

Felipe Vanz

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL E FARMACOLÓGICA DA
NOCICEPÇÃO CUTÂNEA E ARTICULAR INDUZIDA POR
FORMALINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vanz, Felipe

Análise comportamental e farmacológica da nocicepção cutânea e articular induzida por Formalina / Felipe Vanz ; orientador, Carlos Rogério Tonussi - Florianópolis, SC, 2014.

105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Nocicepção. 3. Emocionalidade. 4. Formalina. 5. Intra-articular. I. Tonussi, Carlos Rogério. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

“Análise comportamental e farmacológica da nociceção cutânea e articular induzida por formalina”

por

Felipe Vanz

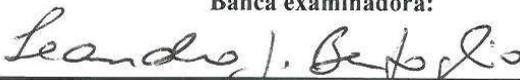
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 08/FMC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

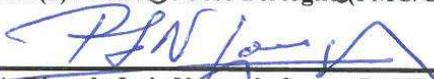


Prof(a). Dr(a). Carlos Rogério Tonussi
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



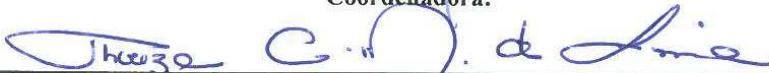
Prof(a). Dr(a). Leandro José Bertoglio (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Ricardo Luiz Nunes de Souza (PANT/FCFAR/UNESP)

Prof(a). Dr(a). Giles Alexander Rae (FMC/CCB/UFSC)

Coordenadora:



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos Rogério Tonussi, pela confiança depositada e disposição em me acompanhar e orientar na realização desse trabalho, bem como pelo crescimento pessoal proporcionado.

Aos professores, Dr. Giles Alexander Rae, Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, bem como ao Dr. Geison Souza Izídio, por aceitarem o convite para compor a banca e pela colaboração no aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, Alessandra, Eduardo, Flora, Franci Ellen, Lucas, Maíra, Taciane, Tiago e Vanessa pela paciência, disposição, e por tudo que me ensinaram.

Aos demais professores da Pós-Graduação em Farmacologia pela contribuição na minha formação.

Aos meus pais, Carlos e Salete, pelo esforço e apoio constantes para que eu pudesse ter uma formação concreta, bem como pelas influências positivas para a construção do meu caráter e educação.

À Mariane Carolina de Almeida, por todo seu apoio e compreensão, me mostrando que com amor tudo é possível.

Aos demais amigos da pós-graduação, por toda a ajuda que me foi dada.

Aos demais funcionários do departamento por toda a contribuição durante a construção desse trabalho.

Enfim, a todos os que, de alguma maneira, colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

“Eu quis mudar o mundo, mas descobri que a única coisa que se pode mudar, com certeza, é a si próprio.”

(Aldous Huxley)

RESUMO

A dor clínica possui um caráter multidimensional, mas a sua dimensão afetiva é pouco explorada nos testes de nocicepção. Sendo assim, o presente trabalho objetivou comparar os modelos de nocicepção persistente cutânea e articular, através da observação comportamental e da manipulação farmacológica (morfina, midazolam e pentilenotetrazol), buscando um modelo mais preditivo para o desenvolvimento de fármacos analgésicos. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos (250-300 g), submetidos à administração intraplantar ou intra-articular de formalina 2%. Foram mensurados comportamentos nocifensivos e demais comportamentos habituais afetados pela nocicepção – o interesse pelo ambiente, evidenciado pela exploração vertical, e o interesse por si próprio, evidenciado pela autolimpeza. Um perfil distinto de respostas nocifensivas foi observado nos dois modelos. O lamber/morder de pata foi o comportamento induzido pela formalina intraplantar que demonstrou maior semelhança temporal com o levantar sustentado do membro, induzido pela formalina intra-articular. A formalina intraplantar suscitou comportamento proativo, enquanto a formalina intra-articular produziu comportamento passivo. Ainda, a formalina intra-articular promoveu maior redução da exploração vertical, enquanto que ambos os estímulos atenuaram a expressão da autolimpeza de maneira semelhante. A morfina (1,0 e 4,0 mg/kg) reduziu a expressão dos comportamentos de lamber/morder a pata (modelo intraplantar) e levantar sustentado de membro (modelo intra-articular) em ambas as fases do teste da formalina. Além disso, a morfina reduziu a exploração vertical nos animais do modelo intraplantar (0,4, 1,0 e 4,0 mg/kg) e intra-articular (4,0 mg/kg), além da autolimpeza nos animais de ambos os modelos (4,0 mg/kg). O midazolam (0,5 mg/kg) e pentilenotetrazol (15 mg/kg) atenuaram somente a resposta nocifensiva de lamber/morder a pata, enquanto que a autolimpeza e a exploração vertical foram atenuadas, respectivamente, apenas no modelo intraplantar. Assim, este estudo sugere que a formalina intra-articular pode se correlacionar melhor com a dor clínica em humanos, por induzir comportamento mais relacionado à depressão e, portanto, poderia ser uma plataforma mais preditiva para o desenvolvimento de fármacos analgésicos. Sugerimos que a restauração dos comportamentos normais de atenção ao ambiente e consigo próprio seriam propriedades desejáveis em um analgésico, porém, nenhum fármaco utilizado aqui restaurou estes comportamentos. Curiosamente, o analgésico padrão – morfina – acentuou o efeito depressivo da nocicepção sobre estes comportamentos.

Palavras-chave: Nocicepção. Emocionalidade. Formalina. Intra-articular.

ABSTRACT

Clinical pain has a multidimensional character, but its affective dimension of pain is underexplored in nociceptive tests. Therefore, this study aimed to refine the models of persistent cutaneous and articular nociception through behavioral and pharmacological (morphine, midazolam and pentylenetetrazole) approaches seeking a more predictive model for the development of analgesic drugs. For this purpose, male Wistar rats (250-300 g) were subjected to administration of formalin 2% in to the hindpaw or knee-joint. Subsequently, nocifensive behaviors, as well as ordinary behaviors affected by nociception – the attention to the environment, as evidenced by the rearing, and the attention to itself, as evidenced by the grooming. A distinct profile of nocifensive responses was observed in the two models. The licking/biting behavior induced by formalin in the hindpaw showed temporal similarity to the lifting of hindlimb induced by formalin in the knee-joint. Further, animal undergoing paw injection of formalin exhibited a proactive coping behavior, while the ones receiving knee-jointinjection showed a passive coping behavior. The knee-joint formalin administration determined a greater reduction of rearing, while both kinds of stimuli reduced similarly the grooming expression. The administration of morphine (1.0 and 4.0 mg/kg) reduced both the expression of licking/biting paw (hindpaw model) and sustained lifting of hindlimb behaviors (knee-joint model) in both phases of the formalin test. Furthermore, the morphine reduced the rearing differently between animals of the hindpaw (0.4, 1.0 and 4.0 mg/kg) and knee-joint models (4.0 mg/kg) besides reducing the grooming similarly in animals of both models (4.0 mg/kg). Both, midazolam (0.5 mg/kg) and pentylenetetrazole (15 mg/kg), attenuated the licking/biting behavior, but each reduced grooming and rearing, respectively, in hindpaw model only. Thus, these results suggest that knee-joint model may be a better correlate to the human pain and could be a more predictive model for the development of analgesic drugs. We also suggest that the restoration of normal attentional behaviors either to the environment or to itself, are desirable properties for a painkiller, however, no drug used herein restored these behaviors. Interestingly, the standard analgesic morphine accentuated the depressive effect of nociception on these behaviors.

Keywords: Nociception. Emotionality. Formalin. knee-joint.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Foto ilustrativa da caixa de observação.....	36
Fig. 2	Perfil temporal da expressão de diferentes respostas nocifensivas, mediante a administração de salina ou formalina 2% pela via intraplantar ou intra-articular.....	42
Fig. 3	Perfil temporal de expressão do comportamento de imobilidade, mensurado durante a evocação do levantar sustentado do membro, em animais submetidos à administração de salina ou formalina 2% pela via intraplantar ou intra-articular.....	43
Fig. 4	Perfil temporal de expressão dos comportamentos relacionados à emocionalidade: exploração vertical (A) e a autolimpeza (B), mediante a administração de salina ou formalina 2% pela via intraplantar ou intra-articular.....	45
Fig. 5	Avaliação da atividade locomotora em animais submetidos à administração de salina ou formalina 2% pela via intraplantar ou intra-articular.....	46
Fig. 6	Influência da morfina sobre a expressão de diferentes respostas nocifensivas induzidas pela formalina intraplantar ou intra-articular.....	48
Fig. 7	Influência da morfina sobre o perfil de expressão do comportamento de exploração vertical em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular.....	50
Fig. 8	Influência da morfina sobre o perfil de expressão do comportamento de autolimpeza em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular.....	51
Fig. 9	Influência das diferentes doses de morfina sobre a atividade locomotora em animais do grupo controle (sem formalina) (A) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar (B) ou intra-articular (C).....	52
Fig. 10	Influência do midazolam sobre a expressão de diferentes respostas nocifensivas induzidas pela formalina intraplantar ou intra-articular.....	54
Fig. 11	Influência do midazolam sobre o perfil de expressão do comportamento de exploração vertical em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando	

	tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular.....	55
Fig. 12	Influência do midazolam sobre o perfil de expressão do comportamento de autolimpeza em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular.....	57
Fig. 13	Influência do midazolam sobre a atividade locomotora em animais do grupo controle (sem formalina) (A) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar (B) ou intra-articular (C).....	58
Fig. 14	Influência do pentilenotetrazol sobre a expressão de diferentes respostas nocifensivas induzidas pela formalina intraplantar ou intra-articular.....	60
Fig. 15	Influência do pentilenotetrazol sobre o perfil de expressão do comportamento de exploração vertical em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular.....	61
Fig. 16	Influência do pentilenotetrazol sobre o perfil de expressão do comportamento de autolimpeza em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular.....	62
Fig. 17	Influência do pentilenotetrazol sobre a atividade locomotora em animais do grupo controle (sem formalina) (A) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar (B) ou intra-articular (C).....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDZs – Benzodiazepínicos
DLF – Funículo dorso-lateral
DLPT – Região dorso-lateral da ponte
F1 – Fase 1
F2 – Fase 2
GABA – Ácido gama aminobutírico
i.p. – Intraperitoneal
LCE – Labirinto em cruz elevado
MDZ – Midazolam
MOR – Morfina
NRM – Núcleo magno da rafe
PTZ – Pentilenotetrazol
RVM – Porção ventro-medial do bulbo
s.c. – Subcutânea
SCP – Substância cinzenta periaquedutal
SCPdl – Coluna dorso-lateral da substância cinzenta periaquedutal
SCPvl – Coluna ventro-lateral da substância cinzenta periaquedutal
SNC – Sistema nervoso central
VPL – Tálamo ventral póstero-lateral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES SOBRE DOR.....	20
1.1.1 Componente sensorial da dor: vias nociceptivas	20
1.1.2 Vias descendentes modulatórias da dor	21
1.1.3 Componente afetivo-motivacional da dor e o sistema límbico	25
1.1.4 Dor em regiões superficiais e profundas	26
1.2 TESTE DA FORMALINA	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 METODOLOGIA	33
4.1 ANIMAIS.....	33
4.2 DROGAS E SOLUÇÕES	33
4.3 TESTE DE FORMALINA INTRAPLANTAR E INTRA-ARTICULAR: PADRONIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS.....	34
4.4 TESTE DE FORMALINA INTRAPLANTAR E INTRA-ARTICULAR: PADRONIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS NÃO-NOCICEPTIVOS (RELACIONADOS COM A EMOCIONALIDADE).....	35
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA	36
4.6 CAIXA DE OBSERVAÇÃO.....	36
4.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	37
4.7.1 Padronização dos comportamentos induzidos pela administração de formalina intraplantar ou intra-articular.....	37
4.7.2 Avaliação dos comportamentos induzidos pela formalina intraplantar ou intra-articular mediante a manipulação comportamental induzida por drogas (morfina, midazolam ou pentilenotetrazol).....	37
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
5 RESULTADOS	41
5.1 PADRONIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR..	41
5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR	47
5.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MIDAZOLAM SOBRE OS	

COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR.....	53
5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DO PENTILENOTETRAZOL SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR.....	58
6 DISCUSSÃO.....	65
6.1 PADRONIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR .	66
6.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR.....	75
6.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MIDAZOLAM SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR.....	80
6.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DO PENTILENOTETRAZOL SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR.....	85
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência subjetiva, de difícil definição, embora todos saibam o que ela significa (RANG *et al.*, 2007). A Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP) define dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008). Esta definição implica que a dor possui um caráter multidimensional, pois envolve componentes sensorial-discriminativos, motivacional-afetivos, autonômicos e motor-reflexivos (CRAIG *et al.*, 2003, TANIMOTO *et al.*, 2003). Apesar dos sistemas neurais do componente sensorial da dor estarem mais bem descritos na literatura, os relacionados ao componente afetivo negativo estão menos claros (TANIMOTO *et al.*, 2003). Ainda, considerar somente as características sensoriais da dor e ignorar suas propriedades motivacionais e afetivas é olhar somente para parte do problema e, possivelmente, nem mesmo a parte mais importante deste (MELZACK; CASEY, 1968 apud FIELDS, 1999).

Além disso, a dor possui um caráter variável e produz sensações diversas. As respostas evocadas pela dor de origem profunda (proveniente de músculos, articulações e vísceras) são bastante diferentes das evocadas pela dor de origem cutânea. Isso porque, a dor cutânea produz respostas de luta ou fuga, vigilância aumentada, hiperatividade, hipertensão e taquicardia, enquanto que a dor profunda geralmente evoca uma reação caracterizada por quiescência, vigilância diminuída, reatividade diminuída, sudorese, náusea e, frequentemente, bradicardia e hipotensão. Tão diferentes são as respostas afetivas, que as representações centrais de dor profunda e cutânea são prováveis de serem diferentes (KEAY *et al.*, 2000; LEWIS, 1942 apud KEAY; BANDLER, 2002).

Neste contexto, o teste de formalina clássico (que será descrito mais adiante), desenvolvido por Dubuisson e Dennis em 1977, ainda é muito utilizado na busca de novas drogas com potencial analgésico. No entanto, esse teste de nocicepção geralmente é conduzido levando-se em consideração somente as respostas nocifensivas, desprezando os comportamentos habituais utilizados como parâmetros de emocionalidade (ADIBPOUR *et al.*, 2014). Além disso, o teste da formalina clássico é baseado na administração de formalina em tecido cutâneo (superficial) e, portanto pode não ser o modelo mais adequado para o estudo da dor clínica persistente, como no caso da dor evocada em tecidos profundos.

1.1 CONSIDERAÇÕES IMPORTANTES SOBRE DOR

1.1.1 Componente sensorial da dor: vias nociceptivas

O termo nociceção está relacionado ao aspecto sensorial da dor e é definido como “os processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo”. Portanto, nociceção e dor não devem ser confundidos, pois são eventos que podem ocorrer de forma independente (LOESER; TREEDE, 2008).

Um estímulo nociceptivo comumente causa dano tecidual, ativando um grupo discreto de estruturas sensoriais periféricas chamadas nociceptores. Sabe-se que estas estruturas são terminações de fibras nervosas de pequeno diâmetro que podem ser não-mielinizadas (fibras C) ou pouco mielinizadas (fibras A δ). Anatomicamente, as fibras nervosas do tipo C e A δ alcançam e/ou circundam a lâmina mais externa do corno dorsal na medula espinal, onde penetram perpendicularmente e terminam principalmente nas lâminas superficiais (I ou II) ou se estendem para as lâminas mais profundas (V, VI, VII e X).

Está bem estabelecido na literatura que os nociceptores (também referidos como aferentes primários), podem ser ativados por estímulos de várias naturezas, como, mecânicos, térmicos e químicos (COUTAUX *et al.*, 2005). Após sua ativação, os nociceptores transmitirão a informação nociceptiva proveniente da periferia para os neurônios nociceptivos de segunda ordem, cujos corpos celulares estão localizados na medula espinal. De fato, estudos eletrofisiológicos do corno dorsal identificaram três tipos de neurônios que recebem sinapses de fibras aferentes sensoriais primárias: neurônios nociceptivos específicos, neurônios nociceptivos não-específicos (também conhecidos como neurônios de faixa dinâmica ampla, do inglês, WDR - *wide dynamic range neurons*) e neurônios não-nociceptivos específicos.

Os neurônios nociceptivos específicos respondem apenas a estímulos periféricos de alta intensidade mediados a partir das fibras do tipo A δ e C, as quais provêm de uma grande variedade de locais (pele, articulações e órgãos). Por outro lado, os neurônios WDR respondem tanto à baixa quanto a alta intensidade de estímulos periféricos, provenientes de vísceras, músculos e articulações. Ainda, estes neurônios podem ser excitados por estímulos provenientes tanto de fibras não-nociceptivas (A β) quanto de fibras nociceptivas (A δ e C). A última classe de neurônios de projeção ascendente, os neurônios não-nociceptivos, respondem somente à baixa intensidade de estímulos periféricos (CALVINO; GRILO, 2006).

Além disso, os axônios dos neurônios nociceptivos de segunda ordem constituem tratos espinais ascendentes que então se projetam para vários níveis supraespinais, onde geralmente estabelecem sinapses com outros neurônios nociceptivos (neurônios de terceira ordem). Os dois principais tratos implicados são:

- **Trato espinotalâmico** - conduz informações nociceptivas provenientes da medula espinal diretamente para o tálamo ventro-pósterolateral (VPL) e certos núcleos talâmicos mediais. Por sua vez, os neurônios no tálamo VPL projetam seus axônios principalmente para a área somatossensorial S1 e S2 do córtex parietal, levando à gênese da percepção da dor (qualidade, intensidade, localização e duração). Por outro lado, os neurônios nociceptivos do tálamo medial projetam seus axônios principalmente para o córtex frontal, córtex insular e córtex cingulado anterior, gerando respostas emocionais mais complexas à dor (CALVINO; GRILO, 2006).
- **Trato espino-retículo-mesencefálico** - pode ser subdividido em *trato spinomesencefálico* e *trato espinoreticular*. O primeiro, o *trato spinomesencefálico*, compreende as projeções espinais para regiões como a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e o núcleo parabraquial da ponte, o qual se projeta para a região da amígdala (via espinoparabraquioamidalóide) ou hipotálamo (via espinoparabraquio-hipotalâmica). Portanto, o *trato spinomesencefálico* está mais relacionado com a dimensão afetivo-motivacional e componente descendente modulatório da dor (MILLAN, 1999). O *trato espinoreticular*, por sua vez, conduz informações nociceptivas provenientes da medula espinal diretamente para a formação reticular. Esta via nociceptiva é ligada ao Sistema Reticular Ativador Ascendente, bem como a SCP, e envia projeções para o tálamo, córtex e estruturas do sistema límbico.

1.1.2 Vias descendentes modulatórias da dor

A existência de um sistema modulatório da dor foi mais claramente proposta em 1965, com a teoria de controle da dor por comporta, proposta por Wall e Melzack. Posteriormente, Wall (1967) sugeriu que estruturas do tronco encefálico seriam capazes de aumentar a atividade de mecanismos inibitórios locais a nível espinal, mediante a

estimulação cutânea de gatos descerebrados. A evidência de que um sistema descendente poderia seletivamente modular a dor foi demonstrada, a partir da observação de que a estimulação focal de uma área encefálica resultava em uma resposta de antinocicepção. Sendo assim, a SCP foi a primeira estrutura na qual se demonstrou que a estimulação elétrica produzia uma resposta do tipo antinociceptiva em ratos (REYNOLDS, 1969), e analgesia em humanos (para revisão, ver BOIVIE; MEYERSON, 1982).

Desde então, diversas estruturas supraespinais que desempenham um papel modulatório importante sobre a dor, incluindo hipotálamo, região dorso-lateral da ponte (DLPT) e porção rostral da região ventromedial do bulbo (RVM) foram encontradas. Além disso, no RVM estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células-on e células-off, as quais vêm sendo implicadas na modulação nociceptiva (FIELDS ; BASBAUM, 1999; FIELDS, 2005). Isso porque, no teste de retirada da cauda, foi demonstrado que a atividade aumentada das células-off promoveu uma resposta inibitória à estimulação nociceptiva térmica, enquanto que a ativação das células-on pareceu facilitar os mecanismos nociceptivos no corno dorsal (FIELDS, 2004).

A SCP possivelmente desempenha o principal papel na inibição descendente da dor (STAMFORD, 1995). No entanto, embora a sua estimulação promova antinocicepção, poucas fibras da SCP projetam-se diretamente para o corno dorsal da medula espinal (BESSON, 1987). Em relação a isso, sabe-se que a SCP pode ser dividida em quatro colunas longitudinais que variam ao longo do seu eixo rostro-caudal, sendo: dorso-lateral, dorso-medial, lateral e ventro-lateral, as quais diferem entre si pelas características imunohistoquímicas, densidade de receptores, conexões e funções (BANDLER; SHIPLEY, 1994; BANDLER; KEAY, 1996). O maior eferente da coluna ventro-lateral da SCP (SCPvl) projeta-se para o núcleo magno da rafe (NRM) (CAMERON *et al.*, 1995), um importante núcleo serotonérgico localizado no RVM. Os neurônios do RVM, por sua vez, projetam-se ao longo do funículo dorsolateral (DLF) e terminam nas lâminas I, II e V do corno dorsal da medula espinal (BASBAUM *et al.*, 1978). Por outro lado, a coluna dorso-lateral da SCP (SCPdl) projeta axônios para a região dorso-lateral da ponte e para a região ventro-lateral do bulbo (CAMERON *et al.*, 1995). Dessa forma, mesmo que a SCP não possua neurônios descendentes noradrenérgicos e/ou serotonérgicos diretamente para a medula espinal, as diferentes colunas dessa estrutura se comunicam com sítios noradrenérgicos importantes para a modulação da dor a esse nível, incluindo os núcleos A5, A6 e A7 (BAJIC;

PROUDFIT, 1999), além dos núcleos serotoninérgicos (BAJIC; PROUDFIT, 1999). A contribuição destes núcleos noradrenérgicos na modulação da dor deve-se principalmente pela inibição dos neurônios pré-sinápticos e pós-sinápticos responsáveis pela transmissão da dor a nível medular, provavelmente sendo esse efeito mediado pela ação agonística da noradrenalina nos adrenorreceptores α -2 (para revisão, ver MILLAN, 2002). Isso porque, sabe-se que esses receptores estão acoplados a uma proteína G do tipo inibitória, o que parece implicar na resposta antinociceptiva mediada por esse receptor à nível medular.

Muitos neurotransmissores estão envolvidos na modulação da atividade da SCP e, portanto, interferem na nocicepção. Os opioides exógenos, como a morfina (MOR), mimetizam as ações analgésicas dos opioides endógenos por atuarem em sítios espinais e supraespinais. A nível espinal, o efeito dos opioides se deve principalmente a sua atividade agonística nos receptores opioidérgicos μ , κ e δ que, por sua vez, estão acoplados preferencialmente a uma proteína G do tipo inibitória. Como consequência, a ativação desses receptores (ou a estabilização dos mesmos em uma conformação estrutural ativa) promove a ativação de canais para o potássio e a inibição dos canais para o cálcio (para revisão, ver MILLAN, 1999), o que resulta na liberação reduzida de transmissores excitatórios (por exemplo, o glutamato).

O envolvimento dos opioides na inibição da dor mediada pela SCP foi evidenciado por Yaksh e Rudhy (1978), os quais demonstraram que a injeção de morfina na SCP foi capaz de promover uma antinocicepção duradoura, sensível à naloxona (um antagonista competitivo dos receptores opioides). No entanto, é válido destacar que a antinocicepção obtida com a estimulação da região dorsal da SCP é de natureza não-opioide, enquanto a antinocicepção opioide é obtida com a estimulação da região ventro-lateral da SCP (BLANDLER; SHIPLEY, 1994).

Quando agonistas μ -opioides são administrados sistemicamente ou localmente na SCP ou no RVM, ocorre um aumento na taxa de disparo das células-off, sendo posteriormente observado uma resposta de inibição do reflexo de retirada da cauda em resposta a estimulação térmica. Além disso, doses analgésicas de agonistas μ -opioides silenciam a atividade das células-on (FIELDS, 2004). Essa resposta é compatível com o encontro de um efeito analgésico, uma vez que a atividade das células-off foi encontrada por promover a inibição da nocicepção. Os agonistas opioides endógenos ou exógenos também podem interagir com neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos

presentes na SCP. Sendo assim, o efeito antinociceptivo promovido pelos opioides pode estar relacionado com um processo de desinibição da SCP (CHIENG; CHRISTIE, 1994), uma vez que os neurônios da SCP, os quais se projetam para o RVM, encontram-se sob inibição tônica por interneurônios GABAérgicos (para revisão, ver BEHBEHANI, 1995). Em contrapartida, Chieng e Christie (1994) também demonstraram em seus experimentos que a administração de opioides inibiu a atividade de neurônios glutamatérgicos presentes na SCP, mas se essa resposta contribui para a promoção de analgesia ainda não está clara. Além disso, os opioides também atuam em outras estruturas importantes na modulação da dor, como amígdala, hipotálamo e DLPT (para revisão, ver FIELDS, 2004).

O ácido gama aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, também fornece importantes contribuições na modulação da dor. A administração de agonistas do receptor GABA-A no RVM (GILBERT; FRANKLIN, 2001), ou a administração intra-cerebroventricular de benzodiazepínicos (BZDs) (TATSUO *et al.*, 1999), aumenta a nocicepção. De maneira oposta, injetados na medula, os BZDs produzem antinocicepção em muitos testes (NIV *et al.*, 1988; ZAMBOTTI *et al.*, 1991). Além disso, como já mencionado anteriormente, as vias de projeção excitatórias, provenientes da SCP, que se projetam para os neurônios do tronco encefálico estão sujeitas a um controle inibitório tônico pelos interneurônios GABAérgicos (para revisão, ver MILLAN, 1999). Sendo assim, não é difícil argumentar que muitos dos resultados contraditórios obtidos em testes nociceptivos mediante a administração de BDZs sistemicamente, são consequência da ampla distribuição do sistema GABAérgico a nível espinal e supraespinal. Alguns benzodiazepínicos, como por exemplo, o midazolam (MDZ), ainda podem ser biotransformados em outros metabólitos como a α -hidroximidazolam e o 4-hidroximidazolam, ambos farmacologicamente ativos e que, portanto, podem contribuir para a diversidade das repostas encontradas com a utilização dessas drogas.

Outra droga que pode servir como uma importante ferramenta farmacológica para o estudo da dor sob condições emocionais alteradas, é o pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista do receptor GABA-A que atua no mesmo sítio de ligação da picrotoxina (HUANG *et al.*, 2001). O PTZ pode ser considerado um protótipo de droga ansiogênica, sendo extensamente utilizado em modelos animais de ansiedade (JUNG; LAL; GATCH, 2002).

1.1.3 Componente afetivo-motivacional da dor e o sistema límbico

As emoções desagradáveis são componentes integrantes da dor, por apresentarem qualidades sensoriais únicas e por essas qualidades ocorrerem frequentemente dentro de um contexto que é ameaçador, como ocorre durante uma doença ou trauma físico. Portanto, a dor é acompanhada por desejos de terminar, reduzir ou escapar da sua presença. Parte desta dimensão afetiva da dor é o momento a momento desagradável, feito de emoções que pertencem ao presente ou futuro próximo, como angústia, ansiedade e medo (PRICE, 2000).

A dor persistente está fortemente associada com depressão e transtornos de ansiedade. A relação entre dor e aspectos afetivos negativos parece ser recíproca naqueles pacientes que sofrem de depressão e ansiedade, enquanto que o medo e/ou estresse podem inibir a dor (relatado na literatura como analgesia induzida por estresse) (NEUGEBAUER *et al.*, 2004; BUTLER; FINN, 2009), ou ainda, facilitá-la (JORUM, 1988). Já foi demonstrado que a ansiedade pode potencializar a dor em humanos (PLOGHAUS *et al.*, 2001) e que fármacos ansiolíticos ajudam no controle da dor (JANSSEN; ARNTZ, 1999). Em testes animais, observa-se também, a influência da ansiedade na nocicepção, porém, os resultados são variados. Fármacos ansiolíticos podem ter efeito hiponociceptivo (MARTINS; BASTOS; TONUSSI, 2006), hipernociceptivo (TATSUO *et al.*, 1999), ou nenhum efeito (GATCH, 1999; MARTINS; BASTOS; TONUSSI, 2006). Por outro lado, fármacos ansiogênicos podem induzir hiponocicepção (SHANNON; LUTZ, 2000; VELAZQUEZ *et al.*, 2006) ou nenhum efeito (MARTINS; BASTOS; TONUSSI, 2006).

Da mesma forma, estudos em humanos mostraram uma associação positiva entre depressão e distúrbios dolorosos crônicos (SULLIVAN, 1992). Além disso, é bem contemplado na literatura o uso de fármacos antidepressivos no tratamento da dor crônica (MICÓ *et al.*, 2006). De maneira semelhante, animais de modelos de dor neuropática evocam comportamentos do tipo depressivo, com alteração do volume da amígdala (GONÇALVES *et al.*, 2008). De fato, a amígdala parece ser um importante substrato neural para a interação entre dor e emoção. Através das conexões com áreas cerebrais envolvidas na nocicepção e dor, medo e ansiedade, atenção e cognição, função autonômica e respostas de estresse e no controle endógeno da dor, o núcleo central da amígdala parece exercer um papel chave na resposta emocional-afetiva da dor (NEUGEBAUER *et al.*, 2004). Foram demonstrados que diferentes núcleos da amígdala são ativados por estímulos químicos

somáticos e viscerais. A injeção intraplantar de formalina aumentou a expressão de RNAm para c-fos nos núcleos basolateral e lateral da amígdala, mas não no núcleo central da amígdala, enquanto a injeção intraperitoneal de ácido acético induziu fortemente a expressão de RNAm para c-fos no núcleo central, moderadamente no núcleo lateral e brandamente no núcleo basolateral da amígdala (NAKAGAWA *et al.*, 2003). Além disso, a lesão excitotóxica bilateral dos núcleos basolateral e central da amígdala aboliu a aversão condicionada ao local induzido por injeção intraplantar de formalina, enquanto a lesão do núcleo central da amígdala, mas não do núcleo basolateral, aboliu a aversão condicionada ao local induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético, em ambos os casos, sem alterar a expressão dos comportamentos nociceptivos induzidos pelos agentes nociceptivos. Isto demonstra diferentes contribuições dos núcleos da amígdala nos comportamentos afetivos negativos de dores químicas somáticas e viscerais (TANIMOTO *et al.*, 2003).

Um sistema que se origina do corno dorsal da medula espinal e se projeta através de núcleos do tálamo medial/intralaminar para o córtex cingulado anterior foi proposto como responsável pelo processamento do aspecto desagradável da dor (TREEDE *et al.*, 1999). A destruição de neurônios na região rostral, mas não caudal do córtex cingulado anterior, reduziu a aversão condicionada ao local induzida pela formalina (sugerindo o envolvimento do componente afetivo da dor) sem reduzir os comportamentos relacionados à nocicepção. Esse resultado demonstra a importância do córtex cingulado anterior nas respostas afetivas da dor (JOHANSEN *et al.*, 2001).

1.1.4 Dor em regiões superficiais e profundas

Como referido anteriormente, Thomas Lewis (1942) forneceu evidências de que a resposta afetiva evocada por dor de origem cutânea (caracterizada por luta ou fuga, vigilância aumentada, hiperatividade) é bastante diferente da suscitada por dor em tecido profundo (caracterizada por quiescência, vigilância diminuída, reatividade diminuída). Tão diferentes eram as respostas afetivas que Lewis (1942) supôs que as representações centrais de dor profunda e cutânea deveriam ser diferentes (LEWIS, 1942 apud KEAY; BANDLER, 2002). De fato, hoje é reconhecido que a nocicepção proveniente de tecidos cutâneos e profundos promove a ativação de diferentes regiões da SCP e amígdala, sendo que essas estruturas participam das respostas de medo e ansiedade, bem como da atividade das projeções modulatórias

descendentes da dor (KEYAY *et al.*, 2000; NEUGEBAUER *et al.*, 2004).

1.2 TESTE DA FORMALINA

O teste de formalina consiste na aplicação de um estímulo algésico químico, sendo utilizado como ferramenta para modelar uma condição de dor aguda e tônica. A administração de formalina promove a expressão de respostas nocifensivas em duas fases bem estabelecidas (fase I e II), separadas por um período quiescente (interfase) (MOGIL, 2009). McCall e colaboradores (1996) demonstraram haver ativação de fibras aferentes do tipo C durante todo o teste de formalina, de forma bifásica, com padrão análogo aos comportamentos induzidos pela formalina durante as fases I e II.

A fase I do teste da formalina, com duração de 5 minutos aproximadamente, parece ser resultante da ativação direta das fibras do tipo C e A δ pela formalina (PUIG; SORKIN, 1996). Posteriormente, observa-se uma fase de quiescência, sem manifestação comportamental, que é independente da concentração de formalina utilizada. Esse período interfase é pensado por ser resultado de uma ativa inibição da entrada nociceptiva (HENRY *et al.*, 1999).

A fase II do teste é caracterizada por reações inflamatórias e sensibilização central no corno dorsal da medula espinal (TJOLSEN *et al.*, 1992). A contribuição da estimulação de neurônios nociceptivos no desenvolvimento e manutenção dos comportamentos nociceptivos observados na fase II é sustentado pela observação de que o estímulo da formalina provoca liberação de neuromoduladores inflamatórios na medula espinal, como aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato) e substância P, que contribuem para sensibilização central (MALMBERG; YAKSH, 1992a, 1992b, 1995).

Os principais comportamentos nocifensivos induzidos pela formalina são: o lambe/morder a pata, a flexão tônica (levantar sustentado do membro) e a flexão fásica do membro. Todas as respostas aparecem imediatamente após a aplicação da formalina e desaparecem em uma ou duas horas, dependendo da concentração utilizada, porém, o edema produzido pela inflamação pode durar por vários dias (CAPONE; ALOISI, 2004). Matthies e Franklin (1992) demonstraram que após a descerebração de ratos os comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina se mantinham, o que sugere que estes comportamentos são organizados em estruturas não-corticais. Além disso, Wheeler-Aceto e Cowam (1991) demonstraram que os comportamentos induzidos pela formalina podem ser processados tanto em regiões espinais quanto

supraespinais. De fato, após a transecção espinal em ratos, o comportamento de lambar a pata foi totalmente abolido, sugerindo que este comportamento é processado em regiões supraespinais. Em contrapartida, o comportamento de flexão fásica da pata foi totalmente abolido durante a fase II do teste de formalina e parcialmente abolido durante a fase I, sendo assim sugerido que a expressão deste comportamento na fase I depende tanto de regiões espinais quanto supraespinais, enquanto que na fase II do teste, este comportamento parece ser processado exclusivamente em regiões supraespinais.

Outros locais de injeção, além da pata, foram utilizados no teste da formalina, a fim de fornecer novas contribuições que auxiliem no entendimento da transmissão nociceptiva e sua modulação. Martins e colaboradores (2006) demonstraram que a formalina aplicada via intra-articular, no joelho direito de ratos, suscitou uma resposta nocifensiva (levantar sustentado do membro), de maneira concentração-dependente, com padrão bifásico de expressão, separado por uma fase quiescente. Ainda, este perfil de expressão comportamental, encontrado no teste intra-articular, é semelhante ao relatado no teste da formalina na pata. No entanto, Melo (2009) demonstrou que a administração de formalina intraplantar e intra-articular promove diferenças substanciais quanto à expressão dos comportamentos habituais, não-nociceptivos. Dessa forma, foi observado que a administração de formalina em tecido subcutâneo promoveu uma maior expressão de comportamentos como o lambar do chão, morder a cauda, mexer e/ou ingerir o bolo fecal e defecação, do que quando comparado à formalina intra-articular. Por outro lado, a administração de formalina intra-articular suscitou comportamentos de bocejo e esconder a face. Sendo assim, o processamento do estímulo nociceptivo parece ser modificado na dependência do local de injeção em que a formalina é administrada (tecido profundo ou superficial), o que garante ao animal um repertório comportamental defensivo diferenciado (comportamentos nocifensivos e não-nociceptivos), a fim de que estes animais possam lidar de maneira mais apropriada com condições aversivas específicas (do inglês, *coping*).

2 JUSTIFICATIVA

O teste de formalina intraplantar é utilizado desde a década de 70, porém seu uso se baseia, quase que exclusivamente, na observação dos comportamentos nociceptivos reflexos induzidos, ignorando os comportamentos relacionados ao componente afetivo-motivacional, que poderiam ser úteis no entendimento da resposta aos fármacos, por exemplo. Por outro lado, a administração intra-articular de agentes irritantes em ratos, como a formalina, tem-se revelado um modelo importante para o estudo da dor em tecido profundo. Portanto, uma avaliação mais minuciosa comparativa do modelo intraplantar e intra-articular parece ser relevante na busca de um modelo mais preditivo para o desenvolvimento de fármacos analgésicos.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho objetiva comparar os modelos de nocicepção cutânea e articular, induzidos por formalina, através de uma abordagem etológica e farmacológica em busca de um modelo mais preditivo para o desenvolvimento de fármacos analgésicos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma análise etológica em ratos Wistar machos submetidos à administração de formalina 2% intraplantar ou intra-articular;
- Comparar a expressão dos comportamentos nociceptivos e não-nociceptivos induzidos pela administração de formalina 2% intraplantar ou intra-articular;
- Investigar a influência da manipulação farmacológica por uso de morfina (analgésico), midazolam (ansiolítico) e pentilenotetrazol (ansiogênico), sobre os padrões comportamentais induzidos pela formalina 2% intraplantar ou intra-articular.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Os animais utilizados nesse trabalho foram ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com peso aproximado de 250 - 300 gramas que foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC). Os animais foram agrupados em caixas contendo no máximo 5 animais e mantidos sob temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro (12 horas de claro e 12 horas de escuro) com livre acesso à água e à ração. Os experimentos foram realizados entre 9:00 e 15:00 horas, após ambientação prévia dos animais, por pelo menos 1 hora, na sala onde os experimentos foram realizados. Os experimentos foram conduzidos seguindo os preceitos éticos definidos pela Associação Internacional para estudo da Dor (IASP, 1983) e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC (Protocolo: P00723).

4.2 DROGAS E SOLUÇÕES

Para a realização dos experimentos, foram utilizados:

- Sulfato de Morfina (Dimorf®, Cristália, Brasil) diluído em solução fisiológica de NaCl 0,9% (Salina 0,9%), nas concentrações de 0,4, 1,0 e 4,0 mg/kg, administrado pela via subcutânea num volume de injeção de 0,1 ml/100 g de peso corporal;
- Cloridrato de Midazolam (Hipolabor, Brasil) diluído em solução salina 0,9%, na concentração de 0,5 mg/kg, administrado pela via intraperitoneal num volume de 0,1 ml/100 g de peso corporal;
- Pentilenotetrazol (Pentylenetetrazole®, Sigma, EUA) dissolvido em solução salina 0,9%, na concentração de 15 mg/kg, administrado pela via intraperitoneal num volume de 0,1 ml/100 g de peso corporal.

- Formalina (Formaldeído 37%, Merck AG, Alemanha), diluída a 2% em solução salina 0,9%, sendo considerada a concentração inicial da formalina a ser diluída como 100%.

Os animais considerados do grupo controle de cada droga foram tratados unicamente com o veículo (solução salina 0,9%).

4.3 TESTE DE FORMALINA INTRAPLANTAR E INTRA-ARTICULAR: PADRONIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS NOCICEPTIVOS

Para esse estudo foram injetados 50 µl de formalina 2% na pata direita traseira, por via subcutânea (avaliação da dor superficial) (referido como “modelo intraplantar”) ou intra-articular no joelho direito (avaliação da dor profunda) (referido como “modelo intra-articular”). Todos os animais, independentemente do grupo experimental, foram pré-expostos (ambientados) ao aparato experimental (caixa de observação) por um período de 20 min, 24 horas antes do início dos experimentos.

O tempo total dispendido pelo animal nos comportamentos nociceptivos foi mensurado inicialmente a cada bloco de 5 min, durante 60 min. Porém, após essa sessão de padronização, foi possível definir uma faixa de tempo inicial na qual cada comportamento foi proeminente expresso (representado no eixo “X” dos gráficos na sessão “Resultados”), sendo assim desprezado ou não avaliado o tempo final do teste. O tempo mensurado foi contabilizado em segundos.

Os comportamentos nociceptivos mensurados foram os seguintes:

- Lamber/morder a pata: foi mensurado o tempo em que o animal dispendeu lambendo e/ou mordendo a pata em que a formalina foi administrada;
- Levantar sustentado do membro: foi considerado o tempo em que o animal manteve o membro, o qual a formalina foi administrada, sob flexão sustentada, sem tocar ou tocando levemente o chão da caixa de observação.

4.4 TESTE DE FORMALINA INTRAPLANTAR E INTRA-ARTICULAR: PADRONIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS NÃO-NOCICEPTIVOS (RELACIONADOS COM A EMOCIONALIDADE)

Como já mencionada anteriormente, a administração de formalina em tecido subcutâneo resultou em um perfil comportamental diferenciado daquele induzido por formalina intra-articular. Portanto, mediante o teste da formalina, também foram avaliados comportamentos habituais clássicos, não-nociceptivos, a fim de se avaliar a emocionalidade do animal, sendo eles:

- Autolimpeza (do inglês, *grooming*): foi mensurado o tempo em que o animal evocou movimentos repetitivos e sequenciais voltados para o lambe/morder de patas, limpeza da região da face, cabeça, corpo, cauda e genitália. O tempo em que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo o local de administração da formalina não foi mensurado como parte desse comportamento;

- Exploração vertical (do inglês, *rearing*): foi mensurado o tempo em que o animal se manteve apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando ou não, com as patas anteriores, as paredes da caixa de observação;

- Parâmetro de imobilidade: foi mensurado unicamente o tempo em que o animal adotou uma postura de imobilidade durante a expressão do comportamento nociceptivo de levantar sustentado do membro. Esse parâmetro foi utilizado como uma forma de avaliar a interação do animal com o ambiente a sua volta mediante a condição aversiva (nocicepção).

Dessa forma, o tempo total dispendido pelo animal em cada comportamento não-nociceptivo, foi registrado inicialmente a cada bloco de 5 min, durante 60 min, sendo o tempo contabilizado em segundos. Porém, após a padronização, foi possível definir uma faixa de tempo inicial na qual cada um dos comportamentos foi proeminentemente expresso (representado no eixo “X” dos gráficos na sessão “Resultados”), sendo assim desprezado ou não avaliado o tempo final do teste.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

A atividade locomotora foi avaliada na mesma caixa de observação onde os demais comportamentos, citados anteriormente, foram mensurados. Para tanto, foram contabilizados o número de cruzamentos, com as quatro patas do animal, pelos quadrantes da caixa de observação, durante os 10 primeiros minutos em que o animal foi testado. Esse período (10 min) foi estipulado para evitar uma possível habituação do animal à caixa de observação.

4.6 CAIXA DE OBSERVAÇÃO

A caixa de observação foi feita de acrílico transparente, tendo como dimensões 28,5 cm X 28,5 cm e 29,5 cm de altura. Espelhos foram adicionados a uma estrutura metálica (ângulo de 45°), a qual também serviu como suporte para a caixa de observação, e que tiveram a finalidade de aperfeiçoar a observação do animal, através da formação de uma imagem refletida da parte inferior da caixa. Ainda, com a finalidade de mensurar a atividade locomotora, cordas elásticas foram dispostas no piso externo da caixa, de modo a formar quatro quadrantes de aproximadamente 203 cm² cada. A sala foi iluminada por uma lâmpada incandescente de 16 W. No intervalo entre as sessões de teste e/ou de ambientação, a caixa foi limpa com álcool 10%. Os testes foram então filmados para posterior análise dos comportamentos.

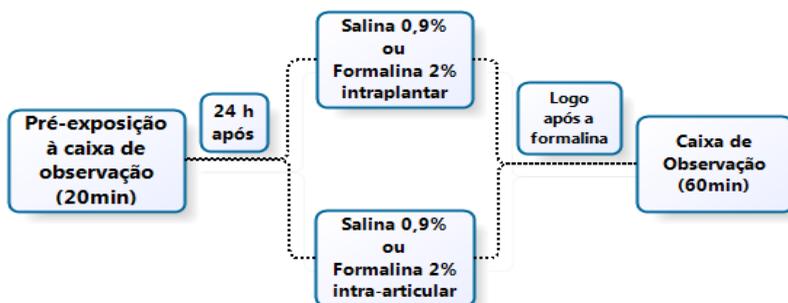


Figura 1: Foto ilustrativa da caixa de observação.

4.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.7.1 Padronização dos comportamentos induzidos pela administração de formalina intraplantar ou intra-articular

Esse experimento foi conduzido de acordo com o protocolo experimental expresso na figura 1. Para tanto, os animais foram primeiramente alocados, de maneira aleatória, em quatro grupos de oito animais cada. Após, os animais foram pré-expostos à caixa de observação por 20 minutos, 24h antes do início dos experimentos. No dia do teste, foram administrados 50 µl de formalina ou solução salina 0,9% pela via subcutânea, na pata posterior direita ou, por via intra-articular, no joelho direito. Imediatamente após, os animais foram cuidadosamente colocados na caixa de observação e gravados durante o período de 60 minutos, para posterior avaliação dos comportamentos nociceptivos e não-nociceptivos.



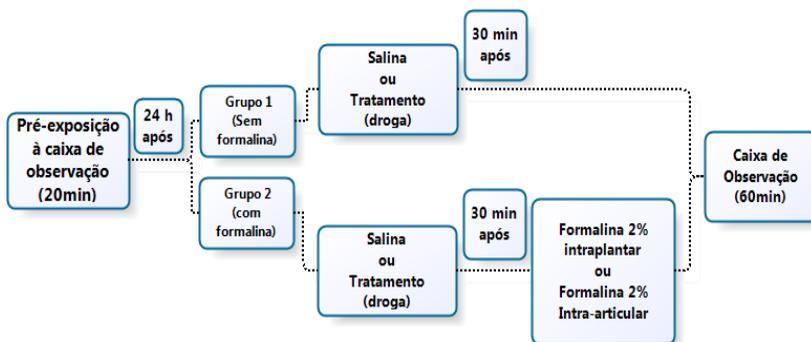
Esquema 1: Protocolo experimental para a padronização dos comportamentos induzidos pela formalina intraplantar e intra-articular.

4.7.2 Avaliação dos comportamentos induzidos pela formalina intraplantar ou intra-articular mediante a manipulação comportamental induzida por drogas (morfina, midazolam ou pentilenotetrazol)

Esses experimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo experimental expresso na figura 2. Todas as drogas e suas respectivas doses foram escolhidas por promoverem um efeito analgésico (morfina), ansiolítico (midazolam) e ansiogênico (pentilenotetrazol). Sendo assim, os animais foram alocados inicialmente em dois grandes grupos para cada droga, 24 horas após a pré-exposição desses animais à caixa de

observação. Isso porque, os animais pertencentes ao grupo 1 foram somente tratados com solução salina 0,9%, morfina (0,4, 1,0 ou 4,0 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg) ou pentilenotetrazol (15 mg/kg). Imediatamente depois de transcorridos 30 minutos, esses animais foram gentilmente colocados na caixa de observação, não havendo, em nenhum momento, a administração de formalina intraplantar ou intra-articular. Posteriormente, os comportamentos não-nociceptivos foram avaliados individualmente de acordo com sua faixa temporal de expressão.

De maneira semelhante, os animais alocados no grupo 2 foram pré-tratados com solução salina 0,9%, morfina (0,4, 1,0 ou 4,0 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg) ou pentilenotetrazol (15 mg/kg). No entanto, depois de transcorridos 30 minutos, os animais receberam 50 μ l de formalina, pela via subcutânea, na pata posterior direita ou, pela via intra-articular, no joelho direito dos animais. Imediatamente após, esses animais foram cuidadosamente colocados na caixa de observação para a avaliação individual dos comportamentos nociceptivos e não-nociceptivos, de acordo com a faixa temporal de expressão de cada comportamento.



Esquema 2: Protocolo experimental para a avaliação dos comportamentos induzidos pela formalina intraplantar ou intra-articular, mediante a manipulação comportamental induzida por drogas. No esquema, o “tratamento” refere-se à administração de morfina, midazolam ou pentilenotetrazol.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nenhuma análise estatística foi realizada para comparar as resposta nocifensivas e o parâmetro de imobilidade entre os animais dos grupos intraplantar e intra-articular, referente ao primeiro item da sessão

resultados “Padronização dos comportamentos induzidos pela formalina intraplantar ou intra-articular”, uma vez que esses comportamentos parecem não se equiparar qualitativamente. Entretanto, para a comparação dos comportamentos habituais, relacionados à emocionalidade (exploração vertical e autolimpeza), foi utilizado o teste da análise de variância (ANOVA) de duas vias mais medidas repetidas, tomando como fatores independentes a “nocicepção” (salina 0,9% X formalina 2%) e o sítio de injeção (intraplantar X intra-articular). Ainda, o teste da ANOVA foi cabível em todos os protocolos experimentais que envolveram os comportamentos de exploração vertical e autolimpeza, uma vez que os dados referentes a esses comportamentos foram transformados e expressos na forma de uma curva cumulativa para preencher o requisito da normalidade exigido por esse teste paramétrico (tempo de expressão do comportamento, mensurado num dado bloco experimental, somado com o tempo de expressão desse mesmo comportamento obtido no bloco anterior). A avaliação da atividade locomotora desses animais foi realizada pela ANOVA de duas vias simples, sendo considerados como fatores independentes a “nocicepção” e o “sítio de injeção”.

Em relação aos demais grupos experimentais, a análise comportamental (exceto para a fase 1 do teste da formalina e avaliação da atividade locomotora) foi realizada pelo teste da análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, sendo considerado o “tratamento” como o fator entre grupos e a “repetição” como sendo o fator dentro do grupo. A avaliação da fase 1 do teste da formalina, bem como a avaliação da atividade locomotora foi realizada pela ANOVA de uma via simples ou o teste “t” de Student para comparação de dois grupos independentes, quando necessário. Após todas as análises, foi utilizado o teste *post-hoc* de Duncan quando cabível, com valor adotado de significância estatística de $P < 0,05$.

Deve ser novamente lembrado que, após o experimento referente à padronização dos comportamentos, foi definida uma faixa de tempo inicial na qual cada comportamento foi proeminentemente expresso (representado no eixo “X” dos gráficos na sessão “Resultados”). Portanto, somente essa faixa de tempo foi considerada para a análise estatística.

A análise estatística foi realizada utilizando o software *StatSoft Statistica 7*[®], sendo os dados expressos como a média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). Todos os gráficos foram elaborados a partir da utilização do software *GraphPad Prism 5*[®].

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR

Uma das finalidades desse trabalho foi a de mensurar separadamente o maior número de comportamentos nociceptivos e não-nociceptivos que se reproduziram ao longo do teste da formalina, para assim, caracterizar melhor os dois modelos de nocicepção (intraplantar e intra-articular).

Sendo assim, primeiramente foram caracterizados os comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina intraplantar ou intra-articular. Diante disso, verificou-se que a administração de formalina induziu a expressão de respostas nocifensivas de maneira bifásica nos animais de ambos os modelos, intercalada por um período de quiescência (fig. 2). Nos animais do modelo intra-articular, a resposta nocifensiva foi mediada exclusivamente pelo reflexo do levantar sustentado do membro, enquanto que nos animais do modelo intraplantar foram mensuradas duas respostas referidas como nocifensivas: o reflexo do levantar sustentado de membro e o *lamber/morder a pata*.

Os achados também demonstram diferenças entre o perfil temporal em que as respostas nocifensivas foram expressas nos animais de ambos os modelos (fig. 2). Diante disso, pode ser observado que o *lamber/morder a pata* é o comportamento induzido pela formalina intraplantar que melhor se relacionou com o perfil temporal de expressão do levantar sustentado de membro, evocado nos animais do modelo intra-articular. Além disso, no modelo intraplantar, o reflexo de *lamber/morder a pata* demonstra uma expressiva alternância com o levantar sustentado do membro, até aproximadamente a metade do teste (fig. 2).

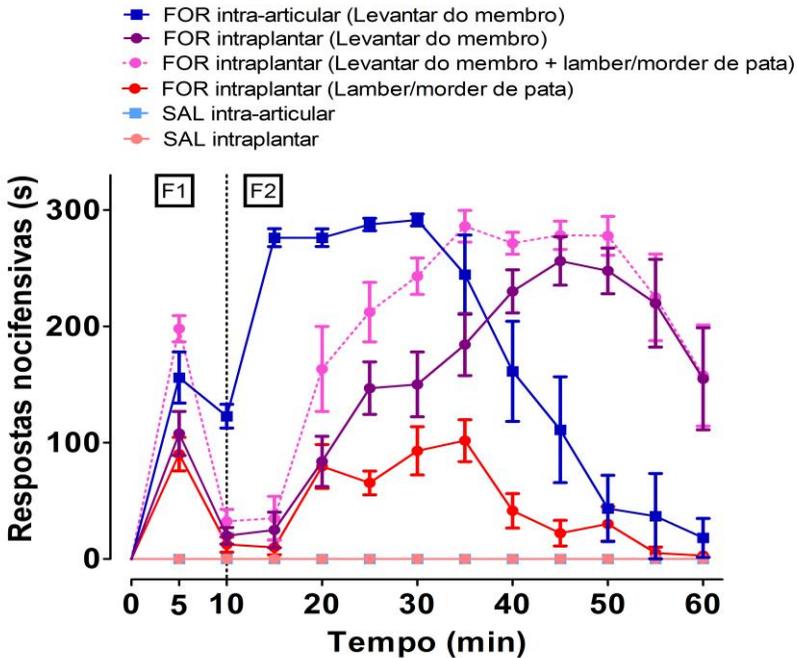


Figura 2: Perfil temporal da expressão de diferentes respostas nocifensivas, mediante a administração de salina ou formalina 2% pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido em uma determinada resposta nocifensiva, enquanto que o eixo X representa o tempo referente à fase 1 (0-5 min) e fase 2 (10-50 min) do teste da formalina. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais.. Esses dados não foram analisados estatisticamente.

O parâmetro de imobilidade, que representa o tempo em que o animal permaneceu imóvel enquanto evocava o levantar sustentado do membro, demonstrou uma resposta temporal diferenciada entre os animais dos modelos de nocicepção (fig. 3). Enquanto que no modelo intra-articular a resposta máxima é observada aproximadamente na metade do teste (30 min) com posterior decréscimo, no modelo intraplantar a manifestação da resposta de imobilidade é evidenciada principalmente na segunda metade do tempo de execução do teste.

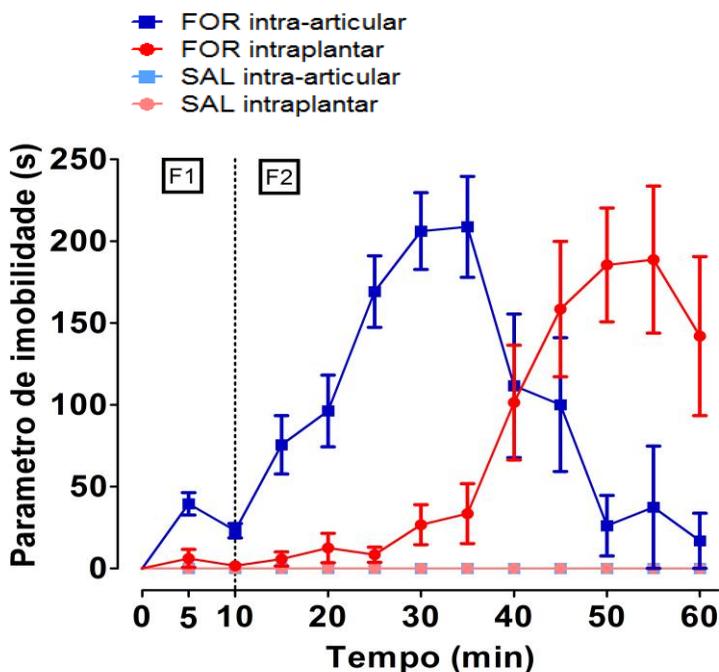


Figura 3: Perfil temporal de expressão do comportamento de imobilidade, mensurado durante a evocação do levantar sustentado do membro, em animais submetidos à administração de salina ou formalina 2% pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido na resposta de imobilidade, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise referente a fase 1 (0-5 min) e fase 2 (10-60 min) do teste da formalina. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Esses dados não foram analisados estatisticamente.

Em relação aos demais comportamentos não-nociceptivos, foi verificado que a exploração vertical foi evocada de maneira mais expressiva até 25 min, após o início do teste. Por outro lado, o comportamento de autolimpeza manteve-se tonicamente expresso até os 40 min iniciais do teste, aproximadamente (faixas temporais representadas pelo eixo “X” das figuras 4A e 4B, respectivamente). Em relação ao comportamento de exploração vertical, a análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas revelou que a administração de

formalina (fator nocicepção) foi capaz de promover a redução dessa resposta ($F_{1,28}=25,55$; $P=0,00002$; Fig. 4A), sendo também observado uma interação entre o fator nocicepção e sítio de injeção ($F_{1,28}=4,63$; $P=0,04$). O teste *post-hoc* de Duncan revelou que o grupo formalina intra-articular foi significativamente diferente do grupo controle ($P=0,00008$). Além disso, a formalina intra-articular induziu uma maior redução no tempo de exploração vertical do quando comparado à resposta observada no grupo intraplantar ($P=0,03$). O grupo formalina intraplantar, por sua vez, também atenuou o comportamento de exploração vertical quando comparado ao grupo controle ($P=0,04$).

Quanto ao comportamento de autolimpeza, foi observado que o fator nocicepção modificou significativamente a expressão desse comportamento ($F_{1,28}=40,59$; $P=0,000001$; Fig. 4B). Porém, não houve diferença quanto à magnitude dessa resposta, quando comparados os grupos intraplantar e intra-articular ($F_{1,28}=1,70$; $P=0,20$). Nenhuma interação foi observada entre os fatores “nocicepção” X “sítio de injeção” ($F_{1,28}=1,05$; $P=0,31$).

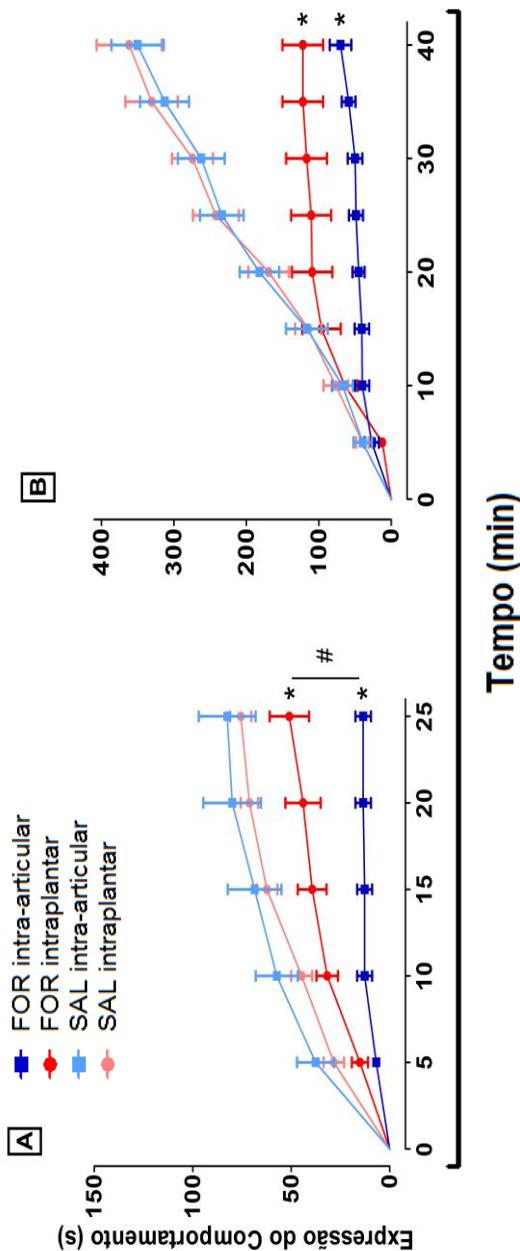


Figura 4: Perfil temporal de expressão dos comportamentos relacionados à emocionalidade: exploração vertical (A) e autolimpeza (B), mediante a administração de salina ou formalina 2% pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido no determinado comportamento, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise do teste. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Os * indicam uma diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com formalina em comparação ao seu respectivo grupo controle, o qual foi tratado unicamente com salina (fator nocicepção). A # indica uma diferença significativa da interação dos fatores “sítio de injeção” X “nocicepção” ($P < 0,05$) (modelo intraplantar X modelo intra-articular). (ANOVA de duas vias mais medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

O último parâmetro mensurado foi referente à atividade locomotora, na qual o fator nociceção modificou significativamente o número de quadrantes cruzados pelo animal ($F_{1,28}=5,19$; $P=0,03$; Fig. 5), enquanto que o sítio de injeção não se mostrou importante para essa resposta ($F_{1,28}=0,94$; $P=0,33$). Posteriormente, o *post-hoc* de Duncan revelou que o modelo intra-articular reduziu a atividade locomotora quando comparado ao grupo controle ($P=0,03$), enquanto que este efeito não foi observado no modelo intraplantar quando comparado ao grupo de animais tratados com salina intraplantar ($P=0,39$). Ainda, não houve diferença estatística significativa diante da comparação da resposta observada entre os animais do modelo intraplantar e intra-articular ($P=0,16$).

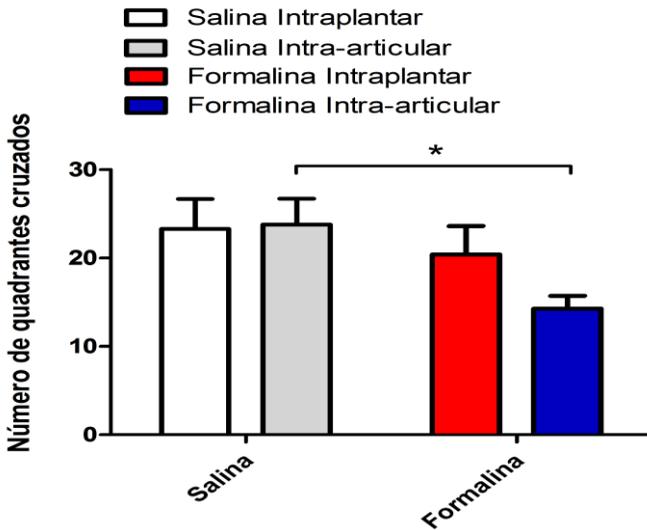


Figura 5: Avaliação da atividade locomotora em animais submetidos à administração de salina ou formalina 2% pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o número total de quadrantes que foram cruzados pelo animal durante os 10 primeiros minutos de exposição ao teste na caixa de observação. As barras representam a média \pm E.P.M. de 8 animais. O * indica uma diferença estatística significativa ($P<0,05$) do grupo tratado com formalina em comparação ao seu respectivo grupo controle, tratado unicamente com salina (fator nociceção). (ANOVA de duas vias simples seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

5.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR

A morfina é uma droga de ação opioide clássica, amplamente utilizada na clínica devido ao seu efeito analgésico e, por esse motivo, foi uma valiosa ferramenta farmacológica para o refinamento dos modelos de nocicepção.

Primeiramente, foram avaliados os efeitos mediados pela morfina sobre a expressão dos comportamentos relacionados à nocicepção nos animais de ambos os modelos. Sendo assim, pode ser observado a morfina reduziu significativamente a expressão do levantar sustentado do membro induzido pela formalina intraplantar somente na fase 2 do teste de formalina (F1: $F_{3,28}=2,66$; $P=0,06$ e F2: $F_{3,28}=9,51$; $P=0,0001$; Fig. 6). No entanto, o *post-hoc* de Duncan revelou que somente a morfina na dose de 4,0 mg/kg promoveu esse efeito quando comparado ao grupo controle ($P=0,00008$).

Em relação ao modelo intra-articular, a administração de morfina promoveu uma redução na expressão do levantar sustentado do membro em ambas as fases do teste, sendo fase 1 ($F_{3,28}=5,63$; $P=0,003$; Fig. 6) e fase 2 ($F_{3,28}=21,63$; $P=0,000001$). Posteriormente foi revelado pelo teste *post-hoc* que somente as doses de 1,0 mg/kg e 4,0mg/kg foram capazes de mediar esse efeito na fase 1 ($P=0,04$ e $P=0,001$, respectivamente) e fase 2 ($P=0,02$ e $P=0,00005$, respectivamente) do teste da formalina.

Além disso, o tratamento com morfina reduziu significativamente a expressão do comportamento de lambar/morder a pata, induzido pela formalina intraplantar, em ambas as fases do teste (F1: $F_{3,28}=11,17$; $P=0,00005$ e F2: $F_{3,28}=5,20$; $P=0,005$, Fig. 6). Posteriormente, o teste *post-hoc* revelou que somente as doses de 1,0 e 4,0 mg/kg promoveram esse efeito na fase 1 ($P=0,021$ e $P=0,00008$) e fase 2 ($P=0,017$ e $P=0,04$, respectivamente) do teste.

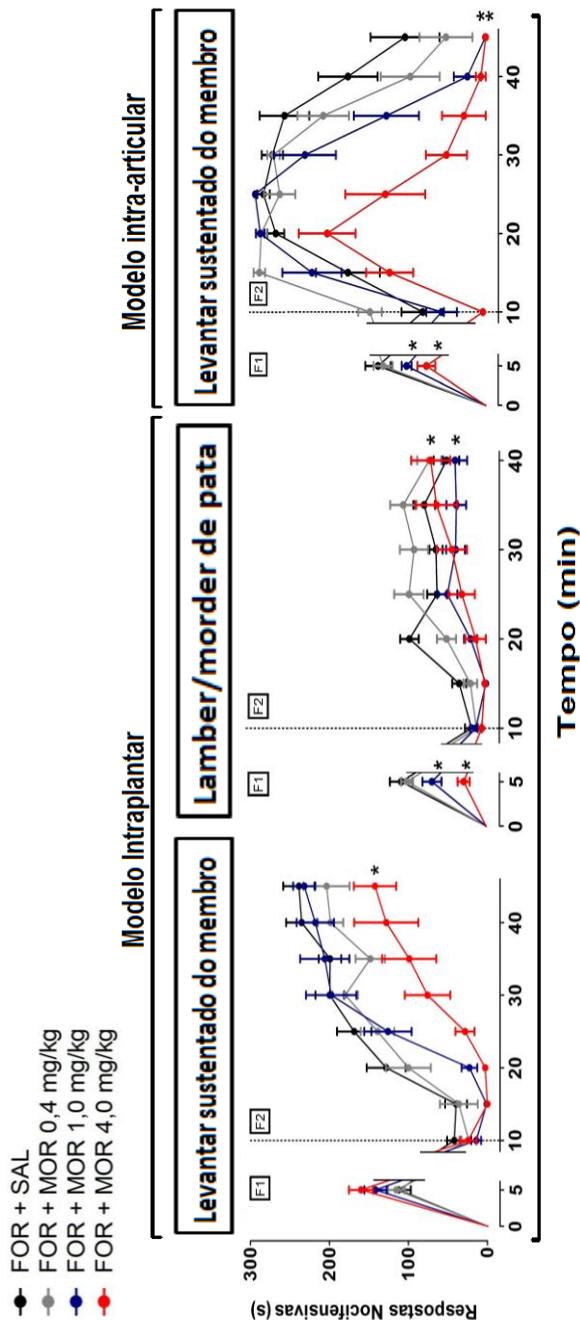


Figura 6: Influência da morfina sobre a expressão de diferentes respostas nocifensivas induzidas pela formalina intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido na resposta nocifensiva, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise referente a fase 1 e fase 2 do teste da formalina. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Os * indicam a diferença estatística significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com morfina (0,4, 1,0 ou 4,0 mg/kg) em comparação ao grupo controle, tratado com salina (fator tratamento). (ANOVA de uma via simples ou ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

Em seguida, foram avaliados os efeitos da morfina (0,4, 1,0 e 4,0 mg/kg) sobre a expressão do comportamento de exploração vertical em comparação com os animais do grupo controle, os quais foram tratados unicamente com salina (experimento realizado na ausência de formalina) (Fig. 7). Dessa forma, pode ser observado que a morfina reduziu a expressão do comportamento de exploração vertical ($F_{3,28}=16,40$; $P=0,000001$), sendo que somente as doses de 1,0 e 4,0 mg/kg foram capazes de promover esse efeito ($P=0,02$ e $P=0,00005$, respectivamente).

Posteriormente, foram avaliados os efeitos da morfina sobre a expressão do comportamento de exploração vertical nos modelos de nocicepção (Fig. 7). Assim, foi verificado que a morfina reduziu a expressão da exploração vertical nos animais do modelo intraplantar ($F_{3,28}=21,73$; $P=0,000001$), sendo as doses de 0,4 mg/kg ($P=0,01$), 1,0 mg/kg ($P=0,0001$) e 4,0 mg/kg ($P=0,00005$) capazes de promover esse efeito. Em contrapartida, somente a dose 4,0 mg/kg atenuou a expressão da exploração vertical nos animais do modelo intra-articular ($P=0,008$; Fig. 7), sendo considerado, portanto, o tratamento como um fator modificador dessa resposta ($F_{3,28}=3,73$; $P=0,02$).

Quanto ao comportamento de autolimpeza, a administração de morfina determinou uma significativa redução na expressão desse comportamento quando comparado aos animais do grupo controle, os quais foram tratados unicamente com salina (experimento realizado na ausência de formalina) ($F_{3,28}=26,93$, $P=0,000001$; Fig. 8). O teste *post-hoc* de Duncan revelou que a morfina promoveu esse efeito quando administrada nas doses de 0,4 mg/kg ($P=0,01$), 1,0 mg/kg ($P=0,00009$) e 4,0 mg/kg ($P=0,00005$).

Em seguida, foram avaliados os efeitos da morfina sobre a expressão do comportamento de autolimpeza nos animais do modelo intraplantar e intra-articular. Sendo assim, pode ser observado que o tratamento com morfina foi capaz de reduzir a expressão da autolimpeza nos animais do modelo intraplantar ($F_{3,28}=6,15$, $P=0,002$; Fig. 8). No entanto, o teste *post-hoc* de Duncan revelou que somente a dose de 4,0 mg/kg promoveu esse efeito ($P=0,0004$). De maneira semelhante, somente a administração de morfina na dose de 4,0 mg/kg foi capaz de reduzir a expressão da autolimpeza nos animais do modelo intra-articular ($P=0,04$; Fig. 8).

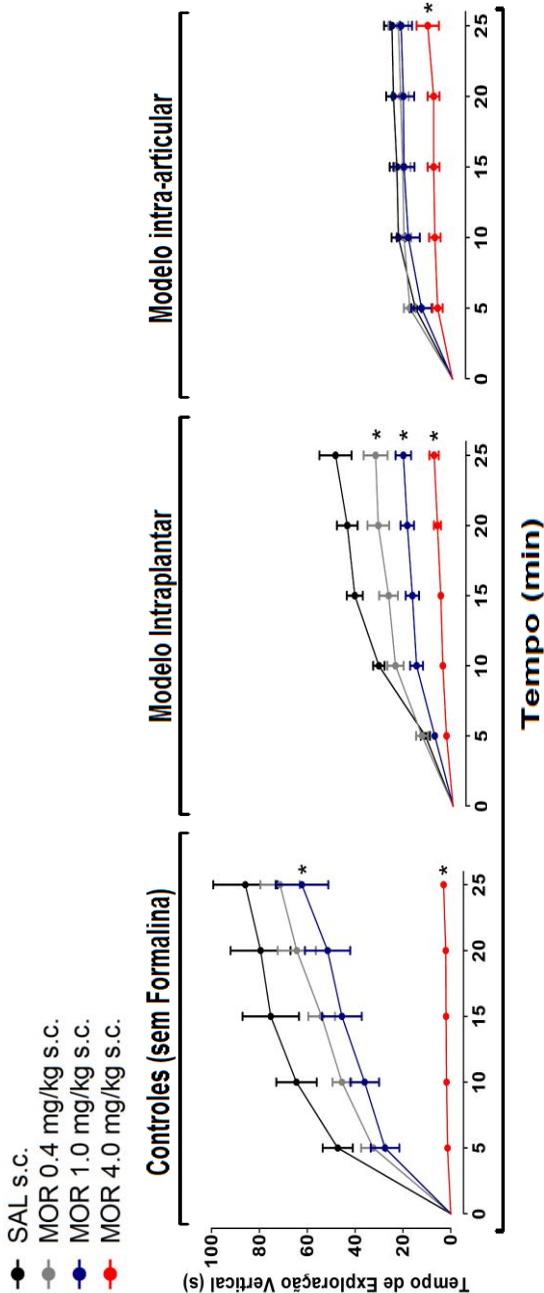


Figura 7: Influência da morfina sobre o perfil de expressão do comportamento de exploração vertical em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido no comportamento de exploração vertical, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Os * indicam a diferença estatística significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com morfina (0,4, 1,0 ou 4,0 mg/kg) em comparação ao grupo controle, tratado com salina (fator tratamento). (ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

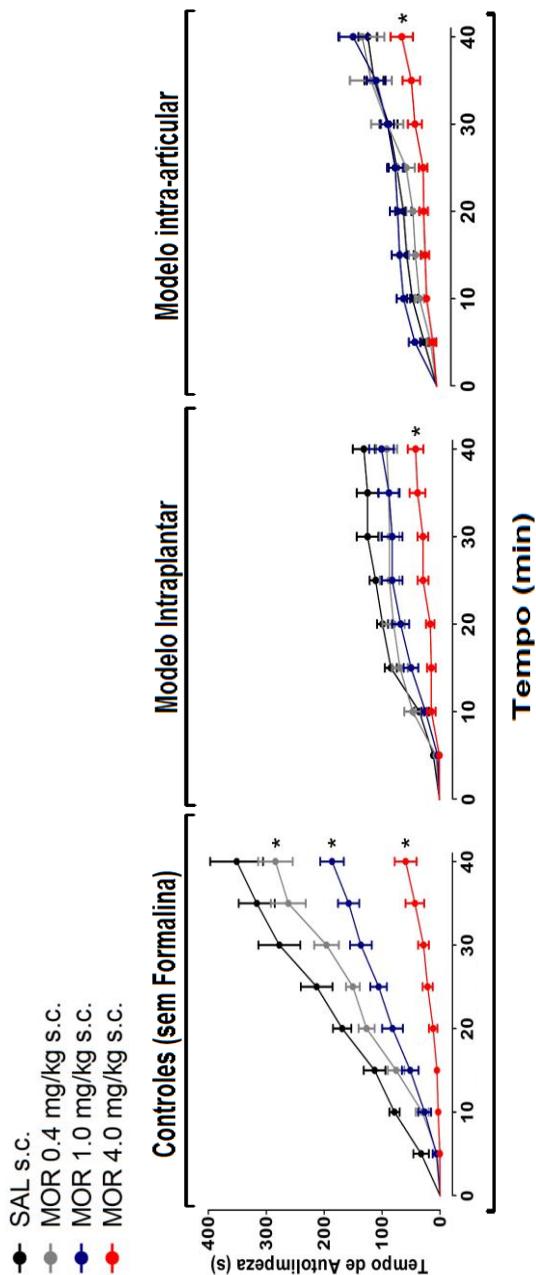


Figura 8: Influência da morfina sobre o perfil de expressão do comportamento de autolimpieza em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido no comportamento de autolimpieza, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Os * indicam a diferença estatística significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com morfina (0,4, 1,0 ou 4,0 mg/kg) em comparação ao grupo controle, tratado com salina (fator tratamento). (ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

Os efeitos sedativos da morfina foram discriminados pela avaliação da atividade locomotora dos animais. Assim, foi verificado que o fator tratamento modificou significativamente a expressão dessa resposta quando comparado com os animais do grupo controle, os quais foram tratados unicamente com salina (experimento realizado na ausência de formalina) ($F_{3,28}=7,47$; $P=0,0007$; Fig. 9A). Posteriormente, foi revelado pelo teste *post-hoc* que a morfina, unicamente na dose de 4,0 mg/kg, reduziu o número de quadrantes cruzados pelos animais ($P=0,0004$). Ainda, a morfina, tanto no modelo intraplantar ($F_{3,28}=0,52$; $P=0,66$; Fig. 9B) quanto no modelo intra-articular ($F_{3,28}=1,16$; $P=0,34$; Fig. 9C), não modificou a atividade locomotora dos animais quando comparados aos seus respectivos grupos controles (formalina intraplantar e formalina intra-articular, respectivamente).

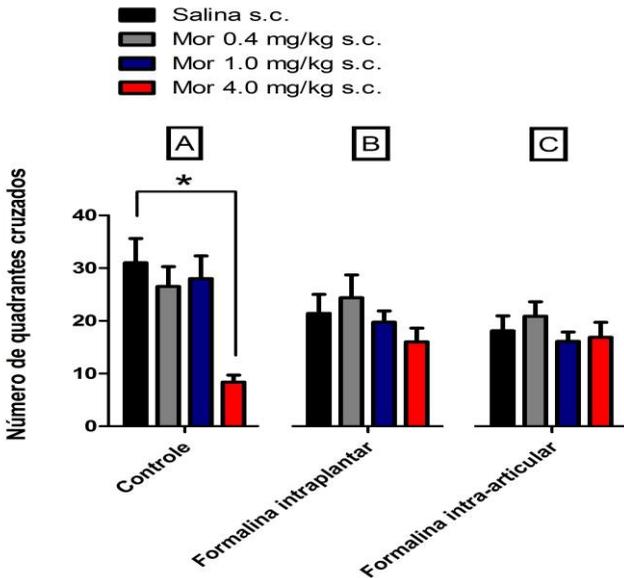


Figura 9: Influência das diferentes doses de morfina sobre a atividade locomotora em animais do grupo controle (sem formalina) (A) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar (B) ou intra-articular (C). O eixo Y representa o número de quadrantes que foram cruzados pelo animal durante os 10 primeiros minutos de exposição ao teste. As barras representam a média \pm E.P.M. de 8 animais. O * indica a diferença estatística significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com morfina (0,4, 1,0 ou 4,0 mg/kg) em comparação ao grupo controle, tratado com salina (fator tratamento). (ANOVA de uma via simples seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

5.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MIDAZOLAM SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR

O midazolam é uma droga amplamente utilizada na clínica, sendo também extensamente explorado nos testes animais devido ao seu efeito ansiolítico, motivo pelo qual essa droga também foi utilizada nesse trabalho.

Sendo assim, avaliou-se inicialmente a influência do midazolam sobre a expressão do comportamento de levantar sustentado de membro induzido pela formalina intraplantar. Assim, foi verificado que o tratamento com midazolam não foi capaz de modificar a expressão desse comportamento quando avaliado na fase 1 ($t_{14}=0,29$; $P=0,59$; Fig. 10) e fase 2 do teste da formalina ($F_{1,14}=3,20$; $P=0,09$). Um resultado semelhante foi observado no modelo intra-articular, onde o midazolam não alterou a resposta do levantar sustentado do membro em nenhuma das fases do teste (F1: $t_{14}=0,24$; $P=0,62$; Fig. 10) (F2: $F_{1,14}=0,01$, $P=0,90$).

Em relação ao comportamento de morder/lamber a pata, a administração de midazolam não foi capaz de alterar a expressão desse comportamento quando avaliado na fase 1 do teste ($t_{14}=1,56$; $P=0,23$; Fig. 10). Por outro lado, o midazolam reduziu a expressão do lamber/morder a pata quando avaliado na fase 2 do teste da formalina ($F_{1,14}=5,92$, $P=0,02$).

Em seguida, foram avaliados os efeitos do midazolam sobre a expressão do comportamento habitual (não-nociceptivo) de exploração vertical em comparação com os animais do grupo controle, os quais foram tratados unicamente com salina (experimento realizado na ausência de formalina). Nessa condição, o tratamento com midazolam não alterou a resposta de exploração vertical ($F_{1,14}=0,95$; $P=0,34$; Fig. 11). De maneira semelhante, o tratamento com midazolam também não afetou a expressão desse comportamento nos animais do modelo intraplantar ($F_{1,14}=2,06$; $P=0,17$; Fig. 11) e intra-articular ($F_{1,14}=0,05$, $P=0,81$; Fig. 11).

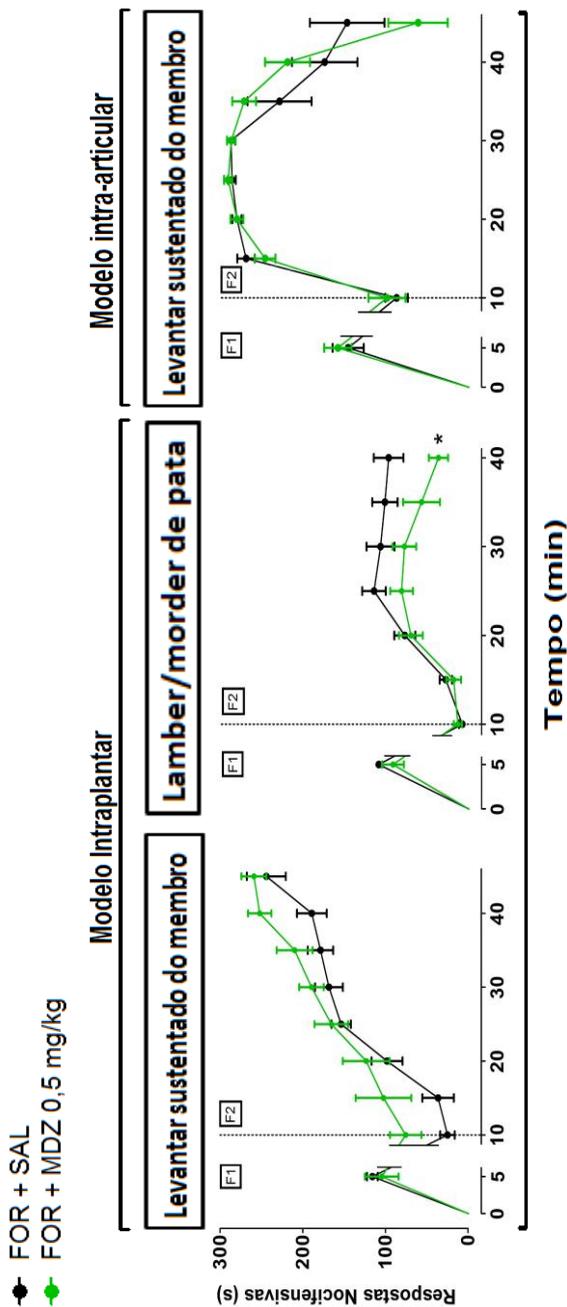


Figura 10: Influência do midazolam sobre a expressão de diferentes respostas nocifensivas induzidas pela formalina intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido na resposta nocifensiva, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise referente a fase 1 e fase 2 do teste da formalina. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. O * indica a diferença estatística significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com midazolam (0,5 mg/kg) em comparação ao grupo controle, tratado com salina (fator tratamento). (Teste “t” de Student ou ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

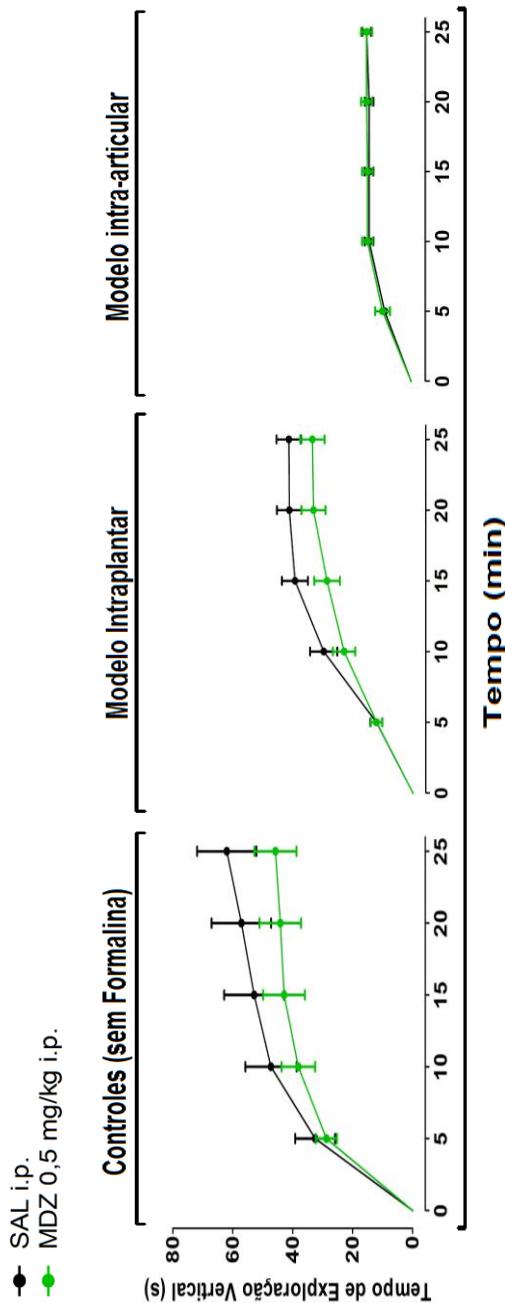


Figura 11: Influência do midazolam sobre o perfil de expressão do comportamento de exploração vertical em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido no comportamento de exploração vertical, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. (ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

Em contrapartida, observamos que o tratamento com o midazolam ($F_{1,14}=8,89$; $P=0,009$; Fig. 12) determinou uma redução na expressão do comportamento de autolimpeza quando comparado ao grupo de animais tratados unicamente com salina (experimento realizado na ausência de formalina) ($P=0,01$).

Em relação aos modelos de nocicepção, o tratamento com midazolam reduziu significativamente a expressão do comportamento de autolimpeza nos animais do modelo intraplantar ($F_{1,14}=14,82$; $P=0,001$; Fig. 12). Porém, nenhum efeito significativo foi observado em relação à administração de midazolam sobre a expressão desse comportamento quando avaliados os animais do modelo intra-articular ($F_{1,14}=2,60$, $P=0,12$; Fig. 12).

Em seguida, foi avaliado o parâmetro de atividade locomotora para discriminar um possível efeito sedativo mediado pelo midazolam. No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada com a administração de midazolam quando comparado aos animais do grupo controle ($t_{14}=1,17$; $P=0,29$; Fig. 13A), intraplantar ($t_{14}=2,01$; $P=0,17$; Fig. 13B) ou ainda, ao grupo intra-articular ($t_{14}=0,28$; $P=0,60$; Fig. 13C).

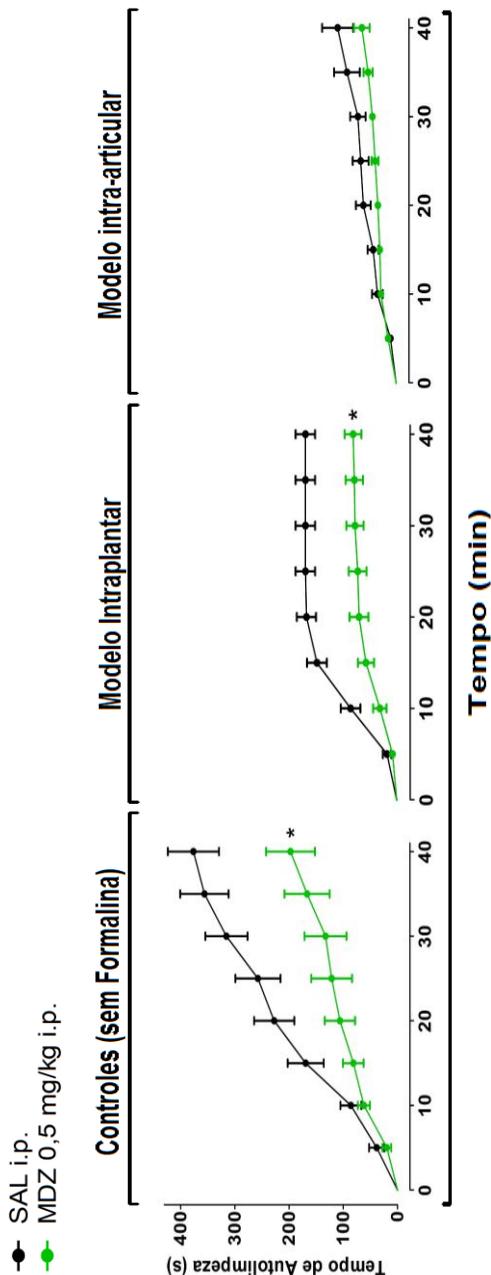


Figura 12: Influência do midazolam sobre o perfil de expressão do comportamento de autolimpieza em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido no comportamento de autolimpieza, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Os * indicam a diferença estatística significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com midazolam (0,5 mg/kg) em comparação ao grupo controle, tratado com salina (fator tratamento). (ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

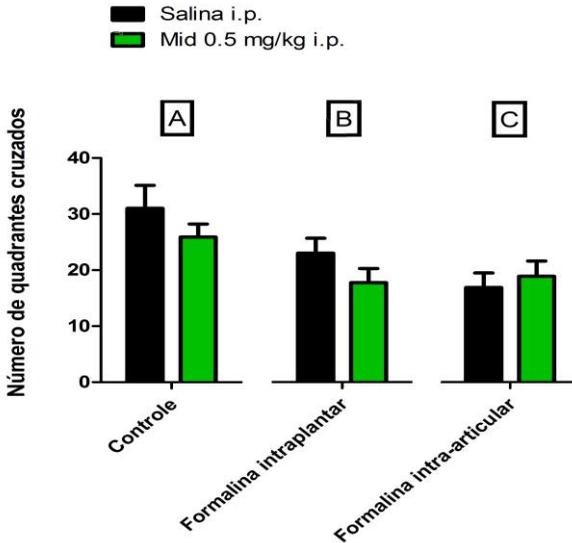


Figura 13: Influência do midazolam sobre a atividade locomotora em animais do grupo controle (sem formalina) (A) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar (B) ou intra-articular (C). O eixo Y representa o número de quadrantes que foram cruzados pelo animal durante os 10 primeiros minutos de exposição ao teste. As barras representam a média \pm E.P.M. de 8 animais. (Teste “t” de Student para grupos independentes).

5.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DO PENTILENOTETRAZOL SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR

O pentilenotetrazol foi utilizado nesse estudo por ser considerado uma importante ferramenta farmacológica devido ao seu potencial ansiogênico, que está relacionado com a modulação do sistema GABAérgico. Assim, primeiramente foram avaliados os efeitos do pentilenotetrazol sobre a expressão dos comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina intraplantar ou intra-articular. Diante disso, foi verificado que o pentilenotetrazol (15 mg/kg) não foi capaz de alterar a expressão do levantar sustentado do membro induzido pela formalina intraplantar, em nenhuma das fases do teste da formalina (F1: $t_{14}=0,19$; $P=0,66$; F2: $F_{1,14}=1,85$; $P=0,19$; Fig. 14). De maneira semelhante, a

administração de pentilenotetrazol não modificou a expressão desse comportamento nos animais do modelo intra-articular (F_1 : $t_{14}=0,02$; $P=0,86$ e F_2 : $F_{1,14}=1,95$; $P=0,18$; Fig. 14). Ainda, o pentilenotetrazol não modificou a expressão do lambe/morder a pata quando avaliada a fase 1 do teste da formalina ($t_{14}=0,03$; $P=0,85$). Por outro lado, a expressão desse comportamento foi reduzida na fase 2 do teste, mediante a administração de pentilenotetrazol ($F_{1,14}=6,25$; $P=0,02$; Fig. 14).

Em seguida, foram avaliados os efeitos da administração de pentilenotetrazol sobre a expressão do comportamento não-nociceptivo de exploração vertical quando comparado aos animais do grupo controle, os quais foram tratados unicamente com salina (experimento realizado na ausência de formalina). Assim, foi verificado que o tratamento com pentilenotetrazol foi capaz de reduzir a expressão desse comportamento ($F_{1,14}=7,78$; $P=0,01$; Fig. 15).

De maneira semelhante, o pentilenotetrazol também reduziu a expressão da exploração vertical nos animais do modelo intraplantar ($F_{1,14}=7,84$; $P=0,01$; Fig. 15). No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada com a administração de pentilenotetrazol, sobre a expressão desse comportamento, nos animais do modelo intra-articular ($F_{1,14}=3,74$; $P=0,07$; Fig. 15).

Posteriormente, foram avaliados os efeitos do pentilenotetrazol sobre a expressão do comportamento de autolimpeza. No entanto, nenhum efeito significativo foi observado mediante a administração dessa droga quando comparada aos animais do grupo controle (experimento realizado na ausência de formalina) ($F_{1,14}=0,88$; $P=0,36$; Fig. 16), ou ainda, quando comparado aos animais do grupo intraplantar ($F_{1,14}=2,19$; $P=0,16$; Fig. 16) e intra-articular ($F_{1,14}=0,06$; $P=0,80$; Fig. 16).

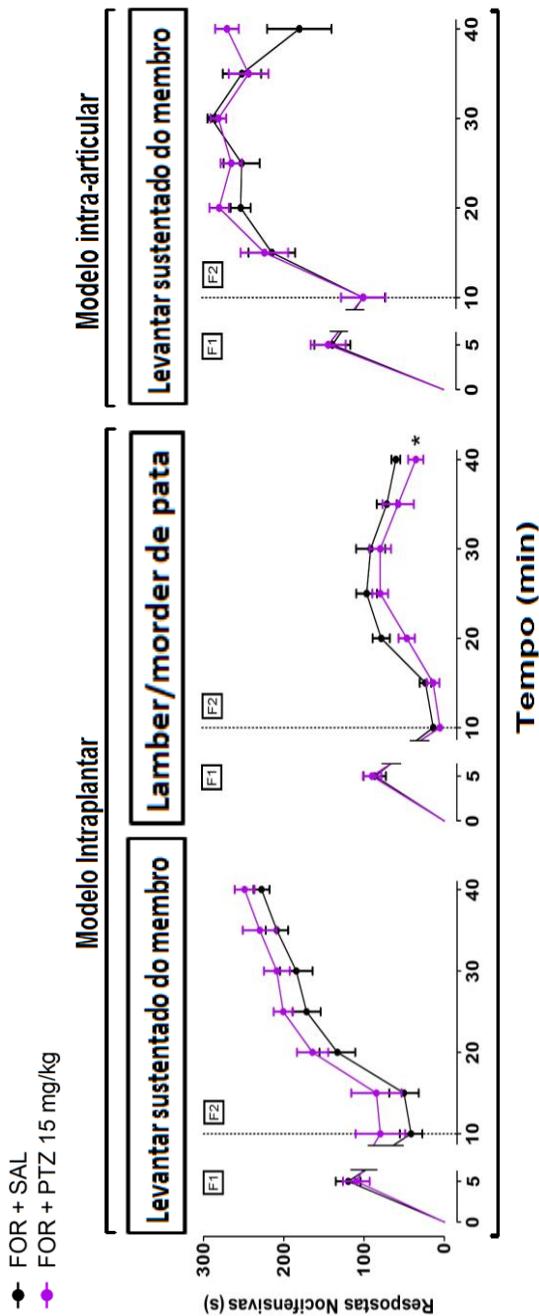


Figura 14: Influência do pentilenotetrazol sobre a expressão de diferentes respostas nocifensivas induzidas pela formalina intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido na resposta nocifensiva, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise referente a fase 1 e fase 2 do teste da formalina. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. O * indica a diferença estatística significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com pentilenotetrazol (15 mg/kg) em comparação ao grupo controle, tratado com salina (fator tratamento). (Teste “t” de Student ou ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

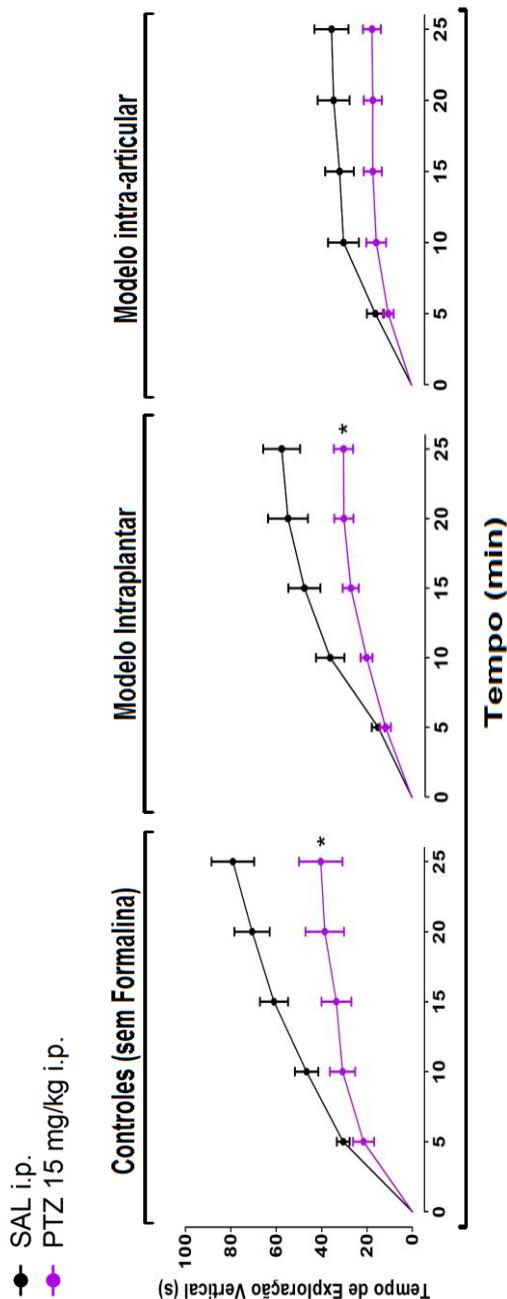


Figura 15: Influência do pentilenotetrazol sobre o perfil de expressão do comportamento de exploração vertical em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido no comportamento de exploração vertical, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. Os * indicam a diferença estatística significativa ($P < 0,05$) do grupo tratado com pentilenotetrazol (15 mg/kg) em comparação ao grupo controle, tratado com salina (fator tratamento). (ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

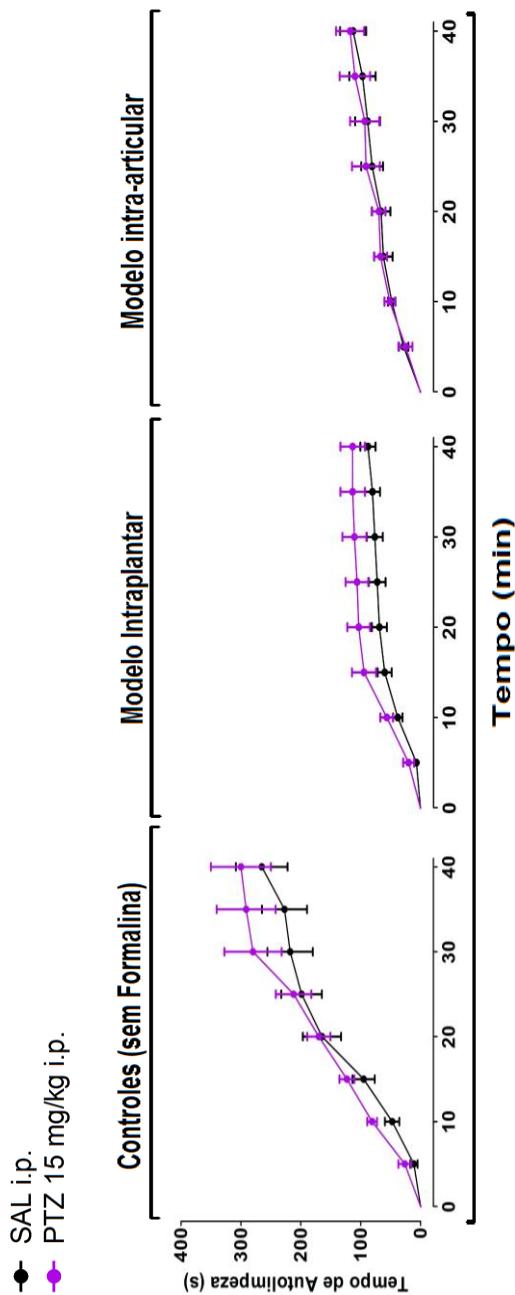


Figura 16: Influência do pentilenoetrazol sobre o perfil de expressão do comportamento de autolimpieza em animais do grupo controle (sem tratamento com formalina) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar ou intra-articular. O eixo Y representa o tempo dispendido no comportamento de autolimpieza, enquanto que o eixo X representa o tempo de análise. Os pontos das curvas representam um bloco total de tempo de 5 minutos cada, sendo expressos como a média \pm E.P.M. de 8 animais. (ANOVA com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan).

Em relação à atividade locomotora, nenhuma alteração significativa foi observada quando comparados os animais, os quais o pentilenotetrazol foi administrado, com os animais do grupo controle (tratado unicamente com salina) ($t_{14}=0,54$; $P=0,47$; Fig. 17A), intraplantar ($t_{14}=0,06$; $P=0,79$ Fig. 17B) ou ainda, com os animais do grupo intra-articular ($t_{14}=0,98$; $P=0,33$ Fig. 17C).

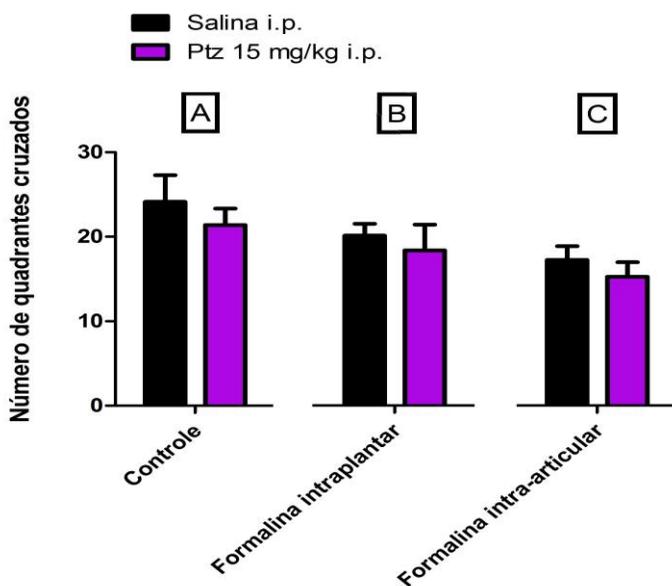


Figura 17: Influência do pentilenotetrazol sobre a atividade locomotora em animais do grupo controle (sem formalina) (A) ou quando tratados com formalina pela via intraplantar (B) ou intra-articular (C). O eixo Y representa o número de quadrantes que foram cruzados pelo animal durante os 10 primeiros minutos de execução do teste. As barras representam a média \pm E.P.M. de 8 animais. (teste "t" de Student para grupos independentes).

6 DISCUSSÃO

O teste da formalina intraplantar, desenvolvido por Dubuisson e Dennis em 1977, tem sido muito utilizado para avaliar o potencial analgésico de drogas. No entanto, uma variação do teste intraplantar que consiste na administração intra-articular de agentes irritantes em ratos, tornou-se um teste importante para o estudo da dor de tecido profundo (TONUSSI; FERREIRA, 1992; HEPPELMANN; PAWLAK, 1997; HEPPELMANN; JUST; PAWLAK, 2000).

Resposta bifásica à formalina

Em ambos os modelos intraplantar e intra-articular, a clássica resposta bifásica à formalina foi observada, sendo caracterizada pelo padrão temporal de expressão dos comportamentos nociceptivos. Esse achado sugere que, no tecido articular, exista mecanismos ou aparatos neurofisiológicos semelhantes àqueles responsivos a formalina no tecido cutâneo. Segundo Schaible e Grubb (1993), um nervo articular típico é composto por fibras mielinizadas de grosso calibre A β , fibras mielinizadas de fino calibre A δ e uma alta proporção de fibras não mielinizadas do tipo C (aproximadamente 80%). De fato, essas fibras também estão presentes nos nervos que suprem o tecido cutâneo (SIMONE; KAJANDER, 1997). Quando comparamos, por exemplo, os achados acima com a administração de formalina na poupa dentária, essa resposta bifásica em resposta à formalina não é mais observada (CHIDIAC *et al.*, 2002). Uma possível explicação baseia-se no fato de que a maioria das fibras presentes na polpa dentária são amielinizadas (fibras do tipo A δ ou C) (CHIDIAC *et al.*, 2002). Ainda, embora se tenha sugerido o envolvimento de estruturas supraespinais para a promoção da resposta de quiescência, Henry e colaboradores (1999) demonstraram que essa resposta (interfases) também está presente em ratos espinalizados, ou seja, a resposta de quiescência parece não depender de um neuroeixo íntegro. Sendo assim, a resposta bifásica à formalina parece ser uma característica de tecidos (por exemplo, articular e cutâneo) que apresentam um amplo espectro de fibras aferentes, incluindo as fibras A β (CHIDIAC *et al.*, 2002).

Nos modelos animais de nocicepção, como já mencionado anteriormente, normalmente são mensurados apenas os comportamentos relacionados à nocicepção, o que provavelmente não reflete todo o caráter multidimensional que representa a dor na clínica. Para tanto, se fez necessária uma avaliação comportamental, mediante ou não a

manipulação farmacológica, em busca de um modelo mais preditivo para o desenvolvimento de fármacos analgésicos.

Sendo assim, o conjunto de resultados obtidos nesse trabalho sugere que o teste de formalina intra-articular apresenta um perfil comportamental que melhor se assemelha a uma condição de dor clínica persistente. Essa modelagem, que é resultante da administração da formalina intra-articular, pode então ser mais atrativa para o desenvolvimento de fármacos analgésicos.

6.1 PADRONIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR

Os comportamentos mensurados nesse trabalho, os quais foram utilizados como medidas de nocicepção baseiam-se na observação de respostas que podem ser induzidas pela formalina em preparações com animais decerebrados (MATTHIES; FRANKLIN, 1992). Sendo assim, essas respostas podem ser descritas como reflexos inatos, sendo modulados por conexões entre a medula espinal e tronco encefálico (VIERCK; KLINE; WILEY, 2004).

Nesse trabalho, foi observado que a resposta nocifensiva suscitada pelo modelo intra-articular foi mediada quase que exclusivamente pelo reflexo do levantar sustentado do membro. Já no modelo intraplantar, foram caracterizadas duas respostas nocifensivas que estão de acordo com a literatura: o reflexo do lambar/morder a pata e o reflexo do levantar sustentado do membro (DUBUISSON; DENNIS, 1977; SADDI; ABBOTT, 2000). Porém, a implicação de cada uma dessas respostas comportamentais será discutida a seguir.

Comparação do comportamento de levantar sustentado do membro expresso em animais submetidos à administração de formalina intraplantar ou intra-articular

Os achados demonstraram que os animais do modelo intra-articular expressaram proeminentemente uma única resposta nocifensiva, referida como levantar sustentado do membro. Na literatura foi demonstrado que esse comportamento apresenta a característica de discriminar a intensidade da estimulação nociceptiva, a qual foi induzida pela aplicação de diferentes concentrações de formalina intra-articular, no teste de incapacitação articular (MARTINS; BASTOS; TONUSSI, 2006; SOUSA-SILVA *et al.*, 2013). No entanto, embora esse comportamento (modelo intra-articular) tenha sido visualmente

semelhante ao comportamento de levantar sustentado do membro induzido pela formalina intraplantar, aquele pareceu diferir deste por sugerir uma qualidade mais proeminente de nocicepção. Isso porque, no modelo intraplantar, somente após a metade do tempo de execução do teste (período o qual está relacionado com uma redução da entrada nociceptiva (DICKENSON; SULLIVAN, 1987)), é que a expressão desse comportamento se tornou mais evidente. Ainda, essa diferença qualitativa das respostas observadas entre os dois modelos é provável de acontecer, uma vez que se é sugerido que o processamento neural, tanto do estímulo nociceptivo (LEWIS, 1942 apud KEAY; BANDLER, 2002) quanto de outras possíveis sensações que possam ser evocadas pela formalina, aconteçam de maneira diferenciada entre os dois modelos. Tão diferente é o processamento do estímulo nociceptivo entre os dois modelos, o levantar sustentado do membro induzido pela formalina intraplantar demonstra uma expressiva alternância com o comportamento de lamber/morder a pata até aproximadamente a metade do tempo de execução do teste, enquanto que no modelo intra-articular este comportamento praticamente inexistente (dado não mostrado).

Avaliação do comportamento de lamber/morder a pata induzido pela administração de formalina intraplantar

O comportamento de lamber/morder a pata representa grande parte do repertório comportamental dos animais do modelo intraplantar. Ainda, os achados desse trabalho demonstraram que a resposta máxima de expressão do lamber/morder a pata ocorreu aproximadamente entre 20-40 min após a administração de formalina, de maneira semelhante aos achados de outros autores (SUGIMOTO *et al.*, 1986; WHEELER-ACETO; COWAM, 1991).

Na literatura, foi demonstrado que o comportamento lamber/morder a pata é sensível a drogas analgésicas com diferentes mecanismos de ação, dependendo da fase do teste de formalina. Por exemplo, a morfina e a codeína, analgésicos de ação central, reduziram à expressão do lamber/morder a pata em ambas as fases do teste de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Por outro lado, esses mesmo autores demonstraram que as drogas anti-inflamatórias não esteroidais indometacina e naproxeno, bem como as esteroidais dexametasona e hidrocortisona, foram capazes de inibir a expressão desse comportamento somente na segunda fase do teste, enquanto que o ácido acetilsalicílico e o paracetamol mediaram um efeito antinociceptivo em ambas as fases. Dessa forma, a expressão do lamber/morder a pata na

fase 1 do teste de formalina parece estar mais bem relacionada a um efeito direto da formalina nos nociceptores, uma vez que drogas analgésicas atenuam a expressão desse comportamento nessa fase. Em contraste, drogas com menor potencial analgésico e/ou que apresentam um potencial anti-inflamatório reduzem a expressão do lamber/morder a pata somente na fase 2 do teste, possivelmente ao atuarem impedindo mecanismos indiretos de ativação/sensibilização do nociceptor (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Comparação entre o comportamento de lamber/morder a pata e o levantar sustentado de membro em animais submetidos à administração de formalina intraplantar

Na literatura foi demonstrado que o lamber/morder a pata é um comportamento organizado a nível supraespinal, uma vez que após a transecção espinal em ratos, a expressão desse comportamento foi totalmente abolida (WHEELER-ACETO; COWAM, 1991). Isso sugere que a expressão desse comportamento pode ser mais facilmente influenciada/modulada por um componente emocional e/ou atencional do que quando comparado ao levantar sustentado de membro induzido pela formalina intraplantar, uma vez que este parece ser organizado apenas a nível espinal (VIERCK; KLINE; WILEY, 2004).

No decorrer do teste, foi observado uma diferença no perfil temporal de expressão do comportamento de levantar sustentado do membro e do lamber/morder a pata. No entanto, estudos eletrofisiológicos demonstraram que a injeção subcutânea de formalina 5% resultou em dois períodos de aumento de atividade das fibras C (DICKENSON; SULLIVAN, 1987), os quais coincidem quase que exatamente com curso temporal de expressão do comportamento de lamber/morder a pata (OLUYOMI; HART; SMITH, 1992). Diante disso, podemos sugerir que o reflexo de levantar sustentado do membro, induzido pela formalina intraplantar, pode não estar bem relacionado com a nocicepção, principalmente na segunda metade do teste (30-60 min).

Ainda, os achados demonstraram que, na primeira metade do teste (0-30 min), o comportamento de levantar sustentado do membro parece estar suprimido, ao menos em grande parte, porque o estado atencional do animal é principalmente direcionado para a evocação do comportamento de lamber/morder a pata. Em contrapartida, na segunda metade do teste (30-60 min), onde o esperado seria que a expressão de ambos os comportamentos fosse reduzida em função da diminuição da

entrada nociceptiva (redução dos disparos elétricos nas fibras aferentes primárias) (DICKENSON; SULLIVAN, 1987), é quando a expressão do levantar sustentado do membro torna-se ainda mais evidente. Uma possível explicação se baseia no fato de que se a entrada nociceptiva é reduzida com o passar do tempo (DICKENSON; SULLIVAN, 1987), a demanda emocional/atencional necessária para evocar o comportamento de lambar/morder a pata também reduza proporcionalmente e, dessa forma, se tornaria possível uma maior expressão do reflexo do levantar sustentado de membro. Se assim for, o comportamento de levantar sustentado de membro induzido pela formalina intraplantar poderia estar melhor refletindo um estado de sensibilização motora do que a nocicepção. Corroborando a essa sugestão, Saddi e Abbott (2000) não observaram uma correlação positiva significativa entre o comportamento de levantar sustentado da pata induzido pela formalina intraplantar com as diferentes concentrações de formalina aplicadas em camundongos.

A partir do conjunto de informações apresentado acima, sugerimos que no modelo intraplantar, o comportamento do lambar/morder a pata pode refletir melhor uma condição de nocicepção do que o levantar sustentado do membro. De acordo, Saddi e Abbott (2000) demonstraram que o lambar/morder de pata está positivamente correlacionado com as diferentes concentrações de formalina aplicadas, podendo assim, ser considerada uma medida válida de nocicepção induzida pela formalina intraplantar.

Avaliação do comportamento de imobilidade evocado na primeira metade do teste (0–30 min)

A avaliação desse parâmetro teve como objetivo avaliar a interação dos animais que foram submetidos à administração de formalina intraplantar ou intra-articular com o ambiente no qual esses animais foram previamente familiarizados (caixa de observação), levando-se em consideração a expressão do comportamento levantar sustentado do membro como um indicativo de nocicepção.

Assim, os achados desse trabalho evidenciaram uma expressão diferenciada do comportamento de imobilidade entre os animais de cada modelo. Na primeira metade do teste, a administração de formalina intraplantar pareceu provocar no animal uma maior necessidade de interação com o ambiente a sua volta (caixa de observação) do que quando comparado aos animais submetidos à administração de formalina intra-articular. Isso porque, a formalina intraplantar suscitou

comportamentos defensivos mais proativos, conduzindo o animal a procurar a fonte da estimulação nociceptiva e/ou a fuga desse ambiente. De fato, foi relato que a dor proveniente do tecido cutâneo, desencadeia uma resposta emocional mais ativa que reflete em maior envolvimento com o ambiente (LEWIS, 1942 apud KEAY; BANDLER, 2002).

Em contrapartida, os resultados demonstraram que a administração de formalina intra-articular evocou comportamentos mais passivos, caracterizados por um maior tempo dispendido na postura imobilidade por esses animais. Ainda, foi verificado que o perfil de expressão do comportamento de imobilidade induzido pela formalina intra-articular segue em paralelo ao perfil temporal de expressão do levantar sustentado do membro quando mensurado separadamente (comparar as figuras 2 e 3, respectivamente). De maneira semelhante, a dor profunda é reconhecida por desencadear uma reação caracterizada por imobilidade, diminuição da vigilância, diminuição da reatividade (ou seja, um enfrentamento emocional mais passivo/menor envolvimento com o ambiente) (LEWIS, 1942 apud KEAY; BANDLER, 2002).

Na clínica, uma das características da dor crônica é a de resultar na perda da capacidade do indivíduo para realizar as suas tarefas cotidianas, o que reflete em um maior estado de imobilidade do indivíduo (CARVALHO, 1999). Além disso, associado à problemática da dor persistente, grande parte destes indivíduos desenvolvem transtornos de humor como depressão e ansiedade (CASTRO *et al.*, 2011). Na área da depressão, por exemplo, alguns testes em animais são utilizados por apresentarem elevado grau de preditibilidade farmacológica. Dentre eles, pode ser citado o desamparo aprendido e o desespero comportamental (para revisão, ver NESTLER; HYMAN, 2010). Embora executados por metodologias diferentes entre si, estes dois testes baseiam-se no desenvolvimento de um estado de inibição comportamental (visualmente representado por uma postura de imobilidade adotada pelo animal), sendo este desencadeado por uma fonte de estresse de caráter incontrolável. De maneira semelhante, os animais do modelo intra-articular parecem compartilhar, ao menos em parte, um estado de inibição comportamental, promovido pela estimulação nociceptiva. Isso porque a formalina constitui uma forma de estimulação tônica, inescapável, e por um longo período (quando comparado, por exemplo, ao teste da placa quente ou o teste de retirada da cauda), o que poderia possibilitar ao animal o desenvolvimento de um perfil semelhante ao do estado de inibição comportamental no decorrer do teste.

Portanto, os resultados apresentados até então sugerem que o modelo intra-articular poderia representar melhor uma condição de dor clínica persistente, uma que vez o comportamento de imobilidade evocado por esses animais pode refletir uma condição de desistência frente a uma condição aversiva, inescapável (formalina intra-articular). Por outro lado, a administração de formalina intraplantar suscitou comportamentos defensivos mais proativos, que parecem se relacionar melhor com as respostas observadas na dor clínica aguda. Isso porque, a dor aguda gera respostas de fuga, proteção, busca por apoio, e comportamentos do tipo-ansioso nos indivíduos (CARVALHO, 1999).

Avaliação do comportamento de imobilidade expresso na segunda metade do teste (30 – 60 min)

Os achados demonstraram que a formalina intra-articular promoveu uma redução progressiva do tempo dispendido pelo animal na postura imobilidade (segunda metade do teste). Isso, talvez seja um reflexo de uma condição na qual, além da entrada nociceptiva estar reduzindo com o passar do tempo, também, todos os experimentos foram conduzidos no ciclo claro dos animais experimentais. Sendo assim, ao mesmo tempo em que os animais tendem a reduzir a expressão das respostas nocifensivas, o estado normal de repouso é facilitado. Dessa forma, embora o estado de repouso seja visualmente caracterizado por uma postura de imobilidade, este não foi mensurado como parte do parâmetro de imobilidade pelo fato do animal não demonstrar mais o componente nociceptivo associado. Isso porque, nessa condição sugere-se que a imobilidade de repouso não reflita mais um estado emocional de grande importância, como por exemplo, uma condição onde o animal evoca a imobilidade como forma de desistência, frente a um estresse inescapável.

Em contrapartida, a administração de formalina intraplantar resultou no aumento progressivo do tempo de imobilidade. No entanto, como já discutido anteriormente, o comportamento de levantar sustentado do membro induzido pela formalina intraplantar, parece não estar refletindo a nocicepção (embora tenha sido inicialmente deflagrado pela formalina) e, portanto, sugere-se que a postura de imobilidade expressa pelos animais nesse período de tempo esteja mais bem relacionada a um estado de repouso do animal do que com o envolvimento de um componente emocional de maior importância.

Expressão do comportamento de exploração vertical em animais submetidos à administração de salina ou formalina pela via intraplantar ou intra-articular

O comportamento de exploração vertical foi mensurado na tentativa de se estabelecer uma relação da influência do componente sensorial da nocicepção sobre o componente emocional do animal, uma vez o comportamento de exploração vertical constitui um dos parâmetros utilizados para descrever a emocionalidade do animal no teste do campo aberto (PRUT; BELZUNG, 2003).

Na literatura a exploração vertical é descrita como um comportamento relacionado ao estado atencional/emocional do animal para com o ambiente externo, que permite ao animal a detecção de informações relacionadas com o ambiente à sua volta, como por exemplo, identificar uma possível fonte de ameaça (ALVES; CARVALHO; VENDITTI, 2012). No entanto, esse comportamento pode ser de complexa interpretação pelo fato de ser modulado pelos níveis de excitabilidade do sistema nervoso central (CUNHA; MASUR, 1978).

Os achados desse trabalho demonstraram que a expressão do comportamento de exploração vertical nos animais dos modelos intraplantar e intra-articular foi atenuada, sendo que esse efeito foi maior no modelo intra-articular. Em seus estudos, Saddi e Abbott (2000), demonstraram que diferentes concentrações de formalina intraplantar foram capazes de atenuar a expressão dos comportamentos classificados por eles como sendo ativos (dentre os quais, está o comportamento de exploração vertical), de uma maneira concentração-dependente. Corroborando, Butler e colaboradores (2012), também demonstraram que a administração intraplantar de formalina 2,5% atenuou a expressão desse comportamento. Embora nenhuma evidência tenha sido exposta na literatura até o momento, uma menor expressão desse comportamento pode ser esperada nos animais do modelo intra-articular porque a formalina, quando administrada por essa via, foi encontrada anteriormente por induzir uma resposta comportamental mais passiva, caracterizada por um maior tempo dispendido por esses animais na postura de imobilidade do que à resposta observada no modelo intraplantar.

Em conjunto, os achados dessa sessão demonstraram que a nocicepção induzida pela formalina foi capaz de atenuar a expressão da exploração vertical, que por sua vez é considerado um comportamento essencial para a sobrevivência do animal (ALVES; CARVALHO;

VENDITTI, 2012). Ainda, os animais do modelo intra-articular parecem expressar um perfil comportamental que se assemelha melhor à condição de dor clínica persistente, caracterizado pela expressão de comportamentos sugestivos de menor interesse/motivação do animal em explorar o ambiente externo, embora, a hipótese de que esses animais possam evocar esses comportamentos defensivos como uma estratégia comportamental não pode ser descartada (reserva energética ou simplesmente proteção do membro, por exemplo).

Expressão do comportamento de autolimpeza em animais submetidos à administração de salina ou formalina pela via intraplantar ou intra-articular

O comportamento de autolimpeza pode ser evocado de maneira diferenciada diante de condições opostas: baixo estresse (“conforto”) ou alto estresse (KALUEFF, 2000). Na primeira condição, a de “conforto”, a autolimpeza é processada normalmente na direção cefalocaudal, na qual se caracteriza por movimentos repetitivos sequenciais no lambe de patas, seguido da limpeza na região da face, cabeça, corpo, cauda e genitália (KALUEFF, TUOHIMAA, 2004; KRUK *et al.*, 1998). Em contrapartida, nas condições onde o nível de estresse é maior, esse comportamento é evocado de forma rápida em curto período de tempo, o que resulta na interrupção da sequência completa desse comportamento (KALUEFF, 2000). A evocação da autolimpeza é de extrema importância, uma vez que esse comportamento exige o direcionamento da atenção do animal para si ou induz o cuidado de si (autorreparação), assumindo assim, um caráter de proteção na maioria das vezes.

Os achados desse trabalho demonstraram que a administração de formalina intraplantar ou intra-articular atenuou a expressão do comportamento de autolimpeza quando comparado aos animais do grupo controle, tratados unicamente com solução salina 0,9% pela via intraplantar ou intra-articular. Corroborando os achados, Butler e colaboradores (2012) demonstraram que a formalina intraplantar 2,5% reduziu a expressão de comportamentos relacionados com a atividade exploratória/locomotora dos animais, dentre os quais se inclui a autolimpeza.

Em relação a esses achados, é razoável pensar que um animal demande grande parte do seu tempo direcionando a sua atenção para o cuidado do seu estado físico, e que por isso há uma necessidade de expressar o comportamento da autolimpeza de tempos em tempos. De fato, em ratos machos adultos, por exemplo, foi relatado que

aproximadamente 40% do seu tempo de vigília é direcionado para a autolimpeza (BOLLES, 1960). Além disso, em paralelo, a dor clínica persistente também reduz o caráter atencional do indivíduo por si mesmo (CARVALHO, 1999). Sendo assim, sugere-se que a redução na expressão da autolimpeza, induzida pela administração de formalina, possa ser preditivo para alguns padrões comportamentais que são expressos em humanos com dor persistente, e que refletem o componente afetivo-motivacional da dor (como por exemplo, o abandono ou a redução do autocuidado).

Portanto, a mensuração do comportamento de autolimpeza parece ser uma medida válida que pode oferecer contribuições importantes no campo de pesquisa da dor, embora estudos anteriores envolvendo a administração de diferentes concentrações de formalina intraplantar em camundongos não encontraram uma correlação significativa (SADDI; ABBOT, 2000). Além disso, a interpretação do comportamento de autolimpeza deve ser realizada com o máximo de cautela, uma vez que vários neurotransmissores e neuropeptídios podem modular a expressão desse comportamento, tornando a sua interpretação e/ou extrapolação uma tarefa difícil (TRABER *et al.*, apud SERAFIM; FELÍCIO, 2001; MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993).

Atividade locomotora em animais submetidos à administração de salina ou formalina pela via intraplantar ou intra-articular

Em relação à atividade locomotora, apenas os animais do modelo intra-articular demonstraram uma significativa redução no número de quadrantes cruzados quando comparado aos animais tratados com solução salina 0,9% intra-articular. No entanto, embora esses animais tenham deambulado menos pelo aparato experimental, essa resposta pareceu estar mais relacionada com as alterações emocionais induzidas pela formalina intra-articular do que a um prejuízo significativo na capacidade motora do animal que, por sua vez, tenham impossibilitado o animal de evocar algum dos seus comportamentos. Isso porque, a resposta observada com administração de formalina intra-articular não diferiu da resposta induzida pela formalina intraplantar.

Conclusão parcial sobre os comportamentos induzidos pela administração de formalina intraplantar ou intra-articular

Em conjunto os achados desse trabalho demonstraram que a aplicação de um mesmo estímulo nociceptivo (formalina 2%) é capaz de

promover a expressão diferenciada de comportamentos, quando esse estímulo é aplicado em tecido superficial (via intraplantar) ou profundo (via intra-articular). Isso porque, possivelmente as vias nociceptivas envolvidas no processamento da informação nociceptiva são passíveis de serem diferentes entre os dois modelos. No entanto, mesmo que apresentem diferenças entre si, os animais de ambos os modelos reduzem a expressão de comportamentos habituais e essenciais a sua sobrevivência (autolimpeza e exploração vertical), embora em uma magnitude diferenciada. Isso sugere que o estímulo nociceptivo (formalina) é capaz de modificar a valência que o animal atribui entre o ambiente externo e interno de uma maneira diferenciada, dependendo da via pela qual a formalina foi administrada.

Por último, os achados demonstraram que a administração de formalina intra-articular suscitou comportamentos defensivos que melhor se assemelham com as características comportamentais observadas na dor clínica persistente e, portanto, esse modelo poderia apresentar grandes contribuições futuras na área de pesquisa da dor evocada por tecidos profundos.

6.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MORFINA SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR

A morfina é uma droga opioide clássica amplamente utilizada na clínica devido ao seu efeito analgésico. Portanto, essa droga foi uma valiosa ferramenta farmacológica utilizada para avaliar o grau de discriminação e sensibilidade dos comportamentos nociceptivos, induzidos pela formalina intraplantar ou intra-articular, em detectar o efeito analgésico mediado por essa droga. Além disso, também foram avaliados os efeitos mediados pela morfina sobre a modulação dos comportamentos não-nociceptivos nos animais do modelo intraplantar e intra-articular.

Comparação do comportamento de levantar sustentado do membro mediante a manipulação comportamental por morfina

Os achados referentes à expressão do levantar sustentado do membro, induzido pela formalina intraplantar, em animais previamente tratados com morfina, reforçaram a sugestão inicial de que esse comportamento é qualitativamente diferente do levantar sustentado de

membro induzido pela formalina intra-articular. Isso porque, a expressão desse comportamento nos animais do modelo intraplantar foi afetada pela morfina (reduzida) somente na fase 2 do teste da formalina. Isso implica que esse comportamento esteja sendo modulado de maneira indireta pela morfina, impedindo mecanismos indiretos de ativação/sensibilização do nociceptor (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Além disso, como somente a maior dose de morfina (4,0 mg/kg) foi encontrada por alterar a expressão do levantar sustentado de membro, induzido pela formalina intraplantar, um prejuízo motor, mediado pela morfina, não pode ser descartado. Isso porque, já foi demonstrado que a utilização da morfina, em uma dose menor (2,5), foi capaz de alterar a atividade locomotora dos animais (KÖKS *et al.*, 1999). Sendo assim, sugere-se que a expressão do levantar sustentado do membro em animais do modelo intraplantar esteja mais bem relacionada a uma sensibilização motora, proveniente da estimulação nociceptiva, do que a uma resposta reflexa nociceptiva.

Por outro lado, os achados desse trabalho demonstraram que a morfina, nas doses de 1,0 e 4,0 mg/kg, promoveu uma redução na expressão do levantar sustentado de membro induzido pela formalina intra-articular, em ambas as fases do teste da formalina (fase 1 e 2). Corroborando ao achado, Martins e colaboradores (2006) demonstraram que a morfina, na maior dose (4,0 mg/kg), atenuou a expressão desse comportamento nos animais do modelo intra-articular, em ambas as fases do teste de formalina. Sendo assim, é possível sugerir que a expressão desse comportamento seja modulada tanto de maneira direta (redução da expressão na fase 1), quanto de maneira indireta (redução da expressão na fase 2) pela morfina, o que é compatível com os efeitos promovidos por essa droga na literatura (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Avaliação do comportamento de lamber/morder a pata mediante a manipulação comportamental por morfina

Os resultados demonstraram que a morfina (1,0 e 4,0 mg/kg) reduziu a expressão do lamber/morder a pata (efeito observado na fase 1 e 2 do teste da formalina), o que é compatível com o efeito antinociceptivo dessa droga encontrado na literatura (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Corroborando o achado, Wheeler-Aceto e Cowan (1993) demonstraram que a expressão do lamber/morder a pata, induzido pela formalina intraplantar, é sensível a modulação por uma ampla faixa de doses de morfina (0,3 - 30 mg/kg).

A partir do conjunto de informações citadas acima, se torna possível sugerir que o comportamento do lambe/morder a pata é a resposta nocifensiva induzida pela formalina intraplantar que melhor se assemelha ao comportamento do levantar sustentado de membro induzido pela formalina intra-articular. Isso porque, ambos os comportamentos demonstram respostas semelhantes mediante a administração das mesmas doses de morfina (1,0 e 4,0 mg/kg). Portanto, essa sugestão implica que ambos os comportamentos apresentam um grau equiparado de sensibilidade e discriminação aos efeitos da morfina.

Avaliação do comportamento de exploração vertical mediante a manipulação comportamental por morfina

Posteriormente, foi avaliada a influência da morfina sobre a expressão do comportamento de exploração vertical. Sendo assim, foi evidenciado que a morfina por si (1,0 e 4,0 mg/kg) atenuou a expressão da exploração vertical quando comparado aos animais do grupo controle (nesse experimento não foi utilizado formalina). Em seus experimentos, Neubert e colaboradores (2007) demonstraram que a administração de morfina (2,5 e 5,0 mg/kg) também promoveu uma redução na expressão do comportamento de exploração vertical, enquanto que nenhum efeito foi observado com a dose de 0,5 mg/kg. Essa resposta à morfina já era esperada, uma vez que o animal não recebeu nenhum estímulo prévio a sua avaliação comportamental, dado efeito depressor dessa droga a nível de sistema nervoso central.

Por outro lado, mediante a uma condição onde o estímulo nociceptivo foi aplicado (formalina), verificou-se que todas as doses de morfina testadas, de maneira dose-dependente, foram capazes de atenuar a expressão do comportamento de exploração vertical nos animais do modelo intraplantar. No entanto, a expressão da exploração vertical nos animais do modelo intra-articular foi atenuada somente com a morfina 4,0 mg/kg. Dessa forma, podemos sugerir que o modelo intra-articular mostra-se mais resistente ao efeito da morfina do que os animais do modelo intraplantar, uma vez que a formalina intra-articular por si atenua a expressão desse comportamento de maneira mais acentuada. Isso implica que doses maiores de morfina do que as necessárias para produzir um efeito antinociceptivo sejam necessárias para atenuar ainda mais a expressão desse comportamento nos animais do modelo intra-articular.

No modelo intraplantar, os animais mostraram-se mais sensíveis ao efeito supressor mediado pela morfina sobre a expressão da

exploração vertical, inclusive para uma dose que anteriormente demonstrou não afetar a expressão desse comportamento (experimento realizado na ausência de formalina) (0,4 mg/kg). Nessa condição, a morfina 0,4 mg/kg promoveu um efeito facilitatório, ao encontro do efeito supressor promovido pela formalina sobre a expressão desse comportamento. Uma possível explicação para esse achado baseia-se no efeito pró-nociceptivo, o qual já foi descrito na literatura com a utilização da morfina em doses baixas (WHEELER-ACETO; COWAN, 1993). No entanto, como a análise estatística adotada nesse trabalho não se propôs a investigar o efeito da variável de repetição (tempo), a possibilidade de um efeito pro-nociceptivo mediado pela morfina (0,4 mg/kg) não pode ser descartada, uma vez que a resposta observada vai ao encontro de tal efeito. Por outro lado, Wheeler-Aceto e Cowan (1993) demonstraram que a morfina administrada na dose de 0,3 mg/kg foi suficientemente capaz de promover um efeito antinociceptivo, enquanto que um efeito pró-nociceptivo foi relatado somente com a utilização de uma dose de morfina muito menor (0,03 mg/kg). Em conjunto, esses achados permitem a sugestão de que o efeito supressor da morfina sobre o comportamento de exploração vertical, em animais do modelo intraplantar, pode ser mais facilmente detectável do que os efeitos da morfina sobre as respostas nocifensivas (sejam esses efeitos do tipo antinociceptivo ou pró-nociceptivo).

Quanto ao efeito observado com a utilização de morfina nas doses de 1,0 e 4,0 mg/kg sobre o comportamento de exploração vertical, este pareceu não se somar ao efeito supressor já induzido pela formalina intraplantar sobre a expressão desse mesmo comportamento. Isso porque, a administração dessas doses de morfina promoveu um efeito do tipo antinociceptivo (evidenciado pela redução no tempo do lamber/morder a pata). Sendo assim, esperar-se-ia que a motivação para que o animal explorasse o ambiente a sua volta fosse aumentada, ao encontro dos níveis basais, uma vez que o efeito supressor induzido pela formalina sobre a expressão desse comportamento estaria sendo reduzido pela morfina. No entanto, como a morfina por si foi encontrada por mediar um efeito supressor sobre a expressão da exploração vertical (experimento realizado na ausência de formalina), a observação de uma resposta final facilitatória sobre a expressão desse comportamento não foi encontrada.

Uma grande implicação dos achados apresentados acima se deve a translação do comportamento animal de exploração vertical para o contexto clínico da dor, uma vez que a dor persistente frequentemente reduz a motivação/interesse do indivíduo para com o ambiente externo.

Sendo assim, pelo fato da morfina ser considerada uma droga com ótima eficácia analgésica na clínica, esperar-se-ia que essa droga, ao atuar em estruturas centrais relacionadas ao componente emocional da dor, poderia restaurar, ao menos em parte, o interesse do animal em explorar o ambiente externo (ao encontro dos níveis basais). Porém, essa resposta não foi observada. Uma possível explicação refere-se ao fato de que os efeitos mediados pela morfina sobre a expressão dos comportamentos de exploração vertical e autolimpeza foram relatados por serem dose (PATTI *et al.*, 2005), de maneira não-linear, e tempo-dependentes (SOIGNIER *et al.*, 2000; IWAMOTO, 1984), presumidamente em consequência do envolvimento dos diferentes tipos de receptores opioides envolvidos. Dessa forma, resultados diferentes poderiam ter sido obtidos caso o tempo de análise ou as doses de morfina testadas fossem alteradas.

Avaliação do comportamento de autolimpeza mediante a manipulação comportamental por morfina

Os resultados demonstraram a administração de morfina (0,4, 1,0 ou 4,0 mg/kg), atenuou a expressão do comportamento autolimpeza quando comparado aos animais do grupo controle, tratados unicamente com solução salina 0,9% (experimento realizado na ausência de formalina). No entanto, mediante a aplicação do estímulo nociceptivo (formalina intraplantar ou intra-articular), apenas a morfina na dose de 4,0 mg/kg foi capaz de promover esse efeito.

Porém, apesar da morfina, por si, atenuar a expressão da autolimpeza na ausência da estimulação nociceptiva, este efeito pareceu não se somar ao efeito supressor induzido pela formalina sobre a expressão desse mesmo comportamento. Uma justificativa desse achado, encontrado com a morfina 1,0 mg/kg e 4,0 mg/kg, relaciona-se a promoção do efeito antinociceptivo, o qual ambas as doses induziram. Isso porque, ao inibir o componente nociceptivo, que por sua vez atenuava a expressão da autolimpeza, esperar-se-ia que a expressão desse comportamento fosse restabelecida ao encontro dos níveis basais (aqui o termo “basal” refere-se ao animal controle tratado unicamente com salina). Porém, tal resposta não foi observada, possivelmente porque, a morfina por si atenuou a expressão desse comportamento. Ainda, não podemos excluir a possibilidade de a morfina atuar sobre um componente motor (4,0 mg/kg) e assim reduzir a expressão desse comportamento, uma vez que esse efeito já foi relatado na literatura por

ocorrer com a administração de uma dose ainda menor de morfina (2,5 mg/kg) (KÖKS *et al.*, 1999).

Uma importante implicação do conjunto de resultados citados acima se refere à translação do comportamento animal de autolimpeza para um contexto clínico da dor. Isso porque, a dor persistente muitas vezes reduz a motivação/interesse do indivíduo para o autocuidado. Ainda, como já discutido anteriormente, esperava-se que a morfina promovesse, ao menos em parte, um aumento no interesse/motivação do animal por si ou para o cuidado de si (ao encontro dos níveis basais). No entanto, de maneira semelhante à relatada para o comportamento de exploração vertical, os efeitos mediados pela morfina sobre a autolimpeza, parecem ser dose-tempo-dependentes (PATTI *et al.*, 2005, SOIGNIER *et al.*, 2000; IWAMOTO, 1984). Além disso, outra abordagem de extrema importância seria a de avaliar o efeito de analgésicos não narcóticos sobre esses parâmetros.

6.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE MIDAZOLAM SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR

Outra droga utilizada nesse trabalho foi o midazolam, um benzodiazepínico clássico usado em diversos estudos comportamentais. A dose de midazolam utilizada nesse trabalho foi escolhida por promover um efeito do tipo-ansiolítico no labirinto em cruz elevado (LCE) (GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011).

Comparação do comportamento de levantar sustentado do membro, induzido pela formalina intraplantar ou intra-articular, com o comportamento de lambe/morder a pata, mediante a manipulação comportamental por midazolam

Inicialmente, foi avaliada a influência do midazolam sobre a expressão do comportamento de levantar sustentado de membro. Sendo assim, os resultados demonstraram que o midazolam não foi capaz de alterar a expressão desse comportamento nos animais de ambos os modelos. No entanto, a administração dessa droga atenuou a expressão do lambe/morder a pata, sendo esse efeito evidenciado somente na fase 2 do teste de formalina. Nesse contexto, a sugestão inicial de que o lambe/morder a pata seria um comportamento equivalente (quanto ao grau de sensibilidade e discriminação de drogas) ao levantar sustentado

de membro, expresso nos animais do modelo intra-articular, foi agora desafiada. Em relação a isso, podemos argumentar que o midazolam não é conhecido clinicamente por ser um fármaco analgésico, uma vez que sua capacidade de promover esse efeito é contestável. De maneira semelhante, nos modelos animais de nocicepção, os efeitos mediados pelos BDZs sobre as respostas nocifensivas ainda são considerados contraditórios. Isso se deve principalmente a ampla distribuição do sistema GABAérgico, a qual contribui para a variabilidade das respostas obtidas entre os testes experimentais. Por exemplo, os BDZs foram encontrados promovendo antinocicepção (NISHIYAMA, 2006), nenhum efeito (MARTINS; BASTOS; TONUSSI, 2006) e até mesmo efeito pró-nociceptivo (TATSUO *et al.*, 1999), dependendo da dose e via de administração pela qual os BDZs foram administrados (NIV *et al.*, 1988; TATSUO *et al.*, 1999). Ainda, o midazolam, assim como os demais BDZs, não possui atividade agonística direta no receptor GABA-A. Isso porque essas drogas atuam como moduladores alostéricos positivos, e, portanto, necessitam da presença do GABA para promoverem os seus efeitos (para revisão, ver KORPI *et al.*, 2002). Em relação a isso, é possível argumentar que a ativação do sistema GABAérgico (tônus GABAérgico) se faça de maneira diferenciada entre os animais dos modelos de nocicepção, uma vez que os achados desse trabalho demonstraram que as respostas comportamentais induzidas pela formalina intraplantar e intra-articular por si foram evocadas de maneira diferenciada. Dessa forma, seria possível justificar, ao menos em parte, o motivo pelo qual apenas os animais do modelo intraplantar foram capazes de discriminar o efeito do midazolam.

Outro ponto importante, refere-se ao fato de que o efeito promovido pelo midazolam sobre a expressão do comportamento de lambar/morder a pata foi evidenciado somente na fase 2 do teste. Esse achado implica que o midazolam poderia mediar seu efeito antinociceptivo, ao menos em parte, por impedir os mecanismos indiretos de ativação/sensibilização do nociceptor, e que o comportamento de lambar/morder a pata mostra-se mais sensível a modulação por tais mecanismos do que o levantar sustentado de membro, induzido pela formalina intra-articular.

O potencial do midazolam em promover antinocicepção no modelo intraplantar também pode ser contestado, uma vez que o comportamento de lambar/morder a pata parece estar intimamente relacionado ao de autolimpeza. Isso porque, ambos os comportamentos exigem o recrutamento de um componente atencional/motivacional voltado para si ou para o cuidado de si (autorreparação). Sendo assim,

da mesma forma que a formalina intraplantar induz a expressão do comportamento de lamber/morder a pata, sugerindo ao animal a presença de uma fonte de agressão externa, a autolimpeza pode ser evocada para remover agressores externos, tal como parasitas. Dessa forma, talvez o efeito mediado pelo midazolam, o qual resultou na redução da expressão da autolimpeza (esses dados serão discutidos adiante), pode ter induzido uma redução reflexa da expressão do lamber/morder a pata, o que implica no real efeito dessa droga em mediar um efeito antinociceptivo nesse modelo.

Portanto, a partir do conjunto de dados citados acima, sugerimos que o comportamento de levantar sustentado do membro, induzido pela formalina intra-articular, pode ser mais preditivo para a detecção de drogas com atividade analgésica do tipo-opioide. Por outro lado, o comportamento de lamber/morder a pata demonstrou ainda ser mais sensível para detectar o efeito de drogas que não possuem uma atividade analgésica tão proeminente, as quais possivelmente atuam por mecanismos indiretos de ativação/sensibilização do nociceptor (como por exemplo, modulando um componente emocional/atencional).

Avaliação do comportamento de exploração vertical mediante a manipulação comportamental por midazolam

Em relação aos parâmetros de emocionalidade, primeiramente foi verificado que a administração de midazolam não modificou a expressão do comportamento de exploração vertical, em quaisquer dos experimentos realizados. Na literatura, foi demonstrado que o midazolam em dose maior (0,75 mg/kg), atenuou a expressão do comportamento de exploração vertical em animais submetidos ao paradigma experimental de exposição ao odor de gato, o que é sugestivo de um efeito do tipo ansiolítico neste paradigma (MCGREGOR *et al.*, 2004).

Além da dose de midazolam utilizada, outra possível explicação para a ausência de efeito dessa droga sobre esse parâmetro, refere-se ao fato de que, em todos os experimentos conduzidos, os animais foram previamente submetidos ao aparato experimental (caixa de observação) para uma sessão de familiarização. Essa sessão teve como objetivo submeter o animal a um ambiente novo, a fim de evitar que o estímulo da novidade pudesse modificar a resposta comportamental evocada (processo o qual envolve a aquisição de memória). Diante disso, já está bem estabelecido na literatura que o efeito do tipo ansiolítico do midazolam é perdido após os animais terem sido previamente expostos

ao teste do LCE (GAZARINI; STERN; BERTOGLIO, 2011). É evidente que o LCE baseia-se em um paradigma experimental diferente do que o teste da caixa de observação. Afinal, o LCE apresenta áreas de aversão natural (risco potencial X novidade), bem como áreas de possível proteção ao animal (braços fechados), enquanto que o teste da caixa não oferece compartimentos ou divisões de áreas. Além disso, Gazarini e colaboradores (2011) não aplicaram nenhum estímulo novo ao animal na sua segunda exposição ao LCE. Em contrapartida, nesse trabalho, o animal foi submetido a uma estimulação nociceptiva na sua segunda exposição ao aparato experimental.

Sendo assim, a partir desse conjunto de dados sugerimos que se a administração de midazolam tivesse sido realizada já na primeira exposição do animal ao contexto, uma resposta diferente poderia ter sido observada. Afinal, haveria a possibilidade de o animal apresentar um maior estado de conflito relacionado à escolha entre explorar ou não um ambiente novo (GRAY; MCNAUGHTON, 2000), levando em consideração a presença do estímulo nociceptivo.

Avaliação do comportamento de autolimpeza mediante a manipulação comportamental por midazolam

Posteriormente, foi verificado que a administração de midazolam atenuou a expressão do comportamento de autolimpeza quando comparado aos animais do grupo controle (experimento realizado na ausência da formalina). Muitos estudos na literatura relacionam o efeito de drogas ansiolíticas sobre a expressão do comportamento de autolimpeza. No contexto de um ambiente novo, por exemplo, foi relatado um aumento na expressão do comportamento de autolimpeza em ratos frente ao estímulo da novidade que, no entanto, foi reduzido pela administração de BDZs (MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993; BARROS, 1994). Além disso, os benzodiazepínicos podem reduzir a expressão excessiva da autolimpeza induzida por algumas substâncias tal como o hormônio adrenocorticotrófico (MOODY; MERALI; CRAWLEY, 1993). No entanto, apesar do comportamento de autolimpeza parecer ser preditivo para o efeito ansiolítico de uma droga na clínica, o efeito promovido pelo midazolam sobre o comportamento em si, não pode ser atribuído a um efeito ansiolítico no animal, uma vez que outros componentes também devem ser levados em consideração para a inferência de tal efeito (como os aspectos atencionais e paradigma experimental utilizado).

Outra observação importante, que deve ser levada em consideração nesse estudo, é que o mecanismo pelo qual o midazolam por si reduziu a expressão da autolimpeza (experimento realizado na ausência da formalina), pode não estar relacionada com o mecanismo pelo qual a formalina induziu tal efeito sobre a expressão desse mesmo comportamento. Caso contrário, poderia ser inferido que a redução do comportamento de autolimpeza induzida pela formalina intraplantar estaria relacionada a um efeito do tipo ansiolítico mediado pela formalina. Portanto, é sugerido que o mecanismo pelo qual a formalina intraplantar atenuou a expressão da autolimpeza, estaria relacionado a um aumento no estado de conflito do animal, onde a presença de um novo fator atencional (voltado para o estímulo nociceptivo) compete com um fator atencional preexistente (simplesmente relacionado à necessidade de evocar a autolimpeza). Em contrapartida, o efeito ansiolítico mediado pelo midazolam estaria mais relacionado à ação anticonflito (GRAY; MCNAUGHTON, 2000).

Em relação ao modelo intraplantar, a administração de midazolam promoveu uma redução ainda maior da expressão da autolimpeza do que a induzida somente com a formalina intraplantar. Mediante a aplicação do estímulo nociceptivo, é provável que aumente o estado de conflito do animal, onde a necessidade crescente de evocar a autolimpeza compete com a necessidade de expressar os demais comportamentos defensivos, uma vez que o animal está diante de um estímulo aversivo. Portanto, sugere-se que o efeito do midazolam, estaria justamente promovendo a redução desse estado de conflito exacerbado, de maneira a reduzir a necessidade crescente do animal em expressar a autolimpeza.

A administração de midazolam nos animais do modelo intra-articular não modificou a expressão da autolimpeza, embora a resposta observada vá ao encontro da atenuação desse comportamento. Uma explicação seria pelo possível efeito sedativo mediado por essa droga. Porém, os resultados demonstraram que o parâmetro de atividade locomotora não foi alterado pelo midazolam na dose utilizada (0,5 mg/kg). Em relação a isso, podemos sugerir que como a ativação do sistema GABAérgico parece acontecer de maneira diferenciada entre os animais dos dois modelos de nocicepção, e que a ação do midazolam depende necessariamente do estado ativo desse sistema, doses maiores de midazolam poderiam ser necessárias para atenuar ainda mais a expressão desse comportamento nos animais do modelo intra-articular.

6.4 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MEDIADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DO PENTILENOTETRAZOL SOBRE OS COMPORTAMENTOS INDUZIDOS PELA FORMALINA INTRAPLANTAR OU INTRA-ARTICULAR

O pentilenotetrazol é um antagonista do receptor GABA-A que promove seus efeitos a partir da interação com os sítios de ligação da picrotoxina (HUANG *et al.*, 2001). Inicialmente, essa droga foi referida como um agente pró-convulsivante em humanos. No entanto, quando administrado em doses menores (subconvulsivantes), o pentilenotetrazol pode ser considerado um protótipo de droga ansiogênica, sendo extensamente utilizado em modelos animais de ansiedade (JUNG; LAL; GATCH, 2002). Portanto, o pentilenotetrazol foi uma valiosa ferramenta farmacológica utilizada para avaliar o grau de discriminação e sensibilidade dos comportamentos nociceptivos, induzidos pela formalina intraplantar ou intra-articular. Além disso, também foram avaliados os efeitos mediados pelo pentilenotetrazol sobre a expressão dos comportamentos não-nociceptivos.

Comparação do comportamento de levantar sustentado do membro, induzido pela formalina intraplantar ou intra-articular, com o comportamento de lambe/morder a pata, mediante a manipulação comportamental por pentilenotetrazol

Os achados desse trabalho demonstraram que a administração de pentilenotetrazol não alterou a expressão do comportamento de levantar sustentado do membro, induzido pela formalina intraplantar ou intra-articular. No entanto, a administração dessa droga promoveu uma redução na expressão do lambe/morder a pata, sendo esse efeito evidenciado somente na fase 2 do teste de formalina. Dessa forma, a sugestão de que o lambe/morder a pata seria um comportamento equivalente (quanto ao grau de sensibilidade e discriminação de drogas) ao levantar sustentado de membro, expresso nos animais do modelo intra-articular, foi novamente desafiada.

Na literatura foi relatado que a administração de doses subconvulsivantes de pentilenotetrazol promoveram um aumento do limiar nociceptivo à estimulação nociceptiva cutânea térmica (CONCEIÇÃO *et al.*, 1992) e mecânica (ROCHA *et al.*, 1999). Em contrapartida, o pentilenotetrazol não afetou a nocicepção induzida pela formalina intra-articular no teste de incapacitação articular (MARTINS; BASTOS; TONUSSI, 2006). Esses resultados sugerem uma

sensibilidade maior dos animais do modelo intraplantar para detectar o potencial antinociceptivo do pentilenotetrazol do que o modelo intra-articular.

Além disso, os achados demonstraram que o pentilenotetrazol atenuou a expressão do comportamento de lamber/morder a pata somente na fase 2 do teste de formalina, o que sugere que essa droga possa mediar sua ação antinociceptiva, ao menos em parte, a partir da inibição de mecanismos indiretos de ativação/sensibilização do nociceptor. No entanto, o mecanismo pelo qual o pentilenotetrazol promove o efeito antinociceptivo ainda não está claro. Acredita-se que essa droga atue por um mecanismo semelhante ao da picrotoxina, uma vez que já foram demonstradas que ambas as drogas compartilham o mesmo sítio de ligação alostérico no receptor GABA-A (HUANG *et al.*, 2001). Até o momento, há poucos estudos avaliando o potencial antinociceptivo do pentilenotetrazol. Em contrapartida, sabe-se que a administração intravenosa de picrotoxina é capaz de mediar um efeito antinociceptivo através da desinibição do sistema analgésico descendente no nível da SCP. Dessa forma, o sistema inibitório da dor torna-se ativo o suficiente para gerar uma resposta antinociceptiva, sobrepondo o efeito pró-nociceptivo que é observado com a administração de picrotoxina a nível espinal (KOYAMA; HANAI; YOKOTA, 1998). Outro mecanismo proposto para justificar o efeito antinociceptivo do pentilenotetrazol baseia-se na capacidade dessa droga de modular a atividade de sistemas opioides endógenos (ROCHA *et al.*, 1999). Este resultado implica no envolvimento do sistema opiodérgico na resposta de antinocicepção induzida pela administração sistêmica de pentilenotetrazol.

Evidências na literatura sugerem que alterações na sinalização do sistema GABAérgico estão envolvidas na expressão do comportamento de medo e da analgesia medo condicionado (REA; ROCHE; FINN, 2011). Além disso, sabe-se que a exposição de animais em situações aversivas, de natureza inata ou aprendida, evoca um repertório de comportamentos defensivos, como fuga, luta e a inibição da nocicepção (DEAKIN; GRAEFF, 1991). No paradigma experimental de condicionamento olfatório de medo, foi demonstrado que a simples administração de pentilenotetrazol 15 mg/kg (estímulo aversivo incondicionado) pareado com o odor de café (estímulo neutro) foi capaz de promover um aumento da expressão de comportamentos defensivos, quando esses animais foram reexpostos ao odor de café ou ao contexto, de maneira semelhante à observada com a aplicação de choques elétricos (CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009). Essa resposta,

encontrado pelos autores, foi atribuído ao efeito ansiogênico promovido pelo pentilenotetrazol. Portanto, a partir desse conjunto de dados, sugere-se que o pentilenotetrazol poderia promover uma alteração comportamental compatível com a resposta de medo/estresse nesses animais, de maneira a atenuar a expressão do comportamento de lamber/morder a pata, por exemplo.

Em relação à ausência de efeito do pentilenotetrazol sobre a expressão do levantar sustentado do membro no teste intra-articular, esta é pensada por estar relacionada à dose de pentilenotetrazol utilizada no teste. Isso porque, nesse trabalho os achados foram baseados somente na administração de única uma única dose de PTZ (15 mg/kg). Além disso, como a expressão desse comportamento, no modelo intra-articular, é de maior magnitude do que a resposta de lamber/morder a pata, induzida pela formalina intraplantar, sugere-se que a nocicepção seja experimentada de maneira mais intensa no animal do modelo intra-articular. Sendo assim, supõe-se que doses maiores de pentilenotetrazol seriam necessárias para promover um efeito do tipo antinociceptivo nesse modelo.

Portanto, o comportamento de lamber/morder a pata mostrou-se mais sensível para detectar os efeitos antinociceptivos promovidos pelo pentilenotetrazol, sejam eles mediados por alterações no estado emocional do animal, alterações sensoriais, ou ainda, uma combinação dos dois fatores. No entanto, o potencial analgésico do pentilenotetrazol não foi demonstrado clinicamente. Inicialmente, essa droga foi utilizada em humanos como um estimulante cardiorrespiratório, no entanto, devido ao seu efeito pró-convulsivo, o pentilenotetrazol foi retirado da clínica em 1982 (JÚNIOR, 2007). Isso implica que, a característica da alta sensibilidade apresentada pelo comportamento de lamber/morder, parece não refletir na capacidade desse comportamento em prever o efeito analgésico do pentilenotetrazol na clínica. Por outro lado, o comportamento de levantar sustentado do membro, induzido pela formalina intra-articular, mostra-se menos sensível e talvez mais seletivo para ação de drogas que venham a se tornar analgésicos clinicamente eficazes.

Avaliação do comportamento de exploração vertical mediante a manipulação comportamental por pentilenotetrazol

Em relação aos parâmetros de emocionalidade, verificou-se que o pentilenotetrazol atenuou a expressão do comportamento de exploração vertical, quando comparado aos animais do grupo controle, tratados

unicamente com salina (experimento realizado na ausência da formalina). Além disso, a administração dessa droga também reduziu a exploração vertical nos animais do modelo intraplantar. Acredita-se que esse achado esteja relacionado com o efeito ansiogênico, mediado pelo pentilenotetrazol, o qual poderia promover um aumento na aversividade do animal para com o meio externo. Corroborando ao achado, Cavalli e colaboradores (2009) demonstram que a simples administração de pentilenotetrazol (15 mg/kg), foi capaz de estabelecer um condicionamento olfatório de medo em ratos Wistar. No entanto, o motivo pela qual a formalina por si reduziu a expressão do comportamento de exploração ainda não está claro. Isso porque, talvez o estímulo nociceptivo promova um aumento da aversividade do ambiente externo para o animal, ou ainda, reduza o interesse do animal em explorar esse ambiente (embora uma associação entre os dois fatores também seja possível).

Portanto, a partir do conjunto de resultados citados acima, sugere-se que os animais do modelo intraplantar estão mais sujeitos a modulação comportamental induzida pelo pentilenotetrazol do que os animais do modelo intra-articular. Ainda, o efeito ansiogênico mediado pelo pentilenotetrazol, seria condizente com a sugestão anterior de que essa droga poderia promover analgesia por excitar mecanismos de estresse. Por último, a ausência de resposta no modelo intra-articular frente ao PTZ pode estar relacionada com o fato de que a formalina, quando administrada pela via intra-articular, promove uma maior supressão do comportamento de exploração vertical do que a formalina intraplantar e, por isso, doses maiores de pentilenotetrazol devem ser necessárias para tal efeito.

Avaliação do comportamento de autolimpeza mediante a manipulação comportamental por pentilenotetrazol

Os achados desse trabalho demonstraram que a administração de pentilenotetrazol não modificou a expressão do comportamento de autolimpeza em quaisquer dos experimentos realizados. Além disso, anteriormente foi demonstrado que a administração do midazolam, um modulador alósterico positivo do receptor GABA-A, reduziu a expressão desse comportamento. Nesse caso, o esperado seria que a administração do pentilenotetrazol promovesse o aumento da autolimpeza, uma vez que essa droga atua como um antagonista do receptor GABA-A. No entanto, deve ser levado em consideração que ambas as drogas medeiam suas principais ações de maneira GABA-

dependentes. Dessa forma, é possível que dependendo da contribuição (grau de atividade) do sistema GABAérgico para a resposta de autolimpeza, esse sistema possa se mostrar mais ou menos sensível a ação dessas drogas. Além disso, o midazolam pode promover outros efeitos, de maneira independente do receptor GABA-A. Isso porque, essa droga foi encontrada como sendo capaz de alterar a condutibilidade iônica em células NG108-15, que por sua vez, não expressam o receptor GABA-A (ISHIZAWA *et al.*, 1997). No entanto, a contribuição desse efeito para o achado acima ainda não está clara.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstraram que os comportamentos nociceptivos e não-nociceptivos são evocados de maneira diferenciada entre os animais do modelo intraplantar e intra-articular. Em relação às respostas nocifensivas, o *lamber/morder a pata*, foi o comportamento, induzido pela formalina intraplantar, que melhor discriminou o efeito antinociceptivo da morfina, sendo também sensível ao aparente efeito antinociceptivo mediado pelo midazolam e pentilenotetrazol. Ainda, no modelo intra-articular, os animais expressaram uma única resposta nocifensiva, o *levantar sustentado de membro*. Esse comportamento pareceu discriminar o efeito antinociceptivo da morfina de maneira semelhante ao *lamber/morder a pata*, mas com a vantagem de não se mostrar sensível ao efeito antinociceptivo promovido pelo midazolam e pentilenotetrazol, uma vez que esse efeito é contestado na literatura.

Em relação aos comportamentos habituais (relacionados com a emocionalidade), os resultados demonstraram que a administração de formalina por si, quando administrada pela via intraplantar ou intra-articular, foi capaz de atenuar a expressão do comportamento de exploração vertical, sendo que nos animais do modelo intra-articular esse efeito foi ainda mais expressivo. A administração de formalina (intraplantar ou intra-articular) também reduziu a expressão do comportamento de autolimpeza. Esses resultados implicam que a formalina parece reduzir o estado de motivação do animal ou ainda, aumentar a aversividade do ambiente a sua volta, de maneira que a expressão de comportamentos essenciais à sobrevivência do animal (exploração vertical e autolimpeza) fique comprometida. Além disso, os animais do modelo intraplantar foram mais sensíveis à modulação comportamental induzida por drogas (morfina, midazolam e pentilenotetrazol), o que pareceu contribuir para a maior sensibilidade, apresentada por esse modelo, em detectar o efeito antinociceptivo mediado pelo midazolam e pentilenotetrazol. Por outro lado, os animais do modelo intra-articular mostraram-se menos lábeis a tal modulação.

Ainda, a administração de formalina intraplantar suscitou comportamentos mais proativos, de maneira semelhante à resposta comportamental evocada em humanos na condição de dor aguda. Por outro lado, a administração de formalina intra-articular, suscitou comportamentos defensivos mais passivos, sendo que esse perfil comportamental parece se correlacionar ao observado na dor clínica persistente e, portanto, dessa forma, o modelo intra-articular poderia ser

uma plataforma mais atrativa para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos.

Por fim, as evidências desse trabalho sugerem que a análise conjunta dos comportamentos nociceptivos e não-nociceptivos (relacionados com a emocionalidade) pode ser uma ferramenta mais preditiva para o desenvolvimento de fármacos analgésicos melhores, pois a partir dessa, se poderiam buscar substâncias ou uma combinação delas, que aliassem a redução da dor com a restauração da motivação para a exploração do ambiente e do cuidado de si.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, p. 91-102, 1995.

ADIBPOUR, N.; POORNAJJARI, A.; KHODAYAR, M., J.; REZAEI, S. Antinociceptive Effect of Some Biuret Derivatives on Formalin Test in Mice. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4 (2), p. 179–183, 2014.

ALVES, R.; CARVALHO, J.; VENDITTI, M. High- and Low-Rearing Rats Differ in the Brain Excitability Controlled by the Allosteric Benzodiazepine Site in the GABA_A Receptor. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v. 2, n. 3, p. 315-325, 2012.

BAJIC, D.; PROUDFIT, H. K. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. **Journal of Comparative Neurology**, v. 405 (3), p. 359–379, 1999.

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

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

BARROS, H. M.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, M. A.; TANNHAUSER, M. The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. **Pharmacology and Toxicology**, v. 74 (6), p. 339-344, 1994.

BASBAUM, A. I.; CLANTON, C. H.; FIELDS, H. L. Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. **Journal of Comparative Neurology**, v. 178 (2), p. 209–224, 1978.

- BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Annals of Neurology**, v.4 (5), p. 451-162, 1978.
- BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, v. 46 (6), p. 575-605, 1995.
- BESSON, J. M. Anatomical and biochemical strategy of pain suppressing systems. **Cephalalgia**, v. 7 (6), p. 19-22, 1987.
- BOIVIE, J.; MEYERSON, B. A. A correlative anatomical and clinical study of pain suppression by deep brain stimulation. **Pain**, v. 13 (2), p. 113-126, 1982.
- BOLLES, R. C. Grooming behavior in the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 53, p. 306-310, 1960.
- BUTLER, R. K.; FINN, D. P. Stress-induced analgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 88, p. 184–202, 2009.
- BUTLER, R. K.; FORD, G. K.; HOGAN, M.; ROCHE, M.; DOYLE, K. M.; KELLY, J. P.; KENDALL, D. A.; CHAPMAN, V.; FINN, D. P. Fear-induced suppression of nociceptive behaviour and activation of Akt signalling in the rat periaqueductal grey: role of fatty acid amide hydrolase. **Journal of Psychopharmacology**, v. 26 (1), p. 83-91, 2012.
- CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73 (1), p. 10-16, 2006.
- CAMEROM, A. A.; KAHN, L. A.; WESTLUND, K. N.; WILLIS, W. D. The efferent projections of periaqueductal gray in the rat: a *Phaseolus vulgaris-leucoagglutini* study. II Descending projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 351(4), p. 585-601, 1995.
- CAPONE, F.; ALOISI, A. M. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. **Ann Ist Super Sanita**, v. 40 (2), p. 223-9, 2004.
- CARVALHO, M. **Dor: um estado multidisciplinar**. São Paulo: Summus editorial, 2ª ed., 1999.

CASTRO, M. M. C.; QUARANTINI, L. C.; DALTRO, C.; PIRES-CALDAS, M.; KOENEN, K. C.; KRAYCHETE, D. C.; OLIVEIRA, I.R. de. Comorbidade de sintomas ansiosos e depressivos em pacientes com dor crônica e o impacto sobre qualidade de vida. **Revista de Psiquiatria Clínica**, São Paulo: USP, v. 38, n. 4, p. 126-129, 2011.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L. J.; CAROBREZ, A. P. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning Memory**, v. 92 (4), p. 512-518, 2009.

CHIDIAC, J. J.; RIFAI, K.; HAWWA, N. N.; MASSAAD, C. A.; JURJUS, A. R.; JABBUR, S. J. Nociceptive behaviour induced by dental application of irritants to rat incisors: a new model for tooth inflammatory pain. **European Journal of Pain**, v. 6 (1), p. 55-67, 2002.

CHIENG, B.; CHRISTIE, M. J. Inhibition by opioids acting on mu-receptors of GABAergic and glutamatergic postsynaptic potentials in single rat periaqueductal gray neurones *in vitro*. **British Journal of Pharmacology**, v. 113 (1), p. 303-309, 1994.

CONCEIÇÃO, I. M.; MAIOLINI, J. 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**, v. 25 (8), p. 831-834, 1992.

COUTAUX, A.; ADAM, F. WILLER, J. C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72 (5), p. 359-71, 2005.

CRAIG, A. D. A new view of pain as a homeostatic emotion. **Trends in Neurosciences**, v. 26 (6), p. 303-7, 2003.

CUNHA, J. M.; MANSUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacology**, v. 16 (5), p. 259-267, 1978.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5 (4), p. 305-315. 1991.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. **Pain**, v. 30 (3), p. 349-360, 1987.

DUBUISSON, D.; DENNIS S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4 (2), p. 161-74, 1977.

FIELDS, H. L. Pain: an unpleasant topic. **Pain**, v. 82, p. S61-S69, 1999.

FIELDS, H. L. State-dependent opioid control of pain. **Neuroscience**, v. 5, p. 565-575, 2004.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanism of pain modulation. In: WALL, P.D.; MELZACK, R.(eds). **Textbook of pain**. 4 th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, p. 243-257, 1999.

GATCH, M. B. Effects of benzodiazepines on acute and chronic ethanol-induced nociception in rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 23 (11), p. 1736-1743, 1999.

GAZARINI, L.; STERN, C. A.; BERTOGLIO, L. J. Protein synthesis in dorsal hippocampus supports the drug tolerance induced by prior elevated plus-maze experience. **Neuroscience** v. 179, p. 179–187, 2011.

GILBERT, A. K.; FRANKLIN, K. B. GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. **Pain**, v. 90 (1-2): 25-36, 2001.

GONÇALVES, L.; SILVA, R.; PINTO-RIBEIRO, F.; PEGO, J. M.; BESSA, J. M.; PERTOVAARA, A.; SOUSA, N.; ALMEIDA, A. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. **Experimental Neurology**, v. 213 (1), p. 48-56, 2008.

GRAY, A. J.; MCNAUGHTON, N. **The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry Into the Functions of the Septo-Hippocampal System, Second Edition**. Oxford University Press, New York, p. 424, 2000.

GUNTER, W. D.; SHEPARD, J. D.; FOREMAN, R. D.; MYERS, D. A.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. Evidence for visceral hypersensitivity in high-anxiety rats. **Physiology and Behavior**, 69 (3): 379-382, 2000.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. Anatomy and embryology of the laboratory rat. **BioMed**, Wörthsee, 1986.

HELMSTETTER, F. J. Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44 (2), p. 433-438, 1993.

HENRY, J. L.; YASHPAL, K.; PITCHER, G. M.; CODERRE, T. J. Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. **Pain**, v. 82 (1), p. 57-63, 1999.

HEPPELMANN, B.; JUST, S.; PAWLAK, M. Galanin influences the mechanosensitivity of sensory endings in the rat knee joint. **European Journal of Neuroscience**, v. 12 (5), p. 1567-1572, 2000.

HEPPELMANN, B.; PAWLAK, M. Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed joints of the rat. **Pain**, v. 73 (3), p. 377-382, 1997.

HUANG, R. Q.; BELL-HORNER, C. L.; DIBAS, M. I.; COVEY, D. F.; DREWE, J. A.; DILLON, G. H. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298 (3), p. 986-95, 2001.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30 (1), p. 103-114, 1987.

ISHIZAWA, Y.; FURUYA, K.; YAMAGISHI, S.; DOHI, S. Non-GABAergic effects of midazolam, diazepam and flumazenil on voltage-dependent ion currents in NG108-15 cells. **Neuroreport**, v. 8 (11), p. 2635-8, 1997.

IWAMOTO, E. T. An assessment of the spontaneous activity of rats administered morphine, phencyclidine, or nicotine using automated and observational methods. **Psychopharmacology** (Berl), v. 84 (3), p. 374-382, 1984.

JANSSEN, S. A.; ARNTZ, A. No interactive effect of naltrexone and benzodiazepines on pain during phobic fear. **Behaviour Research and Therapy**, v. 37 (1), p. 77-86, 1999.

JIMÉNEZ-VELÁZQUEZ, G.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Influence of pharmacologically-induced experimental anxiety on nociception and antinociception in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 547 (1-3), p. 83-89, 2006.

JOHANSEN, J. P.; FIELDS, H. L.; MANNING, B. H. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98 (14), p. 8077-82, 2001.

JORUM, E. Analgesia or hyperalgesia following stress correlates with emotional behaviour in rats. **Pain**, v. 32 (3), p. 341-348, 1988.

JUNG, M. E.; LAL, H.; GATCH, M. B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26 (4), p. 429-439, 2002.

KALUEFF, A. V. Measuring grooming in stress and comfort. **Proceedings of Measuring Behavior**, v. 3, p. 148-149, 2000.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. **Brain Research. Brain Research Protocols**, v. 13 (3), p. 151-158, 2004.

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

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**, v. 290 (3), p. 157-160, 2000.

KÕKS, S.; SOOSAAR, A.; VÕIKAR, V.; BOURIN, M.; VASAR, E. BOC-CCK-4, CCK(B) receptor agonist, antagonizes anxiolytic-like action of morphine in elevated plus-maze. **Neuropeptides**, v. 33 (1), p. 63-69, 1999.

KORPI, E. R.; GRUNDER, G.; LUDDENS, H. Drug interactions at GABA(A) receptors. **Progress in Neurobiology**, v. 67 (2), p. 113-159, 2002.

KOYAMA, N.; HANAI, F.; YOKOTA, T. Does intravenous administration of GABAA receptor antagonists induce both descending antinociception and touch-evoked allodynia? **Pain**, v. 76 (3), p. 327-336, 1998.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137 (3), p. 473-477, 2008.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **Journal of Pharmacol and Experimental Therapeutics**, v. 263 (1), p. 136-146, 1992a.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, v. 257 (5074), p. 1276-1279, 1992b.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **Journal of Neuroscience**, v. 15 (4), p. 2768-76, 1995.

MARTINS, M. A.; BASTOS, L. C.; TONUSSI, C. R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **Journal of Pain**, v. 7 (2), p. 100-7, 2006.

MATTHIES, B. K.; FRANKLIN, K. B. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. **Pain**, v. 51 (2), p. 199-206, 1992.

MCCALL, W. D.; TANNER, K. D.; LEVINE, J. D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 208 (1),

p. 45-48, 1996.

MCGREGOR, I. S.; HARGREAVES, G. A.; APFELBACH, R.; HUNT, G. E. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. **Journal of Neuroscience**, v. 24 (17), p. 4134-4144, 2004.

MELO, N. E. B. **Comparação do estresse induzido por dois modelos de nocicepção persistente em ratos: abordagem comportamental e farmacológica**. 2009. 71 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150 (699), p. 971-979, 1965.

MICÓ, J. A.; ARDID, D.; BERROCOSO, E.; ESCHALIER, A. Antidepressants and pain. **Trends Pharmacological Sciences**, v. 27 (7), p. 348-354, 2006.

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

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

JÚNIOR, M. **Drug may counteract Down Syndrome**. Scientific American, 2007. Disponível em:
<<http://www.scientificamerican.com/article/drug-may-counteract-down>>. Acesso em 12 dezembro 2013.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 10 (4), p. 283-94, 2009.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48 (4), p. 254-60, 1955.

MOODY, T. W.; MERALI, Z.; CRAWLEY, J. N. The effects of anxiolytics and other agents on rat grooming behavior. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 90, p. 281-290, 1988.

MOTTA, V., BRANDÃO, M. L. Aversive and antiaversive effects of morphine in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 44 (1), p. 119-125, 1993.

NAKAGAWA, T.; KATSUYA, A.; TANIMOTO, S.; YAMAMOTO, J.; YAMAUCHI, Y.; MINAMI, M.; SATOH, M. Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats. **Neuroscience Letters**, v. 344 (3), p. 197-200, 2003.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13 (10), p. 1161-1169, 2010.

NEUBERT, J. K.; ROSSI, H. L.; POGAR, J.; JENKINS, A. C.; CAUDLE, R. M. Effects of mu- and kappa-2 opioid receptor agonists on pain and rearing behaviors. **Behavioral and Brain Functions**, v. 3, p. 49, 2007.

NEUGEBAUER, V.; LI, W.; BIRD, G. C.; HAN, J. S. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, v. 10 (3), p. 221-234, 2004.

NISHIYAMA, T. Analgesic effects of systemic midazolam: comparison with intrathecal administration. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 53 (10), p. 1004-1009, 2006.

NIV, D.; DAVIDOVICH, S.; GELLER, E.; URCA, G. Analgesic and hyperalgesic effects of midazolam: dependence on route of administration. **Anesthesia and Analgesia**, v. 67 (12), p. 1169-1173, 1988.

NORTON, P. J.; ASMUNDSON, G. J. Anxiety sensitivity, fear, and avoidance behavior in headache pain. **Pain**, v. 111 (1-2), p. 218-223, 2004.

OLKKOLA, K. T.; AHONEN, J. Midazolam and other benzodiazepines. **Handbook of Experimental Pharmacology**, (182), p. 335-360, 2008.

OLUYOMI, A. O.; HART, S. L.; SMITH, T. W. Differential antinociceptive effects of morphine and methylmorphine in the formalin test. **Pain**, v. 49 (3), p. 415-418, 1992.

PATTI, C. L.; FRUSSA-FILHO, R.; SILVA, R. H.; CARVALHO, R. C.; KAMEDA, S. R.; TAKATSU-COLEMAN, A. L.; CUNHA, J. L.; ABÍLIO, V. C. Behavioral characterization of morphine effects on motor activity in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 81 (4), p. 923-927, 2005.

PLOGHAUS, A.; NARAIN, C.; BECKMANN, C. F.; CLARE, S.; BANTICK, S.; WISE, R.; MATTHEWS, P. M.; NICHOLAS, J.; RAWLINS, P.; TRACEY, I. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. **Journal of Neuroscience**, v. 21 (24), p. 9896-9903, 2001.

PRICE, D. D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science**. v. 288 (5472), p. 1769-1772, 2000.

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**, v. 463, p. 3-33, 2003.

PUIG, S.; SORKIN, L. S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, v. 64 (2), p. 345-355, 1996.

RAMZAN, I. M.; LEVY, G. Kinetics of drug action in disease states. XIV. Effect of infusion rate on pentylenetetrazol concentrations in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats at onset of convulsions. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 234 (3), p. 624-8, 1985.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang and Dale Farmacologia**. [Tradução de Raimundo Rodrigues Santos e outros]. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REA, K.; ROCHE, M.; FINN, D. P. Modulation of conditioned fear, fear-conditioned analgesia, and brain regional c-Fos expression following administration of muscimol into the rat basolateral amygdala. **Journal of Pain**, v. 12 (6), p. 712-721, 2011.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. **Science**, v. 164 (3878), p. 444-445, 1969.

REZAYOF, A.; ASSADPOUR, S.; ALIJANPOUR, S. Morphine-induced anxiolytic-like effect in morphine-sensitized mice: involvement of ventral hippocampal nicotinic acetylcholine receptors. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 103 (3), p. 460-466, 2013.

RHUDY, J. L.; GRIMES, J. S.; MEAGHER, M. W. Fear-induced hypoalgesia in humans: effects on low intensity thermal stimulation and finger temperature. **Journal of Pain**, v. 5 (8), p. 458-468, 2004.

ROCHA, L.; CANO, A.; CRUZ, Z.; OMANA-ZAPATA, I.; VILLALOBOS, R.; MAIDMENT, N. T. Opioid peptide systems following a subconvulsant dose of pentylenetetrazol in rats. **Epilepsy Research**, v. 37 (2), p. 141-150, 1999.

SADDI, G.; ABBOTT, F. V. The formalin test in the mouse: a parametric analysis of scoring properties. **Pain**, v. 89 (1), p. 53-63, 2000.

SCHAIBLE, H. G.; GRUBB, B. D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. **Pain**, v. 55 (1), p. 5-54, 1993.

SHANNON, H. J., LUTZ, E. A. Yohimbine produces antinociception in the formalin test in rats: involvement of serotonin (1A) receptors. **Psychopharmacology**, v.149 (1), p.93-97, 2000.

SIMONE, D. A.; KAJANDER, K. C. Responses of cutaneous A-fiber nociceptors to noxious cold. **Journal of Neurophysiology**, v. 77 (4), p. 2049-2060, 1997.

SOIGNIER, R. D.; VACCARINO, A. L.; BRENNAN, A. M.; KASTIN, A. J.; ZADINA, J. E. Analgesic effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the formalin test in mice. **Life Sciences**, v. 67 (8), p. 907-912, 2000.

SOUZA-SILVA, E.; DE OLIVEIRA, D. T.; ETO, C.; STEIN, T.; TONUSSI, C. R. Histamine Produces Opposing Effects to Serotonin in the Knee Joint of Rats. **Journal of Pain**, v. 14 (8), p. 808-817, 2013.

STAMFORD, J. A. Descending control of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75 (2), p. 217-227, 1995.

SUGIMOTO, M., KURAIISHI, Y., SATOH, M.; TAKAGI, H. Involvement of medullary opioid-peptidergic and spinal noradrenergic systems in the regulation of formalin-induced persistent pain. **Neuropharmacology**, v. 25 (5), p. 481-485, 1986.

SULLIVAN, M. J.; REESOR, K.; MIKAIL, S.; FISHER, R. The treatment of depression in chronic low back pain: review and recommendations. **Pain**, v. 50 (1), p. 5-13, 1992.

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. **European Journal of Neuroscience**, v. 18 (8), p. 2343-2350, 2003.

TATSUO, M. A.; SALGADO, J. V.; YOKORO, C. M.; DUARTE, I. D.; FRANCISCHI, J. N. Midazolam-induced hyperalgesia in rats: modulation via GABA(A) receptors at supraspinal level. **European Journal Pharmacology**, v. 370 (1), p. 9-15, 1999.

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

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48 (3), p. 421-427, 1992.

TREEDE, R.; KENSHALO, D. R.; GRACELY, R. H.; JONES, A. K. P. The cortical representation of pain. **Pain**, v. 79 (2-3), p. 105-111, 1999.

VAN SLUYTERS, R. C. **Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research**. Report of an Institute for Laboratory Animal Research Committee, National Research

Council of the National Academies, The National Academy Press, Washington, DC, 2003.

VIERCK, C. J., JR. **Animal models of pain**. In: Wall and Melzack's textbook of pain, 5th edition (McMahon SB, Koltzenburg M, eds), pp 175–185. China: Elsevier Ltd., Churchill Livingstone, 2006.

VIERCK, C. J., JR.; KLINE, R.; WILEY, R. G. Comparison of operant escape and innate reflex responses to nociceptive skin temperatures produced by heat and cold stimulation of rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 118 (3), p. 627-635, 2004.

WALL, P. D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **Journal of Physiology**, v. 188 (3), p. 403-423, 1967.

WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 236 (2), p. 193-199, 1993.

WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. **Psychopharmacology**, v.104 (1), p. 35-44, 1991.

WOOLF, C. J. Long term alterations in the excitability of the flexion reflex produced by peripheral tissue injury in the chronic decerebrate rat. **Pain**, v. 18 (4), p. 325–343, 1984.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. Narcotic analgesic: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. **Pain**, v. 4 (4), p. 299-359, 1978.

ZAMBOTTI, F.; ZONTA, N.; TAMMISO, R.; CONCI, F.; HAFNER, B.; ZECCA, L.; FERRARIO, P.; MANTEGAZZA, P. Effects of diazepam on nociception in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 344 (1), p. 84-89, 1991.