

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Papel das porções dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal de
camundongos na modulação das reações comportamentais defensivas e
antinociceção induzidas por situações aversivas**

Joyce Mendes Gomes

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da USP, como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área:
Psicobiologia

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOYCE MENDES GOMES

Papel das porções dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal de camundongos na modulação das reações comportamentais defensivas e antinocicepção induzidas por situações aversivas

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

RIBEIRÃO PRETO - SP

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendes-Gomes, Joyce

Papel das porções dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal de camundongos na modulação das reações comportamentais defensivas e antinocicepção induzidas por situações aversivas. Ribeirão Preto, 2010.

122 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração:

Psicobiologia.

Orientador: Nunes-de-Souza, Ricardo Luiz.

1. Camundongo. 2. Labirinto em cruz elevado. 3. Teste da formalina. 4. Matéria cinzenta periaquedutal. 5. Medo/ansiedade. 6. Antinocicepção. 7. Corticosterona.

“Sempre que me batiam o desânimo, a desesperança e o temor procurava me desvencilhar destes sentimentos, lembrando que lá no final estava um sonho muito maior que o meu. Estava o sonho de Deus”

Modificado de Ivna Sá

À Deus que, com sua fidelidade incondicional, me impulsionou a realizar este trabalho, que me auxiliou a reerguer-me após cada queda, e me fez ver que elas não representam fim, mas pausas antes de grandes recomeços.

À Ele, que me ensinou que os sonhos podem concretizar-se, ainda que exista um tempo para cada coisa . Assim, enquanto houver vida, o mais importante é corajosamente semear e recomeçar sempre.

E, por fim, que me capacitou a fazer de cada obstáculo uma oportunidade de crescimento humano e aperfeiçoamento profissional. Com efeito, faço minhas as palavras do apóstolo Paulo:

”Sei em quem pus minha confiança” (II Tímóteo 1, 12).

AGRADECIMENTOS

“Eu sou eu e o que me cerca” (José Ortega y Gasset)

Certa vez, ouvi Pe. Fábio de Melo fazer uma reflexão sobre essa frase dizendo que quando ele pensa em tudo o que já viveu, percebe que já não é apenas Fábio, mas que também é um pouco de cada pessoa que passou por sua vida. Concordo plenamente com ele, pois quando penso em tudo o que vivi e em cada pessoa que fez parte de minha vida durante todos esses anos, percebo que já não sou apenas eu mesma, mas sou multidão. Cada pessoa que passou por minha vida deixou um pouco de si e, de alguma forma, contribuiu para o aprimoramento do que carrego como essência e daquilo que realizo. Certamente, este trabalho também traz um pouco de cada uma delas. Agradeço imensamente por cada mão estendida, cada palavra de incentivo, cada colo e ouvido nas horas difíceis e cada crítica e correção que almejavam o meu crescimento. Se hoje concretizo um sonho, acreditem: todas essas pessoas também são responsáveis por esta vitória.

“Educar é ser um artesão da personalidade, um poeta da inteligência, um semeador de idéias” (Augusto Cury)

Ao prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza meus sinceros agradecimentos e admiração pelos 10 anos de amizade, orientação e ensino. Quando penso no professor Ricardo é impossível não me lembrar da seguinte frase: “Olha devagar para cada coisa. Aceita o desafio de ver o que a multidão não viu. Em cascalhos disformes e estranhos diamantes sobrevivem solitários” (Pe. Fábio de Melo). Dentre as muitas qualidades que o professor possui, admiro profundamente sua capacidade de nos fazer enxergar preciosidades que certamente deixaríamos passar despercebidas. Muitas vezes, o meu olhar apressado de aprendiz poderia ter ignorado grandes resultados. Tantas outras vezes, críticas aos trabalhos feitas por assessores poderiam ter me desanimado, mas o professor sempre me auxiliou a enxergar os avessos de cada uma delas e a acatá-las para o aprimoramento de minha pesquisa. Por fim, porém não menos importante, destaco a sua competência como professor. Rubem Alves parafraseando Adélia Prado diz que esta lhe ensina Pedagogia ao dizer: “Não quero faca nem queijo; quero é fome”. O escritor destaca que o comer não começa com o queijo. O comer começa na fome de comer queijo. Se não tenho fome, é inútil ter queijo. Nesse sentido, ressalto que o cuidado do professor Ricardo para com cada aula e o brilho no olhar que transmite ao falar de Farmacologia, sem dúvida alguma, contribuíram para despertar a minha paixão por esta disciplina e para a vocação da docência e da pesquisa.

“Não conseguimos nada sozinhos neste mundo, e o que quer que aconteça é o resultado da tapeçaria completa da vida e todos os nós individuais tecidos de uns nos outros que criam algo” (Sandra Day O'Connor, Supreme Court Justice).

À Juliana Sayuri Fugimoto, por ter realizado a etapa experimental da parte 4.2 desta tese. E à Vanessa Cristiane de Santana Amaral, por ter me auxiliado na realização dos experimentos da parte 4.1.

À Tatiane Sorregotti e a tantos outros amigos que, de alguma forma, me auxiliaram nos experimentos.

À Juliana e à Tatiani também agradeço por aceitarem a minha colaboração na orientação de seus estágios de iniciação científica, pela confiança em meu trabalho e em meus ensinamentos, pela dedicação à pesquisa que realizaram e pela amizade em todas as horas. A elas minha profunda admiração e eterna gratidão.

À Vanessa, mais do que a colaboração nos experimentos, agradeço pela amizade, descontração, compreensão, conselhos, pelas mãos sempre estendidas e por me ajudar a acreditar que tudo daria certo.

Às técnicas do laboratório de Farmacologia da UNESP: Rosana Finoti Pupim Silva e Elizabete Zocal Paro Lepera. Obrigada por tantos anos de dedicação ao laboratório e por desempenharem suas funções com tanta competência. Devo muito deste trabalho a vocês. Obrigada pelo apoio, pela solicitude, pelas palavras amigas e pelas vezes que suas mãos auxiliaram as minhas nos experimentos.

À Cláudia Solano Rocha, que realizou as fotos das lâminas com cortes histológicos. Obrigada por tão pronta e solícitamente ter aceitado me ajudar. Suas sugestões e conhecimentos foram essenciais.

À Graziela Bachião Martins Colombári Pereira, pelo auxílio nas correções ortográficas e gramaticais deste Agradecimento.

Aos camundongos, sujeitos experimentais deste trabalho, cuja contribuição para a ciência é sempre inestimável.

Aos docentes e funcionários da UNESP–Araraquara pela cordialidade, solicitude e trabalho que desempenham.

À UNESP–Araraquara pela concessão do espaço e materiais para o desempenho deste trabalho.

Aos funcionários da USP-Ribeirão Preto. Agradeço especialmente às secretárias da Psicobiologia e da CPG, Renata Vicentini e Maria Inês Joaquim, pelo excelente trabalho desempenhado em todos esses anos.

Aos professores da Psicobiologia, Farmacologia e Fisiologia da USP-Ribeirão Preto que ministraram aulas nas disciplinas que cumpri créditos e que tanto contribuíram em minha formação.

À UNESP e à UNIP, que me deram a oportunidade de exercer a atividade de docência. Obrigada aos profs. Ricardo e Cleopatra, que me selecionaram para receber a bolsa didática e ministrar aulas de Farmacologia na UNESP. Agradeço ao Egberto, que foi quem me apresentou à UNIP e me ajudou a acreditar em minha competência e, à Maira, professora e coordenadora do curso de Farmácia, pela confiança em meu trabalho e por me conferir a responsabilidade de ministrar a disciplina de Farmacodinâmica no curso de Farmácia.

À IBRO, pela realização do curso “Fundamentals of pain research” e pelo apoio financeiro para que eu pudesse participar como aluna. Sem dúvida, as contribuições desse curso foram além do aumento dos meus conhecimentos sobre dor.

À FAPESP, pela confiança e apoio financeiro concedidos para a realização deste trabalho e para a sua divulgação em congressos nacionais e internacionais.

“Há pessoas que nos roubam...

Há pessoas que nos devolvem...!” (Pe. Fábio de Melo)

Aos meus pais, Maria Rita e Manoel Eduardo. Agradeço à minha mãe por seu apoio incondicional em todas as horas. Sei que estou sempre presente em suas orações e creio que isso foi essencial para superar tantos momentos difíceis. Também sou grata ao meu pai porque sei que, à sua maneira, me apoiou e se orgulhou de minhas conquistas.

Aos meus avós, Joaquim e Diolanda, pelos exemplos de bondade, alegria, honestidade e força a serem seguidos. Também agradeço pelo acolhimento em sua casa, onde encontrei ambiente apropriado para escrever parte desta tese.

À Jéssica, à Duda e ao Fê pelo apoio, alegria e carinho oferecidos.

A toda a família, em especial às tias Maria Teresa, Benta e Thera, porque depositaram profunda confiança em minha formação acadêmica e sempre me lembraram que não existem limites para a força e a capacidade de quem acredita em si.

“A Fé e a Razão constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva à contemplação da verdade. Foi Deus quem colocou no coração do Homem o desejo de conhecer a verdade e, em última análise, de conhecer a Ele, para que, conhecendo-o e amando-o, possa chegar também à verdade plena sobre si próprio” (Papa João Paulo II)

Aos Padres Sinval Januário, Rosinei Pessini e Carrilho e à Isabel Olívio pela amizade e exemplo de fé a serem seguidos. Suas orações e palavras sempre foram como que água em terra seca e sedenta. Obrigada por serem epifania de Deus, trazendo sempre renovação à minha alma.

Aos fundadores e participantes do Ministério das Universidades Renovadas (MUR) por terem sido voz de Deus em minha vida durante esses 10 anos que os conheci. Queridos, obrigada pela disposição em ajudar esta obra tão linda, por me ensinarem que fé e razão podem e devem andar juntos, e por sempre trazerem esperança, paz e amor ao meu coração. Agradeço especialmente à Ariana, que foi quem me levou a conhecer esta obra.

Ao núcleo do GOU Ruah: Valéria Mallavolta, Olívio, Ana Lígia, Aline, Lidiane, Graziela, Marcos, Viviane, Juliane, Luana, Valéria Fernandez, Elisa, Caroline, Gabriela, Patrícia, Tarciso, Alexandre, Mariana, Ana Cláudia, Viviane Silva, Ana Carolina Soarez, Lucas, Márcio, Leandro, Flávia e Renata. Cada um teve importância única em minha vida. Muito obrigada pela amizade em todas as horas, por suas orações e apoio principalmente quando os experimentos não davam certo. Ressalto que vocês foram minha família aqui em Araraquara.

Ao MUR São Carlos (em especial Fernando Piantino, João Paulo, Carolina, Heltinho, Henrique, Cecília, Micheli, Dú, Márcio, Renan, Rodrigo “Dracena”, Fernanda, Fernando de Oliveira, João, Claudinei, Marcelo, Sara, Aderson, Mabel, Helton, Evelise, André, Lucas, Danilo, Rafa, Claudinei, Ana Cláudia, Hellen, Carlos, Luiz Alfredo, Tina, Achilles) e aos GPP, GOUs e Grupos de Oração de Araraquara (Cristiane, Laura, Roberto, Paulinho, Danilo, Dábana, Fabiano, Paula, Hilris, Maísa, Luigina, Lílian, Bruna, Gustavo, Vilma, Pedrinho, Odilo, Sônia, Antônio, Gui, Kiki, Randal, Natalia, Day, Rosana, Jana, Talita, Thaís, Néia, Sílvia), pela amizade, acolhida e carinho com que sempre me trataram e por me ajudarem a nunca desistir de meus sonhos e conquistas, inclusive deste trabalho.

Aos participantes dos GOUs de Ribeirão Preto: Nova Vida (em especial, Carlinha, Valquíria, Alexandre, Carolina e Michele) e Luz no Mundo (Júnior, Lívia, Juliana, Débora), pelo apoio que me deram em todos os momentos em que lá estive.

Aos participantes dos GOUs e de grupos de oração do Paraná e do Brasil afora, com quem pude conviver mais proximamente: Tatiane, Mariana, Felipe, Pedro Paulo, Ana Karina, Maycon, Leandro, Sanclayver, Tchello, Cleiton, Rodrigo, Joice, Déa, Justo, Mailinha.

Aos Amigos do Shalom: Nino, Tânia, Matias, Lidi, Fabinho, Elizandra, Ana Paula, Julianinho, Juzão, Líria, Sílvia, Silvinha, Maria Teresa, Vado, Mônica, Teresa, Marcelo, Ariane, Fábio, Ana Clara e Lamis, sempre prontos a me ajudar, amparar, instruir e apontar o melhor caminho.

“Temos esse poder. O poder de dar significado às pessoas que amamos. O poder de tirá-las do meio da multidão e ajudá-las fraternalmente” (Gabriel Chalita)

Aos meus velhos, porém, sempre atuais amigos: Manuela, Vahram, Paula, Ariana e Márcio Andrey. Obrigada porque, mesmo fisicamente distantes, sempre se fizeram presentes de alguma forma. Agradeço porque nunca me negaram apoio e amizade, especialmente em momentos difíceis. Saibam também que a integridade de caráter, a competência, a determinação e a força de cada um de vocês sempre serão exemplos a serem seguidos por mim. À Manu agradeço também por ser sempre tão amorosa e presente. Manu, obrigada porque, mesmo com o passar dos anos e com tantas mudanças em nossas vidas, você sempre cultivou nossa amizade de uma forma tão bonita e atual. Ao Vahram quero também agradecer por ser um grande exemplo de coragem, por me mostrar que, muitas vezes, os obstáculos somos nós quem criamos. Por ajudar a me levantar diante das dificuldades e me fazer ver que sempre é tempo de tentar de novo.

Ao Alexandre (Lê), por ter sido um amigo tão fiel no final do ano de 2009, que foi um momento tão decisivo para a conclusão deste trabalho. Obrigada pelo esforço em tentar me entender apesar de nossas diferenças e por cada conselho, abraço e colo oferecidos em momentos tão difíceis. Em suas atitudes humanas pude sentir o amor e o cuidado de Deus. Assim, como não lembrar e lhe dedicar a música “Humano Amor de Deus” e, em especial este trecho: “Quando os meus sonhos vi desmoronar, me trouxeste outros pra recomeçar. Quando me esqueci que era alguém na vida, teu amor veio me relembrar. Que Deus me ama. Que não estou só. Que Deus cuida de mim, quando fala pela tua voz e me diz coragem”?

À Leticia Maragno, Angélica e Gláucia, que me acolheram por inúmeras vezes em suas casas em Ribeirão Preto e me conferiram não somente um teto, mas também muita amizade, carinho, apoio e momentos inesquecíveis. Minha eterna gratidão e desculpas por todo o incômodo causado. Angélica, manifesto minha admiração por você ter aceitado em sua casa, com tanto bom humor, alguém que você mal conhecia. Gláucia e Lê, acompanhei momentos difíceis em suas vidas e posso dizer que se tornaram exemplos de seres humanos de fibra, determinação, coragem e superação.

Aos amigos do laboratório: Vanessa, Alianda, Eduardo, Tarciso, Jú, Tati, Diego, Alexandre, Yara, Karina, Egberto, Fábio, Marcelo, Paulão, Rodrigo, Roberta, Ana Paula, Cássia, Ana Cláudia, Leonardo, Diego, Kelciane, Liany, Renata, Otávio, Sheila e outros que posso ter me esquecido. Em todos esses anos de intensa convivência, pude aprender com cada um de vocês. Agradeço pelos momentos de alegria, diversão, apoio, auxílio e por todos os trabalhos que, com sucesso, desempenhamos juntos, como o curso de Neuropsicofarmacologia por exemplo.

Aos profs. José Francisco Fracasso, Paulo Nogueira, José Salvador Lepera, Azair L. M. do Canto de Souza, Cleopatra da Silva Planeta e Maria do Carmo Longo e à tão competente secretária do PANT, Tirene Pavanelli, pelos tantos anos de ótima convivência, cordialidade e amizade.

Às professoras de inglês Valdicea Moreira e Thaís Sparano pelos ensinamentos, competência e apoio às minhas viagens internacionais que divulguei resultados deste trabalho.

Às amigas que dividiram apartamento comigo em Araraquara: Viviane, Kaori, Vanessa, Sirléia, Raquel e Cláudia, pelos excelentes anos de convivência.

Aos amigos adquiridos durante o curso de graduação Jean e Gabriel Fachini e aos meus novos colegas e amigos, Nilo, Bruninho, Ashok, Cesinha, Du, Sol, Syl, André, Fabi, Van, Giu, Claudia Chiari, José Henrique, Arnóbio, Michelle, Regina e Ana. Queridos, passei momentos maravilhosos com vocês. Obrigada pela amizade, acolhimento e diversão.

À Evelyn, Elizandra e Viviane por terem entrado em minha vida de maneira tão única e especial a ponto de nossa identificação ter sido imediata. Obrigada por todo o carinho, cuidado, palavras de incentivo, e por terem sido presente tão maravilhoso em minha vida.

Aos amigos, professores e parceiros de dança de salão. A todos, os meus profundos agradecimentos por terem me apresentado a dança que, mais do que um esporte ou lazer, é caracterizada como uma arte que renova a alma. Deixo, em especial, o meu agradecimento ao grande amigo Anderson Polito que, com sua amizade e simplicidade, ensinou-me os primeiros passos da dança e me fez acreditar que sou capaz de aprender e realizar aquilo que amo.

Aos novos colegas de trabalho na UNIP: Maira, Nilva, Karina, Andréia e Alberto, pelo acolhimento e amizade.

À Rose (Rosão), que, por tantas vezes, não limpou somente minha casa, mas também meus pensamentos e meu coração, renovando, assim, minhas esperanças.

Aos colegas de Ribeirão Preto que tornaram ainda mais agradáveis os meus dias naquela cidade: Caê, Karina Abdo, Karina Paraventi, Renato Leonardo, Javier, Andréa Milena, Jorge, Quintino, João, Gabriel, Carlo, Zé, Marcos, Cris, Gláucio, Ricardo, Juliana, Fabrício, Rosana, Eveline, Luciane, Júlia, Lucas, Milene, Alicia, Raquel. Agradeço especialmente à Danielle, que compartilhou suas anotações durante o curso de aperfeiçoamento, e aos pós graduandos da USP que moram ou moraram nas Casas 3 e 12, pela amizade, acolhimento e descontração.

To the friends I've met around the world, specially Annabelle, Bartu, Alim, Fevzican, Gilbert, Angelica and others from IBRO School (Montreal - Canada). They've given cultural richness to my conference trips and have made them even more exciting and joyful.

To Cem, for always remembering me that to concretize my dreams, I just need to trust myself.

“O amor nos socorre do esquecimento. Retira o poder definitivo da lápide, porque sobrevive na continuidade do que plantamos” (Pe. Fábio de Melo)

Aos alunos das Escolas de Férias em Neuropsicofarmacologia (realizado na FCFar-UNESP-Araraquara) e dos Cursos de Verão em Psicobiologia (realizado na FFCLRP-USP), pela confiança em meus ensinamentos e pela experiência e aprendizado que me conferiram.

Aos meus primeiros alunos de graduação, das turmas 77 (diurno) e 78 (noturno) do curso de Farmácia-Bioquímica na UNESP-Araraquara. Agradeço também aos alunos do meu primeiro emprego, que cursam Farmácia na UNIP-Araraquara. A todos, o meu agradecimento pela amizade, apoio, paciência, aprendizado e pela oportunidade de ensinar Farmacologia, uma disciplina que tanto amo.

“Contrariamente ao que crêem os pessimistas, todo erro é um valor que vem aumentar os nossos haveres. Em vez de chorar sobre ele convém explorá-lo. Por isso é preciso que resolvamos estudá-lo a fundo, descobrir, sem piedade, as suas raízes e construir energicamente a nova concepção das coisas que isto nos proporciona” (José Ortega y Gasset)

Aos assessores de meu primeiro artigo (“Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice” - publicado na revista **Brain Research**), cujas críticas proporcionaram o nascimento deste trabalho.

Ao assessor da FAPESP e aos docentes que participaram da leitura do meu projeto de doutorado direto, os profs. Drs. Silvio Morato de Carvalho, Cláudia Maria Padovan e Christie Ramos Andrade Leite Panissi. Meus agradecimentos pelas riquíssimas sugestões que tanto contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação, os profs. Drs. Marcus Lira Brandão, Francisco Silveira Guimarães e Christie Ramos Andrade Leite Panissi, e aos assessores do artigo (“Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation” - publicado na revista **Behavioural Brain Research**) que contém parte dos dados obtidos durante o meu doutorado. Muito obrigada por todas as críticas e sugestões que tanto contribuíram para o aprimoramento e publicação do mesmo.

Aos profs. Drs. Newton Sabino Canteras e Norberto Cisne Coimbra, à Christiana Strauss e à Vani Maria Alves Correa, pelos ensinamentos de técnicas de histologia.

Aos membros da banca examinadora, os profs. Drs. Francisco Silveira Guimarães, Willian Alves do Prado, Christie Ramos Andrade Leite Panissi e Cláudia Maria Padovan, por tão prontamente aceitarem sua participação, pela leitura e correção desta tese.

Tente Outra Vez

Raul Seixas

<i>Veja!</i>	<i>Tente!</i>	<i>Uh! Uh! Uh!...</i>
<i>Não diga que a</i>	<i>Levante sua mão</i>	
<i>canção</i>	<i>sedenta</i>	<i>Queira! (Queira!)</i>
<i>Está perdida</i>	<i>E recomece a</i>	<i>Basta ser sincero</i>
<i>Tenha em fé em</i>	<i>andar</i>	<i>E desejar profundo</i>
<i>Deus</i>		<i>Você será capaz</i>
<i>Tenha fé na vida</i>	<i>Não pense</i>	<i>De sacudir o</i>
<i>Tente outra vez!...</i>	<i>Que a cabeça</i>	<i>munido</i>
	<i>agüenta</i>	<i>Vai!</i>
<i>Beba! (Beba!)</i>	<i>Se você parar</i>	<i>Tente outra vez!</i>
<i>Pois a água viva</i>	<i>Não! Não! Não!</i>	<i>Humrum!...</i>
<i>Ainda tá na fonte</i>	<i>Não! Não! Não!...</i>	
<i>(Tente outra vez!)</i>		<i>Tente! (Tente!)</i>
<i>Você tem dois pés</i>	<i>Há uma voz que</i>	<i>E não diga</i>
<i>Para cruzar a</i>	<i>canta</i>	<i>Que a vitória está</i>
<i>ponte</i>	<i>Uma voz que</i>	<i>perdida</i>
<i>Nada acabou!</i>	<i>dança</i>	<i>Se é de batalhas</i>
<i>Não! Não! Não!...</i>	<i>Uma voz que gira</i>	<i>Que se vive a vida</i>
	<i>(Gira!)</i>	<i>Han!</i>
<i>Oh! Oh! Oh! Oh!</i>	<i>Bailando no ar</i>	<i>Tente outra vez!...</i>

SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	15
<i>ABSTRACT</i>	18
<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i>	21
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. REAÇÕES DE DEFESA.....	23
1.2. MEDO E ANSIEDADE.....	24
1.3. SUBSTRATOS NEURAIS DO MEDO/ANSIEDADE.....	25
1.4. DOR E ANTINOCICEPÇÃO EM ESTADOS AVERSIVOS.....	28
1.4.1. Fisiologia da Dor.....	29
1.4.2. Vias Descendentes de Modulação da Dor.....	32
1.4.3. Antinocicepção Induzida pelo Medo/Ansiedade.....	35
1.4.4. Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	36
1.5. MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (MCP).....	37
1.5.1. Organização Anatômica e Funcional da MCP.....	37
1.5.2. MCP na Modulação Nociceptiva e na Antinocicepção Induzida pela Exposição ao LCEa.....	38
2. OBJETIVOS	43
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	44
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	45
3.1. ÉTICA.....	46
3.2. ANIMAIS.....	46
3.3. CAIXA DE VIDRO E O LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	46
3.4. TESTE DA FORMALINA.....	47
4. EXPERIMENTOS	49

4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA E ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS OU NÃO AO TESTE NOCICEPTIVO E EXPOSTOS A TRÊS TIPOS DE LCE.....	50
4.1.1. Materiais e Métodos.....	50
4.1.1.1. Disposição dos Grupos.....	50
4.1.1.2. Radioimunoensaio para Corticosterona.....	51
4.1.1.3. Estatística.....	52
4.1.2. Resultados.....	53
4.1.3. Discussão.....	56
4.2. AVALIAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DA ANTINOCICEPÇÃO GERADA PELA EXPOSIÇÃO AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO ABERTO.....	60
4.2.1. Materiais e Métodos.....	60
4.2.1.1. Disposição dos Grupos.....	60
4.2.1.2. Estatística.....	61
4.2.2. Resultados.....	61
4.2.3. Discussão.....	62
4.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE LESÕES IRREVERSÍVEIS DA MCPd OU MCPvl E DOS COLÍCULOS SUPERIORES E/OU INFERIORES SOBRE AS REAÇÕES DEFENSIVAS ELICIADAS PELA EXPOSIÇÃO AO LCE.....	64
4.3.1. Materiais e Métodos.....	64
4.3.1.1. Droga.....	64
4.3.1.2. Cirurgia e Lesão.....	64
4.3.1.3. Etapas Experimentais.....	65

Etapa 3A: Efeitos da lesão da MCPd sobre as reações comportamentais defensivas e antinocicepção eliciadas pela exposição a diferentes tipos de LCE.....	65
Etapa 3B: Avaliação dos efeitos de lesões bilaterais da MCPd sobre os índices de ansiedade e locomoção no LCEp, em animais não submetidos ao teste nociceptivo.....	65
Etapa 3C: Avaliação do papel da MCPd na modulação da nocicepção	66
Etapa 3D: Avaliação dos efeitos de lesões bilaterais irreversíveis dos colículos superiores e/ou inferiores sobre os índices de ansiedade e locomoção no LCEp, em animais não submetidos ao teste nociceptivo.....	66
Etapa 3E: Efeitos da lesão da MCPvl sobre as reações comportamentais defensivas e antinocicepção eliciadas pela exposição a diferentes tipos de LCE.....	66
Etapa 3F: Avaliação dos efeitos de lesões bilaterais da MCPvl sobre os índices de ansiedade e locomoção no LCEp, em animais não submetidos ao teste nociceptivo.....	67
4.3.1.4. Perfusão e histologia do encéfalo.....	67
4.3.1.5. Coloração de Nissl.....	67
4.3.1.6. Estatística.....	68
4.3.2. Resultados.....	69
4.3.3. Discussão.....	80
5. CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
APÊNDICE.....	112

*“Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui. Sê todo em
cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes”*

Fernando Pessoa

RESUMO

Situações ameaçadoras (p.ex., exposição ao labirinto em cruz elevado – LCE) induzem respostas comportamentais e neurovegetativas, geralmente acompanhadas por antinocicepção e da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA). Além disso, é conhecido que a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) faz parte do substrato neural para a expressão de alterações comportamentais e neurovegetativas em resposta a estímulos aversivos e que essa estrutura mesencefálica é longitudinalmente dividida em quatro colunas (dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral) que estão envolvidas em coordenar estratégias distintas para o animal lidar com diferentes tipos de estresse, ameaça e dor. No presente estudo foram analisados os níveis plasmáticos de corticosterona em camundongos expostos a 3 tipos de LCE, o fechado (LCEf: 4 braços fechados - situação não aversiva), o padrão (LCEp: 2 braços abertos e 2 braços fechados - situação aversiva com a possibilidade de esquiva/fuga) ou o aberto (LCEa: 4 braços abertos - situação aversiva sem a possibilidade de esquiva/fuga). O perfil da resposta hormonal foi também avaliado em animais concomitantemente submetidos à injeção de formalina 2,5% no dorso da pata traseira direita (teste de nocicepção). O estudo também avaliou a duração da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa em animais mantidos ou não neste ambiente aversivo. A caracterização da participação da MCP neste tipo de antinocicepção foi avaliada pela lesão irreversível (produzida pela injeção de NMDA) uni ou bilateral da porção dorsal (MCPd: colunas dorsolateral e dorsomedial) e bilateral da porção ventrolateral (MCPvl) desta estrutura mesencefálica sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na pata traseira direita em camundongos expostos ao LCEf ou ao LCEa. Finalmente, os efeitos da lesão da MCPd ou da MCPvl nos índices de ansiedade foram avaliados no labirinto em cruz elevado padrão (LCEp) em camundongos com ou sem a injeção prévia de formalina. Os resultados mostraram que a exposição aos três tipos de LCE aumentou a secreção plasmática de corticosterona (CORT), porém os níveis foram superiores nos animais expostos ao LCEp ou LCEa quando comparados ao LCEf. Além disso, quando os animais foram submetidos ao teste de formalina níveis elevados, porém semelhantes, de CORT foram verificados após a exposição aos diferentes LCE, sugerindo que o estímulo nociceptivo elevou as concentrações plasmáticas desse glicocorticóide para valores máximos. Na avaliação da duração da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa, verificou-se que esta reação defensiva cessou imediatamente após a retirada do animal deste ambiente, mas perdurou por até 20 minutos quando o animal foi mantido nesta condição ameaçadora. Por fim, a lesão das diferentes porções da MCP mostrou que

tanto a MCPd como a MCPvl parecem não estar envolvidas na antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa. Curiosamente, a lesão da MCPvl reduziu a resposta nociceptiva de animais submetidos ao LCEf e aumentou a locomoção durante a exposição ao LCEf e LCEa. Além disso, a lesão bilateral da MCPd reduziu seletivamente os índices de ansiedade (% de entradas e de tempo nos braços abertos do LCEp) somente em camundongos que não foram submetidos ao teste da formalina, o que sugere que a nocicepção prejudicou o efeito ansiolítico produzido pela lesão desta porção da MCP. No entanto, é importante destacar que a lesão da MCPvl não alterou os índices de ansiedade e a locomoção de camundongos não submetidos a estimulação sensorial nociceptiva concomitante.

Palavras chave: camundongo, labirinto em cruz elevado, teste da formalina, matéria cinzenta periaquedutal, medo/ansiedade, antinocicepção, corticosterona.

“Everything should be made as simple as possible. But not simpler”

Albert Einstein

ABSTRACT

Threatening situations (e.g., exposure to an elevated plus-maze with four open arms – oEPM) induce behavioral and neurovegetative responses generally accompanied by antinociception and activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis. Furthermore, it is known that the midbrain periaqueductal gray (PAG) is part of the neural substrate for the expression of behaviorally and neurovegetative alterations in response to aversive stimuli. In addition, the PAG is longitudinally divided into four columns (dorsomedial, dorsolateral, lateral and ventrolateral) that are involved in coordinating distinct strategies for animals coping with different types of stress, threat and pain. The present study analyzed the plasmatic levels of corticosterone when mice with or without prior 2.5% formalin injection into the right hind paw (nociception test) were exposed in one of the 3 types of EPM, the enclosed (eEPM: 4 enclosed arms - non-aversive situation), the standard (sEPM: two open and two closed arms - aversive situation with the possibility of avoidance/flight) or the open (oEPM: 4 open arms - aversive situation without the possibility of avoidance/flight) EPM. The study also investigated the temporal evaluation of the oEPM-induced antinociception when mice were kept in (for 30 min) or removed from (after 10 min of exposure) that aversive environment (i.e., the oEPM). The characterization of the PAG participation in this type of antinociception was evaluated by irreversible (produced by NMDA injection) uni or bilateral lesion of dorsal PAG portion (dPAG: dorsolateral and dorsomedial columns) and bilateral ventrolateral PAG lesion (vIPAG). Finally, the effects of dPAG or vIPAG lesion on the anxiety indices were investigated in mice with or without prior formalin injection during the exposure to the sEPM. Results showed that the eEPM exposure increased the plasmatic concentration of corticosterone (CORT), however sEPM or oEPM exposure animals showed higher levels of CORT than eEPM-exposed mice. Moreover, when animals were submitted to the formalin test high, but similar levels of this glucocorticoid were verified after the exposure to the different EPM, suggesting that nociception also has provoked a ceiling effect on plasma corticosterone concentration. Results also showed that the oEPM-induced antinociception ceased immediately after mice withdrawal from the aversive situation. However, this pain inhibition response remained unchanged for approximately 20 min in animals that were kept in the threatening condition. Finally, the lesions of different portions of PAG showed that neither dPAG nor vIPAG appear to be involved in the modulation of the oEPM-induced antinociception. Curiously, vIPAG lesion reduced the nociceptive response in animals submitted to the eEPM and increased the locomotion

during eEPM and oEPM exposure. Moreover, bilateral dPAG lesion reduced anxiety indices (% of open arm entries and % of open arm time) only in mice that had not received prior injection of formalin, suggesting that nociception impaired the anxiolytic-like effect produced by dPAG lesion. It is important to highlight that vIPAG lesion did not alter the anxiety-like indices and the locomotion in mice not submitted to the concurrent nociceptive stimulation.

Keywords: mouse, elevated plus maze, formalina test, periaqueductal gray, fear/anxiety, antinociception, corticosterone.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH: Adrenocorticotropina	HM: Hipotálamo medial	MCPvl: Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
AM: Amígdala	HPA: Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal	MDZ: Midazolam
Aq: Aqueduto mesencefálico	LCE: Labirinto em cruz elevado	NMDA: Ácido n-metil-d-aspártico
BA: Braços abertos do labirinto em cruz elevado	LCEa: Labirinto em cruz elevado aberto	RVM: Bulbo rostral ventromedial
BF: Braços fechados do labirinto em cruz elevado	LCEf: Labirinto em cruz elevado fechado	SCD: Sistema cerebral de defesa
CD: Corno dorsal da medula espinal	LCEp: Labirinto em cruz elevado padrão	SEA: Sistema encefálico aversivo
CI: Colículos inferiores	MCP: Matéria cinzenta periaquedutal	SIC: Sistema de inibição comportamental
CORT: Corticosterona	MCPd: Matéria cinzenta periaquedutal dorsal	SID: Sistema inibitório descendente
CRH: Hormônio liberador de corticotropina	MCPdl: Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral	SP: Substância P
CS: Camadas profundas dos colículos superiores	MCPdm: Matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial	TC: Tempo no centro do labirinto em cruz elevado
CV: Caixa de vidro	MCPI: Matéria cinzenta periaquedutal lateral	TNF: fator necrose tumoral
ETB: Entradas totais nos braços do labirinto em cruz elevado		TRC: Teste de retirada da cauda

“O futuro da vida está preso nesta plataforma em que hoje nossos pés se firmam. É dela que partimos. Os sabores de amanhã estão sendo preparados na terra de nossas escolhas. Ações humanas seguem as mesmas regras das causas e dos efeitos. O que escolhemos hoje é matéria prima que será transmutada em vida futura...”

Pe. Fábio de Melo

1. INTRODUÇÃO

1.1. REAÇÕES DE DEFESA

“O homem tendo outros animais como ancestrais compartilharia com estes suas emoções básicas” (adaptado dos estudos de Charles Darwin, publicado no livro: A Expressão das Emoções no Homem e nos Animais, lançado em 1872).

De acordo com as proposições de Charles Darwin, as raízes da ansiedade e do medo estão nas reações de defesa dos animais frente a estímulos que representam perigo ou ameaça à sobrevivência, ao bem-estar ou à integridade física. Em outras palavras, sob essa perspectiva evolucionária, o homem compartilharia essas emoções básicas (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004) de modo que, segundo Schmitt e Kapezinski (2004), a ansiedade pode ser apontada como um sentimento responsável pela sobrevivência da espécie humana na Terra. O medo de ataque de predadores e a antecipação mental dessa possibilidade (características da ansiedade) levaram o homem a utilizar estratégias eficientes de fuga ou enfrentamento, resultando na preservação da espécie.

No que diz respeito aos outros animais, podem ser citadas como situações que podem eliciar reações comportamentais e autonômicas de defesa: o ataque de um predador, um confronto com indivíduo da mesma espécie, a nocicepção ou estímulos ambientais aversivos, tais como altura excessiva, iluminação intensa, tempestades, incêndio, exposição a lugares novos. Diante dessas situações a estratégia defensiva adotada depende de fatores como a característica e familiaridade do ambiente, a proximidade do estímulo, as experiências anteriores em situações semelhantes, a posição do indivíduo na hierarquia social do seu grupo. De acordo com essas características, os animais procuram responder segundo quatro estratégias comportamentais básicas: fuga, imobilidade, ataque defensivo e submissão (ADAMS, 1979¹ e MARKS, 1994² apud ZANGROSSI; GRAEFF, 2004, p.57).

Segundo estudos de Caroline e Robert Blanchard, mediante uma ameaça potencial ou incerta (p. ex. reexposição ao ambiente em que o animal esteve frente a um predador ou contato com objetos com o seu odor), ratos e camundongos exibem exploração cautelosa em direção à fonte de perigo. Estes comportamentos refletem hesitação e visam avaliação

¹ ADAMS, D.B. Brain mechanisms for offense, defense and submission. **Behavioral and Brain Sciences**, Amsterdam, v. 2, p. 200-241, 1979.

² MARKS, I.M.; NESSE, R.M. Fear and fitness: an evolutionary analysis of anxiety disorders. **Ethology and Sociobiology**, New York, v. 15, p. 247-261, 1994.

de risco, sendo caracterizados por repetidas tentativas de aproximação, seguidas da esquivas ao estímulo aversivo. Já diante de uma ameaça distal, o animal tende a exibir respostas de esquivas ou imobilidade. O escape é preferido quando existe uma rota de saída ou quando o predador mantém-se a certa distância. Quando isso não acontece, o animal tende a permanecer imóvel, pois ao exibir esse estado de congelamento pode diminuir a probabilidade de ser visto pelo predador. No entanto, quando o predador está muito próximo, ou já em contato com a presa, tentativas descontroladas e não direcionadas de fuga ou respostas de agressão defensiva (posturas de ameaça e mordidas ao predador) podem ser os recursos defensivos mais eficazes em inibir a ação predatória (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001).

1.2. MEDO E ANSIEDADE

A ansiedade é inerente à vida humana. Ela é experiência do cotidiano da vida, a qual, em grau menor, é útil para o indivíduo, mas em uma intensidade maior é destrutiva. Ela tanto pode ser um estímulo à ação como um obstáculo a uma boa performance; ela é prazerosamente procurada por aqueles que se engajam em atividades arriscadas e por muitos outros que observam aqueles em suas proezas, seja no mundo real ou no da fantasia. Por outro lado, há aqueles que se vêem impedidos de realizarem suas tarefas a contento ou até mesmo sair de suas casas diante da vivência paralisante da ansiedade (Marco Antônio Brasil-trecho extraído do livro Transtornos de ansiedade. São Paulo: Atheneu, 2004).

A ansiedade e o medo são estados emocionais de grande valor adaptativo, experimentados de maneira subjetiva como não prazerosos e desconfortáveis e cuja expressão plena envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivo-subjetivas. Até um determinado nível estas emoções podem favorecer o desempenho de tarefas motoras e cognitivas, mas passam a ser indesejadas, ou patológicas, quando interferem com o comportamento normal do indivíduo (ZANGROSSI; GRAEFF, 2004). Nesse caso, as reações manifestadas são denominadas Transtornos de Ansiedade, que nada mais são que disfunções nos sistemas encefálicos que modulam as reações de defesa. No entanto, nem sempre é fácil a distinção entre a ansiedade normal e aquela considerada patológica. A diferenciação baseia-se na intensidade das manifestações, na duração, na proporcionalidade da relação entre o evento desencadeante e a reação de ansiedade, e no grau de limitação ocasionado (HETEM, 2004).

Outro assunto que tem sido pauta de discussões é a distinção entre medo e ansiedade. Embora esses dois estados emocionais sejam emoções correlatas, a diferenciação pode ser caracterizada em relação aos estímulos e/ou situações que os desencadeiam, de forma que o medo surgiria diante de situações evidentes de ameaça e perigo, enquanto a ansiedade seria desencadeada por situações onde o perigo é apenas potencial, vago e incerto (BLANCHARD et al., 1993). Além disso, de acordo com Gray e McNaughton (2000), existe ansiedade quando ocorre uma tendência de aproximação a uma fonte de perigo. Quando somente componentes de fuga ou de esquiva são expressos, existe o medo. De fato, dados farmacológicos mostram que as respostas de esquiva e de fuga são resistentes a agentes ansiolíticos, ao contrário das respostas comportamentais de avaliação de risco ou daquelas observadas em decorrência da apresentação de estímulos condicionados que sinalizam punição (BLANCHARD et al., 1993; GRAY; McNAUGHTON, 2000).

1.3. SUBSTRATOS NEURAIIS DO MEDO/ANSIEDADE

Nas últimas décadas ocorreu um progresso significativo no conhecimento das estruturas e sistemas neuronais anatômicos relacionados com os estados de ansiedade. A descoberta das estruturas encefálicas relacionadas com a ansiedade humana deriva do somatório de conhecimentos obtidos por observações de indivíduos com lesão encefálica, manipulação de pacientes submetidos à neurocirurgia, estudos de neuroimagem e resultados com animais de laboratório (GRAEFF; HETEM, 2004). Embora estes últimos não contribuam para o entendimento das bases neurais do componente subjetivo da ansiedade, permitem identificar as estruturas e vias envolvidas nos componentes avaliativo e expressivo da emoção (GRAEFF; HETEM, 2004).

Assim, com base em estudos que utilizaram animais de laboratório, foram elaboradas duas proposições teóricas, na tentativa de ordenar os dados disponíveis sobre bases neuroanatômicas dos comportamentos de defesa. A primeira é um constructo teórico, derivada da Psicologia Experimental, denominada sistema de inibição comportamental (SIC). A segunda, baseada em estudos neurofisiológicos, caracterizou o sistema cerebral de defesa (SCD) (GRAEFF; HETEM, 2004).

Segundo o psicólogo britânico Jeffrey Gray, a ansiedade seria devido à ativação do SIC por determinadas classes de estímulos ambientais, como situações novas ou sinais de

perigo inato ou condicionados de punição ou frustração. A ativação desse sistema resultaria em inibição de qualquer comportamento que o animal estivesse realizando, aumento da vigilância e da atenção e preparo para a ação física vigorosa. Gray destacou que esse sistema era composto pelo septo e o hipocampo, pois lesões dessas estruturas produziam alterações comportamentais semelhantes às produzidas por agentes ansiolíticos. Posteriormente, reformulou sua hipótese e destacou uma estrutura do hipocampo denominada subículo que agiria como um “conferidor” das informações. Caso chegasse alguma informação discrepante, ou seja, algo inesperado acontecesse ao indivíduo, o subículo desencadearia a inibição comportamental, produzindo a ansiedade (GRAY; McNAUGHTON, 2000).

No início da década de 80, o pesquisador Frederico Graeff propôs que o hipotálamo medial (HM), a amígdala (AM) e a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) representam o substrato neural para a expressão de alterações comportamentais e neurovegetativas em resposta a estímulos aversivos. Esse conjunto de estruturas, reciprocamente conectadas, foi nomeado sistema cerebral de defesa (SCD). Posteriormente, a partir dos resultados dos pesquisadores Peter Redgrave e Marcus Brandão, os colículos superiores e inferiores foram integrados a esse sistema que atualmente recebe o nome de sistema encefálico aversivo (SEA) (BRANDÃO et al., 1988; REDGRAVE et al., 1981).

O SEA propõe que a amígdala é responsável pela avaliação do tipo e grau do perigo, e o resultado dessa avaliação é transmitido ao HM e à MCP. Esta última teria a função de selecionar e organizar as reações comportamentais e fisiológicas de defesa mais apropriadas. O HM, por sua vez, regula o funcionamento da hipófise, responsável pela secreção de hormônios, como adrenocorticotropina (ACTH), que estimula as glândulas adrenais a secretarem o cortisol (primatas) ou a corticosterona (roedores) (GRAEFF; HETEM, 2004). No que diz respeito às outras duas estruturas mais recentemente incorporadas ao SEA, postula-se que o colículo inferior seja uma plataforma importante de vias auditivas, de modo que parece atuar no processamento de informações acústicas de natureza aversiva (BRANDÃO et al., 1999). Assim, tem sido proposto que os neurônios do colículo inferior agem como filtros para sons que requerem ação imediata, tais como certos ruídos emitidos pela presa, predador ou co-específicos (CASSEDAY; COVEY, 1996). Já o colículo superior processa informações visuais e parece atuar no controle de movimentos orientados dos olhos e cabeça, bem como na mediação de comportamentos defensivos e

mudanças cardiovasculares que seriam apropriadas em uma emergência, como a presença de um predador ou um objeto em curso de colisão (DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989).

Em 2000, Gray e McNaughton procuraram integrar o constructo do SIC com o do SEA. Propuseram que a principal função do sistema septo-hipocampal é a de detectar conflitos entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo. A primeira seria gerada no chamado “sistema cerebral de aproximação”, representado principalmente pelo núcleo acumbente, que é inervado pelo sistema dopaminérgico mesolímbico. A função desse sistema é incentivar a busca de fontes de satisfação de necessidades biológicas, como alimentação, abrigo e sexo e, está associado à emoção do desejo e ao prazer. Do outro lado está o SEA, representado por uma hierarquia de estruturas, dentre elas a MCP, cuja função é gerar tendência de esquiva ou fuga de fontes de perigo inatas ou aprendidas. Quando uma mesma situação induz ambas as tendências, configura-se o conflito aproximação-esquiva, que sendo detectado pelo septo-hipocampo, gera a ansiedade. Vale ressaltar, que nesse constructo a amígdala também participa do SIC. Enquanto o sistema septo-hipocampal é o responsável pelo componente cognitivo da ansiedade – órgão da hesitação e da dúvida, a amígdala contribui com os aspectos afetivos e neurovegetativos (GRAY; McNAUGHTON, 2000; GRAEFF; HETEM, 2004). Resumidamente, o papel do SIC não é apenas de inibir os comportamentos de aproximação e esquiva, mas também de aumentar o alerta e a atenção, eliciando, por exemplo, comportamentos mediados pelo septo-hipocampo como a avaliação de risco, que compreende uma exploração vigorosa e extensiva para coletar informações necessárias para a exibição da aproximação (caso a ameaça seja percebida em menor magnitude que inicialmente) ou da esquiva (se a ameaça for percebida em maior magnitude que a inicial) (GRAY; McNAUGHTON, 2000).

É importante destacar que quando a fonte de ameaça não induz tendência de aproximação, mas somente esquiva ou fuga, não há ansiedade e sim, medo. As estruturas críticas para essa emoção parecem ser o córtex cingulado anterior, a amígdala, o hipotálamo medial e a MCP (GRAY; McNAUGHTON, 2000; McNAUGHTON; CORR, 2004).

1.4. DOR E ANTINOCICEPÇÃO EM ESTADOS AVERSIVOS

“A dor é uma companhia indesejada, mas inevitável em nossas vidas. É uma mestra que pode nos ensinar o que preferiríamos aprender de outro modo” (Frank T. Vertosick autor de Why We Hurt: The Natural History of Pain).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2006) define dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tissular real ou potencial ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano”. Embora a dor seja de cunho desagradável, é de suma importância para a sobrevivência de muitos animais, visto que se trata de um mecanismo de demarcação de limites para o organismo e de aviso sobre a ocorrência de estímulos lesivos provenientes do meio externo ou do próprio organismo. Sentir dor é tão importante que pessoas com deficiências congênitas nos mecanismos fisiológicos da dor geralmente não ultrapassam a infância. Desde pequenos, os menores ferimentos lhes causam grandes sangramentos e infecções, a não ser quando descobertos por algum adulto que esteja nas proximidades. Ferimentos maiores e até mesmo fraturas são agravados pela própria criança, pois não tendo sofrido dor, não sente a necessidade de imobilizar o membro ferido e continua a se movimentar como se nada tivesse acontecido (LENT, 2001).

Existem basicamente dois tipos de dor: a aguda e a crônica. A dor aguda é aquela que dura (ou está prevista para) um curto período de tempo, geralmente menos de um mês. A dor crônica é definida como a dor que persiste ou recorre por mais de 3-6 meses ou a dor associada à lesão tecidual que se espera continuar ou evoluir. Desse modo, conforme descrito acima, a dor aguda sinaliza a ocorrência de lesão e, portanto, apresenta valor biológico fundamental para a sobrevivência, pois induz no indivíduo reações de defesa, fuga ou remoção do agente causal. Em contrapartida, a dor crônica não apresenta esse valor biológico e corresponde a mecanismos de adaptação que induzem à incapacidade e a repercussões biopsicossociais desfavoráveis (TEIXEIRA, 2006).

Vale ainda ressaltar que tanto a dor aguda quanto a crônica possui dois componentes, o fásico e o tônico. O rápido início da dor é referido como fásico, enquanto a fase insidiosa, persistente, é referida como tônica. Esse segundo componente (ou fase) da dor somente aparece se houver lesão tecidual (DENNIS; MELZACK, 1979) e tem por

finalidade propiciar repouso, os cuidados e a proteção de modo a promover a cura (BRANDÃO, 2004).

1.4.1. Fisiologia da Dor

A importância da função protetora da dor exigiu da natureza o desenvolvimento de todo um sistema sensorial próprio para veicular as informações nociceptivas, de modo que há receptores e vias aferentes privativas dessa modalidade sensorial (LENT, 2001). Quando a pele, tecidos subcutâneos (p.ex. articulações e músculos) ou órgãos internos (com exceção do encéfalo) sofrem estimulação química, térmica e/ou mecânica de alta intensidade, ocorre a ativação de uma série de receptores denominados nociceptores que também são sensíveis a substâncias químicas endógenas. Em caso de lesão tecidual ou irritação, substâncias algio gênicas liberadas no ambiente tecidual do interior dos mastócitos e outros leucócitos, vasos sanguíneos e/ou células traumatizadas, como íons (H^+ e K^+), bradicinina, acetilcolina, histamina, serotonina, leucotrienos, substância P, fator de ativação plaquetário, purinas, radicais ácidos, prostaglandinas, tromboxanos, interleucinas, fator de necrose tumoral alfa, fator de crescimento do nervo, AMPc, ATP, peptídeos, lipídeos, entre outras substâncias, sensibilizam os nociceptores e são responsáveis pela hiperalgesia termomecânica e pela vasodilatação observadas em lesões traumáticas, inflamatórias e/ou isquêmicas (MEYER et al., 2006; TEIXEIRA, 2006). Os nociceptores, especializados em captar estímulos nociceptivos e transformá-los em impulsos nervosos, são terminações de fibras aferentes primárias, cujos corpos celulares localizam-se no gânglio da raiz dorsal ou trigeminal. Os potenciais de ação gerados percorrem toda extensão desses aferentes, que além de possuírem um ramo periférico, apresentam um ramo central que adentra o corno dorsal da medula espinal (pela raiz dorsal) ou o tronco encefálico.

Existem dois tipos de fibras responsáveis por conduzir a informação dolorosa: as fibras A-delta ($A\delta$), que são mielinizadas e, portanto, de maior calibre (2-6 μm de diâmetro), são responsáveis pela condução rápida da dor (5-30 m/s) e as fibras C, que são amielinizadas, de menor calibre (0,4-1,2 μm de diâmetro) e responsáveis pela condução lenta da dor (menor que 2 m/s) (MILLAN, 1999). A ativação das fibras $A\delta$ provoca uma

sensação de dor descrita como cortante e bem localizada, enquanto a ativação das fibras C promove uma sensação de queimação e sem localização precisa.

Os impulsos nociceptivos gerados são direcionados pelos aferentes primários a determinadas partes da substância cinzenta da medula espinal, que pode ser dividida em 10 lâminas de acordo com características citoarquitetônicas de cada porção. As lâminas I (camada marginal), II (substância gelatinosa), III e IV (núcleo próprio), V e VI (camadas profundas) compõem o corno dorsal. A lâmina VII corresponde à substância cinzenta intermediária, as VIII e IX respectivamente, ao corno ventral medial e lateral, enquanto a X circunda o canal central. É principalmente nas lâminas I, II, V, VI e X que se encontram os aferentes secundários implicados na recepção, processamento e transmissão da informação nociceptiva (MILLAN, 1999). A comunicação entre os aferentes primários e secundários ocorre através de uma diversidade de substâncias envolvidas na transmissão central e modulação da informação nociceptiva, dentre eles, os aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato, e neuropeptídeos, como a substância P (SP) (TEIXEIRA, 2006; TODD; KOERBER, 2006). Estímulos fracos e moderados liberam pequena quantidade de glutamato e SP que despolarizam a membrana neuronal e geram a sensação dolorosa momentânea. Quando a estimulação é intensa e prolongada há sensibilização dos neurônios do corno dorsal da medula espinal que passam a reagir intensamente à estimulação nociceptiva ou não. A sensibilização depende de aminoácidos (glutamato, aspartato) e de neuropeptídeos (SP) (TEIXEIRA, 2006).

A neuroanatomia e organização de vias de projeções ascendentes da dor é altamente complexa. Em termos neuroanatômicos existem dois tipos de vias ascendentes, as monossinápticas e as polissinápticas. As primeiras projetam-se diretamente às vias encefálicas superiores e incluem os tratos espinotalâmico, espinomesencefálico, espinoparabraquial, espino-hipotalâmico e o espinoreticular. Vias do trato espinoreticular projetam-se para a formação reticular lateral, um núcleo pré-cerebelar envolvido no controle motor. Outras vias desse trato projetam-se para a formação reticular pontinobulbar medial e de lá, para circuitos talâmico-corticais. O trato espinomesencefálico possui uma via que se dirige para a MCP e uma que se projeta principalmente para as camadas profundas do colículo superior. O maior alvo do trato espinomesencefálico é o núcleo parabraquial da ponte, uma região que tem um importante papel na integração de respostas cardiovasculares, autonômicas e motivacionais à dor. Dois outros tratos que se dirigem ao

núcleo parabraquial são denominados espinoparabraquio-hipotalâmico e espinoparabraquio-amidalóide, de acordo com o alvo das projeções subsequentes a essa estrutura pontina. A amígdala, globo pálido/*putamen* (estriado nos ratos e núcleo lenticular no homem), núcleo acumbente e septo, bem como os córtices frontal, orbital (cingulado) e infralímbico são também diretamente acessados por neurônios nociceptivos espinais. Certos alvos límbicos são interligados ao hipotálamo e têm sido referidos como uma projeção espinotelencefálica: este parece representar uma extensão rostral e bilateral do trato espino-hipotalâmico. Adicionalmente, outros colaterais desse trato projetam-se para o tálamo (incluindo suas porções ventroposterior e posterior) e também inervam o bulbo e a ponte, localizados no tronco encefálico, de onde partem vias descendentes modulatórias da dor (BROOKS; TRACEY, 2005; MILLAN, 1999).

As vias polissinápticas, em contraste com as monossinápticas, possuem uma estação relé com neurônios de segunda ordem em sua rota para centros superiores. As duas principais rotas polissinápticas são a via espino-cervical, que se projeta para o núcleo lateral cervical no nível C1±C3 e o sistema lemniscal, que se dirige para os núcleos dorsais do bulbo caudal: cuneiforme (dos segmentos torácicos e cervicais) e grácil (dos segmentos lombo-sacrais). Do núcleo cervical lateral a informação nociceptiva é carregada via trato cervicotalâmico para vários núcleos talâmicos e, através de uma via cervicomesencefálica, para o mesencéfalo, incluindo a MCP e o colículo superior. Do tálamo os impulsos nociceptivos são conduzidos às seguintes regiões corticais: área SI do giro pós-central, área II somatossensorial, várias regiões do córtex parietal inferior e anterior, córtex insular, córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal medial. Portanto, há um padrão complexo e interativo de inervação múltipla direta e indireta do tálamo, mesencéfalo, sistema límbico, córtex, formação reticular e outras estruturas encefálicas através de múltiplas vias ascendentes. Essas regiões supraespinais são extensivamente interligadas e também interagem com mecanismos de modulação descendente direcionados ao corno dorsal (BROOKS; TRACEY, 2005; MILLAN, 1999).

Para um melhor entendimento do papel de vias ascendentes e mecanismos supraespinais de modulação da experiência de dor, é imperativo ressaltar dois aspectos fundamentais da dor, processados por circuitos tálamo-corticais distintos, mas interconectados e interativos. Assim, verifica-se o aspecto perceptivo-discriminativo: que é a percepção e detecção do estímulo nociceptivo, no que concerne sua intensidade, localização, duração, padrão temporal e qualidade (momento em que o organismo

identifica o estímulo como doloroso). E o aspecto aversivo-cognitivo-motivacional, também denominado reacional: que confere a relação entre dor e humor, atenção e memória da dor, a capacidade de lidar e tolerar a dor e sua racionalização (MILLAN, 1999). O aspecto reacional da dor compreende uma série de comportamentos defensivos que vão desde a retirada reflexa do membro até as respostas emocionais do tipo luta/fuga. Esses comportamentos são geralmente acompanhados por fortes sensações subjetivas de desconforto e intensa motivação para aliviar ou terminar a dor (BRANDÃO, 2004).

1.4.2. Vias Descendentes de Modulação da Dor

As primeiras evidências de que o sistema descendente pode seletivamente modular dor se deram com a demonstração da analgesia produzida por estimulação (no inglês – SPA: *stimulation-produced analgesia*) elétrica da MCP (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006; REYNOLDS, 1969). A ativação dessa estrutura mesencefálica suprime especificamente respostas comportamentais à estimulação nociva, pois os animais permanecem alerta e ativos e suas reações à maioria dos estímulos ambientais permanecem inalteradas. A supressão seletiva da dor permite ao organismo responder de maneira apropriada à situação que o ameaça a vida sem a distração ou respostas motoras concorrentes que são evocadas pelo impulso nociceptivo. Tais descobertas foram substanciais para o entendimento de mecanismos de modulação da dor. Pesquisas subsequentes demonstraram que a MCP faz parte de um circuito do sistema nervoso central que controla a transmissão nociceptiva na medula espinal, sendo que o sistema mais estudado até os dias de hoje, envolve a conexão da MCP com o bulbo rostral ventromedial (RVM), que, por sua vez, envia projeções para a medula espinal (BEHBEHANI, 1995; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006; HEINRICHER et al., 2009). É importante destacar que além da participação das vias que partem da MCP e RVM, neurônios que partem do *locus coeruleus*, localizado no tegmento pontino, fornecem uma via paralela de modulação nociceptiva na medula espinal (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

Quanto à neurotransmissão envolvida no controle da dor na medula espinal, estudos demonstram que projeções serotoninérgicas e opioidérgicas, originadas principalmente do núcleo magno da rafe, descendem via funículo dorsolateral e chegam ao corno dorsal. Além disso, fibras noradrenérgicas provenientes do *locus coeruleus* também exercem

modulação inibitória sobre a nocicepção no corno dorsal através da atuação em receptores α_2 adrenérgicos (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006; FÜRST, 1998, MILLAN, 2002).

Além do sistema inibitório descendente da dor, nos últimos anos crescem as evidências que demonstram a existência de um sistema facilitatório da nocicepção. Portanto, o sistema modulador parece exercer um controle bidirecional, de modo que essa via é prontamente recrutada para suprimir respostas a estímulos nociceptivos em circunstâncias caracterizadas por ameaça de injúria ou de extremo estresse (BOLLES; FANSELOW, 1980), mas também contribui para aumentar a resposta nociceptiva em uma variedade de condições, incluindo a estimulação nociva prolongada, inflamação, injúria de nervos e retirada aguda de opióides. Na verdade, muitas das vezes são as mesmas estruturas (p.ex. o RVM) que estão envolvidas na modulação facilitatória e inibitória da dor (HEINRICHER et al., 2009). Algumas dessas vias são tonicamente ativas, mas o balanço entre inibição e facilitação é dinâmico e pode ser alterado em diferentes estados comportamentais, emocionais e patológicos (HEINRICHER et al., 2009). Esse sistema modulatório recebe impulsos diretos e indiretos de vias envolvidas com a transmissão nociceptiva, conecta-se com o hipotálamo e estruturas límbicas, incluindo amígdala, córtex cingulado anterior e insula anterior e propicia um mecanismo, através do qual, fatores mais relevantes, como medo, atenção e expectativa podem regular o processamento da dor (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

A MCP integra impulsos vindos de áreas límbicas e diencefálicas com aqueles ascendentes vindos do corno dorsal da medula espinal (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006) e inclusive, faz conexão direta com o feixe espinomesencefálico (HEINRICHER et al., 2009). Além disso, há projeções diretas para a MCP de inúmeras áreas pré-frontais mediais, incluindo o cingulado anterior e o córtex insular. A amígdala, que recebe inervação de vias provenientes do hipocampo e neocórtex, constitui outra fonte de aferências para a MCP (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006). Vale ressaltar que a amígdala também recebe impulsos nociceptivos via projeções diretas e indiretas do corno dorsal (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

A maior fonte diencefálica de impulsos para a MCP é o hipotálamo (BANDLER; KEAY, 1996). Já no que diz respeito a estruturas do tronco encefálico, a maioria das projeções para a MCP partem do bulbo rostral ventromedial (com quem mantém conexões

recíprocas), o núcleo cuneiforme, a formação reticular pontinobulbar, o *locus coeruleus* e outros núcleos catecolaminérgicos (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006). Além disso, o núcleo acumbente, localizado no estriado ventromedial, também parece estar envolvido na modulação da dor. Essa estrutura envia projeções ao hipotálamo lateral e amígdala, que por sua vez, enviam impulsos à MCP (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

Vale ressaltar que a MCP é citoarquiteticamente e quimicamente heterogênea (maiores detalhes no item 3.5.1.) e suas subdivisões contribuem diferentemente na modulação da dor. Por exemplo, a porção ventrolateral envia projeções ao RVM e ao tegmento pontino ventrolateral e dorsolateral (*locus coeruleus*). Já a coluna dorsolateral da MCP não envia projeções diretas ao RVM, mas primeiramente ao tegmento pontino e ao bulbo ventrolateral, uma região crítica para o controle autonômico. A MCP também se projeta rostralmente para o tálamo medial e o córtex frontal orbital, aumentando as possibilidades da existência de controle ascendente da nocicepção (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

Vale destacar outra estrutura extremamente importante na modulação nociceptiva - o bulbo rostral ventromedial (designado como *RVM*, *rostral ventromedial medulla*) que inclui o núcleo magno da rafe e a formação reticular ascendente. É do núcleo cuneiforme e da MCP que partem a maioria das vias que chegam ao RVM. A MCP envia poucas projeções para o corno dorsal (CD) da medula espinal, portanto a modulação exercida pela MCP no CD é realizada largamente, porém não exclusivamente, através do RVM. Assim, lesões anatômicas, inativação reversível com lidocaína ou a microinjeção de antagonistas de aminoácidos excitatórios no RVM abolem a analgesia produzida pela estimulação da MCP (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006). No entanto, alguns estudos demonstraram que estimulação não seletiva ou inativação do RVM pode suprimir ou aumentar a nocicepção, dependendo do contexto funcional. A estimulação elétrica pode produzir facilitação ou inibição em diferentes limiares ou de acordo com o curso da resposta inflamatória (HEINRICHER et al., 2009). É difícil compreender como o RVM pode produzir tanto analgesia como hiperalgesia, entretanto o entendimento dessa questão pode-se dar pela análise das características funcionais dos neurônios presentes nessa estrutura bulbar. Em 1983, Fields e colaboradores nomearam células *on* e *off* (ou *ON* e *OFF-cells*) os neurônios do RVM que exibiram mudanças abruptas de estado após retirada nocifensiva. As células *on* entraram em

atividade, enquanto as *off* em um período de silêncio (FIELDS et al., 1983a³ apud HEINRICHER et al., 2009, p.219). Os neurônios remanescentes foram denominados células neutras (ou *neutral-cells*). Durante anos de estudo tem-se tornado evidente que as células *off* exercem função antinociceptiva e que as *on* facilitam a nocicepção (para revisão ver HEINRICHER; INGRAM, 2008). Assim, esses neurônios no RVM parecem ser diferencialmente recrutados por estruturas encefálicas superiores importantes na mediação do medo e do estresse de modo a inibir ou aumentar a dor de acordo com prioridades comportamentais (HEINRICHER et al., 2009).

1.4.3. Antinocicepção Induzida pelo Medo/Ansiedade

Apesar de a dor ser uma das sensações mais importantes para a manutenção da vida de muitos animais, quando esses são confrontados com ameaças ao seu bem estar, à integridade física ou à sobrevivência, além de exibirem respostas comportamentais (fuga, luta, congelamento, vocalização) e neurovegetativas (taquicardia, hipertensão e defecação), normalmente apresentam diminuição da sensibilidade dolorosa ou antinocicepção (KELLY, 1986; RODGERS, 1995). Uma vez que os estímulos nociceptivos normalmente promovem um conjunto de reflexos de retirada, fuga, repouso e outros comportamentos recuperativos, mediante situações aversivas, a antinocicepção apresenta claro valor adaptativo, pois permite ao animal exibir reações defensivas tais como congelamento, luta e fuga, mesmo que uma injúria tenha ocorrido, aumentando assim, suas chances de sobrevivência (BOLLES; FANSELOW, 1980).

A inibição da resposta nociceptiva pode ser provocada por estímulos que predizem o perigo tanto aprendido como inato. Por exemplo, Rodgers e Randall (1986) demonstraram a ocorrência de analgesia condicionada em camundongos colocados num ambiente onde haviam sido previamente atacados em interações intra-específicas. Por outro lado, a antinocicepção induzida por estímulos inatos de perigo pode ser evidenciada quando o animal é exposto a um predador (LESTER; FANSELOW, 1985; KAVALIERS, 1988), a um novo ambiente (NETTO; SIEGFRIED; IZQUIERDO 1987; TORRES et al., 2001) ou a

³ FIELDS, H.L.; BRY, J.; HENTALL, I.; ZORMAN, G. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *The Journal of Neuroscience*, Washington DC, v. 3, p. 2545-2552, 1983a.

uma situação de perigo potencial, como o labirinto em cruz elevado (LCE), que baseia-se na aversão natural de roedores a espaços abertos (HANDLEY; MITHANI, 1984; PELLOW et al., 1985).

1.4.4. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE ou labirinto em X elevado foi originalmente proposto por Handley e Mithani (1984), tendo sido posteriormente validado por métodos farmacológicos, fisiológicos e comportamentais por Pellow et al. (1985) para o estudo da ansiedade em ratos. O teste foi, em seguida, também validado em camundongos (LISTER, 1987; STEPHENS et al., 1986). Este modelo é freqüentemente usado para avaliar a ansiedade bem como o potencial ansiolítico e ansiogênico de drogas e permite avaliar a influência do medo sobre a nocicepção (CONCEIÇÃO et al., 1992; HANDLEY; MITHANI, 1984; LEE; RODGERS, 1990; PELLOW et al. 1985; STEPHENS et al., 1986; TAUKULIS; GOGGIN, 1990). Assim, Lee e Rodgers (1990) demonstraram que a exposição de camundongos ao LCE elicia reações comportamentais defensivas e produz antinocicepção avaliada pelo teste da retirada da cauda (*tail-flick test*). Esses autores também verificaram que a analgesia induzida pela exposição ao labirinto não é revertida pelo pré-tratamento com naltrexona, nem apresenta tolerância cruzada com a morfina, o que sugere um envolvimento de mecanismos não opióides.

Em experimentos realizados em nosso laboratório, camundongos expostos ao LCE não exibem marcante redução da resposta nociceptiva, verificada pelo teste da formalina. Mas, quando confinados aos braços abertos do LCE padrão (LCEp) (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000) ou expostos ao LCE todo aberto (LCEa: com 4 braços abertos) (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005) foi verificada uma antinocicepção de elevada magnitude.

Uma das evidências demonstrando que a antinocicepção induzida pelo medo tem mediação central foi obtida através de injeção de midazolam na amígdala (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Este benzodiazepínico bloqueou completamente a antinocicepção induzida pelo confinamento nos braços abertos (BA) do LCEp. Além desse, vários estudos foram conduzidos com o propósito de investigar os mecanismos envolvidos na modulação da transmissão nociceptiva no sistema nervoso central. A maioria deles tem destacado a participação da matéria cinzenta periaquedutal (MCP) colocando-a como pertencente ao

sistema inibitório descendente, uma vez que sua estimulação resulta na interrupção da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal (para uma revisão ver BASBAUM; FIELDS, 1984; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

1.5.MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (MCP)

1.5.1. Organização Anatômica e Funcional da MCP

Conforme já destacado, a MCP está envolvida na modulação de reações defensivas (item 1.3.) e da nocicepção (item 1.4.2.). Adicionalmente, esta estrutura mesencefálica (Fig. 1A), participa da mediação de outros comportamentos como vocalização, reprodução e regulação cardiovascular (BANDLER; CARRIVE; DEPAULIS, 1991; BEHBEHANI, 1995). E essa diversidade de comportamentos parece estar relacionada às suas subdivisões funcionais (BANDLER; SHIPLEY, 1994; CARRIVE, 1993; MORGAN; CLAYTON, 2005).

Assim, a MCP é anatômica (características imunoistoquímicas, densidade de receptores e conexões) e funcionalmente organizada, sendo subdividida em quatro colunas longitudinais (Fig. 1B) localizadas nas porções dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral ao aqueduto do mesencéfalo (BANDLER; SHIPLEY, 1994; CARRIVE, 1993). Funcionalmente, esta subdivisão baseia-se nas respostas somatomotoras, cardiovasculares e analgésicas seguidas de sua estimulação química ou elétrica e, nesse sentido, atenção especial tem sido dispensada às colunas lateral, dorsolateral e ventrolateral. Assim, a estimulação da MCP dorsolateral e lateral provoca vigorosas respostas somatomotoras, acompanhadas de simpatoexcitação, alterações cardiorrespiratórias e analgesia não opióide e de curta duração (BANDLER, 1982, 1988; BANDLER; DEPAULIS, 1991; BEHBEHANI, 1995; DEPAULIS; KEAY; BANDLER, 1992; HILTON; REDFERN, 1986; KEAY; BANDLER, 2002; KRIEGER; GRAEFF, 1985; LOVICK, 1991; MORGAN, 1991). Por outro lado, a estimulação da MCP ventrolateral provoca quiescência, hiporreatividade, simpatoinibição, diminuição da pressão arterial e analgesia opióide e de longa duração (BANDLER; CARRIVE; ZANG, 1991; BANDLER; DEPAULIS, 1991; BANDLER; KEAY, 1996; BANDLER; SHIPLEY, 1994; CARRIVE, 1991; DEPAULIS; KEAY; BANDLER, 1992, 1994; KEAY;

BANDLER, 2002; LOVICK, 1991, 1993; MORGAN, 1991). Desse modo, evidências demonstram que diante de situações aversivas ou ameaçadoras escapáveis ou controláveis, como por exemplo, a ameaça de um predador ou co-específico ou dor de origem cutânea, ocorreria a estimulação da MCP dorsolateral e/ou lateral. Em contraste, a MCP ventrolateral seria ativada por situações estressantes inescapáveis, como por exemplo, quando o animal sofre repetidas derrotas em conflitos sociais ou está com dor de origem profunda (BANDLER; DEPAULIS, 1991; BANDLER; CARRIVE; ZANG, 1991; BANDLER; KEAY, 1996; BANDLER et al., 2000; BANDLER; PRICE; KEAY, 2000; BANDLER; SHIPLEY, 1994; BERNARD; BANDLER, 1998; KEAY; BANDLER, 1993, 2001, 2002).

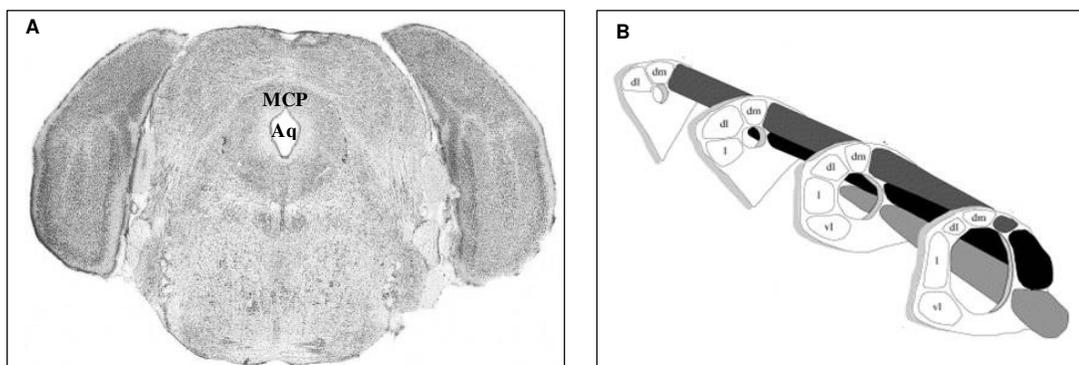


Figura 1 - Em A: corte coronal de mesencéfalo de camundongo (PAXINOS; FRANKLIN, 2001) ilustrando a matéria cinzenta periaquedutal (MCP). Em B (modificado de KEAY; BANDLER, 2001): colunas da MCP. Abreviações: Aq, aqueduto mesencefálico; dm, dl, l e vl, respectivamente, colunas dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral da MCP.

1.5.2. MCP na Modulação Nociceptiva e na Antinociceção Induzida pela Exposição ao LCEa

É importante destacar que dor é uma sensação que se caracteriza como um fenômeno polimodal. A palavra dor é utilizada para descrever uma variedade muito ampla de sensações e experiências emocionais associadas, desde uma injúria sofrida em decorrência de um corte ou pequena queimadura, até sensações anormais das síndromes neuropáticas (CERVERO, 2000). Essas sensações além de serem diferentemente processadas, parecem envolver a estimulação de distintas colunas da MCP. Corroborando a análise comportamental, estudos da expressão de proteína Fos (utilizada como marcador da atividade neuronal) demonstram que testes nociceptivos caracterizados por serem situações

de estresse inescapável (portanto, induzem uma reação de enfrentamento passivo) como, por exemplo, a injeção intramuscular de formalina (KEAY; LI; BANDLER, 2000) e o pinçamento do pescoço (KEAY et al., 2001) provocam uma marcação seletiva de proteína Fos na coluna ventrolateral da MCP de ratos. Por outro lado, testes que se caracterizam por ser situações de estresse escapável (portanto, induzem uma reação de enfrentamento ativo), como o calor radiante (*radiante heat*) no pescoço (KEAY; BANDLER, 1993), provocam uma maior marcação de proteína Fos nas colunas dorsolateral e lateral da MCP.

Também através da análise da marcação de proteína Fos, Lumb (2002, 2004) e Lumb et al. (2002) complementam as proposições de Keay e Bandler (1993) e Keay et al. (2001) discutidas acima, e propõem que quando o estressor é nociceptivo, a coluna da MCP recrutada também depende do tipo de fibra nociceptiva ativada. Assim, uma vez que a pele tem elevada proporção de fibras C e A δ e as vísceras de fibras C (CERVERO, 1987), foi sugerido que na dor cutânea transitória, principalmente as fibras A δ são ativadas, o que resulta na estimulação das colunas dorsolateral e lateral, enquanto na dor visceral ou cutânea persistente, preferencialmente as fibras C são ativadas e a MCP ventrolateral é estimulada (LUMB 2002, 2004; LUMB et al. 2002).

Assim, também é provável que essas sensações tenham uma modulação inibitória distinta. Nesse sentido, foi demonstrado que a exposição ao LCEa provoca antinocicepção em camundongos submetidos aos testes da formalina (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005) e de contorções abdominais, porém não altera a resposta nociceptiva em camundongos (GOMES, 2005) submetidos ao teste de retirada da cauda (TRC ou *tail-flick test*). Com base numa revisão publicada por Le Bars; Gazariu; Cadden (2001), Gomes (2005) sugeriu que a ausência de efeitos antinociceptivos no TRC possa estar associada ao fato de que neste teste fibras A δ são ativadas. Sucintamente, é possível que antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa não esteja associada à inibição da ativação de fibras A δ , mas de fibras C. Em apoio a essa hipótese estão as evidências destacando que as fibras C estão especialmente sujeitas ao controle do SID (sistema inibitório descendente) quando comparadas às fibras A δ (HEINRICHER et al., 2009; LU et al. 2004). Heinricher et al. (2009) destacaram que o controle inibitório exercido pelo sistema MCP-RVM preferencialmente suprime impulsos nociceptivos mediados por fibras C, preservando a informação sensorio-discriminativa carregada rapidamente por fibras A δ . Assim, não seria surpreendente que nos testes de formalina e de contorções abdominais, que caracterizam

dor persistente com ativação de fibras C (LE BARS; GAZARIU; CADDEN, 2001), a resposta antinociceptiva tenha sido obtida, enquanto não foi verificada no TRC.

Além do tipo de fibra (C e/ou A δ) ativada em cada teste deve também ser levado em consideração se a dor produzida é fásica [breve e sem dano tecidual (Dennis; Melzack, 1979)] como é o caso do TRC, ou tônica [contínua e com dano tissular (Dennis; Melzack, 1979)], verificada no teste da formalina e de contorções abdominais. A literatura tem demonstrado que a supressão desses diferentes tipos de dor envolve diferentes sistemas. Por exemplo, Thorn e Plotkin (1984) demonstraram no TRC, que a analgesia gerada pela estimulação da MCP é revertida pelo uso de antagonista opióide e serotoninérgico, enquanto no teste de formalina, somente antagonistas serotoninérgicos foram efetivos. Assim, pode ser que a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa seja mais evidente em testes que envolvam dor tônica.

Em estudos realizados em nosso laboratório, empregamos na pata de camundongos o teste da formalina, que ativa principalmente fibras C (McCALL; TANNER; LEVINE, 1996; LE BARS; GAZARIU; CADDEN, 2001) e provoca dor tônica (ALBE-FESSARD; GIAMBERARDINO; RAMPIM, 1990; BON et al., 2002; CODERRE et al., 1993; DENNIS; MELZACK, 1979; DUBUISSON; DENNIS, 1977; MAIONE et al., 2000; TJOLSEN et al., 1992), caracterizando-se, portanto, como um estressor inescapável. Assim, com base na teoria proposta pelo grupo de Bandler (BANDLER; DEPAULIS, 1991; BANDLER; CARRIVE; ZANG, 1991; BANDLER; KEAY, 1996; BANDLER et al., 2000; BANDLER; PRICE; KEAY, 2000; BANDLER; SHIPLEY, 1994; KEAY; BANDLER, 1993, 2001, 2002) *é possível que animais tratados com formalina e expostos ao LCEa tenham mecanismos da MCP ventrolateral recrutados e, como consequência, a exibição de antinocicepção do tipo opióide.*

No entanto, Nunes-de-Souza et al. (2000) demonstraram que a antinocicepção induzida pelo confinamento nos braços abertos (BA) do LCEp (que é em essência uma situação semelhante à observada durante a exposição ao LCEa) não é bloqueada pela injeção sistêmica de naloxona, sugerindo que esse tipo de antinocicepção não é opióide. Além disso, como a exposição ao LCEa provoca medo inato e a literatura está repleta de evidências indicando ser a porção *dorsal* [termo que designa as colunas dorsolateral, dorsomedial e lateral (BANDLER; SHIPLEY, 1994), embora alguns autores só considerem as duas primeiras (LINO-DE-OLIVEIRA; DE LIMA; CAROBREZ, 2002)] da MCP

(MCPd) a parte envolvida na modulação de respostas de medo incondicionado (BRANDÃO et al., 2003b; CANTERAS, 2003), é possível que a antinocicepção desencadeada no LCEa também seja mediada pela MCPd. *Assim, seria relevante a investigação de qual coluna da MCP estaria de fato envolvida na modulação da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa, quando camundongos são submetidos ao teste da formalina.*

Essa investigação pode ser realizada através da inativação de porções da MCP com substâncias neurotóxicas, como o NMDA (ácido n-metil-d-aspartico), que em elevadas doses causa unicamente a morte de corpos celulares de neurônios (KÖHLER; SCHWARCZ, 1983⁴ apud AVANZI DE LIMA, 2002). A escolha por NMDA, dentre a variedade de neurotoxinas existentes, se deve ao fato de que esta droga não promove destruição neuronal a distância nem desmielinização do axônio no local da infusão, como ocorre com o ácido caínico e com o ácido ibotênico, respectivamente (KÖHLER; SCHWARCZ, 1983 e STELLAR; HALL; WARACZYNSKI, 1991⁵ apud AVANZI DE LIMA, 2002). No entanto, o NMDA lesa corpos celulares indistintamente, independente do neurotransmissor envolvido (AVANZI DE LIMA, 2002). Vale destacar que como a lesão com NMDA geralmente atinge estruturas localizadas dorsalmente à MCP, como, por exemplo, os colículos superiores e inferiores, o presente estudo procurou investigar a influência de lesões dessas estruturas do teto mesencefálico nos efeitos obtidos com a inativação das porções da MCP.

Cabe enfatizar que alguns tipos de antinocicepção são de curta duração [por exemplo, a verificada quando a MCP dorsolateral/lateral é ativada (BANDLER; KEAY, 1996; BANDLER; SHIPLEY, 1994; KEAY; BANDLER, 2002, MORGAN, 1991)] e, portanto, podem não ser detectadas se acessadas *após* a exposição ao evento aversivo desencadeante. Assim, a escolha por testes nociceptivos que possam ser empregados concomitantemente à situação ameaçadora, como é caso do teste da formalina, pode ser relevante para a identificação de diferentes tipos de antinocicepção de curta duração. Além disso, faz-se importante uma análise da curva temporal da antinocicepção induzida pela exposição ao

⁴ STELLAR, J.R.; HALL, F.S.; WARACZYNSKI, M. The effects of excitotoxin lesions of the lateral hypothalamus on self-stimulation reward. **Brain Research**, Amsterdam, v. 541, p. 29-40, 1991.

⁵ KÖHLER, C.; SCHWARCZ, R. Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: a histological study. **Neuroscience**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 819-835, 1983.

LCEa, uma vez que esta pode ser útil na elucidação de qual porção da MCP está envolvida na modulação dessa reação de defesa.

Finalmente, foi demonstrado que a exposição de roedores ao LCEp induz ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenais, com conseqüente secreção plasmática de corticosterona (RODGERS et al., 1999), um marcador biológico de estresse (HERMAN et al., 2005; KORTE, 2001). Uma vez que o LCEa parece ser uma situação mais aversiva que o LCEp, pode ser que induza uma maior liberação desse glicocorticóide. Se esta hipótese estiver correta, a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005) pode ser mediada pela liberação de corticosterona. Além disso, foi demonstrado que camundongos submetidos ao teste da formalina tiveram abolido o efeito ansiolítico de midazolam injetado na matéria cinzenta periaquedutal (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005). Visto que a nocicepção é um estímulo altamente estressante, é possível que induza a secreção de corticosterona, que por sua vez, pode ativar estruturas responsáveis pela mediação dos comportamentos defensivos. Dessa maneira, torna-se interessante a análise dos efeitos da exposição aos LCE fechado, padrão ou aberto sobre a liberação de corticosterona em animais submetidos ou não a teste de nocicepção.

*“Há um tempo em nós que é preciso abandonar as roupas usadas,
que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos,
que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e,
se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de
nós mesmos”*

Fernando Pessoa

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Investigar a participação da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPd) e ventrolateral (MCPvl), através de lesões com microinjeção de NMDA, na modulação das reações comportamentais e antinocicepção induzidas por situações aversivas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar se a aversão produzida pela exposição aos LCE altera a concentração plasmática de corticosterona e se a injeção de formalina (teste de nocicepção) modifica a magnitude dessa secreção.
- Averiguar a duração da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa.
- Verificar o efeito de lesões da MCPd e MCPvl na antinocicepção induzida pela exposição ao labirinto em cruz elevado aberto (LCEa).
- Verificar o papel da MCPd e MCPvl na modulação da nocicepção de camundongos submetidos ao teste da formalina.
- Investigar o efeito de lesões da MCPd de camundongos, submetidos ou não ao teste nociceptivo (teste da formalina), na ansiedade induzida pela exposição ao labirinto em cruz elevado padrão (LCEp).
- Investigar o efeito de lesões da MCPvl de camundongos não submetidos ao teste de nocicepção na ansiedade induzida pela exposição ao LCEp.
- Determinar os efeitos de lesões bilaterais dos colículos superiores e/ou inferiores de camundongos na ansiedade induzida pela exposição ao LCEp.

“Os mais belos pensamentos nada são sem as obras”

Santa Terezinha

3. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

3.1. ÉTICA

Os experimentos realizados neste projeto estão em acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), baseadas US National Institutes of Health *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Além disso, todos os procedimentos foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (Protocolo nº 20/2005; Parecer nº 10/2006).

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos albinos (25-35 g), machos, provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 h) e tiveram livre acesso ao alimento e a água, exceto durante os curtos períodos de teste no LCE.

3.3. CAIXA DE VIDRO E O LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Durante pelo menos os primeiros 25 minutos de cada experimento os animais foram individualmente expostos a uma caixa de vidro (CV: 30 X 20 X 25 cm; ver Fig. 2A) e, posteriormente, alguns foram expostos ao LCE padrão, fechado e aberto, cuja descrição encontra-se abaixo.

O LCE padrão (LCEp; ver Fig. 2B) é similar àquele descrito por Lister (1987). O aparelho é feito de acrílico transparente e consiste de dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm), unidos ortogonalmente a dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira. Outros dois tipos de labirinto foram usados, o LCE fechado (LCEf; ver Fig. 2C) e o aberto (LCEa; ver Fig. 2D), sendo que ambos têm as mesmas dimensões do LCE padrão, porém apresentam os quatro braços com e sem paredes laterais, respectivamente.

Os testes foram conduzidos durante a fase clara do ciclo de luz, em uma sala com baixa iluminação (50 lux, no nível do assoalho do labirinto). Os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços (a posição de colocação do animal no labirinto foi semelhante para os três

aparelhos) e puderam explorar o labirinto por 10 minutos. Todos os três LCE foram posicionados de modo semelhante na sala experimental.



Figura 2 - A: Caixa de vidro (CV); B: LCE padrão (LCEp); C: LCE fechado (LCEf); D: LCE aberto (LCEa).

Todos os experimentos foram gravados através de sistema de circuito fechado de câmera, DVD e televisão.

3.4. TESTE DA FORMALINA

Esse teste, caracterizado por ser um modelo animal de nocicepção (DUBUISSON; DENNIS, 1977; LE BARS; GAZARIU; CADDEN, 2001), é realizado em nosso laboratório através da injeção 25 μ l de formalina 2,5% no dorso da pata traseira direita de camundongos e, a resposta registrada, é o tempo (s) gasto lambendo essa pata (Fig. 3). A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva bifásica (DUBUISSON; DENNIS, 1977). A primeira fase (fásica) é observada nos primeiros 5 minutos, e resulta da ativação

direta de nociceptores (DUBUISSON; DENNIS, 1977; McCALL; TANNER; LEVINE, 1996). A segunda fase (tônica) inicia-se depois de 20 minutos da injeção de formalina e dura aproximadamente 40 minutos (BON et al., 2002; PORRO et al., 2003). Esta segunda fase, além de ser ocasionada pela ativação de fibras C (McCALL; TANNER; LEVINE, 1996; TJOLSEN et al., 1992), também parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico com mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinal (LE BARS; GAZARIU; CADDEN, 2001; TJOLSEN et al., 1992). Essas mudanças funcionais, análogas ao mecanismo de potencialização a longo prazo, devem-se provavelmente, à atividade neural contínua produzida durante a primeira fase, pois sua atenuação, quando, por exemplo, o animal é exposto ao estresse, resulta em hipoalgesia na fase tônica (TJOLSEN et al., 1992; VACCARINO et al., 1992).



Figura 3 - Camundongo lambendo a pata traseira direita que recebeu injeção de 25 μ l de formalina 2,5%.

*“Grandes resultados não podem ser conseguidos de uma vez e,
devemos ficar satisfeitos a avançar na vida assim como
caminhamos - passo a passo”*

Samuel Smiles

4. EXPERIMENTOS

4.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE CORTICOSTERONA E ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS OU NÃO AO TESTE NOCICEPTIVO E EXPOSTOS A TRÊS TIPOS DE LCE.

Eventos estressantes podem ativar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e aumentar a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo núcleo paraventricular hipotalâmico, causando a secreção de adrenocorticotropina (ACTH) pela pituitária anterior que, por sua vez, estimula a síntese e liberação de glicocorticóides pelo córtex da adrenal. Os glicocorticóides, predominantemente, corticosterona nos roedores e cortisol nos primatas, atuam na expressão e na regulação de genes através do corpo e afetam numerosos processos fisiológicos direcionando o organismo para mudanças energéticas e de metabolismo requeridas para lidar com as situações estressantes (AKIL; MORANO, 1995; LEVINE, 2005; MARIN; CRUZ; PLANETA, 2007). Por isso, a corticosterona é bem aceita como um marcador biológico de estresse (HERMAN et al., 2005; KORTE, 2001).

Nossos resultados anteriores (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005) demonstram que a exposição ao LCEa induz antinocicepção de elevada magnitude. Uma vez que a exposição a esse aparato tem características de um evento estressante, é provável que haja a liberação de corticosterona e que esta venha a participar da mediação desse tipo de antinocicepção.

Paralelamente, foi demonstrado que a microinjeção de midazolam na MCP (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005) somente exerce efeito ansiolítico em animais não submetidos ao teste de dor. Uma vez que a dor é um estímulo altamente estressante, é possível que induza a liberação de corticosterona, que por sua vez, pode ativar estruturas responsáveis pela mediação dos comportamentos defensivos. Dessa maneira, o presente estudo analisou os efeitos da exposição aos LCE fechado, padrão ou aberto sobre a liberação de corticosterona em animais submetidos ou não a teste de dor.

4.1.1. Materiais e Métodos

4.1.1.1. Disposição dos Grupos

Para a avaliação dos níveis basais de corticosterona os camundongos foram ambientados por 1 hora à sala de experimentos e, em seguida, individualmente expostos a uma caixa contendo maravalha originária de sua gaiola viveiro. Após 5 min, foi realizada a decapitação e a coleta do sangue (Grupo 1). Já os camundongos submetidos ao teste, enquanto alguns não receberam o estímulo nociceptivo (Grupos 2-4), outros receberam injeção de 50 µl de formalina 2,5% no dorso da pata traseira direita (Grupos 5-7). Após 25 minutos do início do teste, todos os animais foram levados a sala de filmagem por 10 min e expostos aos seguintes aparatos: Grupos 2 e 5: expostos ao LCEf; Grupos 3 e 6: expostos ao LCEp; Grupos 4 e 7: expostos ao LCEa. Os experimentos foram filmados para o registro do tempo de lambidas na pata (em animais submetidos ao teste da formalina) e de medidas exploratórias (frequência de entradas e tempo nos braços dos LCE; tempo gasto na plataforma central e na extremidade distal dos braços).

Posteriormente, os animais também foram expostos em caixas individuais contendo maravalha de sua gaiola viveiro. Após 5 min, foi realizada a decapitação e a coleta do sangue em tubos de polipropileno heparinizados e estocados em gelo (menos de 15 min) para a centrifugação (11500 rpm, 10 min, 4°C). Com base no recente estudo de Amaral; Gomes; Nunes-de-Souza (2009, *no prelo*), que demonstraram que o pico da secreção de corticosterona ocorre 5 minutos após a exposição a um teste de ansiedade/medo (teste de exposição ao predador – RET), a coleta do sangue foi estipulada em 5 minutos após o teste. Posteriormente à coleta, o plasma foi estocado a -80 °C até o dia em que foi realizada a dosagem de corticosterona. Para evitar flutuações nos níveis de corticosterona em função do ritmo circadiano, os experimentos foram realizados entre 8:00 e 13:00 h.

4.1.1.2. Radioimunoensaio para Corticosterona

A concentração plasmática de corticosterona foi determinada por radioimunoensaio (RIE). O método foi adaptado por Marin; Cruz; Planeta (2007) daquele descrito por Sarnyai et al. (1992). O anticorpo para corticosterona liofilizado da Sigma® (St. Louis, MO) foi ressuspenso em 5 mL de Tampão Tris pH 8,0 (0,05M Tris-HCl; 0,1M NaCl; 0,1% de Azida Sódica) e separado em alíquotas (solução estoque) e conservado a -20° C até a utilização. Para a realização do ensaio a solução estoque foi diluída em tampão Tris na proporção de 1:2.

Alíquotas de 20 μL de plasma dos camundongos foram adicionadas em 980 μL de tampão fosfato e incubadas em banho de água a 75 °C durante 1 hora para deslocamento da corticosterona ligada à globulina plasmática. Após a incubação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e alíquotas de 100 μL foram transferidas para tubos de polipropileno contendo 100 μL da solução 1:2 do anticorpo para corticosterona e [3H]-corticosterona (10.000 – 20.000 cpm por tubo de ensaio). As amostras foram incubadas por 12 - 18 horas a 40° C. Após a incubação, a [3H]-corticosterona não ligada foi removida adicionando-se 500 μL de solução de carvão ativado seguido de centrifugação, a 10 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação a radioatividade no sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro de cintilação líquida.

A curva padrão foi construída com concentrações de corticosterona de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 pg/dL em duplicatas. Para preparação do “total” foram utilizados 100 mL de 0,01M de tampão para substituir a corticosterona. A curva padrão foi plotada usando-se $\ln [\text{cort}]$ no eixo x, e no eixo y: $\ln [\text{cpm padrão} / (\text{cpm total} - \text{cpm padrão})]$ que corresponde ao anticorpo ligado. Os valores da amostra foram calculados interpolando-se os valores de y na curva padrão expressos em mg/dL de plasma.

4.1.1.3. Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene e, posteriormente, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) unifatorial seguida pelo teste de Duncan para comparações entre grupos.

Como o teste de Levene apontou significância para os dados referentes à nocicepção, estes valores foram convertidos em raiz quadrada. Posteriormente, os resultados foram submetidos a ANOVA unifatorial seguida pelo teste de Duncan.

Na análise dos índices de ansiedade e locomoção no LCEp os dados foram analisados pelo teste *t* de Student.

Os dados das entradas totais nos braços foram submetidos a ANOVA bifatorial (fator 1: tipo de LCE; fator 2: nocicepção) seguida pelo teste de Duncan. Os resultados referentes ao tempo gasto na plataforma central foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney.

Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4.1.2. Resultados

A **Figura 4** ilustra as concentrações de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) de camundongos pertencentes ao grupo basal (aqueles que saíram da gaiola viveiro e após 5 min tiveram o plasma coletado) e daqueles que após terem sido submetidos ou não ao teste da formalina, foram expostos ao LCE fechado, padrão ou aberto. A ANOVA unifatorial demonstrou efeitos significativos ($F_{6,39} = 10,44$; $p < 0,001$) e o teste de Duncan revelou que todos os grupos apresentaram um aumento da secreção plasmática de corticosterona quando comparado ao grupo controle (Grupo basal). Além disso, os animais não submetidos ao teste de nocicepção e expostos ao LCEp e LCEa apresentaram um aumento dos níveis desse glicocorticóide quando comparados aos expostos ao LCEf.

A **Figura 5** mostra o tempo de lambidas de animais que receberam formalina na pata e que foram expostos ao LCEf, LCEp ou LCEa. A ANOVA unifatorial demonstrou efeitos significativos ($F_{2,15} = 12,02$; $p < 0,01$) e o teste de Duncan revelou que camundongos expostos ao LCEa apresentaram uma queda da resposta nociceptiva significativa quando comparados aos animais expostos ao LCEf e LCEp.

A **Figura 6** mostra a ausência de efeitos da nocicepção sobre a % de entradas e % de tempo nos braços abertos, bem como a frequência de entradas nos braços fechados de camundongos expostos ao LCEp. Os resultados correspondem aos *primeiros 5 min* de exposição ao labirinto. O teste t revelou que a injeção de formalina na pata traseira direita não produziu alterações significativas nos índices de ansiedade (% entradas nos braços abertos: $t_{12} = 1,13$; $p = 0,28$; % tempo nos braços abertos: $t_{12} = 0,76$; $p = 0,46$) nem alterou a atividade locomotora dos animais (frequência de entradas nos braços fechados: $t_{12} = -0,03$; $p = 0,97$) no LCEp, quando comparados ao grupo não submetido ao teste de nocicepção.

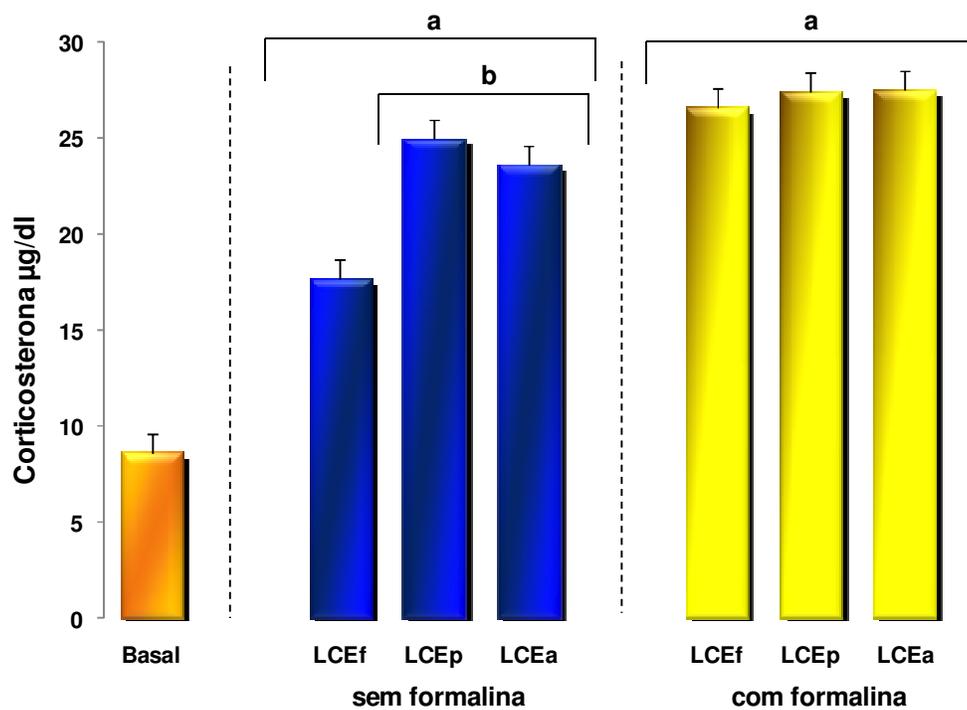


Figura 4 - Concentração plasmática de corticosterona em animais ($n = 5-9/\text{grupo}$) submetidos ou não ao teste da formalina na pata traseira direita e expostos aos diferentes tipos de labirintos (LCEf, LCEp ou LCEa). ^{a,b} $P < 0,05$ comparado aos grupos basal e LCEf, respectivamente.

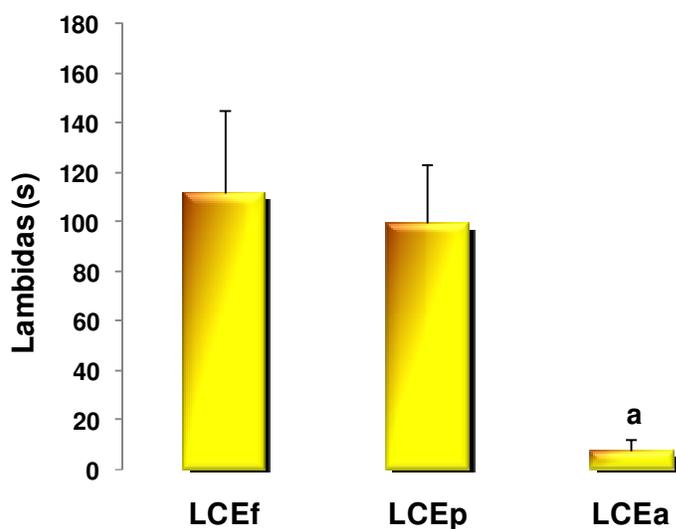


Figura 5 - Efeitos da exposição (10 min) de camundongos ($n = 6/\text{grupo}$) aos diferentes tipos de labirintos (LCEf, LCEp ou LCEa) sobre o tempo de lambidas (s) na pata tratada com formalina 2,5% (fase tônica). ^a $P < 0,01$ comparado aos grupos LCEf e LCEp.

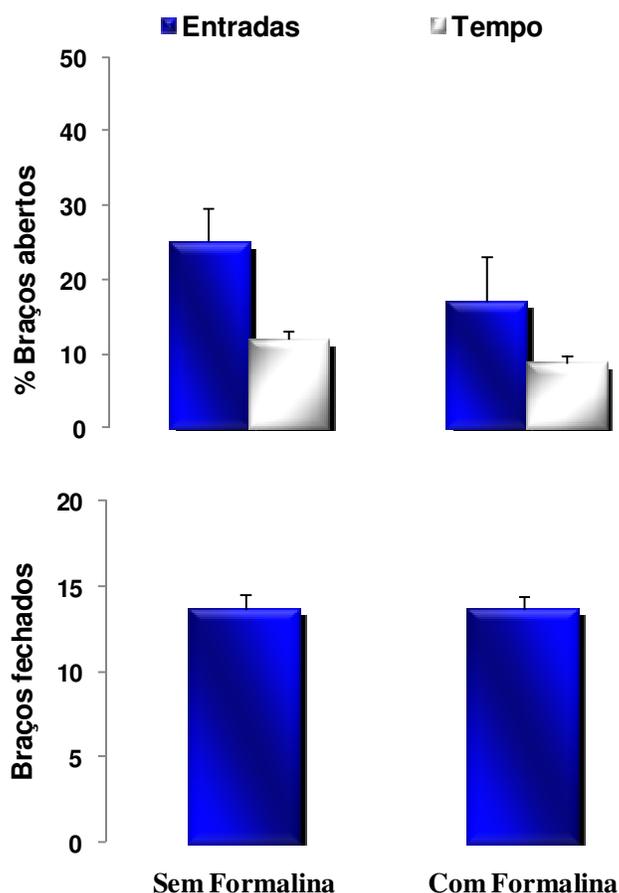


Figura 6 - Ausência de efeitos da nocicepção, provocada pela injeção de 50 μ l formalina a 2,5% no dorso da pata traseira direita, sobre a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos (BA) e a freqüência de entradas nos braços fechados (BF) do LCEp (n = 6-8/grupo).

A **Tabela 1** mostra o registro de medidas exploratórias convencionais (total de entradas nos braços e tempo que os animais gastaram na plataforma central) durante os *primeiros 5 minutos* de exposição ao LCEf, LCEp ou LCEa. Para a freqüência de entradas nos braços a ANOVA bifatorial revelou diferenças significativas para o fator local de exposição ($F_{2,33} = 31,33$; $p < 0,001$), mas não revelou efeitos do fator nocicepção ($F_{1,33} = 2,79$; $p = 0,10$) e da interação nocicepção X local de exposição ($F_{2,33} = 0,25$; $p = 0,78$). Comparações múltiplas entre os grupos revelaram que os animais expostos aos LCEp e LCEa apresentaram menor freqüência de entradas nos braços quando comparados aos grupos correspondentes expostos ao LCEf. Para o tempo gasto na plataforma central, o

teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou que os grupos expostos ao LCEp, submetidos ou não ao teste nociceptivo, apresentaram maior tempo no centro em relação aos que foram ao LCEf (sem dor: $U = 5$; $Z = -2,66$; $p < 0,05$; com dor: $U = 1$; $Z = -2,72$; $p < 0,05$). Além disso, os grupos expostos ao LCEp e não submetidos ao teste de nocicepção apresentaram maior tempo no centro quando comparados aos animais expostos ao LCEa ($U = 5$; $Z = 2,45$; $p < 0,05$). Também foi feita uma análise para se detectar diferenças no tempo gasto no centro entre animais submetidos ou não ao teste nociceptivo. O teste de Mann-Whitney não apontou diferenças significativas entre os grupos expostos ao LCEf ($U = 14$; $Z = -1$; $p = 0,32$), LCEp ($U = 21$; $Z = -0,39$; $p = 0,70$) e LCEa ($U = 16$; $Z = -0,32$; $p = 0,75$).

Tabela 1 - Total de entradas e tempo de permanência na plataforma central dos labirintos fechado, padrão ou aberto (LCEf, LCEp e LCEa) exibidos por camundongos ($n = 6-8$ / grupo) submetidos ou não ao teste da formalina na pata.

exposição		comportamentos	
		ETB	TC
LCEf		32,4 ± 2,4	72,3 ± 6,2
LCEp	sem formalina	18,4 ± 1,2 ^a	129,9 ± 12,8 ^{ab}
LCEa		17,7 ± 0,5 ^a	74,8 ± 8,1
LCEf		28,3 ± 2,1	83,2 ± 7,8
LCEp	com formalina	17,0 ± 1,8 ^a	137,7 ± 11,9 ^a
LCEa		15,2 ± 3,0 ^a	100,0 ± 25,1

^{a,b} $P < 0,05$ versus LCEf e LCEa, respectivamente.

4.1.3. Discussão

Nossos resultados anteriores demonstram que a dor pode abolir o efeito ansiolítico do midazolam injetado na MCP (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005). No entanto, ainda não está esclarecido como a estimulação nociceptiva abole o efeito ansiolítico descrito. Uma possibilidade aventada estaria associada ao envolvimento de glicocorticóides nesse processo. A injeção de formalina causa uma resposta inflamatória e, como um típico estressor, deve induzir a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal,

levando ao aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona (TAYLOR et al., 1998), o que, por sua vez, pode aumentar a ansiedade (STEIMER; DRISCOLL, 2003).

Assim, o presente estudo investigou a existência de diferenças nos níveis plasmáticos de corticosterona (CORT) de animais submetidos ou não ao teste da formalina e expostos a diversas situações LCEf, LCEp e LCEa. Os resultados mostraram que até mesmo a exposição à situação controle (LCEf) provoca elevação dos níveis plasmáticos de CORT (Fig. 4) quando comparado ao grupo basal (ou seja, aquele cujos animais tiveram o plasma coletado 5 min. após saírem da gaiola viveiro). Uma possível explicação para os aumentos dos níveis de CORT para o grupo exposto ao LCE fechado pode estar associada a não familiarização dos animais ao ambiente. Esses resultados corroboram os de Pellow et al. (1985), que já haviam demonstrado que a simples exposição a ambientes novos, como o braço fechado do LCE, pode induzir um aumento da liberação de corticosterona. Além disso, esses autores mostraram que quando os animais são confinados ao braço aberto, uma situação mais ameaçadora que o braço fechado, o aumento da secreção de CORT é ainda maior.

Nossos resultados também demonstram que a exposição às situações mais aversivas, como os LCEp e LCEa e/ou injeção de formalina na pata, aumentam ainda mais os níveis plasmáticos desse glicocorticóide. No entanto, vale ressaltar que somente existem diferenças nos níveis de corticosterona entre animais submetidos ou não ao teste de dor, quando o ambiente em que são expostos é o LCEf. Em outras palavras, parece que tanto a dor quanto a exposição ao LCEp ou ao LCEa induzem a liberação máxima de corticosterona, de modo que quando os animais são submetidos a ambos os fatores não se verifica a presença de níveis ainda mais elevados desse glicocorticóide no plasma. Tais resultados não representam que o somatório desses fatores não seja uma situação de maior estresse ao animal, mas que os níveis plasmáticos alcançaram um valor teto. Em apoio a essa hipótese estudos demonstram que os corticosteróides circulantes alcançam um pico alguns minutos após a exposição aos eventos aversivos (PALKOVITS, 1987), que os mecanismos de regulação mantêm essas concentrações dentro de um intervalo adequado para que não haja efeitos deletérios ao organismo (MUNCK; GUYRE; HOLBROOK, 1984) e que a atividade do eixo HPA é controlada principalmente pelos glicocorticóides, que inibem a sua própria liberação (AKIL; MORANO, 1995).

Corroborando nossos resultados anteriores (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005), somente a exposição ao LCEa induziu antinocicepção de elevada magnitude (Fig. 5). Como não verificamos diferenças nos níveis plasmáticos de corticosterona quando animais submetidos ao teste nociceptivo são expostos aos diferentes tipos de LCE, é provável que não seja a liberação desse glicocorticóide o fator responsável pela mediação dessa reação de defesa induzida pela exposição ao LCEa. Nesse sentido, dados obtidos recentemente em nosso laboratório demonstraram que a remoção das adrenais não antagoniza a antinocicepção induzida pela exposição de ratos ao LCEa (CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA et al., 2009).

Uma vez mais são confirmadas as características aversivas dos braços abertos do LCEp, pois os camundongos exibem menor porcentagem de entradas e de tempo nesse local do que aquela verificada nos braços fechados (Fig. 6). Além disso, o fato de estarem sob ação do estímulo nociceptivo (induzido pela injeção de formalina na pata) não provocou alterações significativas desse comportamento de esquiva dos braços abertos. Em outras palavras, um padrão de exploração similar foi mostrado por camundongos submetidos ou não ao teste de nocicepção, o que sugere que a dor *per se* não afeta significativamente medidas convencionais de ansiedade no LCEp. Também foi demonstrado que embora a administração de corticosterona tenha aumentado (CALVO et al., 1998; SMYTHE et al., 1996) ou diminuído (ANDREATINI; LEITE, 1994; McBLANE; HANDLEY, 1994) a ansiedade no LCE, a administração de metirapona, um inibidor da síntese de corticosterona, não afeta a esquiva dos braços abertos (CALVO et al., 1998; RODGERS et al., 1999). Tais dados sugerem que corticosterona endógena não deve estar diretamente envolvida na mediação das respostas comportamentais nesse teste (CALVO et al., 1998).

Os dados apresentados na Tabela 1 corroboram nossos resultados prévios que demonstram que a exposição de camundongos aos LCEp ou LCEa provoca diminuição da locomoção (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005). É provável que isso ocorra devido às próprias características aversivas destes aparatos, ou seja, porque apresentam braços abertos os animais tendem a se locomover menos que no LCEf, que é constituído por quatro braços com paredes e que, portanto, oferece mais proteção. Além disso, os animais expostos a essas duas situações aversivas tendem a gastar a maior tempo no centro desses aparatos. Quanto ao LCEp, relatos na literatura (FERNANDEZ ESPEJO, 1997;

LEE; RODGERS, 1990; RODGERS; LEE; SHEPHERD, 1992) enfatizaram que, de fato, camundongos ficam na plataforma central aproximadamente 40% do tempo total (5 minutos) de exposição nesse local. Por se tratar de uma situação de conflito com características do tipo aproximação-evitação, é possível que os animais gastem mais tempo no centro por ser este compartimento o que proporciona a oportunidade de ficarem igualmente próximos dos quatro braços. Desse modo, os animais podem fazer avaliações de risco nos braços abertos, sem entrarem nestes compartimentos. No entanto, tal hipótese só se confirmou para os animais expostos ao LCEp, que de fato gastam aproximadamente 40% do tempo na plataforma central desse aparato. Por fim, é importante também destacar que a nocicepção não alterou nem a locomoção nem o tempo que os animais permaneceram nos centro dos LCE.

4.2. AVALIAÇÃO DO CURSO TEMPORAL DA ANTINOCICEPÇÃO GERADA PELA EXPOSIÇÃO AO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO ABERTO.

Estudos realizados previamente em nosso laboratório já evidenciavam que a exposição de camundongos ao LCEa produz antinocicepção (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; MIGUEL, 2006), porém era desconhecida a duração dessa reação de defesa.

Evidências prévias indicam que a MCP parece estar envolvida na modulação da antinocicepção desencadeada por diferentes situações aversivas (p.ex., FANSELOW, 1991; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006; HARRIS, 1996). Além disso, essa estrutura mesencefálica é dividida nas porções dorsal, lateral e ventrolateral que se destacam diferencialmente na modulação de inúmeras respostas, como as autonômicas e comportamentais (BANDLER; SHIPLEY, 1994; CARRIVE, 1993; MORGAN; CLAYTON, 2005), além da antinociceptiva (KEAY; BANDLER, 2001; LUMB, 2004; PARRY et al., 2002; VIANNA; BRANDÃO, 2003). Nesse sentido, foi demonstrado que a estimulação da MCP dorsal/lateral e ventrolateral causa respectivamente, analgesia de curta e longa duração (KEAY; BANDLER, 2002). Assim, a análise da curva temporal da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa pode ser útil na elucidação de qual porção da MCP está envolvida na modulação dessa reação de defesa.

4.2.1. Materiais e Métodos

4.2.1.1. Disposição dos Grupos

O curso temporal da antinocicepção foi analisado basicamente em duas situações: quando o animal permanecia no LCEa por 30 minutos e quando após 10 minutos de exposição, retornava ao ambiente não aversivo (caixa de vidro). Dessa forma, camundongos receberam injeção de 50 µl de formalina 2,5% no dorso da pata traseira direita e foram expostos à caixa de vidro (CV: situação controle). Após 25 minutos da injeção, 3 grupos foram formados, de acordo com o local de exposição: Grupo 1 (vidro-vidro): exposto à CV dos 25 aos 55 min; Grupo 2 (grupo aberto-vidro): exposto ao LCE aberto por 10 min (25-35 min) e retornado à CV até o final do teste (55 min); Grupo 3 (aberto-aberto): exposto ao LCEa até o final do teste. O tempo de lambidas na pata da 2ª Fase do teste foi registrado dos 25 aos 55 min após a injeção de formalina.

4.2.1.2. Estatística

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene e como ocorreu significância, foram convertidos em raiz quadrada. Posteriormente, foram submetidos a ANOVA bifatorial. Uma vez que o teste apontou significância para todos os fatores em análise e interação entre eles, os dados foram submetidos ao teste de Comparações Múltiplas de Duncan e ao teste F de Comparações Planejadas. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4.2.2. Resultados

A **Figura 7** mostra o tempo de lambidas na pata registrado a intervalos de 10 minutos exibido por camundongos durante a segunda fase do teste da formalina. A ANOVA bifatorial revelou efeitos significativos para os fatores local de exposição (vidro ou LCEa) ($F_{4,38} = 12,63$; $p < 0,001$) e intervalo de tempo (25'-35', 35'-45' ou 45'-55') ($F_{2,76} = 6,68$; $p < 0,01$) e para interação entre eles ($F_{8,76} = 11,54$; $p < 0,001$). Para verificação das diferenças entre os grupos em cada intervalo, os dados foram analisados pelo teste de Duncan. No primeiro intervalo (25-35 min) o teste estatístico revelou que os dois grupos expostos ao LCEa (aberto-vidro e aberto-aberto) apresentaram redução significativa do tempo de lambidas quando comparados ao grupo que continuou na caixa de vidro (grupo controle). No intervalo equivalente aos 35-45 min, o teste de Duncan revelou que somente os animais que permaneceram no LCEa (grupo aberto-aberto) apresentaram menor resposta nociceptiva quando comparados aos do grupo controle. Já no último intervalo, correspondente aos 45-55 min, observa-se que o grupo aberto-vidro apresentou maior tempo de lambidas quando comparados ao controle. Posteriormente, cada grupo foi individualmente analisado para verificar se a resposta nociceptiva se modificava com o decorrer do tempo, ou seja, se era diferente entre os intervalos. Para isso, foi utilizado o teste de comparações planejadas que demonstrou que os animais somente expostos ao vidro (grupo vidro-vidro) apresentaram redução do tempo de lambidas na pata apenas no último intervalo (45-55 min) quando comparado ao 1º (25-35 min). Já os animais expostos ao LCEa e retornados ao vidro (aberto-vidro) apresentaram um aumento

da resposta nociceptiva nos 2º (período que retornavam à caixa de vidro) e 3º intervalos quando comparados ao 1º. Os que foram somente para o LCEa (aberto-aberto) apresentam um *aumento* da resposta nociceptiva no 3º intervalo quando comparado ao 1º.

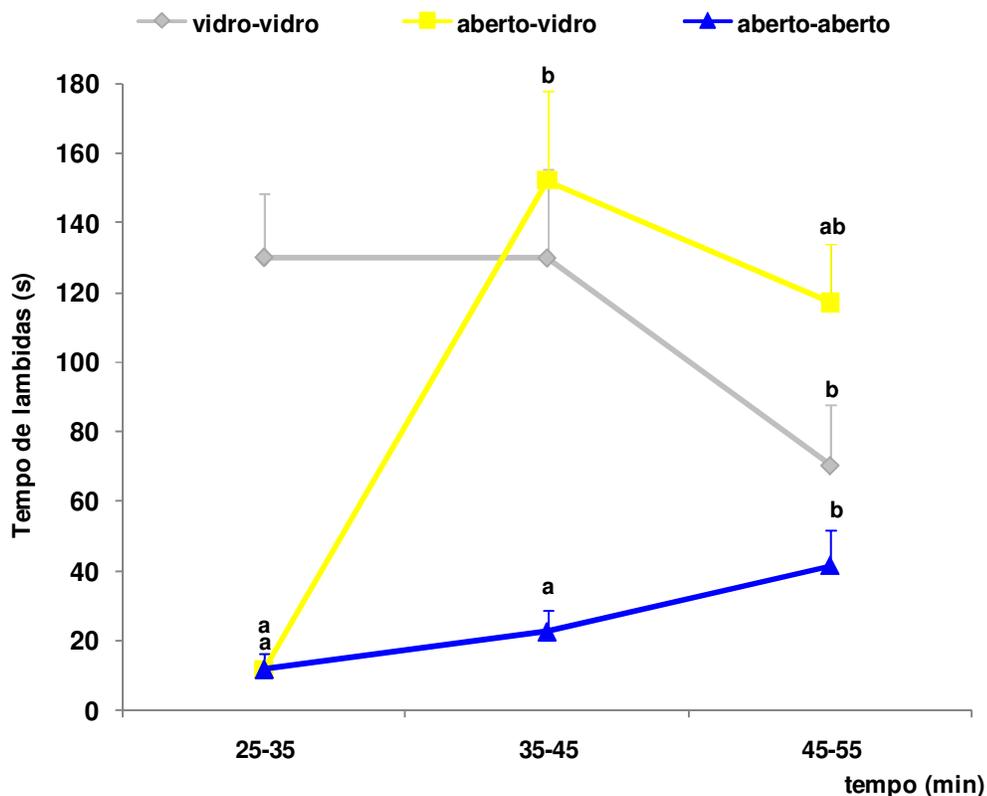


Figura 7 - Tempo de lambidas (s) na pata que recebeu formalina, registrado na 2ª fase do teste nociceptivo (25-55 min após a injeção de formalina). Os dados são demonstrados em intervalos de 10 min ($n = 9$ /grupo). ^{a,b} $P < 0,05$ versus vidro-vidro (controle) e intervalos 25-35 min, respectivamente.

4.2.3. Discussão

A análise da Figura 7 primeiramente demonstra que o grupo controle (animais somente expostos à caixa de vidro) apresenta uma queda da resposta de dor no último intervalo, corroborando dados da literatura que destacam que o teste de formalina dura aproximadamente 60 minutos (BON et al., 2002; PORRO et al., 2003). A curta duração desse teste de dor veio a ser um fator limitante para avaliarmos se a resposta antinociceptiva persistiria por mais tempo. No entanto, é importante notar que nos últimos

10 minutos de exposição (45-55 min) ao LCEa, já se observa um aumento significativo do tempo de lambidas (grupo aberto-aberto), o contrário do que foi observado no grupo somente exposto à Caixa de Vidro. Desse modo, é provável que a antinocicepção verificada no LCEa se mantenha por aproximadamente 20 minutos, indicando ser classificada como de longa duração.

Além disso, a análise dos dados do grupo aberto-vidro aponta que a antinocicepção cessa imediatamente após a saída do LCEa, ou seja, os animais passam a exibir um tempo de lambidas semelhante àqueles não expostos a este ambiente aversivo (grupo vidro-vidro). Desse modo, pode-se destacar que esse tipo de antinocicepção é decorrente da aversividade do local e que somente se mantém enquanto a ameaça está presente. Esses resultados também ressaltam a importância da escolha de testes de nocicepção que possam ser empregados concomitantemente à exposição ao LCEa, como é o caso do teste da formalina. Em outras palavras, uma vez que a antinocicepção cessa assim que o animal é retirado do LCEa, testes que são realizados posteriormente à exposição ao ambiente aversivo podem não detectar a tempo esta queda da resposta nociceptiva.

Por fim, deve-se ainda aventar que como a antinocicepção parecia ser de longa duração, a MCP ventrolateral poderia estar envolvida em sua mediação (KEAY; BANDLER, 2002). Em contrapartida, é importante notar que essa resposta cessa assim que os camundongos são retirados do LCEa, sugerindo a participação da MCP dorsal (KEAY; BANDLER, 2002). Dessa forma, para elucidar se a MCP dorsal e/ou ventrolateral estão envolvidas na mediação da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa foi relevante a utilização de outra técnica, como a de lesão dessas porções da MCP, como descrito a seguir.

4.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE LESÕES IRREVERSÍVEIS DA MCPd OU MCPvl E DOS COLÍCULOS SUPERIORES E/OU INFERIORES SOBRE AS REAÇÕES DEFENSIVAS ELICIADAS PELA EXPOSIÇÃO AO LCE.

4.3.1. Materiais e Métodos

4.3.1.1. Droga

As lesões irreversíveis foram realizadas com o NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) (RBI). Este composto foi injetado uni e bilateralmente e a concentração necessária para provocar a lesão foi baseada em alguns estudos (DEACON; CROUCHER; RAWLINS 2002; DEACON; PENNY; RAWLINS, 2003) nos quais foram utilizados 1µg/0,1µl para lesionar o córtex pré-frontal medial e hipocampo de camundongos.

4.3.1.2. Cirurgia e Lesão

Após anestesia com hidrato de cloral (500 mg/kg i.p.), os camundongos receberam implantação craniana de cânula-guia (26-gauge) de 7 mm de comprimento. A cânula foi fixada no crânio do animal com cimento acrílico. As coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula-guia na MCPd foram: 4,1 mm posterior ao bregma; 1,5 mm lateral à linha média; 2,3 mm ventral à superfície craniana, ângulo de 26°; sendo a ponta da cânula-guia posicionada 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. Para a MCPvl foram: 4,1 mm posterior ao bregma; 2,0 mm lateral à linha média; 2,1 mm ventral à superfície craniana, ângulo de 29°; sendo a ponta da cânula-guia posicionada 2,0 mm dorsal à estrutura alvo. Para implantação bilateral de cânulas nos colículos superiores e/ou inferiores foram utilizadas as mesmas coordenadas para atingir a MCPd, com exceção daquela correspondente à profundidade, que foi 1,8 mm ventral à superfície craniana, sendo que a ponta da cânula-guia também foi posicionada 1,0 mm dorsal à estrutura alvo. Tais coordenadas foram baseadas no Atlas de Paxinos e Franklin (2001). A injeção de NMDA foi feita através da inserção de uma agulha (33-gauge) de 8 mm de comprimento no interior da cânula-guia. A agulha de injeção foi conectada, por meio de tubos de polietileno (PE-10), a uma microseringa Hamilton (5µl). Uma bomba de infusão (BI 2000, INSIGHT Equipamentos) foi programada para injetar 0,1µl/30s, sendo injetado o volume de 0,2 µl de NMDA. Após a microinjeção, a agulha

permanecia no sítio de injeção por mais 180 segundos. O movimento de uma pequena bolha de ar no tubo de polietileno durante as injeções confirmou o fluxo da solução. Para cada grupo *lesado* houve um grupo *sham* (grupo que passou pelos mesmos procedimentos cirúrgicos, porém não recebeu NMDA) correspondente, que foi utilizado para controlar os parâmetros comportamentais dos animais com lesão. Além disso, os grupos *sham* também foram utilizados durante a histologia para comparação da extensão da lesão em grupos que receberam NMDA.

Após o procedimento cirúrgico os animais receberam injeção intramuscular de 0,1 ml do antimicrobiano pentabiótico (concentração 17 mg/ml) e pelas 48 horas subsequentes, a água presente no bebedouro de cada gaiola viveiro esteve acrescida do analgésico paracetamol (concentração 0,16 mg/ml).

4.3.1.3. Etapas Experimentais

Etapa 3A: Efeitos da lesão da MCPd sobre as reações comportamentais defensivas e antinocicepção eliciadas pela exposição a diferentes tipos de LCE.

Cinco a seis dias após a lesão irreversível (unilateral ou bilateral) ou fictícia (animais *sham*) da MCPd e cerca de 1 hora antes do início do teste, os animais foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento para ambientação. Posteriormente, foram tratados com 50 µl de solução de formalina a 2,5%, injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita. Em seguida, cada camundongo foi individualmente exposto à caixa de vidro onde se registrou o tempo de lambidas na pata tratada com formalina por 5 minutos (Fase 1). Passados 25 minutos da injeção de formalina, foi realizado por 10 minutos o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste. Para tal, os animais foram expostos ao LCE fechado, padrão ou aberto.

Etapa 3B: Avaliação dos efeitos de lesões bilaterais da MCPd sobre os índices de ansiedade e locomoção no LCEp, em animais não submetidos ao teste nociceptivo.

Visando verificar os efeitos das lesões da MCPd somente sobre os índices de ansiedade no LCEp, alguns animais não foram submetidos ao teste de nociceptivo. Assim, cinco a seis dias após a lesão bilateral irreversível ou fictícia (animais *sham*) da MCPd e cerca de 1 hora antes do início do teste, os animais foram transportados para uma sala

adjacente à sala de experimento para ambientação. Posteriormente, os camundongos foram expostos à caixa de vidro e, após 25 minutos, foram levados ao LCEp para o registro dos índices de ansiedade (% de entradas e de tempo nos braços abertos) e da locomoção (frequência de entradas nos braços fechados), durante os 5 primeiros minutos de exposição.

Etapa 3C: Avaliação do papel da MCPd na modulação da nocicepção.

Para avaliar o papel da MCPd na modulação da nocicepção, todos os animais *sham* e lesados que foram expostos ao LCEp (somente aqueles que não foram submetidos ao teste de nocicepção) receberam, após 48 h, injeção de formalina na pata traseira direita e foram expostos à caixa de vidro, onde foi registrado o tempo de lambidas na pata durante a primeira (0-5 min) e segunda fase (25-35 min) do teste da formalina.

Etapa 3D: Avaliação dos efeitos de lesões bilaterais irreversíveis dos colículos superiores e/ou inferiores sobre os índices de ansiedade e locomoção no LCEp, em animais não submetidos ao teste nociceptivo.

As lesões da MCPd não são seletivas a esta porção, atingindo também os colículos superiores e/ou inferiores que, sabidamente, também estão envolvidos no processamento das reações de defesa (BRANDÃO et al., 1999, 2003a, 2003b; REDGRAVE et al., 1981). Portanto, fez-se necessário avaliar os efeitos de lesões bilaterais somente dessas estruturas localizadas no teto mesencefálico. Nessa etapa experimental foi utilizado o mesmo protocolo (ver etapa 3B) empregado para os animais que sofreram lesões da MCPd e que foram expostos ao LCEp sem serem submetidos ao teste nociceptivo.

Etapa 3E: Efeitos da lesão da MCPvl sobre as reações comportamentais defensivas e antinocicepção eliciadas pela exposição a diferentes tipos de LCE.

Cinco a seis dias após a lesão bilateral irreversível ou fictícia (animais *sham*) da MCPvl e cerca de 1 hora antes do início do teste, os animais foram transportados para uma sala adjacente à sala de experimento para ambientação. Posteriormente, os camundongos foram tratados com 50 µl de solução de formalina a 2,5%, injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita. Em seguida, cada camundongo foi exposto à caixa de vidro onde se registrou por 5 minutos (Fase 1) o tempo de lambidas na pata tratada com

formalina. Passados 25 minutos da injeção de formalina, foi realizado, por 10 minutos, o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste. Para tal, os animais foram expostos ao LCE fechado ou aberto.

Etapa 3F: Avaliação dos efeitos de lesões bilaterais da MCPvl sobre os índices de ansiedade e locomoção no LCEp, em animais não submetidos ao teste nociceptivo.

Nessa etapa experimental foi utilizado o mesmo protocolo experimental (ver etapa 3B) empregado para os animais que sofreram lesões da MCPd e que foram expostos ao LCEp, sem, contudo, serem submetidos ao teste nociceptivo.

4.3.1.4. Perfusão e histologia do encéfalo

Após o teste no LCE, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental (340 mg/Kg i.p.) e submetidos à perfusão cardíaca com salina seguida de formaldeído 10%. Os animais foram então decapitados, seus encéfalos removidos e acomodados em recipientes contendo formaldeído 10% e, 24 e 48h depois, foram postos em solução de sacarose 20% e 30%, respectivamente. Posteriormente, os encéfalos foram submetidos a seções coronais de 30 µm ao longo do trajeto da agulha com auxílio de um micrótomo criostato (Leica CM 1850). Seções paralelas foram coradas com a técnica de Nissl (descrita abaixo) e inspecionadas com o uso de um microscópio (Leica DMLB) de modo a verificar a ocorrência ou não de lesão de porções da MCP e/ou colículos superiores e inferiores.

4.3.1.5. Coloração de Nissl

Os encéfalos foram seccionados coronalmente em fatias de 30µm de espessura, pelo uso de um Criostato (Leica CM1850). Quando a MCP foi visualizada, os cortes foram coletados e distribuídos sobre lâminas previamente gelatinizadas. Após 24h as lâminas foram submetidas à técnica de coloração de Nissl, seguindo-se o protocolo abaixo.

As lâminas foram imersas em álcool 70% por 20 min. Após esse período passaram por uma bateria de álcoois e xilol (álcool 95% I, 3min; álcool 95% II, 3min; álcool 100% I, 3 min; álcool 100 % II, 3min; xilol I, 3min e xilol II, 30 min). Depois as lâminas passaram por uma bateria de álcoois e água destilada (álcool 100% II, 2 min; álcool 100% I, 2 min; álcool 95% II, 2 min; álcool 95 % I, 2 min; álcool 70%, 2 min; álcool 50%, 2 min e água

destilada, 2 min). As seções foram coradas com cresil violeta 0,25 % por um período de 60s. Já coradas, foram lavadas 2 vezes em água destilada e mergulhadas em álcool (50%, 70%; 95% I; 95%/ácido acético 10% (diferenciador); 95% II; absoluto I e II. Posteriormente, foram inseridas em xilol I e em xilol II (por 30 min) para a montagem das lamínulas.

A coloração de Nissl é bastante utilizada para visualização de lesões citotóxicas uma vez que esse método cora a glia e corpos celulares de neurônios, provendo acurácia no delineamento do sítio de lesão (HEEB; YAHR, 2000; SUKIKARA et al., 2006). Neste método, solução de cresil violeta é usada para identificar o tecido encefálico degenerado: ela cora em azul corpúsculos de Nissl dentro dos neurônios intactos (BURES; HUSTON, 1983). A localização e o tamanho das lesões são avaliados através da diminuição de células neuronais típicas, do processo de gliose (SUKIKARA et al., 2006). Além disso, cromatólise, inchaço do corpo celular do neurônio e picnose do núcleo dos neurônios em degeneração podem ser visualizados em regiões turvas do tecido nervoso (BURES; HUSTON, 1983).

4.3.1.6. Estatística

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de homogeneidade de variância de Levene.

Nos experimentos que investigaram o papel da MCPd na modulação das reações comportamentais defensivas e antinocicepção induzidas por situações aversivas, quando o teste de homogeneidade não foi significativo, todos os resultados do teste de nocicepção e exploração (total de entradas nos braços e tempo no centro) nos LCE foram submetidos à análise de variância (ANOVA/MANOVA) bifatorial (fator 1: tipo de LCE; fator 2: lesão) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. No entanto, o teste de Levene apresentou significância nos valores da análise nociceptiva e tempo no centro. No primeiro caso, os dados foram convertidos em raiz quadrada e, posteriormente, foram submetidos a ANOVA bifatorial seguida teste de comparações múltiplas de Duncan. Os dados referentes ao tempo no centro foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

Quanto aos resultados obtidos durante a exposição ao LCEp [análise de ansiedade (% entradas e % de tempo nos BA) e análise de locomoção (frequência de entradas nos BF)], nos experimentos em que os animais receberam injeção de formalina na pata (Fig. 11), os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) unifatorial. Já nos casos em que os animais não foram submetidos ao teste de nocicepção, os dados foram analisados pelo teste *t* de Student (Fig. 12). Esse teste também foi utilizado para analisar os dados dos experimentos com lesões dos colículos inferiores e/ou superiores (Fig. 14) e daquele que verificou o efeito das lesões bilaterais da MCPd sobre a nocicepção durante as fases 1 e 2 do teste da formalina (Fig. 13).

Nos experimentos que investigaram o papel da MCPvl na modulação das reações comportamentais defensivas e antinocicepção induzidas por situações aversivas, os resultados referentes ao total de entradas nos braços dos LCE foram submetidos à análise de variância (ANOVA/MANOVA) bifatorial (fator 1: tipo de LCE; fator 2: lesão) seguida pelo teste de Duncan.

Uma vez que o teste de Levene apontou significância para os valores correspondentes à nocicepção (fase 2 do teste da formalina) e ao tempo gasto no centro dos LCE, o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney foi então utilizado.

Os resultados obtidos durante a exposição ao LCEp foram analisados ao teste *t* de Student (Fig. 16).

Em todos os dados valores de *p* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4.3.2. Resultados

Todos os cortes do mesencéfalo foram verificados histologicamente através da coloração de Nissl. Nos experimentos que investigaram o papel da MCPd na modulação das reações comportamentais defensivas e antinocicepção induzidas por situações aversivas, de maneira semelhante ao que já foi previamente relatado com lesões eletrolíticas (BLANCHARD et al., 1981) e químicas (DIELENBERG; LEMAN; CARRIVE, 2004) da MCP, as áreas de lesão foram extensas (**Fig. 8B, 8D e 9**). Elas incluíram a porção dorsal da MCP, ou seja, as colunas dorsomediais (MCPdm) e

dorsolaterais (MCPdl) e em poucos casos, as colunas laterais (MCPl). As lesões também se estenderam dorsalmente atingindo os colículos superiores e/ou inferiores. Entretanto, a MCP ventrolateral (MCPvl), permaneceu intacta nesses experimentos com lesões da MCPd. Não houve sinais de lesão nos animais sham, exceto no local aonde as cânula-guia estavam implantadas, ou seja, 1 mm acima da estrutura alvo (**Fig. 8A, 8C e 8E**).

Para investigar o papel dos colículos superiores e/ou inferiores nos efeitos produzidos pela lesão da MCPd, foi realizado um experimento adicional com animais que tiveram somente essas estruturas presentes no teto mesencefálico lesada (**Fig. 8F**).

No que diz respeito aos experimentos que analisaram os efeitos de lesão da MCPvl, foi verificado que as áreas de lesão também foram extensas (**Fig. 8H**), incluindo, os colículos superiores e/ou inferiores. Entretanto, a MCPd permaneceu intacta nesses experimentos. Não houve sinais de lesão nos animais sham, exceto no local aonde as cânula-guia estavam implantadas, ou seja, 2 mm acima da estrutura alvo (**Fig. 8G**).

A **Figura 10** mostra os efeitos de lesões unilaterais (lesão) ou bilaterais (lesão bilateral) da MCP dorsal (MCPd) sobre o tempo gasto lambendo a pata (que recebeu formalina) registrados durante os 10 min de exposição ao LCEf, LCEp ou LCEa. A ANOVA bifatorial revelou efeitos significativos para o fator tipo LCE [$F(2,132) = 97,09; p < 0,0001$] mas não para os fatores tipo de lesão [$F(3,132) = 1,14; p = 0,33$] e interação LCE X tipo de lesão [$F(6,132) = 0,98; p = 0,44$]. O teste de Duncan demonstrou que os camundongos expostos ao LCEa exibiram um menor tempo de lambidas quando comparado aos expostos ao LCEp e LCEf. Além disso, os animais expostos ao LCEp também gastaram menos tempo lambendo a pata que os expostos ao LCEf.

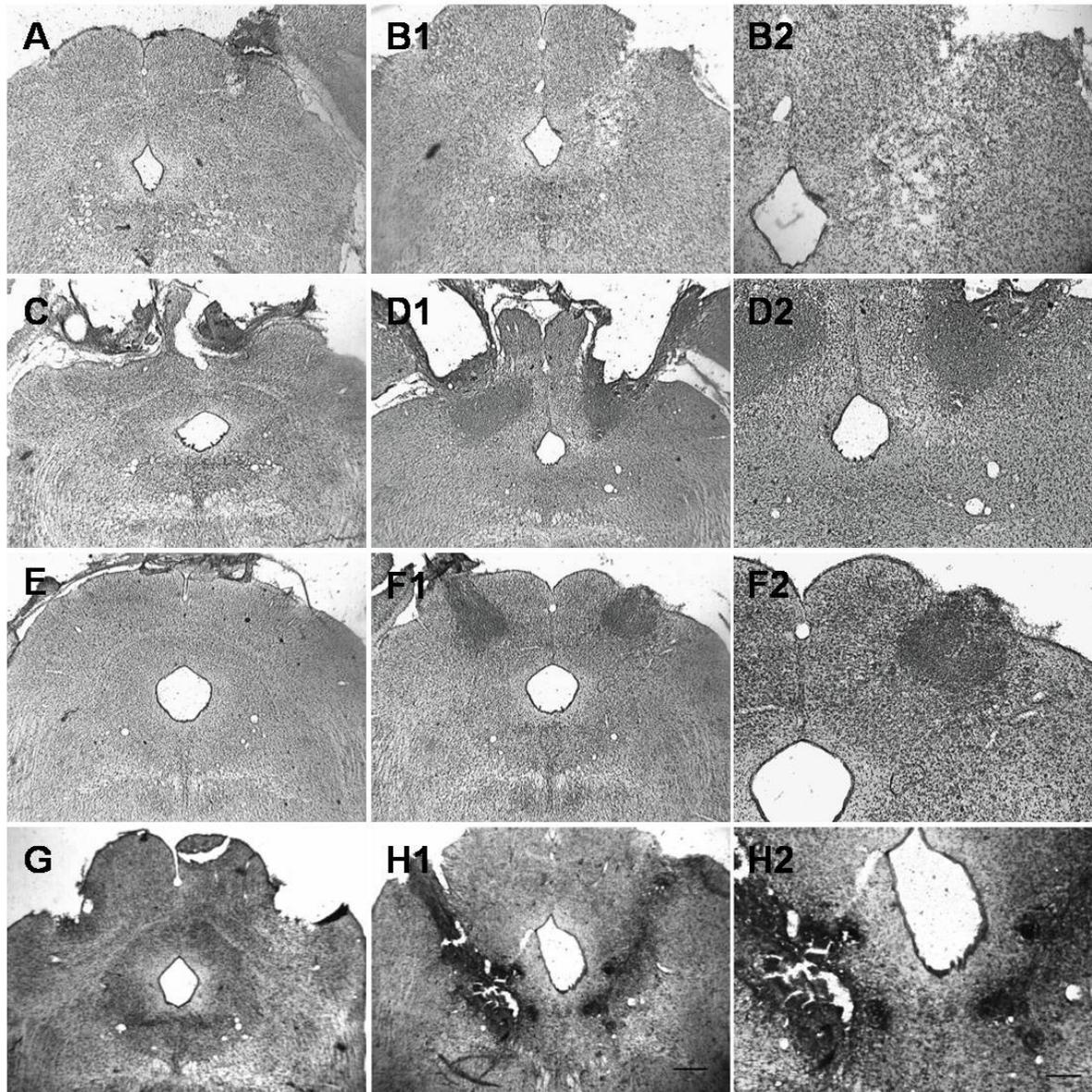


Figura 8 - Aparência da lesão com NMDA. Fotomicrografias de secções coronais coradas com cresil violeta (coloração de Nissl) ilustrando a extensão e a aparência de mesencéfalos que somente receberam implantação unilateral (A) ou bilateral (C) de cânulas-guia (grupos sham) e daqueles que também receberam injeção unilateral (B) ou bilateral (D) de NMDA (grupos lesão) na MCP dorsal. Também estão presentes fotomicrografias ilustrando os locais de implantação bilateral de cânulas-guia (grupo sham) nos colículos superiores e/ou inferiores (E) e MCP ventrolateral (G) e, também, de lesões bilaterais (grupo lesão) nos colículos superiores e/ou inferiores (F) e MCP ventrolateral (H). Nas áreas de lesão são observadas gliose e perda neuronal. Barra de escala = 400 μ m em A, B1, C, D1, E, F1, G e H1; 200 μ m em B2, D2, F2 e H2.

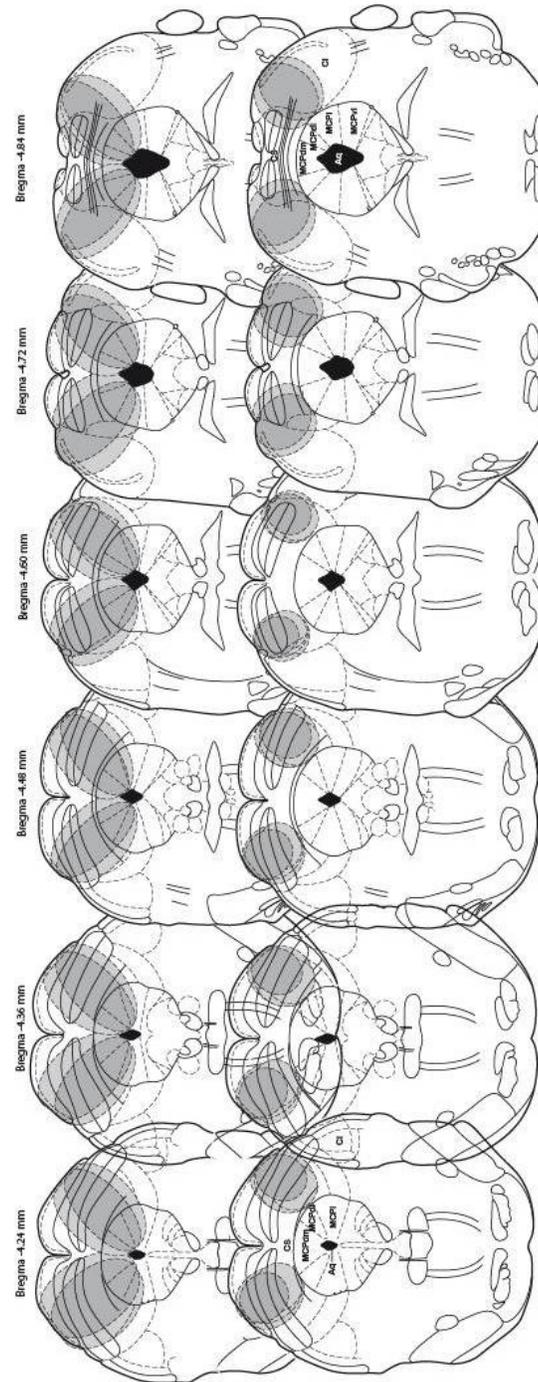


Figura 9 - Diagrama representativo das lesões unilateral ou bilateral da MCPd e bilateral dos colículos superiores e/ou inferiores. A distância aproximada da linha interaural está indicada no topo das figuras e foi retirado do atlas de Paxinos e Franklin (2001). Abreviações: Aq, aqueduto; MCPdm, MCPdl, MCPvl e MCPvl, respectivamente, matéria cinzenta periaquedutal dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral; CS, colículo superior; CI, colículo inferior.

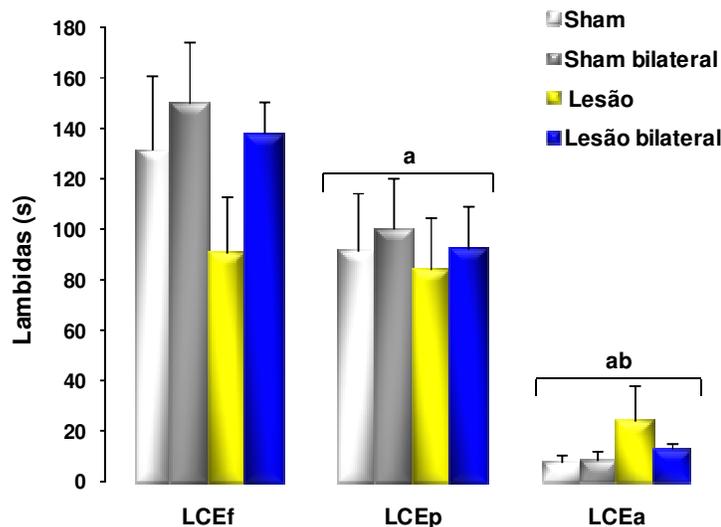


Figura 10 - Ausência de efeitos de lesão unilateral ou bilateral da MCPd sobre o tempo gasto lambendo a pata que recebeu formalina 2.5% registrados durante os 10 min. de exposição ao LCEf, LCEp ou LCEa; n = 8–18. ^{a,b} $P < 0,01$ versus os grupos LCEf e LCEp, respectivamente.

A **Tabela 2** mostra o total de entradas nos braços e o tempo gasto na plataforma central dos três tipos de LCE. No que diz respeito às entradas nos braços, a ANOVA bifatorial revelou efeitos significativos para o fator tipo de labirinto [$F(2,132) = 31,17$; $p < 0,0001$] mas não para o tipo de lesão [$F(3,132) = 1,91$; $p = 0,13$] e interação labirinto \times tipo de lesão [$F(6,132) = 1,10$; $p = 0,36$]. O teste de Duncan apontou que os camundongos expostos ao LCEa exibiram menos entradas nos braços que os grupos expostos ao LCEp e LCEf e, que animais expostos ao LCEp, também apresentaram uma menor total de entradas nos braços que os expostos ao LCEf. Quanto ao tempo gasto na plataforma central, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre o tipo de lesão para os três labirintos (LCEf: $H = 8,05$, $p = 0,05$; LCEp: $H = 7,93$, $p = 0,05$; LCEa: $H = 2,05$, $p = 0,56$). No entanto, o teste de Kruskal-Wallis apontou diferenças entre os três labirintos (Sham: $H = 13,78$, $p < 0,01$; Sham bilateral: $H = 9,81$, $p < 0,01$; Lesão: $H = 10,06$, $p < 0,01$; Lesão bilateral: $H = 10,84$, $p < 0,01$) e por isso, esta análise não paramétrica foi seguida pelo teste de Dunn. Entre os grupos Sham, verificou-se que animais expostos ao LCEp apresentaram maior tempo no centro quando comparados aos expostos ao LCEf e LCEa. Entre os grupos Sham bilateral, os animais expostos ao LCEp e LCEa apresentaram maior tempo no centro quando comparados aos expostos ao LCEf. Já

entre os grupos Lesão Unilateral, os animais expostos ao LCEp apresentaram maior tempo no centro quando comparados aos expostos ao LCEf. Finalmente, entre os grupos que sofreram Lesão bilateral, os animais expostos ao LCEp e LCEa ficaram maior tempo no centro quando comparados aos expostos ao LCEf.

A **Figura 11** aponta a ausência de efeitos de lesões unilaterais (lesão) e bilaterais (lesão bilateral) sobre alguns comportamentos exibidos durante os 5 min de exposição ao LCEp por camundongos que tinham recebido injeção prévia de formalina na pata traseira direita. A ANOVA unifatorial demonstrou que nem a lesão unilateral nem a bilateral alterou significativamente os índices de ansiedade [% entradas nos braços abertos (% EA: $F(3,36) = 0,63$; $p = 0,60$) e % tempo nos braços abertos (% TA: $F(3,36) = 1,48$; $p = 0,24$)] e atividade locomotora [entradas nos braços fechados: EF: $F(3,36) = 1,90$; $p = 0,15$].

Tabela 2 - Ausência de efeitos de lesão unilateral ou bilateral da MCP dorsal (MCPd) sobre o total de entradas nos braços e tempo gasto na plataforma central dos três tipos de LCE (n = 8–18).

	Entradas nos braços			Tempo no centro (s)		
	LCEf	LCEp	LCEa	LCEf	LCEp	LCEa
Sham	28,6 ± 2,3	17,7 ± 2,2 ^a	14,3 ± 2,3 ^{ab}	65,3 ± 2,8	120,3 ± 6,6 ^a	87,5 ± 13,5 ^b
Sham bilateral	21,8 ± 1,9	15,7 ± 1,1 ^a	13,0 ± 1,2 ^{ab}	65,5 ± 8,9	99,7 ± 8,9 ^a	110,6 ± 13,2 ^a
Lesão	21,5 ± 2,1	14,3 ± 2,0 ^a	15,0 ± 2,0 ^{ab}	73,2 ± 7,2	140,7 ± 12,7 ^a	110,4 ± 13,7
Lesão bilateral	23,8 ± 2,0	18,9 ± 2,2 ^a	12,9 ± 1,0 ^{ab}	48,2 ± 4,8	98,5 ± 14,0 ^a	99,3 ± 14,8 ^a

^{ab} $P < 0,05$ versus os grupos LCEf e LCEp, respectivamente.

A **Figura 12** ilustra os efeitos da lesão bilateral da MCPd (grupo lesão bilateral) sobre a % de entradas (% EA) e % tempo nos braços abertos (% TA) e entradas nos braços fechados (EF) em camundongos expostos ao LCEp mas não submetidos ao teste da formalina. Os resultados foram registrados durante os primeiros 5 min de exposição ao LCEp. O teste *t* de Student para medidas independentes revelou que a lesão bilateral da MCPd aumentou significativamente a % EA ($t(25) = -5,21$; $p < 0,001$) e % TA ($t(25) = -4,41$; $p < 0,001$) mas, de maneira importante, não alterou a atividade locomotora [CE: $t(25) = 0,63$; $p = 0,53$] quando comparado ao grupo sham bilateral.

A **Figura 13** ilustra os efeitos da lesão bilateral da MCPd (grupo lesão bilateral) sobre o tempo gasto lambendo a pata que recebeu injeção de formalina em camundongos submetidos à situação controle (caixa de vidro), ou seja, que não foram expostos a nenhum

dos LCE. Os resultados são referentes à primeira (0–5 min) e segunda (25–35min) fases do teste da formalina. O teste *t* de Student para amostras independentes demonstrou que a lesão bilateral da MCPd não produz qualquer alteração significativa no tempo gasto lambendo a pata [primeira fase (0–5 min): $t(25) = -0,06$; $p = 0,95$; segunda fase (25–35min): $t(25) = 0,59$; $p = 0,56$] quando comparado aos grupos sham bilateral.

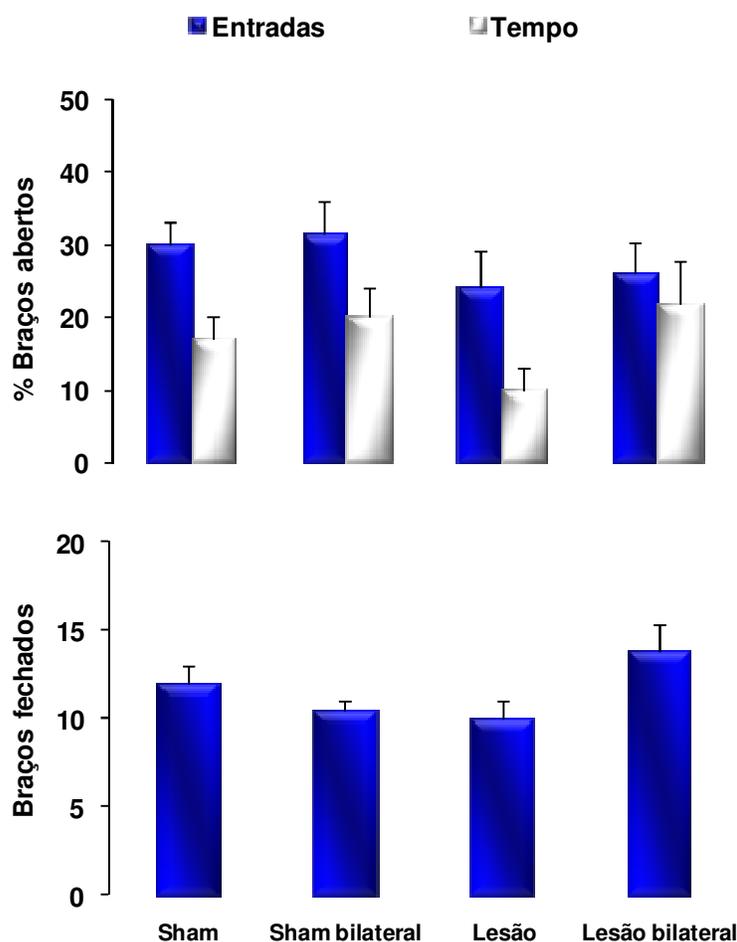


Figura 11 - Ausência de efeitos de lesão unilateral ou bilateral da MCPd sobre o comportamento de camundongos que receberam injeção de formalina na pata traseira direita e que foram expostos ao LCEp. Grupos sham unilateral (Sham), $n = 12$; Grupos sham bilateral, $n = 10$; Grupos lesão unilateral (lesão), $n = 9$; Grupos lesão bilateral, $n = 9$.

A **Figura 14** aponta a ausência de efeitos da lesão bilateral dos colículos superiores e/ou inferiores (grupo lesão bilateral) sobre a % EA, % TA e EF em camundongos expostos ao LCEp, mas não submetidos ao teste da formalina (ou seja, sem estimulação

nociceptiva concomitante). Os resultados foram registrados durante os primeiros 5 min de exposição ao LCEp. O teste *t* de Student para medidas não relacionadas revelou que a lesão bilateral dos colículos superiores e/ou inferiores não produziu qualquer mudança significativa no comportamento de camundongos expostos ao LCEp (% EA: $t(25) = -0,09$; $p = 0,93$; % TA: $t(25) = -0,21$; $p = 0,83$; EF: $t(25) = 0,93$; $p = 0,36$) quando comparado ao grupo sham bilateral.

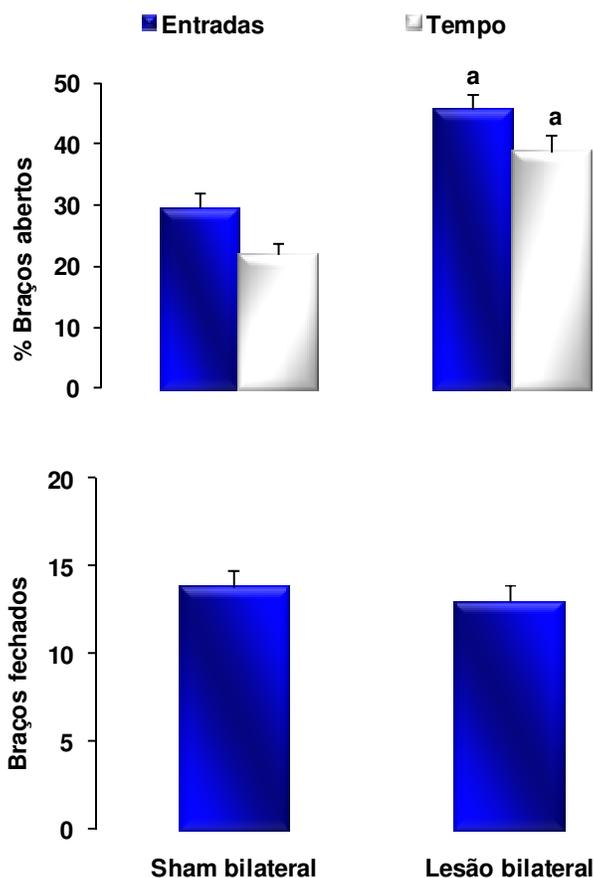


Figura 12 - Efeitos da lesão bilateral da MCPd sobre o comportamento de camundongos (que não receberam injeção de formalina 2,5%) expostos ao LCEp. Grupo sham bilateral, $n = 12$; Grupo lesão bilateral, $n = 15$. ^a $P < 0,001$ comparado ao grupo sham bilateral.

A **Figura 15** mostra os efeitos das lesões bilaterais irreversíveis (com 0,2 μ l de NMDA) ou fictícias (sham) da coluna ventrolateral da MCP sobre a resposta de lambe a pata tratada com formalina em camundongos durante as Fases 1 (0-5min) e 2 (25-35 min) do teste de nocicepção. A Fase 2 foi analisada durante a exposição aos LCE fechado (LCEf) ou aberto (LCEa) e os resultados referem-se aos **10 minutos totais** de exposição a

esses aparatos. Na fase 1, o teste *t* de Student para medidas não relacionadas revelou que a lesão bilateral da MCPvl não produziu qualquer mudança significativa na resposta nociceptiva de camundongos ($t_{50} = 0,43$; $p = 0,67$). Já na Fase 2, o teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou que os animais sham e lesão expostos ao LCEa apresentaram menor tempo de lambidas na pata quando comparados aos expostos ao LCEf (Sham: $U = 1$; $Z = 4,27$; $p < 0,001$; Lesão: $U = 39$; $Z = 2,26$; $p < 0,05$). Além disso, o teste de Mann-Whitney apontou diferenças significativas entre os animais sham e lesão expostos ao LCEf ($U = 55$; $Z = 2,18$; $p < 0,05$), mas não entre os expostos ao LCEa ($U = 58$; $Z = 0,49$; $p = 0,62$).

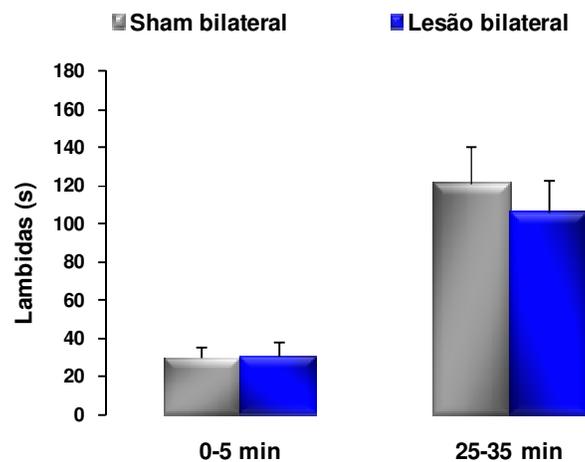


Figura 13 - Ausência de efeitos de lesão bilateral da MCPd sobre o tempo gasto lambendo a pata que recebeu injeção de formalina registrado durante a primeira (0–5 min) e segunda (25–35 min) fase do teste de nociceção em camundongos expostos à caixa de vidro. Grupo sham bilateral, $n = 12$; Grupo lesão bilateral, $n = 15$.

Na **Tabela 3** observa-se o total de entradas nos quatro braços e o tempo gasto na plataforma central dos diferentes labirintos (LCEf ou LCEa) exibidas por camundongos sham e lesados, previamente tratados com formalina na pata. Os resultados demonstrados correspondem aos *primeiros 5 minutos* de exposição ao labirinto. Quanto às entradas nos braços a ANOVA bifatorial revelou não haver diferenças significativas para a interação tipo de LCE x lesão ($F_{1,48} = 0,44$; $p = 0,51$), mas revelou efeitos do LCE ($F_{1,48} = 82,59$; $p \leq 0,01$) e do fator lesão ($F_{1,48} = 7,32$; $p < 0,001$). Comparações múltiplas entre os grupos revelaram que os animais expostos ao LCEa apresentaram uma menor frequência de entradas nos braços quando comparados aos grupos correspondentes expostos ao LCEf.

Além disso, os animais com a MCPvl lesada apresentaram um aumento do número de entradas nos braços, independente do tipo de LCE que foram expostos. Quanto ao tempo gasto na plataforma central, a o teste não paramétrico de Mann-Whitney demonstrou que os animais sham e lesão expostos ao LCEa apresentaram um maior tempo no centro quando comparados aos grupos correspondentes expostos ao LCEf (Sham: $U = 31$; $Z = -2,73$; $p \leq 0,01$; Lesão: $U = 36$; $Z = -2,41$; $p < 0,05$).

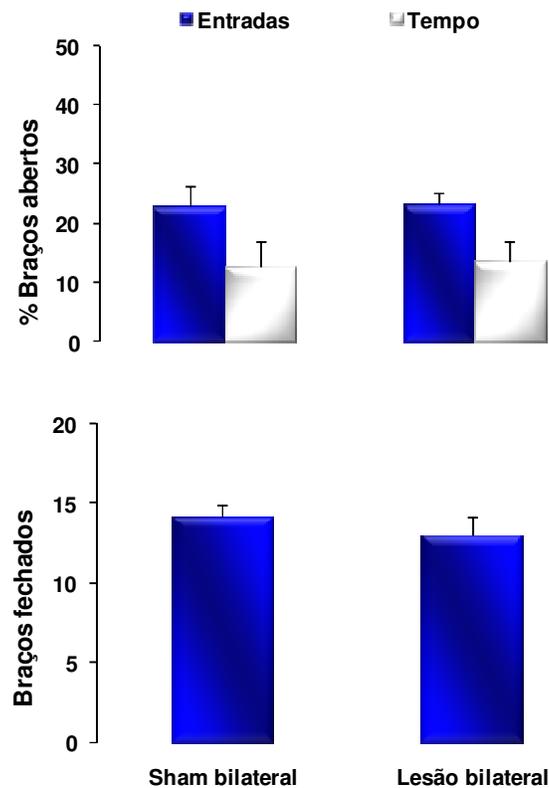


Figura 14 - Ausência de efeitos de lesão bilateral dos colículos superiores e/ou inferiores sobre o comportamento de camundongos (que não receberam injeção de formalina 2,5%) expostos ao LCEp. Grupo sham bilateral, $n = 18$; Grupo lesão bilateral, $n = 9$.

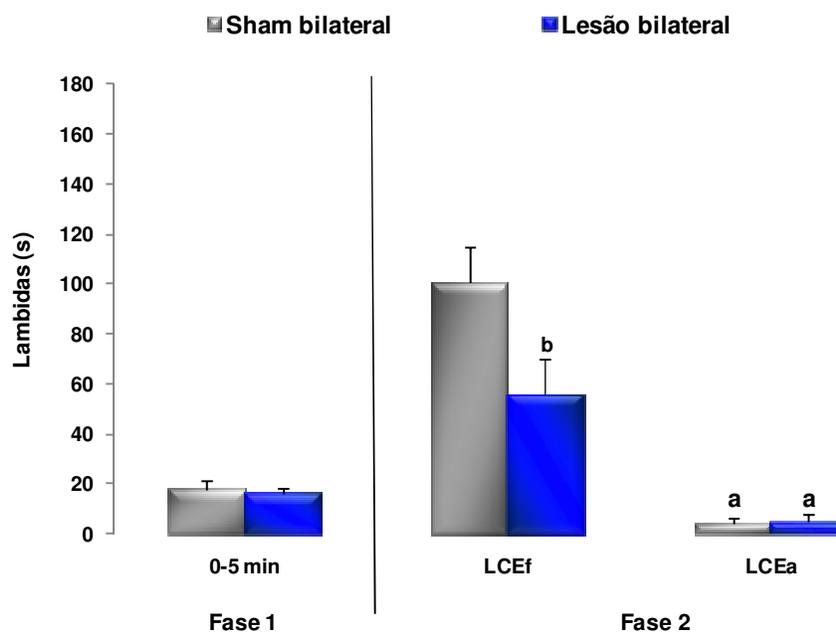


Figura 15 - Efeitos da lesão fictícia (Sham, n = 12-14) ou irreversível (com NMDA 0,2 μ l, n = 11-15) da coluna ventrolateral da MCP de camundongos sobre o tempo de lambidas (s) na pata tratada com formalina 2,5% durante a Fase 1 (0-5 min) ou Fase 2 (25-35 min) do teste de nocicepção. A Fase 2 foi observada durante a exposição aos labirintos fechado ou aberto (LCEf ou LCEa). ^{a,b} $P < 0,05$ comparado aos grupos LCEf e Sham, respectivamente.

Tabela 3 - Efeitos da lesão fictícia (Sham, n = 12-14) ou irreversível (com NMDA 0,2 μ l, n = 11-15) da coluna ventrolateral da MCP de camundongos sobre o total de entradas e o tempo de permanência na plataforma central dos labirintos fechado ou aberto (LCEf e LCEa).

	Entradas nos braços		Tempo no centro (s)	
	LCEf	LCEa	LCEf	LCEa
Sham bilateral	28,6 \pm 1,4	12,8 \pm 1,2 ^a	58,8 \pm 3,3	105,4 \pm 14,9 ^a
Lesão bilateral	31,9 \pm 1,9 ^b	18,3 \pm 1,7 ^{ab}	64,5 \pm 1,9	82,8 \pm 7,4 ^a

^{a,b} $P < 0,05$ comparado aos grupos LCEf e Sham, respectivamente.

A **Figura 16** ilustra a ausência de efeitos de lesão bilateral da MCPvl (grupo lesão bilateral) sobre a % de entradas (% EA) e % tempo nos braços abertos (% TA) e entradas nos braços fechados (EF) em camundongos expostos ao LCEp, mas não submetidos ao teste da formalina. Os resultados foram registrados durante os primeiros 5 min de exposição ao LCEp. O teste *t* de Student para medidas independentes revelou que a lesão bilateral da MCPd não alterou significativamente a % EA ($t(13) = 0,46$; $p = 0,65$), a % TA ($t(13) = 0,78$; $p = 0,45$) e a atividade locomotora [CE: $t(13) = -0,83$; $p = 0,42$] quando comparado ao grupo sham bilateral.

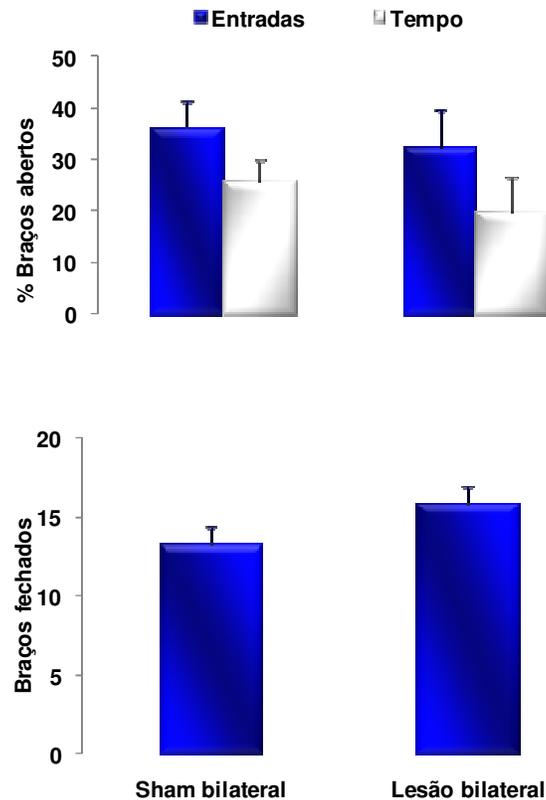


Figura 16 – Ausência de efeitos de lesão bilateral da MCPvl sobre o comportamento de camundongos (que não receberam injeção de formalina 2,5%) expostos ao LCEp. Grupo sham bilateral, n = 7; Grupo lesão bilateral, n = 8.

4.3.3. Discussão

Os principais resultados do presente estudo demonstram que embora o LCE padrão (LCEp) induza ansiedade (verificada pela esquivas dos braços abertos) não eliciu antinocicepção de elevada magnitude. Entretanto, quando camundongos foram expostos ao LCE aberto (LCEa) exibiram expressiva redução da resposta nociceptiva à injeção de formalina na pata, o que corroborou nossos estudos prévios com camundongos (MENDES GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005) e ratos (CORNÉLIO; NUNES-DE-SOUZA, 2009). As lesões uni e bilateral da MCPd bem como a lesão bilateral da MCPvl não alteraram a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa. A lesão bilateral da MCPd não alterou a resposta nociceptiva nem na fase 1, nem na 2 do teste da formalina em camundongos que permaneceram na situação controle (caixa de vidro). Curiosamente, a lesão da MCPvl reduziu a resposta nociceptiva de animais submetidos ao LCE fechado (LCEf) e aumentou a locomoção durante a exposição ao LCEf e LCEa. Além disso, a lesão bilateral da MCPd

produziu um efeito ansiolítico seletivo, mas somente quando os animais não foram concomitantemente submetidos ao teste de nocicepção.

As diferenças verificadas entre o LCEp e o LCEa (Fig. 10) na capacidade de produzir antinocicepção quando camundongos são submetidos ao teste da formalina corroboram, em parte, as obtidas em estudos realizados previamente em nosso laboratório (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005; MIGUEL, 2006). Isso porque, em nossos resultados anteriores observamos antinocicepção somente nos animais expostos ao LCEa. Já no presente estudo camundongos que foram ao LCEp também apresentaram uma pequena, porém significativa, redução da resposta nociceptiva. Vale ressaltar que dados da literatura demonstraram que o LCEp pode induzir uma antinocicepção de baixa intensidade em roedores submetidos ao teste de retirada da cauda (ALBRECHET-SOUZA et al., 2005; CONCEIÇÃO et al., 1992; LEE; RODGERS, 1990; 1991; RODGERS; LEE; SHEPHERD, 1992).

Nossos resultados também mostraram que a antinocicepção produzida pela exposição ao LCEp não é de elevada magnitude como a verificada em animais que foram ao LCEa. É provável que as distintas respostas nociceptivas observadas com os dois grupos – LCEp e LCEa – estejam relacionadas a diferenças nas intensidades do estímulo aversivo dos dois labirintos. Em outras palavras, apesar do LCEp ser interpretado como um ambiente aversivo e capaz de induzir ansiedade (os índices convencionais de ansiedade para os animais *sham* uni e bilateral foram respectivamente, de 30% e 32% para entradas e 17% e 20% para tempo gasto nos braços abertos, caracterizando a esquiva por este compartimento), os camundongos expostos a este aparato têm acesso aos braços fechados e, portanto, podem expressar dor (lambendo mais a pata nesse compartimento). Entretanto, o grupo exposto ao LCEa não apresenta a mesma oportunidade de escape, o que sugere que a antinocicepção provocada pela exposição ao LCEa seja devida a característica inescapável do teste. Nesse contexto, e em comum com outros modelos animais de ansiedade (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003; BOURIN; HASCOËT, 2003; FILE; SETH, 2003; MILLAN; BROCCO, 2003; PRUT; BELZUNG, 2003), o LCEp representa uma situação de conflito com características do tipo aproximação-esquiva (para maiores detalhes sobre esse conceito ver McNAUGHTON; CORR, 2004), em que camundongos têm a oportunidade de aproximar (possibilidade de comida, água, fêmea e até mesmo um lugar seguro) ou de evitar (ativa ou passivamente) um ambiente

potencialmente perigoso. Entretanto, no LCEa, o estado emocional parece ser um pouco diferente, uma vez que os animais apresentam antinocicepção e não podem se esquivar ou escapar do ambiente aversivo, isto é, os braços abertos.

A primeira etapa deste estudo mostrou que a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa não foi alterada pela lesão unilateral da MCPd. Tal ausência de efeitos das lesões nos levou a propor três hipóteses: (a) existiria um envolvimento da MCPd, mas lesões unilaterais não seriam suficientes para reverter uma resposta que envolveria a participação de ambas as porções dorsais, ou (b) não seria a porção dorsal da MCP a responsável por mediar esta reação defensiva, ou (c) a MCP não estaria envolvida na mediação deste tipo de antinocicepção. Os primeiros resultados do presente estudo eram insuficientes para que a terceira hipótese fosse rejeitada, porém parecia improvável que ela fosse verdadeira uma vez que evidências prévias indicam que a MCP está envolvida na mediação da antinocicepção induzida por diferentes situações aversivas (p.ex., FANSELOW, 1991; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006; HARRIS, 1996).

A MCP é longitudinalmente dividida em 4 colunas, cuja estimulação química ou elétrica produz antinocicepção (MORGAN, 1991; KEAY; BANDLER, 2001). Inúmeros estudos enfatizam que a porção dorsal da MCP tem um papel crucial na modulação de respostas a situações aversivas (p.ex., comportamentos defensivos, ativação autonômica) (BRANDÃO et al., 2003a; GRAEFF, 2004), e, em geral, essas reações são acompanhadas por antinocicepção (FANSELOW, 1991; HARRIS, 1996; SIEGFRIED; FRISCHKNECHT; NUNES-DE-SOUZA, 1990). Assim, a primeira hipótese deveria ser considerada: a MCPd poderia estar envolvida na mediação da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa, mas, como as lesões realizadas na primeira etapa desse estudo foram unilaterais, havia a possibilidade da função do lado não lesado ter “compensado” a inativação daquele que recebeu NMDA. Nesse sentido, tem sido demonstrado que quando o animal recebe um estímulo nociceptivo ocorre marcação bilateral de proteína FOS na MCP (BANDLER; SHIPLEY, 1994; KEAY; BANDLER, 2001 e 2002; PARRY et al. 2002). Além disso, Sukikara et al. (2006) demonstraram, em ratos, que a lesão bilateral da coluna lateral da MCP (MCPI) foi mais efetiva que a unilateral em produzir os resultados observados em seu estudo. Sucintamente, esses pesquisadores demonstraram que a lesão bilateral da MCPI inibiu a caça de insetos e restabeleceu o comportamento maternal, anteriormente alterados pelo tratamento com morfina. Tais efeitos mostraram-se de

pequena magnitude ou ausentes quando a lesão atingia somente um dos lados dessa estrutura mesencefálica.

Assim, visando-se elucidar se a MCP dorsal estaria envolvida na mediação da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa, o presente estudo investigou os efeitos da lesão bilateral da MCPd na modulação da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa. Os resultados demonstram que tal procedimento não reverteu essa reação defensiva verificada durante a exposição ao LCEa (Fig. 10). Desse modo, parece que a MCPd não participa da mediação desse processo. Além disso, nossos resultados também demonstram que a dor ocasionada pela injeção de formalina não é modulada pela MCPd. Isso porque a lesão bilateral dessa porção da MCP não provocou mudanças na resposta de lambe a pata (Fig. 13), nem na primeira, nem na segunda fase do teste nociceptivo, em animais que não foram expostos à situação ameaçadora (o LCEa). Nesse sentido, Haghparast e Ahmad-Molaei (2009) demonstraram que a lesão eletrolítica bilateral da MCP dorsolateral não altera a resposta nociceptiva de ratos submetidos ao teste da formalina.

A inesperada ausência de efeitos da lesão da MCPd sobre a nocicepção permanece não esclarecida. Dois tipos de neurônios do bulbo rostral ventromedial (no inglês: *RVM - rostral ventromedial medulla*), nomeados células *on* e *off*, parecem estar envolvidos na modulação nociceptiva (VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). O último exerce ação inibitória sobre a nocicepção, enquanto o primeiro uma modulação facilitatória. Entretanto, quando a MCPvl é estimulada, ambos os tipos de células respondem, o que indica que podem ser influenciadas por projeções descendentes da MCP que modulam a nocicepção (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006). Embora a MCP dorsolateral não envie projeções diretamente para o RVM, o faz do modo indireto ao bulbo medial e lateral através de sinapses com o núcleo cuneiforme (para uma revisão ver KEAY; BANDLER, 2001). Desse modo, é possível que tanto as células *on* quanto as *off* perderam seu controle sobre a nocicepção em animais com a MCPd lesada. Se assim, outras estruturas encefálicas [p.ex. amígdala, hipotálamo, córtex cingulado anterior (BROOKS; TRACEY, 2005) ou até mesmo, a MCPvl] poderiam assumir a modulação desse tipo de antinocicepção induzida pela exposição ao ambiente aversivo.

É importante destacar que diante de um evento aversivo a coluna da MCP que é ativada depende de alguns fatores, como por exemplo, se o animal tem a possibilidade de escape (BANDLER et al., 2000; KEAY; BANDLER, 2001), se o estímulo é condicionado

ou não (VIANNA; BRANDÃO, 2003) ou se o estresse é de origem psicológica ou física (KEAY; BANDLER, 2001). Por exemplo, foi demonstrado que a tanto a lesão da porção dorsal quanto da ventrolateral da MCP de ratos reverteu a antinocicepção induzida por estímulos aversivos condicionados (HELMSTETTER; TERSHNER, 1994). Entretanto, somente a lesão da MCPvl bloqueou a antinocicepção provocada pela exposição a estímulos aversivos incondicionados (BELLGOWAN; HELMSTETTER, 1996). Visto que a exposição ao LCEa representa uma situação aversiva incondicionada, fez-se importante também investigarmos o envolvimento da MCPvl nesse tipo de antinocicepção.

Vale ressaltar também que o próprio estímulo doloroso é aversivo e, portanto, deve ativar a MCP, principalmente nas porções lateral e ventrolateral. Na realidade, a coluna a ser ativada depende de uma série de fatores, como a natureza do estímulo nociceptivo, se o mesmo é controlável/escapável (KEAY; BANDLER, 2002), de intensidade profunda ou superficial (KEAY; BANDLER, 1993), bem como da parte do corpo em que é aplicado (LUMB et al., 2002; PARRY et al., 2002) e de quais fibras nervosas estão envolvidas em carrear o impulso doloroso gerado (LUMB, 2002, 2004). Por exemplo, foi demonstrado que em estimulações cutâneas profundas são ativadas principalmente fibras C e que a dor desencadeada é caracterizada como tônica/persistente/inescapável, pois não é interrompida quando cessa o estímulo que primeiramente a desencadeou. Além disso, a estimulação desse tipo de fibra nervosa parece levar indiretamente à ativação da coluna ventrolateral da MCP (LUMB et al., 2002; PARRY et al., 2002; RODELLA et al. 1998). Neste sentido, a injeção de formalina na pata provoca dor tônica/persistente/inescapável (ALBEFESSARD; GIAMBERARDINO; RAMPIM, 1990; BON et al., 2002; CODERRE et al. 1993, DENNIS; MELZACK, 1979; DUBUISSON; DENNIS, 1977; MAIONE et al., 2000; TJOLSEN et al., 1992), ativa principalmente fibras C (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; McCALL; TANNER; LEVINE, 1996) e, portanto, é possível que recrute a MCPvl. Neste contexto, estudos demonstraram que a injeção de formalina na pata de ratos leva a aumentos da marcação de proteína FOS nessa coluna da MCP (KEAY; BANDLER, 2002; LUMB et al., 2002; PARRY et al., 2002; RODELLA et al., 1998). Além disso, De Luca-Vinhas, Macedo e Brandão (2006) demonstraram que somente a fase tônica (fase 2) desse teste foi sensível aos efeitos antinociceptivos da estimulação da MCPvl.

Dessa forma, a segunda hipótese mostrava-se relevante, ou seja, não seria a porção dorsal da MCP a responsável por mediar esta reação defensiva. Isso porque, como tem sido

ênfatisado que a própria dor tônica recruta mecanismos antinociceptivos da MCPvl (KEAY; BANDLER, 2002; LUMB et al., 2002; PARRY et al., 2002; RODELLA et al., 1998), a lesão da MCPd não teria como alterar a expressão da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa. Por essa razão, foram investigados os efeitos da lesão bilateral da MCPvl e resultados inesperados foram verificados (Fig. 15). Enquanto não atenuou a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa, a lesão da MCPvl levou a diminuição da resposta nociceptiva de animais que foram expostos ao LCEf.

Conforme discutido acima, o RVM possui as células *on* e *off*, as quais exercem importantes funções, respectivamente, na modulação facilitatória e inibitória da dor (VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). Assim, faz-se relevante definir em quais circunstâncias o sistema descendente atua de modo a inibir ou facilitar a nocicepção. Nesse sentido, tem sido ênfatisado que, em condições normais (por ex., na ausência de estresse psicológico), a resposta à formalina é predominantemente facilitada pelo sistema descendente (VANEGAS; SCHAIBLE, 2004) e estudos demonstraram que testes que induzem dor tônica, como o teste da formalina, ativam a MCPvl (KEAY; BANDLER, 2002; LUMB et al., 2002; PARRY et al., 2002; RODELLA et al., 1998). Desta forma, se considerarmos que a ativação da MCPvl facilitaria o processo nociceptivo, por inibir as células *off* e/ou excitar as células *on* do RVM, a sua inativação, por exemplo provocado pela lesão com NMDA, poderia causar antinocicepção em camundongos expostos a um ambiente potencialmente não aversivo, tal como o LCEf.

A ausência de efeitos da lesão da MCPvl sobre a antinocicepção manifestada pela exposição ao LCEa sugere que esta estrutura mesencefálica não está envolvida na mediação desta reação de defesa. Vale destacar que foi demonstrado que a antinocicepção induzida pelo confinamento no braço aberto do LCEp (que é em essência uma situação semelhante à observada durante a exposição ao LCEa) foi completamente revertida pela injeção de midazolam na amídala de camundongos submetidos ao teste de contorções abnominais (BAPTISTA et al., 2009; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Assim, faz-se relevante investigar no futuro o papel de outras estruturas pertencentes ao sistema defensivo, p.ex. amídala, hipotálamo e córtex cingulado anterior (BROOKS; TRACEY, 2005), na modulação desse tipo de antinocicepção em animais submetidos ao teste da formalina.

Os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 confirmam mais uma vez que a exposição de camundongos a situações aversivas, como os LCEp e/ou LCEa, provoca diminuição da locomoção. Esse efeito é esperado devido às próprias características ameaçadoras desses labirintos, ou seja, porque apresentam braços abertos os animais tendem a se locomover menos que no LCEf que é constituído por quatro braços com paredes e que portanto, oferece mais proteção. Além disso, conforme é discutido em detalhes no item 4.1.3., essa diminuição da atividade locomotora poderia ocorrer no LCEp porque os animais gastam maior tempo no centro deste aparato, onde podem exibir avaliações de risco sem precisarem entrar nos braços abertos (FERNANDEZ ESPEJO, 1997; LEE; RODGERS, 1990; RODGERS; LEE; SHEPHERD, 1992). Também se observa que da mesma forma que a lesão da MCPd não alterou a resposta nociceptiva nos diferentes tipos de LCE, tampouco modificou a frequência de entradas nos braços desses aparatos. No entanto, a lesão bilateral da MCPvl provocou um aumento da locomoção tanto no LCEf quanto no LCEa.

Existem evidências sugestivas de que um dos papéis da MCPvl é promover um estado de quiescência/imobilidade para que o animal possa se recuperar de uma injúria sofrida (MORGAN; CARRIVE, 2001; MORGAN; WHITNEY; GOLD, 1998). Cerminara et al. (2009) mostraram, em ratos, que a transmissão no trato espino-olivo-cerebelar, que recebe informações de fibras A β e A δ das patas dianteiras e traseiras e as envia ao cerebelo, envolvido na coordenação motora (ITO, 1984), é reduzida pela ativação da MCPvl. Isto ressalta o papel dessa estrutura mesencefálica na modulação de impulsos ascendentes que se dirigem ao cerebelo. Nesse sentido, resultados demonstram que a inativação da MCPvl, pela injeção de midazolam, provoca aumento das entradas nos braços fechados do LCEp, sem afetar os índices convencionais de ansiedade (DE LUCA-VINHAS; MACEDO; BRANDÃO, 2006). Assim, o fato de o midazolam ter aumentado a locomoção pode ser o resultado de uma desinibição do sistema motor, com liberação do comportamento exploratório e perda da quiescência imposta (DE LUCA-VINHAS; MACEDO; BRANDÃO, 2006; MORGAN; CARRIVE, 2001). Embora não tenhamos verificado imobilidade nos animais sham expostos ao LCEf e submetidos ao teste da formalina, é possível que o aumento da locomoção conferido pela lesão da MCPvl seja também devido à liberação do sistema exploratório, que deveria estar mais controlado em virtude de o animal estar com nocicepção.

Finalmente, é importante destacar que o aumento da locomoção provocado pela lesão da MCPvl pode ter afetado a exibição da resposta nociceptiva durante a exposição LCEf, conforme apontado pelo teste estatístico de covariância (dados não demonstrados). Em outras palavras, a queda do tempo de lambidas na pata pode não ter sido um efeito direto da lesão da MCPvl, mas sim, uma consequência do aumento da atividade locomotora.

Quanto à análise do tempo gasto na plataforma central, a exposição ao LCEp provocou um aumento no tempo gasto neste compartimento (animais sham uni e bilateral gastaram respectivamente, 40% e 33% do tempo no centro do LCEp) (Tabela 2). Vale ressaltar que, de maneira geral, os animais expostos ao LCEa também gastaram mais tempo no centro que os que estiveram no LCEf (Tabelas 2 e 3). A preferência por esse compartimento pode estar relacionada ao fato de que é nesse local que ocorre a intersecção dos 4 braços do LCE e, portanto, acaba por ser o que oferece um pouco mais de segurança ao animal. Além disso, verificou-se que a lesão unilateral ou bilateral da MCPd ou bilateral da MCPvl não alterou o tempo em que os animais ficaram na plataforma central dos diferentes tipos de LCE.

No que diz respeito à participação da MCPd na mediação da ansiedade induzida pela exposição ao LCEp, nossos resultados demonstraram que a lesão bilateral dessa porção da MCP aumentou a porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos. É importante notar que esse efeito ansiolítico foi seletivo, ou seja, não houve alteração da locomoção, verificada pela frequência de entradas nos braços fechados (FILE, 1992; RODGERS; JOHNSON, 1995). Entretanto, o efeito ansiolítico conferido pela lesão da MCPd não foi observado quando os animais tinham previamente recebido injeção de formalina na pata. Em outras palavras, a estimulação nociceptiva concomitante prejudicou o efeito ansiolítico provocado pela lesão bilateral da MCPd.

Nesse sentido, já havíamos demonstrado que a injeção do benzodiazepínico midazolam (MDZ) na MCP atenuou a ansiedade no LCEp, porém, somente em animais que não receberam tratamento concomitante de formalina na pata. Sob ação da formalina, nenhum dos comportamentos analisados foi alterado pela injeção intra-MCP de MDZ (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005). Corroborando nossos resultados, Fernández-Guasti et al. (2005) demonstraram que níveis baixos e moderados de nocicepção, produzidos, respectivamente, pela injeção intra-articular de ácido úrico 3,75%

e 7,5%, prejudicaram o efeito ansiolítico do diazepam (1 mg/kg) no LCE. Os autores sugeriram que o efeito ansiolítico desse benzodiazepínico deve ter sido abolido por citocinas, prostaglandinas e fator necrose tumoral (TNF), produzidos durante o processo inflamatório. Nesse contexto, Song et al., (2003) já haviam relatado que a administração da citocina, interleucina-1 beta, produz efeito ansiogênico em ratos expostos ao LCE e ao campo aberto e aumenta a concentração plasmática de prostaglandina E2 e corticosterona.

Vale destacar também que a dor tem um componente afetivo negativo que parece estar relacionado à ansiedade e à depressão (GALLAGHER; VERMA, 2004). Assim, apesar de Hasnie et al. (2007) e Kontinen et al. (1999) verificarem que dor neuropática (por ex., induzida pela ligadura parcial do nervo ciático de camundongos e ligadura de nervo espinal de ratos) não altera o comportamento no LCE, Ji et al. (2007) e Narita et al. (2006) demonstraram que ratos com artrite (induzida pela injeção intra-articular de caolin/carragenina no joelho) e camundongos com dor inflamatória persistente apresentaram aumentos dos índices de ansiedade no LCE.

Assim, no presente estudo poder-se-ia sugerir que a injeção de formalina induziu a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal levando a uma aumento dos níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona (TAYLOR et al., 1998), o que acarretou em aumento da ansiedade (STEIMER; DRISCOLL, 2003) e influenciou a exploração dos braços abertos. De fato, os resultados descritos no item 4.1. demonstram que a injeção de formalina provoca um aumento da liberação de corticosterona plasmática (Fig. 4). No entanto, conforme pode ser verificado nas Figuras 6, 11 e 12, animais submetidos ou não ao teste de nocicepção apresentam um perfil de exploração similar, o que sugere que a dor *per se* não afeta significativamente nem medidas convencionais de ansiedade (% entradas e de tempo nos braços abertos) nem a atividade locomotora (entradas nos braços fechados) no LCEp. Dessa maneira, a análise das Figuras 6, 11 e 12 também fortalece que o prejuízo provocado pela nocicepção no efeito ansiolítico produzido pela lesão da MCPd independe da atividade locomotora no LCEp.

O fato dos parâmetros de ansiedade não terem sido alterados não exclui a ativação de outras estruturas encefálicas enquanto os animais estão sob estimulação nociceptiva concomitante. Estudos anteriores mostraram que a dor pode ativar a coluna ventrolateral da MCP e outras estruturas do sistema encefálico aversivo, tais como, o hipotálamo anterior (LUMB, 2004) e a amígdala (CARRASQUILLO; GEREAU, 2007; JI et al., 2007;

NEUGEBAUER et al., 2004; TANIMOTO et al., 2003). Em outras palavras, o estímulo de dor deve ativar outras estruturas encefálicas que mantêm a esquiva aos braços abertos mesmo quando os animais estão com a MCPd lesada. Isso deve permitir ao animal gastar mais tempo em um lugar seguro até que tenha se recuperado da injúria. Embora atrativa, essa hipótese ainda necessita ser testada.

Vale ressaltar que em todos os experimentos do presente estudo, que envolveram injeção de NMDA na MCPd, as lesões não ficaram circunscritas à esta porção. A exemplo do que foi relatado no estudo realizado por Dielenberg, Leman e Carrive (2004), a implantação de cânulas e/ou espraçamento de NMDA provocaram lesões em estruturas situadas dorsolateralmente à MCP. Esse fato foi verificado inclusive nos animais sham, que também receberam a implantação de cânulas. Assim, verificou-se a ocorrência de lesão dos colículos superiores e/ou inferiores (localizados na porção dorsal do mesencéfalo ou teto mesencefálico). Uma vez que existem evidências sugestivas envolvendo a participação dos colículos superiores e inferiores na modulação de reações defensivas (BRANDÃO et al., 1999, 2003a, 2003b; REDGRAVE et al., 1981), tornou-se relevante uma avaliação mais cautelosa dos resultados obtidos.

A literatura está repleta de evidências que demonstram que um aumento gradual da intensidade de estimulação elétrica da MCPd, camadas profundas dos colículos superiores (CS) e colículos inferiores (CI) produz, de maneira progressiva, comportamento defensivo, caracterizado por alerta, congelamento e escape, acompanhados por reações autonômicas (BRANDÃO; COIMBRA; LEÃO-BORGES, 1990; BRANDÃO et al., 1988; CARDOSO et al., 1992; COIMBRA; BRANDÃO, 1993, 1997; COIMBRA et al., 1996, 2000; COIMBRA, LEÃO-BORGES; BRANDÃO, 1989; EICHENBERGER et al., 2002; MELO; BRANDÃO, 1995). Efeitos semelhantes foram observados após a injeção de NMDA nessas estruturas (BANDLER, 1982; BANDLER; DEPAULIS; VERNES, 1985; CARDOSO; COIMBRA; BRANDÃO, 1994; DEAN; MITCHELL; REDGRAVE, 1988; KRIEGER; GRAEFF, 1985). Foi proposto que as respostas observadas devem-se à natureza aversiva do estímulo, visto que os animais prontamente aprendem diferentes tipos de comportamentos operantes para cessarem a estimulação elétrica dessas estruturas do teto mesencefálico (BRANDÃO; AGUIAR; GRAEFF, 1982; BRANDÃO et al., 1997; MELO; CARDOSO; BRANDÃO, 1992).

Desse modo, os colículos superiores e inferiores foram integrados ao sistema cerebral aversivo (SCA) (BRANDÃO et al., 1988, 1994, 1999, 2003a; REDGRAVE et al., 1981), que inclui o hipotálamo medial, amígdala e matéria cinzenta periaquedutal dorsal (GRAEFF, 1981, 1990). Estudos de expressão do gene c-fos ou marcação da proteína Fos fortalecem a teoria de que essas cinco estruturas constituem o SCA, uma vez que essas áreas são marcadas após a estimulação química ou elétrica da MCPd ou após os animais serem expostos a ambientes aversivos (SANDKÜLER, 1991; SANDNER et al., 1992; SILVEIRA et al., 2001; SILVEIRA; SANDNER; GRAEFF, 1993). Além disso, Brandão et al. (1999), baseando-se em uma série de evidências da literatura (BANDLER; SHIPLEY, 1994; HERRERA; SANCHES DEL CAMPO; SMITH AGREDA, 1988; MAISONNETTE et al., 1996; MEININGER; POL; DERER, 1986) propuseram a existência de conexões anatômicas e funcionais recíprocas entre essas estruturas.

O colículo inferior é uma plataforma importante de vias auditivas, de modo que parece atuar no processamento de informações acústicas de natureza aversiva (BRANDÃO et al. 1999). Assim, tem sido proposto que os neurônios do colículo inferior agem como filtros para sons que requerem ação imediata, tais como certos sons emitidos pela presa, predador ou co-específicos (BRANDÃO et al., 2003a; CASSEDAY; COVEY, 1996). Já o colículo superior processa informações visuais e parece atuar no controle de movimentos orientados dos olhos e cabeça, bem como na mediação de comportamentos defensivos e mudanças cardiovasculares que seriam apropriadas em uma emergência, como a presença de um predador ou um objeto em curso de colisão (BRANDÃO et al., 2003a; DEAN; REDGRAVE; WESTBY, 1989). Além disso, a estimulação elétrica dos colículos inferiores e superiores produz, respectivamente, a sensibilização de ratos aos estímulos aversivos inerentes do LCE (reduzindo as entradas e tempo gasto nos braços abertos) (PANDOSSIO; MOLINA; BRANDÃO, 2000) e aumenta a latência de esquiva inibitória no labirinto em T elevado (ALMEIDA et al., 2006).

Uma vez que todas essas evidências confirmam a participação dos colículos superiores e/ou inferiores no SCA, é possível que a diminuição dos índices de ansiedade no LCEp, atribuído à lesão da MCPd, tenha sido também decorrente da lesão dessas estruturas do mesencéfalo dorsal. Nesse sentido, Blanchard et al. (1981) realizaram um estudo que visava demonstrar que lesão eletrolítica da MCP diminuía reações defensivas desencadeadas por estímulos aversivos (nociceptivos ou não). No entanto, as lesões não

foram circunscritas à MCP, uma vez que atingiram também os colículos superiores. Para confirmar que os resultados observados deviam-se à lesão da MCP, esses autores realizaram experimentos em que ratos tiveram os colículos superiores lesados e verificaram que embora lesões nessa estrutura alterassem alguns comportamentos guiados pela visão (como fuga induzida à distância), não modificaram outras medidas relacionadas ao comportamento defensivo. Assim, para a confirmação de que a redução dos índices de ansiedade (Fig. 12) devem-se exclusivamente à lesão bilateral da MCPd, fez-se necessária a realização de um experimento em que camundongos tiveram os colículos inferiores e superiores lesados. Nesse experimento os animais foram expostos ao LCEp (para avaliação dos índices de ansiedade), mas não foram submetidos ao teste nociceptivo (teste da formalina). Verificou-se que as lesões (Fig. 14) não alteraram quaisquer comportamentos registrados. Em outras palavras pode-se sugerir que os comportamentos que denotam ansiedade (p.ex. esquiva dos braços abertos) no LCEp, parecem não envolver em sua mediação a participação de mecanismos pertencentes aos colículos superiores e/ou inferiores, mas provavelmente dependem da ativação da MCPd em camundongos.

Diferentemente do que foi verificado com a lesão da MCPd, a lesão da MCPvl não alterou os índices de ansiedade no LCEp em animais não submetidos a estimulação nociceptiva (Fig. 16). Esse resultado era esperado uma vez que estudos demonstram que enquanto a MCPd parece estar envolvida em integrar respostas ativas a estímulos incondicionados, a MCPvl participa da expressão de congelamento condicionado (VIANNA; LANDEIRA-FERNANDEZ; BRANDÃO, 2001). Além disso, De Luca-Vinhas; Macedo; Brandão (2006) demonstraram que a injeção do benzodiazepínico midazolam na MCPvl de ratos aumentou o comportamento exploratório (o que não foi verificado em nossos resultados), mas não alterou a esquiva dos braços abertos do LCEp. Esses autores levantam hipóteses de que a MCPvl mediará apenas alguns comportamentos de medo, como o congelamento, e alguns tipos de antinocicepção controladas pela amígdala (CARRIVE; LEE; SU, 2000; FANSELOW et al., 1994; HELMSTETTER et al., 1998; LEDOUX; FARB; RUGGIERO, 1990; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA; PRADO, 2001), mas que o estímulo aversivo inerente ao LCE parece não ativar essa porção da MCP. Em vez disso, o circuito responsável pela produção de respostas incondicionadas, como a esquiva aos braços abertos do LCE, parece de fato ser o sistema encefálico aversivo, composto pela MCP dorsal, o hipotálamo medial e a amígdala (BRANDÃO et al., 1994 e 1999).

“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano. Mas sem ele, o oceano seria menor”

Madre Teresa de Calcutá

5. CONCLUSÕES

- A exposição ao LCEf (situação controle) aumenta a liberação de corticosterona e, níveis plasmáticos superiores deste corticosteróide são verificados quando camundongos são expostos às situações mais aversivas, como o LCEp e LCEa. Curiosamente, a injeção de formalina não alterou o perfil plasmático de corticosterona observado em animais expostos ao LCEp e LCEa, talvez porque a liberação desse glicocorticóide tenha atingido um “teto”. Tais resultados sugerem não ser a corticosterona a responsável pela modulação da antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa ou pelo prejuízo do efeito ansiolítico induzido pela lesão da MCPd em animais submetidos ao teste da formalina.
- A resposta antinociceptiva gerada pela exposição ao LCEa se mantém aproximadamente por 20 min. Todavia, se após 10 min de exposição ao LCEa, os animais retornam à situação controle (caixa de vidro), imediatamente expressam a resposta de dor semelhante àqueles somente expostos ao ambiente não aversivo. Portanto, tais resultados sugerem que a duração dessa resposta depende da presença do estímulo ameaçador. Em outras palavras, esse tipo de antinocicepção é de curta duração quando o animal é retirado do ambiente aversivo, porém perdura (por até 20 min) se o animal é mantido na condição ameaçadora (LCEa).
- Embora o LCEp induza ansiedade (esquiva dos braços abertos), não elicia antinocicepção de elevada magnitude, como a verificada durante a exposição ao LCEa. Lesões unilaterais e bilaterais da MCP dorsal (MCPd) não alteraram a antinocicepção verificada no LCEa, o que sugere que essa porção da MCP não participa da mediação dessa resposta.
- A lesão bilateral da MCPd não altera a resposta nociceptiva tanto na primeira como na segunda fase do teste da formalina, sugerindo que a porção dorsal da MCP não participa da mediação da resposta nociceptiva a esse teste.
- A lesão bilateral da MCPd atenuou seletivamente os índices de ansiedade em animais expostos ao LCEp, um efeito que foi prejudicado pela estimulação sensorial nociceptiva (injeção de formalina).

- A lesão bilateral dos colículos inferiores e/ou superiores não produziu alterações nos índices de ansiedade no LCEp, indicando ser o efeito ansiolítico dependente das lesões bilaterais na MCPd.
- A lesão bilateral da MCP ventrolateral (MCPvl) não reverteu a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa, porém reduziu a resposta nociceptiva durante a exposição ao LCEf, sugerindo um possível papel dessa porção da MCP na mediação da resposta nociceptiva verificada na Fase 2 (fase tônica) do teste da formalina.
- A lesão da MCPvl aumentou a locomoção durante a exposição ao LCEf e LCEa. Isto sugere um papel da MCPvl no controle motor em situações em que o animal está sujeito à estimulação nociceptiva tônica.
- A queda da resposta nociceptiva observada em animais que sofreram lesão da MCPvl e que foram expostos ao LCEf pode ter ocorrido devido a aumento da atividade locomotora, conforme apontado pelo teste estatístico de covariância.
- A lesão bilateral da MCPvl não alterou os índices de ansiedade e a atividade locomotora de animais não submetidos ao teste de nocicepção e expostos ao LCEp. Esta ausência de efeitos indica que a MCPvl, diferentemente da MCPd, não participa da mediação da ansiedade induzida pela exposição ao LCEp em camundongos.

“Toda forma de saber nasce de um não saber”

De Fábio de Melo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁶

⁶ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

AKIL, H.A.; MORANO, M.I. Stress. In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. (Ed.). **Psychopharmacology: The fourth generation of progress**. New York: Raven Press, 1995. p. 773-785.

ALBE-FESSARD, D.; GIAMBERARDINO, M.A.; RAMPIM, O. Comparison of different animal models of chronic pain. **Advances in Pain Research and Therapy**, New York, v. 13, p. 11-25, 1990.

ALBRECHET-SOUZA, L.; OLIVEIRA, A.R.; DE LUCA, M.C.; TOMAZINI, F.M.; SANTOS, N.R.; BRANDÃO, M.L. A comparative study with two types of elevated plus-maze (transparent vs. opaque walls) on the anxiolytic effects of midazolam, one-trial tolerance and fear-induced analgesia. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 571-579, 2005.

ALMEIDA, L.P.; RAMOS, P.L.; PANDOSSIO, J.E.; LANDEIRA-FERNADEZ, J.; ZANGROSSI JR, H.; NOGUEIRA, R.L. Prior electrical stimulation of dorsal periaqueductal grey or deep layers of the superior colliculus sensitizes rats to anxiety-like behaviors in the elevated T-maze test. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 170, n. 2, p. 175-181, 2006.

AMARAL, V.C.S.; GOMES, K.S.; NUNES-DE-SOUZA, RL. Increased corticosterone levels in mice subjected to the rat exposure test. **Hormones and Behavior**, San Diego, 2009. In press. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.09.018.

ANDREATINI, R.; LEITE, J.R. The effect of corticosterone in rats submitted to the elevated plus-maze and pentylenetetrazol-induced convulsions. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1333-1347, 1994.

AVANZI DE LIMA, V. **O núcleo mediano da rafe no medo condicionado: aspectos comportamentais, autonômicos e motores**. 2002. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59134/tde-30032003-114936/>

BANDLER, R. Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 30, n. 2, p. 183-188, 1982.

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

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Emerging principles of organization in the midbrain periaqueductal gray. In DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, 1991. p. 1-8.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; ZHANG, S.P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, v. 87, p. 269-305, 1991.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, 1991. p. 175-198.

BANDLER, R.; DEPAULIS, A.; VERNES, M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behaviour in the rat by microinjections of excitatory amino acids. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 107-109, 1985.

BANDLER, R.; KEAY, K.A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, v. 107, p. 285-300, 1996.

BANDLER, R.; KEAY, K.A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Research Bulletin**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 95-104, 2000.

BANDLER, R.; PRICE, J.L.; KEAY, K.A. Brain mediation of active and passive emotional coping. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, v. 122, p. 333-349, 2000.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. Columnar organization in midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neurosciences**, New York, v. 17, n. 9, p. 379-389, 1994.

BAPTISTA, D.; BUSSADORI, K.; NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Blockade of fear-induced antinociception with intra-amygdala infusion of midazolam: influence of prior test experience. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1294, p. 29-37, 2009.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control system: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, [S.l.], v. 7, p. 309-338, 1984.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 46, n. 6, p. 575-605, 1995.

BELGOWAN, P.S.; HELMSTETTER, F.J. Neural systems for the expression of hypoalgesia during nonassociative fear. **Behavioral Neuroscience**, Washington DC, v. 110, n. 4, p. 727-736, 1996.

BERNARD, J.F.; BANDLER, R. Parallel circuits for emotional coping behaviour: new pieces in the puzzle. **The Journal of Comparative Neurology**, New York, v. 401, n. 4, p. 429-436, 1998.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 205-218, 2001.

BLANCHARD, D.C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R.J. The mouse defense test battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 97-116, 2003.

- BLANCHARD, D.C.; YUDKO, E.B.; RODGERS, R.J.; BLANCHARD, R.J. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 155-165, 1993.
- BLANCHARD, D.C.; WILLIAMS, G.; LEE, M.C.; BLANCHARD, R.J. Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. **Physiological Psychology**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 157-163, 1981.
- BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, Amsterdam, v. 3, p. 291-322, 1980.
- BON, K.; WILSON, S.G.; MOGIL, J.S.; ROBERTS, W.J. Genetic evidence for the correlation of deep dorsal horn Fos protein immunoreactivity with tonic formalin pain behavior. **The Journal of Pain**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 181-189, 2002.
- BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 455-465, 2003.
- BRANDÃO, M.L. Mecanismos básicos e aspectos motivacionais da dor. In: BRANDÃO, M.L. (Ed.). **As bases biológicas do comportamento: introdução à neurociência**. São Paulo: Editora Pedagógica Universitária (EPU), 2004. p. 141-157.
- BRANDÃO, M.L.; AGUIAR, J.C.; GRAEFF, F.G. GABA mediation of the antiaversive action of the minor tranquilizers. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 397-402, 1982.
- BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDOSSIO, J.E.; DE ARAUJO, J.E.; CASTILHO, VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 863-875, 1999.
- BRANDÃO, M.L.; CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N.C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 339-346, 1994.
- BRANDÃO, M.L.; COIMBRA, N.C.; LEÃO-BORGES, P.C. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 495-499, 1990.
- BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C.; LEÃO-BORGES, P.C.; COIMBRA, N.C.; BAGRI, A. Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. **Physiology and Behaviour**, New York, v. 44, n. 3, p. 361-365, 1988.
- BRANDÃO, M.L.; TRONCOSO, A.C.; DE SOUZA SILVA, M.A.; HUSTON, J.P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 225-233, 2003a.
- BRANDÃO, M.L.; TRONCOSO, A.C.; MELO, L.L.; SANDNER, G. Active avoidance learning using brain stimulation applied to the inferior colliculus as negative reinforcement

in rats: evidence for latent inhibition. **Neuropsychobiology**, Basel, v. 35, n. 1, p. 30-35, 1997.

BRANDÃO, M.L.; VIANNA, D.M.; MASSON, S.; SANTOS, J. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 36-41, 2003b.

BROOKS, J.; TRACEY, I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. **Journal of Anatomy**, Oxford, v. 207, n. 1, p. 19-33, 2005.

BURES, J.; HUSTON, J.P. Physiological Psychology Research. In: BURES, J.; BURESOVÁ, O.; HUSTON, J. (Ed.). **Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior**. 2nd. ed. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 1-76.

CALVO, N.; MARTIJENA, I.D.; MOLINA, V.A.; VOLOSIN, M. Metyrapone pretreatment prevents the behavioral and neurochemical sequelae induced by stress. **Brain Research**, Amsterdam, v. 800, n. 2, p. 227-235, 1998.

CANTERAS, N.S. Análise crítica dos sistemas neurais envolvidos nas respostas de medo inato. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 21-24, 2003.

CARDOSO, S.H.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 63, n. 1, p. 17-24, 1994.

CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Opposite effects of low and high doses of morphine on neuronal substrates of aversion in the inferior colliculus. **Behavioral Pharmacology**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 489-495, 1992.

CARRASQUILLO, Y.; GEREAU, R.W. Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. **The Journal of Neuroscience**, Washington DC, v. 27, n. 7, p. 1543-1551, 2007.

CARRIVE, P. Functional organization of PAG neurons controlling regional vascular beds. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, 1991. p. 67-100.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behaviour: functional representation and neuronal organization. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 58, n. 1-2, p. 27-47, 1993.

CARRIVE, P.; LEE, J.; SU, A. Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray. **Neuroscience**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 1071-1080, 2000.

CASSEDAY, J.H.; COVEY, E. A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. **Brain, Behavior and Evolution**, Basel, v. 47, n. 6, p. 311-336, 1996.

CERMINARA, N.L.; KOUTSIKOU, S.; LUMB, B.M.; APPS, R. The periaqueductal grey modulates sensory input to the cerebellum: a role in coping behaviour? **The European Journal of Neuroscience**, Paris, v. 29, n. 11, p. 2197-2206, 2009.

CERVERO, F. Fine afferent fibres from viscera and visceral pain: anatomy and physiology of viscerosomatic convergence. In: SCHMIDT, R.F.; SCHIABLE, H.G.; VAHLE-HINZ, C. (Ed.). **Fine afferent nerve fibres and pain**. Weinham: VCH; 1987. p. 321-331.

CERVERO, F. Neurobiología del dolor. **Revista de Neurologia**, Barcelona, v. 30, n. 6, p. 551-555, 2000.

CODERRE, T.J.; FUNDYTUS, M.E.; MCKENNA, J.E.; DALAL, S.; MELZACK, R. The formalin test: a validation of the weighted scores method of behavioural pain rating. **Pain**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 43-50, 1993.

COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 59, n. 1-2, p. 131-139, 1993.

COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 97-103, 1997.

COIMBRA, N.C.; EICHENBERGER, G.C.D.; GORCHINSKI, R.T.; MAISONNETTE, S. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Brain Research**, Amsterdam, v. 736, n. 1-2, p. 348-352, 1996.

COIMBRA, N.C.; LEÃO-BORGES, P.C.; BRANDÃO, M.L. GABAergic fibers from substantia nigra, pars reticulata modulate escape behavior induced by midbrain central gray stimulation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 1, p. 111-114, 1989.

COIMBRA, N.C.; OSAKI, M.Y.; EICHENBERGER, G.C.D.; CISCATO JR, J.G.; JUCÁ, C.E.B.; BIOJONE, C.R. Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). **Psychopharmacology**, Berlin, v. 152, n. 4, p. 422-430, 2000.

CONCEIÇÃO, I.M.; MAIOLINI JUNIOR, M.; MATTIA, N.; VITAL, M.A.; SANTOS, B.R.; SMAILI, S.; FRUSSA-FILHO, R. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 8, p. 831-834, 1992.

CORNÉLIO, A.M.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition? **Physiology and Behaviour**, New York, v. 96, n. 3, p. 440-447, 2009.

DEACON, R.M.; CROUCHER, A.; RAWLINS, J.N.P. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 132, n. 2, p. 203-213, 2002.

DEACON, R.M.; PENNY, C.; RAWLINS, J.N.P. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 139, n. 1-2, p. 139-155, 2003.

DEAN, P.; MITCHELL, I.J.; REDGRAVE, P. Responses resembling defensive behavior produced by microinjections of glutamate into superior colliculus of rats. **Neuroscience**, Oxford, v. 24, n. 2, p. 501-510, 1988.

DEAN, P.; REDGRAVE, P.; WESTBY, M. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. **Trends in Neurosciences**, New York, v. 12, n. 4, p. 137-147, 1989.

DE LUCA-VINHAS, M.C.Z.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Pharmacological assessment of the freezing, antinociception, and exploratory behaviour organized in the ventrolateral periaqueductal gray. **Pain**, Amsterdam, v. 121, n. 1-2, p. 94-104, 2006.

DENNIS, S.G.; MELZACK, R. Comparison of phasic and tonic pain in animals. In: BONICA, J.J. (Ed.). **Advances in pain research and therapy**. New York: Raven Press, 1979. 3 v. p. 747-760.

DEPAULIS, A.; KEAY, K.A.; BANDLER, R. Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat. **Experimental Brain Research**, Berlin, v. 90, n. 2, p. 307-318, 1992.

DEPAULIS, A.; KEAY, K.A.; BANDLER, R. Quiescence and hyporeactivity evoked by activation of cell bodies in the ventrolateral midbrain periaqueductal gray of the rat. **Experimental Brain Research**, Berlin, v. 99, n. 1, p. 75-83, 1994.

DIELENBERG, R.A.; LEMAN, S.; CARRIVE, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioural responses to cat odor exposure in rats. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 153, n. 2, p. 487-496, 2004.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 161-174, 1977.

EICHENBERGER, G.C.; RIBEIRO, S.J.; OSAKI, M.Y.; MARUOKA, R.Y.; RESENDE, G.C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CORREA, S.A.; DA SILVA, L.A.; COIMBRA, N.C. Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 48-59, 2002.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 1-8.

FANSELOW, M.S.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; DECOLA, J.P.; KIM, J.J. The immediate-shock deficit and postshock analgesia: implication for the relationship between the analgesic CR and UR. **Animal learning & behavior**, Austin, v. 22, p. 72-76, 1994.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; REYES, R.; MARTÍNEZ-MOTA, L.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. Influence of inflammatory nociception on the anxiolytic-like effect of diazepam and buspirone in rats. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 180, n. 3, p. 399-407, 2005.

FERNANDEZ ESPEJO, E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 105-112, 1997.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: MCMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **Wall and Melzack's textbook of pain**. 5th. ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006. p. 125-142.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 14, p. 219-245, 1991.

FILE, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: ELLIOTT, J.M.; HEAL, D.J.; MARSDEN, C.A. (Ed.). **Experimental approaches to anxiety and depression**. Chichester: Wiley, 1992. p. 25-44.

FILE, S.E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 35-53, 2003.

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

GALLAGHER, R.M.; VERMA, S. Mood and anxiety disorders in chronic pain. **Progress in Pain Research Management**, [S.l.], v. 27, p. 139-178, 2004.

GOMES, K.S. **Expressão de proteína Fos na investigação do substrato neural da antinocicepção induzida pelo medo**. 2005. 122 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59134/tde-19052005-163911/>.

GRAEFF, F.G. Minor tranquilizers and brain defense systems. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 4-5, p. 239-265, 1981.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: ROTH, M.; BURROW, G.D.; NOYES, R. (Ed.). **Handbook of anxiety**. New York: Elsevier, 1990. 3 v. p. 307-54.

GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 239-259, 2004.

GRAEFF, F.G.; HETEM, L.A.B. Neurobiologia. In: HETEM L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 107-132.

GRAY, J.A.; McNAUGAHTON, N. (Ed.). **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. 2nd. ed. London: Oxford University Press, 2000. 440 p.

HAGHPARAST, A.; AHMAD-MOLAEI, L. Effects of electrolytic lesion of dorsolateral periaqueductal gray on analgesic response of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis in rat. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 451, n. 2, p. 165-169, 2009.

HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, New York, v. 327, n.1, p. 1-5, 1984.

HARRIS, J.A. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. **Journal of Physiology, Paris**, Paris, v. 90, n. 1, p. 15-25, 1996.

HASNIE, F.S.; WALLACE, V.C.J.; HEFNER, K.; HOLMES, A.; RICE, A.S.C. Mechanical and cold hypersensitivity in nerve-injured C57BL/6J mice is not associated with fear-avoidance- and depression-related behaviour. **British Journal of Anaesthesia**, Oxford, v. 98, n. 6, p. 816-822, 2007.

HEEB, M.M.; YAHR, P. Cell-body lesions of the posterodorsal preoptic nucleus or posterodorsal medial amygdala, but not the parvocellular subparafascicular thalamus, disrupt mating in male gerbils. **Physiology and Behaviour**, New York, v. 68, n. 3, p. 317-331, 2000.

HEINRICHER, M.M.; INGRAM, S.L. The brainstem and nociceptive modulation. In: BUSHNELL, M.C.; BASBAUM, A.I. (Ed.). **The senses, a comprehensive reference. Pain**. Academic Press: San Diego, 2008. 5 v. p. 593-626.

HEINRICHER, M.M.; TAVARES, I.; LEITH, J.L.; LUMB, B.M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 214-225, 2009.

HELMSTETTER, F.J.; TERSHNER, S.A. Lesions of the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla disrupt antinociceptive but not cardiovascular aversive conditional responses. **The Journal of Neuroscience**, Washington DC, v. 14, n. 11, pt. 2, p. 7099-7108, 1994.

HELMSTETTER, F.J.; TERSHNER, S.A.; POORE, L.H.; BELGOWAN, P.S.F. Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Brain Research**, Amsterdam, v. 779, n. 1-2, p. 104-118, 1998.

HERMAN, J.P.; OSTRANDER, M.M.; MUELLER, M.K.; FIGUEIREDO, H. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 1201-1213, 2005.

HERRERA, M.; SANCHES DEL CAMPO, F.; SMITH AGREDA, V. Neuronal relationships between the dorsal periaqueductal nucleus and the inferior colliculus

(Nucleus commissuralis) in the cat. A golgi study. **Journal of Anatomy**, London, v. 158, p. 137-145, 1988.

HETEM, L.A.B. Diagnóstico diferencial. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu; 2004. p. 191-206.

HILTON, S.M.; REDFERN, W.S. A search for brainstem cell groups integrating the defence reaction in the rat. **The Journal of Physiology**, London, v. 378, p. 213-228, 1986.

ITO, M. **The cerebellum and neural control**. New York: Raven Press, 1984.

JI, G.; FU, Y.; RUPPERT, K.A.; NEUGEBAUER, V. Pain-related anxiety like behaviour require CRF I receptors in the amygdala. **Molecular Pain**, London, v. 3, n. 13, p. 1-5, 2007.

KAVALIERS, M. Brief exposure to a natural predator, the short-tail weasel, induces benzodiazepine sensitive antinociception in white-footed mice. **Physiology and Behaviour**, New York, v. 43, n. 2, p. 187-193, 1988.

KEAY, K.A.; BANDLER, R. Deep and superficial noxious stimulation increases Fos-like immunoreactivity in different regions of the midbrain periaqueductal grey of the rat. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 154, n. 1-2, p. 23-26, 1993.

KEAY, K.A.; BANDLER, R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 25, n. 7-8, p. 669-678, 2001.

KEAY, K.A.; BANDLER, R. Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculation. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 87, n. 2, p. 275-279, 2002.

KEAY, K.A.; CLEMENT, C.L.; DEPAULIS, A.; BANDLER, R. Different representations of inescapable noxious stimuli in the periaqueductal grey and upper cervical spinal cord of freely moving rats. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 313, n. 1-2, p. 17-20, 2001.

KEAY, K.A.; LI, Q.F.; BANDLER, R. Muscle pain activates a direct projection from ventrolateral periaqueductal gray to rostral ventrolateral medulla in rats. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 290, n. 3, p. 157-160, 2000.

KELLY, D.D. **Stress induced analgesia**. New York: NY Academy of Sciences, 1986. 467 v.

KONTINEN, V.K.; KAUPPILA, T.; PAANANEN, S.; PERTOVAARA, A.; KALSO, E. Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathy. **Pain**, Amsterdam, v. 80, n. 1-2, p. 341-346, 1999.

KORTE, S.M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 117-142, 2001.

KRIEGER, J.E.; GRAEFF, F.G. Defensive behaviour and hypertension induced by glutamate in the midbrain central grey of the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 1, p. 61-67, 1985.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEDOUX, J.E.; FARB, C.; RUGGIERO, D.A. Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 10, n. 4, p. 1043-1054, 1990.

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

LEE, C.; RODGERS, R.J. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. **Behavioral Pharmacology**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 491-496, 1991.

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

LESTER, L.S.; FANSELOW, M.S. Exposure to a cat produces opioid antinociception in rats. **Behavioral Neuroscience**, Washington DC, v. 99, n. 4, p. 756-759, 1985.

LEVINE, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 939-946, 2005.

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; DE LIMA, T.C.; CAROBREZ, A.P. Dorsal periaqueductal gray matter inhibits passive coping strategy elicited by forced swimming stress in rats. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 335, n. 2, p. 87-90, 2002.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOVICK, T.A. Interactions between descending pathways from the dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, 1991. p. 101-20.

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

LU, Y.; SWEITZER, S.M.; LAURITO, C.E.; YEOMNAS, D.C. Differential opioid inhibition of C- and A δ - fiber mediated thermonociception after stimulation of the nucleus raphe magnus. **Anesthesia and Analgesia**, Baltimore, v. 98, n. 2, p. 414-419, 2004.

LUMB, B.M. Inescapable and escapable pain is represented in distinct hypothalamic-midbrain circuits: specific roles for Adelta- and C-nociceptors. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 87, n. 2, p. 281-286, 2002.

LUMB, B.M. Hypothalamic and midbrain circuitry that distinguishes between escapable and inescapable pain. **News in Physiological Sciences**, Bethesda, v. 19, p. 22-26, 2004.

LUMB, B.M.; PARRY, D.M.; SEMENENKO, F.M.; McMULLAN, S.; SIMPSON, D.A. C-nociceptor activation of hypothalamic neurones and the columnar organisation of their projections to the periaqueductal grey in the rat. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 87, n. 2, p. 123-128, 2002.

MAIONE, S.; OLIVA, P.; MARABESE, I.; PALAZZO, E.; ROSSI, F.; BERRINO, L.; FILIPPELLI, A. Periaqueductal gray matter metabotropic glutamate receptors modulate formalin-induced nociception. **Pain**, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p. 183-189, 2000.

MAISONNETTE, S.S.; KAWASAKI, M.C.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Effects of lesions of amygdaloid nuclei and substantia nigra on aversive responses induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Research Bulletin**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 93-98, 1996.

MARIN, M.T.; CRUZ, F.C.; PLANETA, C.S. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. **Physiology and Behaviour**, New York, v. 90, n. 1, p. 29-35, 2007.

McBLANE, J.W.; HANDLEY, S.L. Effects of two stressors on behaviour in the elevated X-maze: Preliminary investigation of their interaction with 8-OH-DPAT. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 116, n. 2, p. 173-182, 1994.

McCALL, W.D.; TANNER, K.D.; LEVINE, J.D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 208, n. 1, p. 45-48, 1996.

McNAUGHTON, N.; CORR, P.J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 285-305, 2004.

MEININGER, V.; POL, D.; DERER, P. The inferior colliculus of the mouse. A Nissl and Golgi study. **Neuroscience**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 1159-1179, 1986.

MELO, L.L.; BRANDÃO, M.L. Role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in the aversion induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, Amsterdam, v. 51, n. 2-3, p. 317-321, 1995.

MELO, L.L.; CARDOSO, S.H.; BRANDÃO, M.L. Antiaversive action of benzodiazepines on escape behavior induced by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Physiology and Behaviour**, New York, v. 51, n. 3, p. 557-562, 1992.

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

MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: MCMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **WALL and MELZACK'S textbook of pain**. 5th. ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006. p. 3-34.

MIGUEL, T.T. **Antinociceção induzida pelo medo: efeito da inibição da óxido nítrico sintase na matéria cinzenta periaquedutal de camundongos**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, PPG-CF, UFSCar, São Carlos, 2006.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MILLAN, M.J.; BROCCO, M. The Vogel conflict test: procedural aspects, gaminobutyric acid, glutamate and monoamines. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 67-96, 2003.

MORGAN, M.M. Differences in antinociception evoked from dorsal and ventral regions of the caudal and periaqueductal gray matter. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, 1991. p. 139-150.

MORGAN, M.M.; CARRIVE, P. Activation of the ventrolateral periaqueductal gray reduces locomotion but not mean arterial pressure in awake, freely moving rats. **Neuroscience**, Oxford, v. 102, n. 4, p. 905-910, 2001.

MORGAN, M.M.; CLAYTON, C.C. Defensive behaviors evoked from the ventrolateral periaqueductal gray of the rat: comparison of opioid and GABA disinhibition. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 164, n. 1, 61-66, 2005.

MORGAN, M.M.; WHITNEY, P.K.; GOLD, M.S. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. **Brain Research**, Amsterdam, v. 804, n. 1, p. 159-166, 1998.

MUNCK, A.; GUYRE, P.M.; HOLBROOK, N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocrine reviews**, Baltimore, v. 5, n. 1, p. 25-55, 1984.

NARITA, M.; KANEKO, C.; MIYOSHI, K.; NAGUMO, Y.; KUZUMAKI, N.; NAKAJIMA, M.; NANJO, K.; MATSUZAWA, K.; YAMAZAKI, M.; SUZUKI, T. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. **Neuropsychopharmacology**, New York, v. 31, n. 4, p. 739-750, 2006.

NETTO, C.A.; SIEGFRIED, B.; IZQUIERDO, I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. **Behavioral and Neural Biology**, New York, v. 48, n. 2, p. 304-309, 1987.

- NEUGEBAUER, V.; LI, W.; BIRD, G.C.; HAN, J.S. The amygdala and persistent pain. **The Neuroscientist**, Thousand Oaks, v. 10, n. 3, p. 221-234, 2004.
- NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R.V.; GRAEFF, F.G.; PELA, I.R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 300-310, 2000.
- OLIVEIRA, L.C.; NOBRE, M.J.; BRANDAO, M.L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Role of amygdala in conditioned and unconditioned fear generated in the periaqueductal gray. **Neuroreport**, London, v. 15, n. 14, p. 2281-2285, 2004.
- OLIVEIRA, M.A.; PRADO, W.A. Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats. **Brain Res Bull**, v. 54, n. 1, p. 55-63, 2001.
- PALKOVITS, M. Organization of the stress response at the anatomical level. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, v. 72, p. 47-55, 1987.
- PANDOSSIO, J.E.; MOLINA, V.A.; BRANDÃO, M.L. Prior electrical stimulation of the inferior colliculus sensitizes rats to the stress of the elevated plus-maze test. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 19-25, 2000.
- PARRY, D.M.; SEMENENKO, F.M.; CONLEY, R.K.; LUMB, B.M. Noxious somatic inputs to hypothalamic-midbrain projection neurones: a comparison of the columnar organisation of somatic and visceral inputs to the periaqueductal grey in the rat. **Experimental Physiology**, Cambridge, v. 87, n. 2, p. 117-122, 2002.
- PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2nd. ed. California: Elsevier Science, 2001.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.
- PORRO, C.A.; CAVAZZUTI, M.; LUI, F.; GIULIANI, D.; PELLEGRINI, M.; BARALDI, P. Independent time courses of supraspinal nociceptive activity and spinally mediated behavior during tonic pain. **Pain**, Amsterdam, v. 104, n. 1-2, p. 291-301, 2003.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.
- REDGRAVE, P.; DEAN, P.; SOUKI, W.; LEWIS, G. Gnawing and changes in reactivity produced by microinjections of picrotoxin into the superior colliculus of rats. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 75, n. 2, p. 198-203, 1981.
- REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, New York, v. 164, n. 3878, p. 444-445, 1969.

RODELLA, L.; REZZANI, R.; GIOIA, M.; TREDICI, G.; BIANCHI, R. Expression of Fos immunoreactivity in the rat supraspinal regions following noxious visceral stimulation. **Brain Research**, Amsterdam, v.47, n. 4, p. 357-366, 1998.

RODGERS, R.J. Neuropharmacological Aspects of Adaptative Pain Inhibition in Murine "Victims" of Aggression. **Aggressive Behavior**, New York, v. 21, p. 29-39, 1995.

RODGERS, R.J.; HALLER, J.; HOLMES, A.; HALASZ, J.; WALTON, T.J.; BRAIN, P.F. Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. **Physiology and Behaviour**, New York, v.68, n. 1-2, p. 47-53, 1999.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J.T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995.

RODGERS, R.J.; LEE, C.; SHEPHERD, J.K. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 106, n. 1, p. 102-110, 1992.

RODGERS, R.J.; RANDALL, J.I. Resident's scent: a critical factor in acute analgesic reaction to defeat experience in male mice. **Physiology and Behaviour**, New York, v. 37, n. 2, p. 317-322, 1986.

SANDKÜLER, J. Induction of the pronto-oncogene c-fos as a cellular marker of brainstem neurons activated from the PAG. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Ed.). **The midbrain periaqueductal gray: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, 1991. p. 267-286.

SANDNER, G.; DI SCALA, G.; ROCHA, B.; ANGST, M.J. C-fos immunoreactivity in the brain following unilateral electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in freely moving rats. **Brain Research**, Amsterdam, v. 573, n. 2, p. 276-283, 1992.

SARNYAI, Z.; BIRO, E.; PENKE, B.; TELEGDY, G. The cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in rats. **Brain Research**, Amsterdam, v. 589, n. 1, p. 154-156, 1992.

SCHMITT, R.; KAPCZINSK, F. Transtorno de ansiedade generalizada. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.265-283.

SIEGFRIED, B.; FRISCHKNECHT, H.R.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 481-490, 1990.

SILVEIRA, M.C.; SANDNER, G.; GRAEFF, F.G. Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 115-118, 1993.

SILVEIRA, M.C.; ZANGROSSI JR, H.; DE BARROS VIANA, M.B.; SILVEIRA, R.; GRAEFF, F.G. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 13-21, 2001.

SMYTHE, J.W.; MURPHY, D.; TIMOTHY, C.; COSTALL, B. Exogenous corticosterone administration increases anxiety in rats. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 117, 182 p, 1996.

SONG, C.; LI, X.; LEONARD, B.E.; HORROBIN, D.F. Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1beta-induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 44, n. 10, p. 1984-1991, 2003.

STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. **Stress**, London, v. 6, n. 2, p. 87-100, 2003.

STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C.; GRUTZNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**, Berlin, v. 90, n. 2, p. 166-169, 1986.

SUKIKARA, M.H.; MOTA-ORTIZ, S.R.; BALDO, M.V.; FELICIO, L.F.; CANTERAS, N.S. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioural responses. **The Journal of Neuroscience**, Washington DC, v. 26, n. 9, p. 2583-2589, 2006.

TANIMOTO, S.; NAKAGAWA, T.; YAMAUCHI, Y.; MINAMI, M.; SATOH, M. Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical somatic and visceral pains in rats. **The European Journal of Neuroscience**, Paris, v. 18, n. 8, p. 2343-2350, 2003.

TAUKULIS, H.K.; GOGGIN, C.E. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. **Behavioral and Neural Biology**, New York, v. 53, n. 2, p. 205-216, 1990.

TAYLOR, B.K.; AKANA, S.F.; PETERSON, M.A.; DALLMAN, M.F.; BASBAUM, A.I. Pituitary– adrenocortical responses to persistent noxious stimuli in the awake rat: endogenous corticosterone does not reduce nociception in the formalin test. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 139, n. 5, p. 2407-2413, 1998.

TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da dor aguda e crônica. In: TEIXEIRA, M.J. (Ed.). **Dor: manual para o clínico**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 9-24.

THORN, B.E.; PLOTKIN, K.E. Neurochemical mechanisms of stimulation-produced analgesia: comparison of tests involving tonic and phasic pain. **Physiological Psychology**, [S.l.], v. 12, p. 280-284, 1984.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TODD, A.J.; KOERBER, H.R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **WALL and MELZACK'S textbook of pain**. 5th ed. Elsevier: Churchill Livingstone, 2006. p. 73-90.

TORRES, I.L.; VASCONCELLOS, A.P.; SILVEIRA CUCCO, S.N.; DALMAZ, C. Effect of repeated stress on novelty-induced antinociception in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 2, p. 241-244, 2001.

VACCARINO, A.L.; MAREK, P.; STEMBERG, W.; LIEBESKIND, J.C. NMDA receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia in the formalin test. **Pain**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 19-123, 1992.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 295-309, 2004.

VIANNA, D.M.; BRANDAO, M.L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 5, p. 557-566, 2003.

VIANNA, D.M.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M.L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v. 25, n. 7-8, p. 711-719, 2001.

ZANGROSSI JR, H.; GRAEFF, F.G. Modelos animais. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 55-73.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e, sim, a caminhada.

Caminhando e semeando no fim terás o que colher”

Cora Coralina

APÊNDICE

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Anxiolytic-like effects produced by bilateral lesion of the periaqueductal gray in mice: Influence of concurrent nociceptive stimulation

Joyce Mendes-Gomes^a, Ricardo Luiz Nunes-de-Souza^{b,*}^a Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, FFCLRP – USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil^b Lab. Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Rod. Araraquara-Jaú, Km 01, CEP: 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2008

Received in revised form 22 April 2009

Accepted 27 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Anxiety

Fear

Different EPM

Antinociception

Formalin test

NMDA lesion

Dorsal periaqueductal gray

Mice

ABSTRACT

Threatening situations (e.g., exposure to an elevated plus-maze with four open arms – oEPM) induce behavioral and neurovegetative responses generally accompanied by antinociception in animals. The mid-brain periaqueductal gray (PAG) is longitudinally divided into four columns (dorsomedial, dorsolateral, lateral and ventrolateral) that are involved in co-ordinating distinct strategies for coping with different types of stress, threat and pain. The present study evaluated the effect of unilateral or bilateral lesion of dorsal portion of PAG (dPAG: dorsolateral and dorsomedial columns) (i) on nociceptive response induced by 2.5% formalin injection into the right hind paw (nociception test) in mice exposed to a non-aversive situation or to the oEPM and (ii) on anxiety indices in mice exposed to a standard elevated plus-maze (sEPM: two open and two closed arms) with or without prior injection of 2.5% formalin. Results showed that neither pain response in a non-aversive situation (i.e. no exposure to the EPM) nor oEPM-induced antinociception were prevented by uni or bilateral lesion of dPAG. However, bilateral dPAG lesion reduced anxiety indices (% open arm entries and % open arm time) only in mice that had not received prior injection of formalin. These results suggest that either tonic pain, induced by formalin injection or oEPM-induced antinociception, do not recruit the dorsal portion of this midbrain structure. Nevertheless, the role of the ventrolateral portion of the PAG in the modulation of the nociceptive response remains undetermined. Intriguingly, concurrent nociception test impaired the antianxiety effects of bilateral lesion of dPAG. We suggest that pain stimulus has somehow impaired the anxiolytic effect of the dPAG bilateral lesion.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pain is one of the most important processes that guarantee the survival of many animals, since it alerts the organism about the presence of actual or potential tissue damage. Nevertheless, under threatening situations the animals not only exhibit a set of behavioral (e.g., fight, flight, freezing, vocalization) and neurovegetative (e.g., tachycardia, hypertension, defecation) responses, but also antinociception [41,61]. Such reactions have a clear adaptive value since it gives the animal an opportunity to exhibit defensive behaviors even though an injury has occurred, thereby increasing its chances of survival [8].

The elevated plus-maze (EPM) is an animal model of anxiety [33,45,58] that permits to evaluate the influence of aversion on nociception [16,43,67,70]. It has been demonstrated that the EPM exposure elicits both defensive reactions and antinociception, evaluated by the tail-flick test [43]. Nevertheless, in experiments

carried out in our laboratory, EPM exposed mice do not present antinociception of high magnitude, assessed with the formalin nociception test. However, when mice are placed in a totally open elevated plus-maze (oEPM: with four open arms) a highly magnitude antinociceptive response has been verified [52].

Many studies have highlighted the midbrain periaqueductal gray matter (PAG) as an important structure involved in the modulation of the defensive reaction and in the descendent inhibitory pain system, since its electrical or chemical stimulation suppresses nociceptive transmission from the dorsal horn of the spinal cord [4,28]. The PAG is anatomically and functionally organized, being divided into four longitudinal parts that run parallel to the aqueduct, that is, the dorsomedial, dorsolateral, lateral and ventrolateral columns [3,13]. Chemical or electrical stimulation of dorsolateral and lateral PAG causes vigorous somatomotor activity, sympathoexcitation, cardio respiratory alterations and short-term non-opioid mediated analgesia [3,5,22,37,39,46,53]. On the other hand, the stimulation of the ventrolateral PAG evokes “conservation-withdrawal” strategies or a passive coping reaction of quiescence/immobility, decreased vigilance and hyporeactivity, hypotension, bradycardia and an opioid analgesia which has a relatively long time course [3,13,22,23,39,46,47,53].

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3301 6983; fax: +55 16 3301 6980.
E-mail addresses: souzarn@fcar.unesp.br, ricardo.souza@pq.cnpq.br (R.L. Nunes-de-Souza).

Based on the above findings the present study investigated the role of dorsal PAG (dPAG: term used to designate the dorsomedial and dorsolateral columns) on open EPM-induced antinociception and on standard EPM-induced anxiety in mice. To that end, mice had the dPAG unilaterally or bilaterally lesioned with the injection of NMDA (N-methyl-D-aspartic acid). We compared the effects of unilateral and bilateral lesion of PAG since it has been reported that bilateral lesion of lateral PAG produces more dramatic effects on different behaviors (e.g., insect hunting and maternal behavior) than unilateral lesion [68]. In addition, it has been demonstrated that noxious stimulus induces PAG bilateral expression of Fos protein [3,39,40,56]. Thus it seems relevant to identify the influence of PAG unilateral and bilateral lesion on nociception and defensive behavior in mice exposed in the EPM. The formalin test was used to assess nociception and was specifically chosen since it permits the assessment of pain sensitivity concurrently with exposure to the aversive environment. Furthermore, since NMDA lesion usually reaches structures located dorsally to the dPAG (e.g., the superior and inferior colliculi), a complementary experiment aimed to lesion specifically both superior and inferior colliculi was also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Subjects were male Swiss mice (São Paulo State University/UNESP, SP, Brazil), weighing 25–35 g. They were housed in groups of 7 per cage (41 cm × 34 cm × 16 cm) and maintained under a 12 h light cycle (lights on at 7:00 a.m.) in a temperature (23 ± 1 °C) and humidity (55 ± 5%) controlled environment. Food and drinking water were freely available. All mice were experimentally naive, and experimental sessions were carried out during the light phase of the cycle (9 a.m.–5 p.m.).

2.2. Drugs

NMDA (N-methyl-D-aspartic acid; RBI) dissolved in physiological saline (0.9% NaCl). This compound was injected unilaterally or bilaterally into dPAG in the concentration of 1 µg/0.1 µl [18] and in a volume of injection of 0.2 µl.

2.3. Surgery and excitotoxic lesion of dPAG, superior and/or inferior colliculi

Mice were unilaterally or bilaterally implanted with a 7 mm stainless-steel guide cannula (26 gauge; Cooper's Needleworks, Birmingham, UK) under chloral hydrate (500 mg/kg, i.p.) anesthesia. The guide cannulae were fixed to the skull using dental acrylic and jeweler's screws. Stereotaxic coordinates for PAG were 4.1 mm posterior to bregma, ±1.5 mm lateral to the midline and 2.3 mm ventral to skull surface, with the guide cannula angled 26° to the vertical axis. For superior and/or inferior colliculi the coordinates were 4.1 mm posterior to bregma, ±1.5 mm lateral to the midline and 1.8 mm ventral to skull surface, with the guide cannula angled 26° to the vertical axis. Such coordinates were based on a mouse brain atlas [57].

NMDA solution was injected into the dPAG immediately after guide cannulae implantation, while the mice were under anesthesia. Solutions were infused into the dPAG using a microinjection unit (33 G cannula; Cooper's Needleworks), which extended 1.0 mm beyond the tip of the each guide cannula. The microinjection unit was attached to a 5 µl Hamilton microsyringe via polyethylene tubing (PE-10), and administration was controlled by an infusion pump (BI 2000, Insight Equipamentos Científicos Ltda, Brazil) programmed to deliver a volume of 0.2 µl over a period of 60 s. The microinjection procedure consisted of gently restraining the animal, inserting the injection unit, infusing the solution, and keeping the injection unit *in situ* for a further 180 s. Confirmation of successful infusion was obtained by monitoring the movement of a small air bubble in the PE-10 tubing.

To each lesioned group a corresponding sham-lesioned group (i.e. a group that was submitted to the same surgical procedure, except that did not receive any intra-dPAG injection) was added to the study to be used as a control group.

2.4. Formalin test

Nociception was assessed using the formalin test as previously described [1]. The formalin test causes a biphasic nociceptive response [25]. The first phase begins immediately after formalin injection and lasts approximately 5 min. It results from the direct stimulation of nociceptors [25,51]. The second phase begins 20 min after the injection and lasts approximately 40 min [9]. This phase is caused by C fibers activation [51,72] and also involves a period of sensitization during which inflammatory phenomena occur [42,72].

2.5. Apparatus and general procedure

The basic elevated plus-maze design was similar to that originally validated for mice [45]. The standard EPM (sEPM) consisted of two open arms (30 cm × 5 cm × 0.25 cm) and two closed arms (30 cm × 5 cm × 15 cm) connected to a common central platform (5 cm × 5 cm). The apparatus was constructed from wood (floor) and transparent glass (clear walls) and was raised to a height of 38.5 cm above floor level. The other two mazes were similarly constructed but comprised either four enclosed arms (eEPM) or four open arms (oEPM).

Five to six days after surgery, mice were transported to the experimental room and left undisturbed for at least 30 min prior to testing. They were then injected with 50 µl of formalin (2.5%) into the dorsal surface of the right hind paw and individually placed in a glass holding cage (30 cm × 20 cm × 25 cm). Twenty-five minutes after formalin injection, animals were exposed to the sEPM, eEPM or oEPM where it was evaluated the time spent on licking for a period of 10 min (25–35 min after formalin injection). In order to investigate whether the effects of NMDA lesion on anxiety-like behavior was influenced by the nociception test, some mice were submitted to a similar procedure as described above for the sEPM test, except that they did not receive prior formalin injection. A similar procedure was followed for animals that had both superior and inferior colliculi lesioned. Five to six days after the surgical procedure, the animals were submitted to the sEPM.

In order to evaluate the role of dPAG on nociception modulation, all dPAG sham-lesioned and lesioned sEPM animals (only those that had not received the nociceptive stimulus) were injected with formalin into the right hind paw 48 h after sEPM exposure. Nociception test was carried out in the same glass holding cage described above.

For the sEPM, mice were individually placed on the central platform of the maze facing the left open arm. Both eEPM and oEPM were similarly positioned in the experimental room and the experimenter placed the animal facing the arm that corresponded to the sEPM left open arm, even though the eEPM had no open arms and the oEPM no enclosed arms. Between subjects, the mazes were thoroughly cleaned with ethanol 20% and a dry cloth. All sessions were video-recorded by a camera linked to a monitor and DVD in the adjacent laboratory.

2.6. Behavioral analysis

Videotapes were scored by a highly trained observer using an ethological analysis software package developed by Dr. Morato's group at Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. In addition to recording time spent licking the formalin-injected paw (see above), the total number of arm entries (arm entry = all four paws into an arm) was scored. For groups exposed to the sEPM with or without prior formalin injection, the frequency of closed and open arm entries, % open arm [(open/total) × 100] and % open arm time [(open time/300) × 100] were also recorded. Although the test duration had been 10 min, the data for exploration in the maze were calculated only during the first 5 min of test.

2.7. Statistics

All results were initially submitted to Levene's test for homogeneity of variance. When appropriate the data were transformed to square root and then analyzed by Student's *t*-test for unrelated samples (*sham-lesioned* × *lesioned group*) or two-way analysis of variance (ANOVA) for independent factors (factor 1: maze type and factor 2: lesion type). Where indicated by significant *F* values, group differences were identified by Duncan's test. A *P*-value of 0.05 or less was required for significance.

2.8. Perfusion and verification of lesion sites

At the end of testing, animals received an overdose of anesthetic tiopental (340 mg/kg, i.p.) and they were transcardially perfused with saline followed by formaldehyde 10%. The brains were removed and transferred in formaldehyde 10% and 24 h and 48 h later, they were placed in sucrose solution 20% and 30%, respectively, and then sectioned in a cryostat (Leica CM 1850). The sections were mounted on gelatin-coated slides and stained with cresyl violet (Nissl staining). The anatomical location and size of NMDA lesions were evaluated by assessing the typical neuronal cell loss and gliosis infiltration [68]. Nissl-staining methods are widely used to examine cytotoxic lesions [35,68] because these methods stain both glia and neuronal cell bodies, providing a very accurate delineation of the lesion site. Sites of lesion were microscopically verified with reference to a mouse brain atlas [57].

2.9. Ethics

The experiments carried out in this study comply with the norms of the Brazilian Neuroscience and Behavior Society (SBNeC), based on the US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Furthermore, all the procedures were analyzed and approved by the local Ethic Committee (protocol CEP/FCF/Car. Number 20/2005; report number 10/2006).

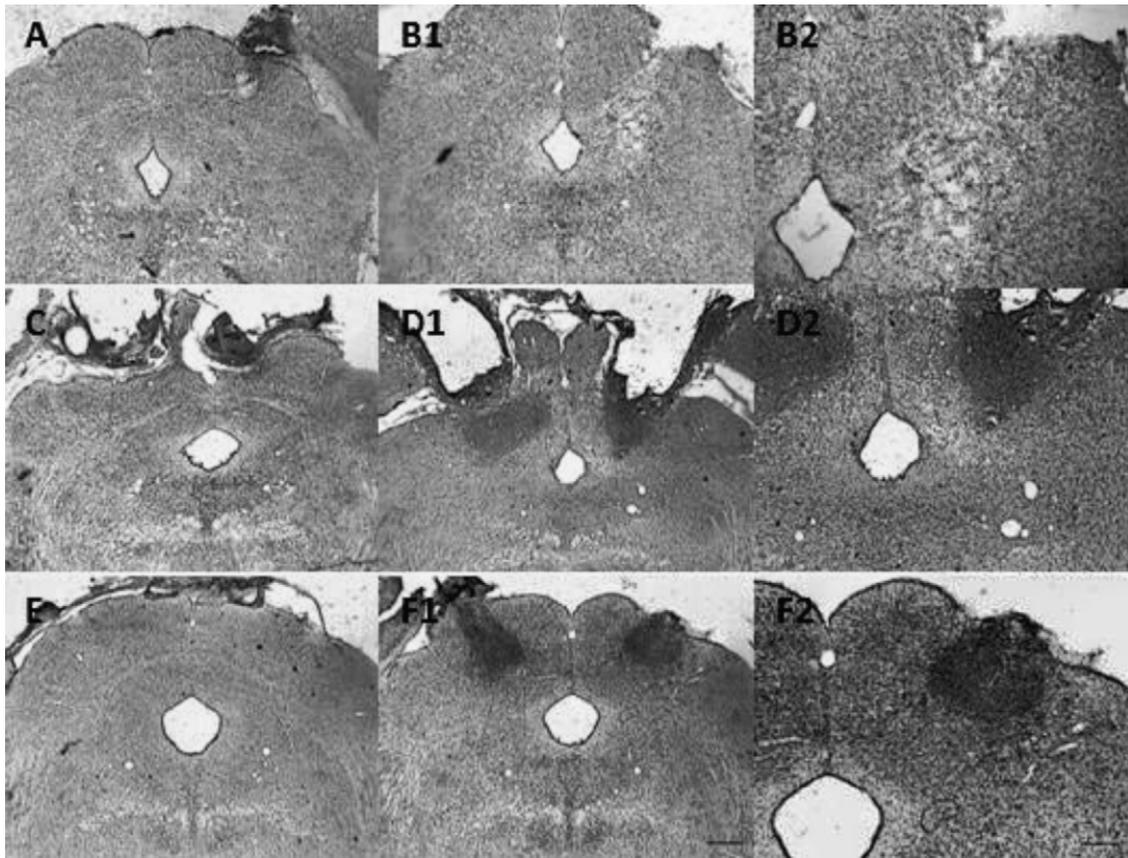


Fig. 1. NMDA lesion appearance. Photomicrographs of transverse cresyl violet-stained sections (Nissl staining), illustrating the extent and appearance of dPAG unilateral (A) or bilateral (C) sham lesions and unilateral (B) or bilateral (D) lesions, from representative cases. Superior/inferior colliculi bilateral sham (E) or bilateral (F) lesions are also shown. In the areas of lesion observe the extent of gliosis and loss of neurons. Scale bar = 400 μm in A, B1, C, D1, E, F1; 200 μm in B2, D2 and F2.

3. Results

3.1. Histology

All NMDA and sham lesions were verified histologically with Nissl staining. Similarly to previously described for electrolytic [7] and chemical [24] lesions of PAG, the lesioned areas were extensive

(see Figs. 1B, 1D and 2). They included the dorsal aspect of the PAG, i.e. the dorsomedial PAG (dmpAG) and dorsolateral PAG (dIPAG) and in some cases, the lateral PAG (lIPAG). The lesions also extended dorsally into the superior and/or inferior colliculi. The ventrolateral PAG (vlPAG), however, was left intact. There was no sign of lesion in the sham-lesioned rats, except where the guide cannulae were implanted (see Fig. 1A, C and E).

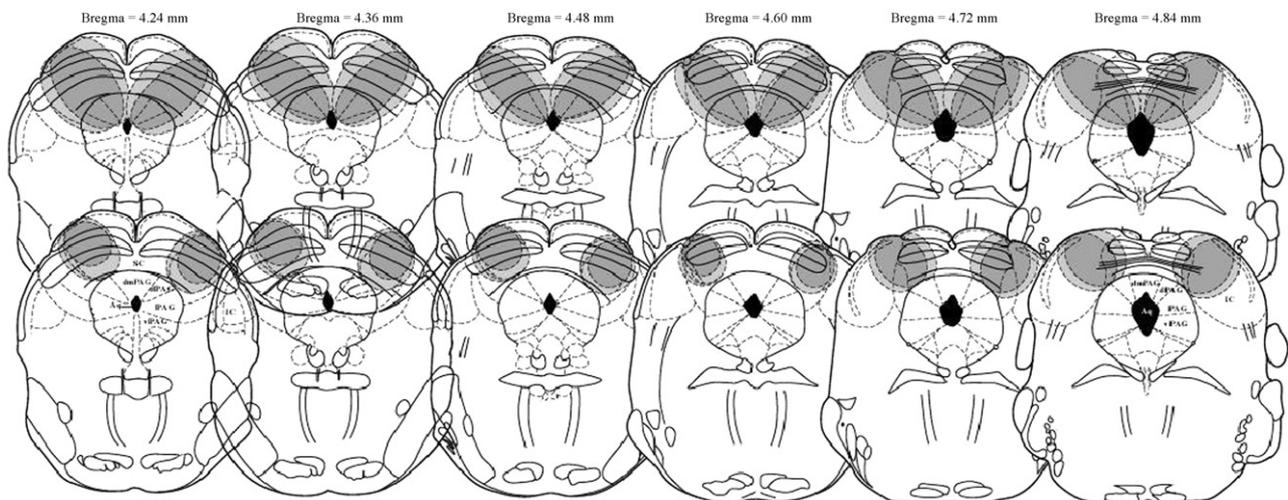


Fig. 2. Composite drawing showing the 'average' NMDA extent of unilateral or bilateral dPAG and superior/inferior colliculi lesions. The average lesion is inferred from the layering of individual lesions on idealized cross-sections of dPAG. The approximate distance from the interaural line is indicated on the top of the figures and was taken from the atlas of Paxinos and Franklin [57]. Abbreviations: Aq, aqueduct; dIPAG, dorsolateral periaqueductal gray; dmpAG, dorsomedial periaqueductal gray; lIPAG, lateral periaqueductal gray; vlPAG, ventrolateral periaqueductal gray; SC, superior colliculus; IC, inferior colliculus.

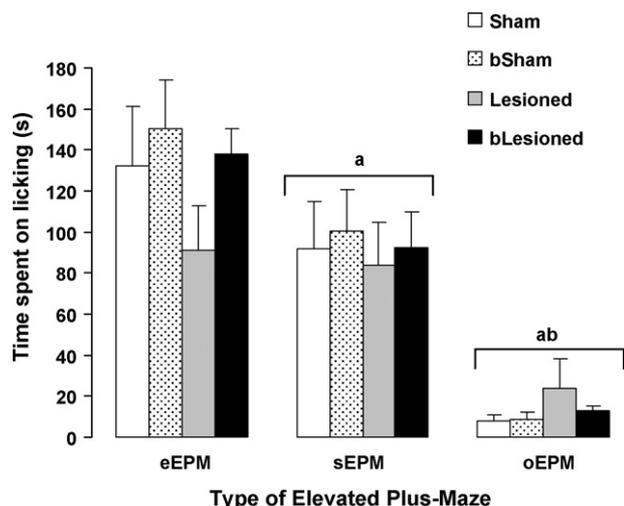


Fig. 3. Lack of effects of unilateral or bilateral lesion of dPAG on time spent on licking the paw injected with formalin 2.5% recorded during 10 min of exposure to the eEPM, sEPM or oEPM; $n = 8-18$. ^{a,b} $P < 0.01$ versus eEPM and sEPM groups, respectively.

In order to investigate the role of the superior and/or inferior colliculi on the effects produced by dPAG lesion, an additional experiment was carried out in animals that had only the superior and/or inferior colliculi lesioned (see Fig. 1F).

3.2. Behavioral results

Fig. 3 shows the effects of unilateral (lesioned) or bilateral lesion (bLesioned) of dorsal PAG (dPAG) on time spent licking the formalin injected paw recorded during exposure to the eEPM, sEPM or oEPM for 10 min. Two-way ANOVA revealed significant effects for maze type factor [$F(2,132) = 97.09, P < 0.0001$] but not for lesion type factor [$F(3,132) = 1.14, P = 0.33$] and maze \times lesion type interaction [$F(6,132) = 0.98, P = 0.44$]. Duncan's test indicated that oEPM exposed mice exhibited less time licking the injected paw when compared to sEPM and eEPM groups. Also, mice exposed to sEPM displayed less time licking the paw than eEPM exposed mice.

Table 1 shows total arm entries in the three types of EPM. Two-way ANOVA revealed significant effects for maze type factor [$F(2,132) = 31.17, P < 0.0001$] but no significant for lesion type factor [$F(3,132) = 1.91, P = 0.13$] and maze type \times lesion type interactions [$F(6,132) = 1.10, P = 0.36$]. Duncan's test indicated that oEPM exposed mice exhibited lower total entries when compared to sEPM and eEPM groups. Duncan's test also revealed that mice exposed to sEPM displayed lower total entries than eEPM exposed mice.

Fig. 4 shows the effects of dPAG unilateral (lesioned) or bilateral lesion (bLesioned) on behavior during 5-min period of exposure in the sEPM in mice that had received prior formalin injection into the right hind paw. One-way ANOVA showed that neither unilateral nor bilateral lesions of dPAG significantly altered anxiety indices [% open arms entries (% OE): $F(3,36) = 0.63, P = 0.60$] and % open arms

Table 1
Lack of effects of unilateral or bilateral lesion of dorsal PAG (dPAG) on the total entries in the arms of the three types of EPM ($n = 8-18$).

	eEPM	sEPM	oEPM
Sham	28.6 \pm 2.3	17.7 \pm 2.2 ^a	14.3 \pm 2.3 ^{a,b}
bSham	21.8 \pm 1.9	15.7 \pm 1.1 ^a	13.0 \pm 1.2 ^{a,b}
Lesioned	21.5 \pm 2.1	14.3 \pm 2.0 ^a	15.0 \pm 2.0 ^{a,b}
bLesioned	23.8 \pm 2.0	18.9 \pm 2.2 ^a	12.9 \pm 1.0 ^{a,b}

^a $P < 0.05$ versus eEPM group.
^b $P < 0.05$ versus sEPM group.

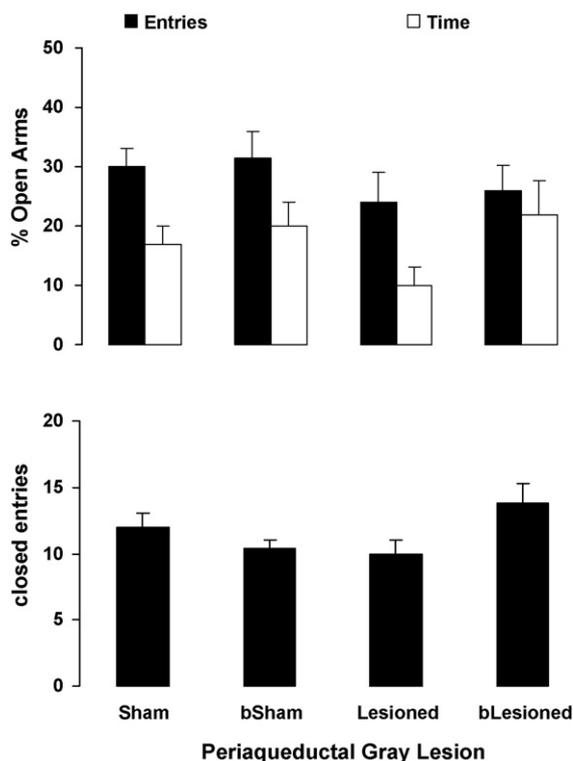


Fig. 4. Lack of effects of unilateral or bilateral lesion of dPAG on behavior of mice injected with formalin 2.5% in the right hind paw and exposed to the sEPM. Unilateral sham-lesioned group (Sham), $n = 12$; Bilateral sham-lesioned group (bSham), $n = 10$; unilateral lesioned group (lesioned groups), $n = 9$; bilateral lesioned group (bLesioned), $n = 9$.

time (% OT: $F(3,36) = 1.48, P = 0.24$)] and locomotor activity [closed arms entries: CE: $F(3,36) = 1.90, P = 0.15$].

Fig. 5 illustrates the effects of bilateral dPAG lesion (bLesioned group) on % open entries (% OE), % open time (% OT) and closed arm entries (CE) in mice exposed to the sEPM in the absence of prior formalin treatment. The results were recorded during the first 5 min of exposure to the sEPM. Student's t -test for unrelated samples revealed that bilateral lesion of dPAG increased significantly % OE ($t(25) = -5.21, P < 0.001$) and % OT ($t(25) = -4.41, P < 0.001$) but, importantly, did not significantly alter the locomotor activity [CE: $t(25) = 0.63, P = 0.53$] when compared with the bilateral sham-lesioned group.

Fig. 6 illustrates the effects of bilateral dPAG lesion (bLesioned group) on time spent on licking the formalin injected paw of mice exposed to control situation (a glass holding cage), i.e. they were not exposed to any type of EPM. The results are referent to the first (0–5 min) and second (25–35 min) phases of the formalin test. Student's t -test for unrelated samples demonstrated that the dPAG bilateral lesion did not produce any significant change on time spent on licking [first phase (0–5 min): $t(25) = -0.06, P = 0.95$; second phase (25–35 min): $t(25) = 0.59, P = 0.56$] when compared with sham-lesioned group.

Fig. 7 shows the effects of bilateral superior and/or inferior colliculi lesion (bLesioned group) on % OE, % OT and CE in mice exposed to the sEPM in the absence of prior formalin treatment (i.e. in the absence of concurrent nociceptive stimulation). The results were recorded during the first 5 min of exposure to the sEPM. Student's t -test for unrelated samples revealed that bilateral lesion of superior and/or inferior colliculi did not produce any significant change on the behavior of mice in the sEPM (% OE: $t(25) = -0.09, P = 0.93$; % OT: $t(25) = -0.21, P = 0.83$; CE: $t(25) = 0.93, P = 0.36$) when compared with the bilateral sham-lesioned group.

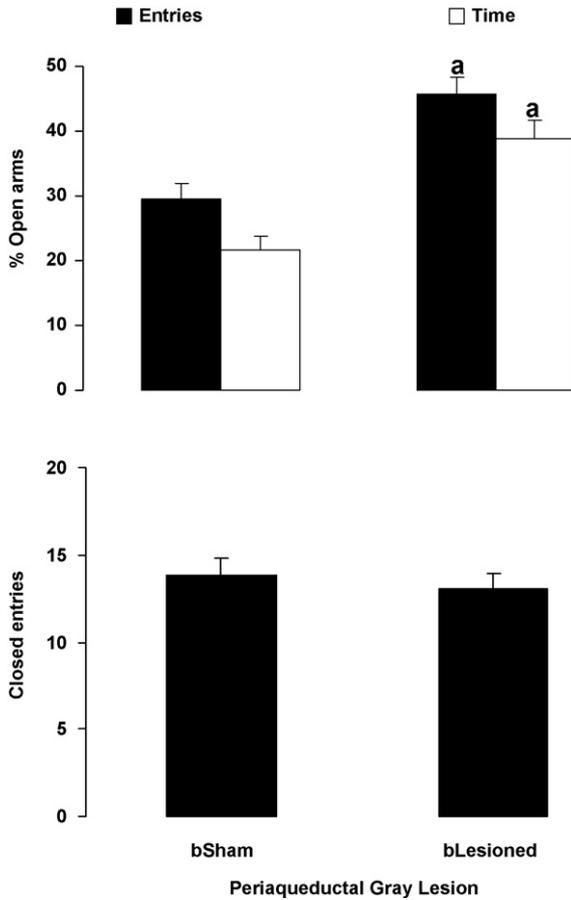


Fig. 5. Effects of dPAG bilateral lesions on behavior of mice (not injected with formalin 2.5%) exposed to the sEPM. Bilateral sham-lesioned group (bSham), $n = 12$; bilateral lesioned group (bLesioned), $n = 15$. ^a $P < 0.001$ compared with the bilateral sham-lesioned group.

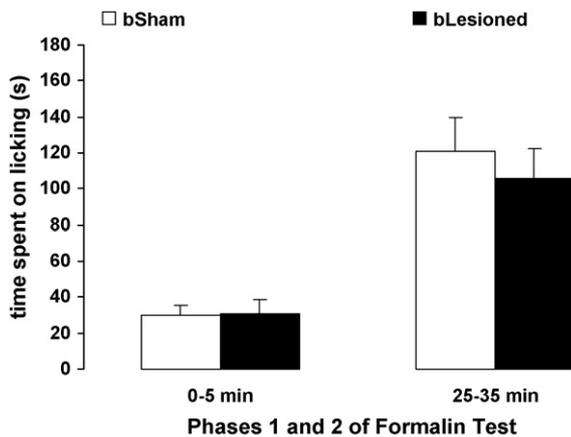


Fig. 6. Lack of effects of dPAG bilateral lesions on time spent on licking the paw injected with formalin recorded during the first phase (0–5 min) and the second phase (25–35 min) of the nociceptive test in mice exposed to the holding cage box. Bilateral sham-lesioned group (bSham), $n = 12$; bilateral lesioned group (bLesioned), $n = 15$.

4. Discussion

The main results of the present study showed that even though the standard EPM (sEPM) clearly induced anxiety-like effects (avoidance of the open arms) it did not elicit antinociception of high magnitude. However, when mice were exposed to a totally open

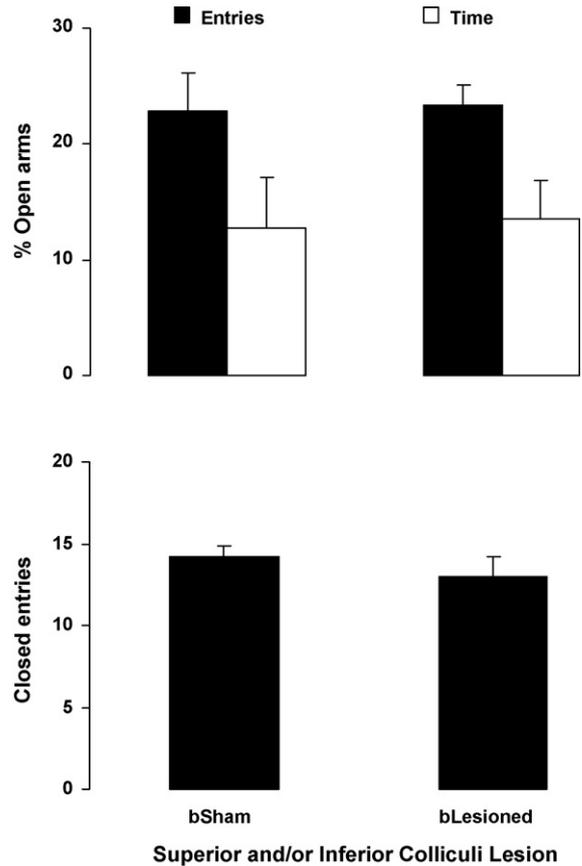


Fig. 7. Lack of effects of superior and/or inferior colliculi bilateral lesions on behavior of mice (not injected with formalin 2.5%) exposed to the sEPM. Bilateral sham-lesioned group (bSham), $n = 18$; bilateral lesioned group (bLesioned), $n = 9$.

EPM (oEPM) they showed a marked reduction in the pain response to formalin injection into the paw, corroborating our previous findings observed with mice [52] and rats [17]. Neither unilateral nor bilateral lesions of dPAG altered the oEPM-induced antinociception. Bilateral lesion alone did not alter the nociceptive response either in the first phase or in the second phase of the formalin test in mice exposed to a control situation. Importantly, bilateral lesion of dPAG produced behaviorally selective anxiolytic-like effects in sEPM-exposed animals, but only in the absence of concurrent nociceptive stimulation, i.e. in mice that had not received formalin injection.

The quantitatively different profile of the antinociceptive response observed in mice exposed to the sEPM and oEPM (Fig. 3) partially corroborates our previous studies [52]. In this context, it has been previously demonstrated that sEPM exposure induces only a mild reduction of the nociception response assessed by the tail-flick test in rats and mice [16,43,44,63]. In addition, the present results showed that the degree of pain inhibition caused by sEPM exposure was substantially lower than that observed during oEPM exposure. Thus, despite clear evidence that the sEPM was interpreted as an aversive environment (that is, mice exhibit low open arm exploration), this experience was insufficient to induce antinociception of high magnitude. These contrasting observations indicate that the modest antinociceptive response in the sEPM (see Fig. 3) may have been due to the control afforded by the presence of the closed arms (i.e. possibility to avoid the more aversive open areas). In this context, the low frequency in the total arms entries observed in oEPM exposed mice when compared with eEPM or sEPM exposed animals (see Table 1) seems to confirm the high level of aversiveness induced by oEPM test.

It has been emphasized that the dorsal portion of the PAG has a crucial role on the modulation of the fear-like responses (e.g., defensive behaviors, autonomic activation) [10,31]. In general, the aversive reactions are accompanied by antinociception [26,34,64]. Based on these evidences, we hypothesized that the dPAG would also modulate of oEPM-induced antinociception. Curiously, present results demonstrated that neither unilateral nor bilateral dPAG lesions reversed the antinociception, suggesting that dPAG is not involved in the mediation of pain inhibition process during the exposure of formalin injected mice in the oEPM. It has been demonstrated that lesions of dorsal or ventral portion of the PAG disrupt antinociception induced by conditioned aversive stimulus [36]. However, only lesions of the ventral PAG changed pain inhibition provoked by unconditioned aversive stimulus [6]. Given that oEPM exposure represents a type of unconditioned aversive situation, it is important to investigate the involvement of ventral PAG on oEPM-induced antinociception.

Formalin injection into the paw causes tonic/persistent/inescapable pain [2,9,15,21,25,50,72], and activates mainly C fibers [42,51]. Evidence showing that formalin injection into the rat paw leads to an increasing of Fos-like immunoreactivity in the ventrolateral portion of the PAG has also been emphasized [40,49,56,60]. If so, the lack of effects of dPAG lesion on oEPM-induced antinociception might be due to fact that formalin injection into the hind paw activates mainly vPAG (rather than dPAG) column. Corroborating this assumption are the results shown in Fig. 6, which demonstrates that dPAG bilateral lesion alone did not change the time spent on licking the injected paw recorded in both phases of the nociceptive test in mice not exposed to the aversive environment (i.e. the oEPM). A very recently published study also showed that electrolytic bilateral lesions of dorsolateral PAG do not alter the nociceptive response in rats submitted to the formalin test [32]. Furthermore, the tonic phase (i.e. the second phase) of the formalin test was demonstrated to be sensible to the antinociceptive effects of vPAG stimulation [20]. Thus it remains to be determined whether vPAG lesion would alter the nociceptive response in mice exposed or not to the oEPM. Yet, it seems relevant to investigate the role of other limbic structures (e.g., amygdala, hypothalamus) on the modulation of this type of pain inhibition. In this context, we have demonstrated that antinociception induced by EPM-open arm confinement was completely blocked by intra-amygdala injection of midazolam [55].

The unexpected absence of effect followed by dPAG lesion on nociception remains unclear. Moreover two types of neurons in rostral ventromedial medulla (RVM), the so-called on and off cells, seem to be involved in nociceptive modulation [73]. The latter exerts a net inhibitory effect on nociception while the former exerts a facilitatory modulation. Both on and off cells respond to manipulations of the ventral portion of the PAG that produce behavioral analgesia, which indicates that either or both could relay the descending influence of the PAG on nociception [28]. Although the dorsolateral PAG does not project directly to the RVM it can influence both medial and lateral medulla via a projection to the cuneiform nucleus [for a review, see Ref. [39]], suggesting that both on and off cells would have lost their control on nociception in dPAG lesioned mice. If so, other brain structures (e.g., amygdala, hypothalamus, anterior cingulate [11] or even the vPAG) might assume the modulation of this form of environmentally induced antinociception.

Regarding the participation of dPAG on modulation of the anxiety-like behaviors in the EPM, present results demonstrated that bilateral lesion of dPAG selectively attenuated anxiety indices. dPAG bilaterally lesioned mice increased percent of open arms entries and percent of open arms time in the sEPM. It is particularly important to note that these anxiolytic-like effects of dPAG lesion were seen in the absence of changes to the primary index

of general locomotor activity in the maze, namely, closed arm entries (e.g., Refs. [29,62]). However, the anxiolysis followed by dPAG lesion was not observed when mice received prior formalin injection. In other words, concurrent nociceptive stimulation prevented the antianxiety effects of dPAG bilateral lesion. Corroborating these results, previous findings from our laboratory have demonstrated that concurrent nociceptive stimulation impaired the anxiolytic effect of midazolam injected into the PAG in mice [52]. Furthermore, it was demonstrated that low and mild levels of nociception, produced by intra-articular injection of uric acid at 3.75% or 7.5%, respectively, prevented the anxiolytic-like effect of diazepam (1 mg/kg) in the plus-maze [27]. The authors suggested that the anxiolytic-like effect of diazepam may be abolished by cytokines, prostaglandins and tumor necrosis factors (TNF), produced during the inflammatory process. In this context, it has been reported that administration cytokine, interleukin-1 beta, produces anxiety-like behavior in rats in the plus-maze and open field tests and induces an increase in plasma prostaglandin E2 and corticosterone [65].

Precisely how concurrent nociceptive stimulation abolished the anxiolytic effect of dPAG lesion is also unclear. In fact, formalin injection also impaired the antianxiety effects produced by intra-PAG infusion of midazolam [52]. Considering that formalin injection may have induced hypothalamus–pituitary–adrenal activation leading to increases in ACTH and corticosterone plasmatic levels [71], which in turn could have enhanced anxiety [66], its effects could have influenced open arm exploration. In addition, nociception could have impaired the locomotion in the sEPM, which in turn would affect the anxiolysis produced by dPAG lesion. However, both hypotheses were not confirmed since a similar pattern of maze exploration observed in animals that received dPAG bilateral lesion in the presence and absence of concurrent nociceptive stimulation (see Figs. 4 and 5). In other words, it suggests that pain per se does not significantly affect the conventional measures of anxiety (% open arm entries, % open arm time) and locomotor activity (closed arm entries) in the sEPM.

Furthermore, previous evidence has shown that pain can activate the ventrolateral column of PAG and other structures of the brain aversive system such as anterior hypothalamus [48] and amygdala [12,38,54,69]. Moreover, even though the anxiety-like parameters have not been altered, it did not exclude the activation of other brain structures while the animals are under concurrent nociceptive stimulation. In other words, pain stimulus might activate other structures that maintain the avoidance of the open arms even though the animals are with the dPAG lesioned. This may lead mice to spend more time in a secure place until the injury is healed up. Although attractive, such hypothesis remains to be empirically tested.

It is noteworthy that in the present study lesions of the dPAG were not circumscribed to this midbrain structure. NMDA injection also reached structures of the midbrain tectum, provoking neuronal lesion in the superior and inferior colliculi. As previously reported, electrolytic [7] and chemical [24] lesion of PAG also provokes neuronal death in sites located at dorsal midbrain, such as the superior and inferior colliculi. It has been reported that both superior and inferior colliculi also belong to the brain aversive system [10,59], which also includes the medial hypothalamus, amygdala and dorsal periaqueductal gray [30]. It has been proposed that neurons in the inferior colliculus are filters for sounds that require immediate action, such as certain sounds made by prey, predators and conspecifics [10,14]. The deep layers of the superior colliculus has been implicated not only in the production of orienting movements of the eyes and head but also in the mediation of defensive movements together with cardiovascular changes that would be appropriate for a sudden emergency such as the appearance of a predator, or an object on collision course

[10,19]. These evidences are suggestive that lesions of superior and inferior colliculi could sum to the anxiolytic-like effects produced by dPAG lesion recorded in mice that had not received concurrent nociceptive stimulation. However, bilateral lesions of superior and inferior colliculi did not alter any behavior recorded in the sEPM. These results suggest that the anxiety-like behaviors observed in the sEPM do not involve the participation of superior and inferior colliculi, but certainly depend on the dPAG activation in mice.

Acknowledgements

We thank Rosana Finoti Pupim Silva and Cláudia Solano Rocha for the excellent technical assistance. This study was supported by FAPESP, CNPq and PADC/FCF-UNESP. J. Mendes-Gomes was supported by FAPESP fellowship (05/01988-3) and R.L. Nunes-de-Souza received a CNPq research fellowship (309407/2006-0).

References

- Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 1995;60:91–102.
- Albe-Fessard D, Giamberardino MA, Rampim O. Comparison of different animal models of chronic pain. *Adv Pain Res Ther* 1990;13:11–25.
- Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 1994;17:379–89.
- Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control system: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 1984;7:309–38.
- Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 1995;46:575–605.
- Bellgowan PS, Helmstetter FJ. Neural systems for the expression of hypoaesthesia during nonassociative fear. *Behav Neurosci* 1996;110:727–36.
- Blanchard DC, Williams G, Lee MC, Blanchard RJ. Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiol Psychol* 1981;9:157–63.
- Bolles RC, Fanselow MS. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci* 1980;3:291–322.
- Bon K, Wilson SG, Mogil JS, Roberts WJ. Genetic evidence for the correlation of deep dorsal horn Fos protein immunoreactivity with tonic formalin pain behavior. *J Pain* 2002;3:181–9.
- Brandão ML, Troncoso AC, De Souza Silva MA, Huston JP. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol* 2003;463:225–33.
- Brooks J, Tracey I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J Anat* 2005;207:19–33.
- Carrasquillo Y, Gereau RW. Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. *J Neurosci* 2007;27:1543–51.
- Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behaviour: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 1993;58:27–47.
- Casseday JH, Covey E. A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain Behav Evol* 1996;47:311–36.
- Coderre TJ, Fundytus ME, Mckenna JE, Dalal S, Melzack R. The formalin test: a validation of the weighted scores method of behavioural pain rating. *Pain* 1993;54:43–50.
- Conceição IM, Maiolini Jr M, Mattia N, Vital MA, Santos BR, Smaili S, et al. Anxiety-induced antinociception in the mouse. *Braz J Med Biol Res* 1992;25:831–4.
- Cornélio AM, Nunes-de-Souza RL. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: a non-opioid type of pain inhibition? *Physiol Behav* 2009;96:440–7.
- Deacon RMJ, Croucher A, Rawlins JNP. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res* 2002;132:203–13.
- Dean P, Redgrave P, Westby M. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci* 1989;12:137–47.
- De Luca-Vinhas MCZ, Macedo CE, Brandão ML. Pharmacological assessment of the freezing, antinociception, and exploratory behaviour organized in the ventrolateral periaqueductal gray. *Pain* 2006;121:94–104.
- Dennis SG, Melzack R. Comparison of phasic and tonic pain in animals. In: Bonica JJ, editor. *Advances in pain research and therapy*, vol. 3. New York: Raven Press; 1979. p. 747–60.
- Depaulis A, Keay KA, Bandler R. Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region of the rat. *Exp Brain Res* 1992;90:307–18.
- Depaulis A, Keay KA, Bandler R. Quiescence and hyporeactivity evoked by activation of cell bodies in the ventrolateral midbrain periaqueductal gray of the rat. *Exp Brain Res* 1994;99:75–83.
- Dielenberg RA, Leman S, Carrive P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioural responses to cat odor exposure in rats. *Behav Brain Res* 2004;153:487–96.
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161–74.
- Fanselow MS. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray matter*. New York: Plenum Press; 1991. p. 1–8.
- Fernández-Guasti A, Reyes R, Martínez-Mota L, López-Muñoz FJ. Influence of inflammatory nociception on the anxiolytic-like effect of diazepam and buspirone in rats. *Psychopharmacology* 2005;180:399–407.
- Fields HL, Basbaum AI, Heinricher MM. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMahon SB, Koltzenburg M, editors. *Wall and Melzack's textbook of pain*. 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier; 2006. p. 125–42.
- File SE. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott JM, Heal DJ, Marsden CA, editors. *Experimental approaches to anxiety and depression*. Chichester: Wiley; 1992. p. 25–44.
- Graeff FG. Brain defense systems and anxiety. In: Roth M, Burrow GD, Noyes R, editors. *Handbook of anxiety*, vol. 3. New York: Elsevier; 1990. p. 307–54.
- Graeff FG. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:239–59.
- Haghighparast A, Ahmad-Molaei L. Effects of electrolytic lesion of dorsolateral periaqueductal gray on analgesic response of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis in rat. *Neurosci Lett* 2009;451:165–9.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1984;327:1–5.
- Harris JA. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. *J Physiol Paris* 1996;90:15–25.
- Heeb MM, Yahr P. Cell-body lesions of the posteriodorsal preoptic nucleus or posteriodorsal medial amygdala, but not the parvocellular subparafascicular thalamus, disrupt mating in male gerbils. *Physiol Behav* 2000;68:317–31.
- Helmstetter FJ, Tershner SA. Lesions of the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla disrupt antinociceptive but not cardiovascular aversive conditional responses. *J Neurosci* 1994;14:7099–108.
- Hilton SM, Redfern WS. A search for brainstem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *J Physiol* 1986;378:213–28.
- Ji G, Fu Y, Ruppert KA, Neugebauer V. Pain-related anxiety like behaviour require CRF1 receptors in the amygdala. *Mol Pain* 2007;3:1–5.
- Keay KA, Bandler R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev* 2001;25:669–78.
- Keay KA, Bandler R. Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculation. *Exp Physiol* 2002;87:275–9.
- Kelly DD. *Stress induced analgesia*, vol. 467. New York: NY Academy of Sciences; 1986.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001;53:597–652.
- Lee C, Rodgers RJ. Antinociceptive effects of plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. *Psychopharmacology (Berlin)* 1990;102:507–13.
- Lee C, Rodgers RJ. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. *Behav Pharmacol* 1991;2:491–6.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berlin)* 1987;92:180–5.
- Lovick TA. Interactions between descending pathways from the dorsal and ventrolateral periaqueductal gray matter in the rat. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray: functional, anatomical and neurochemical organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 101–20.
- Lovick TA. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. *Prog Neurobiol* 1993;40:631–44.
- Lumb BM. Hypothalamic and midbrain circuitry that distinguishes between escapable and inescapable pain. *News Physiol Sci* 2004;19:22–6.
- Lumb BM, Parry DM, Semenenko FM, McMullan S, Simpson DA. C-nociceptor activation of hypothalamic neurones and the columnar organisation of their projections to the periaqueductal grey in the rat. *Exp Physiol* 2002;87:123–8.
- Maione S, Oliva P, Marabese I, Palazzo E, Rossi F, Berrino L, et al. Periaqueductal gray matter metabotropic glutamate receptors modulate formalin-induced nociception. *Pain* 2000;85:183–9.
- McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett* 1996;208:45–8.
- Mendes-Gomes J, Nunes-De-Souza RL. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. *Brain Res* 2005;1047:97–104.
- Morgan MM. Differences in antinociception evoked from dorsal and ventral regions of the caudal and periaqueductal gray matter. In: Depaulis A, Bandler R, editors. *The midbrain periaqueductal gray: functional, anatomical and neurochemical organization*. New York: Plenum Press; 1991. p. 139–50.
- Neugebauer V, Li W, Bird GC, Han JS. The amygdala and persistent pain. *Neuroscientist* 2004;10:221–34.
- Nunes-De-Souza RL, Canto-De-Souza A, Da-Costa M, Fornari RV, Graeff FG, Pela IR. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology (Berlin)* 2000;150:300–10.
- Parry DM, Semenenko FM, Conley RK, Lumb BM. Noxious somatic inputs to hypothalamic-midbrain projection neurones: a comparison of the columnar organisation of somatic and visceral inputs to the periaqueductal grey in the rat. *Exp Physiol* 2002;87:117–22.

- [57] Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. California: Academic Press; 2001.
- [58] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149–67.
- [59] Redgrave P, Dean P, Souki W, Lewis G. Gnawing and changes in reactivity produced by microinjections of picrotoxin into the superior colliculus of rats. *Psychopharmacology* 1981;75:198–203.
- [60] Rodella L, Rezzani R, Gioia M, Tredici G, Bianchi R. Expression of Fos immunoreactivity in the rat supraspinal regions following noxious visceral stimulation. *Brain Res* 1998;47:357–66.
- [61] Rodgers RJ. Neuropharmacological aspects of adaptative pain inhibition in murine “Victims” of aggression. *Aggress Behav* 1995;21:29–39.
- [62] Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;52:297–303.
- [63] Rodgers RJ, Lee C, Shepherd JK. Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology (Berlin)* 1992;106:102–10.
- [64] Siegfried B, Frischknecht HR, Nunes-De-Souza RL. An ethological model for the study of activation and interaction of pain, memory and defensive systems in the attacked mouse. Role of endogenous opioids. *Neurosci Biobehav Rev* 1990;14:481–90.
- [65] Song C, Li X, Leonard BE, Horrobin DF. Effects of dietary n-3 or n-6 fatty acids on interleukin-1beta-induced anxiety, stress, and inflammatory responses in rats. *J Lipid Res* 2003;44:1984–91.
- [66] Steimer T, Driscoll P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. *Stress* 2003;6:87–100.
- [67] Stephens DN, Meldrum BS, Weidmann R, Schneider C, Grutzner M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? *Psychopharmacology (Berlin)* 1986;90:166–9.
- [68] Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felicio LF, Canteras NS. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioural responses. *J Neurosci* 2006;26:2583–9.
- [69] Tanimoto S, Nakagawa T, Yamauchi Y, Minami M, Satoh M. 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* 2003;18:2343–50.
- [70] Taukulis HK, Goggin CE. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. *Behav Neural Biol* 1990;53:205–16.
- [71] Taylor BK, Akana SF, Peterson MA, Dallman MF, Basbaum AI. Pituitary-adrenocortical responses to persistent noxious stimuli in the awake rat: endogenous corticosterone does not reduce nociception in the formalin test. *Endocrinology* 1998;139:2407–13.
- [72] Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5–17.
- [73] Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev* 2004;46:295–309.

Poema: Das Pedras

Cora Carolina

Ajuntei todas as pedras

que vieram sobre mim.

*Levantei uma escada muito
alta*

e no alto subí.

Teci um tapete floreado

e no sonho me perdi.

Uma estrada,

um leito,

uma casa,

um companheiro.

Tudo de pedra.

Entre pedras

cresceu a minha poesia.

Minha vida...

Quebrando pedras

e plantando flores.

*Entre pedras que me
esmagavam*

Levantei a pedra rude

dos meus versos.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)