresentaram diferenças entre a resposta basal e final na placa quente (Figura 9), sugerindo que as fêmeas podem ser mais sensíveis à nocicepção térmica.

A este respeito, alguns estudos apontam que as diferenças sexuais podem impactar no processamento da dor (MOGIL et al., 2020). Por exemplo, uma série de genes relacionados à dor e que são codificadores de receptores, como melanocortina-1 (MC1R) e do receptor 5-HT_{2A} (HTR2A), demonstraram ser influenciados pelo sexo, em camundongos ou humanos. E ainda que a dor crônica pode produzir modificações na circuitaria neuronal, efeito dependente do sexo (KUNER; FLOR, 2016; MOGIL, 2020). Também foi demonstrado que apenas camundongos machos submetidos ao modelo de priming hiperalgésico apresentam o desenvolvimento e manutenção da dor crônica influenciada pela proteína quinase tipo C presente na amígdala basolateral, enquanto a expressão de comportamentos reflexos e afetivos relacionados à dor, são influenciados por receptores glutamatérgicos AMPA (GluA2), em ambos os sexos (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2020). Nossos achados somam-se a um crescente corpo de evidências sobre diferenças sexuais nos mecanismos moleculares da dor no cérebro.

Em conjunto, essas informações sugerem que a nocicepção pode apresentar dimorfismo sexual e que, em parte, a diferença nos resultados observados nesta pesquisa

relacionados aos camundongos demonstradores fêmeas pode ser dependente do sexo, embora mais estudos sejam necessários para elucidar os mecanismos presentes neste aumento da sensibilidade nociceptiva.

Nossos resultados mostraram que o alojamento em quartetos, produziu aumento da resposta nociceptiva nos camundongos machos e fêmeas, corroborando estudos anteriores que utilizaram modelo semelhante, com alojamento em duplas, e que registraram aumento da resposta nociceptiva nos camundongos machos constrictos quando expostos ao teste da placa quente (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; BENASSI-CEZAR et al., 2021; TAVARES et al., 2021; ZANIBONI et al., 2018).

Estudos anteriores realizados pelo grupo de Psicobiologia da UFSCar demonstraram que o convívio em duplas, quando um camundongo macho é demonstrador de dor crônica para um coespecífico (observador), o observador macho apresenta aumento da nocicepção no teste de contorções abdominais e de comportamentos semelhantes à ansiedade, no teste do LCE (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2022; BENASSI-CEZAR et al., 2021; TAVARES et al., 2021; ZANIBONI et al., 2018).

Com objetivo de aproximar o modelo utilizado experimentalmente com camundongos, ao que acontece com os seres humanos, alteramos o número de camundongos durante o alojamento. Os resultados mostraram que o convívio em trios ou quartetos, quando um dos coespecíficos é o demonstrador da nocicepção, promove nos camundongos observadores aumento de comportamentos tipo ansiedade e hipernocicepção (BRANDÃO-DE-SOUZA et al., 2023). A alteração no protocolo experimental, permitiu o refinamento do procedimento metodológico, otimizando o tempo da coleta de dados e propiciando a observação do contágio emocional em um número maior de coespecíficos (BRANDÃO-DE-SOUZA et al., 2023), semelhante ao que foi observado em trabalhos anteriores utilizando

duplas (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2022; BENASSI-CEZAR et al., 2021; TAVARES et al., 2021; ZANIBONI et al., 2018).

Neste estudo, os resultados de avaliação da nocicepção em camundongos machos e fêmeas (Experimentos 1A e 1B), demonstraram aumento da resposta nociceptiva após o convívio em quarteto por 14 dias com o coespecífico com constrição do nervo isquiático. Trabalhos anteriores têm relacionado a empatia e a nocicepção em modelos animais (BARTAL et al., 2011; LU et al., 2017), e demonstraram que a observação de um coespecífico em sofrimento leva à sensibilização das vias nociceptivas no SNC (LANGFORD et al., 2006).

Em parte, a sensibilização nociceptiva pode ser explicada por alterações nas sinapses de algumas populações neuronais do SNC, envolvendo prejuízos na potencialização de longo prazo, e resultando na alteração das sinapses dos nociceptores periféricos, que passam a interpretar as informações não dolorosas como de dor, e as dolorosas com potencial nociceptivo ainda maior (WANG; THYAGARAJAN, 2020). Estímulos dolorosos ativam o CCA, quando o indivíduo recebe o estímulo e quando observa estado doloroso semelhante (SINGER et al., 2004).

Portanto, os nossos resultados corroboram as evidências da literatura e acrescentam que a modificação do protocolo de convivência em quartetos por 14 dias também é importante para estabelecer a familiaridade entre os roedores (LANGFORD et al., 2006; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2022; TAVARES et al., 2021) e que o convívio em quarteto por mais 14 dias com o demonstrador com dor crônica, também promove nos camundongos observadores machos e fêmeas o aumento da nocicepção e de comportamentos tipo-ansiedade.

A literatura destaca o papel da neurotransmissão alfa-2 adrenérgica na modulação da resposta nociceptiva (WANG et al., 2017; MWOBODIA et al., 2021) e nas respostas do tipo

ansiedade (SCHWEIMER et al., 2005; WU et al., 2019), e enfatiza que o tratamento com clonidina produz melhora de comportamentos de dor e ansiedade em humanos (LAURETTI et al., 2002; PEREIRA et al., 2008) e em roedores (MWOBODIA et al., 2021; SCHWEIMER et al., 2005; WANG et al., 2017; WU et al., 2019).

Neste trabalho, a clonidina (8 µg) intra-CCA produziu efeito antinociceptivo em ambos os sexos de camundongos Ob-CNC (Figuras 10 e 12). Esse resultado está de acordo com evidências anteriores que demonstraram efeito antinociceptivo da clonidina (WANG et al., 2017). A clonidina é um agonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos e sua atividade consiste na inibição da sinalização intracelular, pela mediação de uma proteína de guanosina inibitória (Gi), bem como na redução da liberação de noradrenalina no CCA (GYIRES et al., 2009; LLORCA-TORRALBA et al., 2016).

O CCA possui alta densidade destes receptores (SCHEININ et al., 1994) e é possível que esse efeito antinociceptivo seja decorrente da participação do CCA no controle do sistema descendente inibitório nociceptivo. Esta estrutura está relacionada com a modulação do estresse, da ansiedade e da dor e possui conexões com os núcleos da rafe e o Locus Coeruleus (TORK, 1985). Os núcleos da rafe, especialmente o núcleo ventral, participa da atenuação da entrada sensorial nociceptiva pela mediação dos receptores 5HT_{1A}, da neurotransmissão serotoninérgica na medula espinal, enquanto o Locus Coeruleus participa da modulação do sistema descendente inibitório nociceptivo pelos receptores alfa-2 adrenérgicos, da neurotransmissão noradrenérgica (KANDEL et al., 2014; LLORCA-TORRALBA et al., 2016), sendo possível que este agonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos tenha atuado neste sistema descendente inibitório nociceptivo nos camundongos machos e fêmeas.

Vários trabalhos destacam a participação do CCA na modulação de respostas relacionadas a ansiedade e no processamento consciente dos sentimentos em humanos, à

preocupação empática em relação ao sofrimento do outro (MOYA-ALBIOL et al., 2010). Na clínica, pacientes com transtornos de ansiedade apresentam aumento da atividade do CCA (OSUCH et al., 2000; MOCHCOVITCH et al., 2014; ZHUO, M., 2016), e lesões nessa estrutura produziram efeito ansiolítico (HAY et al., 1993). Considerando que os receptores alfa-2 adrenérgicos participam da regulação das sinapses de neurônios do CCA (KOGA et al., 2020), e que a inativação dessa estrutura reverte o efeito tipo-ansio gênico induzido pelo convívio em duplas de camundongos machos expostos ao LCE no contágio emocional para a dor crônica (BENASSI-CEZAR et al., 2021), investigamos o papel da neurotransmissão alfa-2 adrenérgica do CCA de camundongos no modelo de empatia para dor crônica.

O aumento da exploração e do tempo de permanência nos espaços abertos do labirinto, foram validados e relacionados aos comportamentos tipo-ansiolíticos no LCE em roedores (PELLOW et al., 1985; LISTER, 1987, CRUZ et al., 1994; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). Situações ansiosas de conflito aproximação-esquiva, promovem que o animal aumente comportamentos de avaliação de risco em direção a fonte de perigo iminente, enquanto os fármacos ansiolíticos reduzem a avaliação de risco nas áreas protegidas do labirinto (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995; RODGERS et al., 1997; CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Neste estudo, o tratamento com clonidina (8 µg) intra-CCA nos camundongos Ob-CNC de ambos os sexos, não alterou os índices de ansiedade, porcentagens de entradas (%EBA) e de tempo (%TBA) nos braços abertos, e as entradas nos braços fechados (EBF), comportamento validado como atividade locomotora (RODGERS; JOHNSON, 1995).

Apesar da clonidina de não ter alterado as medidas espaço-temporais de exploração no LCE nos camundongos Ob-CNC (Figuras 11 e 13), reduziu a %SAPProt, nos machos, e a %TC e %MergProt nas fêmeas, comportamentos de defesa relacionados a avaliação de risco

que podem ser mais sensíveis às ações dos fármacos (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995; RODGERS et al., 1997), (Tabelas 1 e 2).

Tomados em conjunto, os resultados demonstram que a clonidina intra-CCA produziu efeito tipo-ansiolítico independente do sexo nos camundongos Ob-CNC, uma vez que os comportamentos de avaliação de risco em espaços protegidos do labirinto foram reduzidos (RODGERS; JOHNSON, 1995; RODGERS et al., 1997).

Considerando as diferenças entre os estudos em relação ao tipo de roedor, ao sexo, e às doses do agonista, o nosso resultado corrobora a redução dos comportamentos relacionados à ansiedade promovida pela administração intra-córtex pré-límbico de clonidina (2,5 e 5,0 µg) em ratos submetidos ao LCE (WU et al., 2019).

Alguns trabalhos demonstraram que o efeito antinociceptivo da clonidina intra-amígdala e intra-CCA (ORTIZ et al., 2007; WANG et al., 2017) pode ser revertido com antagonistas dos receptores alfa-2 adrenérgicos (MAKAU et al., 2014; ORTIZ et al., 2007; WANG et al., 2017). Neste estudo, a dose inefetiva de ioimbina (0,05 µg) foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da clonidina (8 µg) em camundongos machos e fêmeas observadores da dor crônica comparados ao controle Ob-CNC Salina/Clonidina 8 µg, resultando em efeito pró-nociceptivo similar ao obtido no controle Ob-CNC Salina/Salina.

Uma possível explicação para esses resultados, é que o CCA emite projeções específicas para estruturas encefálicas que modulam a nocicepção. Sobre isso, Smith et al. (2021) investigaram o contágio emocional para a dor utilizando um protocolo de transferência social da dor e da analgesia entre camundongos. Os pesquisadores encontraram que o CCA apresenta uma ampla projeção encefálica que modula a dor e o medo. A projeção do CCA que modula a dor está diretamente conectada ao núcleo accumbens (nAC), enquanto a projeção para o complexo amigdalóide modula o medo. A inibição da projeção neuronal (CCA-nAC) resultou no bloqueio do fenômeno de transferência social da dor,

efeito que perdurou por mais de 48 horas. Assim, é possível que os efeitos antinociceptivos produzidos pela clonidina neste estudo, independentemente do sexo dos camundongos, sejam decorrentes da atuação desse agonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos no sistema inibitório descendente da dor que se conecta ao núcleo accumbens. Porém, esta é uma hipótese que necessita ser testada futuramente.

Como o CCA apresenta aferências para o complexo amigdalóide, é razoável sugerir que essa conexão pode modular a ansiedade, uma vez que o papel do complexo amigdalóide na modulação da ansiedade tem sido amplamente investigado (BARBALHO et al., 2009; GREEN e VALE, 1992; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; PESOLD e TREIT, 1995; ZANGROSSI e GRAEFF, 1994), inclusive no fenômeno de contágio emocional (SILVEIRA et al., 2023; SMITH et al., 2021; ZANIBONI et al., 2018).

No entanto, para os comportamentos semelhantes à ansiedade avaliados no LCE por este estudo, a administração combinada de ioimbina seguida de clonidina não reverteu o efeito de redução dos comportamentos de avaliação de risco registrados nos camundongos machos e fêmeas Ob-CNC. Apesar do antagonista ter reduzido o TMerg nos camundongos Ob-CNC, independentemente do sexo, produziu efeito semelhante nas fêmeas Ob-Sham que conviveram com o coespecífico sem dor. Além dos efeitos destacados, agonista e antagonista reduziram a porcentagem de tempo nos braços abertos (%TBA) nos camundongos machos Ob-Sham, e redução semelhante (%TBA) foi registrada nas fêmeas Ob-Sham tratadas com clonidina. Os outros comportamentos de avaliação de risco e as medidas espaço-temporais não foram alteradas. Portanto, os resultados apresentados são insuficientes para afirmar que o antagonista apresentou efeito do tipo-ansiolítico ou ansiogênico neste estudo.

Provavelmente, a ioimbina (0,05 µg) não reverteu o efeito ansiolítico da clonidina (8 µg) sobre os comportamentos de avaliação de risco dos camundongos machos e fêmeas Ob-

CNC devido à falta de seletividade desse fármaco pelos receptores alfa-2 adrenérgicos no CCA. Embora este antagonista possua alta afinidade para os receptores alfa-2, também atua como agonista dos receptores 5-HT_{1A} da serotonina (ZARETSKY et al., 2015). Se esta hipótese estiver correta, uma interação farmacológica determinou a ausência de efeito na reversão da ansiedade dos animais e, em parte, independente do sexo, reduziu a ansiedade dos camundongos Ob-Sham tratados com Ioimbina 0,05 µg/Salina. Tomados estes resultados em conjunto, e com objetivo de elucidar com mais especificidade os mecanismos neurofisiológicos envolvidos na modulação da ansiedade e nocicepção relacionadas a empatia, sugerimos que em estudos futuros seja investigado o papel de um antagonista seletivo para os receptores alfa-2 adrenérgicos, e a possível interação entre as neurotransmissões serotoninérgica e adrenérgica no CCA de camundongos machos e fêmeas, utilizando o modelo de empatia para a dor.

Assim, diante dos resultados apresentados acima e da importância do CCA na modulação da nocicepção e ansiedade (BENASSI-CESAR et al., 2021), sugerimos que a neurotransmissão adrenérgica do CCA é relevante para modular a nocicepção e a ansiedade, no modelo de empatia para a dor em camundongos machos e fêmeas. Essa pesquisa contribui para esclarecer o papel da neurotransmissão alfa-2 adrenérgica em respostas nociceptivas e de ansiedade associadas ao contágio emocional em camundongos machos e fêmeas, e poderá auxiliar futuras intervenções com objetivo de melhorar condições psicopatológicas marcadas por prejuízos em comportamentos empáticos.

O estudo apresenta algumas limitações a saber: a) a ioimbina atua como antagonista dos receptores alfa-2 adrenérgicos, e agonista dos receptores serotoninérgicos 5HT_{1A}. b) a redução da disponibilidade de animais pelo biotério central da UFSCar, comprometeu a coleta de dados e prejudicou a investigação de outras doses para os fármacos selecionados para estudo por esta pesquisa.

6. CONCLUSÃO

Os nossos resultados demonstraram que a convivência em quartetos com um demonstrador de dor crônica, induz hipernocicepção e aumento de respostas semelhantes à ansiedade em camundongos machos e fêmeas, corroborando pesquisas anteriores.

A clonidina (8 μ g) intra-CCA, reduziu a hipernocicepção e comportamentos de avaliação de risco relacionados a ansiedade, induzidos pelo contágio emocional da dor crônica em camundongos independente do sexo. A administração combinada da dose inefetiva de ioimbina (0,05 μ g) seguida de clonidina (8 μ g) reverteu a antinocicepção, porém não alterou o efeito tipo-ansiolítico nos comportamentos de avaliação de risco produzido pelo agonista alfa-2 adrenérgico.

Assim, sugerimos que a neurotransmissão alfa-2 adrenérgica no CCA de camundongos machos e fêmeas modula de maneira distinta a nocicepção e a ansiedade induzida pelo fenômeno de contágio emocional para a dor.

7. REFERÊNCIAS

ADRIAENSEN, H. et al. Response properties of thin myelinated (A-delta) fibers in human skin nerves. **Journal of Neurophysiology**, v. 49, n. 1, p. 111-122, 1983.

ANGELIS, L. Effects of valproate and lorazepam on experimental anxiety: tolerance, withdrawal, and role of clonidine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 329-333, 1995.

BANDLER, R. Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: Suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal grey region. **Progress in psychobiology and physiological psychology**, v. 13, p. 67-154, 1988.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Mice undergoing neuropathic pain induce anxiogenic-like effects and hypernociception in cagemates. **Behavioural Pharmacology**, v. 26, n. 7, p. 664–672, 2015.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Interplay between 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray in the modulation of fear-induced antinociception in mice. **Neuropharmacology**, v. 140, p. 100-106, 2018.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Chronic fluoxetine impairs the effects of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptors activation in the PAG and amygdala on antinociception induced by aversive situation in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 260, 2020.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Sex differences in the role of atypical PKC within the basolateral nucleus of the amygdala in a mouse hyperalgesic priming model. **Neurobiology of Pain**, v. 8, p. 100049, 2020.

BAPTISTA-DE-SOUZA, D. et al. Behavioral, hormonal, and neural alterations induced by social contagion for pain in mice. **Neuropharmacology**, v.1, n.203, p. 108878, 2022.

BARBALHO, C. A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: Evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse

agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Research**, v. 1267, p. 65-76, 2009.

BARKIN, R. L.; F., J. The management challenges of chronic pain: the role of antidepressants. **American journal of therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 31-49, 2000.

BARROSO, A. R. et al. Characterization of rat ultrasonic vocalization in the orofacial formalin test: influence of the social context. **European Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 11, p. 1213-1226, 2019.

BAXTER, A. J. et al. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression. **Psychological medicine**, v. 43, n. 5, p. 897-910, 2013.

BENARROCH, E. E. The locus ceruleus norepinephrine system: Functional organization and potential clinical significance. **Neurology**, v. 73, n. 20, p. 1699–1704, 16 nov. 2009.

BENNETT, G. J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87–107, 1988.

BESSON, J.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological reviews**, v. 67, n. 1, p. 67-186, 1987.

BENASSI-CEZAR, G. et al. A. Differential modulation of the anterior cingulate and insular cortices on anxiogenic-like responses induced by empathy for pain. **Neuropharmacology**, v.192, p. 108413-108424, 2021.

BOURNE, S.; MACHADO, A.G.; NAGEL, S.J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics**, v. 25, n. 4, p. 629-638, 2014.

BRANDÃO-DE-SOUZA, R. C. et al. Influence of social interaction conditions on chronic pain emotional contagion in male mice. **Anais da XXXVII Reunião Anual da FeSBE**. Campinas, Galoá, 2023.

- BRILL, S.; GINOSAR, Y.; DAVIDSON, E.M. Perioperative management of chronic pain patients with opioid dependency. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 19, n. 3, p. 325-331, 2006.
- BYLUND, D. B. et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 2, p. 121–136, 1994.
- CANTO-DE-SOUZA, A. et al. Involvement of the midbrain periaqueductal gray 5-HT_{1A} receptors in social conflict induced analgesia in mice. **European journal of pharmacology**, v. 345, n. 3, p. 253-256, 1998.
- CROSS, S. A. Pathophysiology of pain. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 1994. p. 375-383.
- CHEN, J. et al. Primary hyperalgesia to mechanical and heat stimuli following subcutaneous bee venom injection into the plantar surface of hindpaw in the conscious rat: a comparative study with the formalin test. **Pain**, v. 83, n. 1, p. 67-76, 1999.
- COSTA, C. O. da et al. Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 68, p. 92-100, 2019.
- CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, p.171-176, 1994.
- DECOSTERD, I.; WOOLF, C.J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. **Pain**, v. 87, n. 2, p. 149-158, 2000.
- DEVINSKY, O.; MORRELL, M. J.; VOGT, B. A. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. **Brain**, v. 118, n. 1, p. 279-306, 1995.
- DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v. 82, p. S27-S35, 1999.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.

- GAMAL-ELTRABILY, M. et al. Cortical modulation of nociception. **Neuroscience**, v. 458, p. 256-270, 2021.
- GARCIA, A.M.B.; CARDENAS, F.R.; MORATO, S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. **Physiology Behavior**, v. 85, p. 265-270, 2005.
- GREEN, S.; VALE, A.L. Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects of benzodiazepines in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 3, p. 261-264, 1992.
- GUAY, D. R. Adjunctive agents in the management of chronic pain. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 21, n. 9, p. 1070-1081, 2001.
- GYIRES, K. et al. α 2-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 7, p. 447–453, 1 dez. 2009.
- HA, H. Cervicothalamic tract in the rhesus monkey. **Experimental Neurology**, v. 33, n. 1, p. 205-212, 1971.
- HAYAR, M. A.S. Pereira et al. Envelhecimento e dor crônica: um estudo sobre mulheres com fibromialgia. **Acta fisiátrica**, p. 107-112, 2014.
- HAY, P.; SACHDEV, P.; CUMMING, S.; SMITH, J. S.; LEE, T.; KITCHENER, P.; MATHESON, J. Treatment of obsessive-compulsive disorder by psychosurgery. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 87, n. 3, p. 197-207, 1993.
- IZZO, J. M. et al. The impact of chronic pain on the quality of life and on the functional capacity of cancer patients and their caregivers. **Brazilian Journal of Pain**, v. 2, p. 336-341, 2019.
- KATTER, J. T.; BURSTEIN, R.; GIESLER, G. J. The cells of origin of the spinothalamic tract in cats. **Journal of comparative neurology**, v. 303, n. 1, p. 101-112, 1991.

- KIM, S. H.; CHUNG, Jin Mo. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355-363, 1992.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da Dor (Pathophysiology of pain). **Archives of veterinary science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.
- KRIEGHOFF, V. et al. Neural and behavioral correlates of intentional actions. **Neuropsychologia**, v. 49, n. 5, p. 767-776, 2011.
- KRIKORIAN, A. et al. La experiencia de sufrimiento en cuidadores principales de pacientes con dolor oncológico y no oncológico. **Av Enfermería**. 2010; 28 (1): 13-20.
- KOGA, K. et al. Ascending noradrenergic excitation from the locus coeruleus to the anterior cingulate cortex. **Molecular Brain**, v. 13, 26 mar. 2020.
- KUNER, Rohini; FLOR, Herta. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 20-30, 2017.
- KURAISHI, Y. et al. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain research**, v. 273, n. 2, p. 245-252, 1983.
- LÄHDESMÄKI, J. et al. Behavioral and neurochemical characterization of α 2A-adrenergic receptor knockout mice. **Neuroscience**, v. 113, n. 2, p. 289-299, 2002.
- LANGFORD, D. J. Social Modulation of Pain as Evidence for Empathy in Mice. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1967–1970, 2006.
- LAURETTI, G. R. et al. Avaliação clínica comparativa entre a cetamina e a clonidina por via peridural no tratamento da dor crônica neuropática. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p. 34-40, 2002.
- LEÃO-FERREIRA, K. A.S. et al. Prevalence of chronic pain in a metropolitan area of a developing country: a population-based study. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 74, n. 12, p. 990-998, 2016.

- LECKER, Irene et al. Physical contact promotes the development of emotional contagion between mice. **Neuroscience**, v. 464, p. 126-132, 2021.
- LIMA-COSTA, M. F. et al. Cohort profile: The Brazilian longitudinal study of ageing (ELSI-Brazil). **International Journal of Epidemiology**, v. 52, n. 1, p. e57-e65, 2023.
- LIU, Z. Y.; ZHUANG, D. B.; LUNDERBERG, T.; YU, L. C. Involvement of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. **Neuroscience**, v. 112, n. 2, p. 399-407, 2002.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacol**, v. 92, p.180-185, 1987.
- LLORCA-TORRALBA, M. et al. Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. **Neuroscience**, v. 338, p. 93–113, 3 dez. 2016.
- MAKAU, C. M. et al. Intrathecal administration of clonidine or yohimbine decreases the nociceptive behavior caused by formalin injection in the marsh terrapin (*Pelomedusa subrufa*). **Brain and Behavior**, v. 4, n. 6, p. 850-857, 2014.
- MARTIN, L. J.; TUTTLE, A. H.; MOGIL, J. S. The interaction between pain and social behavior in humans and rodents. **Behavioral neurobiology of chronic pain**, p. 233-250, 2014.
- MOLLACE, V. et al. The effects of phosphatidylserine on the decreased cardiovascular response to clonidine microinfused into the nucleus tractus solitarii of old rats. **British journal of pharmacology**, v. 100, n. 3, p. 547-551, 1990.
- MOCHCOVITCH, M. D.; DA ROCHA FREIRE, R. C.; GARCIA, R. F; NARDI, A. E. A systematic review of fMRI studies in generalized anxiety disorder: evaluating its neural and cognitive basis. **Journal of Affective Disorders**, v. 167, p. 336-342, 2014.

MOSHOFISKY, K. J. The role of sex and ovarian cycles in rodent behavioral and physiological variability. **Honors Project**, Smith College, 2017.

MOYA-ALBIOL, L.; HERRERO, N.; BERNAL, M. Consuelo. The neural bases of empathy. **Rev Neurol**, v. 50, n. 2, p. 89-100, 2010.

MUNGER, B. L.; BENNETT, G. J.; KAJANDER, K. C. An experimental painful peripheral neuropathy due to nerve constriction: I. Axonal pathology in the sciatic nerve. **Experimental neurology**, v. 118, n. 2, p. 204-214, 1992.

MWOBOBIA, R. M.; KANUI, T. I.; ABELSON, K. S. P. The effects of clonidine and yohimbine in the tail flick and hot plate tests in the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). **BMC research notes**, v. 14, p. 1-5, 2021.

NASCIMENTO, D. C. H.; SAKATA, R. K. Dependência de opioide em pacientes com dor crônica. **Revista dor**, v. 12, p. 160-165, 2011.

NITANDA A.; YASUNAMI N.; TOKUMO K.; FUJII H.; HIRAI T.; NISHIO H. Contribution of the peripheral 5-HT_{2A} receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. **Neurochemistry international**, v. 47, p. 394-400, 2005.

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**, v.150, n.3, p. 300-310, 2000.

ORTIZ, J. P.; HEINRICHER, M. M.; SELDEN, N. R. Noradrenergic agonist administration into the central nucleus of the amygdala increases the tail-flick latency in lightly anesthetized rats. **Neuroscience**, v. 148, n. 3, p. 737-743, 2007.

OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Absence of antinociceptive effect of alpha-2 agonists microinjected in the periaqueductal gray of the rat. **Brain research**, v. 289, n. 1-2, p. 349-354, 1983.

- OSUCH, E. A.; KETTER, T. A.; KIMBRELL, T. A.; GEORGE, M. S.; BENSON, B. E.; HERSCOVITCH, M. W. W.; POST, R. M. Regional cerebral metabolism associated with anxiety symptoms in affective disorder patients. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 10, p. 1020-1023, 2000.
- PANKSEPP, J. B.; LAHVIS, G. P. Rodent empathy and affective neuroscience. **Neuroscience and Biobehavior Review**, v. 35, n. 9, p. 1864-75, 2011.
- PEREIRA, D. F. et al. Comparação do impacto da melatonina e clonidina na dor e ansiedade pós-operatórias de pacientes submetidas a histerectomia abdominal. **Salão de Iniciação Científica. Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2008.**
- PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Progress in Neurobiology**, v. 80, n. 2, p. 53-83, out. 2006.
- PESOLD, C.; TREIT, D. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Brain Research**, v. 671, p. 213-221, 1995.
- PRESTON, S. D.; DE WAAL, F. B. Empathy: Its ultimate and proximate bases. **Behavioral and brain sciences**, v. 25, n. 1, p. 1-20, 2002.
- 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**, v.52, p. 297-303, 1995b.
- ROMAN, A. A. S. R. Participação do óxido nítrico no efeito sedativo e antinociceptivo dos agonistas α_2 - adrenérgicos. **app.uff.br**, 30 mar. 2004.
- SAGEN, J.; PROUDFIT, H. K. Evidence for pain modulation by pre-and postsynaptic noradrenergic receptors in the medulla oblongata. **Brain research**, v. 331, n. 2, p. 285-293, 1985.

SAMPAIO, L. R.; CAMINO, C. P. S.; ROAZZI, A. Revisão de aspectos conceituais, teóricos e metodológicos da empatia. **Psicologia: Ciência e Profissão**, v. 29, n. 2, p. 212–227, 2009.

SCHAIBLE, H.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's archives of surgery**, v. 389, p. 237-243, 2004.

SCHEININ, M. et al. Distribution of $\alpha 2$ -adrenergic receptor subtype gene expression in rat brain. **Molecular Brain Research**, v. 21, n. 1-2, p. 133–149, jan. 1994.

SCHULZ, B.; FENDT, M.; SCHNITZLER, H. Clonidine injections into the lateral nucleus of the amygdala block acquisition and expression of fear-potentiated startle. **European Journal of neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 151-157, 2002.

SCHWEIMER, J.; FENDT, M.; SCHNITZLER, H. Effects of clonidine injections into the bed nucleus of the stria terminalis on fear and anxiety behavior in rats. **European journal of pharmacology**, v. 507, n. 1-3, p. 117-124, 2005.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, n. 2, p. 205-218, 1990.

SHAMAY-TSOORY, S. G. The Neural Bases for Empathy. **The Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 18–24, 2011.

SINGER, T.; SEYMOUR, B.; O DOHERTY, J.; KAUBE, H.; DOLAN, R. J.; FRITH, C.D. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. **Science**, v.303, p.1157-1162, 2004.

SIVASELVACHANDRAN, S.; ACLAND, E. L.; ABDALLAH, S.; MARTIN, L. J. Behavioral and mechanistic insight into rodent empathy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 91, p. 130-137, 2018.

SMITH, M. L.; ASADA, N.; MALENKA, R. C. Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia. **Science**, v. 371, n. 6525, p. 153-159, 2021.

TAVARES, L.R.R. et al. A. 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. **Social Neuroscience**, v.16, n.5, p. 534-548, 2021.

TEIXEIRA, M. J. et al. Fisiopatologia da dor. **Fisiopatologia da dor**. Porto Alegre: Artmed, p. 145-75p, 2009.

TORK, I. Raphe nuclei and serotonin containing systems. **The rat nervous system**, v. 2, p. 43-78, 1985.

TORREÃO, L. Uso de opioides em pacientes terminais: sedação ou eutanásia?. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, p. 123-123, 2003.

VAN HEES, J.; GYBELS, J. C. Nociceptor activity in human nerve during painful and non painful skin stimulation. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 44, n. 7, p. 600-607, 1981.

WANG, Y. et al. Cingulate alpha-2A adrenoceptors mediate the effects of clonidine on spontaneous pain induced by peripheral nerve injury. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 289, 2017.

WU, Z. et al. Activation and blockade of α 2-adrenoceptors in the prelimbic cortex regulate anxiety-like behaviors in hemiparkinsonian rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 519, n. 4, p. 697-704, 2019.

ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F. G. Behavioral effects of intra-amygdala injections of GABA and 5-HT acting drugs in the elevated plus-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, p. 2453-2456, 1994.

ZANIBONI, C. R. et al. Empathy for pain: insula inactivation and systemic treatment with midazolam reverses the hyperalgesia induced by cohabitation with a pair in chronic pain condition. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 278, 2018.

ZARETSKY, D. V. et al. Yohimbine is a 5-HT_{1A} agonist in rats in doses exceeding 1 mg/kg. **Neuroscience letters**, v. 606, p. 215-219, 2015.

ZHOU, S. et al. Enhancement of behavioral nociceptive responses but not itching responses by viewing mirror images in adult mice. **Molecular Pain**, v. 18, p. 1744806922111158, 2022.

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

8. ANEXOS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Envolvimento dos receptores alfa-2 adrenérgicos do córtex cingulado anterior 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 8413010823 (ID 001896), sob a responsabilidade de **Azair Liane Matos do Canto de Souza e equipe; Lara Maria Silveira; Raphael Christian Brandão de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 25/08/2023.

We certify that the proposal "Involvement of alpha-2 adrenergic receptors in the anterior cingulate cortex in the modulation of anxiety and nociception induced by living with a conspecific with chronic pain in male and female mice.", utilizing 960 Heterogenics mice (480 males and 480 females), protocol number CEUA 8413010823 (ID 001896), under the responsibility of **Azair Liane Matos do Canto de Souza and team; Lara Maria Silveira; Raphael Christian Brandão de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/25/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

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

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

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

