

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**COMPARAÇÃO DO ESTRESSE INDUZIDO POR DOIS MODELOS DE  
NOCICEPÇÃO PERSISTENTE EM RATOS: ABORDAGEM  
COMPORTAMENTAL E FARMACOLÓGICA**

**NATÁLIA ELISA BOING MELO**

**FLORIANÓPOLIS-SC**

**2009/2**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA  
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA DA NOCICEPÇÃO**

**COMPARAÇÃO DO ESTRESSE INDUZIDO POR DOIS MODELOS DE  
NOCICEPÇÃO PERSISTENTE EM RATOS: ABORDAGEM  
COMPORTAMENTAL E FARMACOLÓGICA**

**NATÁLIA ELISA BOING MELO**

**Orientador:**

**Professor Dr. Carlos Rogério Tonussi**

**Co- Orientador:**

**Maria Alcina Martins de Castro**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
à Coordenadoria do Curso de Graduação em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal  
de Santa Catarina como requisito parcial para  
a conclusão do curso.**

**FLORIANÓPOLIS-SC  
2009/2**

## AGRADECIMENTOS

"Quando se diz obrigado, se dizem muitas coisas mais,  
que vêm de muito longe com a origem do indivíduo, e de  
tão perto como o pulsar do coração".

(Pablo Neruda)

Agradeço a todos que passaram pela minha vida nesses, anos de faculdade, amigos e professores, e que, mesmo sem saber, me ensinaram mais do que posso expressar em palavras.

Ao Professor Dr. Carlos Rogério Tonussi, pela orientação, ensinamentos e confiança a mim dispensada.

A Maria Alcina Martins, minha co-orientadora, pessoa a quem devoto a mais sincera e efusiva admiração. Por tanto ter me ensinado e por ter me acompanhado desde os meus primeiros passos no laboratório.

Aos meus pais, pela base sólida, pelo incentivo, ensinamentos e valores. E por nunca medirem esforços para me fazer feliz.

# SUMÁRIO

<b>Sumário .....</b>	<b>4</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>5</b>
<b>Lista de TABELAS .....</b>	<b>7</b>
<b>Lista de abreviaturas .....</b>	<b>8</b>
<b>resumo .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>11</b>
1.1. Dor .....	11
1.2. Fibras e vias Nociceptivas.....	12
1.3. Dor profunda e superficial .....	13
1.4. Dor e ansiedade/ estresse .....	14
1.5. Dor e o teste de formalina .....	17
1.6. Justificativa .....	18
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
2.1. Geral.....	20
2.2. Específicos .....	20
<b>3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>21</b>
3.1. Animais .....	21
3.2. Teste de formalina .....	21
3.3. Desenho experimental.....	22
3.4. Padronizações e análise descritiva dos comportamentos.....	24
3.5. Análises Estatísticas.....	27
<b>4. Resultados.....</b>	<b>29</b>
4.1. Primeira etapa, comparação formalina e salina.....	29
4.2. Segundo etapa do experimento, Animais pré-tratados (via i.p.), meia hora antes do teste de formalina com midazolam.....	42
<b>5. Discussão.....</b>	<b>49</b>
5.1. Primeira etapa.....	50
5.2. Segunda etapa, efeitos do pré-tratamento com midazolam.....	56
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama com o desenho experimental da primeira etapa do estudo. ....	23
Figura 2 - Desenho experimental da segunda etapa do estudo. ....	24
Figura 3 - Comportamento de grooming. ....	25
Figura 4 - Comportamento de rearing. ....	25
Figura 5 - Comportamento de Imobilidade.....	26
Figura 6 - Atividade Exploratória .....	26
Figura 7 - Morder a cauda.....	26
Figura 8 - Ingerir ou manipular o bolo fecal.....	27
Figura 9 - Lambidas no chão.....	27
Figura 10 - Esconder a face .....	27
Figura 11 - Bocejos .....	27
Figura 12 - Resposta nocifensiva da injeção de formalina a 2% subcutânea no joelho (A) e pata (B).....	31
Figura 13 - Efeito da injeção de formalina no comportamento de exploração do ambiente .....	32
Figura 14 – Efeito da injeção de formalina no comportamento de imobilidade.....	33
Figura 15 – Efeito da injeção de formalina no comportamento de Grooming .....	34
Figura 16 - Efeito da injeção de formalina no comportamento de Rearing.....	35
Figura 17 - Efeito da injeção de formalina no comportamento de morder ou lamber a cauda .....	36
Figura 18 - Efeito da injeção de formalina no comportamento de lamber o chão .....	37
Figura 19 - Efeito da injeção de formalina no comportamento de mexer no bolo fecal .....	38
Figura 20 - Efeito da injeção de formalina no comportamento de esconder a face ( <i>hunched</i> ).....	39
Figura 21 - Efeito da injeção de formalina no número de bocejos.....	40
Figura 22 - Efeito da injeção de formalina no número de bolos fecais .....	41
Figura 23 - Efeito do Midazolam no comportamento nociceptivo .....	43
Figura 24 - Efeito do midazolam no comportamento de exploração do ambiente. ....	44
Figura 25 - Efeito do midazolam no comportamento de imobilidade.....	44

Figura 26 - Efeito do midazolan no comportamento de Grooming .....	45
Figura 27 - Efeito do midazolan no comportamento de Rearing .....	45
Figura 28 - Efeito do midazolan no comportamento de morder a cauda .....	46
Figura 29 - Efeito do midazolan no comportamento de Lamber o chão. ....	46
Figura 30 - Efeito do midazolan no comportamento de mexer no bolo fecal.....	47
Figura 31 - Efeito do midazolan no comportamento de esconder a face (hunched)....	47
Figura 32 - Efeito do midazolan no número de bocejo .....	48
Figura 33 - Efeito do midazolan no numero de bolos fecais .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Resumo dos principais efeitos dos tratamentos de formalina (2%), no joelho e na pata, e principais efeitos do pré- tratamento com midazolam no teste de formalina na caixa.....	49
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
cm	Centímetro
EPM	Erro padrão da média
F1	Fase 1
F2	Fase 2
I.A.S.P	Associação Internacional para o Estudo da Dor
i.p.	Intraperitoneal
MDZ	Midazolam
min	Minutos
Sal	Salina
<i>t</i>	Valor do teste t de <i>Student</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SJ	Salina Joelho
SP	Salina Pata
FJ	Formalina Joelho
FP	Formalina Pata

## RESUMO

Clinicamente, a dor é um fenômeno complexo da percepção que envolve aspectos sensoriais objetivos (a nocicepção) e estimulações afetivas (emoção), que se combinam de forma variada dependendo de uma série de fatores de aprendizado, ambientais e culturais, apenas para citar alguns. Diversos modelos animais foram estabelecidos para reproduzirem de forma confiável os aspectos agudos e crônicos de dor pertinentes à condição humana. No entanto, os modelos comportamentais comumente utilizados somente avaliam o componente sensorial da dor provocada por um estímulo nociceptivo. Isto torna mais prático a avaliação do efeito de tratamentos sobre as diferentes condições nociceptivas, mas como a grande maioria dos modelos animais de nocicepção se baseiam em comportamentos reflexos, deixamos de considerar como os tratamentos podem afetar o componente emocional da dor induzido pela nocicepção. Especialmente em modelos de nocicepção persistente, o aspecto emocional aversivo deve ser mais importante. Tem sido uma tendência o refinamento dos modelos de nocicepção, aperfeiçoando os mecanismos de registro e procurando utilizar estímulos cada vez mais fracos e para que o aspecto sensorial seja proporcionalmente mais relacionado à experiência humana. Da mesma forma, como o componente afetivo motivacional da dor é um determinante importante da experiência de dor total no homem, devemos refinar os modelos para que apresentem componente aversivo menos intenso para que os parâmetros observados estejam dentro de um repertório não - estereotipado. Neste trabalho foi investigado o componente estressor da dor persistente induzida por formalina em dois sítios com importantes diferenças anatômicas e significado clínico – o tecido subcutâneo e o tecido articular. O modelo de formalina na pata se mostrou mais estressor, pois apresentou maior gama de comportamentos associados à ansiedade generalizada do que o modelo de formalina no joelho. O fármaco ansiolítico midazolam, por sua vez, teve efeito hiponociceptivo semelhante nos dois modelos, mas reduziu de forma mais significativa os

comportamentos relacionados à ansiedade no teste de formalina na pata. Estes resultados reforçam a idéia de que este modelo é muito mais ansiogênico do que a formalina aplicada no joelho dos animais.

Palavras-chave: Nocicepção, tecido cutâneo, tecido articular, estresse.

## **1. Introdução**

### **1.1. Dor**

A dor pode ser considerada um dos sintomas mais freqüentes da prática clínica e um dos problemas de tratamento mais importantes. Em algumas situações pode ceder com um simples analgésico. E, em outras, pode ser objeto de difícil terapêutica, de tal maneira que, na realidade, a dor transcende o seu conceito sintomático para ser considerada uma entidade patológica própria (MARTINS *et alii*, 2006).

Segundo a IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor), a dor é descrita como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nestes termos” (LOESER E TREEDE, 2008). Hunt e Mantyh (2001) descrevem a dor como uma sensação necessária à sobrevivência e a manutenção da integridade do organismo, mas a dor persistente ou crônica pode resultar em sintomas secundários tais como ansiedade, depressão e principalmente a diminuição da qualidade de vida.

A sensação que denominamos de dor tem um caráter subjetivo e inclui aspectos complexos, como os componentes sensoriais e afetivo-motivacionais, podendo ser modulada por uma larga escala de experiências comportamentais, de forma que uma experiência que é dolorosa para uns não é necessariamente para outros (WILLIS, 1985). Por esta razão se faz necessário uma distinção entre dor e nocicepção. O termo nocicepção se refere à recepção pelo sistema nervoso central de sinais evocados pela ativação de receptores sensoriais especializados, que normalmente já começam a sinalizar quando há uma situação crítica em andamento para um tecido, que pode causar lesão. Por outro lado, a dor seria o caráter

aversivo relacionado à atividade gerada em algum ponto das vias nociceptivas, ou à memória dessa atividade. Assim, quando se trata de animais, o termo correto a ser utilizado é a nocicepção, já que atualmente é muito difícil, se não impossível, de se avaliar o caráter subjetivo da dor nestes sujeitos. O termo nocicepção está relacionado ao reconhecimento de sinais no sistema nervoso, que se originam em receptores sensoriais (nociceptores) e fornecem informações relacionadas ao dano tissular.

Pelo fato de dor e nocicepção não serem sinônimos, tem se sugerido que termos com o prefixo algisia (do grego *algesis* = sensibilidade a dor) como hiperalgisia (aumento de sensibilidade a dor) e hipoalgisia (diminuição da sensibilidade a dor) ou analgesia (sem dor), sejam substituídos, respectivamente, por hipernocicepção, hiponocicepção e antinocicepção, por serem mais apropriados quando se trata de resultados obtidos a partir da avaliação da nocicepção em modelos animais (PARADA *et alii.*, 2003; CUNHA *et alii.*, 2005; MARTINS *et alii.*, 2006).

Geralmente podemos identificar três formas de dor levando em conta sua relação entre o estímulo nociceptivo e a sensação da dor: nocicepção, dor inflamatória e neuropática. (também chamadas de fase 1, fase 2 e 3 da dor, por CERVERO e LAIRD, 1991). Dor nociceptiva se refere ao processo de um estímulo doloroso breve; dor inflamatória é a consequência do prolongamento do estímulo nociceptivo, levando ao dano do tecido; e dor neuropática é a consequência de um dano neurológico, incluindo neuropatias periféricas e estado de dor centrais.

## **1.2. Fibras e vias Nociceptivas**

As fibras sensoriais, sozinhas ou em conjunto, fornecem informações ao sistema nervoso central não somente sobre o meio ambiente, mas também sobre o estado do organismo. Entre as diferentes variedades de fibras sensoriais os nociceptores normalmente

respondem a múltiplas formas de energia que produzem lesão ( estímulo térmico, mecânico, e químico), fornecendo informações ao sistema nervoso em relação à localização e intensidade do estímulo nocivo.

Tanto no tecido superficial (pele e tecido conjuntivo) quanto no profundo (ossos articulações, músculos e tendões), o sinal nociceptivo alcança o Sistema Nervoso Central (SNC), devido à presença de terminações nervosas livres (assim chamadas por não serem equipadas com corpúsculos ou órgãos) das fibras aferentes primárias, que transmitem a informação dolorosa para os neurônios do corno dorsal da medula espinhal (BASBAUM e JESSEL, 2000). Os corpos celulares das terminações nervosas livres da região da cabeça e do corpo localizam-se, respectivamente, no gânglio do trigêmeo e nos gânglios das raízes dorsais, e podem ser agrupadas em três categorias com base em seus diâmetros, estruturas e velocidades de condução (JULIUS e BASBAUM, 2001). As fibras C, que por serem amielinizadas são as de condução mais lenta (0,5-2 m/s) e as de menor diâmetro (0,4-1,2  $\mu\text{m}$ ). Na segunda categoria encontram-se as fibras A $\delta$ , mielinizadas (2-6  $\mu\text{m}$ ) e de velocidade intermediária (12-30 m/s). Finalmente, existem as fibras A $\alpha$  e A $\beta$  da terceira categoria, mielinizadas de largo calibre e de condução rápida (10  $\mu\text{m}$ , 100 m/s), responsáveis pela informação proprioceptiva (toque leve e pressão).

### **1.3. Dor profunda e superficial**

Juntas estruturais, assim como as articulações, são inervadas por nociceptores, que em condições normais são exclusivamente ou predominantemente ativados por estímulos dolorosos não fisiológicos que podem causar danos às estruturas profundas (por exemplo, sobrecarga, torções, uma forte pressão, contração isquiática) (SCHAIBLE, 1993). Informações sensoriais vindas dos músculos e articulações influenciam o sistema motor, e estão envolvidas na percepção de movimento e posição, mas a maior parte dessa percepção

não atinge a consciência. A maior sensação que podemos sentir em tecidos profundos (por exemplo, articulações e músculos) é a dor. A dor de tecidos profundos é muitas vezes persistente e mal localizada, e é, portanto, diferente da dor cutânea.

É uma observação clínica comum de que uma pequena lesão num membro em tecido profundo resulte em uma sensibilidade que se prolonga e se espalha muito longe do local da lesão, enquanto lesões cutâneas equivalentes parecem suscitar um distúrbio sensorial mais espacial e temporalmente restringido. Na verdade, a dor profunda é mais provável de exibir fenômenos como a irradiação e encaminhamento do que é a dor cutânea (ALOISI *et alii.*, 1995).

Diferenças na experiência subjetiva dessa dor têm levado pesquisadores a acreditar que a organização neuronal do tecido cutâneo e profundo são diferentes (LEWIS, 1938). Em contraste com a dor cutânea, dores musculares geram tipicamente uma queda na pressão arterial, bem como sudorese e náuseas (FEINSTEIN *et alii.*, 1954), sugerindo diferenças no processamento de informação nociceptiva proveniente da pele e de tecidos profundos.

#### **1.4. Dor e ansiedade/ estresse**

De uma maneira geral, a dor envolve a integração de várias estruturas do encéfalo as quais atendem componentes sensoriais, afetivos e cognitivos (GUILBAUD *et alii.*, 1994). Muitas estruturas do sistema límbico e cortical (amígdala, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal), são alvos das informações nociceptivas e desempenham importante papel na regulação do humor e especificamente na indução de estados de ansiedade (LOVICK, 2008). Assim, a dor e o humor podem interagir e mostrar efeitos coletivos. No homem, por exemplo, a ansiedade é um fator que pode levar à exacerbação da dor existente e a uma redução na eficácia de drogas analgésicas (ARNÉR *et alii.*, 1988; KAIN *et alii.*, 2000; LAUTENBACHER *et alii.*, 1999; TAENZER *et alii.*, 1986).

A ansiedade é um estado emocional com componentes psicológicos e fisiológicos, que faz parte do espectro normal das experiências humanas, sendo propulsora do desempenho. Ela passa a ser patológica quando é desproporcional à situação que a desencadeia, interferindo na qualidade de vida, conforto emocional ou no desempenho diário do indivíduo (ROSEN E SCHILKIN, 1998). Em geral, o termo “ansiedade” é considerado extremamente subjetivo e sujeito a múltiplas interpretações. Normalmente ele está associado a outros termos também subjetivos, como “emocionalidade”, “estresse”, “aversividade” e “fobia”. Entretanto, muitos autores tendem a defini-la como sendo um conjunto de respostas fisiológicas (atividade do sistema nervoso autonômico, taquicardia, sudorese) e comportamentais (vigília e reatividade comportamental; esquiva) aumentadas que, juntas, protegem o indivíduo de um possível dano diante de uma situação potencialmente perigosa (FILE *et alii.*, 1993; LANG *et alii.*, 2000; ADAMEC *et alii.*, 2001; BELZUNG e GRIEBAL, 2001; BLANCHARD *et alii.*, 2001; DIELENBERG e MCGREGOR, 2001; FILE, 2001). Apesar de a ansiedade ser, a princípio, um fenômeno tipicamente humano, respostas fisiológicas e comportamentais semelhantes tem sido descritas em diversas espécies animais e parecem fazer parte de um mecanismo universal através do qual os organismos se adaptam a condições adversas (GROSS e HEN, 2004). O conceito de estresse é frequentemente encontrado na literatura associado à natureza física como o bem estar, sofrimento, emocionalidade, medo e ansiedade. Segundo Ramos (1998), o estresse é considerado como a resposta de um organismo a estímulos ambientais, que ameaçam o seu equilíbrio interno, também chamado de homeostase. Esses estímulos, que são percebidos e avaliados por um sistema cognitivo / emocional, podem induzir uma variedade de alterações neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais, na tentativa de maximizar a probabilidade de sucesso de uma demanda.

Em animais, uma variedade de estímulos estressantes leves não nociceptivos, como por exemplo, retenção, vibração breve, exposição a vapor de éter, ou exposição a um novo ambiente, podem levar a um aumento da nocicepção (hipernocicepção) (HAYES *et alii.*, 1978; JORUM, 1988). Por outro lado, outros estudos mostram que os eventos estressantes ambientais são capazes de ativar diferentes tipos de hiponocicepção (KAVALIERS e INNES, 1988; RODGERS e RANDALL, 1987a; HELMSTETTER, 1993; RODGERS e SHEPHERD, 1989; TESKEY *et alii.*, 1984; RODGERS *et alii.*, 1992; LEE e RODGERS, 1992; BELLGOWAN e HELMSTETTER, 1996; NUNES-DE-SOUZA *et alii.*, 2000; TERSHNER e HELMSTETTER, 2000; VENDRUSCOLO., 2004). Acredita-se que essa hiponocicepção gerada pelo estresse ambiental pode ser desencadeada como um valor adaptativo e que pode fazer parte do repertório de comportamentos defensivos de muitas espécies animais, como uma proteção em situações de conflito (HARRIS, 1996).

No entanto, os trabalhos que estudam a influência do estresse / ansiedade na nocicepção não levam em consideração o tipo de estímulo nociceptivo empregado. Como a nocicepção também é fonte de estresse / ansiedade para o animal, manipulações que aumentem o estresse/ ansiedade devem aumentar a nocicepção. Ao contrário, quando o teste nociceptivo tem menor potencial estressor, situações estressantes / ansiogênicas devem diminuir a nocicepção (BUSHNELL *et alii.*, 1985; MIRON *et alii.*, 1989; RHODY e MEAGHER 2000; PLOGHAUS *et alii.*, 2003).

Até a presente data, tem havido relativamente poucos estudos para manipular experimentalmente as sensações da ansiedade, e por isso é difícil determinar a natureza de relacionamento causal entre a ansiedade e a dor. Os testes nociceptivos clássicos realizados em animais normalmente medem comportamentos reflexos. Estes refletem predominantemente o processamento sensorio discriminativo da transmissão nociceptiva, incluindo os aspectos da localização do estímulo, intensidade e modalidade. A mensuração do

tratamento afetivo-motivacional da transmissão nociceptiva (incluindo aspectos da emoção que incorpora desgosto, medo, angústia e excitação) em animais tem sido menos relatada freqüentemente, apesar de uma complexa interação existente entre estas duas dimensões relacionadas com o processamento da dor (HUNT e MANTYH, 2001).

A origem da dor pode ser determinante da atuação de diferentes estruturas relacionadas com a ansiedade/estresse, e pode ser uma das razões de se encontrarem comportamentos distintos em testes nociceptivos diferentes.

### **1.5. Dor e o teste de formalina**

O teste da formalina é um modelo comportamental de dor associada com lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção de formalina diluída ( DUBUISSON e DENNIS, 1977; TJOLSEN *et alii*, 1992; ABBOTT *et alii.*, 1995, MARTINS *et alii.*, 2006). Este teste experimental é amplamente utilizado para avaliar o efeito de drogas analgésicas, e é considerado um modelo de dor tônica ou persistente (CARTENS, 1995; TJOLSEN *et alii.*, 1992).

As respostas comportamentais à formalina seguem um padrão bifásico composto de uma fase inicial aguda (primeira fase), que dura aproximadamente 5 minutos e é seguido, após um breve intervalo de quiescência, por um período mais prolongado (segunda fase) de atividade comportamental aumentada, que pode durar até cerca de 1 hora (DUBUISSON e DENNIS, 1977, MARTINS *et alii.*, 2006).

A primeira fase da resposta nocifensiva à formalina (dor aguda), esta relacionada à ativação direta dos nociceptores, devido à estimulação química periférica (WHEELER-ACETO e COWAN, 1991; TAYLOR *et alii.*, 2000). Na segunda fase (dor tônica) o comportamento nociceptivo é gerado pela estimulação continua dos nociceptores por mediadores secundários inflamatórios e/ou por uma hiperexcitabilidade da medula espinhal

induzida pela primeira fase (sensibilização central) ( DICKENSON E SULLIVAN, 1987; CODERRE *et alii.*, 1990; , TAYLOR. *et alii.*, 1995). O intervalo de quiescência entre a primeira e a segunda fase é resultado de uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra-espinhais ( MATTHIES e FRANKLIN, 1992) e espinhais ( KANEKO e HAMMOND, 1997).

A Injeção de formalina na pata de rato inicia um comportamento nociceptivos espontâneo, constituído por chacoalhar, lambar e/ou morder a pata injetada, que pode ser traduzido como um reflexo dos aspectos sensoriais e emocionais do processamento da dor. (CODERRE *et alii.*, 1993).

O teste da formalina, é usado para avaliar comportamentos nociceptivos, e até o presente momento não levava em consideração outros comportamentos associados à dor, como o estresse causado por eles.

## **1.6. Justificativa**

Normalmente a ansiedade é vista como um fator que influencia na dor de forma adversa, dependendo se a origem da nocicepção é cutânea ou profunda somática / visceral. O presente estudo de nocicepção induzida por formalina pode ajudar a prever de forma mais confiável o efeito das novas estratégias farmacológicas, com mecanismos clássicos ou não, para eliminação da dor e para o tratamento de dores clinicamente relevantes.

O desenvolvimento de modelos baseados na injeção de formalina em outros tecidos além da pele é muito útil para o melhor entendimento da transmissão e modulação da nocicepção, pois existe um consenso que os impulsos nociceptivos de tecidos profundos são processados por diferentes substratos.

Como o teste da formalina é um modelo animal amplamente utilizado, é imprescindível uma avaliação mais rigorosa desse modelo em termos de estresse, onde a dor é fonte deste estado.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Geral**

O presente trabalho objetiva avaliar as diferenças comportamentais, tanto nociceptivas, já padronizadas, como as respostas possivelmente geradas pelo estresse, presentes nas respostas induzidas pelo mesmo estímulo nociceptivo agudo persistente em tecidos de origem superficial e profunda.

### **2.2. Específicos**

- Padronizar os comportamentos induzidos pela formalina aplicada em tecido superficial (subcutâneo na pata) e profundo (intra-articular no joelho).
- Verificar o efeito do fármaco ansiolítico Midazolam nos dois modelos comportamentais.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados para este projeto, ratos Wistar machos com aproximadamente 3 meses de idade provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), que foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção (LANEN) do Departamento de Farmacologia. As colônias de ratos Wistar usadas neste estudo foram mantidas no biotério central até completarem um mês, quando seguiram para o biotério do laboratório até o período de experimentos. Os animais foram alojados em caixas (42 x 34 x 17 cm), cada qual contendo 5 (cinco) indivíduos, forradas com serragem, trocadas a cada dois dias. Os ratos foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 h às 19 h), com livre acesso à água e comida. Todos os procedimentos experimentais foram realizados cuidadosamente de acordo com as normas previstas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC, Protocolo 23080.034307/2009-11).

#### **3.2. Teste de formalina**

O teste de formalina utilizado foi descrito por DUBUISSON e DENNIS (1977). Cerca de 24 h antes do teste os animais foram ambientados na caixa, onde seria realizado o experimento. A ambientação consistiu na colocação individual dos animais na caixa de observação por um período aproximado de 20 min. A ambientação foi realizada para determinar níveis basais de comportamento estável e para minimizar as variações individuais no comportamento de ansiedade, devido à novidade, em todos os animais.

Para avaliação nociceptiva os animais receberam injeção de formalina a 2% (50 µl) na região plantar da pata direita traseira (avaliação de dor superficial) e intra-articular no joelho direito (avaliação de dor profunda). A concentração de formalina foi baseada em um estudo anterior (MARTINS et alii., 2006) no qual demonstrou ser essa a dose ideal para induzir uma resposta comportamental submáxima, a fim de se permitir detectar aumento ou diminuição nas respostas.

No teste, foi registrado, em blocos de 5 min, durante 60 min, o número total de comportamentos nociceptivos (NCN) entre eles: chacoalhadas, lambidas, mordidas, retiradas e/ou erguidas (3 s de permanência) da pata ou do joelho injetado.

Neste teste também foram padronizados outros comportamentos produzidos pela injeção de formalina não diretamente relacionados com a nocicepção.

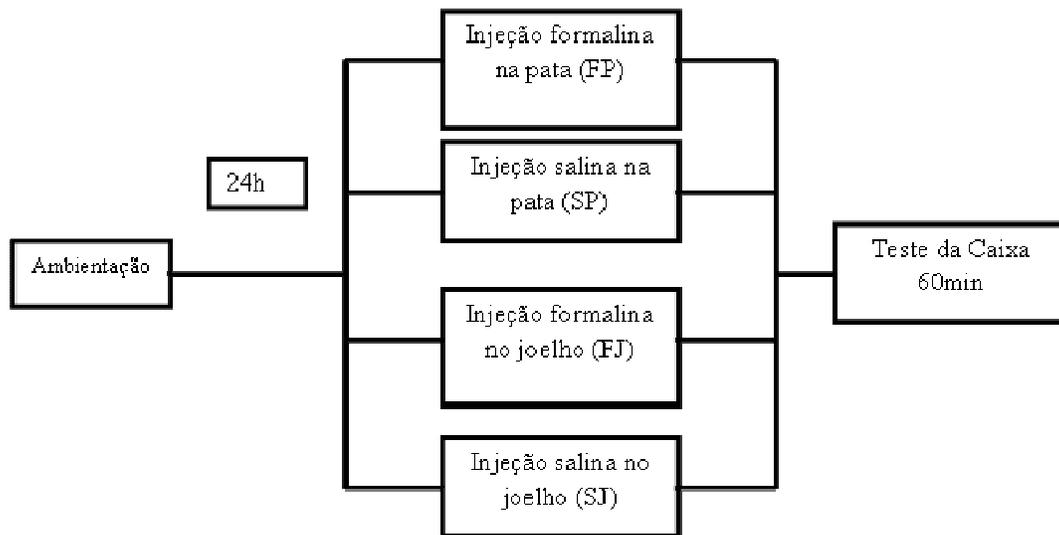
A caixa de observação é de acrílico transparente, medindo 29 cm de largura, altura e profundidade. Para facilitar a visualização da pata do animal, foram adicionados espelhos, angulados em aproximadamente 45° nas laterais e atrás.

### **3.3. Desenho experimental**

Os testes foram feitos em 02 etapas. Na primeira etapa (Figura 1) os animais foram divididos em 2 grupos principais, um submetido a injeção na pata e outro submetido a injeção no joelho. Cada grupo foi subdividido em dois, um que recebeu a injeção de formalina e outro que recebeu injeção do veículo, no caso salina.

Cada grupo continha 10 animais e a análise dos grupos pata e joelho foi realizada simultaneamente, com duas caixas colocadas uma ao lado da outra. A fim de que a análise fosse feita com maior precisão, os animais foram filmados durante o tempo do teste (60 min). Desta forma, todos os comportamentos relacionados à nocicepção e outros comportamentos

não diretamente relacionados, puderam ser analisados. O número de bolos fecais também foi contabilizado.

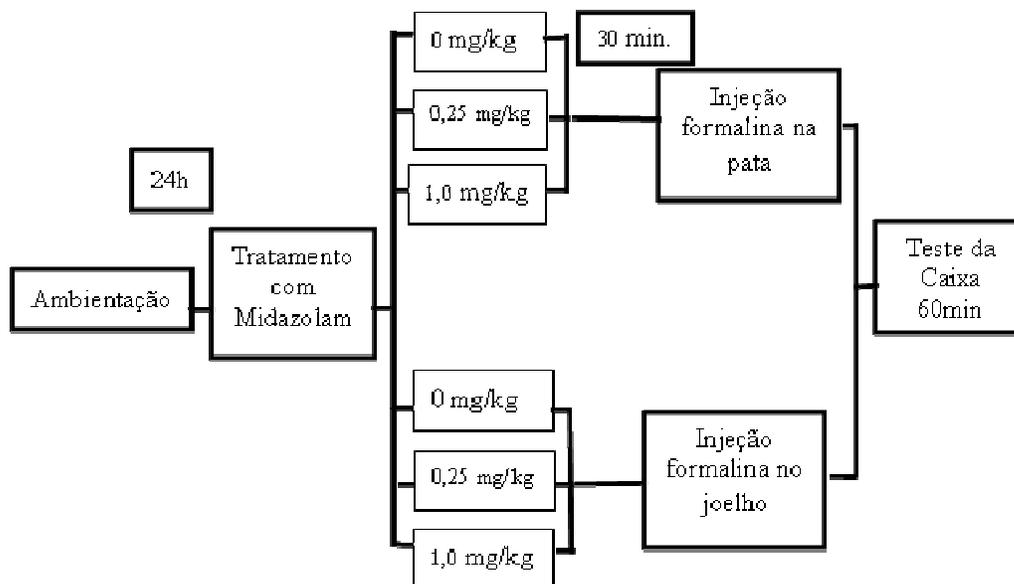


**Figura 1 - Diagrama com o desenho experimental da primeira etapa do estudo.**

Na segunda etapa do estudo (Figura 2) foi utilizado no mesmo teste um ansiolítico, no caso o midazolam, que foi administrado 30 min antes do teste de avaliação nociceptiva na caixa, via i.p., 0,25 e 1,0 mg/kg, e no controle foi administrado o veículo, no caso água destilada. (Martins *et alii*, 2006).

Neste teste foram utilizados dois grupos, formalina injetada no joelho, com as diferentes doses de midazolam, e formalina na pata, também com as diferentes doses da droga ansiolítica.

Este pré-tratamento foi realizado para observar se existia diferença nos comportamentos dos dois testes, com o pré-tratamento com midazolam, e sem pré-tratamento.



**Figura 2 - Desenho experimental da segunda etapa do estudo.**

### **3.4. Padronizações e análise descritiva dos comportamentos**

Para investigar a atividade do rato no aparelho dentro da caixa no teste de formalina foi feita uma análise descritiva. Em primeiro lugar, um animal de cada tratamento (formalina no joelho, formalina na pata, salina no joelho e salina na pata) foi observado. Todos os padrões comportamentais, ou seja, todos os comportamentos que se repetiam ao longo do teste foram selecionados, mesmo os que só apareceram em um dos tratamentos.

Assim foi construído um etograma, ou seja, um conjunto de elementos comportamentais que foi padronizado e contabilizado neste estudo, juntamente com outros comportamentos já amplamente utilizados como parâmetro na literatura. O número de bolos fecais produzidos durante o período de teste também foi quantificado.

As medidas padrão de atividade quantificadas já amplamente usadas na literatura foram o **Grooming** (Figura 3) que inclui limpeza de patas dianteiras, patas traseiras, corpo, rosto e genital, higiene é um componente importante do repertório comportamental de roedores; **Rearing** (Figura 4) que consiste no levantamento do animal sustentado pelas

patas traseiras no solo, encostando-se à parede da caixa ou não; **Imobilidade** (Figura 5) onde rato permanece numa postura fixa, com o membro injetado encolhido ou não. Geralmente assume uma postura mais descontraída e até deita-se de lado. E atividade exploratória (Figura, 6), a **Exploração do Ambiente** consiste em andar pela caixa, cheirando o ambiente ou não, avaliando o espaço. Cinco outros comportamentos foram observados e padronizados. Estes comportamentos foram:

- **Mordidas na cauda**, segura a cauda e morde tanto a ponta quanto a base do órgão (figura, 7);
- Número de vezes que ingeriu ou **mexeu no bolo fecal** (figura, 8);
- **Lambidas no chão** (figura 9);
- **Esconder a face**: animal fica apoiado sobre as quatro patas, porém posiciona a cabeça com o rosto voltado para o chão e focinho entre as patas dianteiras. Espasmos fortes podem ser observados enquanto ele se encontra assim (Figura 10);
- **Número de bocejos** (Figura 11).



Figura 3 - Comportamento de Grooming.



Figura 4 - Comportamento de Rearing.



**Figura 5 - Comportamento de Imobilidade.**



**Figura 6 - Atividade Exploratória**



**Figura 7 - Morder a cauda**



Figura 8 - Ingerir ou manipular o bolo fecal



Figura 9 - Lambidas no chão



Figura 10 - Esconder a face



Figura 11 - Bocejos

### 3.5. Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como a média + erro padrão da média (e.p.m.). A análise foi feita com o teste de t de *Student* pareado, na quantificação de bolos fecais. Para análise estatística dos animais tratados com midazolam foi usada análise de variância (ANOVA) de uma via, ou para medidas repetidas seguida pelo teste de Dunnet para comparações com o controle. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente

significante foi de  $P < 0,05$ . Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o programa GraphPad Prism version 5.

## **4. Resultados**

### **4.1. Primeira etapa, comparação formalina e salina**

Quando os animais foram colocados na caixa de observação, imediatamente após a aplicação de formalina na pata, as principais respostas manifestadas por eles foram; agitação, micção, defecação e episódios de lambidas compulsivas no assoalho, além dos comportamentos nociceptivos considerados tais como, elevação sustentada do membro afetado e intermitentes mordidas e lambidas na pata que recebeu a solução de formalina a 2%.

A injeção de formalina na pata induziu duas fases de respostas nocifensivas intercaladas por um período de quiescência. Imediatamente após a injeção de formalina (F1= 0-5 min), ocorreu um rápido aumento no número de comportamentos nociceptivos (NCN), seguido por um período sem manifestação nociceptiva (quiescência). Em seguida, o NCN aumentou de maneira gradativa e sustentada, caracterizando a segunda fase do teste (F2= 15-60 min.). Após os 60 min. de teste, embora ainda manifestassem comportamentos nociceptivos, edema e eritema da pata injetada, os animais foram recolocados em suas caixas. (Fig. 12 B)

No comparativo, injeção de formalina no joelho, os animais foram colocados na mesma caixa de observação do teste de formalina na pata. Avaliaram-se como comportamentos nociceptivos (NCN): o número de flexão do joelho (a cada três segundos = 01 comportamento) número de lambidas e número de contrações ou espasmos no membro afetado. Após a injeção de formalina intra-articular, os animais não manifestaram comportamentos de agitação, micção, defecação ou de lambidas compulsivas no assoalho, como aqueles observados com a injeção subcutânea na pata. Dentre os comportamentos nociceptivos considerados, a flexão espontânea e sustentada do joelho afetado foi o mais

predominante durante todo o teste. Apenas no período de quiescência, os animais caminhavam normalmente ou permaneciam parados com as quatro patas no chão. (Fig. 12 A)

Podemos observar que o comportamento de atividade exploratória, nos dois modelos diminuiu em relação ao controle (fig.13 A e B), na comparação entre os dois modelos o modelo de formalina no joelho apresentou maior atividade, na primeira fase do teste (fig.13 C).

A imobilidade não foi alterada no modelo de formalina no joelho (fig.14 A), mas decresceu significamente na pata (fig.14 B). Assim o modelo do joelho apresentou imobilidade em níveis acentuadamente mais elevados que a pata ( fig.14 C).

O *Grooming* diminuiu nos dois modelos (fig.15 A e B), mas não apresentou diferenças significativas entre os dois modelos (fig.15 C).

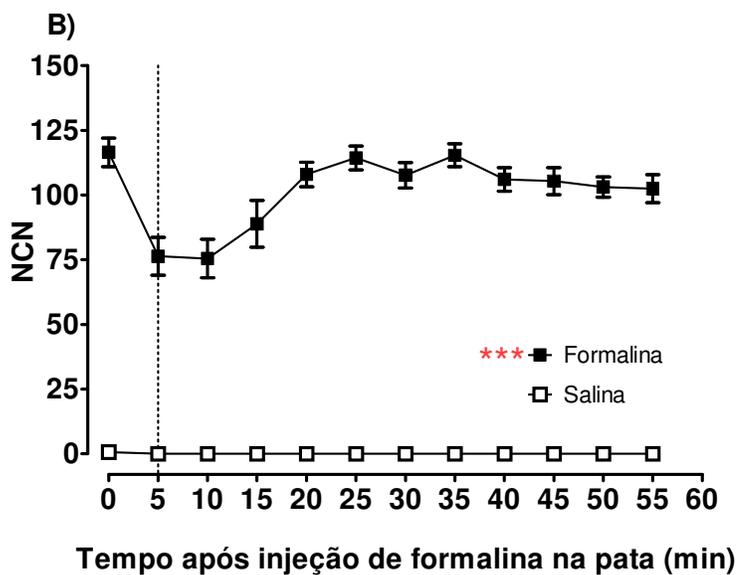
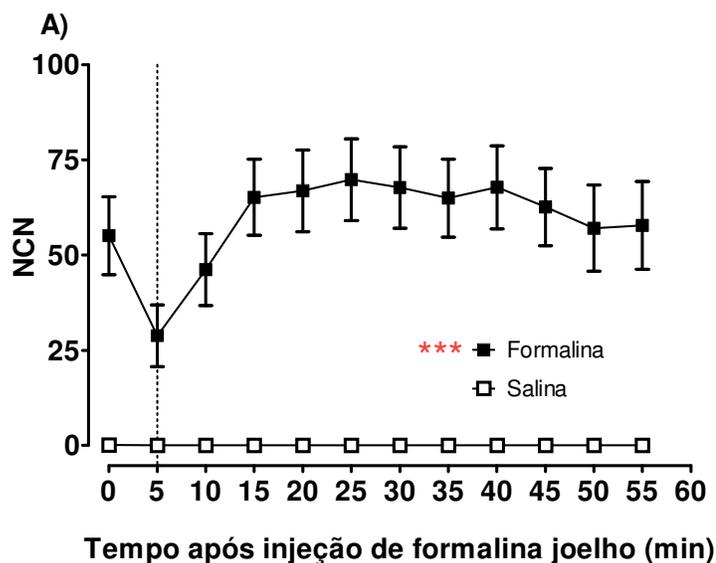
No comportamento de *Rearing*, a formalina no joelho reduziu esse comportamento na primeira e segunda fase do teste (fig.16 A). Mas na pata a variação só ocorreu na primeira fase (fig.16 B).Entre os dois modelos não foi observado variações significativas (fig.16 C).

Os comportamentos de Morder a cauda (fig.17), Lamber o chão ( fig.18) e Mexer no bolo fecal (fig. 19) foram vistos principalmente no teste de formalina na pata. No joelho nenhum desses comportamentos apresentou variações importantes.

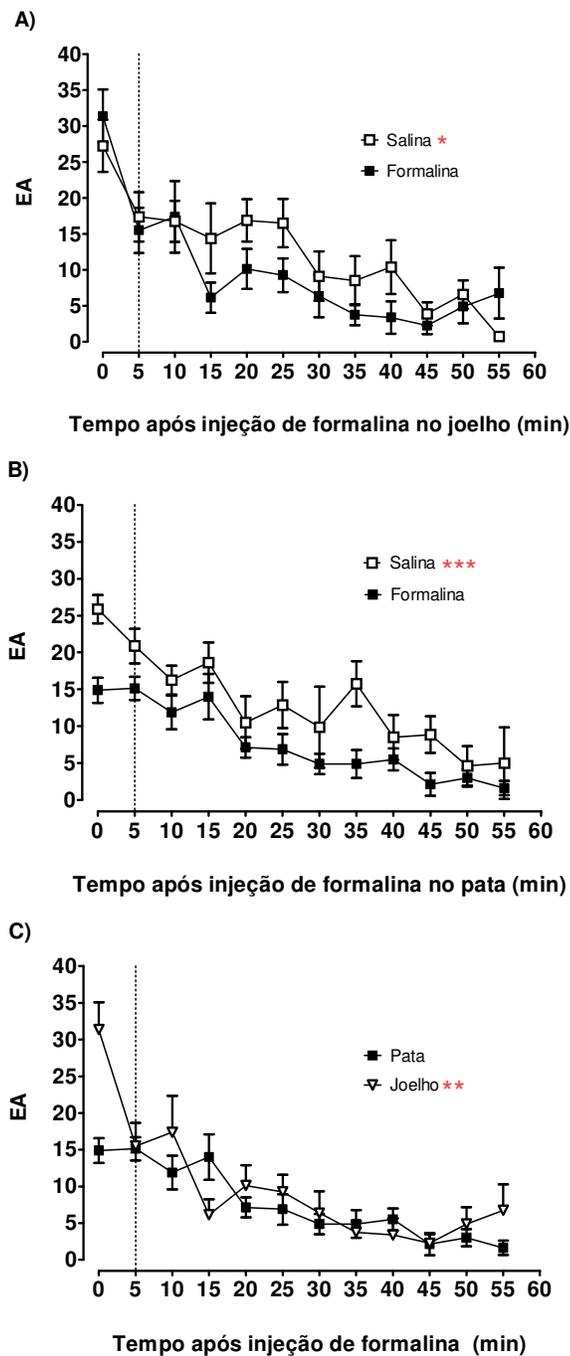
O comportamento de esconder a face foi observado principalmente no modelo de formalina no joelho (fig. 20 A e C).

O número de bocejos, não apresentou variação entre os modelos e seus controles (fig.21 A e B), entretanto a formalina no joelho apresentou com maior frequência esse comportamento durante todo o período do teste.

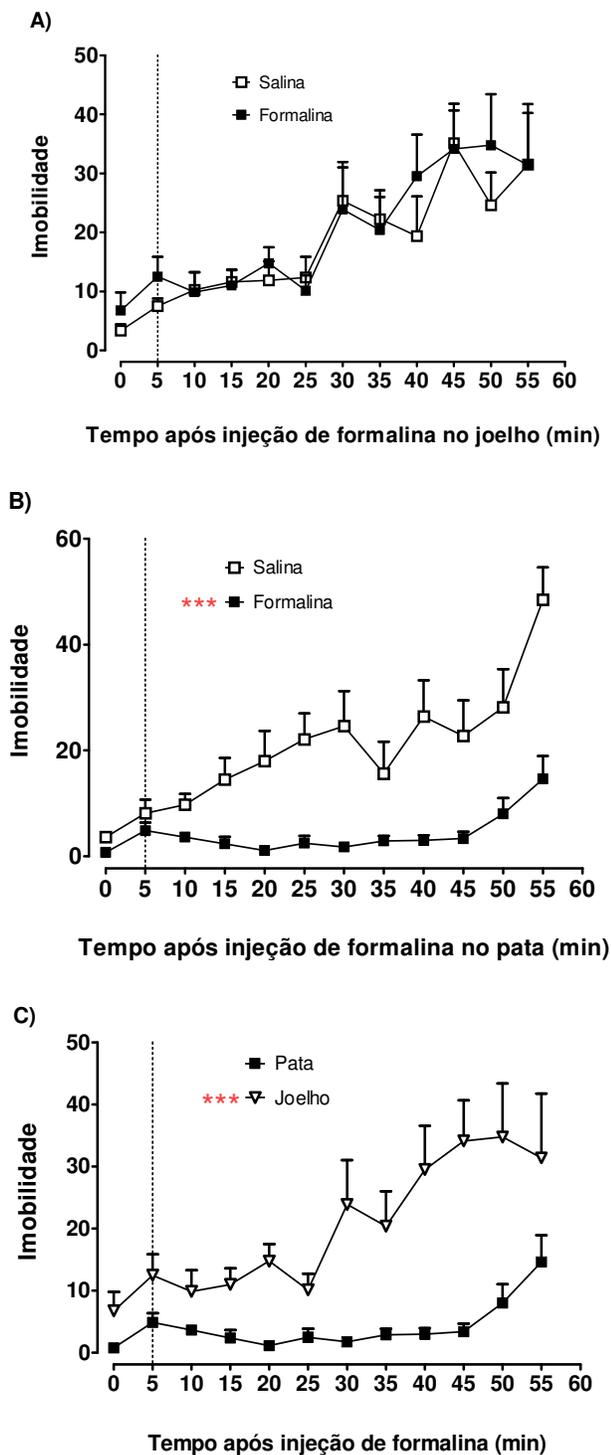
Com relação ao número de Bolos fecais (fig.22), a formalina na pata mostrou uma tendência em elevar o seu número( fig.22 B), essa tendência também foi observada na comparação entre os dois modelos.



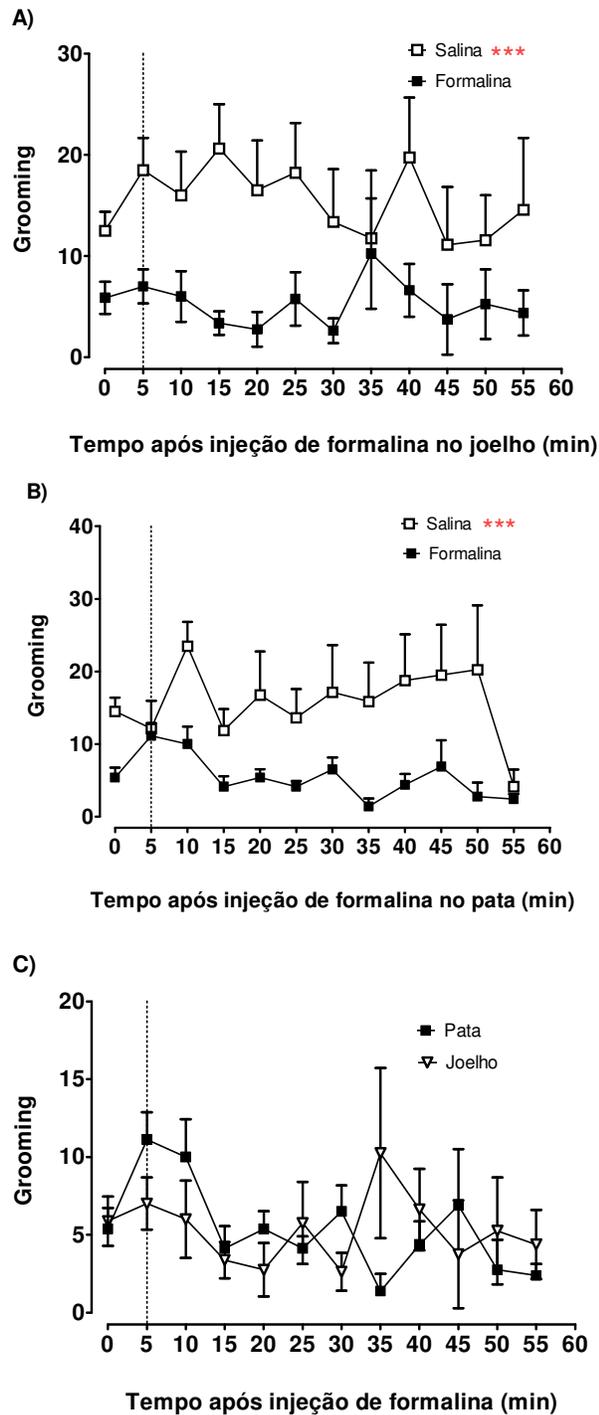
**Figura 12** - Resposta nocifensiva da injeção de formalina a 2% subcutânea no joelho (A) e pata (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 10 animais, a cada 5 min após a injeção realizada no tempo 0. Diferenças significativas entre os grupos foram detectada através do teste t de *Student* pareado e \*\*\*= $p < 0,001$ .



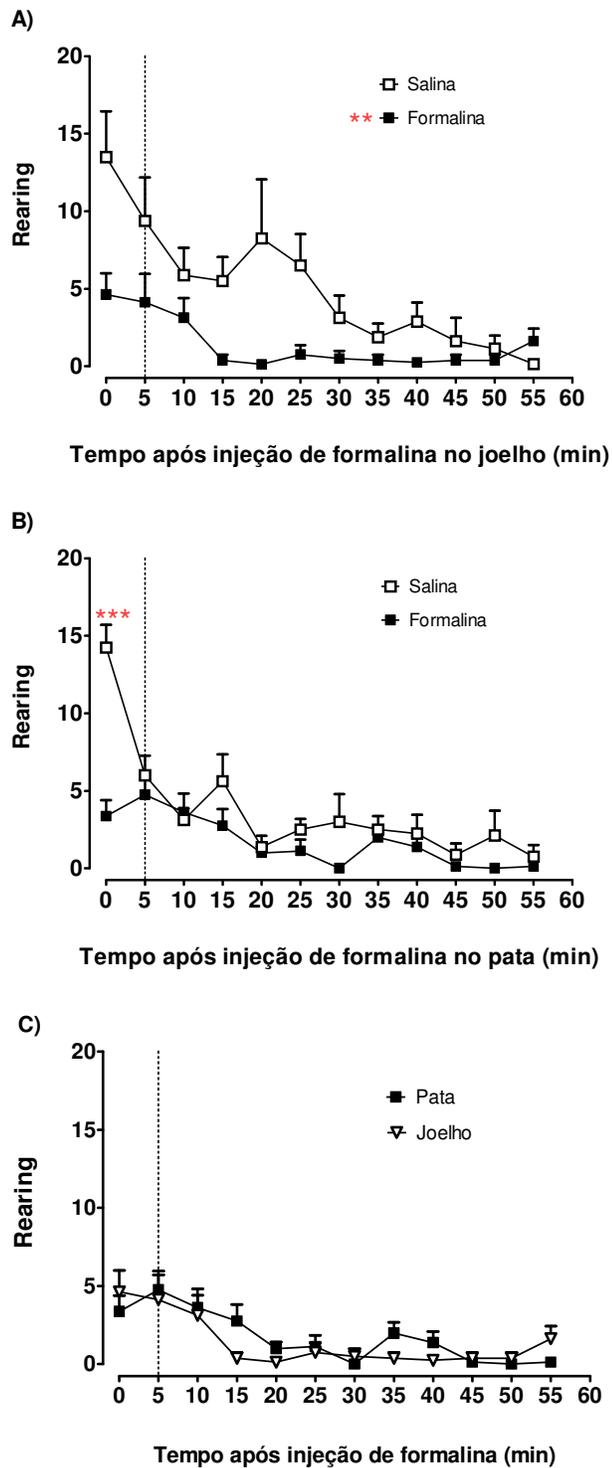
**Figura 13** - Efeito da injeção de formalina no comportamento de exploração do ambiente, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5min. Após a injeção. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas. \* $p \leq 0,05$ , \*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\*=  $p < 0,001$  comparado ao grupo controle.



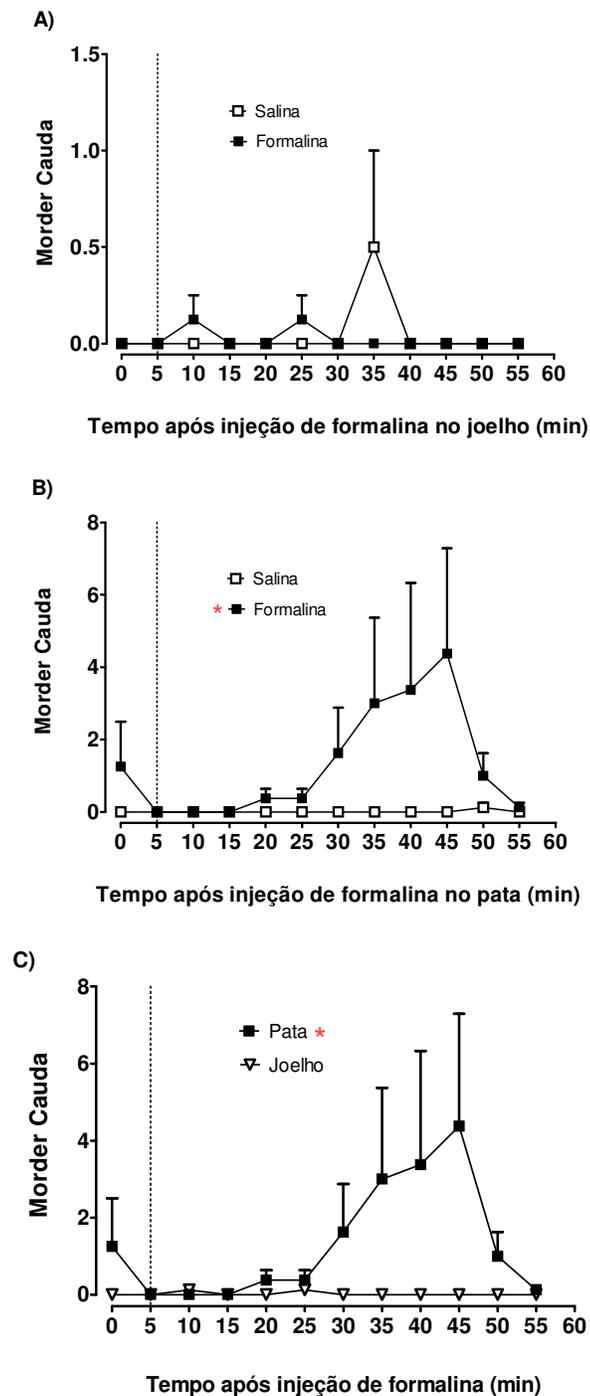
**Figura 14** – Efeito da injeção de formalina no comportamento de imobilidade, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas. \*\*\*= $p < 0,001$  comparado ao grupo controle.



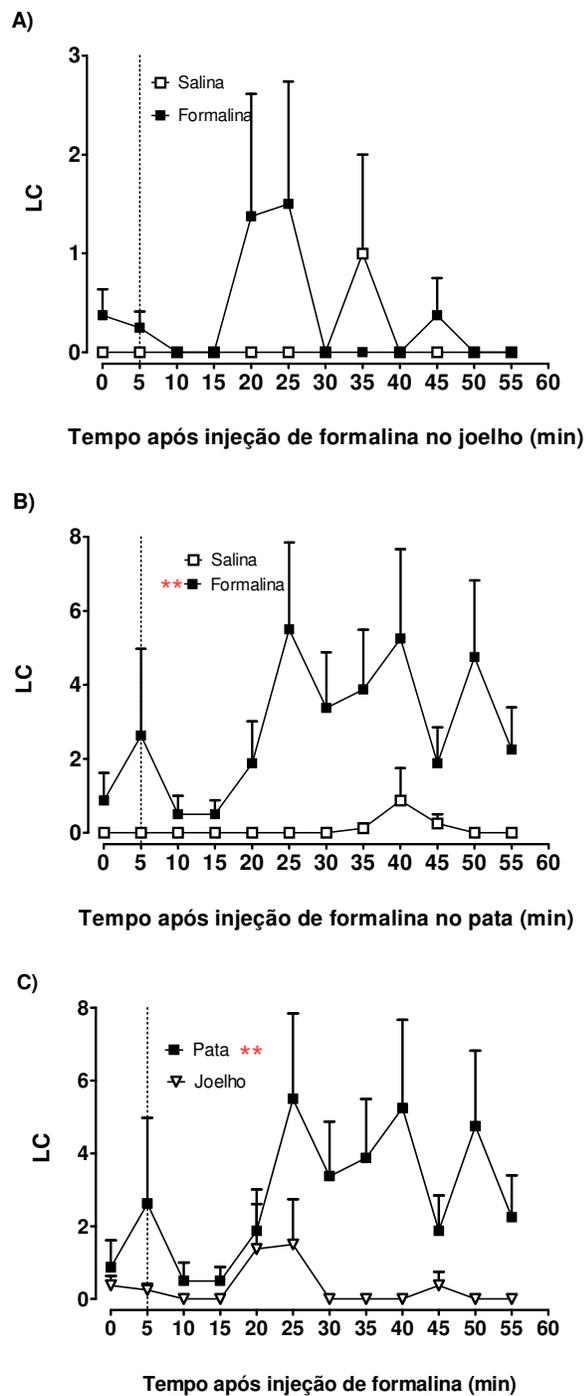
**Figura 15** – Efeito da injeção de formalina no comportamento de Grooming, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, \*\*\*=  $p < 0,001$ , comparado ao grupo controle.



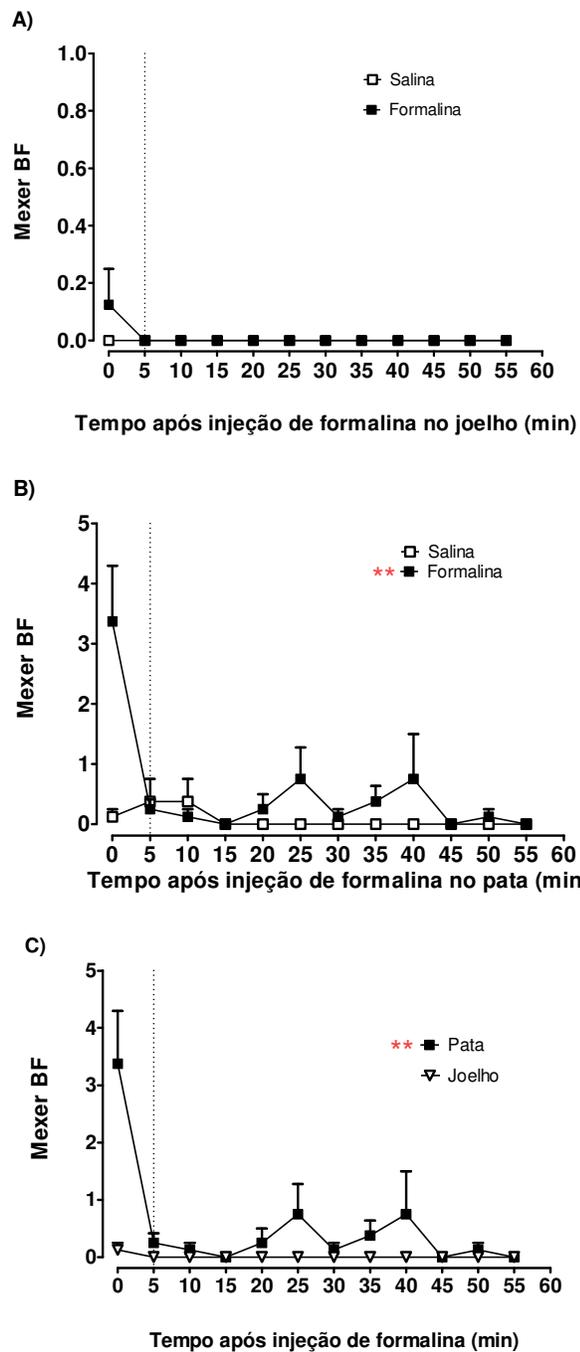
**Figura 16** - Efeito da injeção de formalina no comportamento de Rearing, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutânea (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, \*\*=  $p < 0,01$ ; \*\*\*=  $p < 0,001$ .



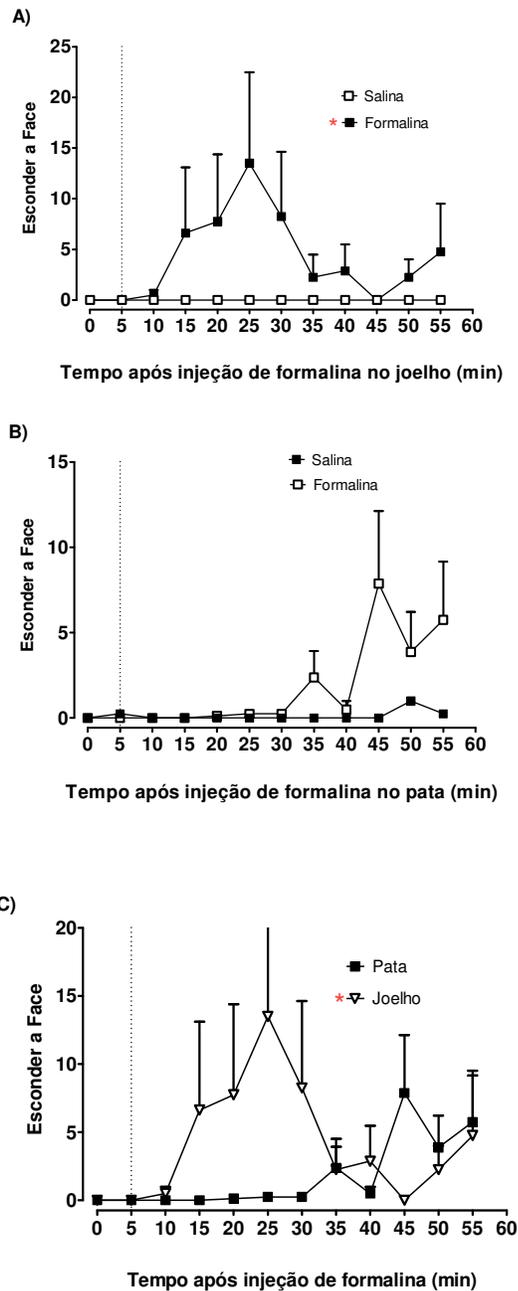
**Figura 17** - Efeito da injeção de formalina no comportamento de morder ou lambem a cauda, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle.



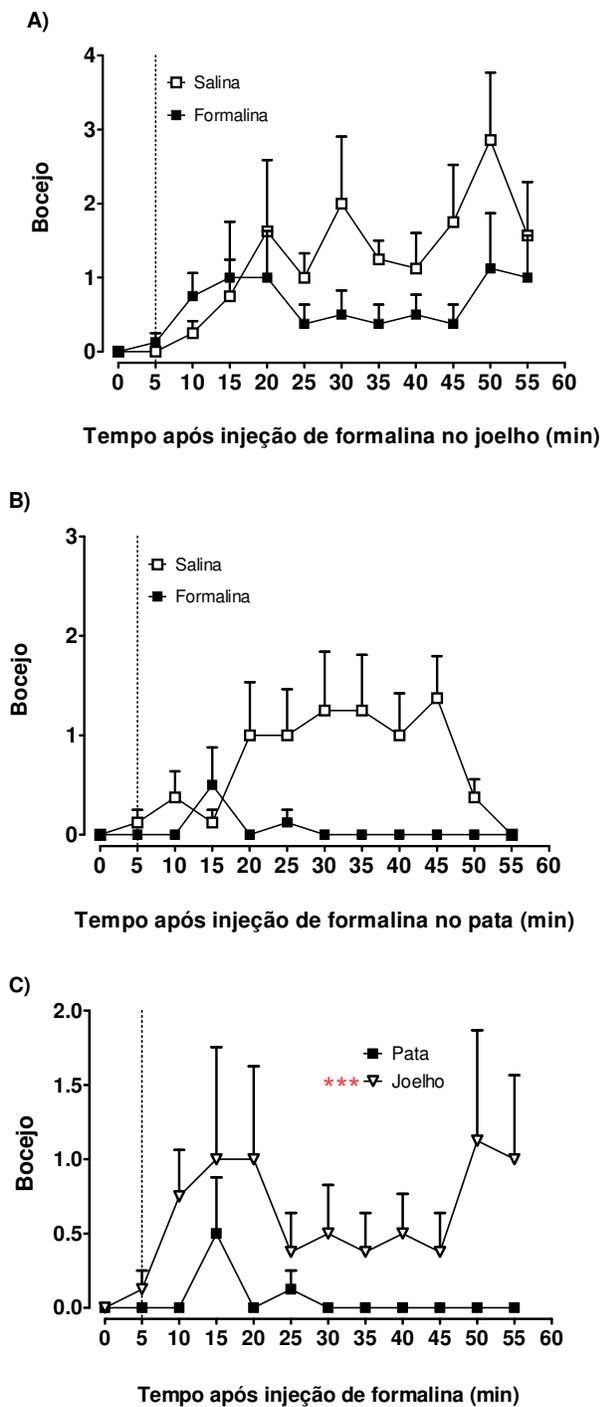
**Figura 18** - Efeito da injeção de formalina no comportamento de lambar o chão, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas.  $**p \leq 0,01$  comparado ao grupo controle.



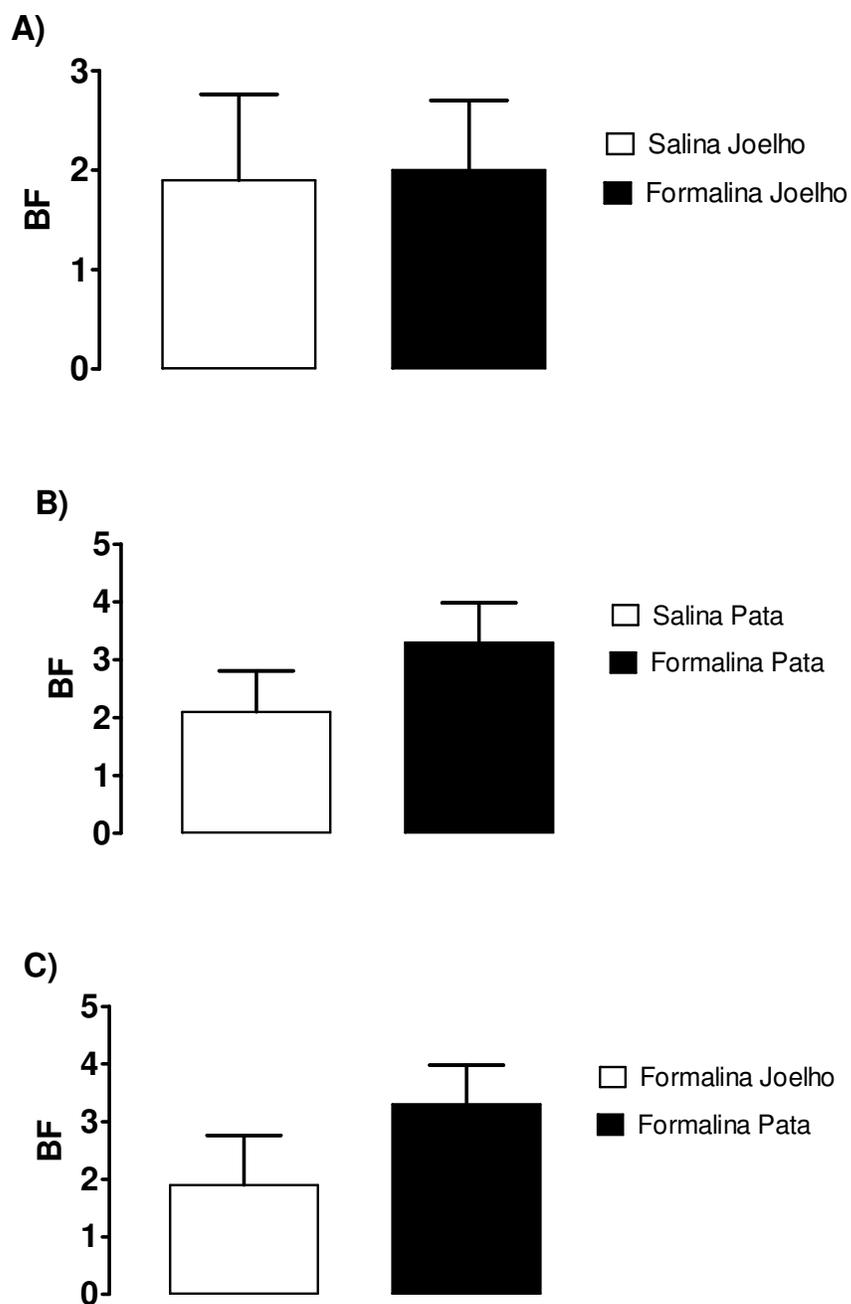
**Figura 19** - Efeito da injeção de formalina no comportamento de mexer no bolo fecal, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas.  $**p \leq 0,01$  comparado ao grupo controle.



**Figura 20** - Efeito da injeção de formalina no comportamento de esconder a face, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articula (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle.



**Figura 21** - Efeito da injeção de formalina no número de bocejos, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas. \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado ao grupo controle.



**Figura 22** - Efeito da injeção de formalina no número de bolos fecais, durante o teste da formalina registrado no período de 1 h. Injeção no joelho, intra-articular (A) e pata, subcutâneo (B), e comparação dos locais injetados (C). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais. Os dados foram analisados através do teste t de Student de uma via, para medidas repetidas.

## **4.2. Segundo etapa do experimento, Animais pré-tratados (via i.p.), meia hora antes do teste de formalina com midazolam**

A segunda etapa do experimento consistiu no pré-tratamento com midazolam, via i.p., 30 minutos antes do início do teste da formalina.

Nos dois modelos estudados neste estudo o midazolam mostrou um efeito antinociceptivo (Fig.23). A dose de 0,25 mg/kg de midazolam afetou os dois modelos nas duas fases da formalina, enquanto a dose de 1mg/kg, mostrou efeito somente no modelo de formalina no joelho, no período de 30-60 minutos do teste.

No modelo de formalina na pata a exploração do ambiente diminuiu com a dose de 1mg/kg (Fig. 24 B). No joelho nenhuma das doses obteve variação significativa (fig.24 A)

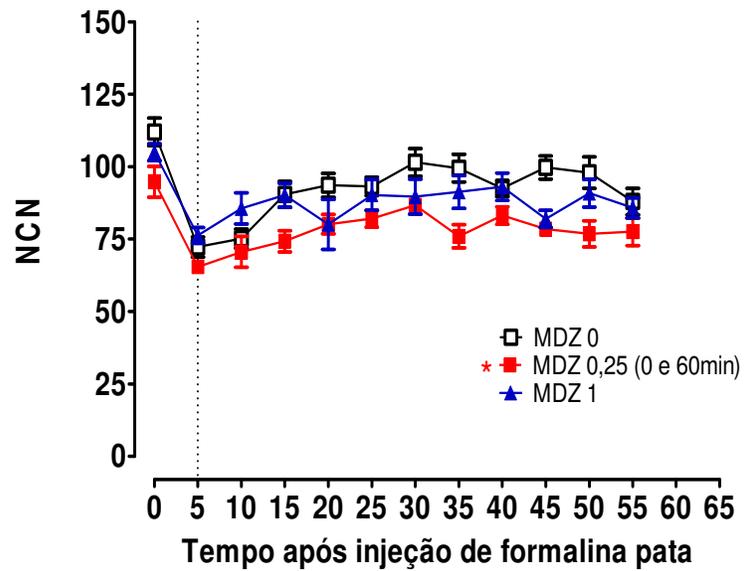
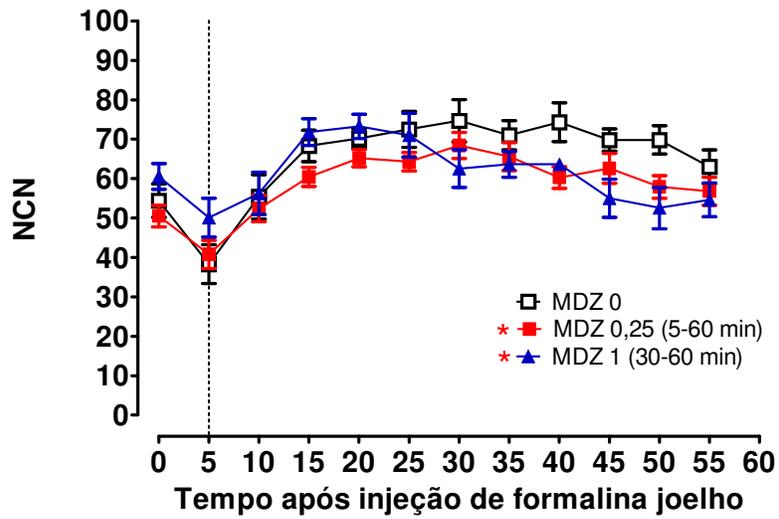
A imobilidade foi afetada em ambos os modelos com a dose de 1mg/kg de midazolam, nos dois modelos ele aumentou (Fig. 25)

No comportamento de *grooming*, o modelo de formalina no joelho, diminuiu com as duas doses do ansiolítico (Fig. 26 A). E no modelo da pata somente a dose de 1mg/kg, conseguiu significativamente baixar o comportamento (Fig. 26 B). Esta dose ainda baixou o número de *rearings* no modelo. (Fig. 27 B).

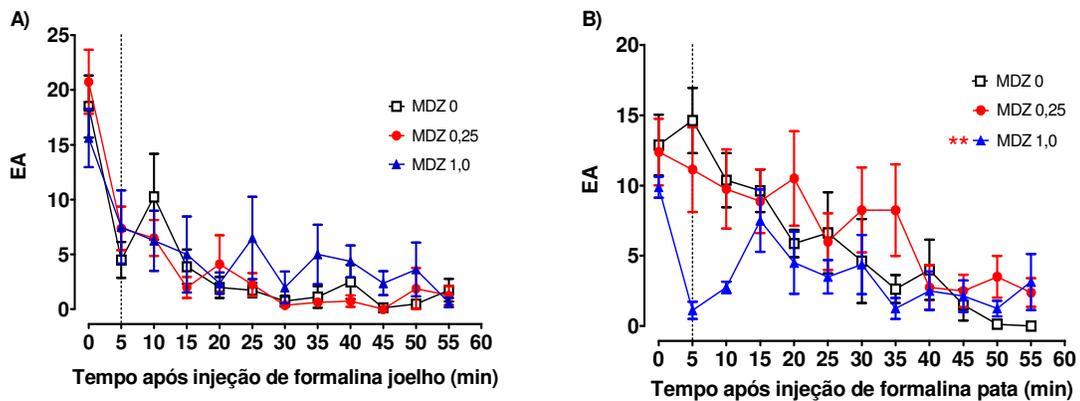
Dos comportamentos de morder a cauda ( fig. 28) e mexer no bolo fecal (Fig. 30) não apresentaram variação significativa em nenhum dos modelos. E no comportamento de lamber o chão, somente o modelo da pata na dose de 1mg/kg da droga diminuiu esse comportamento (Fig 29 B).

O parâmetro esconder a face aumentou com a dose de 0,25mg/kg no modelo do joelho (Fig.31 A) e diminuiu nesta mesma dose na pata (Fig.31 B).

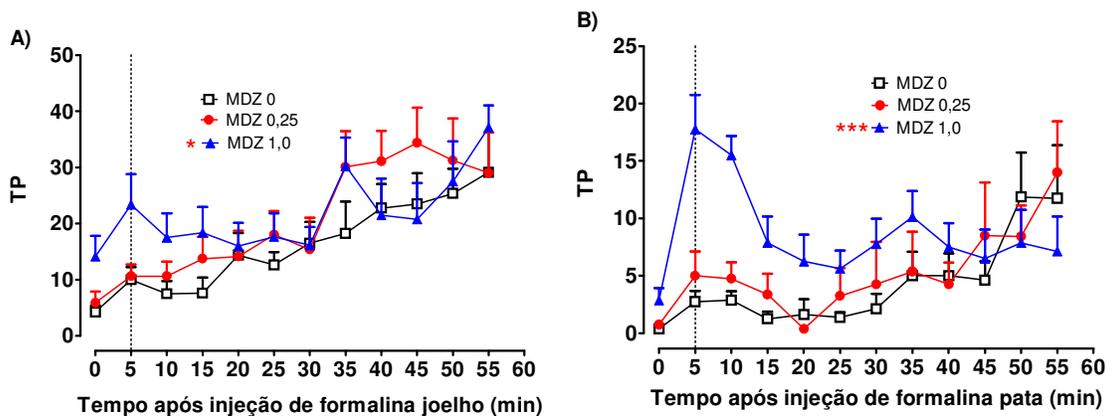
Os parâmetros de número de bocejos (Fig.32), e número de bolos fecais (Fig.33) não foi afetado pelo tratamento com o ansiolítico. Mas no modelo do joelho, há uma tendência em diminuir o número de bolo fecal com o aumento da dose de midazolam.



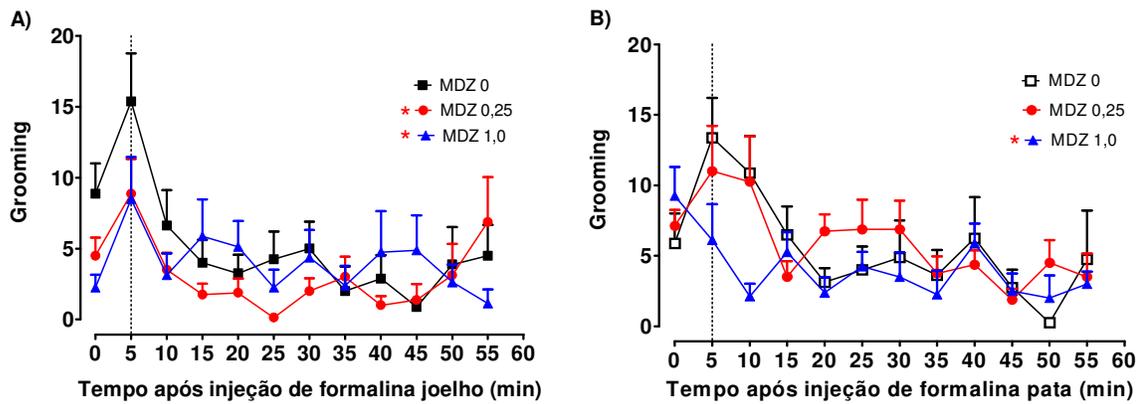
**Figura 23** - Efeito do Midazolam no comportamento nociceptivo avaliado nos testes de formalina, r durante 1h, intra-articular (A) e pata, (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 10 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnet. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle.



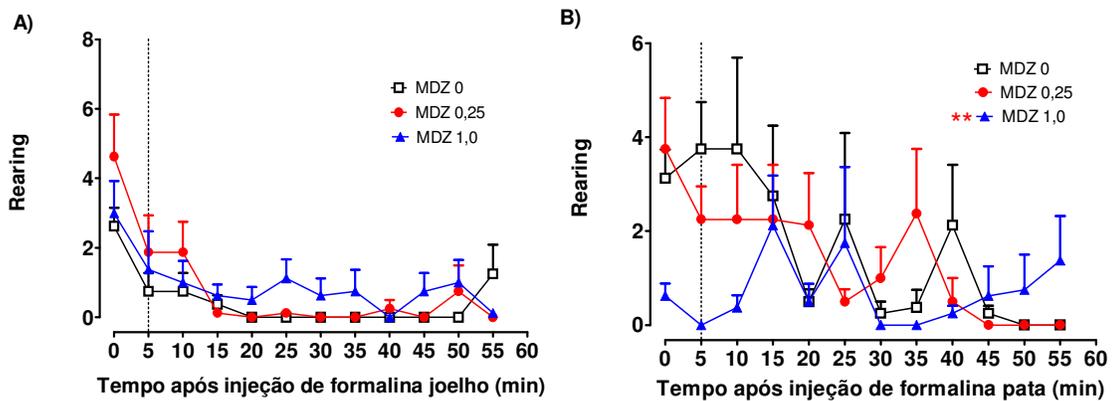
**Figura 24** - Efeito do midazolam no comportamento de exploração do ambiente nos testes de formalina intra-articular (A) e pata, (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnet. \* $p \leq 0,01$  comparado ao grupo controle.



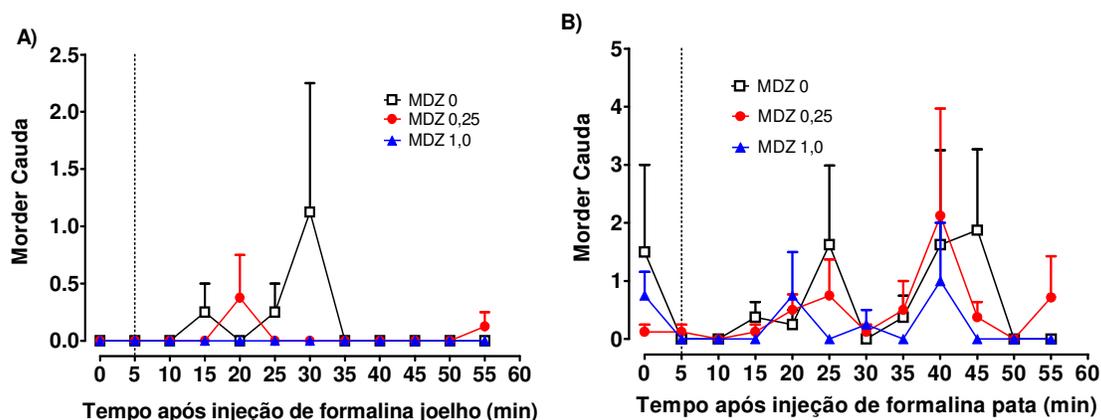
**Figura 25** - Efeito do midazolam no comportamento de imobilidade durante o teste de formalina intra-articular (A) e pata, (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste pós Dunnet. \* $p \leq 0,05$  e \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado ao grupo controle.



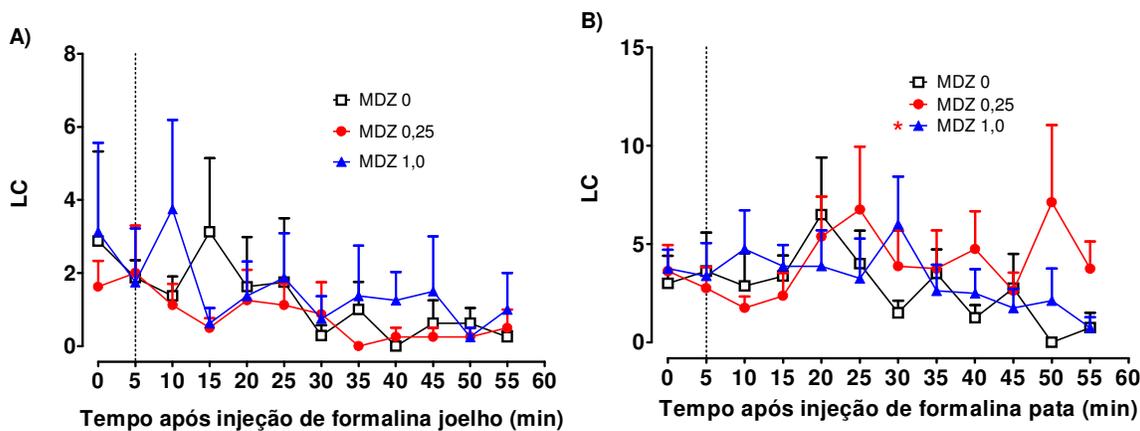
**Figura 26** - Efeito do midazolam no comportamento de Grooming durante o teste da formalina , intra-articular (A) e pata, subcutânea (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnet. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle.



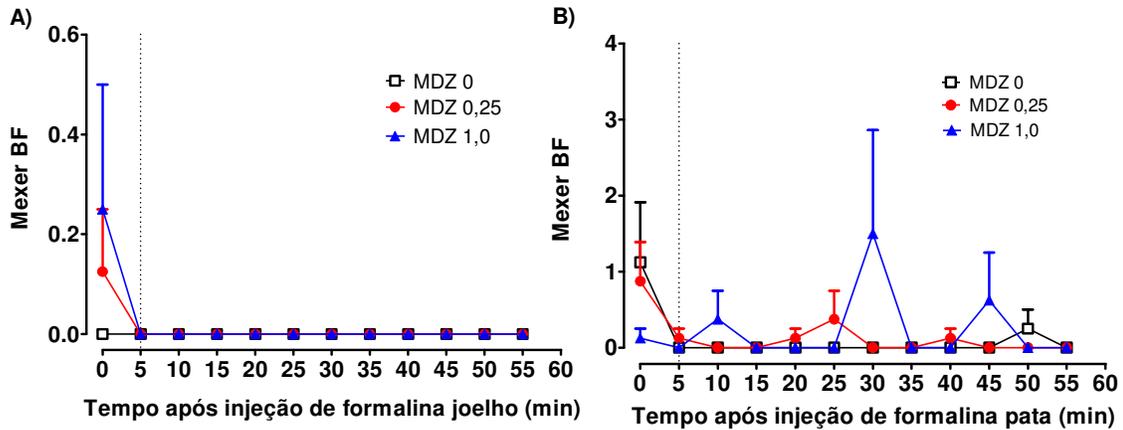
**Figura 27** - Efeito do midazolam no comportamento de Rearing durante o teste da formalina, intra-articular (A) e pata (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnet. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle.



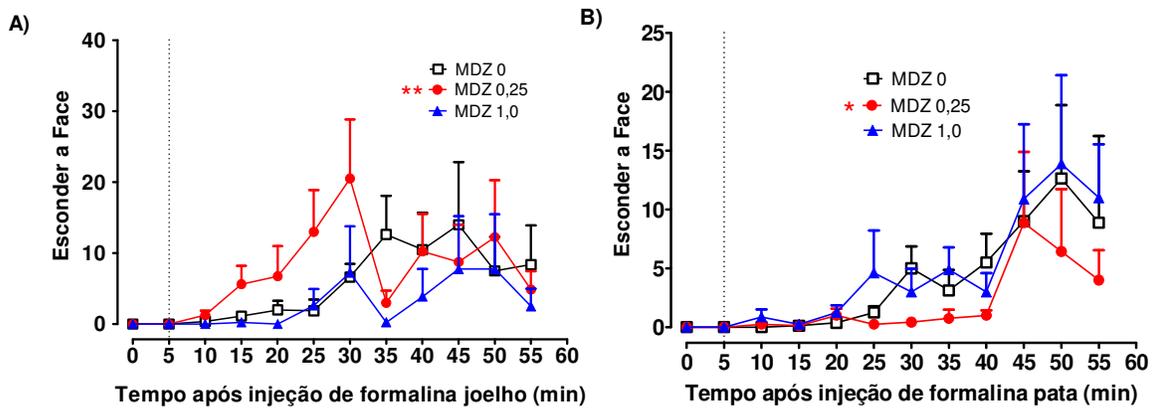
**Figura 28** - Efeito do midazolam no comportamento de morder a cauda durante o teste da formalina intra-articular (A) e pata (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnet.



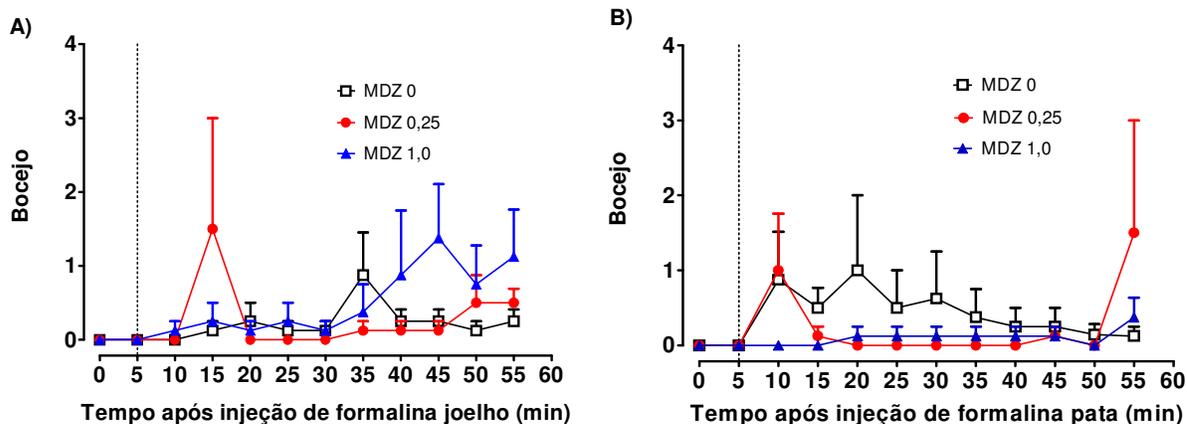
**Figura 29** - Efeito do midazolam no comportamento de Lamber o chão durante o teste da formalina intra-articular (A) e pata (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnet. \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle.



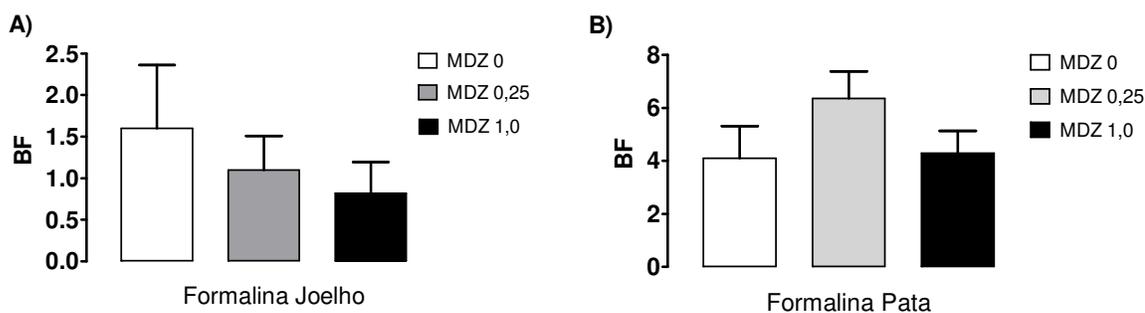
**Figura 30** - Efeito do midazolam no comportamento de mexer no bolo fecal durante o teste da formalina intra-articular (A) e pata (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnet.



**Figura 31** - Efeito do midazolam no comportamento de esconder a face (hunched) durante o teste da formalina intra-articular (A) e pata (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais, a cada 5 min. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnet. \* $p \leq 0,05$  e \*\* $p \leq 0,01$  comparado ao grupo controle.



**Figura 32** - Efeito do midazolam no número de bocejo durante o teste da formalina intra-articular (A) e pata (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnett.



**Figura 33** - Efeito do midazolam no número de bolos fecais produzidos durante o teste da formalina intra-articular (A) e pata (B). Os dados representam a média  $\pm$  epm de 8 animais. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguido pelo teste de Dunnett.

## 5. Discussão

Os principais achados do presente trabalho encontram-se resumidos na **tabela 1** abaixo.

**Tabela 1** - Resumo dos principais efeitos dos tratamentos de formalina (2%), no Joelho e na pata, e principais efeitos do pré- tratamento com midazolam no teste de formalina na caixa.

Comportamento	SJx FJ	SPx FP	FP x FJ	MDZ FP	MDZ FJ
<b>Dor</b>	↑	↑		0,25 ↓	0,25 e 1,0 ↓
<b>Exploração do ambiente</b>	↓	↓	↑	1,0 ↓ Quiesc	-
<b>Imobilidade</b>	-	↑	↓	1,0↑(5-40 min.)	1,0 ↑(0-10min)
<b>Grooming</b>	↓	↓	-	1,0 ↓ Quiesc	0,25 e 1,0 ↓
<b>Rearing</b>	↓	↓	-	1,0 ↓ Quiesc	-
<b>Morder a cauda</b>	-	↑	↑	-	-
<b>Lamber o chão</b>	-	↑	↑	0,25↑(25-55 min.)	-
<b>Mexer no bolo fecal</b>	-	↑	↑	-	-
<b>Esconder a Face</b>	↑	↑	↑	0,25 ↑	0,25↓
<b>Bocejo</b>	-	-	↑	-	-
<b>Número bolo fecal</b>	-	-	-	-	-

**Legenda:** Na tabela o símbolo (↑), significa aumento do comportamento, e (↓), significa diminuição do comportamento, e (-) significa que não houve variação significativa de um grupo para o outro. SJ= Salina no Joelho, SP= Salina na Pata, FJ= Formalina no Joelho e FP= Formalina na Pata. MDZ= midazolam.

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar o efeito do estímulo doloroso na ansiedade e estresse do animal, padronizando medidas comportamentais relacionadas à ansiedade, a própria nocicepção, e buscando uma possível correlação entre essas medidas. Para tal, os ratos da linhagem Wistar foram submetidos ao teste da formalina, modelo de dor persistente inflamatória.

## 5.1. Primeira etapa

Diversos experimentos com roedores têm sido realizados no intuito de se entender melhor a possível relação entre comportamentos relacionados à nocicepção e a ansiedade.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que tanto a formalina no joelho quanto a formalina na pata apresentaram um conjunto de comportamentos consistentes indicativos de nocicepção, em relação aos animais que receberam apenas solução fisiológica no mesmo sítio.

O rato injetado com formalina da pata mostrou mais comportamentos nociceptivos como lambidas e mordidas na pata afetada que no joelho. Jänig (1987) sugeriu que lambe o local injetado por agentes irritantes representa uma estratégia de redução da dor, já que ela estimula aferentes cutâneos de grande calibre, tais como fibras A delta, relacionados com o tato que, por sua vez, reduzem a transmissão de informações por nociceptores periféricos aos neurônios do corno dorsal da medula espinhal – Teoria da Comporta (MELZACK E WALL, 1965).

No joelho, a formalina diminuiu a exploração do ambiente pelo animal. Diminuiu também o tempo de *grooming* e o número de *rearing*. Além de abordagens descritivas, o *grooming* tem sido descrito como uma ferramenta importante na investigação do estresse neurocomportamental em ratos (KALUEFF *et alli*, 2004). Segundo Sprujt (1992), *grooming* pode ser considerada uma resposta comportamental que acompanha as mudanças provocadas por estímulos ansiogênicos (CASARRUBEA, 2008).

Dentre os comportamentos padronizados o número de bocejos durante a formalina no joelho foi significativamente maior do que no teste de formalina na pata, demonstrando talvez menores níveis de estresse ou nocicepção no animal. Por outro lado, o número de esconder a face (*hunched up*) aumentou. Esse comportamento pode ter mais de um significado. Pode ser uma tentativa de dormir, em uma posição que a sensação na pata ou joelho afetado não o

incomode. Sendo, mais preponderante quando a intensidade de incapacitação é maior, portanto é maior a nocicepção. Pode-se supor ainda que o animal esteja demonstrando um comportamento depressivo em relação a dor, onde ocorre a desistência de tentar contornar os efeitos nociceptivos causados pela formalina permanecendo “parado esperando passar”. Esta manifestação comportamental pode estar relacionada com o que chamam na literatura de *desamparo (helplessness)*. Com base na teoria do desamparo aprendido, modelo de depressão (ABRAMSON, 1978), o desamparo implica num conjunto generalizado, de conseqüências da dor crônica em longo prazo na vida diária. Desamparo se refere a um estilo atribucional, explicando eventos negativos, tais como dor crônica e suas conseqüências como sendo incontroláveis, imprevisíveis, e imutáveis, assim como o efeito de dor persistente da formalina (ABRAMSON et al 1978, EVERS et al , 2001). Estudos em pacientes com artrite reumatóide continuam a apoiar o papel central do desamparo, indicando um valor preditivo para o nível de dor, incapacidade e depressão ao longo do tempo. (EVERS et al, 2001, DEVELLIS et al 1992, SMITH et al 1994).

Os comportamentos de imobilidade, lambar o chão, comer ou mexer nos bolos fecais e morder a cauda não apresentaram percentual de variação significativa, entre o grupo controle e o tratado com formalina no joelho, demonstrando nestas condições de análise, não serem parâmetros úteis para comparação.

O teste de formalina na pata diminuiu o tempo de exploração do ambiente e o número de *rearings* na primeira fase do experimento em relação ao grupo controle.

O Rearing é uma resposta comportamental, tradicionalmente considerada como um marcador confiável de estresse em roedores (BELZUNG, 1999; CRAWLEY et al., 1997; ESPEJO, 1997). Assim num ambiente ansiogênico, ou com um estímulo ansiogênico esse comportamento tende a diminuir.

O Rearing também é considerado como um comportamento de exploração do ambiente, e no estudo é observado que segue o mesmo padrão do parâmetro de exploração.

O comportamento exploratório está sob o controle de duas motivações concorrentes. Por um lado, os animais mostram tendências de abordagem e investigar novos objetos e lugares. Por outro lado, a novidade também induz o medo, o que tenderia a suprimir a exploração ou produção de prevenção ativa da nova situação. Assim, o comportamento exploratório dependerá em grande medida do grau de novidade da situação, bem como outros aspectos da experiência anterior do animal. Toda manipulação emocional relevante, como a presença de um estímulo aversivo ou atrativo, que reduz ou aumenta o medo (mecanismo inibitório) seria de esperar, respectivamente, reduzir ou aumentar os níveis de exploração. (KALUEFF et TUOHIMAA , 2004)

No mesmo modelo o parâmetro de imobilidade também diminuiu com a injeção de formalina. A resposta de imobilidade postural varia em seus componentes, mas em geral é caracterizado por uma ausência de movimento e uma apatia em relação aos estímulos. (ZAMUDIO, 2009). Neste modelo a estimulação na pata pode ser tamanha estressora que o animal não conseguiu ficar indiferente em relação ao estímulo. Este modelo ainda diminuiu o número de comportamentos de Grooming.

O Grooming é um comportamento de cuidados com o corpo que está representado na maioria das espécies animais (FENTRESS, 1977; GREER e CAPECCI, 2003; SPRUIJT *et alli.*, 1992). É uma parte importante do repertório comportamental de roedores (BERRIDGE e WHISHAW, 1992; BERRIDGE *et alli.*, 1987, VAN ERP *et alli.*, 1995). Esse é altamente sensível a vários fatores estressantes, drogas psicotrópicas e manipulações genéticas (DUNN *et alli.*, 1987; GERLAI *et alli.*, 1998; CHOLERIS *et alli.*, 2001; SPRUIJT *et alli.*, 1992). Em roedores, o *grooming*, desempenha um papel importante na adaptação comportamental ao stress, incluindo comportamentos de lidar e de excitação (EGUIBAR *et alli.*, 2003;

KAMETANI, 1988; SACHS, 1988; SPRUIJT *et alli.*, 1992).

De fato, tem muito que se sabe que a atividade de *grooming* dos roedores geralmente pode ser aumentada em duas situações opostas: de alta e baixa tensão (KALUEFF, 2002; KATZ e ROTH, 1979). "Grooming Conforto" é um ritual que ocorre como uma transição do repouso para a atividade, e sob condições de estresse espontâneas (FENTRESS, 1977; KALUEFF, 2000; SPRUIJT *et al.*, 1992). Aqui observamos que como o *grooming* diminuiu com a administração do estímulo estressor, o *grooming* que significa conforto foi afetado.

A formalina na pata aumentou o número de comportamento de esconder a face (*hunched up*), o número de mordidas na cauda, lambidas no chão, número de bolo fecal, e as vezes que come ou mexe no bolo fecal. Comportamentos esses que, apesar de não descritos na literatura, em conjunto podem estar indicando um maior nível de estresse e nocicepção.

Os comportamentos de mordidas na cauda, lambidas no chão ou mexer/comer os bolos fecais podem ser vistos como comportamento de lidar, em inglês "Coping Behavior". Estes foram definidos como "constantes mudanças cognitivas e comportamentais no esforço de responder as demandas específicas, externas e / ou internas que são avaliadas como exaustivas, ou excedendo os recursos da pessoa" (LAZARUS *et alli.* 1984).

Estudos de correlação têm demonstrado que as respostas de lidar estão associadas tanto a curto como longo prazo no ajuste da dor crônica. (LINE *et alli.*, 1996; KEEFE *et alli.*, 1997; BOOTHBY *et alli.*, 1999; DE GOOD *et alli.*, 2001). Comportamentos de lidar com a dor se mostraram relacionados com medidas de intensidade da dor, aflição emocional, função física, estado de invalidez e outras variáveis psicossociais. Por exemplo, o uso de múltiplas estratégias de lidar com a dor tem sido inversamente correlacionado com incapacidades e deficiências (GIL *et alli.*, 1993, MARTIN *et alli.*, 1996) e com disfunções psicossociais (JENSEN *et alli.*, 1992).

Uma medida composta que representa as respostas cognitivas de lidar com a dor (identificado como "percepção de controle sobre a dor e pensamento racional") foram significativamente associada com menos intensidade de dor (TOTA-FAUCETTE *et alli.*, 1993) e menores níveis de sofrimento e incapacidade (DOZOIS *et alli.*, 1996; TAN *et alli.*, 2002). Em contraste, as respostas exageradas chamadas de catastrofismo (do inglês *catastrophizing*) foram significativamente correlacionadas com a maior intensidade de dor, angústia afetiva (SULLIVAN *et alli.*, 1995; UNRUH *et alli.*, 1999; TAN *et alli.*, 2001) e incapacidade (MARTIN, *et alli.* 1996 ; GEISSER *et alli.*, 1998). O *catastrofismo* tem sido definido como uma orientação exagerada e negativa em resposta aos estímulos dolorosos, uma ampliação do valor da ameaça do estímulo doloroso, e uma consciente incapacidade para controlar a dor. (ROSENSTIEL, 1983; SULLIVAN 1999). O *catastrofismo* refere-se à maior gravidade da dor em pacientes com artrite reumatóide (COVIC *et alli.*, 2000; KEEFE, 1997) e osteoartrite (KEEFE *et alli.*, 2000 e 2004). Altos níveis de *catastrofismo* também estão associados à dor mais intensa, mais generalizada e a perturbação emocional entre os indivíduos com fibromialgia e esclerodermia (GRACELY, 2000).

Comparando os dois modelos observou-se que a formalina no joelho apresentou no início do teste aumento da atividade exploratória seguido por imobilidade até o termino do experimento. Demonstrando que o nível de nocicepção atingida no modelo de formalina no joelho não impediu que o foco de atenção do animal se mantivesse no ambiente e não na dor. Ao contrário da formalina na pata, onde os níveis elevados de movimentos nociceptivos demonstraram que o animal manteve se mais focado na pata afetada, principalmente na segunda fase da formalina, que apresentou níveis muito baixos de imobilidade. Foi observado em muitos estudos que o aumento da ansiedade com estímulos provocados pela dor, ou administração de corticosterona (ZAMUDIO, 2005) aumentou a duração da imobilidade. Nas aves há ampla evidência de que o uso de estímulos estressores, antes ou durante a imobilidade

torna mais provável a sua existência e prolonga a resposta (FAURE *et alli.*, 2003; ALTAM *et alli.*, 2005).

Dos comportamentos padronizados neste trabalho, o modelo de formalina no joelho mostrou maior número de bocejos, e maior número de esconder a face.

Já o modelo de formalina na pata apresentou maior número de mordidas na cauda, lambidas no chão, maior número de vezes que ingeriu ou mexeu no bolo fecal e também maior número de bolos fecais. Todos esses comportamentos apareceram em níveis muito altos de nocicepção, o que retoma a idéia de que são manifestações geradas pelo estresse da dor, seriam estratégias ativas para o enfrentamento deste estado. Por outro lado, o esconder a face pode ser uma estratégia passiva para contornar a dor. Estratégias ativas são definidas como respostas adaptativas de enfrentamento (por exemplo, permanecer ocupado ou ativo), e estratégias passivas são definidos como as não-adaptativas (por exemplo, permanecendo imóvel). O lidar passivo tem sido associado a altos níveis de dor, incapacidade e sofrimento. Em contrapartida, respostas ativas de lidar têm sido correlacionadas com efeito positivo e maior atividade locomotora (SNOW-TUREK *et alli.*, 1996; TURNER *et alli.* 1995; ZAUTRA *et alli.*, 1995) . Além disso, estudos de correlação mostraram que respostas de lidar passivas foram prenúncios dos níveis de dor e subsequente incapacidade. (POTTER *et alli.* 1992 ; TURNER *et alli.* 1995).

O aumento no número de bolos fecais pode estar indicando que o modelo de formalina na pata é mais estressante que no joelho, alguns estudos usam o bolo fecal para indicar aumento nos níveis de corticosterona, hormônio expresso pelo estresse e ansiedade em ratos. (LEPSCHY *et alli.*, 2007; JANSEN *et alli.*, 2009).

Interessantes considerações etológicas surgem de uma análise comparativa entre os resultados atuais e os obtidos em diferentes contextos experimentais. Atividade exploratória, imobilidade e *grooming* representam os padrões comportamentais descritos no hot-plate

(CASARRUBEA, 2006; ESPEJO *et alli.*,1992), campo aberto e hole-board (CASARRUBEA, 2009). Se por um lado, cada um destes elementos não difere a respeito de diferentes contextos, a sua padronização se distingue. Neste contexto experimental, a necessidade de uma resposta de fuga rápida aos estímulos nociceptivos poderia explicar por que grooming é raramente observado (CASARRUBEA, 2009, ESPEJO *et alli.*,1992). A análise comparativa dos resultados obtida em diferentes contextos experimentais sugere, de acordo com Casarrubea (2009), que esse comportamento pode ser organizado de forma modular, onde a padronização entre os elementos pode mudar dependendo da motivação e estímulos externos.

Além disso, a ausência de estresse induzindo analgesia no modelo de formalina no joelho pode estar relacionada ao local diferente da injeção de formalina. Conforme descrito na introdução, respostas nociceptivas evocadas por estímulos cutâneos diferem de uma provocada por estímulos em tecidos profundos. A discrepância entre os modelos de nocicepção em sua susceptibilidade à modulação pelo estresse é evidente não só nos resultados do presente estudo, mas também nos efeitos parciais e transitórios analgésicos encontrados em outros estudos, empregando o teste da formalina (AMIR e AMIT, 1979; FUCHS e MELZACK, 1996; ALOISI *et alli.*, 1998).

## **5.2. Segunda etapa, efeitos do pré-tratamento com midazolam**

Benzodiazepínicos ansiolíticos ou condições ansiogênicas têm demonstrado causar efeitos pró-nociceptivos e antinociceptivo em modelos de nocicepção cutânea, (MARTINS *et alli.*,2006). Curiosamente, há também uma forte associação entre a ansiedade e a dor, que pode ter manifestações contrárias. Estudos clínicos mostram que pacientes com altos níveis de ansiedade experimentam dor elevada. Baer e colaboradores demonstraram que ratos muito ansiosos apresentaram resposta mais baixa de dor a estímulos térmicos comparados com os

ratos em um estado de baixa ansiedade (MARTINS *et alli.*, 2006). Assim, a ansiedade também pode levar a uma redução da experiência da dor.

No modelo de formalina na pata, a dose de 0,25 mg/kg de midazolam diminuiu o número de eventos nociceptivos durante todo o período de segunda fase da formalina, em relação ao controle, entretanto a dose de 1 mg/kg não diminuiu efetivamente o número de eventos nociceptivos. Já o modelo de formalina no joelho apresentou redução significativa dos comportamentos nociceptivos, nas duas doses de midazolam utilizadas.

Chiba e colaboradores (2008), mostraram que midazolam administrado por via intratecal teve efeito antinociceptivo tanto em estímulo térmico agudo quanto nocicepção inflamatória, enquanto midazolam administrado por via intraperitoneal tinha efeitos antinociceptivos sobre o estímulo inflamatório, mas não na nocicepção térmica aguda em ratos Sprague-Dawley.

O efeito de benzodiazepínicos dado sistemicamente em testes nociceptivos tem sido inconsistentes. Estas drogas já foram descritas produzindo antinocicepção moderada, nenhum efeito, ou mesmo um efeito pró-nociceptivo, com este último resultado a ser corroborado pelo efeito antinociceptivo induzido por um antagonista benzodiazepínico. ( GATCH, 1999; PALAOGLU *et alli.*, 1986; PANG *et alli.*, 2001; SIEVE *et alli.*, 2001; TATSUO *et alli.*,1999; TONUSSI *et alli.*, 1992; ZAMBOTTI *et alli.*; 1991).

Já foi reconhecido que a nocicepção provocada nos tecidos cutâneos e profundos, ativa diferentes regiões na área cinzenta periaquedutal e amígdala, estruturas que participam do comportamento de ansiedade / medo e estão envolvidas na ativação projeções modulatórias descendentes para a medula espinhal.( GAMEIRO *et alli.*, 2003; BOLLES *et alli.*, 1980).

No modelo de formalina na pata a dose de 1 mg/kg, reduziu a exploração no ambiente, e o *rearing*. Pode ser um indicio que a ansiedade de fato foi reduzida, e o ambiente já não é

mais tão aversivo. No entanto esses parâmetros não foram afetados no modelo de injeção articular. Como já foi discutido o comportamento exploratório de roedores é caracterizado como um equilíbrio entre a busca de novidades e evasão, e está correlacionada com o nível de ansiedade (RODGERS, *et alli.*, 1997). Portanto, as variações de comportamento exploratório provavelmente refletem diferenças de enfrentamento do estresse entre os dois modelos experimentais.

No comportamento de *grooming*, o fato de ele ter sido reduzido nos dois modelos com o tratamento do midazolam também confirma a ação do ansiolítico, uma vez que um comportamento intensificado de *grooming* também pode ser observado em resposta à exposição a fatores estressantes (KALUEFF e TUOHIMAA, 2005) várias regiões parecem estar envolvidas na regulação do *grooming*, incluindo o hipotálamo, mostrando que os elementos do *grooming* podem ser engatilhados por diferentes níveis de estresse (KALUEFF e TUOHIMAA 2004; VAN ERP *et alli.* 1995).. Como nesta situação existe um componente altamente estressor (injeção de formalina), o *grooming* visto como um comportamento de lidar com a dor foi reduzido.

Um fato interessante surgiu no parâmetro da imobilidade onde a mesma dose de 1mg/kg de midazolam, afetou de forma inversa os dois modelos. No modelo de formalina no joelho, a imobilidade diminuiu, e no modelo na pata este parâmetro aumentou. Deixando mais claro as diferenças entre os dois modelos. Com a redução dos níveis de ansiedade no experimento, o modelo no joelho, onde a característica mais marcante foi a imobilidade, e que é o que se encontra normalmente em outros estudos, diminuiu. E o tratamento com midazolam conseguiu aumentar a imobilidade do modelo na pata, um dos indícios que este modelo pode ser um bom modelo animal para os comportamentos de catastrofismo da dor (*catastrophizing behavior*).

Quanto aos comportamentos padronizados no estudo, o esconder a face aumentou na dose de 0,25 mg/kg do ansiolítico no joelho e diminuiu na pata, seguindo o mesmo padrão da imobilidade, o que pode reforçar esse parâmetro. No modelo da formalina na pata, estes achados parecem se correlacionar bem com os achados sobre a nocicepção, pois a dose menor do benzodiazepínico reduziu o comportamento nocifensivo assim como o de esconder a face. E a dose maior não teve efeito sobre os dois comportamentos. No modelo de formalina no joelho, a interpretação parece mais difícil. A dose menor aumentou o comportamento de esconder a face, mas também diminuiu a incapacitação. E a dose maior apresentou tendência a diminuir o comportamento de esconder a face, mas também reduziu a incapacitação. Isto é contrário a interpretação de que o comportamento de esconder a face seja diretamente proporcional a nocicepção. Porém, há de se ressaltar que nesta etapa do estudo, os animais controle com formalina no joelho apresentaram um número de comportamentos de esconder a face bem menor, e em um período mais tardio do teste, do que o que havia sido observado na primeira etapa. Isto poderia estar afetando a expressão dos efeitos do fármaco. O comportamento de lambar o chão no modelo da pata (dose de 1 mg/kg) diminuiu em relação ao controle. E os outros comportamentos mesmo não apresentando significância variaram com a administração do midazolam, o que sugere de fato uma correlação com o componente estressor gerado pela dor.

Quanto à defecação, no modelo de formalina no joelho foi observado uma tendência em diminuir com a proporção de dose administrada. O aumento da defecação foi à primeira medida de emotividade proposto por Hall em 1934, mas raramente é considerado como índice de ansiedade em estudos farmacológicos (PRUT *et alli.*, 2003; RAMOS *et alli.*, 1998). No entanto, os presentes resultados sugerem uma correlação entre a defecação e as medidas clássicas de ansiedade nesse modelo.

## 6. Conclusão

O presente estudo permite sugerir que o modelo de nocicepção por formalina intra-articular é menos ansiogênico para o animal do que o tradicional método de formalina injetada na pata traseira. O efeito do fármaco ansiolítico parece apoiar essa sugestão, quando reduz os comportamentos relacionados à ansiedade, mais presentes no modelo da pata. Esta diferença pode ter implicações muito importantes para o estudo da dor e do efeito de fármacos analgésicos, pois sugere também que os fatores emocionais e talvez a própria nocicepção originados pela formalina na pata sejam proporcionalmente muito mais elevados do que aqueles respectivamente observados em pacientes humanos em geral. Porém se o modelo de formalina no joelho pode ser mais adequado para a compreensão dos mecanismos envolvidos na dor clínica em geral, que envolvem patologias músculo-esquelético, o modelo de formalina da pata, justamente por sua característica mais ansiogênica, pode ser mais adequado para o estudo de mecanismos e avaliação de fármacos voltados para as dores que geram emotividade exagerada, como o catastrofismo, por exemplo. Finalmente, este estudo permitiu caracterizar que comportamentos ocorrem de forma mais específica em cada modelo, e possibilita que no futuro possamos de forma prática avaliar não apenas o componente sensorial da dor (a nocicepção), mas também alguns componentes perceptuais, que podem estar caracterizando o estado emocional dos animais frente a esta nocicepção. Ou seja, estamos mais próximos de avaliar realmente a dor em animais e sua modificação por drogas, melhorando a preditividade da investigação pré-clínica deste fenômeno.

## 7. Referências

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

ABRAMSON LY, SELIGMAN MEP, TEASDALE JD. (1978). **Learned helplessness in humans: critique and reformulation.** *J Abnorm Psychol.*;v.87, p.49-74.

ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J.; COLLINS, A. (2001). **Neural plasticity and stress induced changes in defense in the rat.** *Neurosci Biobehav Rev.*, v. 25, p. 721-744.

ALOISI AM, DECCHI B, CARLI G. (1995) **Importance of site of injection in the formalin test.** *Med Sci Res*; v.23, p.603-610.

ALOISI AM, CECCARELLI I, LUPO C. (1998). **Behavioural and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats.** *Brain Res Bull*;v.47, p.57- 62.

ALTAN O., PABUCCUOGLU A., ALTAN A., KONYALIOGLU S. , BAYRAKTAR H. (2003) . **Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers.** *Br. Poult. Sci.* v.44, p. 545-550.

AMIR S, AMIT Z. (1979).**The pituitary gland mediates acute and chronic pain responsiveness in stressed and non-stressed rats.** *Life Sci*;v.24, p.439- 48.

ARNÉR, S. MEYERSON, B.A. (1988) . **Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain.** *Pain*, v. 33, p. 11-23.

BAER E, DAVITS LJ, LIEB R.KANGO KENKYU. (1971). **Inferences of physical pain and psychological distress. In relation to verbal and non-verbal patient communication.** *Spring*;4(2):142-6.

BASBAUM, A.E.; JESSEL, T.M. (2000) .**The perception of pain.** In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M. *The Principles of Neural Science.* v. 4, p. 472-791.

BELZUNG C. (1999). **Measuring rodent exploratory behavior.** In: Cruzio WE, Gerlai RT, editors. *Handbook of molecular genetics for brain and behavior research.* New York: Elsevier; p. 738-749.

BELZUNG, C. e GRIEBEL, G. (2001). **Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review.** *Behav Brain Res.*, v. 125, p. 141-149.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. (2001). **Mouse defensive behaviors: Pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic.** *Neurosci Biobehav Rev.*, v. 25, p. 205- 210.

BELLGOWAN, P.S.; HELMSTETTER, F.J. (1996) . **Neural systems for the expression of hypoalgesia during non associative fear.** *Behav. Neurosci.*, v. 110, n.4, p. 727-736.

BERRIDGE K.C., WHISHAW I.Q.(1992). **Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence.** Exp Brain Res;v. 90, p.275–90.

BOOTHBY J.L., THORN B.E., STROUD M.W., JENSEN M.P. (1999). **Coping with pain, in Getchel RJ, Turk DC (eds): Psychosocial Factors in Pain: Critical Perspectives.** New York, NY, Guildford Press, v. 2, p. 345-359.

BUSHNELL, M.C.; DUNCAN, G.H.; DUBNER, R.; JONES, R.L.; MAIXNER, W. (1985).**Attentional influences on noxious and innocuous cutaneous heat detection in humans and monkeys.** J. Neurosci., v.5, p. 1103-1110.

CARTENS, E. (1995). **Neural Mechanisms of Hyperalgesia: peripheral or central sensitization.** Neur. in Physiol.Sci., v. 10, p. 260-265.

CASARRUBEA M., SORBERA F., CRESCIMANNO G.( 2009). **Structure of rat behavior in hole-board: I) multivariate analysis of response to anxiety.** Physiol Behav.; v.8, p.96 174-179.

CERVERO, F., LAIRD, J.M.A. (1991). **One pain or many pains? A new look at pain mechanisms.** News Physiol.Sci; v.6, p. 268-273.

CHIBA, S., NISHIYAMA, T., YOSHIKAWA, M., YAMADA, Y. (2009).**The antinociceptive effects of midazolam on three different types of nociception in mice.**J Pharmacol Sci.; v.109, p.71-7.

CHOLERIS E, THOMAS AW, KAVALIERS M, PRATO FS. (2001). **A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field.** Neurosci Biobehav Rev; v.25, p.235–60.

CRAWLEY J.N., BELKNAP J.K., COLLINS A., CRABBE J.C., FRANKEL W., HENDERSON N.(1997). **Behavioural phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies.** Psychopharmacology;v.132, p.107–24.

CODERRE, T.J.; VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. (1990). **Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection.** Brain Res., v. 535, p.155-158.

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

COVIC T, ADAMSON B, HOUGH M. (2000).**The impact of passive coping on rheumatoid arthritis pain.** Rheumatology (Oxford); v.39, p.1027–30.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. Jr.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA,S.H. (2005).**A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., v. 102, n. 5, p. 1755-1760.

- DEGOOD D.E., TAIT R.C.(2001). **Assessment of pain beliefs and pain coping, in Turk DC, Melzack R (eds).Handbook of Pain Assessment.** New York, NY, Guilford, v.3, p 320-345.
- DEVELLIS BM, BLALOCK SJ. (1992). **Illness attributions and hopelessness depression: the role of hopelessness expectancy.** J Abnorm Psychol.;v.101, p.257–264.
- DICKENSON, A.H., SULLIVAN, A.F. (1987). **Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin induced activity of rat dorsal horn neurons.** Neurosc. Lett.; v.87, p. 207-211.
- DIELENBERG, R. A. e MCGREGOR, I. S. (2001). **Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review.** Neurosci Biobehav Rev., v. 25, p. 597-609.
- DOZOIS DJA, DOBSON KS, WONG M, HUGHES D, LONG A. (1996). **Predictive utility of the CSQ in low back pain: individual vs composite measures.** Pain; v. 66, p.171-180.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. (1977). **The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats.** Pain, v.4, p. 161-174.
- DUNN A.J., BERRIDGE C.W., LAI Y.I., YACHABACH T.L. (1987). **CRF-induced excessive grooming behavior in rats and mice.** Peptides;v.8, p.841–4.
- EGUIBAR JR, ROMERO-CARBENTE JC, MOYAHO A. (2003). **Behavioral differences between selectively bred rats: D1 versus D2 receptors in yawning and grooming.** Pharmacol Biochem Behav.; v.74, p.827– 32.
- ESPEJO EF. (1997). **Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety.** Behav Brain Res;v.86, p.105– 12.
- EVERS A.W.M., KRAAIMAAT F.W., LANKVELD W. (2001). **Beyond unfavorable thinking: the Illness Cognition Questionnaire for chronic diseases.** J Consult Clin Psychol.;v.69, p.1026–1036.
- FAURE J.M., VAL-LAILLET D., GUY G., BERNADET M.D., GUEMENE D. (2003).**Fear and stress reactions in two species of duck and their hybrid.** Horm. Behav. v. 43, p568–572.
- FEINSTEIN B, LANGTON J N K, JAMESON R M. (1954). **Experiments on pain referred from deep somatic tissues.** Journal of Bone and Joint Surgery, v. 36, p. 981-997.
- FENTRESS J.C. (1977). **The tonic hypothesis and the patterning of behavior.** Ann NY Acad Sci;v.290, p.370–94.
- FILE, S. E.; ZANGROSSI, H. JR.; ANDREWS, N. (1993). **Social interaction and elevated plus-maze tests: Changes in release and uptake of 5-HT and GABA.** Neuropharmacology v. 32, p. 217-221.

- FILE, S. E. (2001). **Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse.** Behav Brain Res.,v. 125, p. 151-157.
- FUCHS ,P.N., MELZACK, R. (1996). **Restraint reduces formalin-test pain but the effect is not influenced by lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus.** ExpNeurol;v.139, p.299– 305.
- GAMEIRO, G.H.; GAMEIRO, P.H.; ANDRADE, A.; PEREIRA, L.F.; ARTHURI, M.T.; MARCONDES, F.K.; VEIGA, M.C. (2006). **Nociception- and anxiety-like behavior inrats submitted to different periods of restraint stress.** Physiol. Behav., v. 87, p.643-649.
- GATCH ,M.B.(1999).**Effects of benzodiazepines on acute and chronic ethanol-induced nociception in rats.** Alcohol Clin. Exp Res; v.23, p.1736-1743.
- GEISSER, M.E., ROTH, R.S. (1998). **Knowledge of and agreement with pain diagnosis: Relation to pain beliefs, pain severity, disability, and psychological distress.** J. Occup Rehabil v.8, p.73-88.
- GERLAI R, HENDERSON JF, RODER JC, JIA Z. (1998).**Multiple behavioural anomalies in GluR2 mutant mice exhibiting enhanced LTP.** Behav Brain Res;v.95, p.37–45.
- GIL, K.M., THOMPSON, R.J., KEITH, B.R., TOTA-FAUCETTE, M., NOLL, S., KINNEY, T.R. (1993). **Sickle cell disease pain in children and adolescents:change in pain frequency and coping strategies over time.** J Pediatr Psychol v.18, p.621-637.
- GREER, J.M., CAPECCI, M.R. (2003). **Hoxb8 is required for normal grooming behaviourin mice.** Neuron; v 33, p 23–34.
- GROSS, C. e HEN, R. (2004). **The developmental origins of anxiety.** Nature Rev v. 5, p. 545-551.
- GUILBAUD, G.; BERNARD, J. F. and BESSON, J. M. (1994). **Brain areas involved in nociception and pain.** In Patrick Wall e Ronald Melzack, (Eds.), Textbook of pain, Churchill Livingstone, London, p. 113-128.
- HARRIS, J.A., (1996). **Descending antinociceptive mechanism in the brainstem: their role in the animal's defensive system.** J. Physiol, v. 90, p. 15–25.
- HALL, C.S. (1934). **Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.**J Comp Psychol ; v.18, p.385–403.
- HAYES, R.L., BENNETT, G.J., NEWLON, P.G., MAYER, D.J. (1978). **Behavioral and physiological studies of non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli.** Brain Res, v.155, p. 69-90.
- HELMSTETTER, F.J. (1993). **Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala.** Pharmacol. Biochem. Behav., v. 44, p. 433-438.

- HELMSTETTER, F.J.; TERSHNER, S.A.; POORE, L.H.; BELLGOWAN, P.S. (1998). **Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla.** *Brain Res.*, v. 779, p. 104-118.
- HUNT,S.P.; MANTYH,P.W. (2001). **The molecular dynamics of pain control.** *Neuroscience*, v.2, p. 83-91.
- IASP (international Association for Study of Pain), (1995). **Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals.** *Pain*; v 16, p. 09-110.
- JÄNIG, W. (1987).**Neuronal mechanisms of pain with special emphasis on visceral and deep somatic pain.** *Acta Neurochir Suppl (Wien)*; v.38, p.16-32.
- JENSEN, M.P., STROM, S.E., TURNER, J.A., ROMANO, J.M. (1992). **Validity of the Sickness Impact Profile Roland scale as a measure of dysfunction in chronic pain patients.** *Pain*; v.50, p.157-162.
- JANSEN, F., HEIMING, R.S., LEWEJOHANN, L., TOUMA, C., PALME, R., SCHMITT, A., LESCH, K.P., SACHSER, N. (2009). **Modulation of behavioural profile and stress response by 5-HTT genotype and social experience in adulthood.** *Behav Brain Res.*v. 51,p. 150- 157.
- JORUM, E. (1988). **Analgesia or hyperalgesia following stress correlates with emotional behavior in rats.** *Pain*, v. 32, p. 341-348.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. (2001). **Molecular mechanisms of nociception.** *Nature*, v. 413, p. 203-210.
- KAIN, Z.N., SEVARINO, F., ALEXANDER, G.M., PINCUS, S., MAYES, L.C. (2000). **Preoperative anxiety and postoperative pain in women undergoing hysterectomy. A repeated measures design.** *J. Psychosom. Res.*, v. 49, p. 417-22.
- KALUEFF, A.V. (2000). **Measuring grooming in stress and comfort.** *Proc Int. Conf Measur. Behav.* ; v.3, p.148–149.
- KALUEFF, A.V. (2002). **Grooming and stress.** *KSF: Kiv.* ; v. 4, p. 100- 108.
- KALUEFF, A.V., TUOHIMAA, P. (2004a).**Grooming analysis algorithm for neurobehavioral stress research.** *Brain Res. Prot.*;v.13, p.151–8.
- KALUEFF AV, LOU YR, LAAKSI I, TUOHIMAA P. (2004b). **Grooming microstructure in mice is affected by genetic ablation of Vitamin D receptors.** *Proc FENS Forum*;v.5, p.353-359.
- KANEKO, M., HAMMOND, D.L. (1997). **Role of spinal gamma-aminobutyric acid A receptors in formalin-induced nociception in the rat.** *J Pharmacol Exp Ther*; v. 282, p. 928-938.

- KATZ RJ, ROTH KA. (1979). **Stress-induced grooming in the rat – an endorphin mediated syndrome.** *Neurosci. Lett.* ; v.13, p. 209–12.
- KAVALIERS, M, INNES DG. (1938). **Novelty-induced opioid analgesia in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): sex and population differences.** *Behav. Neural. Biol.*, v.49, p. 54-60.
- KEEFE, F.J., AFFLECK, G., LEFEBVRE, J.C., STARR, K., CALDWELL, D.S., TENNEN, H. (1997). **Pain coping strategies and coping efficacy in rheumatoid arthritis: a daily process analysis.** *Pain*; v. 69, p. 35-42.
- KEEFE, F.J., AFFLECK, G., FRANCE, C.R., EMERY, C.F., WATERS, S., CALDWELL, D.S.(2004). **Gender differences in pain, coping, and mood in individuals having osteoarthritic knee pain: a within-day analysis.** *Pain*; v.110, p.571–7.
- KEEFE, F.J., LEFEBVRE, J.C., EGERT, J.R., AFFLECK, G., SULLIVAN, M.J., CALDWELL, D.S. (2000). **The relationship of gender to pain, pain behavior, and disability in osteoarthritis patients: the role of catastrophizing.** *Pain*; v. 87, p. 325–34.
- KLEIN, T. MAGERL, W., ROLKE, R.TREEDE, R.D. (2005). **Human surrogate models of neuropathic pain.** *Pain*;v.115 , p.227-233.
- LANG, P. J.; DAVIS, M.; OHMAN, A. (2000) **Fear and anxiety: Animal models and human cognitive psychophysiology.** *J Affect Disord* v. 61, p. 137-159.
- LAUTENBACHER, S., SPERNAL, J., SCHEIBER W., KRIEG J.C. (1999). **Relationship between clinical pain complaints and pain sensitivity in patients with depression and panic disorder.** *Psychosom. Med.* v. 61, p. 822–827.
- LAZARUS, R.S., FOLKMAN, S. (1984). **Stress, appraisal, and coping.** New York, NY, Springer,v.1, p 445-448.
- LEE, C., RODGERS, R.J. (1992). **Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure:influence of opiate receptor manipulations.** *Psychopharmacology*, v. 102, p. 507-513.
- LEWIS T. (1938). **Suggestions relating to the study of somatic pain.** *British Medical Journal*, v.1, p.321-325.
- LIN, C., WARD, S.E. (1996). **Perceived self-efficacy and outcome expectancies in coping with chronic low back pain.** *Res Nurs Health*; v.19, p. 299-310.
- LEPSCHY, M., TOUMA, C., HRUBY, R., PALME, R. (2007). **Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats.** *Lab Anim.* ; v.41(3), p.372-87.
- LOESER, J.D., TREEDE, R.D. (2008). **The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology.** *Pain*, v.137 (3), p.473-477.

- LOVICK, T. A. (2008). **Pro-nociceptive action of cholecystokinin in the periaqueductal grey: a role in neuropathic and anxiety-induced hyperalgesic states.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 32(4), p. 852-862.
- MARTIN, M.Y., BRADLEY, L.A., ALEXANDER, R.W., ALARCON, G.S., TRIANA-ALEXANDER, M., AARON, L.A., ALBERTS, K.R. (1996). **Coping strategies predict disability in patients with primary fibromyalgia.** *Pain*; v.68, p.45-53.
- MARTINS A.M.; BASTOS, L.C.; TONUSSI, C.R. (2006). **Formalin injection into Knee-joints of rats; pharmacological characterization of deep somatic nociceptive model.** *The Journal of Pain*. v.2, p. 100-107.
- MATTHIES, B.K.; FRANKLIN, K.B. (1992). **Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine.** *Pain*, v. 51, p. 199-206,
- MELLO, D.M.S.; MARCINICHEN, D.R.; MADRUGA, D.; BRANCO, R.; PASCHOALINI, M. A.; DE LIMA, T.C.M. (2007). **Involvement of NK1 receptors in metabolic stress markers after the central administration of substance P.** *Behavioural Brain Research* v. 181, p. 232–238.
- MELZACK, R., WALL, P.D. (1965). **Pain mechanisms: a new theory.** *Science*. ; v.150, p.971-9.
- MIRON, D.; DUNCAN, G.H.; BUSHNELL, M.C. (1989). **Effects of attention on the intensity and unpleasantness of thermal pain.** *Pain*, v. 39, p. 345-352.
- NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R.V.; GRAEFF, F.G.; PELA, I.R. (2000). **Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam.** *Psychopharmacology*, v. 150, p. 300-310.
- PALAOĞLU, O.; AYHAN, I.H. (1986).**The possible role of benzodiazepine receptors in morphine analgesia.** *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 25, p. 215-217,.
- PANG, C.S.; TSANG, S.F.; YANG, J.C.(2001).**Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice.** *Life Sci.*, v. 68, p. 943-951.
- PARADA, C.A.; VIVANCOS, G.G.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. (2003)**Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 100, p. 2923-2928.
- PLOGHAUS, A.; BECERRA, L.; BORRAS, C.; BORSOOK, D. (2003). **Neural circuitry underlying pain modulation: expectation, hypnosis, placebo.** *Trends Cogn. Sci.*, v. 7, p. 197- 200.
- POTTER, R.G., JONES, J.M. (1992).**The evolution of chronic pain among patients with musculoskeletal problems: a pilot study in primary care.** *Br J Gen. Pract.* ; v.42, p.462-464.

- PRUT L, BELZUNG C. (2003). **The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.** Eur J Pharmacol; v.463 , p.3–33.
- RAMOS, A. E MORMÈDE, P. (1998). **Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach.** Neurosci Biobehav Rev, v. 22, p.33-57.
- RODGERS, R.J., LEE, C., SHEPHERD, J.K. (1992) . **Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience.** Psychopharmacology, v. 106, p.102-110.
- RODGERS, R.J., RANDALL, J.I. (1997). **Benzodiazepines ligands, nociception and “defeat” analgesia in male mice.** Psychopharmacology, v. 91, p. 305-315.
- ROSEN, J.B.; SCHILKIN, J. (1998). **From normal fear to pathological anxiety.** Psychol Rev; v. 105, p.325-350.
- ROSENSTIEL, A.K., KEEFE, F.J. (1993). **The use of coping strategies in chronic low back pain patients: relationship to patient characteristics and current adjustment.** Pain; v.17, p.33-44.
- RHUDY, J.L.; MEAGHER, M.W. (2000). **Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds.** Pain, v. 84, p. 65-75.
- SACHS, B.D. (1988). **The development of grooming and its expression in adult animals.** Ann NY Acad. Sci; v.525, p.1–17.
- SCHAIBLE H-G., GRUBB B. D. (1993). **Afferent and spinal mechanism of joint pain.** Pain v. 55, p. 5-54.
- SCHANBERG, L.E., LEFEBVRE, J.C., KEEFE, F.J., KREDICH, D.W., GIL, K.M. (1997) **Pain coping and the pain experience in children with juvenile chronic arthritis.** Pain; v.73, p.181-189.
- SIEVE, A.N.; KING, T.E.; FERGUSON, A.R.; GRAU, J.W.; MEAGHER, MW. (2001). **Pain and negative affect: evidence the inverse benzodiazepine agonist DMCM inhibits pain and learning in rats.** Psychopharmacol (Berl); v.153, p.180-190.
- SMITH, T.W., CHRISTENSEN, A.J., PECK, J.R., (1994). **Cognitive distortion, helplessness and depressed mood in rheumatoid arthritis.** Health Psychol.; v.13, p.213–217.
- SNOW-TUREK, A.L., NORRIS, M.P., TAN, G. (1996). **Active and passive coping strategies in chronic pain patients.** Pain; v.64, p.455-462,
- SPRUIJT BM, VAN HOOFF JA, GISPEN WH. (1992). **Ethology and neurobiology of grooming behavior.** Physiol Rev. ; v.72, p.825–52.

- SULLIVAN, M.J.L., BISHOP, S.R., PIVIK, J. (1995). **The Pain Catastrophizing Scale: development and validation.** *Psychol Assess* v.7, p.524-532.
- SULLIVAN MJL, NEISH N. (1999). **The effects of disclosure on pain during dental hygiene treatment: the moderating role of catastrophizing.** *Pain* ; v. 79, p.155–163.
- TAENZER, P., MELZACK, R., JEANS, M.E. (1986). **Influence of psychological factors on postoperative pain, mood and analgesic requirements.** *Pain* v. 24, p. 331–342.
- TAN, G., JENSEN, M.P., ROBINSON-WHELEN, S., THORNBY, J.I., MONGA, T.N. (2001). **Coping with chronic pain: a comparison of two measures.** *Pain*; v.90, p.127-133.
- TAN, G., JENSEN, M.P., ROBINSON-WHELEN, S., THORNBY, J. I., MONGA, T.N. (2002). **Measuring control appraisals in chronic pain.** *J Pain* v.3, p.385-393.
- TATSUO, M.A.; SALGADO, J.V.; YOKORO, C.M.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. (1999). **Midazolam-induced hyperalgesia in rats: modulation via GABA(A) receptors at supraspinal level.** *Eur. J. Pharmacol.*, v.1, p. 9-15.
- TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A.; RODERICK, R.E.; TATE, J.; GREEN, P.G.; LEVINE, J.O.; BASBAUM, A.I. (2000). **Opioid inhibition of formalin-induced changes in plasma extravasation and local blood flow in rats.** *Pain*, v. 84, p. 263-270.
- TERSNER, S.A.; HELMSTETTER, F.J. (2000). **Antinociception produced by mu opioid receptor activation in the amygdala is partly dependent on activation of mu opioid and neurotensin receptors in the ventral periaqueductal gray.** *Brain Res.*, v. 865, p. 17-26.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. (1992). **The formalin test: an evaluation of the method.** *Pain*, v. 51, p. 5-17.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. (1992) **Rat knee-join carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics.** *Pain*, v. 48, p. 421-427.
- TOTA-FAUCETTE, M.E., GIL, K.M., WILLIAMS, D.A., KEEFE, F.J., GOLI, V. (1993). **Predictors of response to pain management treatment.** *Clin J Pain*; v.9, p.115-123.
- TURNER, J.A., WHITNEY, C., DWORKIN, S.F., MASSOTH, D., WILSON, L. (1995). **Do changes in patient beliefs and coping strategies predict temporomandibular disorder treatment outcomes?** *Clin J Pain*; v. 1, p.177-188.
- UNRUH, A.M., RITCHIE, J., MERSKEY, H. (1999). **Does gender affect appraisal of pain and pain coping strategies?** *Clin J Pain*; v.15, p.31-40.
- VAN ERP AM, KRUK MR, WILLEKENS-BRAMER DC, FERMONT PC, NIJSEN MJ. (1995). **PVH lesions do not inhibit stressor-induced grooming in the rat.** *Physiol Behav*; v.57, p.887–92.
- VENDRUSCOLO, L.F.; PAMPLONA, F.A.; TAKAHASHI, R.N. (2004). **Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats.** *Brain Res.*, v. 1030, p. 277-283.

WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. (1991). **Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics.** Psychopharmacology, v. 104, p. 35-41.

WILLIS, W.D. (1985). **Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways.** Phil. Trans. R. Soc. Lond., v. 308, p. 253-268.

ZAMBOTTI, F.; ZONTA, N.; TAMMISO, R.; CONCI, F.; HAFNER, B.; ZECCA, L.; FERRARIO, P.; MANTEGAZZA, P. (1991). **Effects of diazepam on nociception in rats.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 344, p. 84-89.

ZAMUDIO, S., FREGOSO, T., MIRANDA, A., DE LA CRUZ, F., FLORES, G. (2005). **Strain differences of dopamine receptor levels and dopamine related behaviors in rats,** Brain Res. Bull; v.65, p.339-347.

ZAMUDIO, S.R., QUEVEDO-CORONA, L., GARCÉS, L., DE LA CRUZ, F. (2009). **The effects of acute stress and acute corticosterone administration on the immobility response in rats.** Brain Res Bull.; v.80, p.331-6.

ZAUTRA, A.J., BURLESON, M.H., SMITH, C.A., BLALOCK, S.J., WALLSTON, K.A., DEVELLIS, R.F., DEVELLIS, B.M., SMITH, T.W. (1995). **Arthritis and perceptions of quality of life: an examination of positive and negative affect in rheumatoid arthritis patients.** Health Psychol; v.14, p.399-408.