



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

**O ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PREVINE COMPORTAMENTOS DO
TIPO ANSIOSO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE
EMPATIA PELA DOR**

Ma. Isabela Miranda Carmona

**São Carlos
2023**

ISABELA MIRANDA CARMONA

**O ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL PREVINE COMPORTAMENTOS DO
TIPO ANSIOSO EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE
EMPATIA PELA DOR**

**Tese apresentada ao programa
Interinstitucional UFSCar/UNESP de
Pós-graduação em Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal
de São Carlos, para obtenção de título
de doutora em Ciências Fisiológicas**

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

**Coorientação: Dr. Paulo Eduardo
Carneiro de Oliveira**

São Carlos

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Isabela Miranda Carmona, realizada em 27/10/2023.

Comissão Julgadora:

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

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel (UFU)

Profa. Dra. Deborah Suchecki (UNIFESP)

Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari (UNESP)

Profa. Dra. Amanda Ribeiro de Oliveira (UFSCar)

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

DEDICATÓRIA

Dedico a todas as mulheres da nossa história, às mulheres da minha vida que me mostraram como podemos ser capazes de sermos nós mesmas, de atingirmos nossos objetivos, cuidando dos nossos desejos e acreditando que somos importantes. Somos mais do que pensamos. E que nunca é tarde para buscarmos o nosso bem...nunca é tarde.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a todos os camundongos que participaram desse estudo e contribuíram mais uma vez para o desenvolvimento da neurociência.

Agradeço a todos que me apoiaram intensamente e cuidadosamente me acolheram com muito carinho, principalmente nos momentos que estive mais perdida, desesperançosa e desmotivada. Posso dizer que estou cercada de pessoas que me amam muito.

Agradeço ao meu parceiro de pesquisa, minha alma gêmea científica, Paulo Eduardo, que há sete anos entrou na minha vida acadêmica e me mostrou como posso ser uma excelente pesquisadora. Os seus ensinamentos e sua forma de me estimular me fizeram acreditar que tenho toda a capacidade de pensar cientificamente, ensinar, e desenvolver estudos que tragam contribuições para a ciência tanto básica quanto clínica, afinal sou psicóloga. Nossa parceria foi recíproca e hoje sei que ainda teremos muito o que aprender e construir juntos já que hoje somos também parceiros de vida. Muito obrigada por me fazer alguém melhor!

Agradeço aos grandes amigos que o percurso acadêmico me concedeu. Pessoas incríveis que tornaram meus dias mais alegres e leves. Anna Cecília que com toda sua introspecção funcional e braveza enrustida sempre esteve disponível e de prontidão para me apoiar e ajudar, minha querida moonlight. Dona Lara Maria com seu jeito manhoso e às vezes ácido muitas vezes me ajudou a preparar fórmulas e ouvia meus anseios. Liginha minha querida nanica, sempre disposta a participar e a vestir a camisa, seu jeito dedicado, proativo e comprometido me serviram de exemplo para continuar, mesmo sendo a bravinha do laboratório sempre foi gentil e amorosa comigo. Grandes discussões com meu querido Luiz, sempre me provocando com seu sarcasmo científico, muitas vezes me ajudou a entender conceitos e hipotetizar situações. Ainda tenho maravilhosas amigas que deixaram saudade depois que seguiram seus caminhos, Carol minha caixinha da empatia, mesmo distante ainda temos nossa ressonância afetiva. Aura, minha Aurepas, membra do nosso bonde diário Araraquara-São Carlos, seu amor, sua compaixão, sua escuta carinhosa, toda sua luz cativa a todos, sempre de bem com a vida.

Agradeço a minha amiga/irmã de infância, Bruna, que me acolheu desde que iniciei uma nova fase da minha vida, todo apoio e todo amor foram imprescindíveis para que eu pudesse continuar caminhando, acreditando que eu conseguiria vencer as fases difíceis.

Agradeço a minha mãe Suzel e ao meu pai José, pelo suporte, pela dedicação, pela paciência, por me ouvirem e apoiarem minhas decisões. Nos momentos mais difíceis, vocês estavam lá para segurar minha mão.

Agradeço aos meus irmãos, Janaina e Junior, minhas raízes, minha reabilitação da alma.

Agradeço a minha nova família, os Carneiro de Oliveira que me acolheram, me ouviram e me ensinaram como é importante termos laços que nos fortalecem quando mais precisamos.

Agradeço a todos os professores que desde o início da minha trajetória escolar até hoje, de uma forma ou de outra, me ajudaram a construir minha formação e minha conduta como pessoa, psicóloga e pesquisadora.

Agradeço ao Dr. Fábio Cardoso Cruz, professor da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) que apoiou nosso trabalho, e cedeu seu laboratório e seus materiais para que pudéssemos executar uma parte do meu doutorado.

Agradeço a Paula Cristina Bianchi que me ensinou os procedimentos necessários para realização das minhas análises de imuno-histoquímica e ainda esteve comigo durante as etapas me ajudando. Ainda me acolheu em sua casa, muito querida.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza, que possibilitou meu ingresso à neurociência. A partir disso, percebi a minha afinidade pela pesquisa e minha vontade de continuar nesse caminho se fortaleceu. Agradeço por permitir que pudesse desenvolver meu projeto de acordo com meus interesses e por acreditar na competência do meu trabalho.

Agradeço aos membros da banca pelo aceite em contribuir para avaliação do meu trabalho. Igualmente, por dedicarem o seu tempo para correção da minha tese. A contribuição e o conhecimento de vocês são fundamentais para conclusão dessa etapa e para o desenvolvimento da minha carreira.

Agradeço à secretaria do Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP.

Agradeço ao laboratório de Neuropsicofarmacologia da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP).

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento concedido ao meu trabalho de pesquisa.

Agradeço a Deus por sempre me ouvir e sempre estar comigo, me mostrando que existem coisas boas na nossa vida.

RESUMO

A empatia é a capacidade de compartilhar emoções na qual possibilita prever e compreender os sentimentos, ações e motivações do outro. Em modelos animais, a empatia pode ser estudada por meio de protocolos experimentais que investigam as reações comportamentais de coespecíficos que são submetidos a experimentar o sofrimento de seus parceiros. Nesse âmbito, dados do nosso grupo de pesquisa têm mostrado aumento de comportamentos relacionados à ansiedade em camundongos alojados com seus coespecíficos submetidos à lesão crônica do nervo ciático. Essas evidências nos encorajaram a buscar uma alternativa não farmacológica que amenizasse o impacto de se conviver com o parceiro sujeito à dor crônica. Assim, a presente pesquisa teve como principal objetivo analisar os efeitos do enriquecimento ambiental (EA) no comportamento do tipo ansioso em camundongos expostos ao paradigma da empatia pela dor e testados no labirinto em cruz elevado (LCE). Adicionalmente, investigamos o padrão de ativação neuronal dos núcleos basolateral e central da amígdala, e das subáreas CA1 (cornu ammonis 1) e giro denteado do hipocampo dorsal. Para isso, camundongos machos da linhagem Swiss foram expostos a um protocolo de 28 dias de convívio. No 21º dia após o nascimento (dia pós-natal; PND 21), os camundongos foram alojados em pares (observador e demonstrador) por 14 dias para o estabelecimento de familiaridade. No 14º dia (PND 35), todos os demonstradores foram submetidos (demonstrador CNC) ou não (demonstrador Sham) a cirurgia de constrição no nervo ciático. Após esse procedimento, os pares foram alojados em ambiente sem enriquecimento (SE) ou com enriquecimento ambiental (EA). No 28º dia (PND 42), os animais observadores e demonstradores foram expostos ao LCE. Nossos achados mostraram que o EA foi capaz de prevenir o efeito ansiogênico induzido pelo protocolo de empatia pela dor. Além disso, constatamos que demonstradores CNC apresentaram aumento de respostas relacionadas à ansiedade que foram amenizadas após exposição ao EA. Interessantemente, observamos que nos demonstradores CNC, o EA reduziu significativamente a hipersensibilidade a estímulos térmicos, mas não a eliminou completamente. Ainda, a condição CNC foi capaz de diminuir a ativação do hipocampo dorsal, mas não da amígdala, tanto no demonstrador quanto no observador. Os dados indicam que os comportamentos relacionados à ansiedade compartilhados entre os parceiros foram prevenidos em animais alojados em ambientes enriquecidos. Esse corpo de evidências lança luz sobre intervenções não-farmacológicas, como a adoção de um protocolo de enriquecimento ambiental para o manejo de alterações comportamentais, configurando uma estratégia efetiva para amenizar consequências decorrentes de contextos estressantes como o convívio com a dor crônica.

Palavras-chave: Empatia. Enriquecimento ambiental. Ansiedade. Camundongos. Amígdala. Hipocampo.

ABSTRACT

Empathy is the ability to share emotions, enabling the prediction and understanding of the feelings, actions, and motivations of others. In animal models, empathy can be studied through experimental protocols that investigate the behavioral reactions of conspecifics subjected to experiencing the suffering of their partners. In this context, data from our research group have shown an increase in anxiety-related behaviors in mice housed with conspecifics subjected to chronic sciatic nerve injury. These findings encouraged us to seek a non-pharmacological alternative to alleviate the impact of living with a partner experiencing chronic pain. Thus, the main objective of the present research was to analyze the effects of environmental enrichment (EE) on anxious behavior in mice exposed to the empathy for pain paradigm and tested in the elevated plus-maze (EPM).

Additionally, we investigated the neuronal activation pattern of the basolateral and central nuclei of the amygdala, as well as the CA1 (cornu ammonis 1) subarea and dentate gyrus of the dorsal hippocampus. To achieve this, male Swiss mice were exposed to a 28-day cohabitation protocol. On the 21st day after birth (postnatal day; PND 21), mice were housed in pairs (observer and demonstrator) for 14 days to establish familiarity. On the 14th day (PND 35), all demonstrators underwent (constriction nerve injury demonstrator) or did not undergo (sham demonstrator) sciatic nerve constriction surgery. After this procedure, pairs were housed in either a standard environment (SE) or an environmentally enriched environment (EE). On the 28th day (PND 42), observer and demonstrator animals were exposed to the EPM. Our findings demonstrated that EE prevented the anxiogenic effect induced by the empathy for pain protocol.

Furthermore, we observed that constriction nerve injury demonstrators showed increased anxiety-related responses, which were alleviated after exposure to EE. Interestingly, we noted that in constriction nerve injury demonstrators, EE significantly reduced thermal sensitivity, but did not eliminate it completely. Moreover, the constriction nerve injury condition was able to decrease activation in the dorsal hippocampus but not in the amygdala, both in the demonstrator and the observer. The data indicate that anxiety-related behaviors shared between partners were prevented in animals housed in enriched environments. This body of evidence sheds light on non-pharmacological interventions, such as adopting an environmental enrichment protocol, for managing behavioral changes, providing an effective strategy to mitigate consequences resulting from stressful contexts such as living with chronic pain.

Keywords: Empathy. Enriched environment. Anxiety. Mice. Amygdala. Hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Caixa de Enriquecimento Ambiental. Foto do modelo de caixa utilizada para exposição ao enriquecimento ambiental.....**34**
- Figura 2.** Imagem representativa da caixa utilizada para o alojamento sem enriquecimento (SE).....**35**
- Figura 3.** Placa quente.....**35**
- Figura 4.** Labirinto em cruz elevado (LCE).....**36**
- Figura 5.** Representação esquemática do procedimento de perfusão para fixação do tecido nervoso.....**38**
- Figura 6.** Representação da linha do tempo.....**40**
- Figura 7.** Latência de retirada da pata (em segundos) no teste de placa quente. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) ($n = 17-19$). # $p < 0,05$ comparado com respectivo grupo Sham. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo SE. CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. ANOVA de duas vias.....**43**
- Figura 8.** Efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre a %EBA no LCE de camundongos (A) demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus (B) respectivos observadores. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) ($n = 17-19$). # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo Sham. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo SE. EBA: Entradas nos Braços Abertos; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. ANOVA de duas vias.....**45**
- Figura 9.** Efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre a %TBA no LCE de camundongos (A) demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus (B) respectivos observadores. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) ($n = 17-19$). # $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo Sham. * $p < 0,05$ comparado ao respectivo grupo SE. TBA: Tempo Gasto nos Braços Abertos; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. ANOVA de duas vias..... **46**

Figura 10. Efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre a EBF no LCE de camundongos (A) demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus (B) respectivos observadores. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) ($n = 17-19$). # $p < 0,05$ comparado à condição Sham. * $p < 0,05$ comparado ao alojamento SE. EBF: entrada nos braços fechados; CNC: constrição do nervo ciático; SE: ambiente padrão; EA: enriquecimento ambiental. ANOVA de duas vias.....47

Figura 11. Correlação entre comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no LCE exibidos por demonstradores e observadores alojados na mesma caixa-moradia. Os gráficos apresentam a dispersão dos pontos e as retas de regressão. O valor de $p < 0,05$ indica a presença de correlação significativa entre os comportamentos. O valor de $r > 0$ indica correlação positiva. EBA: Entrada nos Braços Abertos; TBA: Tempo gasto nos Braços Abertos; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. Coeficiente de correlação de Pearson.....50

Figura 12. Esquema representativo de seção coronal referente à localização das subáreas CA1 e DG (PAXINOS; FRANKLIN, 2019) (A). Fotomicrografia da área utilizada para quantificar os núcleos imunorreativos anti-Fos nas subáreas CA1 (*cornu ammonis* 1) e DG (Giro denteado) do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores e observadores após o teste de LCE (B).....51

Figura 13. Cortes coronais representativos com destaque (setas pretas) para os núcleos imunorreativos anti-Fos na subárea CA1 do hipocampo dorsal de demonstradores e observadores após o teste no labirinto em cruz elevado. Dem: Demonstrador; Obs: Observador; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: enriquecimento ambiental.....52

Figura 14. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm^2 de tecido extraído da sub-região CA1 do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores (A) e observadores (B) nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE ou EA. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média ($M \pm EPM$) ($n = 2-6$). # $p < 0,05$ comparado à condição Sham. * $p < 0,05$ comparado ao alojamento SE. CA: *Cornu Ammonis*; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: Imunorreativo. ANOVA de duas vias.....53

Figura 15. Cortes coronais representativos com destaque (setas pretas) para os núcleos imunorreativos anti-Fos na subárea DG do hipocampo dorsal de demonstradores e observadores após o teste no labirinto em cruz elevado. DG: Giro Denteado; Dem: Demonstrador; Obs: Observador; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental.....54

Figura 16. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm² de tecido extraído da sub-região DG do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores (A) e observadores (B) nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE ou ambiente enriquecido. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M± EPM) (n=2-6). *p<0,05 comparado ao alojamento SE. DG: Giro Denteado; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: Imunorreativo. ANOVA de duas vias.....55

Figura 17. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm² de tecido extraído da sub-região CA1 do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores e observadores nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE. As barras representam os valores das médias ± EPM (n=2-6). #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham. CA: *Cornu Ammonis*; SE: Sem Enriquecimento; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: imunorreativo. Teste t de Student.....57

Figura 18. Fotomicrografia da área utilizada para quantificar os núcleos imunorreativos anti-Fos nas subáreas basolateral (BLA) e central (CeA) da amígdala de camundongos demonstradores e observadores após o teste de LCE (A). Esquema representativo de seção coronal referente à localização das subáreas BLA e CeA(B).....58

Figura 19. Cortes coronais representativos com destaque (setas pretas) para os núcleos imunorreativos anti-Fos na subárea basolateral da amígdala de demonstradores e observadores após o teste no labirinto em cruz elevado. BLA: Basolateral; Dem: Demonstrador; Obs: Observador; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental.....58

Figura 20. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm² de tecido extraído da sub-região BLA da amígdala de camundongos demonstradores (A) e observadores (B) nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE ou EA. As barras representam os valores das médias ± EPM (n=2-6). #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham. *p<0,05 comparado ao alojamento SE. BLA: Basolateral; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: Imunorreativo. ANOVA de duas vias.....60

Figura 21. Cortes coronais representativos com destaque (setas pretas) para os núcleos imunorreativos anti-Fos na subárea central da amígdala de demonstradores e observadores após o teste no labirinto em cruz elevado. CeA: Amígdala Central; Dem: Demonstrador; Obs: Observador; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental.....60

Figura 22. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm² de tecido extraído da sub-região central da amígdala de camundongos demonstradores (A) e observadores (B) nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE ou ambiente enriquecido. As barras representam os valores das médias e o erro padrão da média (M± EPM) (n=2-6). #p<0,05 comparado à condição Sham. CeA: Amígdala Central; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: Imunorreativo. ANOVA de duas vias.....**62**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos formados para o estudo.....	39
Tabela 2. Total de camundongos utilizados no labirinto em cruz elevado.....	41
Tabela 3. Comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no labirinto em cruz elevado, em demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus respectivos parceiros observadores alojados em ambiente padrão ou ambiente enriquecido.....	49
Tabela 4. Correlação entre os comportamentos complementares relacionados à ansiedade avaliados no LCE exibidos por demonstradores e observadores alojados na mesma caixa-moradia.....	50
Tabela 5. Número de núcleos imunorreativos para a proteína Fos por mm ² de tecido extraído das sub-regiões CA1 e DG do hipocampo dorsal de demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus respectivos parceiros observadores alojados em ambiente SE ou ambiente enriquecido.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

BLA: Grupo (amígdala) basolateral

CeA: Grupo (amígdala) central

LCE: Labirinto em cruz elevado aberto

BSNT: Núcleo do leito da estria terminal

EA: Enriquecimento ambiental

HD: Hipocampo dorsal

HV: Hipocampo ventral

CA: *Cornu ammonis*

DG: Giro denteado

5-HT1A: Receptor de serotonina subtipo 1A

SE: Sem enriquecimento

mg/kg: Miligrama por quilo

i.p: Intraperitoneal

mm: Milímetro

CNC: Grupo constrição do nervo ciático

Sham: Grupo sem constrição do nervo ciático

cm: centímetro

SAP: stretched attend posture

PBS: Tampão fosfato salino

H₂O_d: água destilada

KH₂PO₄: Fosfato de Potássio Monobásico

K₂HPO₄: Fosfato de Potássio Dibásico

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

NaH₂PO₄: Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado

M: Molar

°C: Celsius

µm: Micrômetro

PND: Pós-natal

ANOVA: Análise de variância

Dem: Demonstrador

EBA: Entradas nos braços abertos

Obs: Observador

TBA: Tempo gasto nos braços abertos

EBF: Entrada nos braços fechados

DG: Giro denteado

mm²: Milímetro ao quadrado

IR: Imunorreativo.

LISTA DE SIGLAS

fMRI: ressonância magnética funcional

EEG: eletroencefalografia

IASP: International Association for the Study of Pain

DSM-5: 5ª versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais

OMS: Organização Mundial de Saúde

CEUA/UFSCar: Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS.....	31
OBJETIVO GERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
SUJEITOS.....	34
ÉTICA.....	34
CONSTRIÇÃO DO NERVO CIÁTICO.....	34
TIPOS DE ALOJAMENTO.....	35
Enriquecimento ambiental.....	35
Alojamento sem enriquecimento ambiental.....	36
TESTE DA PLACA QUENTE.....	36
LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	37
PERFUSÃO E SECÇÕES CORONAIS DO ENCÉFALO.....	38
IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	39
PROCEDIMENTO GERAL.....	40
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
RESULTADOS.....	43
Avaliação da efetividade da constrição do nervo ciático em camundongos demonstradores: teste da placa quente.....	44
Avaliação dos efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental em camundongos demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e camundongos observadores, avaliados no labirinto em cruz elevado.....	45
Correlação entre os comportamentos relacionados à ansiedade exibidos por demonstradores e observadores alojados na mesma caixa-moradia.....	50
Avaliação da participação das subáreas CA1 e giro denteado do hipocampo dorsal nos comportamentos relacionados à ansiedade em demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e observadores, expostos ao enriquecimento ambiental.....	52
Avaliação da participação das subáreas basolateral e central da amígdala nos comportamentos relacionados à ansiedade em demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e observadores, expostos ao enriquecimento ambiental.....	58
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

Introdução

Ainda hoje, estudar e conceituar a empatia e suas bases psicobiológicas continua sendo um desafio. Apesar disso, dispomos de diversas pesquisas recentes que sugerem que a empatia é constituída por componentes emocionais e sociais fortemente ressonantes, que configura um determinante crucial para a sobrevivência das espécies, possibilitando a detecção de estados afetivos uns dos outros (GONZALEZ–LIENCRES et al.,2014).

Antes mesmo do surgimento do termo empatia, Charles Darwin (1809-1882) deu início a uma sequência de estudos que descrevia sobre a evolução da expressão das emoções dos homens que de certa maneira estava relacionada a ancestralidade de outros animais, ou seja, a expressão das emoções foi conservada. Por exemplo, existem algumas similaridades expressivas como reações de medo, identificadas tanto em humanos quanto em macacos (DARWIN, 2009). Entretanto, munido apenas do método observacional, Darwin não pode sugerir a presença da intersubjetividade nas espécies estudadas (FRANKEL, 2017).

A intersubjetividade refere-se à capacidade de perceber a experiência vivida do outro (GALLESE, 2003; STERN, 2005). Na tentativa de explicar esse fenômeno, o psicólogo Edward Titchener (1867-1927) influenciado por teóricos alemães que implementaram o conceito de “Einfühlung”¹ – significado literal de sentir, e refere-se à ação de se projetar em outro corpo ou ambiente – transpôs esse termo para o contexto clínico para denominar como um indivíduo consegue assimilar as emoções do outro (GANCZAREK et al., 2018; STUEBER, 2019). Com base nisso, Titchener introduziu o termo “Empathy” para descrever a capacidade dos indivíduos em compartilhar emoções, percebê-las e compreendê-las por meio de suas inter-relações (FRANKEL, 2017). Titchener associa a empatia a uma ativação cinestésica correspondente nos músculos mentais, o que significa que a experiência empática vai além da simples observação e envolve uma resposta física ou emocional interna (TITCHENER, 1909).

A partir disso, pesquisas se sucederam trazendo o conceito empatia como a capacidade de compartilhar emoções, na qual possibilita predizer e compreender os

¹Refere-se a uma tomada de perspectiva corporal imaginária, que busca compreender como seria viver em outro corpo ou outro ambiente. Vale ressaltar, o outro corpo ou o outro ambiente onde se “sente” não precisa necessariamente estar fisicamente presente, podendo ser somente representado, ou até mesmo imaginado. Por exemplo, “sentir em” uma paisagem pintada ou descrita verbalmente, é supostamente possível compreender como seria estar naquela paisagem.

sentimentos, ações e motivações do outro (SINGER, 2006; BERNHARDT; SINGER, 2012). De uma forma geral, existem três comportamentos básicos relacionados a empatia caracterizados por sentir o que o outro está sentindo (contágio/ressonância afetiva); perceber e compreender o que o outro está sentindo e; ter alguma intenção de mitigar o sofrimento do outro. Essa classificação reúne componentes cognitivos e afetivos que levam o indivíduo a refletir e agir frente ao contexto e ao estado emocional - conjunto de emoções predominantes experimentadas por um indivíduo em determinado momento - do outro (DECETY; JACKSON, 2004; ZAKI; OCHSNER, 2012).

Segundo Preston e Hofelich (2012) a empatia abrange processos que levam os indivíduos a entenderem e sentirem o estado emocional que estão observando por meio da percepção direta ou imaginação. Esses processos são tidos como subclasses que compõem a empatia, como o contágio emocional (um fenômeno psicológico no qual as emoções de um indivíduo afetam diretamente as emoções do outro), comportamento de ajuda (se refere à disposição em ajudar ou assistir os outros em sofrimento), empatia cognitiva (capacidade de compreender e entender os pensamentos, sentimentos e perspectivas de outro indivíduo), entre outras, todas compartilhando um mesmo mecanismo em comum, o mecanismo de ação-percepção (PRESTON; DE WAAL, 2002; SIVASELVACHANDRAN et al., 2018). De acordo com a premissa do modelo de ação-percepção, a percepção do comportamento de um indivíduo, ativa automaticamente as representações desse comportamento no observador (SINGER et al., 2004). Além disso, essa representação compartilhada, automaticamente, recruta áreas cerebrais motoras (PRESTON; DE WAAL, 2002).

Inicialmente, a observação de respostas a partir da percepção do outro foi vinculada a neurônios especializados identificados em pesquisas realizadas com macacos Rhesus. Nesses estudos foi demonstrado a ativação de neurônios localizados no córtex pré-motor – região somatotopicamente organizada que se projeta para o córtex motor e para diversas estruturas motoras subcorticais, sendo responsável pela programação das funções motoras – especificadamente, na área cortical F5 que está relacionada a comandos motores da boca e das mãos (BRANDÃO, 2004; FERREIRA et al., 2017).

Além disso, foi detectado ativação de neurônios situados no lóbulo parietal inferior – região associada a percepção do corpo no espaço (MACHADO, 2006) – dos macacos

ao assistirem ações realizadas por seus similares. Com isso, foi proposto que esses neurônios disparam não somente quando o macaco está executando um movimento como segurar um objeto, mas igualmente quando observa passivamente outro macaco executar um movimento semelhante (DI PELLEGRINO et al., 1992; GALLESE et al., 1996; RIZZOLATTI et al., 1996; FERRARI et al., 2003; CAGGIANO et al., 2009; COOK et al., 2014). Assim, essa sobreposição a nível neural caracterizada pela função de associar as ações observadas e executadas, levou os pesquisadores a denominarem esses neurônios de neurônios-espelho (KILNER; LEMON, 2013).

Posteriormente, em estudos clínicos que realizaram ressonância magnética funcional (fMRI) e eletroencefalografia (EEG) em humanos, igualmente foi detectado atividade de neurônios-espelho situados no córtex pré-motor (FERRI et al., 2015), lóbulo parietal inferior (RIZZOLATTI, 2005; ARNSTEIN et al., 2011; MOLENBERGHS et al., 2012), ainda no córtex motor primário (FADIGA et al., 2005), região responsável por ações específicas motoras como velocidade, direção, força e aceleração (ROLAND et al., 1980) e no hipocampo (MUKAMEL et al., 2010), que já desempenha um importante papel em processos de aprendizagem, memória, comportamentos emocionais e motivacionais (BRANDÃO, 2004).

Esses resultados a respeito da atividade dos neurônios-espelho passaram a caracterizar o modelo de ação-percepção, que mais tarde, foi implicado para o entendimento do funcionamento de processos cognitivos. Nesse sentido, a observação de uma simples ação motora não abrange apenas o “observar”, mas também a detecção de aspectos sensoriais referentes a ação, mecanismos de atenção, atribuição de sentido à situação, compreensão de intenções e comunicação para interação social (PULVERMÜLLER et al., 2014). Inclusive, ressalta-se que as emoções dos outros podem ser percebidas devido a representações pessoais já incorporadas, possibilitando que a empatia ocorra em virtude das experiências anteriores do observador (DE WAAL; PRESTON, 2017).

À vista disso, pesquisas têm sugerido que o modelo de ação-percepção desempenha um importante papel na compreensão das emoções de outros indivíduos (AGNEW et al., 2007; GALLESE et al., 2004; PINEDA; HECHT, 2009; WICKER et al., 2003). Uma das formas utilizadas para identificar essa relação foi a partir de estudos de percepção e

observação de um estímulo doloroso. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, International Association for the Study of Pain, 2020), a dor envolve uma experiência sensorial e emocional desagradável que pode produzir a ativação de componentes perceptivos, sensoriais, afetivo-emocionais e cognitivos no indivíduo. Em razão disso, se configura como uma ferramenta cabível para o estudo da reverberação de estados emocionais.

Sob esse aspecto, Singer e colaboradores (2004) investigaram circuitos relacionados a dor experienciada e observada. Para isso, recrutaram 16 casais e utilizaram a fMRI com o objetivo de verificar os disparos neurais nos indivíduos ao receberem e ao observarem seus parceiros receberem uma estimulação dolorosa aplicada por meio de um eletrodo alocado no dorso da mão. A fMRI detectou ativação de estruturas envolvidas na matriz da dor como córtex insular, córtex cingulado anterior, córtex somatosensorial, tronco encefálico, cerebelo e tálamo nos indivíduos que receberam o estímulo. Já nos observadores do estímulo doloroso foi detectado mais robustamente a ativação do córtex cingulado anterior e córtex insular. Interessantemente, esses resultados sugerem que a empatia pela dor envolve componentes afetivos da dor e não somente estruturas relacionadas a modulação da dor (SINGER et al., 2004). Nesse âmbito, Lamm e colaboradores (2011) em uma meta-análise reuniram resultados de diversos estudos de imagem e de diferentes paradigmas que demonstraram a participação dos córtices insular e anterior cingulado nos comportamentos relacionados a empatia pela dor. Vale ressaltar que essas estruturas integram uma rede neural vinculada a cognição social, um processo neurobiológico que possibilita aos indivíduos assimilarem e agirem de forma adequada frente aos estados afetivos do outro (BUTMAN; ALLEGRI, 2001).

Sob outro ponto vista, estudos de neuroimagem funcional com pacientes que sofreram um acidente cerebral isquêmico agudo no hemisfério direito têm revelado a importância de certas regiões cerebrais para a capacidade de realizar inferências sobre o comportamento emocional dos outros. algumas regiões específicas dos circuitos neuronais devem estar parcialmente preservadas para que o indivíduo possa realizar inferências precisas sobre o comportamento emocional dos outros. Isso pode incluir áreas como o córtex pré-frontal ventromedial, giro orbitofrontal, ínsula anterior, córtex cingulado anterior, lobo temporal, amígdala e junção temporoparietal (LEIGH et al.,

2013). Ainda, lesões cerebrais na amígdala e córtex insular podem produzir prejuízos na empatia afetiva – capacidade de sentir o que o outro sente – em contrapartida, a empatia cognitiva – capacidade de inferência do estado emocional do outro – é seletivamente prejudicada devido a lesões no córtex pré-frontal medial (HURLEMANN et al., 2010; SHAMAY-TSOORY et al., 2009).

Em síntese, as evidências nos mostram que a rede neurobiológica envolvida na empatia engloba áreas como hipocampo, amígdala e regiões como o córtex cingulado anterior (LANGFORD et al., 2006). A princípio, respostas relacionadas a empatia estavam associadas ao comportamento motor e ao espelhamento de disparos neuronais referentes a ação motora observada. Posteriormente, estudos científicos possibilitaram ampliar a concepção sobre a empatia, incluindo comportamentos mais complexos relacionados a funções cognitivas como assimilar, inferir e agir frente ao estado emocional do outro, além de identificar algumas regiões do aparato neuronal envolvidas na emissão dessas respostas (PULVERMÜLLER et al., 2014).

A empatia foi por muito tempo considerada uma capacidade exclusiva do homem. Com advento das contribuições de Darwin, pesquisadores passaram a considerar que essa capacidade poderia estar presente no repertório de outros animais, dando início a uma sequência de estudos que fomentaram evidências relevantes a respeito do comportamento empático em macacos, porcos, cachorros e roedores (CARVENALLI et al., 2020). Isso possibilitou a investigação das bases biológicas da empatia e sua relação com os estados emocionais e comportamentos, o que proporciona novos olhares sobre o entendimento do caráter emocional e social dos seres humanos (SINGER et al., 2004; LANGFORD et al., 2006; SINGER; LAMM, 2009; BERNHARDT; SINGER, 2012). Nesse sentido, tais aspectos podem ser estudados por meio de estados emocionais negativos como a dor, medo ou ansiedade que decorrem do contágio afetivo entre os animais (MEYZA et al., 2017).

A propósito, modelos de roedores para investigar processos relacionados à empatia foram publicados desde o trabalho de Church sobre as reações emocionais de ratos que observaram seus coespecíficos expostos a choques nas patas (Church 1959). No entanto, o conceito de “empatia” só foi sugerido diretamente pela primeira vez no trabalho de Langford e colaboradores (2006) que mostraram a influência do convívio na percepção

dolorosa. Essas evidências indicaram que a observação de um coespecífico submetido a estímulos dolorosos pode intensificar a sensibilidade a dor nos camundongos observadores. na dor aumentou a sensibilidade nociceptiva em camundongos. A partir disso, outros paradigmas com roedores têm sido usados para abordar diferentes processos relacionados à empatia, como comportamento pró-social, medo observado, empatia pela dor e contágio emocional (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015, PANKSEPP; LAHVIS 2011; SIVASELVACHANDRAN et al., 2016; KEUM; SHIN 2016; MEYZA et al., 2017, 2018; CARNEIRO DE OLIVERIA et al., 2017; MEYZA; KNAPSKA, 2018; CARNEVALI et al., 2020; RODRIGUES TAVARES et al., 2021).

Evidências do grupo de pesquisa de Bartal (2011, 2014, 2016) observaram que ratos demonstram comportamento pró-social caracterizado pelo resgate de seus parceiros de caixa-moradia presos ao cilindro de contenção. Blystad e colaboradores (2019) observaram que ratos Sprague-Dawley preferem libertar seus coespecíficos ao invés de abrir um compartimento com alimento. Além disso, essa resposta foi mais frequente na presença do parceiro mantido em tubo de contenção do que na presença dos tubos que continham alimento ou estavam vazios. Adicionalmente, mais um método para avaliar um comportamento pró-social em roedores é por meio do modelo de autismo induzido pelo ácido valpróico. Fontes-Dutra e colaboradores (2019) mostraram que ratos Wistar submetidos à exposição pré-natal ao ácido valpróico aumentaram a latência da resposta de libertar o seu parceiro preso a um tubo em relação aos animais controle. No entanto, isso não significa que os ratos não apresentem um comportamento do tipo empático, apenas levaram mais tempo para aprender, de modo que não afetou a manutenção desse comportamento após sua primeira ocorrência.

Já em paradigmas que utilizaram o medo observado para o estudo da empatia, foi evidenciado que animais observadores aumentaram a taxa de congelamento ao testemunharem choques nas patas dos seus coespecíficos em comparação com os períodos de linha de base ou pós-sofrimento (ATSAK et al., 2011; CARRILLO et al., 2019; CHOI; JEONG, 2017; GONZALEZ-LIENCRES et al., 2014; HAN et al., 2020). Sanders e colaboradores (2013) compararam a diferença entre choque nas patas e nado forçado na emissão de comportamentos relacionados a empatia em camundongos observadores. Esses autores constataram que o choque nas patas é mais eficaz para induzir

alterações comportamentais referentes ao medo observável representadas pelo aumento da resposta de congelamento.

Em se tratando de resultados obtidos pela reverberação de estados emocionais provenientes da dor, Lu e colaboradores (2018) verificaram aumento de comportamentos de consolação e hipernocicepção (resposta intensificada à dor) ao estímulo mecânico em ratos que presenciaram seus parceiros de caixa-moradia submetidos a injeção intraperitoneal de ácido acético. Similarmente, Mohammadi e colaboradores (2020) demonstraram sensibilidade a percepção dolorosa acentuada em ratos expostos a observação de seus coespecíficos expostos a injeção de formalina nas patas.

Nesse âmbito, nosso grupo de pesquisa estabeleceu uma forma de investigar a empatia pela dor e consequentes alterações comportamentais por meio de um protocolo de convivência com parceiro de caixa-moradia submetido à constrição do nervo ciático. Os nossos estudos demonstraram que a coabitação com camundongos submetidos a constrição do nervo ciático produziu hiperalgesia (condição caracterizada por uma resposta aumentada à dor) nos animais expostos ao teste de contorções abdominais (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; ZANIBONI et al., 2018; RODRIGUES TAVARES et al., 2021). Referência do nosso grupo de pesquisa igualmente mostraram que o convívio com camundongos sujeitos ao estresse crônico de contenção é capaz de causar aumento do número de contorções em coespecíficos de caixa-moradia (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017).

Vale ressaltar que não somente a alteração da dor pode ser uma evidência da ressonância de estados afetivos. Sob esse aspecto, existem estudos que apontam respostas relacionadas a ansiedade como um efeito subjacente a presença do sofrimento do outro. À vista disso, Tomiyoshi e colaboradores (2009) observaram aumento de respostas relacionadas à ansiedade em animais avaliados no LCE após coabitarem com um coespecífico inoculado por um indutor tumoral. Outro estudo, mostrou que a coabitação com um animal sob estado epiléptico ou depressivo pode aumentar respostas do tipo ansiedade em camundongos submetidos ao LCE (YANG et al., 2016). Já a partir do nosso protocolo de empatia pela dor de constrição do nervo ciático, obtivemos resultados como redução das entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE, caracterizando aumento da ansiedade que foi induzida pelo convívio (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015;

CARMONA et al., 2016; BENASSI-CEZAR et al., 2020). Ainda, nosso grupo também demonstrou aumento de comportamentos relacionados a ansiedade nos camundongos que conviveram junto a coespecíficos expostos cronicamente ao estresse de contenção (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017).

Esses resultados sugerem que por meio da avaliação de respostas relacionadas à ansiedade geradas pelo convívio, torna-se possível observar a existência de um componente emocional presente entre os animais que influencia seus comportamentos (BARTAL, et al., 2016). A ansiedade é uma emoção fundamental, de caráter evolutivo e adaptável que compõe o repertório comportamental de diversas espécies. Nesse sentido, é imprescindível para mantermos a eficiência do nosso desempenho e contribuir para a sobrevivência das espécies (STEIN; BOUWER, 1997; BRANDÃO, 2004).

Sob o ponto de vista biológico, a ansiedade está intimamente relacionada ao medo, pois, compartilham características semelhantes como respostas fisiológicas de aumento da frequência cardíaca e respiratória, aumento da motilidade intestinal, necessidade de micção, sudorese, resultando um estado emocional desconfortante (BRANDÃO, 2004; DELUCIA, 2014). Além disso, as mudanças fisiológicas podem impulsionar o indivíduo a enfrentar situações de ameaça, favorecendo processos mnemônicos e de aprendizagem por meio do aumento da atenção, da esquivas ou ainda, aumento de comportamentos de confronto (HETEM; GRAEFF 2003; JOELS; PU et al., 2006; RODRIGUES; LeDOUX et al., 2009). Vale ressaltar que medo é a resposta emocional a ameaça iminente real ou percebida, enquanto ansiedade é a antecipação de ameaça futura (APA, 2014).

Como vimos anteriormente, a ansiedade pode decorrer de situações estressoras como o convívio com a dor do outro. Da mesma forma, estudos clínicos obtiveram resultados similares ao avaliarem familiares e/ou cuidadores de pacientes acometidos por doenças crônicas. Nesse contexto, pesquisas demonstraram elevados sintomas de sofrimento psíquico, ansiedade e depressão em cônjuges de indivíduos com dor crônica (SCHWARTZ et al., 1991; LEONARD; CANO, 2006). Ainda, em diversos trabalhos, os cuidadores relataram uma vivência emocional desagradável acentuada, suscitada pela sobrecarga do cuidado e pela percepção do sofrimento do paciente, o que contribuiu para o surgimento de transtornos ansiosos e do humor depressivo (SCHULZ et al., 2007; SCHULZ; SHERWOOD, 2008; COSTA-REQUENA et al., 2012; GONZALEZ et al.,

2020). Diante desse contexto, a empatia pela dor é um fenômeno que compreende uma angústia afetiva caracterizada por sentimentos de compaixão e pela vontade de ajudar (GIUMMARRA et al., 2015).

Pesquisas de neuroimagem apontaram que observação da dor pode desencadear um estado afetivo e cognitivo que recruta estruturas neurais envolvidas na empatia (LAMM et al., 2011; HILLIS, 2014). Benuzzi e colaboradores (2018) usando a fMRI, verificaram aumento da ativação bilateral da amígdala em voluntários que assistiam vídeos de expressões faciais relacionadas a dor em comparação a expressões sem dor. Em contrapartida, jovens diagnosticados com traços de psicopatia² apresentaram redução da ativação da amígdala ao serem submetidos a uma série de imagens referentes a situações dolorosas (MARSCH et al., 2013).

Além disso, estudos pré-clínicos a respeito de estados emocionais subjacentes a percepção da dor identificaram aumento da ativação da amígdala em ratos que testemunharam seus coespecíficos receberem choques nas patas (KNASPKA et al., 2006; MIKOSZ et al., 2015). Outras pesquisas mostraram que essa estrutura também está envolvida em comportamentos pró-sociais e medo observável (JEON et al., 2010; KARAKILIC et al., 2018). Esse corpo de evidências nos mostra que a amígdala não só é responsável pela atividade do processamento emocional inato ao indivíduo, mas igualmente desempenha funções que expressam a empatia (BRANDÃO, 2004; KARAKILIC et al., 2018).

O nome “amígdala” foi cunhado pela primeira vez por Karl Friedrich Burdach no início do século XIX ao identificar uma estrutura amendoada na porção do lobo temporal anterior (PABBA, 2013). A título de curiosidade, o primeiro estudo a detectar a participação da amígdala nas reações emocionais foi o de Brown e Schäfer em 1888 após realizarem uma cirurgia de remoção bilateral do lobo temporal de macacos Rhesus. Posteriormente, Klüver e Bucy em 1937, conseguiram associar a lesão da amígdala a diminuição de comportamentos defensivos, agressividade e medo (JANAK; TYE, 2018).

Depois disso, muitos pesquisadores se interessaram em compreender mais especificidades a respeito do funcionamento da amígdala, não só por meio de lesões, mas

2 Estudos demonstraram que indivíduos diagnosticados com psicopatia possuem dissociação entre o sistema emocional e cognitivo, principalmente com deficiências no campo emocional o que pode levar a prejuízos relacionados a respostas empáticas (BLAIR, 2005)

igualmente através de estimulações elétricas que propiciaram a correlação entre o comportamento emocional e sua base biológica (BLANCHARD et al., 1971; NIEMINEM et al., 1992; RANJBAR et al., 2017).

A amígdala é constituída por múltiplos núcleos interligados que se conectam a outras estruturas neurais por meio de projeções, desempenhando respostas distintas subjacentes ao medo e a ansiedade (DAVIS, 1992). Os núcleos amigdalóides são classificados em três grupos, o basolateral (BLA) que abrange o núcleo lateral, basal e basomedial; o cortical, composto pelos núcleos do trato olfatório lateral e núcleo cortical; e o grupo centromedial que agrupa os núcleos medial e central (CeA) (SAH et al., 2003). Para o estudo em questão, focamos BLA e CeA, pois, existem fortes evidências demonstrando o crítico papel desses núcleos na ansiedade (ETKIN et al., 2009; BABAEV et al., 2018; LIU et al., 2021; BRAGA et al., 2022).

Como exemplos, Sorregotti e colaboradores (2018) observaram aumento significativo da quantidade de células positivas para a proteína Fos no BLA em camundongos após serem expostos ao labirinto em cruz elevado aberto. Nesse estudo, foi adotado esse tipo de modelo justamente para que os animais estivessem expostos a um ambiente ansiogênico, já que o labirinto não possui áreas protegidas, o que possibilita avaliar o papel dos núcleos da amígdala na modulação da ansiedade. Outra evidência sugeriu que o aumento de comportamentos relacionados a ansiedade em ratos Wistar após o estresse crônico de contenção, está associado a hipertrofia do BLA indicado pelo aumento da arborização dendrítica nessa região (VYAS et al., 2002; 2004).

Estudos que utilizaram a técnica de imunomarcção de Fos demonstraram aumento na expressão dessa proteína no BLA e no CeA de camundongos submetidos a um modelo da síndrome do intestino irritável que exibiram respostas ansiogênicas quando expostos ao LCE, ao campo aberto e ao teste da caixa claro/escuro (ZHANG et al., 2014). Mais um estudo igualmente mostrou aumento na expressão da proteína Fos no CeA em ratos Wistar submetidos a cirurgia de transecção do nervo espinhal e expostos a um teste do campo aberto, onde foi possível detectar diminuição da exploração da região central do aparato, o que caracteriza aumento da resposta relacionada à ansiedade nesses animais (MORLAND et al., 2015). Em diferente contexto, o envolvimento do CeA foi demonstrado por meio da ativação optogenética de neurônios nesse núcleo que induziu

comportamentos do tipo ansioso em ratos submetidos ao LCE e ao campo aberto (MAZZITELLI et al., 2022).

De forma geral, nos referimos a essa ansiedade visualizada nos animais quando expostos a testes comportamentais como a ansiedade presente nos humanos. Apesar da ansiedade ser um comportamento natural da nossa espécie, quando somos expostos a contextos estressantes podemos desenvolver uma ansiedade exacerbada e constante que pode atrapalhar a nossa funcionalidade, acarretando o que denominamos de transtorno. De acordo com 5ª versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM-5), os transtornos de ansiedade englobam prejuízos clinicamente significativos nos processos cognitivos, na regulação emocional ou no comportamento, o que pode acarretar déficits no funcionamento de mecanismos biológicos, psicológicos ou de desenvolvimento intrínsecos ao desempenho mental (APA, 2014). Dados publicados pela Organização Mundial de Saúde apontam que mais de um terço das pessoas nas Américas são acometidas por transtornos mentais, dentre os quais, a ansiedade se configura um dos transtornos frequentemente diagnosticado, especificadamente no Brasil, cerca de 18,6 milhões de indivíduos sofrem devido a ansiedade (OMS, 2021).

Diante desse cenário, vemos a importância de estudarmos formas terapêuticas mais assertivas que nos auxiliem na compressão de comportamentos de ansiedade clinicamente observáveis, além de proporcionar uma nova maneira de reagir, emocionalmente, a uma situação considerada aversiva (PAREKH; GIVON, 2019). Para mimetizarmos uma estratégia psicoterapêutica em estudo com animais, selecionamos o modelo de enriquecimento ambiental (EA), pois, se configura como um excelente paradigma que pode produzir a melhora dos sintomas observados na ansiedade patológica.

O papel do ambiente foi verificado por acaso depois que Donald Olding Hebb (1940), psicólogo canadense, pioneiro em estudos neuropsicológicos relacionados a memória e aprendizagem, observou que seus ratos criados como animais de estimação apresentavam melhor em uma tarefa de resolução de problemas, isto é, gastavam menor tempo para percorrer um labirinto, em comparação aos ratos de laboratório mantidos em gaiolas-padrão. No entanto, a validade empírica do EA foi efetivamente demonstrada a partir das pesquisas de Bennett, Diamond e Rosenzweig (1960), que investigaram o efeito do ambiente na neuroplasticidade química e anatômica de ratos ingênuos (BONDI et al.,

2014). Interessantemente, os estudos desenvolvidos sobre o EA possibilitaram desmistificar a ideia de que o neurodesenvolvimento somente ocorre em infantes, visto que cérebros adultos também possuem essa capacidade. Isso se sucedeu após ratos adultos submetidos ao EA apresentarem maior peso e espessura do córtex em relação aos ratos alojados na caixa-padrão (BENNETT et al., 1964).

O EA pode ser caracterizado como um procedimento experimental em que sujeitos de pesquisa são expostos a objetos de diferentes tamanhos e formas em um amplo ambiente de convivência. Nessa circunstância, o contexto produz a possibilidade de enriquecimento e integração de elementos exploratórios, físicos e sociais que resultam em alterações comportamentais e neurais (ROSENZWEIG et al., 1972; FERNANDEZ-TERUEL et al., 2002; LEGGIO et al., 2005; CHENG et al., 2011; MATTER et al., 2012; KIMURA et al., 2022). Além disso, o EA pode facilitar o enfrentamento de novas experiências devido ao convívio dos animais com novos objetos e circunstâncias desafiadoras sem efeitos aversivos (HARRIS et al., 2009).

Diversos efeitos do EA nos comportamentos de roedores foram detectados, por exemplo, a redução de respostas relacionadas à ansiedade em sujeitos expostos ao LCE e ao labirinto em forma de zero (BENAROYA-MILSHTEIN et al., 2004; DUMAN et al., 2008; SAMPEDRO-PIQUERO, et al., 2014). Do mesmo modo, evidências apontam que o EA ajuda em processos de aprendizagem e de memória de curto prazo (SOFFIÉ et al., 1999; FERNANDEZ-TERUEL et al., 2002; ARNAIZ et al., 2004; 2006; BRUEL-JUNGERMAN et al., 2005), na memória emocional (WOODCOCK; RICHARDSON, 2000), na prevenção do declínio cognitivo associado ao envelhecimento (HARATI et al., 2011; BLANCO et al., 2017), na resolução de problemas (DIAMOND, 2001; FERNANDEZTERUEL et al., 2002) e na diminuição de sintomas depressivos (BRENES et al., 2008; 2009). Além disso, existem alterações moleculares subjacentes a exposição ao EA, caracterizadas pela melhora da neurogênese em cérebros de roedores adultos (RAVENELLE et al., 2014; ASHOKAN et al., 2016; OHLIN; ABRAHAM, 2018).

Toda essa análise acerca da melhora da capacidade de aprendizagem e memória devido a exposição ao EA, tem sido associada a mudanças ocorridas no hipocampo. A razão da investigação dessa estrutura é porque está criticamente envolvida na formação e armazenamento da memória de curto e longo prazo, na percepção, memória de trabalho,

memória implícita, na atenção, também para a orientação espacial e codificação de novas informações (ANAND; DHIKAV, 2012; ALY; RANGANATH, 2018). Funções essas excepcionalmente sensíveis aos efeitos do EA.

O hipocampo foi identificado, inicialmente, pelo cirurgião e anatomista italiano Giulio Cesare Arantius no século XVI. Naquela época, Arantius estabeleceu para essa região o termo hipocampo, originário da palavra grega para cavalo-marinho (*hippos*: cavalo e *kampos*: monstro marinho) devido ao seu formato (BIR et al., 2015). O hipocampo é uma estrutura subcortical dividida bilateralmente, composto por duas massas neuronais arqueadas e imersas na porção temporal do córtex que se estendem do eixo dorsal (hipocampo dorsal: HD) ao ventral (hipocampo ventral: HV) (BRANDÃO, 2003; HERNANDES, 2020). A formação hipocampal é constituída pelo subículo, o *cornu ammonis* (CA), citoarquiteturalmente subdividido em três áreas (CA1, CA2 e CA3), e o giro denteado (DG) (MOREIRA, 2017; CASTRO, 2018).

Além do papel fundamental do hipocampo em processos mnemônicos, acredita-se que também esteja envolvido na modulação do medo e da ansiedade (BRANDÃO, 2003; HERNANDES, 2020). É comum nos depararmos com diversos estudos sobre a ansiedade que ressaltam a participação do HV em comportamentos referentes às reações de defesa, mas isso, não descarta a hipótese de que o HD igualmente pode influenciar essas respostas. À vista disso, Kheirbek e colaboradores (2013) utilizando a técnica de optogenética para elevar a ativação de células do DG dorsal de ratos, demonstraram que essa estimulação aumentou o tempo gastos nos braços abertos do LCE e a exploração total no teste de campo-aberto. Em contrapartida, Zhang e colaboradores (2014a) mostraram que a inibição do HD de ratos por meio da microinjeção de muscimol produziu aumento da aversão aos braços abertos do LCE.

De outra forma, após a administração intra-HD de 8-OH-DPAT, agonista do receptor 5-HT1A (receptor de serotonina subtipo 1A), foi observado diminuição da quantidade de lambidas punidas em ratos expostos ao teste de Vogel, caracterizando um efeito ansiogênico (HERNANDES, 2020). Esses dados reforçam que o HD também desempenha ação sobre comportamentos emocionais. E isso nos fornece o embasamento para igualmente investigarmos o seu papel frente a ansiedade induzida pelo contágio emocional contemplado no presente trabalho.

Em síntese, até o momento sabemos que a empatia pela dor é capaz de induzir ansiedade em camundongos observadores que conviveram com seus coespecíficos (demonstradores) submetidos à constrição do nervo ciático. Para tanto, consideramos relevante averiguar se esses demonstradores também apresentam aumento de ansiedade, o que nos permitiria observar se houve um contágio desse estado emocional entre os pares. Adicionalmente, pressupomos que a exposição ao EA possa prevenir o desenvolvimento de comportamentos do tipo ansioso em ambos animais. Além disso, consideramos de igual importância identificar se esses comportamentos relacionados a ansiedade desencadeados pelo contágio emocional podem estar sendo modulados pela amígdala e pelo hipocampo, considerando ainda possíveis alterações nessas áreas devido a exposição ao EA.

Objetivos

Objetivo geral

Investigar os efeitos do enriquecimento ambiental nas respostas relacionadas à ansiedade de camundongos submetidos ao modelo de empatia pela ansiedade induzida pela dor.

Objetivos Específicos

- Padronização de uma ferramenta experimental de enriquecimento ambiental para prevenir os efeitos da exposição ao modelo de empatia pela ansiedade induzida pela dor.
- Análise do padrão de ativação neuronal dos núcleos basolateral e central da amígdala em camundongos submetidos ao modelo experimental de enriquecimento ambiental na reversão da ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela dor, por meio da metodologia de imunomarcção da proteína Fos.
- Análise do padrão de ativação neuronal das subáreas do CA1 (*cornu ammonis 1*) e giro denteado do hipocampo dorsal em camundongos submetidos ao modelo experimental de enriquecimento ambiental na reversão da ansiedade induzida pelo modelo de empatia pela dor, por meio da metodologia de imunomarcção da proteína Fos.

Material e métodos

Sujeitos

Foram utilizados 140 camundongos machos, da linhagem Suíço-albino, desmamados aos 21 dias, provenientes do biotério central da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar. Inicialmente, os animais pesavam em torno de 25g e ao final do experimento, esse peso variou entre 40 e 45g. Assim que chegavam ao laboratório, todos os animais foram distribuídos similarmente e alojados em pares em uma caixa sem enriquecimento (SE) ou com enriquecimento ambiental (EA). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 1 °C), e luz (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, luzes acesas às 7:00 horas e apagadas às 19:00 horas), com livre acesso ao alimento e água, exceto durante as breves sessões de teste e foram manuseados duas vezes por semana para limpeza das caixas. Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo do animal, geralmente no período matutino (8:00 às 11:00 horas).

Ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar (CEUA N° CEUA 5836171117). Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas e preceitos especificados pela diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Construção Crônica do Nervo Ciático

Para reproduzir o modelo de dor crônica, foi utilizado o método proposto por Bennet e Xie (1998), e posteriormente modificado para uso com camundongos (SOMMER; SCHAFERS, 1998). Após anestesia com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), os animais foram submetidos ao procedimento que consiste na secção da fáscia entre o glúteo e bíceps femural e a exposição do nervo ciático direito próximo a sua trifurcação. O tecido ao redor do nervo foi cuidadosamente cortado a uma distância de aproximadamente 8 mm e, posteriormente, a compressão do nervo foi realizada por meio de três ligaduras com fio estéril, não inflamatório e não absorvível,

mononylon 6.0 (grupo constrição do nervo ciático, CNC). O outro grupo foi submetido a um procedimento similar, não havendo a constrição do nervo (grupo Sham). Considerando que esse modelo é um dos modelos de indução da dor crônica, Nitanda e colaboradores (2005) demonstraram que os comportamentos relacionados à dor aumentam gradualmente até um pico alcançado por volta do 10º dia após a cirurgia de constrição do nervo ciático.

A constrição do nervo ciático se configura como uma forma de dor neuropática. A dor neuropática resulta de danos ou disfunções no sistema nervoso periférico ou central. Esta condição, muitas vezes, é acompanhada por uma série de sintomas sensoriais, como hipersensibilidade a estímulos dolorosos (hiperalgesia) e respostas dolorosas a estímulos que normalmente não seriam dolorosos (alodinia). Além disso, a dor neuropática pode se manifestar de forma espontânea, sem a necessidade de um estímulo externo. (CAVALLI et al., 2019).

Tipos de alojamento

Enriquecimento ambiental (EA)

As caixas de enriquecimento ambiental (41cm x 34cm x 16cm) eram forradas com maravalha para pequenos animais, interiormente continham tubos coloridos que formavam um túnel, uma casa colorida, uma escada que possibilitava o acesso a um bebedouro, uma roda de exercício, uma bola colorida, brinquedos de plástico, e um reservatório para alimento (modificado de Simpson e Kelly 2011; Blanco et al. 2017).

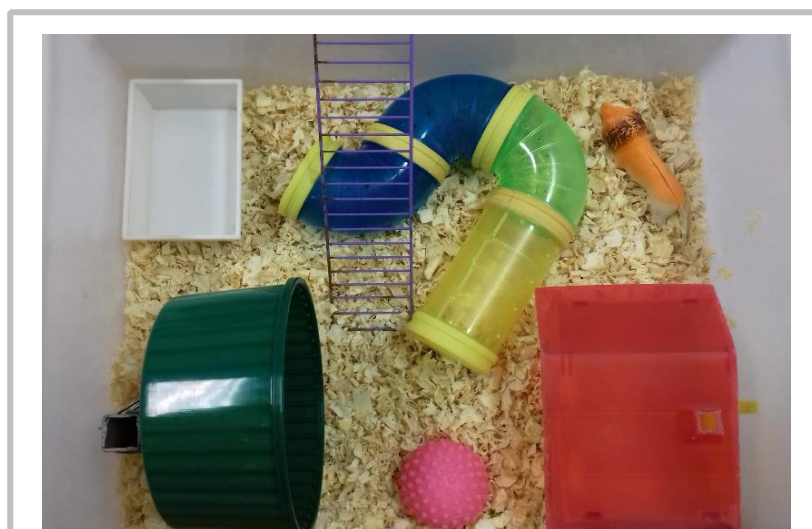


Figura 1. Caixa de Enriquecimento Ambiental. Foto do modelo de caixa utilizada para exposição ao enriquecimento ambiental. Fonte: Foto de autoria própria.

Alojamento Sem Enriquecimento (SE)

As caixas utilizadas para o contexto de ambiente SE (30 cm x 19 cm x 14 cm) apenas continham um bebedouro, acesso ao alimento e eram forradas com maravalha para animais pequenos (Figura 2).



Teste da placa quente

O teste de placa quente (figura 3) é caracterizado pelo registro do tempo em que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida a 52°C (LIU et al., 2002) até reagirem ao estímulo térmico, avaliado pela latência para retirada ou lambida da pata traseira direita, pata em que foi realizada a constrição do nervo ciático ou não. O tempo máximo que o animal permaneceu sobre a placa foi 30 segundos, para evitar lesão nas patas (KURAIISHI et al., 1983).



Labirinto em cruz elevado (LCE)

A figura 4 representa o aparato experimental utilizado nas sessões de teste em que consiste em 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 38,5cm do solo por um suporte de madeira (LISTER, 1987). Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz e foram gravados por meio de um sistema de câmera conectada a um computador localizado na sala adjacente a sala de testes. A avaliação dos parâmetros comportamentais foi realizada a partir da observação das gravações, acompanhada do uso de um software de análise etológica X-Plo-Rat 3.0 (GARCIA et al., 2005).

Para análise comportamental foram avaliadas a frequência total de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com as quatro patas para dentro do braço), a porcentagem de entrada nos braços abertos [(aberto/total) X 100] e de tempo gasto no braço aberto; os tempos de permanência nos braços fechados e na parte central do labirinto [(tempo/300) X 100] (LISTER, 1987).

Outros parâmetros comportamentais foram avaliados como as frequências de mergulhar (movimento exploratório com a cabeça/ombros para fora dos braços abertos) e esticar (stretched attend posture - SAP: postura exploratória caracterizada pelo corpo do animal estendido para frente, depois retrai à posição original sem locomoção efetiva, resposta associada à avaliação de risco) e imobilidade. As medidas de mergulhar e esticar se referem às respostas relacionadas a avaliação de risco que podem caracterizar um estado de atenção e alerta. Os braços fechados e o centro são áreas consideradas protegidas e braços abertos áreas desprotegidas do labirinto (CRUZ et al., 1994; RODGERS; JOHNSON, 1995).



Figura 4. Labirinto em cruz elevado (LCE). Fonte: Foto de autoria própria.

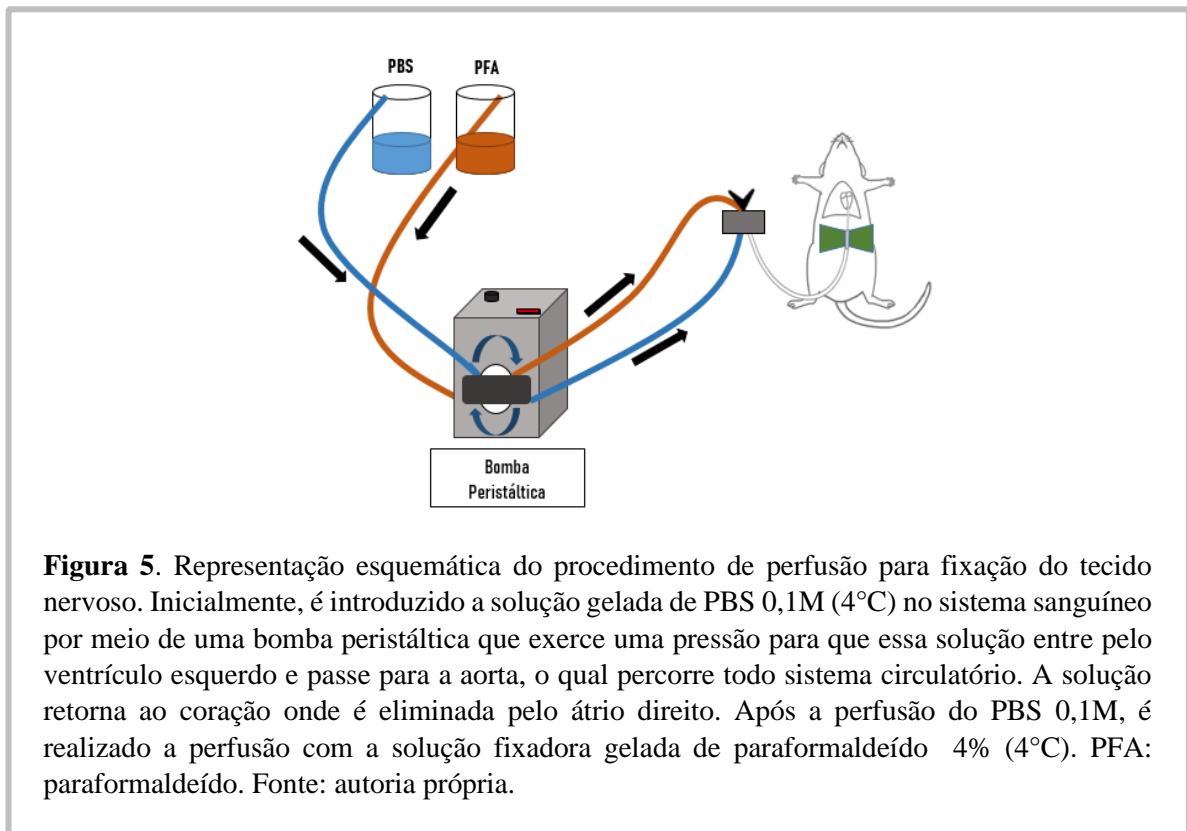
Perfusão e Secções Coronais do Encéfalo

Noventa minutos após o término do teste no LCE, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, i.p., respectivamente) para serem submetidos ao procedimento de perfusão. Com os animais já anestesiados, as suas cavidades abdominais e torácicas foram abertas para implantação de uma agulha (acoplada à uma bomba de perfusão) no ventrículo esquerdo do coração. Os animais foram perfundidos com 100ml de solução PBS 0,1M (3,2g de KH_2PO_4 ; 7,1g de K_2HPO_4 ; 9,1g de NaCl em 100ml de água destilada), seguido de 400ml de paraformaldeído 4% (4g de NaOH; 4g de paraformaldeído; 16,58g de NaH_2PO_4) (Figura 5).

Após o término, os encéfalos foram cuidadosamente removidos do interior da calota craniana e imersos em solução de paraformaldeído 4%, durante três a cinco horas, para fixação e preservação adequada dos componentes celulares encefálicos.

Em seguida, os encéfalos foram retirados da solução de paraformaldeído e transferidos para uma solução hipertônica de sacarose 30% (diluída em PBS 0,1M), para crio-proteção. Os encéfalos permaneceram nesta solução até apresentarem sinais de desidratação (movendo-se para o fundo dos frascos), procedimento que normalmente ocorria entre 24 e 48 horas. Imediatamente após esse período, os encéfalos foram congelados com gelo seco por uma hora e armazenados em freezer -80°C .

Posteriormente, os encéfalos foram fatiados coronalmente com $30\mu\text{m}$ de espessura em um criostato (Leica CM1850) seguindo as coordenadas do atlas de Paxinos e Franklin, 2001. Os encéfalos foram seccionados desde sua porção mais frontal até sua porção mais caudal, tendo todos os seus cortes preservados e armazenados em solução anti-congelante para posterior análise histológica.



Imuno-histoquímica

Para avaliação de ativação neuronal foi realizado o procedimento de imuno-histoquímica para a proteína Fos, conforme literatura (HOPE et al., 2006; MATTSON et al., 2007). Este procedimento foi realizado nas fatias coronais dos encéfalos dos observadores e demonstradores, expostos ao ambiente SE ou ao EA posteriormente testados no LCE.

As fatias coronais dos encéfalos foram previamente processadas e devidamente armazenadas contendo as regiões de interesse e foram primeiramente lavadas 5 vezes por 5 minutos com PBS 0,1M. Em seguida, foram incubadas em uma solução de peróxido de Hidrogênio (0,2%) e PBS por 20 minutos e foram novamente lavadas com PBS 0,1M durante 5 minutos por 5 vezes. Logo após, as fatias foram incubadas com anticorpo primário Fos (Millipore®, anti-coelho, diluição 1:4000) diluído em solução bloqueadora

(soro de cabra 3%; Triton X-100 0,25%, dissolvidos em PBS) por 16 a 18h em temperatura de 4°C, sob agitação constante.

Após a incubação com anticorpo primário, as fatias foram lavadas com PBS 0,1M durante 5 minutos por 5 vezes e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado (Vector Laboratories©, B-1000, diluição 1:700) diluído em solução bloqueadora (Triton X-100 0,25%, soro de cabra 3% e PBS 0.1 M). Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS por 5 vezes (5 minutos cada lavagem) e incubadas por 1 hora e 30 minutos em solução de avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC Vectastain®, Vector Laboratories©), preparada em PBS contendo Triton X-100 0,5%.

Continuando o procedimento, as fatias foram lavadas por 5 vezes (5 minutos cada) e incubadas em 3,3-diaminobenzidina (DAB) por, aproximadamente, 5 minutos. Na sequência, foram lavadas 5 vezes com PBS (5 minutos cada) e transferidas para solução de PBS 0,1M para montagem das lâminas. As lâminas utilizadas foram preparadas com gelatina e alumínio crômico.

Após a montagem dos cortes nas lâminas, essas foram desidratadas com titulações seriadas e crescentes de etanol (água destilada; etanol: 30%, 60%, 90%; 95% e 100%), xilol e posteriormente cobertas com *Permount* e lamínulas.

A imunomarcção de Fos foi capturada através de uma câmera acoplada a um microscópio (Zeiss Axio Imager D2®).

Procedimento geral

Vinte e um dias após o nascimento, os camundongos foram alojados aos pares (pós-natal; PND 21). No 14º dia de convívio (PND 35), um animal de cada dupla foi submetido à cirurgia de constrição do nervo ciático (CNC) ou ao procedimento sham. Esses animais foram denominados de demonstradores CNC ou demonstradores sham.

Após os efeitos da anestesia, os demonstradores foram alocados com seus respectivos pares, que passaram a ser os observadores CNC ou observadores sham. Aleatoriamente, as duplas foram submetidas ao alojamento EA ou ao SE. Dessa maneira, formamos os seguintes grupos:

Tabela 1. Grupos formados para o estudo.

Demonstradores sham + observadores sham expostos ao alojamento SE

Demonstradores sham + observadores sham expostos ao alojamento EA

Demonstradores CNC + observadores CNC expostos ao alojamento SE

Demonstradores CNC + observadores CNC expostos ao alojamento EA

SE = Sem enriquecimento; EA = Enriquecimento ambiental; CNC = Constrição do Nervo Ciático

Após a formação desses grupos, os animais conviveram por mais 14 dias, totalizando 28 dias de protocolo de convívio. No 28º dia (PND 49), submetemos todos os animais, observadores e demonstradores, ao LCE durante cinco minutos (Figura 6). Considerando que o contágio emocional ocorre quando o sujeito é acometido pelo estado emocional do outro (HATFIELD et al. 1993, 2009) decidimos avaliar observadores e demonstradores para averiguar se exibiam respostas comportamentais semelhantes.

Ao final do experimento, os demonstradores CNC ou Sham, foram submetidos ao teste da placa quente para verificação da hiperalgesia induzida pela constrição do nervo ciático. Noventa minutos após o teste, todos os animais foram perfundidos e os encéfalos removidos para a realização da análise de imuno-histoquímica. Na figura 6, está representado o delineamento experimental utilizado e na tabela 2, os grupos experimentais formados.

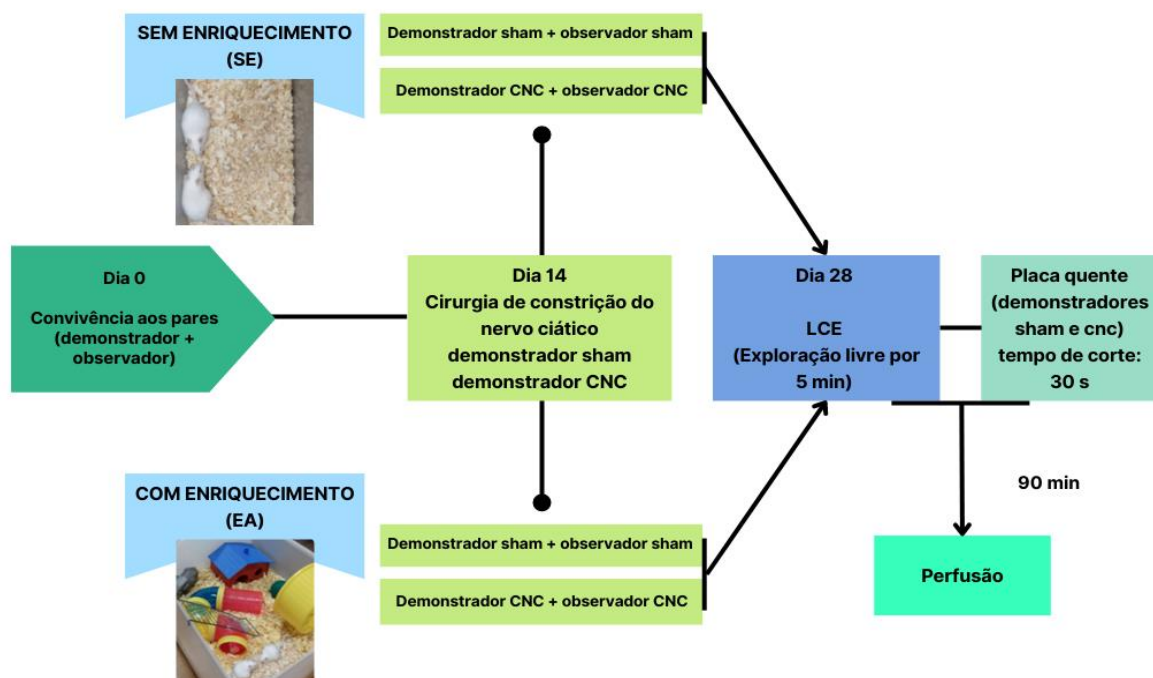


Figura 6. Representação da linha do tempo. CNC= Constrição do Nervo Ciático; LCE= Labirinto em Cruz Elevado; SE= Sem Enriquecimento; EA= Enriquecimento Ambiental; Min = minutos; S= segundos.

Tabela 2. Total de camundongos utilizados no labirinto em cruz elevado.

Demonstradores				Observadores			
Sham		CNC		Sham		CNC	
SE	EA	SE	EA	SE	EA	SE	EA
n= 17	n= 19	n= 17	n= 17	n= 17	n= 19	n= 17	n= 17

Os números representam o total de camundongos utilizados por grupo CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental.

Análise estatística

Os dados comportamentais dos demonstradores obtidos no teste de placa quente foram analisados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias considerando o fator condição (Sham e CNC) e o fator alojamento (SE e EA). Os resultados dos comportamentos relacionados à ansiedade obtidos no teste de LCE bem como os dados do número de núcleos imunorreativos no hipocampo dorsal e amígdala de demonstradores e observadores também foram analisados através da ANOVA bifatorial considerando os fatores condição e alojamento.

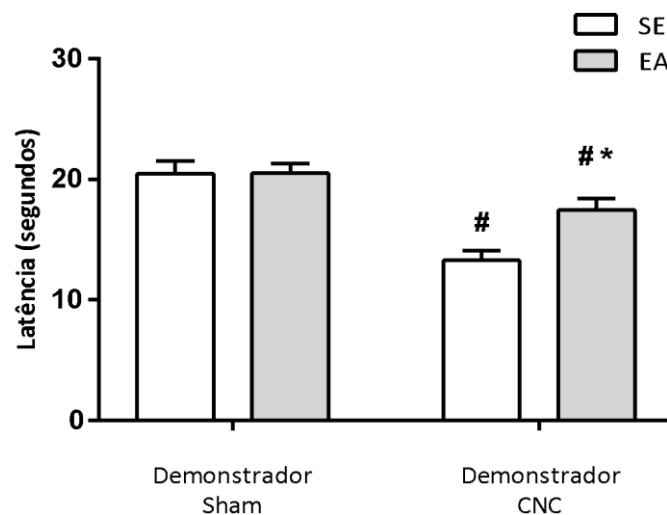
A ANOVA foi seguida pelo teste post-hoc de Duncan para comparações múltiplas, quando necessária. No caso dos dados da imuno-histoquímica, referentes à contagem de núcleos imunorreativos no hipocampo dorsal de demonstradores e observadores, utilizamos o teste t de Student para comparação de grupos específicos. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para verificar a relação entre os comportamentos dos demonstradores e observadores exibidos no teste do LCE. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como significativo para todas as análises estatísticas.

Resultados

Avaliação da efetividade da constrição do nervo nos demonstradores: teste da placa quente

Na figura 7 a ANOVA de duas vias (condição x alojamento) para o teste da placa quente revelou efeitos significativos para a condição ($F_{1,66}=5,57$; $p<0,05$), para o fator alojamento ($F_{1,66}=32,55$; $p<0,05$) e para interação entre os fatores ($F_{1,66}=5,28$; $p<0,05$). O teste post-hoc de Duncan indicou que a latência de resposta ao estímulo térmico foi significativamente menor em demonstradores CNC-SE em comparação aos demonstradores Sham alojados em SE (Dem-Sham-SE vs. Dem-CNC-SE). A exposição ao EA atenuou o efeito da constrição do nervo ciático caracterizado pelo aumento da latência de retirada da pata nos demonstradores CNC em comparação ao CNC alojados SE (Dem-CNC-SE vs. Dem-CNC-EA). Vale ressaltar que o EA preveniu parcialmente a hipersensibilidade térmica induzida pela constrição do nervo ciático.

Figura 7. Latência de retirada da pata (em segundos) no teste de placa quente. As barras representam os valores das médias \pm EPM (n= 17-19). # $p<0,05$ comparado ao respectivo grupo Sham. * $p<0,05$ comparado ao grupo demonstrador CNC-SE. CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. ANOVA de duas vias.



Avaliação dos efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental em camundongos demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e camundongos observadores, avaliados no labirinto em cruz elevado (LCE).

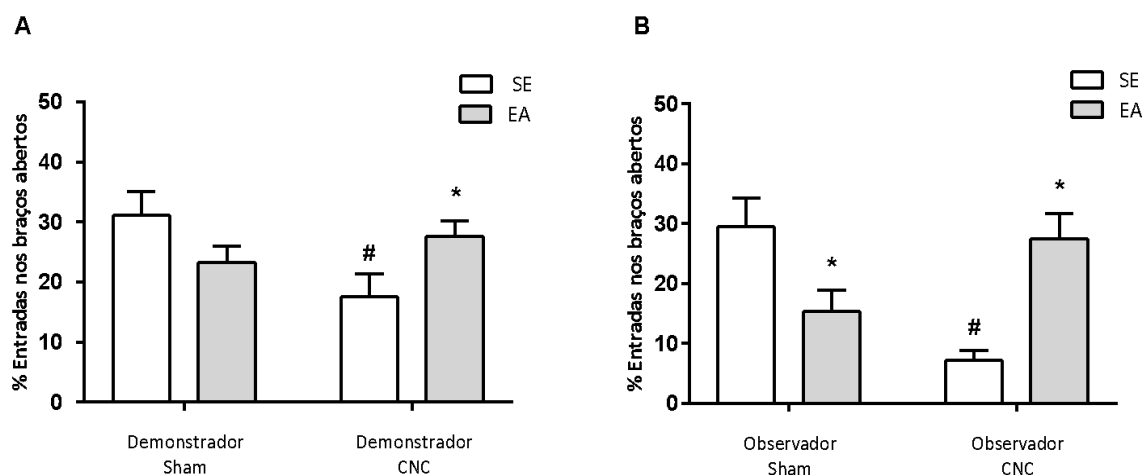
A figura 8A mostra os efeitos do enriquecimento ambiental na porcentagem de entradas nos braços abertos (%EBA) de demonstradores CNC e Sham. A ANOVA de dois fatores (condição x alojamento) revelou efeito significativo para a interação entre os fatores condição e alojamento ($F_{1,66}=7,64$; $p<0,05$), embora a análise estatística não tenha mostrado efeitos para os fatores condição ($F_{1,66}=2,05$; $p=0,16$) e alojamento ($F_{1,66}=0,12$; $p=0,74$). Análises posteriores utilizando o teste de comparações múltiplas de Duncan mostraram diminuição na %EBA em camundongos demonstradores CNC comparados aos demonstradores Sham alojados no ambiente sem enriquecimento (Dem-Sham-SE vs. Dem-CNC-SE).

A exposição ao enriquecimento ambiental preveniu a ansiedade produzida pela constrição do nervo ciático nos demonstradores CNC quando comparados aos demonstradores CNC alojados no ambiente SE (Dem-CNC-SE vs. Dem-CNC-EA).

Na figura 8B, podemos observar os efeitos do EA na %EBA dos animais observadores CNC e Sham avaliados no LCE. A análise de variância de duas vias indicou efeito significativo na interação entre os fatores condição e alojamento ($F_{1,66}=20,92$; $p<0,05$), mas não no fator condição ($F_{1,66}=1,83$; $p=0,18$) e no fator alojamento ($F_{1,66}=0,68$; $p = 0,41$).

O teste post hoc de Duncan mostrou diminuição significativa na %EBA em observadores CNC quando comparados aos observadores Sham submetidos ao ambiente SE (Obs-Sham-SE vs. Obs-CNC-SE). Além disso, os observadores CNC expostos ao enriquecimento ambiental apresentaram maior %EBA quando comparados aos observadores CNC alojados no ambiente SE (Obs-CNC-SE vs. Obs-CNC-EA). Inesperadamente, os observadores Sham expostos ao enriquecimento ambiental apresentaram diminuição da %EBA quando comparados aos observadores sham alojados no ambiente SE (Obs-Sham-SE vs. Obs-Sham-EA).

Figura 8. Efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre a %EBA no LCE de camundongos (A) demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus (B) respectivos observadores. As barras representam os valores das médias \pm EPM (n= 17-19). #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham. *p<0,05 comparado ao respectivo grupo SE. EBA: Entradas nos Braços Abertos; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. ANOVA de duas vias.

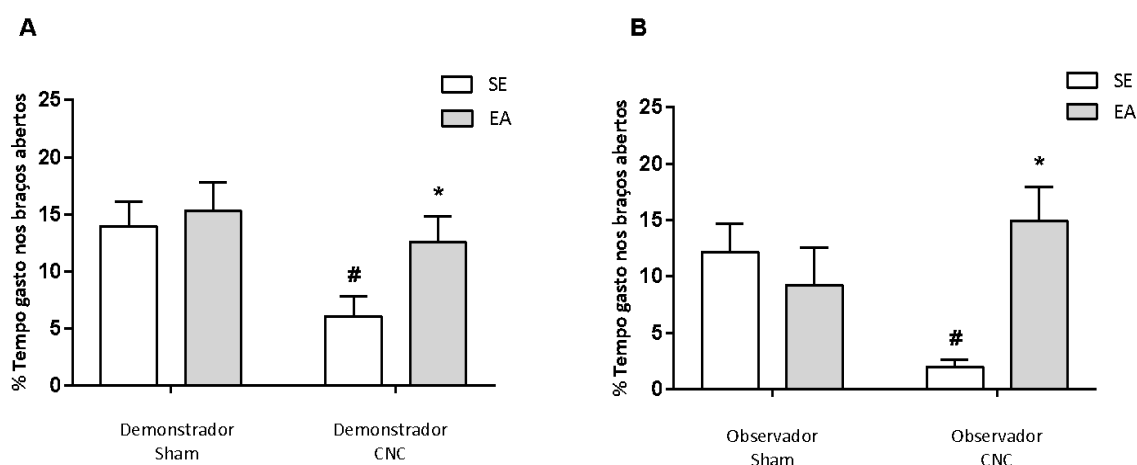


A figura 9A mostra os efeitos do EA na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos (%TBA) de demonstradores CNC e Sham. A análise de variância de duas vias (condição x alojamento) demonstrou efeitos significativos no fator condição ($F_{1,66}=5,68$; $p<0,05$), mas não no fator alojamento ($F_{1,66}=3,08$; $p=0,08$) e na interação entre os fatores condição e alojamento ($F_{1,66}=1,33$; $p=0,25$). Embora a análise estatística de variância não tenha apontado efeito na interação entre os fatores, realizamos o teste post-hoc de Duncan para avaliar possíveis diferenças entre os grupos experimentais. Desse modo, observou-se uma redução na %TBA em demonstradores CNC comparados aos demonstradores Sham alojados no ambiente SE (Dem-Sham-SE vs. Dem-CNC-SE). O alojamento no ambiente enriquecido preveniu o desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade induzidos pela dor crônica nos demonstradores CNC ao compararmos com os demonstradores CNC expostos ao ambiente SE (Dem-CNC-SE vs. Dem-CNC-EA).

A figura 9B mostra os efeitos da exposição ao EA na %TBA de observadores Sham e CNC expostos ao LCE. A ANOVA demonstrou efeito significativo na interação entre a condição e o alojamento ($F_{1,66}=9,13$; $p<0,05$), mas não nos fatores condição

($F_{1,66}=0,74$; $p=0,39$) e alojamento ($F_{1,66}=3,61$; $p=0,06$). O teste post-hoc de Duncan apontou uma redução na %TBA de observadores CNC em relação aos observadores Sham alojados no ambiente SE (Obs-Sham-SE vs. Obs-CNC-SE). Além disso, o EA foi capaz de prevenir a ansiedade produzida pelo convívio com o parceiro em condição de dor, visto que os observadores CNC expostos ao EA aumentaram a exploração dos braços abertos em comparação aos observadores CNC do ambiente SE (Obs-CNC-SE vs. Obs-CNC-EA). Apesar de termos encontrado que a exposição ao EA diminuiu a %EBA em observadores Sham (figura 8B), o mesmo não foi registrado para a %TBA do LCE ($p=0,43$).

Figura 9. Efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre a %TBA no LCE de camundongos (A) demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus (B) respectivos observadores. As barras representam os valores das médias \pm EPM ($n= 17-19$). # $p<0,05$ comparado ao respectivo grupo Sham. * $p<0,05$ comparado ao respectivo grupo SE. TBA: Tempo Gasto nos Braços Abertos; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. ANOVA de duas vias.

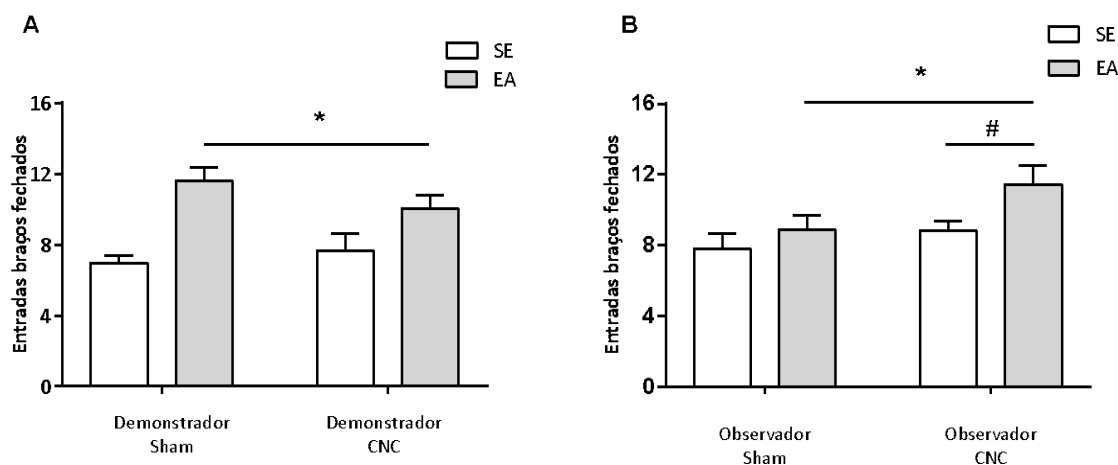


Na figura 10A mostra o efeito do EA sobre as entradas nos braços fechados (EBF) do LCE em camundongos demonstradores Sham e CNC. A ANOVA bifatorial indicou efeito do fator alojamento ($F_{1,66}=21,55$; $p<0,05$), mas não da condição ($F_{1,66}=0,32$; $p=0,57$) e da interação entre o fator condição e o fator alojamento ($F_{1,66}=2,22$; $p=0,14$). Desse modo, vemos que os animais alojados no ambiente enriquecido exibiram aumento

de exploração dos braços fechados independentemente da condição à que esses animais foram submetidos (Dem-SE vs. Dem-EA).

Considerando o comportamento dos animais observadores nas EBF, a análise de variância revelou efeito significativo da condição ($F_{1,66}=4,29$; $p<0,05$) e do alojamento ($F_{1,66}=4,64$; $p<0,05$), mas não indicou efeitos da interação condição e alojamento ($F_{1,66}=0,80$; $p=0,38$). Sendo assim, a figura 10B mostra que os animais observadores submetidos ao convívio com CNC têm maior número de EBF em relação aos observadores submetidos ao convívio com o Sham (Obs-Sham vs. Obs-CNC). Além disso, também verificamos que os camundongos observadores alojados no ambiente enriquecido mostram maior exploração dos braços fechados se comparados com os animais alojados no ambiente SE independentemente da condição (Obs-SE vs. Obs-EA).

Figura 10. Efeitos da exposição ao enriquecimento ambiental sobre a EBF no LCE de camundongos (A) demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus (B) respectivos observadores. As barras representam os valores das médias \pm EPM ($n=17-19$). # $p<0,05$ comparado à condição Sham. * $p<0,05$ comparado ao alojamento SE. EBF: Entradas nos Braços Fechados; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. ANOVA de duas vias.



Na tabela 3 podemos ver os efeitos do EA sobre comportamentos complementares relacionados à ansiedade exibidos por demonstradores e observadores submetidos às condições Sham e CNC. Considerando os animais demonstradores, a ANOVA bifatorial revelou efeitos significativos do fator alojamento sobre a porcentagem de tempo gasto no

centro ($F_{1,66}=13,73$; $p<0,05$), total de SAP ($F_{1,66}=23,39$; $p<0,05$) e porcentagem de SAP protegido ($F_{1,66}=5,72$; $p<0,05$). A análise estatística também mostrou resultados significativos do fator condição sobre o total de SAP ($F_{1,66}=4,78$; $p<0,05$), porcentagem de SAP protegido ($F_{1,66}=8,32$; $p<0,05$) e total de mergulho ($F_{1,66}=4,19$; $p<0,05$). Também, verificamos efeitos significativos da interação entre os fatores condição e alojamento na porcentagem de tempo gasto no centro ($F_{1,66}=4,79$; $p<0,05$) e porcentagem de SAP protegido ($F_{1,66}=4,16$; $p<0,05$).

O teste post-hoc de Duncan indicou que os animais demonstradores na condição CNC alojados no ambiente SE demonstraram aumento da porcentagem de tempo gasto no centro do LCE e da porcentagem de SAP protegido, quando comparado ao respectivo grupo Sham alojado no mesmo tipo de ambiente (Dem-Sham-SE vs. Dem-CNC-SE). Os animais demonstradores na condição Sham alojados no EA apresentaram diminuição do total de SAP quando comparados ao grupo Sham SE (Dem-Sham-SE vs. Dem-CNC-EA). Os animais demonstradores na condição CNC alojados no EA apresentaram aumento do total de SAP quando comparados ao respectivo grupo Sham alojado no mesmo tipo de ambiente (Dem-Sham-EA vs. Dem-CNC-EA). Os animais demonstradores na condição CNC alojados no EA apresentaram diminuição da porcentagem de tempo gasto no centro do LCE, total de SAP e porcentagem de SAP protegido, quando comparados ao respectivo grupo CNC-SE (Dem-CNC-SE vs. Dem-CNC-EA). O total de mergulhos e a porcentagem de mergulhos protegidos não foram alterados.

Considerando os comportamentos dos animais observadores apresentados na tabela 3, a ANOVA de duas vias demonstrou efeito significativo do fator condição apenas no total de SAP ($F_{1,66}=11,26$; $p<0,05$). Da mesma forma, revelou efeito significativo do fator alojamento na porcentagem de tempo gasto no centro ($F_{1,66}=7,20$; $p<0,05$) e no total de SAP ($F_{1,66}=31,46$; $p<0,05$). Além disso, observamos efeitos significativos da interação entre os fatores condição e alojamento na porcentagem de SAP protegido ($F_{1,66}=7,49$; $p<0,05$).

O teste post-hoc de Duncan indicou que os animais observadores na condição CNC alojados no ambiente SE apresentaram aumento da porcentagem de tempo gasto no centro do LCE, quando comparados ao respectivo grupo Sham alojado no mesmo tipo de ambiente (Dem-Sham-SE vs. Dem-CNC-SE). Os animais observadores na condição CNC

alojados no EA apresentaram aumento do total de SAP e diminuição da porcentagem de SAP protegido, quando comparados ao respectivo grupo Sham alojado no mesmo tipo de ambiente (Dem-Sham-EA vs. Dem-CNC-EA). Os animais observadores na condição CNC alojados no EA apresentaram diminuição da porcentagem de tempo gasto no centro do LCE, do total de SAP e da porcentagem de SAP protegido, quando comparados ao respectivo grupo CNC-SE (Dem-CNC-SE vs. Dem-CNC-EA). Os animais observadores na condição Sham alojados no EA apresentaram redução do total de SAP quando comparados ao grupo Sham SE (Dem-Sham-SE vs. Dem-CNC-EA). O total de mergulhos e a porcentagem de mergulhos protegidos não foram alterados.

Tabela 3. Comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no labirinto em cruz elevado, em demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus respectivos parceiros observadores alojados em ambiente SE ou ambiente enriquecido.

Comportamentos	Demonstradores				Observadores			
	Sham		CNC		Sham		CNC	
	SE	EA	SE	EA	SE	EA	SE	EA
%Tempo no centro	37,0 ± 3,3	31,0 ± 1,9	51,0 ± 5,4#	30,3 ± 2,4*	32,5 ± 2,4	28,9 ± 3,0	40,9 ± 2,1#	30,0 ± 2,8*
Total de mergulho	25.5 ± 1.6	28.6 ± 1.9	32.1 ± 3.0	29.8 ± 1.6	22.5 ± 2.6	26.0 ± 1.9	27.7 ± 1.9	29.0 ± 3.0
%Mergulho protegido	71.3 ± 4.7	74.7 ± 4.3	71.8 ± 8.7	74.1 ± 4.5	73.2 ± 4.7	87.3 ± 4.0	76.5 ± 9.0	79.0 ± 4.6
Total de SAP	42.4 ± 3.1	23.4 ± 2.0*	45.0 ± 3.9	33.1 ± 4.0##*	37.8 ± 2.8	15.7 ± 1.9*	43.8 ± 4.2	30.7 ± 3.2##*
%SAP protegido	86.4 ± 1.8	85.9 ± 2.8	97.8 ± 0.6#	91.6 ± 2.9*	86.7 ± 2.8	93.0 ± 3.3	95.2 ± 1.5	79.5 ± 6.8##*

Os dados são apresentados como valores da média ± SEM (n= 17-19). #p <0,05 vs. respectivo grupo Sham. *p <0,05 vs. o respectivo grupo SE. SAP: Stretched Attend Posture; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento ambiental. ANOVA de duas vias.

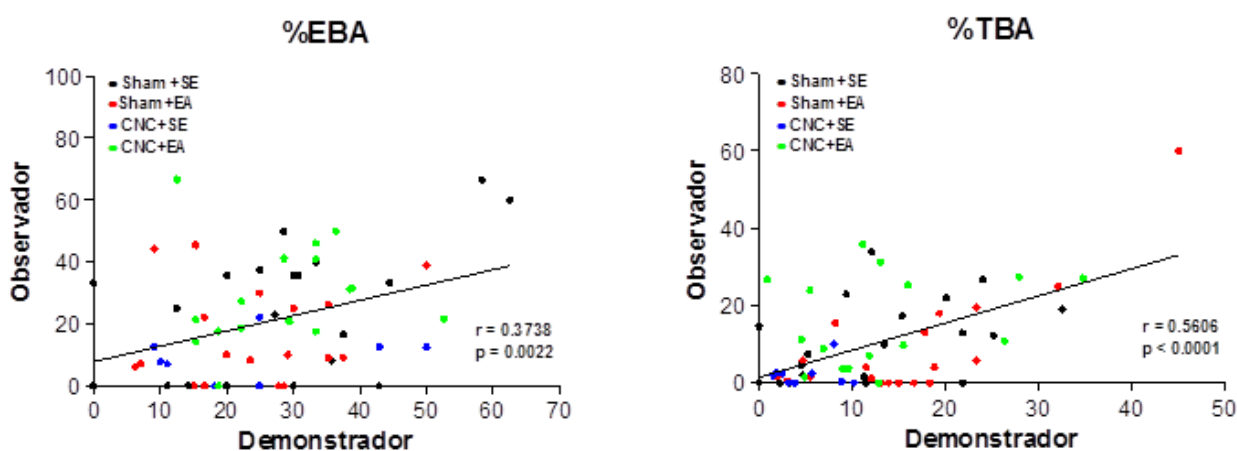
Correlação entre os comportamentos relacionados à ansiedade exibidos por demonstradores e observadores alojados na mesma caixa-moradia.

Os comportamentos avaliados no LCE indicaram que os demonstradores em condição CNC, bem como seus respectivos observadores, apresentaram respostas ansiogênicas semelhantes. A constrição do nervo ciático promoveu diminuição na %EBA e no %TBA nos pares que foram alojados no ambiente SE (Dem-CNC-SE e Obs-CNC-SE), ao serem comparados aos pares na condição Sham alojados no mesmo ambiente (Dem-Sham-SE e Obs-Sham-SE). Além disso, nós investigamos se o EA era capaz de

atenuar o comportamento ansiogênico induzido pela dor neuropática. Os dados obtidos demonstraram que a exposição ao EA preveniu completamente os efeitos da constrição do nervo ciático em ambos, demonstradores e observadores (Dem-CNC-EA e Obs-CNC-EA). Surpreendentemente, os observadores do grupo Sham expostos ao EA (Obs-Sham-EA) demonstraram redução na %EBA, mas não houve alteração significativa na %TBA, sugerindo um possível comportamento ansiogênico nesse grupo em comparação ao grupo Obs-Sham-SE. Embora essa diferença na %EBA não tenha aparecido nos Dem-Sham-EA quando comparados aos Dem-Sham-SE, há uma pequena redução nesse comportamento (figura 8A).

Devido à presença de similaridades entre os comportamentos influenciados pelos diferentes fatores experimentais, examinamos a relação entre as respostas exibidas pelos camundongos residentes na mesma gaiola através do coeficiente de correlação de Pearson (r). Considerando todos os grupos como um conjunto amostral (65 duplas), ou seja, independentemente da condição e do tipo de alojamento, encontramos correlação positiva significativa entre demonstradores e observadores da mesma caixa-moradia na %EBA ($r=0,3738$; $p<0,05$; figura 11A) e na %TBA ($r=0,5606$; $p<0,05$; figura 11B).

Figura 11. Correlação entre comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no LCE exibidos por demonstradores e observadores alojados na mesma caixa-moradia. As figuras apresentam a dispersão dos pontos e as retas de regressão. O valor de $p<0,05$ indica a presença de correlação significativa entre os comportamentos. O valor de $r > 0$ indica correlação positiva. %EBA: Porcentagem de Entrada nos Braços Abertos; %TBA: Porcentagem de Tempo gasto nos Braços Abertos; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental. Coeficiente de correlação de Pearson.



A análise dos comportamentos complementares avaliados no LCE também revelou correlação positiva significativa para o total de SAP, porcentagem de SAP protegido, total de mergulho e porcentagem de mergulho protegido, mas não para as EBF entre demonstradores e observadores da mesma gaiola (Tabela 4).

Tabela 4. Correlação entre os comportamentos complementares relacionados à ansiedade avaliados no LCE exibidos por demonstradores e observadores alojados na mesma gaiola.

Comportamentos	r	Valor de p
EBF	0,2037	0,10
Total de mergulho	0,3934	<0,05
% Mergulho protegido	0,4845	<0,05
Total de SAP	0,4856	<0,05
% SAP protegido	0,2754	<0,05

Os dados são apresentados como valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) e valores de p (n=65). O valor de $p < 0,05$ indica a presença de correlação significativa entre os comportamentos. O valor de $r > 0$ indica correlação positiva. EBF: Entradas nos Braços Fechados; SAP: Stretched Attend Posture.

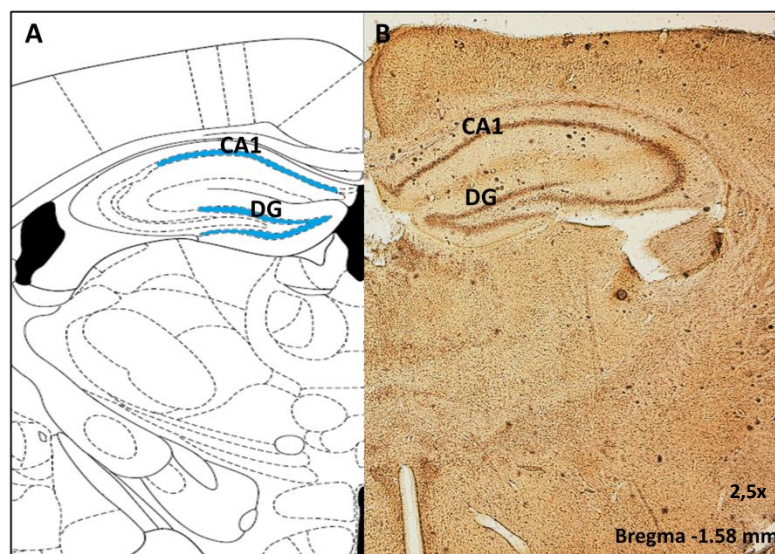
Os dados obtidos através das análises de correlação mostram que independentemente do grupo no qual os camundongos demonstradores e observadores se encontravam, os comportamentos exibidos pelos animais alojados na mesma caixa-moradia são semelhantes. Em outras palavras, nota-se que os demonstradores do grupo Sham-SE, por exemplo, exploram os braços abertos da mesma maneira que seus respectivos parceiros observadores. No outro extremo pode-se observar que os pares do grupo CNC-SE entram menos e gastam menos tempo nos braços abertos do LCE.

Avaliação da participação das subáreas CA1 e giro denteado do hipocampo dorsal nos comportamentos relacionados à ansiedade em demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e observadores, expostos ao enriquecimento ambiental.

Para avaliar a participação das subáreas do hipocampo dorsal e da amígdala na exibição dos comportamentos relacionados à ansiedade verificamos a ativação neuronal a partir da contagem de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos após 90 minutos do

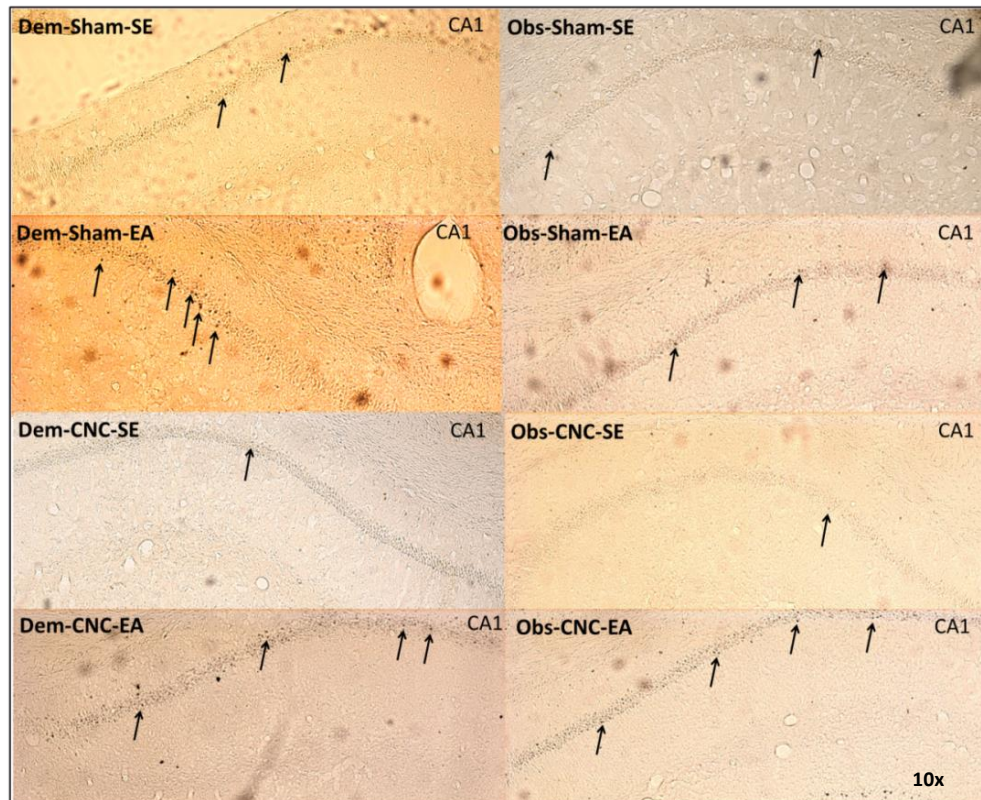
teste de LCE. A figura 12 mostra as sub-regiões do hipocampo dorsal utilizadas para quantificar as células positivas.

Figura 12. Esquema representativo de secção coronal referente à localização das subáreas CA1 e DG (PAXINOS; FRANKLIN, 2019) (A). Fotomicrografia da área utilizada para quantificar os núcleos imunorreativos anti-Fos nas subáreas CA1 (*cornu ammonis 1*) e DG (Giro denteado) do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores e observadores após o teste de LCE (B).



A figura 13 apresenta exemplos de cortes coronais utilizados neste estudo com indicações da marcação positiva da proteína Fos no CA1 de demonstradores e observadores submetidos às condições Sham e CNC, e alojados nos ambientes SE e EA. As presenças dos núcleos imunorreativos indicam que as células foram mais ou menos ativadas durante o teste 2,5x de LCE.

Figura 13. Cortes coronais representativos com destaque (setas pretas) para os núcleos imunorreativos anti-Fos na subárea CA1 do hipocampo dorsal de demonstradores e observadores após o teste no labirinto em cruz elevado. CA1: *Cornu Ammonis 1*; Dem: Demonstrador; Obs: Observador; CNC: Constricção do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental.



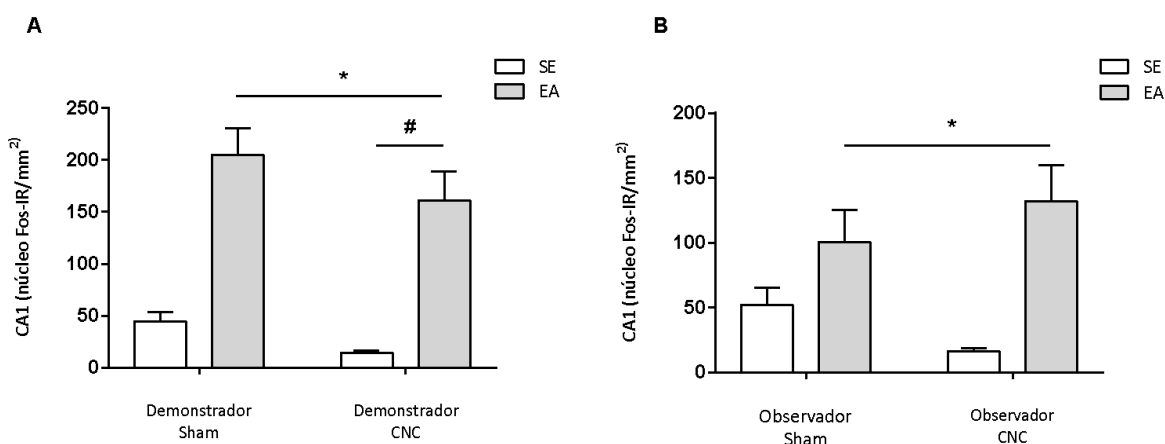
A figura 14 mostra o número de células ativadas por área de tecido nervoso da sub-região CA1 do hipocampo dorsal de demonstradores e observadores em condições Sham ou CNC, alojados em SE ou EA. A ANOVA bifatorial revelou efeito dos fatores condição ($F_{1,13}=7,40$; $p<0,05$) e alojamento ($F_{1,13}=125,95$; $p<0,05$), mas não da interação entre os fatores ($F_{1,13}=0,23$; $p=0,64$) na expressão de proteína Fos no CA1 de camundongos demonstradores (figura 14A).

Sendo assim, observa-se que a condição CNC diminui a ativação celular no CA1 quando comparada à condição Sham, independentemente do tipo de alojamento (Dem-Sham vs. Dem-CNC). Além disso, nota-se também que o EA promove um aumento do número de células ativadas no CA1 de demonstradores ao compararmos com os animais alojados no ambiente SE (Dem-SE vs. Dem-EA).

Considerando os animais observadores, a análise de variância bifatorial demonstrou efeito do fator alojamento ($F_{1,19}=15,85$; $p<0,05$), mas não do fator condição ($F_{1,19}=0,01$; $p=0,92$) e da interação entre os fatores ($F_{1,19} = 2,65$; $p=0,12$) na ativação celular da subárea CA1 do hipocampo (figura 14B). Desse modo, os dados indicam que

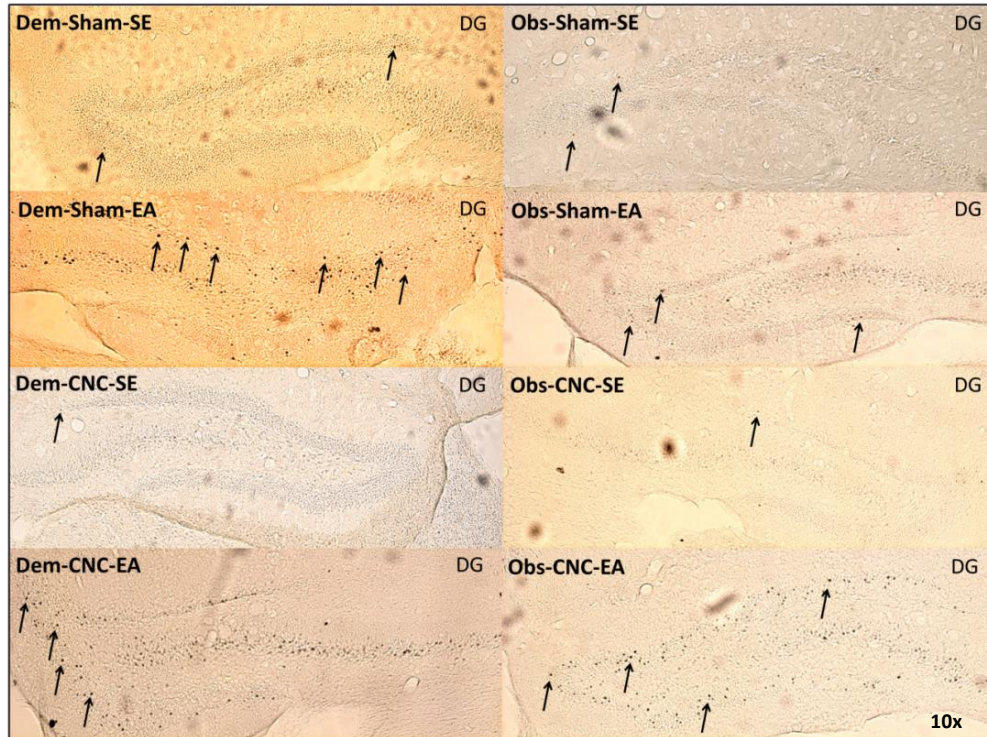
o ambiente enriquecido induz um aumento da expressão de proteína Fos, independentemente da condição a qual os observadores foram submetidos (Obs-SE vs. Obs-EA).

Figura 14. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm² de tecido extraído da sub-região CA1 do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores (A) e observadores (B) nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE ou EA. As barras representam os valores das médias ± EPM (n=2-6). #p<0,05 comparado à condição Sham. *p<0,05 comparado ao alojamento SE. CA: *Cornu Ammonis*; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: Imunorreativo. ANOVA de duas vias.



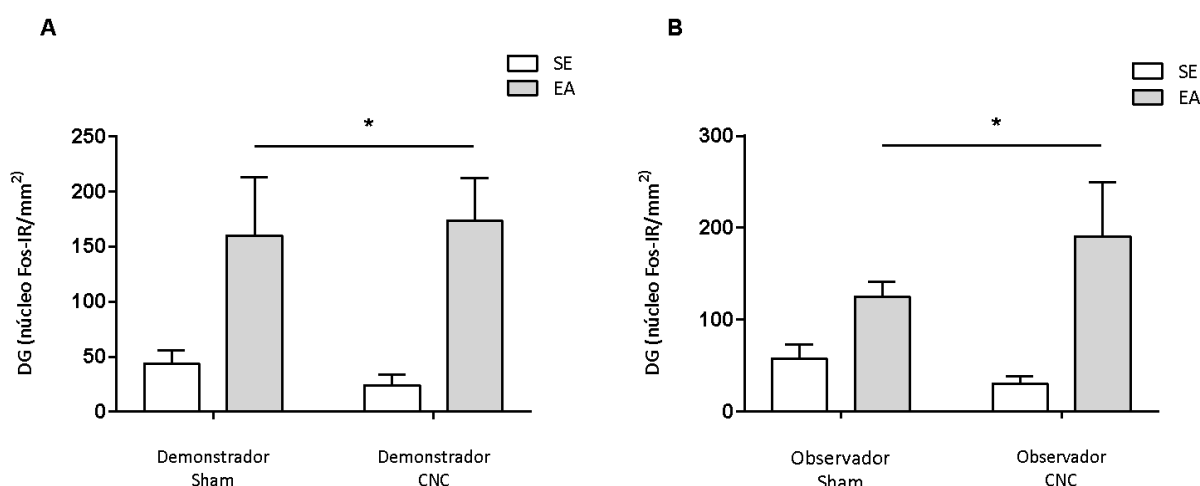
A figura 15 apresenta cortes coronais indicando os núcleos imunorreativos com expressão da proteína Fos no DG de animais demonstradores, submetidos às condições Sham ou CNC, e seus respectivos observadores, expostos ao ambiente SE ou ao EA após a avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE.

Figura 15. Cortes coronais representativos com destaque (setas pretas) para os núcleos imunorreativos anti-Fos na subárea DG do hipocampo dorsal de demonstradores e observadores após o teste no labirinto em cruz elevado. DG: Giro Dentado; Dem: Demonstrador; Obs: Observador; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental.



Na figura 16 observamos os efeitos do EA na ativação neuronal da subárea DG do hipocampo dorsal de demonstradores submetidos, ou não, à constrição do nervo ciático e seus respectivos observadores. A análise de variância de duas vias indicou efeito do fator alojamento ($F_{1,13}=35,35$; $p<0,05$), mas não da condição ($F_{1,13}=0,02$; $p=0,89$) e da interação entre os fatores ($F_{1,13}=0,54$; $p=0,48$) (figura 16A). Nos camundongos observadores a análise de variância bifatorial revelou efeito do alojamento ($F_{1,19} = 11,41$; $p<0,05$), mas não do fator condição ($F_{1,19} = 0,31$; $p=0,59$) e da interação entre os fatores ($F_{1,19} = 1,86$; $p=0,19$) (figura 16B). Sendo assim, o ambiente enriquecido produz aumento da ativação celular de DG ao compararmos com a ativação neuronal do DG nos demonstradores e observadores alojados no ambiente SE, independentemente da condição à qual foram submetidos [(Dem-SE vs. Dem-EA) e (Obs-SE vs. Obs-EA)].

Figura 16. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm² de tecido extraído da sub-região DG do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores (A) e observadores (B) nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE ou ambiente enriquecido. As barras representam os valores das médias \pm EPM (n=2-6). *p<0,05 comparado ao alojamento SE. DG: Giro Denteado; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: Imunorreativo. ANOVA de duas vias.



A análise estatística referente ao número de núcleos imunorreativos na subárea CA1 de demonstradores revelou que o EA induziu o aumento da expressão de proteína Fos independentemente da condição a qual os animais foram submetidos (Dem-SE vs. Dem-EA). Além disso, também verificamos que a condição de dor crônica a qual os animais demonstradores foram submetidos promoveu a diminuição da ativação neuronal da sub-região CA1 independentemente do alojamento no qual os sujeitos permaneceram (Dem-Sham vs. Dem-CNC). Inesperadamente, os dados referentes às ativações neuronais nas duas subáreas do hipocampo dorsal (figuras 14 e 16) assemelhavam-se muito aos resultados comportamentais obtidos com o teste dos camundongos no LCE (figuras 8 e 9).

Assim como observado nos comportamentos relacionados à ansiedade, a condição de constrição do nervo ciático parece, pelo menos visualmente, diminuir a ativação neuronal do hipocampo dorsal ao compararmos demonstradores e observadores Sham alojados no ambiente SE. Provavelmente, essa diferença na expressão de proteína Fos entre os animais alojados em SE tenha sumido devido aos efeitos pronunciados induzidos

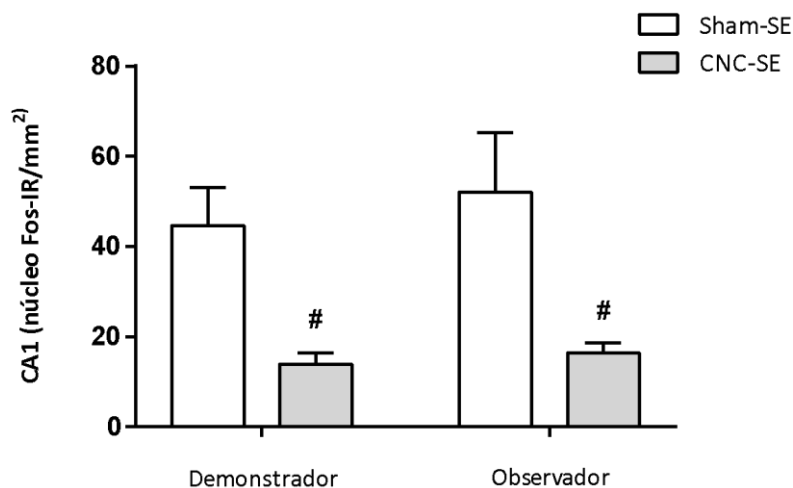
pelo alojamento no ambiente enriquecido. Dessa maneira, decidimos verificar as diferenças nos números de núcleos imunorreativos dos grupos Sham e CNC, em camundongos demonstradores e observadores, sem a influência do ambiente. Embora esse recurso não seja recomendado, nosso grupo de pesquisa utilizou desse expediente num trabalho recém-publicado na revista científica *Frontiers in Behavioral Neuroscience* (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2022). Sendo assim, o teste t de Student indicou que os grupos CNC dos demonstradores e observadores que permaneceram no ambiente SE tiveram diminuição da ativação celular na sub-região CA1 do hipocampo quando comparados com os respectivos grupos Sham (Tabela 5 e Figura 17).

Tabela 5. Número de núcleos imunorreativos para a proteína Fos por mm² de tecido extraído das sub-regiões CA1 e DG do hipocampo dorsal de demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e seus respectivos parceiros observadores alojados em ambiente SE ou ambiente enriquecido.

	CA1			
	SE		EA	
	Sham	CNC	Sham	CNC
Demonstradores	Figura 17 $t_{(10)}=3,48; p=0,32$		$204,83 \pm 25,93$	$161,07 \pm 27,89$ $t_{(3)}=1,07; p=0,36$
Observadores	Figura 17 $t_{(9)}=2,90; p=0,25$		$100,60 \pm 24,92$	$132,11 \pm 28,22$ $t_{(10)}=0,84; p=0,42$
	DG			
	SE		EA	
	Sham	CNC	Sham	CNC
Demonstradores	$43,47 \pm 12,18$ $t_{(10)}=1,23; p=0,25$	$24,05 \pm 9,99$	$159,96 \pm 53,05$	$173,33 \pm 39,14$ $t_{(3)}=0,21; p=0,85$
Observadores	$57,12 \pm 15,98$ $t_{(9)}=1,57; p=0,15$	$29,78 \pm 8,90$	$125,18 \pm 16,44$	$190,05 \pm 60,13$ $t_{(10)}=1,04; p=0,32$

Os dados são apresentados como valores das médias \pm EPM (n=2-6). CA: *Cornu Ammonis*; DG: Giro Denteado; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: constrição do nervo ciático. Teste t de Student.

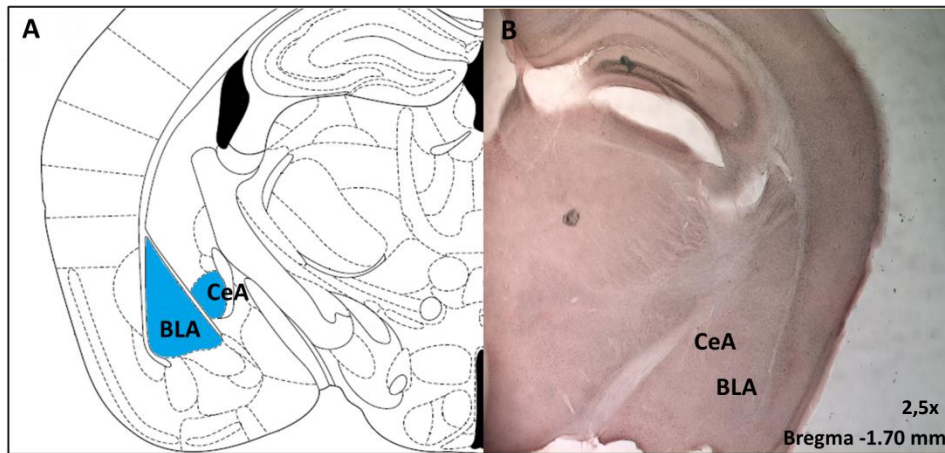
Figura 17. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm^2 de tecido extraído da sub-região CA1 do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores e observadores nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE. As barras representam os valores das médias \pm EPM ($n=2-6$). # $p<0,05$ comparado ao respectivo grupo Sham. CA: *Cornu Ammonis*; SE: Sem Enriquecimento; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: imunorreativo. Teste t de Student.



Avaliação da participação das subáreas basolateral e central da amígdala nos comportamentos relacionados à ansiedade em demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático e observadores, expostos ao enriquecimento ambiental.

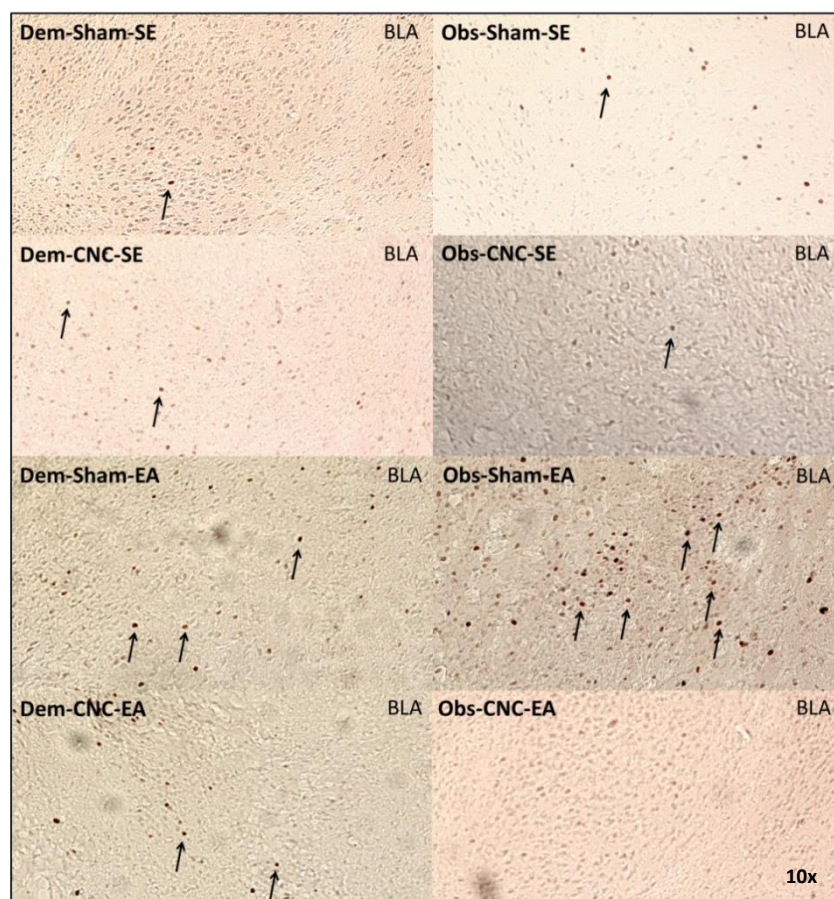
Para verificar a ativação das sub-regiões basolateral e central da amígdala durante a exibição de comportamentos relacionados à ansiedade, nós quantificamos o número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos ao final do teste de LCE. A figura 18 apresenta as áreas encefálicas utilizadas para quantificar as células positivas na amígdala.

Figura 18. Fotomicrografia da área utilizada para quantificar os núcleos imunorreativos anti-Fos nas subáreas basolateral (BLA) e central (CeA) da amígdala de camundongos demonstradores e observadores após o teste de LCE (A). Esquema representativo de seção coronal referente à localização das subáreas BLA e CeA (PAXINOS; FRANKLIN, 2019) (B).



A figura 19 mostra exemplos de cortes coronais com indicação da marcação positiva anti-proteína Fos na amígdala basolateral de demonstradores, submetidos às condições Sham ou CNC, e seus respectivos observadores, expostos ao ambiente SE ou ao EA após a avaliação dos comportamentos relacionados à ansiedade no LCE.

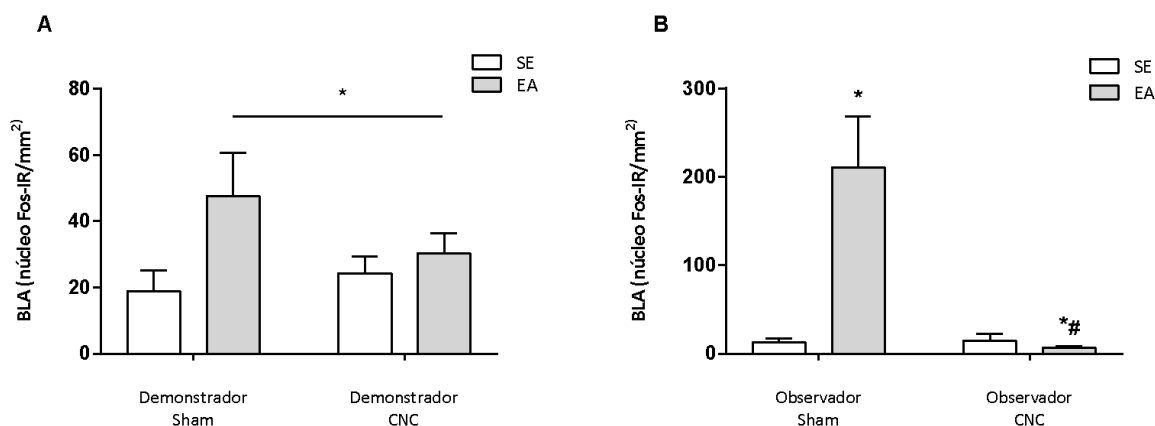
Figura 19. Cortes coronais representativos com destaque (setas pretas) para os núcleos imunorreativos anti-Fos na subárea basolateral da amígdala de demonstradores e observadores após o teste no labirinto em cruz elevado. BLA: Basolateral; Dem: Demonstrador; Obs: Observador; CNC: Constricção do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental.



A figura 20A apresenta o número de neurônios ativados na porção basolateral da amígdala de demonstradores dos grupos Sham e CNC, alojados no ambiente SE ou no EA. A análise de variância bifatorial revelou que houve efeito do fator alojamento ($F_{1,14}=5,85$; $p<0,05$), mas não do fator condição ($F_{1,14}=0,67$; $p=0,43$) e da interação entre os fatores ($F_{1,14}=2,47$; $p=0,14$). Pode-se dizer então, que o alojamento de camundongos demonstradores no ambiente enriquecido induz um aumento da ativação celular da BLA se comparados aos animais que permaneceram no ambiente SE, independentemente da condição (Dem-SE vs. Dem-EA).

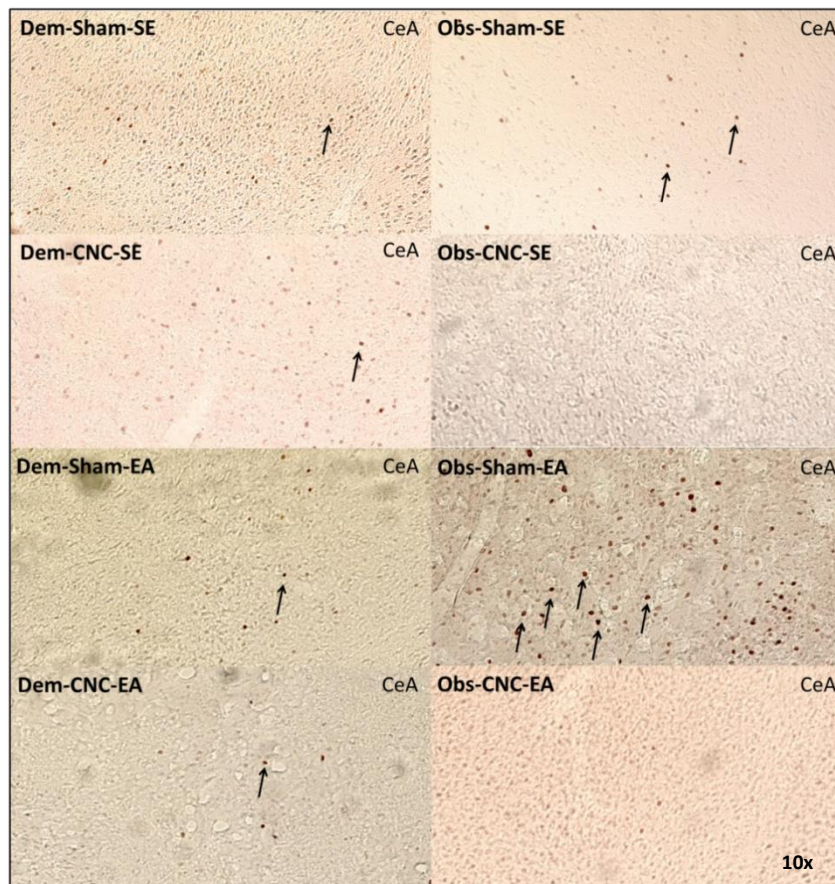
Com relação aos animais observadores, a ANOVA de duas vias indicou efeitos do fator condição ($F_{1,11}=5,38$; $p<0,05$) e da interação entre os fatores ($F_{1,11}=5,60$; $p<0,05$), mas não do fator alojamento ($F_{1,11}=4,77$; $p=0,052$) (figura 24B). O teste de Duncan demonstrou que os animais observadores do grupo CNC alojados no ambiente enriquecido tiveram uma diminuição significativa da expressão da proteína Fos na amígdala basolateral quando comparados ao respectivo grupo SE na mesma condição (Obs-CNC-SE vs. Obs-CNC-EA). Além disso, observa-se que o mesmo grupo CNC exposto ao EA também apresenta diminuição da ativação neuronal na BLA quando comparado ao grupo Sham alojado no ambiente enriquecido (Obs-Sham-EA vs. Obs-CNC-EA).

Figura 20. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm² de tecido extraído da sub-região BLA da amígdala de camundongos demonstradores (A) e observadores (B) nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE ou EA. As barras representam os valores das médias ± EPM (n=2-6). #p<0,05 comparado ao respectivo grupo Sham. *p<0,05 comparado ao alojamento SE. BLA: Basolateral; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: Imunorreativo. ANOVA de duas vias.



A figura 21 apresenta exemplos de cortes coronais indicando a marcação positiva anti-proteína Fos na amígdala central de camundongos demonstradores e observadores dos grupos Sham e CNC, expostos ao ambiente SE ou EA e avaliados no teste de LCE.

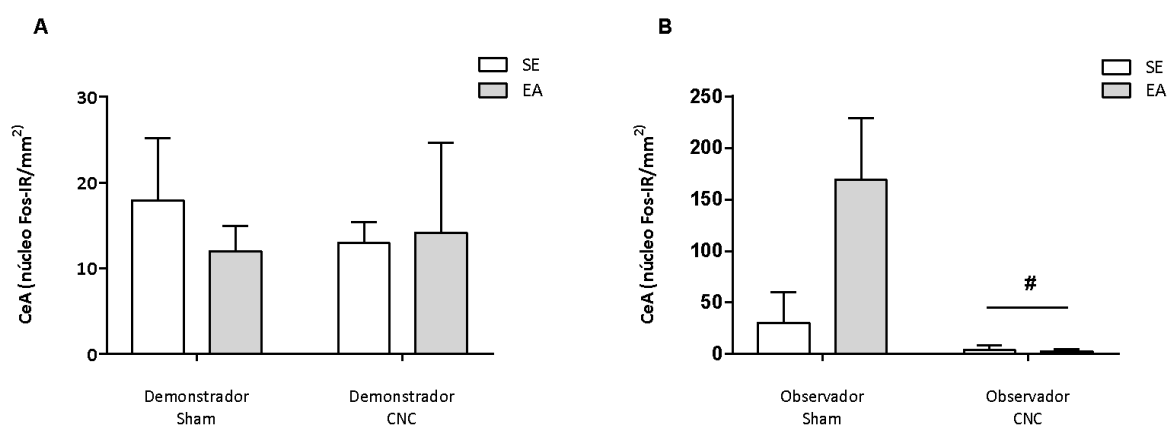
Figura 21. Cortes coronais representativos com destaque (setas pretas) para os núcleos imunorreativos anti-Fos na subárea central da amígdala de demonstradores e observadores após o teste no labirinto em cruz elevado. CeA: Amígdala Central; Dem: Demonstrador; Obs: Observador; CNC: Constrição do Nervo Ciático; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental.



Na figura 22A podemos observar os efeitos do EA na ativação neuronal da CeA de camundongos demonstradores submetidos, ou não, à constrição do nervo ciático. A análise de variância de duas vias não indicou efeito dos fatores alojamento ($F_{1,14}=0,12$; $p=0,73$) e condição ($F_{1,14}=0,04$; $p=0,84$) na expressão de proteína Fos na amígdala central. A interação entre os fatores alojamento e condição também não teve efeito ($F_{1,14}=0,28$; $p=0,61$) na ativação celular dos animais demonstradores.

Considerando a ativação neuronal na amígdala central dos animais observadores (figura 22B), a ANOVA bifatorial revelou efeito do fator condição ($F_{1,13}=5,92$; $p<0,05$), mas não do fator alojamento ($F_{1,13}=3,01$; $p=0,11$) e da interação entre os fatores ($F_{1,13}=3,17$; $p=0,10$). Isso significa que conviver com um parceiro submetido à constrição do nervo ciático promove diminuição da ativação da amígdala central, independentemente do tipo de ambiente no qual os animais estavam alojados (Obs-Sham vs. Obs-CNC).

Figura 22. Número de núcleos imunorreativos anti-proteína Fos por mm² de tecido extraído da sub-região central da amígdala de camundongos demonstradores (A) e observadores (B) nas condições Sham ou CNC, e alojados em ambiente SE ou ambiente enriquecido. As barras representam os valores das médias \pm EPM (n=2-6). #p<0,05 comparado à condição Sham. CeA: Amígdala Central; SE: Sem Enriquecimento; EA: Enriquecimento Ambiental; CNC: Constrição do Nervo Ciático; IR: Imunorreativo. ANOVA de duas vias.



Discussão

Os nossos resultados mostraram que a constrição do nervo ciático promoveu aumento da sensibilidade ao estímulo térmico na pata lesionada dos demonstradores, e o enriquecimento ambiental produziu uma queda parcial na hipersensibilidade térmica apresentada pelos camundongos demonstradores. Observamos também, que os animais demonstradores com dor neuropática e seus respectivos coespecíficos observadores alojados no ambiente sem enriquecimento, exibiram aumento de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE. Em contrapartida, os mesmos grupos demonstradores CNC e observadores CNC que permaneceram no ambiente enriquecido não demonstraram alterações que condizem com aumento de ansiedade, ou seja, o EA preveniu o surgimento de comportamentos relacionados à ansiedade. Inesperadamente, encontramos uma correlação positiva nos comportamentos relacionados à ansiedade avaliados no LCE entre os animais que conviveram nas mesmas caixas-moradia, independentemente da condição e alojamento a que foram submetidos.

Além disso, avaliamos a participação do hipocampo dorsal e da amígdala nas respostas comportamentais exibidas pelos demonstradores e observadores, através da marcação da proteína de expressão imediata Fos. A condição CNC diminuiu a expressão de Fos na subárea CA1 do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores. O enriquecimento ambiental aumentou a expressão de Fos nas sub-regiões CA1 e DG do hipocampo dorsal de demonstradores e observadores. Quando desconsideramos a influência do enriquecimento ambiental na expressão de Fos na sub-região CA1, conseguimos verificar que a condição CNC foi capaz de diminuir a ativação dessa área em camundongos demonstradores e observadores comparados com os animais do grupo Sham. Em relação à amígdala observamos que o enriquecimento ambiental aumentou a ativação no núcleo basolateral em camundongos demonstradores. Nos camundongos observadores a condição CNC promoveu diminuição da expressão de Fos no núcleo central da amígdala.

A fim de constatar a dor induzida pelo modelo de constrição do nervo ciático, os demonstradores CNC e Sham foram avaliados no teste de placa quente. Esse teste é uma ferramenta simples e eficaz para detectar a hiperalgesia periférica e analgesia (ausência ou redução da sensibilidade à dor) em ratos e camundongos, dado que o calor é utilizado

como estímulo nocivo em modelos de dor (LAVICH et al., 2005). De forma geral, a latência da resposta do sujeito ao estímulo é registrada como variável dependente, sendo que os limiares nociceptivos da pata inflamada são determinados pela retirada reflexa da pata (LAVICH et al., 2005; BANNON; MALMBERG, 2007).

Assim, identificamos redução da latência de retirada da pata traseira direita nos demonstradores CNC quando comparados aos demonstradores Sham. Isso se deve a sensibilização dos nociceptores locais e das respostas fisiológicas acarretadas pela lesão crônica do nervo ciático, o que leva o animal a retirar a pata mais rapidamente em relação aos animais em condições saudáveis, o que caracteriza uma hiperalgesia térmica ipsilateral (BANNON; MALMBERG, 2007). Além do que, essa evidência nos mostra que os demonstradores CNC ainda estavam sob os efeitos da dor neuropática até o dia da exposição ao LCE.

Resultados similares aos obtidos nesse estudo sobre as consequências da dor neuropática já foram anteriormente descritos na literatura. Logo, foi demonstrada uma diminuição expressiva na latência de retirada da pata em ratos Sprague-Dawley submetidos ao modelo de constrição do nervo ciático e expostos a placa quente, em outras palavras, uma hiperalgesia observada após a aplicação de um estímulo térmico (Zhang et al., 2018). Outras pesquisas também encontraram hiperalgesia térmica induzida pela dor neuropática em ratos Wistar submetidos ao teste de placa quente (TOLEDO et al., 2021; SILVA-CARDOSO et al., 2021). Wang e colaboradores (2021) verificaram que a cirurgia de constrição do nervo ciático promove redução da latência de retirada da pata em ratos Sprague-Dawley.

A dor neuropática pode ser causada por uma lesão ou doença do sistema somatossensorial cuja função reside na captação de estímulos sensoriais como percepção ao toque, pressão, dor, temperatura entre outros (TREEDER et al., 2007). Esse sistema também é responsável pelo envio dos sinais percebidos para a medula espinhal e, eventualmente, para o cérebro que se encarregará em processar e interpretar essas informações (COLLOCA et al., 2017). Na maioria dos casos, a origem desse tipo de dor está relacionada à secção ou compressão de nervos periféricos ou como consequência de uma doença metabólica como a diabetes (KREMER et al., 2020).

Nesse âmbito, outros estudos que adotaram diferentes testes para avaliar a hiperalgesia desencadeada pela dor neuropática explanaram dados semelhantes. Por exemplo, camundongos C57Bl/6J submetidos à cirurgia de constrição por meio da implantação de um tubo de polietileno ao redor do nervo ciático (sciatic nerve cuffing) diminuíram a latência para retirada da pata em comparação ao sham quando expostos a aplicação de um feixe infravermelho de calor na superfície plantar de cada pata traseira (BENBOUZID et al., 2008). A hiperalgesia ipsilateral induzida pelo modelo de dor neuropática também foi observada em ratos Sprague-Dawley que apresentaram redução significativa da latência de retirada da pata traseira após o contato com uma superfície gelada (HOLDRIDGE et al., 2007). Yang e colaboradores (2020) observaram que ratos Sprague-Dawley com o nervo constricto retiraram a pata traseira lesionada mais rapidamente em relação ao Sham quando expostos a um teste de radiação de estímulo de calor. Ainda, evidências do nosso grupo de pesquisa demonstraram que camundongos submetidos à constrição do nervo ciático apresentaram redução da latência de retirada da pata lesionada pela cirurgia ao serem expostos ao teste de placa quente (BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; ZANIBONI et al., 2018; BENASSI-CEZAR et al., 2020; TAVARES et al., 2022; TAVARES et al., 2023).

O nosso estudo constatou que o convívio com um demonstrador submetido à constrição do nervo ciático induz comportamentos relacionados à ansiedade, caracterizados pela redução da exploração aos braços abertos do LCE e aumento de respostas de avaliação de risco em camundongos observadores. Da mesma forma, verificamos que os demonstradores CNC apresentaram menor índice de entradas e tempo gasto nos braços abertos, e aumento da porcentagem de SAP protegido. Nossos resultados também indicaram que o EA foi capaz de prevenir esse efeito ansiogênico, pois os animais expostos ao EA apresentaram aumento de entradas e tempo gasto nos braços abertos. Além disso, a exposição ao EA provocou a redução das respostas de avaliação de risco caracterizadas pela diminuição do total de SAP e aumento da porcentagem de SAP protegido.

Não somente a hipersensibilidade dolorosa é um dos efeitos associados à dor neuropática, diversos estudos científicos têm indicado alterações emocionais associadas ao desconforto da dor (ATTAL et al., 2008; GERRITS et al., 2012; HAANPÄÄ et al.,

2009; SIMONS et al., 2014; SIEBERG et al. al., 2018; BASANTSOVA et al., 2019; MARTÍNEZ-LAVÍN, 2021). Em âmbito pré-clínico, algumas pesquisas adotaram o modelo de constrição do nervo ciático em modelos animais para mimetizar comorbidades causadas pela dor neuropática, dentre elas, respostas referentes à ansiedade.

Baseado nisso, Roeska e colaboradores (2008) encontraram que a constrição do nervo ciático em ratos Wistar produziu a diminuição do total de entradas e no tempo gasto nas áreas abertas do LCE em comparação aos animais Sham. Em contexto similar, após 25 dias do procedimento de constrição do nervo ciático, ratos Wistar avaliados no LCE exibiram menor exploração aos braços abertos em comparação ao respectivo controle (CASPANI et al., 2014). Outro estudo obteve resultado semelhante, nesse caso, ratos Sprague–Dawley submetidos à constrição parcial do nervo ciático diminuíram o tempo gasto nos braços abertos do LCE (WANG; XUE-QIN et al., 2015).

Da mesma forma, Çivi e colaboradores (2016) mostraram redução da exploração aos braços abertos do LCE em ratos Wistar após 21 dias de dor produzida pela constrição do nervo ciático. Em camundongos, foi igualmente observada uma diminuição significativa no número de entradas e na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do LCE devido à realização da constrição do nervo ciático (FERREIRA-CHAMORRO et al., 2018). Murasawa e colaboradores (2019) observaram que após duas semanas de constrição do nervo ciático, os ratos Sprague–Dawley testados no LCE demonstraram diminuição da exploração aos braços abertos.

Esse conjunto de evidências nos mostra que o modelo de dor neuropática é eficaz para induzir comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. Em nosso estudo, os camundongos demonstradores constritos manifestaram aumento de respostas referentes à ansiedade, representada pela diminuição da exploração aos braços abertos, aumento do tempo gasto no centro do LCE e aumento da porcentagem de SAP protegido, o que corrobora com os achados publicados na literatura. Nesse sentido, no nosso estudo, podemos considerar que os camundongos observadores além de conviverem com a dor dos seus demonstradores, também experienciaram a ansiedade induzida por essa dor.

A importância de avaliarmos o comportamento dos demonstradores se dá pelo nosso interesse em verificar a reverberação emocional da dor durante o convívio. Diferentes estudos têm constatado que os roedores apresentam respostas emocionais na

presença de um coespecífico em sofrimento (LANGFORD et al., 2006; 2011; BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; 2022; SATO et al., 2015; CARMONA et al., 2016; CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017; 2022; ZANIBONI et al., 2018; KANDIS et al., 2018; FONTES-DUTRA et al., 2019; COX; REICHEL, 2020; HERNANDEZ-LALLEMENT et al., 2020; BENASSI-CEZAR et al., 2020; TAVARES et al., 2021; SILVEIRA et al., 2023; TAVARES et al., 2022; TAVARES et al., 2023). A capacidade de percepção da dor permite aos animais compartilharem estados emocionais mesmo sem serem capazes de identificar a fonte ou entender a causalidade da emoção despertada durante a observação do outro (LAVIOLA et al., 2017).

Dessa forma, quando o estado emocional de um indivíduo induz um estado correspondente no observador, denomina-se de contágio emocional (HATFIELD et al. 1993), um mecanismo básico que constitui a empatia (BRÅTEN, 2007; SIVASELVACHANDRAN et al., 2018). Para Preston e De Waal (2002), a empatia é fundamentada no paradigma do mecanismo ação-percepção que possibilita ao observador experienciar o estado emocional do outro por meio de suas próprias representações neurais. A percepção do comportamento de um indivíduo, ativa automaticamente as representações desse comportamento no observador (MOYA-ALBIOL et al., 2010; DE WAAL, 2011). Além disso, quanto maior proximidade social entre os indivíduos, mais fácil ocorrerá essa ativação (PRESTON; DE WAAL, 2002; MARTIN et al., 2015). Sendo assim, a empatia é caracterizada pelo reconhecimento de estados afetivos nos outros que podem ser evocados no observador (BARTAL et al., 2011; ATSAK et al., 2011; CHEN, 2017).

À vista disso, nossos resultados demonstraram que os camundongos observadores CNC exibem aumento de comportamentos ansiogênicos quando expostos ao LCE em comparação com os observadores Sham. Portanto, sugerimos que a coabitação com um coespecífico sujeito a constrição do nervo ciático é capaz de suscitar respostas relacionadas à ansiedade. Da mesma forma, estudos do nosso grupo de pesquisa têm identificado esse padrão comportamental intrínseco ao convívio, isto é, aumento da ansiedade representado pela maior exploração aos braços abertos em camundongos que conviveram com a dor neuropática do outro, o que denominamos de empatia pela dor

(BAPTISTA-DE-SOUZA et al., 2015; 2022; CARMONA et al., 2016; BENASSI-CEZAR et al., 2020; TAVARES et al., 2021).

Os nossos achados são amparados por trabalhos que verificaram o contágio emocional independentemente do tipo de protocolo comportamental adotado. Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstrou aumento de comportamentos relacionados à ansiedade coexistente a exposição crônica ao estresse de contenção em camundongos suíço-albinos. Paralelamente, também verificamos aumento da ansiedade nos parceiros de gaiola desses animais, sugerindo que o contato com os prejuízos da ansiedade induzida pelo estresse pode estar sendo influenciado pelo contágio emocional (CARNEIRO DE OLIVEIRA et al., 2017; 2022; SILVEIRA et al., 2023).

Ainda, Tomiyoshi e colaboradores (2009) observaram que camundongos C57Bl/6 alojados por 20 dias com seus coespecíficos inoculados por um indutor tumoral apresentaram redução do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos do LCE em comparação aos que conviveram com animais saudáveis. Em outro contexto, foi averiguado aumento de comportamentos relacionados à ansiedade em ratos Wistar e Sprague-Dawley após experienciarem seus parceiros receberem injeções crônicas de formalina (NAZERI et al., 2019; MOHAMMADI et al., 2018) ou agudas de veneno de abelha na pata (LI et al., 2014).

Da mesma forma, um protocolo embasado em testemunhar repetidamente a derrota social do parceiro pode aumentar a resposta associada à ansiedade (MIAO et al., 2018; PATKI, et al., 2014; 2015; WARREN et al., 2013). Yang e colaboradores (2016) utilizaram dois tipos de modelo para investigar o contágio emocional, um que simula sintomas epiléticos por meio da estimulação do lobo temporal induzida pela pilocarpina, uma substância alcalóide que quando administrada sistemicamente em altas doses pode provocar alterações comportamentais com manifestações de crises motoras límbicas, mioclonia dos membros anteriores e automatismos faciais (CAVALHEIRO et al., 1996); e o segundo que expunha cronicamente camundongos a choques elétricos nas patas. Os resultados mostraram que os camundongos C57Bl/6 que conviveram tanto com os coespecíficos submetidos ao modelo epilético quanto ao efeito aversivo dos choques apresentaram redução na exploração aos braços no LCE, classificando aumento de ansiedade.

É importante ressaltar que esses trabalhos forneceram evidências enfatizando que contextos psicossociais instáveis devido à presença de sujeitos fisicamente prejudicados e vicariamente em sofrimento podem influenciar o comportamento dos coabitantes desse ambiente. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que os estados emocionais podem afetar o sujeito e o objeto, ou no caso do presente trabalho, demonstrador e observador bidirecionalmente (DE WAAL, 2008; LAMM et al., 2011; LANGFORD et al., 2006).

Primordialmente, os trabalhos do nosso grupo adotaram medidas farmacológicas para o estudo dessas consequências ocasionadas pelo modelo de empatia pela dor (CARMONA et al., 2016; ZANIBONI et al., 2018; BENASSI-CEZAR et al., 2021; TAVARES et al., 2022; TAVARES et al., 2023). Nosso trabalho buscou, de forma *sui generis*, utilizar a manipulação ambiental para investigar seu possível efeito na ansiedade induzida pelo convívio com um coespecífico submetido a dor crônica. De maneira efetiva, demonstramos que o enriquecimento ambiental se mostrou eficaz na prevenção de comportamentos do tipo ansioso tanto em demonstradores quanto em observadores CNC. Isto é, aumentou as entradas e o tempo gasto nos braços abertos do LCE, diminuiu a exploração no centro do aparato e ainda reduziu a taxa de comportamentos de avaliação de risco.

O enriquecimento ambiental pode amenizar a ansiedade presente em estados de dor crônica, contribuindo para a melhora do bem-estar animal e favorecendo processos cognitivos como memória e aprendizagem (KIMURA et al., 2022). Sob esse aspecto, ratos Sprague-Dawley submetidos à dor neuropática expostos ao ambiente enriquecido demonstraram ansiedade reduzida quando avaliados no LCE em comparação aos respectivos controles do ambiente padrão (VACHON, 2014). Kimura e colaboradores (2020) mostraram que após sete semanas de exposição ao enriquecimento ambiental, ratos Wistar com o nervo constricto exibem diminuição de comportamentos relacionados à ansiedade exibidos no LCE.

Similarmente, Gong e colaboradores (2018) demonstraram que o enriquecimento ambiental foi uma alternativa efetiva para reduzir comportamentos do tipo ansioso em ratos Sprague-Dawley adolescentes submetidos à cirurgia de constrição parcial do nervo ciático e avaliados no LCE e no campo aberto. Nossos resultados obtidos por meio da

estimulação ambiental igualmente apontam efeitos benéficos do enriquecimento nos animais demonstradores CNC, isto é, apesar da dor neuropática ter induzido comportamentos relacionados à ansiedade, o enriquecimento ambiental foi capaz de preveni-los.

Além desse paradigma de enriquecimento ambiental para o alívio da constrição do nervo ciático adotado em nosso estudo, outras pesquisas utilizaram formas de acessar as consequências intrínsecas da exposição ao enriquecimento ambiental e sua influência em situações de exposição a estímulos estressores. Por exemplo, em um protocolo caracterizado por 14 dias de dor crônica inflamatória provocada pela injeção intraplantar de adjuvante completo de Freund foi possível detectar melhora da exploração aos braços abertos do LCE em camundongos C57BL/6 quando alocados em um ambiente enriquecido (ZHENG et al., 2017). Ainda, evidências da literatura demonstraram o papel do enriquecimento ambiental na prevenção contra o comportamento do tipo ansioso em ratos Wistar desencadeado pelo estresse agudo de contenção e em camundongos submetidos ao estresse de separação materna. Nesses casos, a exposição ao estresse não foi capaz de reduzir a exploração dos braços abertos do LCE e da área central do campo aberto nos animais enriquecidos (ASHOKAN et al., 2016; NOVAES et al., 2017; JI; XIA, 2022).

Interessantemente, o enriquecimento ambiental também influenciou a hipernocicepção ao estímulo térmico, induzida pela dor neuropática. Nesse âmbito, observamos uma reversão parcial dos efeitos da dor nos demonstradores CNC quando submetidos ao teste da placa quente, ou seja, verificamos um perceptível aumento na latência de retirada da pata nos demonstradores CNC com EA em relação ao CNC-SE (figura 7). Os resultados sugerem que o enriquecimento ambiental diminuiu a nocicepção produzida pela cirurgia, entretanto não foi capaz de nivelar esse padrão de resposta ao obtido com os demonstradores Sham. Resultado semelhante foi apresentado por Wang e colaboradores (2019), cuja resposta de aumento da percepção dolorosa termal avaliada pela aplicação de um feixe de calor diretamente na pata, foi atenuada pelo enriquecimento ambiental em ratos camundongos C57BL/6 submetidos à dor neuropática.

Parent-Vachon e Vachon (2018) demonstraram que o enriquecimento ambiental diminuiu a hipernocicepção a estímulos mecânicos avaliados no teste von Frey em ratos

Sprague-Dawley com neuropatia. Outro estudo verificou que camundongos CD-1 submetidos ao modelo de denervação parcial e expostos ao enriquecimento ambiental não apresentaram redução da percepção ao estímulo térmico quente, porém, foi observado menor hipersensibilidade ao estímulo mecânico e frio em comparação aos animais controle (VACHON et al., 2013). Além disso, um grupo de pesquisadores observou que o alojamento em um ambiente enriquecido reverteu a hiperalgesia apresentada no teste de distensão colorretal em ratos previamente submetidos ao estresse de separação materna (JI; XIA, 2022).

Algumas condições de alojamento empregadas em procedimentos de enriquecimento ambiental, como ciclismo passivo e esteira, são eficazes para aliviar a dor de lesão crônica e a disfunção motora (TAI et al., 2018). Além disso, o EA é um método preciso para provocar o crescimento neuronal e a habilidade motora em diferentes protocolos de cirurgia do nervo ciático (BARONCELLI et al., 2010).

O estudo a respeito de tratamentos para distúrbios neuropsicológicos pode favorecer a compreensão tanto dos mecanismos de terapias já existentes como o manejo de antidepressivos e ansiolíticos, e ainda elucidar abordagens eficazes como o enriquecimento ambiental (CORDNER et al., 2022). Nesse contexto, o presente trabalho adiciona mais um elemento nos estudos que buscam entender a influência que o ambiente pode exercer sobre comportamentos seus mecanismos neurobiológicos subjacentes.

Para sustentar a ideia de que o estado emocional de um sujeito pode ser percebido e influenciar as emoções, e conseqüentemente o comportamento de um coespecífico, realizamos análises de correlação entre demonstradores e observadores para todos os resultados obtidos no teste do LCE. É importante destacar que os dados utilizados para avaliar a relação entre os comportamentos dos sujeitos vieram de demonstradores e observadores da mesma gaiola. Do ponto de vista clínico, a convivência com pacientes de doenças crônicas pode alterar o estado emocional de familiares e/ou cuidadores. Nesse contexto, pesquisas têm demonstrado níveis elevados de sofrimento psicológico, ansiedade e sintomas de depressão em cônjuges de indivíduos com dor crônica (LEONARD; CANO, 2006; SCHWARTZ et al., 1991). Em vários trabalhos os cuidadores relataram uma experiência emocional desagradável pronunciada provocada pela sobrecarga do cuidar e da percepção do sofrimento dos pacientes, o que contribui

para o surgimento de ansiedade e humor depressivo (COSTA-REQUENA et al., 2012; GONZALEZ et al., 2020; SCHULZ et al., 2007; SCHULZ; SHERWOOD, 2008).

Na análise dos nossos resultados encontramos correlação positiva na porcentagem de entradas de braços abertos e porcentagem de tempo gasto em braços abertos, independentemente da lesão do nervo ciático e das condições de alojamento dos grupos (Figura 5A e 5B). Esses achados podem sugerir uma possível conexão do estado emocional compartilhado entre os pares. Alguns trabalhos mostraram correlações entre demonstradores e observadores principalmente no paradigma de aprendizagem observacional do medo (GONZALEZ-LIENCRES et al, 2014; HAN et al, 2020; ZHENG et al, 2020). Nossas evidências podem contribuir para o entendimento desses comportamentos em humanos, ainda como podemos empregar intervenções mais adequadas para amenizar o sofrimento causado pela dor em pacientes, familiares e cuidadores.

No presente trabalho nós demonstramos que a dor gerada pela constrição do nervo ciático induziu diminuição da ativação da sub-região CA1 (Figura 17), mas não do DG (figura 16), do hipocampo dorsal de camundongos demonstradores e observadores alojados em ambiente padrão. Além disso, o enriquecimento ambiental foi capaz de prevenir os efeitos da constrição do nervo ciático na expressão de Fos em CA1 (figura 14) e ainda promoveu um aumento significativo da ativação de CA1 (figura 14) e DG (figura 16) de camundongos demonstradores e observadores Sham. Apesar de não ser vasta, a literatura revela que o recrutamento do hipocampo dorsal é crítico na exibição de comportamentos relacionados à dor. Wei e colaboradores (2021), por exemplo, demonstram que as ativações farmacológica (microinjeção de glutamato), optogenética e quimiogenética do hipocampo dorsal promoveram analgesia no teste de Von Frey em ratos e camundongos submetidos aos modelos de dor neuropática SNI (*Spared nerve injury* – lesão do nervo ciático) e SNL (*Spinal nerve ligation* – ligadura dos nervos espinais), mas não nos animais sham – o aumento do limiar de alodinia (dor em resposta a um estímulo que normalmente não causaria dor) foi cerca de 20% atingindo o grau de significância de 0,09 ($p=0,09$). Em contrapartida, a microinjeção de indiplon, um agonista alostérico do GABA, no hipocampo dorsal induziu efeito proalgésico apenas nos animais sham – provavelmente pelo limiar de retirada das patas nos animais SNI tenha se

aproximado de 0% (WEI et al., 2021). Esses dados indicam que a ativação e inibição do hipocampo dorsal promovem efeitos antinociceptivos e pronociceptivos, respectivamente.

A literatura tem proposto que interneurônios GABAérgicos são responsáveis pela inibição tônica das células piramidais (neurônios glutamatérgicos) do hipocampo. Sendo assim, Mendes e Menescal-de-Oliveira (2008) verificaram que a microinjeção intra-hipocampo dorsal de bicuculina, um antagonista GABAérgico, induziu efeitos antinociceptivos em cobaia (*guinea pigs*). Por outro lado, a microinjeção de muscimol, um agonista GABAérgico promoveu aumento da percepção de dor (MENDES; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008). Esses dados nos encorajam a propor o possível mecanismo neuronal recrutado no hipocampo dorsal nas respostas analgésicas e próalgésicas. Como apresentado anteriormente, a microinjeção de glutamato no hipocampo dorsal produziu efeito antinociceptivo e o bloqueio de receptores NMDA no local aboliu esse efeito (WEI et al., 2021). Também foi verificado que a ativação e inibição de neurônios GABAérgicos no hipocampo dorsal induzem analgesia e próalgesia respectivamente (MENDES; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008). Dessa forma nós sugerimos que a dor neuropática crônica promoveu uma queda na ativação de neurônios glutamatérgicos do hipocampo dorsal induzindo a exibição de respostas de hipersensibilidade à dor. Em contrapartida, a exposição ao enriquecimento ambiental reestabeleceu a atividade desses neurônios glutamatérgicos, responsáveis pelos efeitos analgésicos do hipocampo dorsal. Embora plausível, muitos estudos precisam ser realizados para confirmar os mecanismos sugeridos.

Observamos também que os animais demonstradores e observadores que exibiram queda na exploração dos braços abertos do LCE, apresentaram diminuição da expressão de Fos na sub-região CA1 do hipocampo dorsal. Por outro lado, o enriquecimento ambiental além de prevenir o aumento de comportamentos relacionados à ansiedade, também impediu a diminuição da ativação da sub-região CA1 do hipocampo dorsal de camundongos submetidos à dor neuropática crônica e seus coespecíficos.

Considerando o papel do hipocampo dorsal nas respostas relacionadas à ansiedade, a literatura é escassa e controversa. Zhang e colaboradores (2014a), por exemplo, verificaram que a inibição do hipocampo dorsal de ratos através da microinjeção

de muscimol promoveu aumento da aversão aos braços abertos do LCE, um comportamento ansiogênico típico. Nossos dados corroboram Zhang e colaboradores (2014a) ao indicarem que o aumento de comportamentos do tipo ansioso está relacionado com a diminuição da atividade do hipocampo dorsal.

Outro estudo verificou que o estresse de separação materna prejudicou o comportamento de esquiva inibitória em ratos. Entretanto, os animais que foram submetidos ao estresse e expostos ao enriquecimento ambiental apresentaram reversão desses comportamentos. Ainda, os efeitos do enriquecimento ambiental na tarefa de esquiva inibitória estavam relacionados com o aumento da expressão de Fos no hipocampo dorsal (VIVINETTO et al., 2013). Sabe-se que o modelo de esquiva inibitória é utilizado para avaliação de comportamentos relacionados ao aprendizado e memória, porém, esse teste também envolve um componente emocional semelhante à ansiedade (DOS SANTOS et al., 2005), tanto que nesse mesmo estudo os pesquisadores não encontraram efeito da separação materna no teste de reconhecimento de objetos, mas sim na tarefa de esquiva inibitória.

Dessa forma, os autores concluem que além de prejudicar a memória e a aprendizagem, o estresse de separação materna também afetou componentes emocionais (VIVINETTO et al., 2013), funções que recrutam o hipocampo dorsal (KHAKPAI et al., 2016). Nesse sentido, nós também demonstramos que a exposição ao enriquecimento ambiental preveniu a exibição de comportamentos do tipo ansiogênicos e promoveu aumento da expressão de Fos no hipocampo dorsal, resultados que corroboram Vivinnetto e colaboradores (2013) ao indicarem que o enriquecimento ambiental aumenta a atividade do hipocampo dorsal e promove efeitos benéficos no componente emocional relacionado à dor.

Embora tenhamos encontrado poucos trabalhos além do nosso, os dados sugerem que o aumento de comportamentos do tipo ansioso está relacionado com a diminuição da atividade do hipocampo dorsal. Além disso, observou-se que a exposição ao enriquecimento ambiental não reverte somente os efeitos comportamentais do estresse, como também aumentou a ativação do hipocampo dorsal durante a exibição desses comportamentos. Algumas evidências, entretanto, revelaram que a inativação do hipocampo dorsal através da injeção local de midazolam ou muscimol diminuíram os

comportamentos relacionados à ansiedade no LCE e no teste de interação social (ENGIN; TREIT, 2007; GONZALEZ et al., 1998; MENARD; TREIT, 2001; REZAYAT et al., 2005).

O hipocampo dorsal parece ter papel fundamental na percepção da dor. Ao que tudo indica, a ativação de neurônios glutamatérgicos dessa região induzem efeitos analgésicos e a inibição dos mesmos, através do controle exercido por neurônios GABAérgicos, promovem aumento da nocicepção. Fazendo uma sugestão, poderíamos dizer que a diminuição da expressão de Fos indica diminuição da atividade glutamatérgica na região, causando aumento da dor nos camundongos com constrição do nervo ciático. A exposição ao ambiente enriquecido provavelmente impediu a diminuição da atividade dos neurônios de glutamato da região e conseqüentemente atenuou os efeitos proalgérgicos. Da mesma forma, o hipocampo dorsal pode ter papel importante na exibição de comportamentos relacionados à ansiedade, embora nesse caso a literatura mostre resultados antagônicos. Novos experimentos são fundamentais para entender o papel do hipocampo dorsal na comorbidade entre a dor e a ansiedade.

Com relação às subáreas da amígdala, observamos que a constrição do nervo ciático diminuiu a expressão de Fos no CeA de observadores submetidos ao ambiente sem enriquecimento. Inesperadamente, o enriquecimento ambiental induziu um aumento drástico da expressão de Fos no BLA, mas não no CeA, de camundongos demonstradores. Verificamos também que observadores que conviveram com parceiros Sham apresentaram aumento da expressão de proteína Fos no CeA comparados ao respectivo grupo CNC. Esses resultados indicam que o enriquecimento ambiental por si só induziu o aumento de Fos no BLA dos camundongos.

A amígdala é uma área do encéfalo responsável por conceder um valor emocional às informações sensoriais. Independentemente do valor, positivo ou negativo, adaptamos nossos comportamentos e respostas afetivas de acordo com o estímulo recebido. A consequência disso é que somos capazes de criar memórias emocionais que facilitam as escolhas do comportamento mais adequado em situações futuras (LEDOUX, 2000; VEINANTE et al., 2013). Como os estímulos nociceptivos também são potencialmente prejudiciais à integridade corporal, é de se esperar que a amígdala possa integrar diversas informações nociceptivas para iniciar ou modular as respostas autonômicas e

comportamentais de acordo com o contexto ambiental e com o estado afetivo. Essa adaptação inclui mecanismos de hipoalgesia/analgesia que permitem a inibição reflexa e facilitam as respostas de luta ou fuga. Além disso, esta estrutura cerebral participa na antecipação/previsão do perigo potencial, com base em sinais sensoriais salientes (sons, imagens, odores entre outros), para iniciar as mesmas respostas adaptativas que na presença direta do perigo (VEINANTE et al., 2013).

Ao contrário dos nossos resultados, a literatura tem mostrado que a dor neuropática promove aumento da ativação da amígdala e o recrutamento dessa área pode estar relacionado aos comportamentos ansiogênicos exibidos pelos animais submetidos à dor. Liu e colaboradores (2022), por exemplo, induziram dor neuropática em camundongos através da administração intraperitoneal de paclitaxel, um antitumoral, durante oito dias. A administração crônica do fármaco induziu alodinia mecânica, hiperalgesia térmica, bem como aumento de comportamentos relacionados à ansiedade no LCE e no campo aberto. Além disso, os camundongos que apresentaram comportamentos ansiogênicos e hiperalgésicos também tiveram aumento da expressão de Fos no CeA e no BLA (LIU et al., 2022). Da mesma maneira, Seno e colaboradores (2018) verificaram que ratos submetidos à dor neuropática apresentaram hiperalgesia e alodinia mecânicas, além do aumento da ativação do CeA e BLA, duas semanas após a cirurgia de constrição do nervo ciático. O grupo ainda mostrou que a inativação do CeA e do BLA, com microinjeção de muscimol, reverteu os efeitos comportamentais relacionados à dor e à depressão (SENO et al., 2018).

A literatura também mostra o papel da amígdala nas respostas relacionadas à ansiedade utilizando outros modelos de dor crônica. A administração intracólon de Zymosan, uma substância glicoproteica extraída da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, promove uma inflamação local que mimetiza em camundongos a síndrome do intestino irritável observado em humanos. Os animais submetidos a essa inflamação intestinal exibiram comportamentos do tipo ansiogênicos como, redução da exploração dos braços abertos do LCE, do lado claro da caixa claro/escuro e da região central do campo aberto. Os autores também verificaram aumento na expressão de Fos no CeA e no BLA (ZHANG et al., 2014).

Alguns grupos de pesquisa estudaram a participação de apenas uma das subáreas da amígdala nas respostas emocionais induzidas pela dor. A maioria deles focou no CeA, pois essa região recebe informações nociceptivas diretas dos nervos sensitivos através da região pontina chamada núcleo parabraquial (VEINANTE et al., 2013). Morland e colaboradores (2014), por exemplo, observaram que ratos Wistar machos exibiram hipersensibilidade mecânica no teste de von Frey e diminuíram a exploração do centro do campo aberto, 14 dias após a cirurgia de transecção do nervo espinal. Os animais que apresentaram respostas de alodinia e ansiogênicas também tiveram aumento da expressão da proteína Fos no CeA, quando comparados ao grupo sham. No mesmo sentido, ratos submetidos ao teste de distensão colorretal, um modelo de dor visceral, apresentaram aumento da expressão de Fos no CeA (FELICE et al., 2014). Pedersen e colaboradores (2007), embora não tenham usado modelos animais de ansiedade, demonstraram que o CeA tem papel importante na dor e seus componentes afetivos. Os autores mostraram que a injeção intra CeA de muscimol em ratos reverteu a hiperalgesia mecânica e inibiu o desenvolvimento da aversão condicionada por lugar induzida pela dor (Pedersen et al., 2007).

Outro estudo focou apenas no BLA. Evidências sugerem que o BLA tem papel primordial nos aspectos afetivo/emocionais, cognitivos e também no controle da motivação e comportamentos direcionados por objetivos induzidos pela dor. A influência do BLA nesses comportamentos ocorre devido às densas conexões com o córtex pré-frontal, córtex cingulado e córtex insular, além de projeções para o núcleo acumbens e o próprio CeA (VEINANTE et al., 2013). Ratos submetidos ao modelo de monoartrite - injeção intrarticular de adjuvante completo de Freund em uma das articulações – apresentaram redução no limiar de vocalização durante o teste de pressão mecânica, ou seja, os animais vocalizaram com pressões articulares abaixo do grupo sham. No mesmo sentido, os ratos com monoartrite diminuíram a latência de retirada das patas no teste de imersão em água a 46°C. O aumento dos comportamentos nociceptivos relacionou-se com o aumento da ansiedade e com o aumento da expressão de Fos no BLA (AISSOUNI et al., 2017).

Contudo, em alguns casos as subáreas da amígdala apresentam respostas distintas, dependendo dos modelos de dor utilizados. Tanimoto e colaboradores (2003)

investigaram a participação do CeA e do BLA nas respostas nociceptivas e afetivas de ratos em dois casos díspares de dor. A injeção intraplantar de formalina induz um tipo de dor chamada de somática, já a administração intraperitoneal de ácido acético promove uma dor chamada de visceral. Desse modo, o grupo utilizou esses dois modelos de dor para induzir a aversão condicionada por lugar (ACL). Nesse caso, a ACL foi utilizada para avaliar o componente emocional de cada tipo de dor. Os resultados mostraram que a lesão do CeA reverteu a ACL induzida por formalina e pelo ácido acético, já a lesão do BLA reverteu apenas a ACL induzida por formalina. Dados mostraram lesões nas subáreas da amígdala não afetaram o aumento de lambida nas patas induzido pela injeção de formalina, nem o número de contorções provocadas pela injeção de ácido acético (GAO et al., 2004; TANIMOTO et al., 2003).

Ainda, Kung e colaboradores (2003) conseguiram inibir o pareamento de um estímulo térmico doloroso (*laser*) com um toque sonoro através da lesão na amígdala, embora não tenham observado alteração na sensibilidade dolorosa induzida pelo *laser*. Dentro desse contexto, os autores sugerem que nesse caso o CeA e o BLA estão relacionadas apenas com o componente emocional da dor, e não com a percepção dela em si (GAO et al., 2004; KUNG et al., 2003; TANIMOTO et al., 2003). Complementando essa ideia de funções diferentes das sub-regiões da amígdala, foi observado em ratos que a injeção de formalina intraplantar aumenta a expressão do gene *c-fos* no BLA, mas não no CeA. Em contrapartida, a injeção intraperitoneal de ácido acético aumentou a expressão de *c-fos* no CeA, mas muito pouco no BLA (NAKAGAWA et al., 2003).

Em outro trabalho, os pesquisadores mostraram que a ligação crônica do nervo espinal induziu alodinia mecânica no teste de von Frey e ansiedade nos testes LCE e campo aberto. A microinjeção de diazepam no CeA diminui a ansiedade, mas não alterou a hipersensibilidade à dor. O grupo também observou que a dor neuropática promoveu aumento da excitabilidade do CeA. O aumento da excitabilidade do CeA está relacionada com a redução da atividade GABAérgica que controlam a excitabilidade dos neurônios piramidais glutamatérgicos do CeA. Desse modo, esse trabalho mostrou que a ansiedade dos animais submetidos à dor crônica está relacionada com a diminuição da atividade GABAérgica e não com o aumento da atividade glutamatérgica (JIANG et al., 2014).

Nossos dados mostraram que camundongos observadores que conviveram com parceiros CNC apresentaram diminuição na expressão de Fos no CeA. As pesquisas sobre a empatia induzida pela dor ainda são escassas, então precisamos avançar muito para poder entender melhor como as áreas encefálicas participam desse comportamento. Li e colaboradores (2014), por exemplo, verificaram que ratos que interagiram com parceiros com dor (injeção de veneno de abelha na pata) apresentaram hipersensibilidade mecânica no teste de von Frey. Os observadores também exibiram aumento de comportamentos relacionados à dor após receberem injeção intraplantar de veneno de abelha. Por fim, o grupo demonstrou que a lesão bilateral da amígdala não alterou os comportamentos relacionados à dor após a injeção de veneno de abelha. Assim, os autores concluem que a amígdala não está envolvida na empatia induzida pela dor (LI et al., 2014).

As evidências da literatura apresentadas anteriormente indicam que a amígdala, independente da subárea avaliada, pode estar associada ao estabelecimento do valor emocional dado a estímulos e situações aversivas. Embora não seja consenso, os estudos envolvendo a amígdala tendem a mostrar que o aumento da dor e/ou aumento de comportamentos ansiogênicos estão relacionados com a elevação da atividade neuronal, provavelmente GABAérgica, nessa região encefálica. Além disso, pesquisas demonstraram que a inibição funcional da amígdala bloqueia a exibição de comportamentos relacionados à ansiedade e respostas relacionadas à hiperalgesia.

A dor é uma experiência altamente desagradável e sua cronicidade também pode ser entendida como uma fonte de estresse (ULRICH-LAI et al., 2006; VACHON-PRESSEAU et al., 2013). Tanto a dor quanto o estresse são capazes de produzir alterações neuronais que poderiam estar envolvidas com a exibição de comportamentos disfuncionais. Já está bem descrito que a dor neuropática e estímulos estressores em roedores induzem atrofia do hipocampo e hipertrofia da amígdala. A lesão ou constrição do nervo ciático, bem como o estresse crônico de contenção promovem diminuição da arborização neuronal, dos ramos dendríticos e perda de conexões sináptica em células glutamatérgicas piramidais do hipocampo. Por outro lado, o estresse repetido ou a dor neuropática provocam aumento da proliferação celular e aumento da arborização dendrítica em neurônios do CeA e BLA. As consequências comportamentais são alodinia,

hipernocicepção, aumento da ansiedade e aumento da depressão (GONÇALVES et al., 2008; FUCHS et al., 2006; TYRTYSHNAIA et al., 2020; TYRTYSHNAIA; MANZHULO, 2023; VYAS et al., 2002; 2004).

Nesse contexto, pesquisadores procuraram entender como o enriquecimento ambiental promoveria a melhora dos efeitos em longo prazo, da dor ou do estresse. Animais submetidos ao estresse crônico de separação materna, ao estresse de contenção ou à indução farmacológica de transtornos do humor apresentaram aumento de comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão, bem como alterações morfológicas da amígdala e hipocampo. Não foi surpresa descobrir que o enriquecimento ambiental além de reverter os efeitos comportamentais, promoveu neurogênese no hipocampo e restabeleceu as características morfológicas normais da amígdala (ASHOKAN et al., 2016; KOE et al., 2016; MAHATI et al., 2016; VEENA et al., 2009).

Considerando as evidências da literatura, podemos considerar que nossos resultados corroboram em parte os achados científicos. Animais demonstradores submetidos à constrição do nervo ciático apresentaram hiperalgesia térmica e, junto com seus parceiros observadores, exibiram aumento de comportamentos relacionados à ansiedade. Paralelamente às alterações comportamentais, encontramos queda na ativação do hipocampo dorsal, mas não da amígdala. Nesse recorte, podemos sugerir que a dor neuropática crônica e o contágio emocional compartilhado entre os coespecíficos promoveram efeitos comportamentais como consequência da hipoativação do hipocampo, possivelmente devido à atrofia dessa área encefálica. Além disso, verificamos que ao serem alojados em ambientes enriquecidos os camundongos CNC demonstradores e observadores tiveram essas modificações dos comportamentos e da atividade hipocampal prevenidas, ou seja, provavelmente o enriquecimento ambiental impediu a atrofia do hipocampo.

Em contrapartida, presumindo que a exibição desses comportamentos disfuncionais estaria associada com a hipertrofia da amígdala, podemos sugerir que nossos resultados vão de encontro aos indícios científicos levando em conta que não encontramos conexão entre as alterações comportamentais e o padrão de ativação da amígdala. Nesse sentido, Zhuo (2016) propôs que a ansiedade, por se apresentar de

diferentes formas, também poderia ser resultado de diferentes tipos de neuroadaptações, em diferentes áreas encefálicas e com a participação de diferentes alvos moleculares.

Conclusão

A constrição do nervo ciático é um modelo válido para investigação de comportamentos relacionados à ansiedade induzida pela empatia. Não apenas identificar que animais constritos apresentam alterações emocionais referentes ao aumento da ansiedade, mas também, porque nos possibilitou detectar que a ansiedade do demonstrador provocada pela dor pode reverberar em seu parceiro de caixa-moradia.

Isso foi possível verificar a partir do aumento de comportamentos relacionados à ansiedade nos camundongos observadores quando avaliados no LCE. Além disso, os camundongos submetidos à condição CNC apresentam alterações na percepção dolorosa caracterizada pelo aumento da sensibilidade ao estímulo térmico. Ainda, a condição CNC foi capaz de diminuir a ativação do hipocampo dorsal, mas não da amígdala, tanto do demonstrador quanto do observador.

Apesar dessas alterações representarem uma resposta prejudicial ao sujeito, foi possível, por meio da exposição ao EA, prevenir que comportamentos do tipo ansioso se desenvolvessem em nossos animais, além de melhorar a ativação celular do hipocampo dorsal.

Esse conjunto de evidências nos permite sugerir que manipulações não-farmacológicas, como a adoção de um protocolo de enriquecimento ambiental para o manejo de alterações comportamentais, pode se configurar em uma intervenção eficaz para amenizar consequências decorrentes de contextos potencialmente ameaçadores (presença de estímulos dolorosos e ansiedade).

Referências

AGNEW, Z. K.; BHAKOO, K. K.; PURI, B. K. The human mirror system: a motor resonance theory of mind-reading. **Brain Res. Rev.**, v. 54, n. 2, p. 286-293, 2007.

AISSOUNI, Y. et al. Acid-Sensing Ion Channel 1a in the amygdala is involved in pain and anxiety-related behaviours associated with arthritis. **Sci, Rep.**, v.7:43617, 2017.

ALY, M.; RANGANATH, C. New perspectives on the hippocampus and memory. **Neurosc. Lett.**, v. 680, p. 1-3, 2018. doi: 10.1016/j.neulet.2018.05.047.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). DSM-5: Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. Artmed Editora, 2014.

ANAND, K. S.; DHIKAV, V. Hippocampus in health and disease: An overview. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 15, n. 4, p. 239-246, out. 2012. DOI: 10.4103/0972-2327.104323. PMID: 23349586; PMCID: PMC3548359.

ARNAIZ, S. et al. Extensive enriched environments protect old rats from aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. **Behav. Brain Res.**, v. 169, n. 2, p. 294-302, 2006.

ARNAIZ, S. L. et al. Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition. **Mol. Aspects of Med.**, v. 25, n. 1-2, p. 91-101, 2004.

ARNSTEIN, D. et al. μ -suppression during action observation and execution correlates with BOLD in dorsal premotor, inferior parietal, and SI cortices. **J. Neurosci.**, v. 31, n. 40, p. 14243-14249, 2011.

ASHOKAN, A.; HEGDE, A.; MITRA, R. Short-term environmental enrichment is sufficient to counter stress-induced anxiety and associated structural and molecular

plasticity in basolateral amygdala. **Psychoneuroendocrinology**, v. 69, p. 189–196, 2016.
DOI: 10.1016/j.psyneuen.2016.04.00.

ATSAK, P. et al. Experience modulates vicarious freezing in rats: a model for empathy. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21855, 2011.

ATTAL, N. et al. Neuropathic pain: are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion?. **Pain**, v. 138, n. 2, p. 343-353, 2008.

BABAEV, O.; PILETTI C. C.; KRUEGER-BURG, D. Inhibition in the amygdala anxiety circuitry. **Exp. Mol. Med.**, v. 50, n. 4, p. 1-16, 2018.

BANNON, A. W.; MALMBERG, A. B. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. **Curr. Protoc. in Neurosci.** DOI: 10.1002/0471142301.ns0809s41, 2007.

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

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

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

BARONCELLI, L., et al. Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. **Cell Death Differ.** 17.7: 1092-1103, 2010.

BASANTSOVA, N. Y. et al. Small-fiber neuropathy definition, diagnosis, and treatment. **Neurol. Sci.**, v. 40, n. 7, p. 1343-1350, 2019.

BENAROYA-MILSHTEIN, N. et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. **Eur. J. Neurosci.**, v. 20, p. 1341-1347, 2004.

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

BENBOUZID, M. et al. Sciatic nerve cuffing in mice: A model of sustained neuropathic pain. **Eur. J. Pain**, v. 12, n. 5, p. 591–599, 2008.

BENNETT, E. L. et al. Chemical and anatomical plasticity brain. **Science**, v. 146, p. 610–619, 1964.

BENUZZI, F. et al. Pain mirrors: neural correlates of observing self or others' facial expressions of pain. **Front. Psychol.**, v. 9, p. 1825, 2018. DOI: 10.3389/fpsyg.2018.01825.

BIR, S. C. et al. Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530-1589) and the hippocampus of the human brain: history behind the discovery. **J. Neurosurg.**, v. 122, n. 4, p. 971-975, 2015. DOI: 10.3171/2014.11.JNS132402.

BLANCO, M. B.; DE SOUZA, R. R.; CANTO-DE-SOUZA, A. Effects of environmental enrichment in a mouse model of posttraumatic stress disorder. **Psychol. Neurosci.**, v. 10, n. 2, p. 225, 2017.

BONDI, C. O. et al. Environmental enrichment as a viable neurorehabilitation strategy for experimental traumatic brain injury. **J. Neurotrauma**, v. 31, n. 10, p. 873-888, 2014. DOI: 10.1089/neu.2014.3328.

BOYKO, M. et al. Establishment of an animal model of depression contagion. **Behav. Brain Res.**, v. 281, p. 358-363, 2015.

BRAGA, M. F. M. et al. GABAergic circuits of the basolateral amygdala and generation of anxiety after traumatic brain injury. **J. Amin. Acids**, v. 54, n. 9, p. 1229-1249, 2022. DOI: 10.1007/s00726-022-03184-y.

BRANDÃO, M. L. **As bases biológicas do comportamento: Introdução à neurociência.** São Paulo: E.P.U., 2004. 244 p.

BRÅTEN, S. **On being moved: From mirror neurons to empathy.** Amsterdam/Philadelphia: John Benjamins Publishing, 2007. 349 p.

BRENES, J. et al. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. **Beh. Brain Res.**, v. 197, p. 125-137, 2009.

BRENES, J. et al. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 89, p. 85-93, 2008.

BRUEL-JUNGERMAN, E. et al. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. **European J. Neurosci.**, v. 21, p. 513-521, 2005.

BUTMAN, J.; ALLEGRI, R. F. A cognição social e o córtex cerebral. **Psicol-Reflex Crit**, v. 14, p. 275-279, 2001.

CAGGIANO, V. et al. Mirror neurons differentially encode the peripersonal and extrapersonal space of monkeys. **Science**, v. 324, n. 5925, p. 403-406, 2009.

CAI, Y. Q. et al. Brain Circuits Mediating Opposing Effects on Emotion and Pain. **J. Neurosci.**, v. 38, n. 28, p. 6340-6349, 2018. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2780-17.2018.

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

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

CARNEIRO DE OLIVEIRA, P. E. et al. Mice cohabiting with familiar conspecific in chronic stress condition exhibit methamphetamine-induced cross-sensitization and augmented consolation behavior. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 16, p. 835717, 2022.

CARNEVALI, L. et al. The contagion of social defeat stress: Insights from rodent studies. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 111, p. 12-18, 2020.

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

CASPANI, O. et al. Tramadol reduces anxiety-related and depression-associated behaviors presumably induced by pain in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **Pharmacol. Biochem. and Behav.**, v. 124, p. 290-296, 2014.

CASTRO, C. P. N. et al. **Aspectos comportamentais e morfofuncionais do estriado e hipocampo no modelo animal YAC128 da doença de Huntington: investigação do efeito neuroprotetor do probucol.** 2018. 174 p. Tese (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

CAVALHEIRO, E. A. et al. The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia**, v. 37, n. 10, p. 1015–1019, 1996.

CAVALLI, E. et al. Neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. **Int. J. of Immunopathol. Pharmacol.**, v. 33, p. 1-10, 2019. DOI: 10.1177/2058738419838383.

CHEN, P. J.; HUANG, C. D.; YEH, S. J. Impact of a narrative medicine programme on healthcare providers' empathy scores over time. **BMC Med. Educ.**, v. 17, p. 1-8, 2017.

CHENG, J. P. et al. A relatively brief exposure to environmental enrichment after experimental traumatic brain injury confers long-term cognitive benefits. **J. Neurotrauma**, v. 29, p. 2684–2688, 2012.

CHOI, J.; JEONG, Y. Elevated emotional contagion in a mouse model of Alzheimer's disease is associated with increased synchronization in the insula and amygdala. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

ÇIVI, S. et al. Effects of quercetin on chronic constriction nerve injury in an experimental rat model. **Acta Neurochir.**, v. 158, p. 959-965, 2016.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v. 3, p. 17002, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.2.

COOK, R. et al. Mirror neurons: from origin to function. **Behav. Brain Sci.**, v. 37, n. 2, p. 177-192, 2014. DOI: 10.1017/S0140525X13000903.

CORDNER, Z. A. et al. Fluoxetine and environmental enrichment similarly reverse chronic social stress-related depression- and anxiety-like behavior, but have differential effects on amygdala gene expression. **Neurobiol. Stress**, v. 15, p. 100392, 2021.

COSTA-REQUENA, G. et al. Caregivers morbidity in palliative care unit: predicting by gender, age, burden and self-esteem. **Supportive Care in Cancer**, v. 20, p. 1465-1470, 2012. DOI: 10.1007/s00520-011-1233-6.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 32, n. 1, p. 1-32, 2009. DOI: 10.1146/annurev.neuro.051508.

COX, S. S.; REICHEL, C. M. Rats display empathic behavior independent of the opportunity for social interaction. **Neuropsychopharmacol.**, v. 45, n. 7, p. 1097-1104, 2020.

DARWIN, C (1965). **A expressão das emoções no homem e nos animais**. Tradução: Leon de Souza Lobo Garcia. São Paulo: Companhia das Letras, 2009. 174 p.

DAVIS, M. The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 15, n. 1, p. 353–375, 1992. DOI: 10.1146/annurev.ne.15.030192.002033.

DE TOMMASO, M. et al. Empathy for pain in fibromyalgia patients: An EEG study. **Int. J. Psychophysiol.**, v. 146, p. 43-53, 2019.

DE WAAL, F. B. M. Putting the altruism back into altruism: the evolution of empathy. **Annu. Rev. Psychol.**, 59, 279–300, 2008.

DE WAAL, F. B. M. What is an animal emotion?. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1224, n. 1, p. 191-206, 2011.

DE WAAL, F. B. M.; PRESTON, S. D. Mammalian empathy: behavioural manifestations and neural basis. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 18, n. 8, p. 498-509, 2017.

DI PELLEGRINO, G. et al. Understanding motor events: a neurophysiological study. **Exp. Brain Res.**, v. 91, n. 1, p. 176-180, 1992.

DIAMOND, M. C. Response of the brain to enrichment. **An. Acad. Bras. de Cienc.**, v. 73, n. 2, p. 211-220, 2001.

DUMAN, C. et al. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain Res.**, v. 1199, p. 148-158, 2008.

ENGIN, E.; TREIT, D. The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. **Behav Pharmacol.** Sep;18(5-6):365-74, 2007. doi: 10.1097/FBP.0b013e3282de7929.

ETKIN, A. et al. Disrupted amygdalar subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder. **Arch. Gen. Psychiatry**, v. 66, p. 1361-1372, 2009. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.104

FADIGA, L.; CRAIGHERO, L.; OLIVIER, E. Human motor cortex excitability during the perception of others' action. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 15, n. 2, p. 213-218, 2005.

FELICE, V. D. et al. Differential activation of the prefrontal cortex and amygdala following psychological stress and colorectal distension in the maternally separated rat. **Neuroscience**, v. 267, p. 252–262, 2014.

FERNANDÉZ-TERUEL, A. et al. Early-life handling stimulation and environmental enrichment. Are some of their effects mediated by similar neural mechanisms? **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 73, p. 233-245, 2002.

FERRARI, P. F. et al. Mirror neurons responding to the observation of ingestive and communicative mouth actions in the monkey ventral premotor cortex. **Eur. J. Neurosci.**, v. 17, n. 8, p. 1703-1714, 2003.

FERREIRA, V. R. T.; CECCONELLO, W. W.; MACHADO, M. R. Neurônios-espelho como possível base neurológica das habilidades sociais. **Psicol-Reflex Crit.**, v. 23, n. 1, p. 147-159, 2017.

FERREIRA-CHAMORRO, P. et al. Sulforaphane inhibited the nociceptive responses, anxiety-and depressive-like behaviors associated with neuropathic pain and improved the anti-allodynic effects of morphine in mice. **Front. pharmacol.**, v. 9, p. 1332, 2018.

FERRI, S. et al. A human homologue of monkey F5c. **Neuroimage**, v. 111, p. 251-266, 2015.

FONTES-DUTRA, M. et al. Abnormal empathy-like pro-social behaviour in the valproic acid model of autism spectrum disorder. **Behav. Brain Res.**, v. 364, p. 11-18, 2019.

FRANKEL, R. M. The Many Faces of Empathy: Biological, Psychological, and Interactional Perspectives, **J. Patient Exp.**, v. 4, n. 2, p. 55-56, 2017.

FUCHS, E.; FLUGGE, G.; CZECH, B. Remodeling of neuronal networks by stress. **Front. Biosci.**, v. 11, p. 2746-2758, 2006.

GALLESE, V. Being like me: Self-other identity, mirror neurons and empathy. Perspectives on imitation: From cognitive neuroscience to social science, v. 1, p. 101-118, 2005.

GALLESE, V. Being Like Me": Self-Other Identity, Mirror Neurons, and Empathy. *In*: HURLEY, S.; CHATER, N. (org.). **Perspectives on imitation: From neuroscience to social science: Vol. 1. Mechanisms of imitation and imitation in animals.** Cambridge: MIT Press, 2005. cap.3, p. 101-118.

GALLESE, V. et al. Action recognition in the premotor cortex. **Brain**, v. 119, n. 2, p. 593-609, 1996.

GALLESE, V. Mirror neurons, embodied simulation, and the neural basis of social identification. **Psychoanal. Dialogues**, v. 19, n. 5, p. 519-536, 2009.

GALLESE, V.; KEYSERS, C.; RIZZOLATTI, G. A unifying view of the basis of social cognition. **Trends Cogn. Sci.**, v. 8, n. 9, p. 396-403, 2004.

GANCZAREK, J.; HÜNEFELDT, T.; BELARDINELLI, M. O. From “Einfühlung” to empathy: exploring the relationship between aesthetic and interpersonal experience. **Cogn. Process**, v. 19(2), p.141-145, 2018.

GAO, Y-J. Et al. Contributions of the anterior cingulate cortex and amygdala to pain- and fear-conditioned place avoidance in rats. **Pain**, v. 110, p. 343-353, 2004.

GERRITS, M. M. J. G. et al. Impact of pain on the course of depressive and anxiety disorders. **Pain**, v. 153, n. 2, p. 429-436, 2012.

GIUMMARRA, M. J. et al. Affective, sensory and empathic sharing of another’s pain: the empathy for pain scale. **Eur. J. Pain**, v. 19, n. 6, p. 807-816, 2015.

GONÇALVES, L. et al. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. **Exp. Neurol.**, v. 213, p. 48-56, 2008.

GONG, X. et al. Environmental Enrichment Reduces Adolescent Anxiety- and Depression-like Behaviors of Rats Subjected to Infant Nerve Injury. **J. Neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 262, 2018.

GONZALEZ, C. P.; ROMAN-CALDERÓN, J. P.; LIMONERO, J. T. The relationship between positive aspects of caring, anxiety and depression in the caregivers of cancer patients: the mediational role of burden. **Eur. J. of Cancer Care**, e13346, 2020. DOI: 10.1111/ecc.13346.

GONZALEZ, L. E., OUAGAZZAL, A-M., FILE, S. E. Stimulation of benzodiazepine receptors in the dorsal hippocampus and medial raphe reveals differential GABAergic control in two animal tests of anxiety. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, p. 3673-3680, 1998.

GONZALEZ-LIENCRES, C. et al. Emotional contagion in mice: the role of familiarity. **Behav. Brain Res.**, v. 263, p. 16-21, 2014.

HAANPÄÄ, M. L. et al. Assessment of neuropathic pain in primary care. **Am. J. Med.**, v. 122, n. 10, p. S13-S21, 2009.

HAN, Y. et al. Similar levels of emotional contagion in male and female rats. **Sci. Rep.**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

HARATI, H. et al. Attention and memory in aged rats: Impact of lifelong environmental enrichment. **Neurobiol. Aging.** 32(4), p. 718-36, 2011.

HARRIS, A; D'EATH, R; HEALY, S. Environmental enrichment enhances spatial cognition in rats by reducing thigmotaxis (wall hugging) during testing. **Anim. Behav.** v. 77, p. 1459–1464, 2009.

HATFIELD, E.; CACIOPPO, J.T.; RAPSON, R. L. Emotional contagion. Current directions. **Psychol. Sci.**, v. 2, p. 96–99, 1993.

HERNANDES, P. M. **O papel dos receptores 5-HT1A do hipocampo dorsal e ventral na mediação de respostas defensivas associadas à ansiedade.** 2020. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020. doi:10.11606/D.17.2020.tde-19082020-222724. Acesso em: 2023-03-11.

HERNANDEZ-LALLEMENT, J. et al. Harm to others acts as a negative reinforcer in rats. **Curr. Biol.**, v. 30, n. 6, p. 949-961, 2020.

HILLIS, A. E. Inability to empathize: brain lesions that disrupt sharing and understanding another's emotions. **Brain**, v. 137, p. 981-997, 2014.

HOLDRIDGE, S. V.; CAHILL, C. M. Spinal administration of a δ opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Eur. J. Pain**, v. 11, n. 6, p. 685–693, 2007.

HURLEMANN, R. et al. Oxytocin enhances amygdala-dependent, socially reinforced learning and emotional empathy in humans. **J. Neurosci.**, v. 30, n. 14, p. 4999–5007, 2010.

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

JEON, D. et al. Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca²⁺ channels in ACC. **Nat. Neurosci.**, v. 13, p. 482-488, 2010.

JIANG, H. et al. Sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala via the decreased GABAergic inhibition contributes to the development of neuropathic pain-related anxiety-like behaviors in rats. **Mol. Brain**, v. 7:72, 2014.

JI, N-N.; XIA, M. Enriched environment alleviates adolescent visceral pain, anxiety and depression-like behaviors induced by neonatal maternal separation. **Transl. Pediatr.**, v. 11, p. 1398-1407, 2022.

KANDIS, S. et al. Acetaminophen (paracetamol) affects empathy-like behavior in rats: Dose-response relationship. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 175, p. 146-151, 2018.

KARAKILIC, A. et al. The effects of acute foot shock stress on empathy levels in rats. **Behav. Brain Res.**, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.04.043>.

KHAKPAI, F.; NASEHI, M.; ZARRINDAST, M-R. The role of NMDA receptors of the medial septum and dorsal hippocampus on memory acquisition. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 143, p. 18-25, 2016.

KHEIRBEK, M. A. et al. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. **Neuron**, v. 77, n. 5, p. 955-968, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.038>.

KILNER, J. M. et al. Evidence of mirror neurons in human inferior frontal gyrus. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 32, p. 10153-10159, 2009.

KILNER, J. M.; LEMON, R. N. What we know currently about mirror neurons. **Curr. Biol.**, v. 23, n. 23, p. R1057-R1062, 2013.

KIMURA, L. F. et al. Distinct environmental enrichment protocols reduce anxiety but differentially modulate pain sensitivity in rats. **Behav. Brain Res.**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.11.012>.

KIMURA, L. F. et al. Early exposure to environmental enrichment protects male rats against neuropathic pain development after nerve injury. **Exp. Neurol.**, v. 332, p. 113390, 2020.

KOE, A. S.; ASHOKAN, A.; MITRA, R. Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. **Transl. Psychiatry**, v. 6, e729, 2016.

KREMER, M. et al. How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain?. **Eur. J. Neurosci.**, 2020. doi:10.1111/ejn.14686

KUNG, J-C. et al. Contribution of the anterior cingulate cortex to laser-pain conditioning in rats. **Brain Res.**, v. 970, p. 58-72, 2003.

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

LANGFORD, D. J. et al. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. **Science**, v. 312, p. 1967-1970, 2006.

LANGFORD, D. J. et al. Varying perceived social threat modulates pain behavior in male mice. **J. Pain**, v. 12, n. 1, p. 125-132, 2011.

LAVICH, T. R. et al. A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. **Braz. J. of Med. and Biol.**, v. 38, p. 445-451, 2005.

LAVIOLA, G. et al. Low empathy-like behaviour in male mice associates with impaired sociability, emotional memory, physiological stress reactivity and variations in neurobiological regulations. **PloS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0188907, 2017.

LeDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 23, p. 155-184, 2000.

LEGGIO, M. G. et al. Environmental enrichment promotes spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 163, p. 78-90, 2005.

LEIGH, R. et al. Acute lesions that impair affective empathy. **Brain**, v. 136, n. 8, p. 2539-2549, 2013.

LEONARD, M. T.; CANO, A. Pain affects spouses too: personal experience with pain and catastrophizing as correlates of spouse distress. **Pain**, v. 126, p. 139-146, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.06.022>.

LI, Z. et al. Social interaction with a cagemate in pain facilitates subsequent spinal nociception via activation of the medial prefrontal cortex in rats. **Pain**, v. 155, n. 7, p. 1253-1261, 2014.

LIU, J. et al. Glutamatergic neurons in the amygdala are involved in paclitaxel-induced pain and anxiety. **Front. Psychiatry**, 13, 869544, 2022.

LU, Y. F. et al. Social interaction with a cagemate in pain increases allogrooming and induces pain hypersensitivity in the observer rats. **Neurosci. Lett.**, v. 662, p. 385-388, 2018.

MACHADO, A. B. M.; HAERTEL, L. M. **Neuroanatomia funcional**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 360 p.

MAHATI, K. et al. Enriched environment ameliorates depression-induced cognitive deficits and restores abnormal hippocampal synaptic plasticity. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 134, p. 379-391, 2016.

MARSH, A. A. et al. Empathic responsiveness in amygdala and anterior cingulate cortex in youths with psychopathic traits. **J. Child Psychol. Psychiatry**, v. 54, p. 900-910, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcpp.12063>.

MARTIN, L. J. et al. Reducing social stress elicits emotional contagion of pain in mouse and human strangers. **Curr. Biol.**, v. 25, n. 3, p. 326-332, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.028>.

MARTIN, L. J.; TUTTLE, A. H.; MOGIL, J. S. The interaction between pain and social behavior in humans and rodents. *In*: TAYLOR, B. K.; FINN, D. P. (org.). **Behavioral neurobiology of chronic pain**. Springer-Verlag Publishing/Springer Nature. p. 233-250, 2014.

MARTÍNEZ-LAVÍN, M. Autonomic Nervous System Dysfunction in Fibromyalgia. *In*: ABLIN, J.N; SHOENFELD, Y. (org). **Fibromyalgia Syndrome**. Springer Nature. p. 193-203, 2021.

MARTÍNEZ-LAVÍN, M. Fibromyalgia in women: somatisation or stress-evoked, sex-dimorphic neuropathic pain?. **Clin. Exp. Rheumatol.**, v. 39, n. 2, p. 422-425, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32940205>.

MATTER, A. M. et al. Temporal effects of environmental enrichment-mediated functional improvement after experimental traumatic brain injury in rats. **Neurorehabil. Neural Repair**, v. 25, p. 558–564, 2011.

MAZZITELLI, M. et al. Optogenetic manipulations of CeA-CRF neurons modulate pain- and anxiety-like behaviors in neuropathic pain and control rats. **Neuropharmacology**, v. 210, p. 109031, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35304173>.

MENARD J, TREIT D. The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. **Brain Res.**, v. 888, p. 163-166, 2001.

MENDES, L.A.F.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Role of cholinergic, opioidergic and GABAergic neurotransmission of the dorsal hippocampus in the modulation of nociception in guinea pigs. **Life Sci.**, v. 83, p. 644–650, 2008.

MEYZA, K. Z. et al. The roots of empathy: Through the lens of rodent models. **Neurosc. Biobehav. Rev.**, v. 76, p. 216-234, 2017.

MIAO, Z. et al. Anxiety-related behaviours associated with microRNA-206-3p and BDNF expression in pregnant female mice following psychological social stress. **Mol. Neurobiol.**, 55, 1097-1111, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0378-1>

MIKOSZ, M. et al. Sex differences in social modulation of learning in rats. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 18114, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep18114>.

MOGIL, J. S. Social modulation of and by pain in humans and rodents. **Pain**, v. 156, p. 35-41, 2015.

MOHAMMADI, F. et al. Affective dimensions of pain and region-specific involvement of nitric oxide in the development of empathic hyperalgesia. **Sci. Rep.**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.

MOHAMMADI, F. et al. Nitric oxide modulates cognitive, nociceptive and motor functions in a rat model of empathy. **Int. J. Neurosci.**, v. 130, n. 1, p. 1-10, 2018.

MOLENBERGHS, P. et al. Brain regions with mirror properties: a meta-analysis of 125 human fMRI studies. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 36, n. 1, p. 341-349, 2012.

MOREIRA, E. S. O sistema límbico: seu estudo morfo-funcional, histórico. A formação hipocampal, o complexo amigdalino e seu envolvimento com a formação reticular. As memórias, o aprendizado e as emoções. A biologia molecular, base estrutural da vida. In: MOREIRA, E.S. **Coleção Monografias Neuroanatômicas Morfo-Funcionais**. Volta Redonda: UniFOA, 2017. cap 5, p. 37-114.

MORENO-MARTÍNEZ, S. et al. Chronic restraint stress induces anxiety-like behavior and remodeling of dendritic spines in the central nucleus of the amygdala. **Behav. Brain Res.**, v. 416, p. 113523, 2022.

MORLAND, R. H. et al. Enhanced c-Fos expression in the central amygdala correlates with increased thigmotaxis in rats with peripheral nerve injury. **Eur. J. Pain**, v. 20, n. 7, p. 1140-1154, 2016.

MOYA-ALBIOL, L. et al. The neural bases of empathy. **Rev. Neurol.**, v. 50, n. 2, p. 89-100, 2010.

MUKAMEL, R. et al. Single-neuron responses in humans during execution and observation of actions. **Curr. Biol.**, v. 20, n. 8, p. 750-756, 2010.

MURASAWA, H. et al. Anxiolytic effects of the novel $\alpha 2 \delta$ ligand mirogabalin in a rat model of chronic constriction injury, an experimental model of neuropathic pain. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 1, p. 189-197, 2019.

NAKAGAWA, T. et al. Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 344, p. 197-200, 2003.

NAZERI, M. et al. Role of Opioid System in neurobiological regulations. **PloS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0188907, 2019.

NITANDA, A. et al. Contribution of the peripheral 5-HT_{2A} receptor to mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. **Neurochem. Int.**, v. 47, n. 6, p. 394-400, 2005.

NOVAES, L. S. et al. Environmental Enrichment Protects against Stress-Induced Anxiety: Role of Glucocorticoid Receptor, ERK, and CREB Signaling in the Basolateral Amygdala. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 457-466, 2017.

OHLINE, S. M.; ABRAHAM, W. C. Environmental enrichment effects on synaptic and cellular physiology of hippocampal neurons. **Neuropharmacology**, v. 145, p. 3-12, 2019.
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Atlas de saúde mental**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240036703/>.

PABBA, M. Evolutionary development of the amygdaloid complex. **Front. Neuroanat.**, v. 7, p. 27, 2013.

PAREKH, R.; GIVON, L. What is psychotherapy. **London Spring**, 2019. Disponível em: <https://www.londonpring.org/what-is-therapy-for-mental-health/>.

PARENT-VACHON, M.; VACHON, P. Environmental enrichment alleviates chronic pain in rats following a spared nerve injury to induce neuropathic pain. A preliminary study. **Vet Med (Auckl)**, v. 9, p. 69-72, 2018.

PATKI, G.; SOLANKI, N.; SALIM, S. Witnessing traumatic events causes severe behavioral impairments in rats. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 17, p. 2017-2029, 2014. <https://doi.org/10.1017/S1461145714000923>

PATKI, G. et al. Witnessing traumatic events and post-traumatic stress disorder: insights from an animal model. **Neurosci. Lett.**, v. 600, p. 28-32, 2015.

PEDERSEN, L. H.; SCHEEL-KRUGER, J.; BLACKBURN-MUNRO, G. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. **Pain**, v. 127, p. 17-26, 2007.

PINEDA, J. A.; HECHT, E. Mirroring and mu rhythm involvement in social cognition: are there dissociable subcomponents of theory of mind?. **Biol. Psychol.**, v. 80, n. 3, p. 306-314, 2009.

PRESTON, S. D. A perception-action model for empathy. *In*: FARROW, T; P. WOODRUFF, P. (org). **Empathy in mental illness**. Cambridge University Press, 2007. p. 428-447.

PRESTON, S. D.; DE WAAL, F. B.M. Empathy: Its ultimate and proximate bases. **Behav. Brain Sci.**, v. 25, n. 1, p. 1-20, 2002.

PULVERMÜLLER, F. et al. Motor cognition–motor semantics: Action perception theory of cognition and communication. **Neuropsychologia**, v. 55, p. 71-84, 2014.

QUIRK, G. J. et al. Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat. **Neuron**, v. 15, n. 5, p. 1029-1039, 1995.

REZAYAT M., et al. Cholecystinin and GABA interaction in the dorsal hippocampus of rats in the elevated plus-maze test of anxiety. **Physiol. Behav.**, v. 84, p. 775-782, 2005.

RIZZOLATTI, Giacomo et al. Premotor cortex and the recognition of motor actions. **Cogn. Brain Res.**, v. 3, n. 2, p. 131-141, 1996.

RIZZOLATTI, G. The mirror neuron system and its function in humans. **Anat. Embryol.**, v. 210, n. 5-6, p. 419-421, 2005.

ROESKA, K. et al. Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. **Pain**, v. 139, 349-357, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.05.003>

ROESKA, K. et al. Decreased spinal cord synaptic inputs to the rostral ventromedial medulla contribute to central sensitization in rats with cystitis. **J. Comp. Neurol.**, v. 520(10), 2241-2255, 2012.

ROLAND, P. E. et al. Supplementary motor area and other cortical areas in organization of voluntary movements in man. **J. Neurophysiol.**, v. 43, n. 1, p. 118-136, 1980.

SAH, P. et al. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 803-834, 2003.

SAMPEDRO-PIQUERO, P.; BEGEGA, A.; ARIAS, J. Increase of glucocorticoid receptor expression after environmental enrichment: relations to spatial memory, exploration and anxiety-related behaviors. **Physiol. Behav.**, v. 129, p. 118-129, 2014.

SANDERS, J. et al. Empathic fear responses in mice are triggered by recognition of a shared experience. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74609, 2013.

SATO, Nobuya et al. Rats demonstrate helping behavior toward a soaked conspecific. **Ani. Cogn.**, v. 18, p. 1039-1047, 2015.

SCHULZ, R.; SHERWOOD, P. R. Physical and mental health effects of family caregiving. **Am. J. Nurs.**, v. 108, p. 23-27, 2008.

SCHWARTZ, L. et al. Depression in spouses of chronic pain patients: the role of patient pain and anger, and marital satisfaction. **Pain**, v. 44, p. 61-67, 1991.

SENO, M.D.J. et al. The critical role of amygdala subnuclei in nociceptive and depressive-like behaviors in peripheral neuropathy. **Sci. Rep.**, v. 8:13608, 2018.

SHAMAY-TSOORY, S. G. et al. Two systems for empathy: a double dissociation between emotional and cognitive empathy in inferior frontal gyrus versus ventromedial prefrontal lesions. **Brain**, v. 132, n. 3, p. 617-627, 2009.

SIEBERG, C. B. et al. Neuropathic pain drives anxiety behavior in mice, results consistent with anxiety levels in diabetic neuropathy patients. **Pain Rep.**, v. 3, n. 3, 2018.

SILVA-CARDOSO, G. K. et al. Cannabidiol effectively reverses mechanical and thermal allodynia, hyperalgesia, and anxious behaviors in a neuropathic pain model: Possible role of CB1 and TRPV1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 197, p. 108712, 2021.

SILVEIRA, L. M. et al. Anterior cingulate cortex, but not amygdala, modulates the angiogenesis induced by living with conspecifics subjected to chronic restraint stress in male mice. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 16, p. 1077368, 2023.

SIMONS, L. E.; ELMAN, I.; BORSOOK, D. Psychological processing in chronic pain: a neural systems approach. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 39, p. 61-78, 2014.

SIVASELVACHANDRAN, S. et al. Behavioral and mechanistic insight into rodent empathy. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 91, p. 130-137, 2018.

SOFFIÉ, M. et al. Behavioural and glial changes in old rats following environmental enrichment. **Behav. Brain Res.**, v. 101, n. 1, p. 37-49, 1999.

STEIN, D. J.; BOUWER, C. A neuro-evolutionary approach to the anxiety disorders. **J Anxiety Disord.**, v. 11, n.4, p. 409-29, 1997.

STERN, D. Intersubjectivity. *In: PERSON E.S; COOPER, A.M.; GABBARD, G.O. (org.).* **The American psychiatric publishing textbook of psychoanalysis.** American Psychiatric Publishing, Inc. 2005. p. 77-92.

STUEBER, K. Empathy. *In: ZALTA, E. N.; NODELMAN, U. (org).* **The Stanford Encyclopedia of Philosophy.** The Metaphysics Research Lab, Department of Philosophy, Stanford University, Fall edition. 2019.

TAI, L. W. et al. Enriched environment and effects on neuropathic pain: experimental findings and mechanisms. **Pain Pract.**, v.18.8: 1068-1082, 2018.

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

TAVARES, L. R. R. et al. Cannabidiol Treatment Shows Therapeutic Efficacy in a Rodent Model of Social Transfer of Pain in Pair-Housed Male Mice. **Cannabis and Cannabinoid Res.**, 2023. doi: 10.1089/can.2022.0300.

TAVARES, L. R. R. et al. 5-HT₃ receptor within the amygdaloid complex modulates pain hypersensitivity induced by empathy model of cohabitation with a partner in chronic pain condition in mice. **Social Neurosci.**, v. 16, n. 5, p. 534-548, 2021.

TITCHENER, E. B. Introspection and empathy. *In: TITCHENER, E. B. Lectures on the experimental psychology of the thought-processes.* New York: The MacMillan Company, 1909. p. 1-6.

TOLEDO, RS et al. rTMS induces analgesia and modulates neuroinflammation and neuroplasticity in neuropathic pain model rats. **Brain Res.**, v. 1762, p. 147427, 2021.

TOMIYOSHI, M. Y. et al. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain Behav. Immun.**, v. 23, n. 4, p. 558-567, 2009.

TREEDER, R. D. et al. Neuropathic pain: Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, n. 18, p. 1630-1635, 2007.

TRUITT, William A. et al. Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala. **Neurosci.**, v. 160, n. 2, p. 284-294, 2009.

TYRTYSHNAIA, A. A. et al. Neuropathic pain causes a decrease in the dendritic tree complexity of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Cells Tissues Organs**, v. 208, p. 89-100, 2019.

TYRTYSHNAIA, A.; MANZHULO, I. Neuropathic pain causes memory deficits and dendrite tree morphology changes in mouse hippocampus. **J. Pain Res.**, v. 13, p. 345-354, 2020.

ULRICH-LAI, Y .M. et al. Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain. **Physiol. Behav.**, v. 88, p. 67-76, 2006.

VACHON, P. et al. Alleviation of chronic neuropathic pain by environmental enrichment in mice well after the establishment of chronic pain. **Behav. Brain Funct.**, v. 9, n. 1, p. 22, 2013.

VACHON, P.. Double Decker Enrichment cages have no effect on long term nociception in neuropathic rats but increase exploration while decreasing anxiety-like behaviors. **Scand J. Lab. Anim. Sci**, v. 40, p. 1-6, 2014.

VEENA, J. et al. Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. **Neurosci. Lett.**, v. 455, p. 178-182, 2009.

VEINANTE, P.; YALCIN, I.; BARROT, M. The amygdala between sensation and affect: a role in pain. **J. Mol. Psychiatry**, v. 1:9, 2013.

VIVINETTO A. L.; SUÁREZ, M. M.; RIVAROLA, M. A. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. **Behav. Brain Res.**, v. 240, p. 110-118, 2013.

VYAS, A. et al. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **J. Neurosci.**, v. 22, n. 15, p. 6810-6818, 2002.

VYAS, A.; PILLAI, A. G.; CHATTARJI, S. Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. **Neuroscience**, v. 128, n. 4, p. 667-673, 2004.

WANG, L.-L. et al. Role of calcitonin gene-related peptide in pain regulation in the parabrachial nucleus of naive rats and rats with neuropathic pain. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 414, p. 115428, 2021.

WANG, X.-M. et al. Environmental enrichment improves long-term memory impairment and aberrant synaptic plasticity by BDNF/TrkB signaling in nerve-injured mice. **Neurosci. Lett.**, v. 694, p. 93-98, 2019.

WANG, X-Q et al. Differential roles of hippocampal glutamatergic receptors in neuropathic anxiety-like behavior after partial sciatic nerve ligation in rats. **BMC Neurosci.**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2015.

WANG, Z. et al. Efficacy of large groove texture on rat sciatic nerve regeneration in vivo using polyacrylonitrile nerve conduits. **Ann. Biom.**, v. 49, p. 394-406, 2021.

WARREN, B. L. et al. Neurobiological sequelae of witnessing stressful events in adult mice. **Biol. Psychiatry**, v. 73, p. 7-14, 2013.

WICKER, B. et al. Both of us disgusted in My insula: the common neural basis of seeing and feeling disgust. **Neuron**, v. 40, n. 3, p. 655-664, 2003.

WEI, X. et al. Activation of the dorsal, but not the ventral, hippocampus relieves neuropathic pain in rodents. **Pain**, v. 162, p. 2865–2880, 2021.

WOODCOCK, A.; RICHARDSON, R. Effects of environmental enrichment on rate of contextual processing and discriminative ability in adult rats. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 73, p. 1-10, 2000.

YALCIN, I. et al. A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. **Biol. Psychiatry**, v. 70, n. 10, p. 946-953, 2011.

YANG, H. et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells attenuates neuropathic pain by inhibiting the TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway in spinal microglia. **J. Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 154, 2020.

YANG, H. et al. Altered behavior and neural activity in conspecific cagemates co-housed with mouse models of brain disorders. **Physiol. Behav.**, v. 163, p. 167-176, 2016.

ZANIBONI, C. 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. **Front. Behav. Neurosci.**, v. 12, p. 278, 2018.

ZHANG, M-M. et al. Effects of NB001 and gabapentin on irritable bowel syndrome-induced behavioral anxiety and spontaneous pain. **Mol. Brain**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2014a.

ZHANG, M. et al. The association between the expression of PAR2 and TMEM16A and neuropathic pain. **Mol. Med. Rep.**, v. 17, n. 3, p. 3744-3750, 2018.

ZHANG, W-N. et al. Temporary inhibition of dorsal or ventral hippocampus by muscimol: Distinct effects on measures of innate anxiety on the elevated plus maze, but similar disruption of contextual fear conditioning. **Behav. Brain Res.**, v. 262, p. 47-56, 2014b.

ZHENG, J. et al. Adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis contributes differentially to environmental enrichment combined with voluntary exercise in alleviating chronic inflammatory pain in mice. **J. Neurosci.**, v. 37, n. 15, p.4145-4157, 2017.

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