UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP-DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Expressão de Proteína Fos na Investigação do Substrato Neural da
Antinocicepção Induzida pelo Medo**

Karina Santos Gomes

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Ciências, área de
Psicobiologia*

Ribeirão Preto - SP
- 2005 -

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
De Ribeirão Preto

Gomes, K. S.

Expressão de proteína Fos na investigação do substrato
neural da antinocicepção induzida pelo medo.

Ribeirão Preto, 2005.

112 p.: il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de
concentração: Psicobiologia.

Orientador: Nunes de Souza, R. L.

1. Labirinto em cruz elevado. 2. Proteína Fos. 3.
Antinocicepção. 4. Sistema Nervoso Central 5.
Camundongos. 6. Medo

Karina Santos Gomes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP-DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**Expressão de Proteína Fos na Investigação do Substrato Neural da
Antinocicepção Induzida pelo Medo**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Ciências, área de
Psicobiologia*

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza

Ribeirão Preto - SP
- 2005 -

Dedico esse trabalho a você Daniel,
meu amor, melhor amigo, maior
incentivador e sobretudo um
exemplo para mim.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, por quem tenho uma imensa admiração, os meus sinceros agradecimentos não só pela orientação deste trabalho, mas também por ter me ensinado as premissas da Ciência, além da amizade e apoio incondicional em todos os momentos. Um exemplo de pessoa e pesquisador.

À banca examinadora, pela atenção dispensada na leitura deste trabalho.

Aos meus pais Maria e João, que acreditaram no meu potencial e que com muito esforço me deram a educação necessária para que eu chegasse até aqui.

À toda minha família, cujos nomes eu não vou citar para não correr o risco de deixar alguém de fora, pelo amor e apoio durante essa jornada.

Aos Profs. Drs. Francisco Silveira Guimarães e Marcus Lira Brandão pela leitura e valiosas sugestões na proforma deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvio Morato de Carvalho, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia, pela amizade, ensinamentos e apoio científico.

À Profa. Dra. Cleopatra da Silva Planeta pela amizade e colaboração no decorrer deste trabalho.

Aos professores José Francisco Fracasso e Maria do Carmo Longo pela amizade e boa convivência durante todos esses anos.

As técnicas do laboratório de Farmacologia da FCF/UNESP Elisabete e Rosana pela amizade e excepcional colaboração técnica, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

À Profa. Dra. Milena de Barros Viana por ter me aceito inicialmente como sua aluna, no início do mestrado.

À secretária Renata, pela amizade, risadas e pelo trabalho na secretaria da Psicobiologia.

À Inês, Sônia e Denise, pela solicitude e pelo competente trabalho junto a secretaria da CPG.

À Profa. Dra. Rosângela G. Pecinini Machado pela boa amizade e conselhos em momentos de dificuldade.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Eduardo, Tarciso, Alianda, Otávio, Fábio, Marcelo, Carol, Gabriela e Joyce pela amizade e apoio durante este período (se eu esqueci alguém, perdão, foi só formalmente!).

Aos amigos da Psicobiologia Julia, Luciana, Joseane, Cintia, Mônica, Selma, Ana Laura, Andréia, Raquel, Camila, Milene, Karina, Joaquim, Carlos Eduardo, Nelson,

Jorge e Fernando Cardenas pelas dicas, amizade, boas risadas, e receptividade sempre que eu precisei.

À Roberta e Viviane pela amizade e hospedagem em Ribeirão Preto. A Veridiana, que além amizade e hospedagem sempre me ajudou muito, desde a época em que estudávamos para a prova de ingresso na Psicobiologia.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara pela concessão de espaço físico, equipamentos e materiais necessários para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAPESP, pelas bolsas concedidas e apoio financeiro para o projeto.

A Deus, por me dar saúde e ânimo para que eu realizasse mais essa etapa de minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Considerações sobre a dor	
1.1.1. Conceito e Neurofisiologia.....	1
1.1.2. Mecanismos centrais controladores da dor.....	5
1.2 Medo/Ansiedade	
1.2.1.Conceito e teorias.....	7
1.2.2. Labirinto em cruz elevado (LCE) e antinocicepção induzida pelo medo.....	12
1.3. Substratos Neurais e Proteína Fos como marcadora funcional.....	15
2. OBJETIVOS.....	21
3. EXPERIMENTOS	
3.1. EXPERIMENTO I: AVALIAÇÃO DA ANTINOCICEPÇÃO EM DIFERENTES TESTES NOCICEPTIVOS EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO LCE.....	23
3.1.1. Materiais e métodos.....	23
3.1.2. Resultados.....	26
3.2. EXPERIMENTO II: EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FOS NA INVESTIGAÇÃO DO SUBSTRATO NEURAL DA ANALGESIA INDUZIDA PELO MEDO.....	28
3.2.1. Materiais e Métodos.....	28
3.2.2. Resultados.....	33
3.3. EXPERIMENTO III: EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FOS NA INVESTIGAÇÃO DO SUBSTRATO NEURAL DA ANALGESIA INDUZIDA PELO MEDO: INFLUÊNCIA DA MANIPULAÇÃO PRÉVIA.....	47
3.3.1. Justificativa e Materiais e Métodos.....	47
3.3.2. Resultados.....	50
4. DISCUSSÃO.....	68

5. CONCLUSÕES.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
7. RESUMO.....	90
8. ABSTRACT.....	92
9. ANEXOS.....	94

ABREVIACES

AMY: Amígdala

BA: Braços abertos

BF: Braços Fechados

blAMY: Núcleo basolateral da amígdala

BNST: Núcleo intersticial da estria terminal

CeAMY: Núcleo central da amgdla

CIC: Núcleo central do colículo inferior

CNF: Núcleo cuneiforme

DCIC: Córtex dorsal do colículo inferior

dmHYP: Hipotálamo dorsomedial

DR: Núcleo dorsal da rafe

ECIC: Córtex externo do colículo inferior

Gi: Núcleo reticular gigantocelular

IC: Colículo infeiror

LCE: Labirinto em cruz elevado

LO: Braços Leste-oeste

IPBd: Núcleo parabraquial dorsal

IPBe: Núcleo parabraquial externo

LPGi: Núcleo lateral paragigantocelular

mPB: Núcleo parabraquial medial

NmR: Núcleo mediano da rafe

NS: Braços Norte-sul

PAG: Matéria cinzenta periaquedutal

PB: Núcleo parabraquial

RMG: Núcleo Magno da Rafe

RVM: núcleos ventro-mediais do bulbo rostral

SC: Colículo superior

Sol: Núcleo do trato solitário

Localização neuroanatômica das estruturas investigadas. Modificado de Franklin e Paxinos (1997).

1. INTRODUÇÃO

1.1.Considerações sobre a dor

1.1.1. Conceito e Neurofisiologia

A palavra dor é utilizada para descrever uma variedade muito ampla de sensações e experiências emocionais associadas, desde uma injúria sofrida em decorrência de um corte ou de uma pequena queimadura, até as sensações anormais das síndromes neuropáticas (Cerveró, 2000). Em função da dificuldade de conceituação do fenômeno da dor, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (*apud* Prado, 1999) padronizou a definição, que pode ser citada como segue: “A dor é a experiência sensorial e emocional desagradável, associada com dano potencial ou de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tal dano”.

A sensibilidade à dor pode variar muito em diferentes grupos socioculturais, bem como em função do estado emocional ou das circunstâncias em que ocorre a lesão. Exemplos clássicos incluem soldados que, embora seriamente feridos durante o combate, relatam pouca ou nenhuma dor enquanto estão na batalha, ou ainda, atletas, que freqüentemente não detectam injúrias sofridas enquanto estão competindo (Prado, 1999; Basbaum & Jessel, 2000).

Em face dessas evidências, a dor não pode ser entendida como um simples fenômeno sensitivo. Dessa forma, a dor tem sido considerada como consistindo de dois principais componentes: o perceptivo-discriminativo, que permite ao indivíduo reconhecer o estímulo como doloroso e localizá-lo numa determinada região do corpo, e o aversivo-cognitivo-motivacional, que compreende uma série de respostas defensivas que vão desde a

retirada de um membro até respostas emocionais complexas como a luta e a fuga, visando a autopreservação imediata (Basbaum & Fields, 1984).

Um estímulo nocivo aplicado na pele ou em tecidos subcutâneos como articulações e músculos, pode ativar uma série de terminações nociceptivas (terminações nervosas livres), que consistem nos prolongamentos periféricos de axônios de neurônios sensoriais, cujos corpos celulares situam-se no gânglio da raiz dorsal ou gânglio trigeminal. Esses neurônios, denominados neurônios aferentes primários, são células pseudo-unipolares que, além do ramo periférico, possuem um ramo central, que adentra o corno dorsal da medula espinal pela raiz dorsal.

Os nociceptores são amplamente distribuídos na pele, mucosas, vísceras, músculos, periósteo e articulações, e respondem a estímulos nociceptivos de múltiplas modalidades, como calor, frio, estímulos mecânicos e químicos. Podem ser classificados como mecanorreceptores, ativados apenas por estímulos mecânicos intensos, nociceptores polimodais, que respondem a qualquer tipo de estímulo nocivo, nociceptores mecanotérmicos, que respondem a estímulos térmicos de variada intensidade, e receptores para o frio, que são ativados por estímulos nocivos de baixa temperatura.

As fibras dos neurônios aferentes primários essencialmente podem ser classificadas com base em seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução: fibras do tipo A δ , mielinizadas, mais grossas (2-6 μ m de diâmetro) e rápidas condutoras de sinais nociceptivos (12-30 m/s) e fibras do tipo C, amielínicas, mais finas (0,4-1,2 μ m de diâmetro) e de condução mais lenta (0,5-2,0 m/s). Enquanto a ativação do primeiro tipo de fibra está associada a sensação de dor descrita como cortante e bem localizada, a ativação de fibras do tipo C promove uma sensação de queimação e sem localização precisa (Le Bars et al,

2001). Essa diferenciação tem sido atribuída ao fato de que as fibras A δ respondem com uma maior frequência de disparos, promovendo mais informações discriminativas para o sistema nervoso central (Raja et al, 1999).

Após uma estimulação periférica de natureza e intensidade suficiente para ativarem nociceptores, a informação é transduzida em potenciais de ação que percorrem o neurônio aferente primário, o qual estabelece sinapses com neurônios do corno dorsal da medula espinal, denominados neurônios de segunda ordem. O corno dorsal da medula espinal pode ser dividido, com base em critérios citoarquitetônicos, em 6 lâminas: lâmina I ou zona marginal, lâmina II ou substância gelatinosa, lâminas III e IV (núcleo próprio) e lâminas V e VI (camada profunda). As lâminas mais superficiais (I e II), juntamente com a lâmina V constituem as regiões predominantemente implicadas na recepção, processamento e transmissão rostral da informação nociceptiva. De modo geral, as fibras C terminam principalmente nas camadas mais superficiais do corno dorsal (I e II) e as fibras A δ terminam na lâmina I e em camadas mais profundas, como a lâmina V.

As células de segunda ordem também são diferenciáveis em relação a sua natureza e resposta à entrada de informações nociceptivas (para uma revisão ver Millan, 1999). Primeiramente, os neurônios de alto limiar ou nociceptivos específicos respondem apenas a estímulos nociceptivos de alta intensidade, mediados por fibras C e A δ e são localizados principalmente nas lâminas I e II; já a maioria dos neurônios de segunda ordem da lâmina V responde tanto a estímulos nocivos, de variada intensidade, quanto a estímulos táteis ou de pressão, sendo denominados de neurônios polimodais, multirreceptivos ou de faixa dinâmica ampla.

Não menos complexa do que a anatomia do sistema aferente de informações nociceptivas é a neuroquímica envolvida na sinapse com o neurônio de segunda ordem. Nesse sentido, destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato, aspartato, uma variedade de neuropeptídeos, como a substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, colecistocinina, galanina, somatostatina, entre outros.

A informação dolorosa alcança estruturas superiores do Sistema Nervoso Central (SNC) através de várias vias ascendentes, que apesar de complexas, podem ser resumidas, de acordo com o objetivo do presente trabalho em: trato espinotalâmico, trato espinomesencefálico, trato espinoparabraquial, trato espinohipotalâmico e trato espinorreticular (para uma revisão ver Millan, 1999).

O trato espinotalâmico consiste na via ascendente nociceptiva mais proeminente na medula espinal, na qual estão compreendidos neurônios nociceptivos específicos e de faixa dinâmica ampla das lâminas I, V e VI do corno dorsal. Esses axônios projetam-se para o lado contralateral da medula espinal e ascendem pelo sistema ântero-lateral, terminando no tálamo. A estimulação elétrica do trato espinotalâmico resulta em sensação de dor, enquanto a lesão dessas fibras (processo conhecido como cordotomia ântero-lateral), resulta em uma marcante redução na sensibilidade a dor no lado oposto ao da lesão. O trato espinomesencefálico compreende axônios de neurônios originados nas lâminas I e V. As projeções percorrem o quadrante ântero-lateral da medula espinal e terminam na formação reticular mesencefálica, matéria cinzenta periaquedutal (via trato espinoanular) e camadas profundas do colículo superior (via trato espinotectal). O maior alvo do trato espinomesencefálico é o núcleo parabraquial (PB) da ponte, uma região que exerce um papel importante na integração das respostas autonômicas, cardiovasculares e

motivacionais a dor. Duas outras vias que partem do PB são denominadas espinoparabraquiohipotalâmica e espinoparabraquioamigdalóide, de acordo respectivamente com suas subseqüentes projeções originadas de duas subpopulações de neurônios do PB. O PB pode ser então, uma estrutura alvo de vários sistemas ascendentes nociceptivos.

O trato espinorreticular compreende neurônios que se originam nas lâminas VII e VIII, que ascendem no quadrante ântero-lateral da medula espinal e terminam em estações sinápticas de diversos núcleos da formação reticular da medula e ponte, hipotálamo e tálamo.

Estudos recentes de marcação retrógrada (Burstein et al, 1996) demonstraram a existência de projeções da medula espinal para o hipotálamo. O trato espinohipotálamico é composto de fibras de neurônios que ascendem contralateralmente para inervar o tálamo e hipotálamo. No entanto, projeções colaterais são também enviadas para a região do quiasma óptico, na qual decussam e descendem para inervar o hipotálamo ipsilateralmente. Há também projeções para outras regiões prosencefálicas (ex. núcleo septal, pálido e núcleo acumbente), tálamo e regiões límbicas, como amígdala, septo e estriado (Millan, 1999 e Craig & Dostrovsky, 2000).

1.1.2. Mecanismos centrais controladores da dor

A exposição de animais a situações ameaçadoras de natureza inata ou aprendida resulta em exibição de um repertório de comportamentos defensivos espécie-específicos, alterações autonômicas e em inibição da dor, sendo esse conjunto de reações de alta relevância para a sobrevivência de uma espécie (Deakin e Graeff, 1991).

Bolles e Fanselow (1980) argumentaram que comportamentos defensivos e respostas nociceptivas são atividades incompatíveis, uma vez que os cuidados dispensados à recuperação da injúria sofrida poderiam prejudicar a exibição de respostas defensivas apropriadas. Com efeito, uma série de estudos tem mostrado que o sistema antinociceptivo pode ser ativado por uma variedade de estímulos nociceptivos externos ou ambientais, exercendo importante função no controle de comportamentos defensivos e afetivos (Fanselow, 1991; Fardin et al, 1984; Terman et al, 1984; Watkins et al, 1982). Também o medo, induzido por estímulos aversivos condicionados ou incondicionados, inibe respostas comportamentais de dor. Assim, a antinocicepção pode ser considerada como parte das reações do sistema defensivo (Bolles e Fanselow, 1980; Fanselow, 1991).

Evidências de que sistemas descendentes podem modular seletivamente a dor foram primeiramente reportadas por Reynolds (1969), através da descoberta da analgesia produzida por estimulação de estruturas encefálicas, que desencadeava uma supressão específica de comportamentos eliciados por estímulos nocivos. Assim como em roedores, esse tipo de antinocicepção em humanos pode ser produzido pela estimulação elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal (PAG). Esse fato é consistente com a visão de que essas regiões, bem como suas funções são homólogas em uma variedade ampla de espécies. Descobertas subseqüentes demonstraram que a PAG é parte de um circuito do Sistema Nervoso Central que controla a transmissão nociceptiva ao nível da medula espinhal. Os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula são seletivamente inibidos pela estimulação da PAG e lesões no funículo dorsolateral bloqueiam ambas as inibições dos neurônios do corno dorsal e das respostas reflexas diante de um estímulo nocivo. A PAG integra entradas de aferências de estruturas límbicas e diencefálicas com aferências

nociceptivas ascendentes da medula espinal (Bandler & Keay, 1996). A maior fonte de projeções diencefálicas para a PAG é o hipotálamo. A amígdala, que por sua vez recebe projeções corticais e do hipocampo constitui outra fonte de aferências. Dessa forma, a injeção de opióides ou a estimulação elétrica do hipotálamo ou amígdala produz analgesia. Estruturas do tronco cerebral que enviam projeções para a PAG incluem o núcleo cuneiforme e núcleos da formação reticular, bem como o *locus coeruleus* e outros núcleos catecolaminérgicos do tronco cerebral.

A PAG é citoarquitetônica e quimicamente heterogênea e suas subdivisões diferem na sua contribuição para a antinocicepção e o controle autonômico. Enquanto a coluna ventrolateral envia projeções mais densas para o núcleo magno da rafe, a coluna dorsolateral tem conexões com núcleos do tronco cerebral ricos em noradrenalina e implicados no controle autonômico. A PAG constitui a maior fonte de projeções para os núcleos ventro-mediais do bulbo rostral (RVM), e essas conexões são críticas para a modulação da transmissão nociceptiva, uma vez que lesões do RVM abolem a antinocicepção produzida pela estimulação da PAG. Porém, a estimulação do RVM inibe as respostas dos neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula frente a um estímulo nocivo (para uma revisão, ver Basbaum e Fields, 1984; Fields e Basbaum, 1989; Millan, 2002).

1.2. Medo/Ansiedade

1.2.1. Conceitos e teorias

Do ponto de vista evolucionário, o medo e a ansiedade são emoções que apresentam claro valor adaptativo, e que se originam nas reações de defesa que os animais exibem

diante de ameaças que podem comprometer sua integridade física ou a própria sobrevivência (Deakin & Graeff, 1991). Historicamente, o estudo da neurobiologia do medo e da ansiedade teve início nos relatos de Darwin (reeditado em 1965), em sua obra, “A expressão das emoções no homem e nos animais”, a qual apontou o caminho, seguido em nosso século pela Etologia, de buscar o valor adaptativo dos processos comportamentais e psicológicos.

Mesmo com as dificuldades inerentes ao objeto de estudo das bases neurais do medo e ansiedade, nas últimas décadas, um considerável progresso no conhecimento na neurobiologia dessas emoções foi derivado do somatório de experimentos com animais de laboratório e achados clínicos (pacientes com lesão cerebral, neurocirurgias e estudos de neuroimagem). A respeito dos principais construtos teóricos elaborados, cabem destaque o sistema cerebral de defesa (SCD) e o sistema de inibição comportamental (SIC). O primeiro teve início com os trabalhos de Hess e Brügger (1943), os quais demonstraram que a estimulação elétrica do hipotálamo medial em gatos eliciou respostas defensivas de luta e fuga, acompanhadas de alterações neurovegetativas, de forma semelhante às respostas eliciadas em um confronto com um predador. Os seguidores de Hess, realizaram a exploração sistemática do sistema nervoso do gato, confirmando os achados descritos em 1943 e adicionando novas estruturas (amígdala e matéria cinzenta periaquedutal) de onde se pôde obter a reação de defesa afetiva por estimulação elétrica. Dessa forma, o hipotálamo medial, amígdala e matéria cinzenta periaquedutal foram agrupadas hierarquicamente compondo o sistema cerebral de defesa (para uma revisão, ver Deakin & Graeff, 1991, Brandão et al, 2003; Hetem & Graeff, 2003). Já o construto do sistema de inibição comportamental foi proposto inicialmente nos anos 60 pelo psicólogo britânico Jeffrey

Gray, o qual postulava que a ansiedade seria devida à ativação do SIC por determinadas classes de estímulos ambientais (sinais de punição ou frustração, estímulos ameaçadores inatos e novidade), resultando na inibição comportamental, e aumento do nível de vigilância e atenção em animais de laboratório. Revisando uma extensa literatura sobre o efeito de lesões cerebrais e administração de drogas ansiolíticas, medidas em animais de laboratório sob diversas condições experimentais, Gray concluiu que as alterações comportamentais produzidas por lesão do sistema septo-hipocampal eram as que mais se aproximavam das produzidas por substâncias ansiolíticas clássicas. Dessa forma, propôs que o sistema septo-hipocampal seria o principal substrato neural do SIC e que as drogas ansiolíticas aliviarão a ansiedade porque prejudicariam o seu funcionamento (Gray & McNaughton, 1982).

Dentre as várias fontes de perigo com as quais animais podem se confrontar, podem ser citadas confrontos com o predador ou com animais da mesma espécie em competições, estímulos ambientais tais como altura, iluminação, estímulos dolorosos e ambientes ou objetos desconhecidos. Frente a estes estímulos os animais geralmente utilizam uma de quatro estratégias defensivas comportamentais básicas: fuga, imobilidade, ataque defensivo e submissão (Adams, 1979; Marks. 1987; Blanchard & Blanchard, 1988). A decisão de escolha de uma particular estratégia leva em conta vários fatores, como as características do ambiente (rota de fuga ou não), distância do estímulo ameaçador e experiência prévia com o estímulo ou ambiente.

Partindo dessa premissa, Robert e Caroline Blanchard, estudando as respostas defensivas comportamentais de roedores (ratos e camundongos) em confronto com predadores, classificaram as estratégias comportamentais exibidas de acordo com o nível de

ameaça, se potencial ou real (se real, distal ou proximal) (Blanchard & Blanchard, 1988; Blanchard et al., 1997). No primeiro nível, as estratégias observadas foram comportamentos exploratórios cautelosos e hesitantes, usando posturas e movimentos do corpo que possibilitam a aproximação e a investigação da possível ameaça, denominados de comportamentos de avaliação de risco. No segundo, foi observada fuga ou imobilidade (estímulo distal), e, no caso em que o predador estava muito próximo ou em contato direto com o animal, fuga ou luta defensiva.

Embora o medo e a ansiedade sejam emoções correlatas, existem tentativas de se diferenciar os seus conceitos, levando-se em consideração de que se tratam de diferentes entidades nosológicas. Nesse sentido, Blanchard et al (1993) propuseram que quando o estímulo ou a situação ameaçadora é real, os comportamentos desencadeados (fuga e luta) seriam representativos de medo, enquanto os representativos de ansiedade (avaliação de risco) seriam desencadeados por estímulos ou situações apenas potencialmente ameaçadoras (Blanchard et al., 1993).

Recentemente, Gray e McNaughton (2000) publicaram a segunda edição do livro intitulado “A Neuropsicologia da ansiedade” (*The Neuropsychology of anxiety*), no qual procuraram revisar e integrar os construtos teóricos do SIC e do SCD, o que resultou em importantes mudanças conceituais, que serão brevemente apresentadas a seguir. À análise etoexperimental proposta pelo casal Robert e Caroline Blanchard, Gray & McNaughton (2000) adicionaram componentes da teoria da aprendizagem, incluindo estímulos condicionados que sinalizam punição ou perda de recompensa (frustração) como eliciadores de ansiedade. Esses autores também realçam a importância da existência do conflito esquiva-aproximação e da direção da resposta para a distinção entre medo e

ansiedade. Assim, quando a situação permite aproximação ao estímulo aversivo, caracterizando um conflito entre aproximação e evitação, os comportamentos observados (inibição comportamental e avaliação de risco) estariam relacionados à ansiedade. Por outro lado, quando a situação oferece somente as estratégias de defesa do tipo esquiva ativa e fuga, os comportamentos estariam relacionados com o medo.

Em suma, a principal função do sistema septo-hipocampal passou a ser a de detectar conflitos entre tendências de aproximação e afastamento da fonte de perigo. A primeira seria gerada no chamado “sistema cerebral de aproximação” (SCA), representado pelo sistema mesolímbico, que inclui estruturas organizadas hierarquicamente, como o núcleo acumbente, que é inervado principalmente pelo sistema dopaminérgico. A função desse sistema é incentivar a busca de fontes de satisfação de necessidades biológicas, como alimento, abrigo e sexo. Essa visão é consistente com o envolvimento do SCA em situações apetitivas como na facilitação de processos de recompensa, omissão de punição e uma série de respostas que incluem a aproximação a fontes de sinais seguros (Ikemoto & Panksepp, 1999, *apud* McNaughton & Corr, 2004). A segunda seria gerada no sistema de fuga/luta/congelamento (SFLC), representado por uma hierarquia de estruturas (representadas nos extremos do eixo rostrocaudal pelo córtex prefrontal e matéria cinzenta periaquedutal, respectivamente) que mediarão respostas de afastamento, como esquiva e fuga, de fontes de perigo inato ou aprendido. Quando uma situação induz ambas as tendências apresentadas acima pelo SCA e SFLC, configura-se o conflito do tipo aproximação-evitação, que ativaria o SIC, gerando ansiedade. É importante ressaltar que além do sistema septo-hipocampal, a amígdala também faz parte do substrato neural do SIC. Enquanto o primeiro estaria mais relacionado com o aspecto cognitivo da ansiedade

(hesitação e dúvida) a amígdala contribuiria com os aspectos afetivos e neurovegetativos da ansiedade, na qual o SIC aumentaria o alerta (Gray & McNaughton, 2000). O papel do SIC pode então ser resumido como não só o de inibir o comportamento de evitação e aproximação, mas também de aumentar o alerta e a atenção, eliciando, por exemplo, comportamentos mediados pelo septo-hipocampo como a avaliação de risco, que compreende uma exploração vigorosa e extensiva para coletar informações necessárias para o equilíbrio do balanço a favor da aproximação (se a ameaça for percebida em menor magnitude do que inicialmente) ou a evitação (se a ameaça for percebida em maior magnitude, comparada a percepção inicial).

1.2.2. Labirinto em cruz elevado (LCE) e antinocicepção induzida pelo medo

O modelo animal de ansiedade do LCE foi originalmente descrito em ratos por Pellow et al (1985) e, posteriormente, validado em camundongos (Lister, 1987). Sucintamente, o LCE é um aparelho usado para avaliar os níveis de ansiedade que roedores (exemplos, ratos e camundongos) exibem diante de uma situação aversiva, eliciada pelos braços abertos do aparelho. Os níveis de ansiedade são avaliados pela esquia aos braços abertos (% de entradas e % de tempo nos braços abertos), enquanto a atividade geral é avaliada pela frequência absoluta de entradas nos braços fechados (Pellow et al, 1985; Rodgers & Cole, 1994). O LCE tem sido amplamente usado para *screening* de drogas e como auxílio para entender os mecanismos subjacentes aos comportamentos relacionados à ansiedade (Pellow et al., 1985, Handley & Mithani, 1984; Rodgers & Cole, 1994, Lister, 1987).

Evidências sugestivas de que são os braços abertos do labirinto a principal fonte de aversão podem ser encontradas em estudos anteriores com ratos e camundongos. Neste sentido, tem sido demonstrado que o confinamento no braço aberto do LCE provoca reações defensivas caracterizadas por congelamento e imobilidade, aumento nos níveis de corticosterona plasmática e defecação (Pellow et al., 1985) e antinocicepção (Nunes-de-Souza et al., 2000), quando comparado com o confinamento nos braços fechados, sugerindo ser a exposição ao primeiro mais estressante.

Com relação à inibição da resposta nociceptiva, Lee e Rodgers (1990) foram os primeiros a demonstrar que a exposição ao LCE resulta em antinocicepção, conforme avaliado pela elevação da latência de retirada da cauda (*tail flick test*). Esse tipo de antinocicepção parece ser mediado por mecanismos não-opioides, uma vez que não é bloqueado por naltrexona e não apresenta tolerância cruzada com morfina (Lee & Rodgers, 1990). Porém, pode ser bloqueada pelo pré-tratamento com ansiolíticos com ação em receptores benzodiazepínicos (Rodgers et al., 1992) e 5-HT_{1A} (Lee e Rodgers, 1991).

A interação entre respostas de medo/ansiedade e antinocicepção tem sido estudada em nosso laboratório e os resultados têm demonstrado que o confinamento no braço aberto do LCE produz antinocicepção de alta magnitude quando comparações são feitas com o confinamento no braço fechado, conforme verificado pelo menor número de contorções abdominais induzidas pela injeção i.p. de ácido acético 0,6% (Nunes-de-Souza et al, 2000). O teste de contorções tem como principal vantagem o seu emprego durante a exposição ao LCE, isto é, possibilita que a nocicepção seja avaliada na presença (e não após, como é o caso do tail-flick test) da situação ameaçadora. Assim, Nunes-de-Souza et al (2000)

demonstraram que a antinociceção induzida pelo confinamento no braço aberto do LCE é insensível a naloxona, porém pode ser bloqueada com a administração sistêmica ou intra-amígdala dos ansiolíticos 8-OH-DPAT e midazolam, respectivamente (Nunes-de-Souza et al., 2000). Outro teste de nociceção, que também pode ser conduzido durante a exposição ao ambiente aversivo, é o da injeção de formalina nas patas (Dubuisson & Dennis, 1977). Recentes resultados obtidos em nosso laboratório têm indicado que camundongos praticamente não lambem a pata tratada com formalina [o tempo de lambida na pata é usado para aferir a resposta nociceptiva (Dubuisson & Dennis, 1977)] quando são expostos aos braços abertos do LCE (Mendes-Gomes & Nunes-de-Souza, 2002).

Embora os braços abertos do LCE sejam a principal fonte de ameaça eliciadora de antinociceção, o emprego do confinamento em cada compartimento do aparelho dificulta a avaliação concomitante dos comportamentos defensivos, tais como, a esquiva e a fuga dos braços abertos. Assim, seria também relevante avaliar o fenômeno da antinociceção induzida pela ansiedade/medo em animais expostos ao LCE inteiro (padrão), isto é, sem confinamento. Vale lembrar que o confinamento é uma situação inescapável pois não permite ao animal fugir do ambiente aversivo (braço aberto, BA) e, desta forma, pode desencadear a ativação de mecanismos de defesa diferentes daqueles envolvidos na exploração total do LCE. Corroborando esta hipótese, recentes estudos usando o labirinto em T elevado (LTE), um novo modelo animal de ansiedade, têm demonstrado que a fuga e a esquiva dos braços abertos resultam em diferentes estados emocionais (Viana et al, 1994; Zangrossi e Graeff, 1997; Graeff et al, 1998). Tendo como base essas evidências, a exposição a um labirinto com todos os braços abertos e a um labirinto com todos os braços fechados (ao invés do confinamento nos braços abertos ou fechados) permitiria um melhor

controle da situação experimental. Preocupações desta natureza resultaram em um trabalho recente, no qual os autores sugerem que o comportamento típico de ratos no LCE padrão é ocasionado sobretudo pelas características contrastantes entre os braços abertos e fechados (que levam o animal ao conflito entre a necessidade inata de explorar um ambiente e evitar suas propriedades aversivas) do que pelas características físicas aversivas dos braços abertos (Salum et al, 2003). Recentes resultados obtidos em nosso laboratório (não publicados), oriundos de experimentos com labirintos semelhantes aos usados por Salum et al (2003) [isto é, LCE padrão, LCE fechado (quatro braços fechados) e LCE aberto (quatro braços abertos)], porém para camundongos, vão ao encontro dessa hipótese. No entanto, embora a exploração nos quatro braços não tenha sido diferente nos três labirintos, a exposição ao LCE aberto eliciou analgesia de alta magnitude quando foi aplicado o teste da formalina, sugerindo que mesmo na ausência da situação de conflito, o labirinto aberto mantém sua propriedade aversiva.

1.3. Substratos Neurais e Proteína Fos como marcadora funcional

Embora haja numerosos estudos relacionando comportamentos defensivos com medo e ansiedade, as vias neurais envolvidas na interação entre essas respostas e antinocicepção são ainda pouco conhecidas. Nas últimas três décadas, houve uma grande convergência de pesquisas objetivando a investigação dos mecanismos neurais responsáveis por interromper a transmissão da informação nociceptiva. Como citado no item 1.1.2, a maioria delas destacou a participação de estruturas como a matéria cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo, os núcleos ventro-mediais do bulbo rostral (núcleo magno da rafe e núcleo paragigantocelular), núcleo parabraquial e núcleo do trato solitário). O hipotálamo, a PAG e a amígdala são também reconhecidos como importantes estruturas

do sistema cerebral aversivo, mediando reações de fuga e luta, ativação autonômica e antinocicepção (Fanselow, 1991; Graeff et al., 1993; Behbehani, 1995; Carrive et al., 1997; Lang et al, 1998; Brandão et al, 2003). A PAG recebe fibras aferentes de neurônios nociceptivos da medula espinhal e envia projeções para núcleos talâmicos que processam a dor. A subdivisão dorsal da PAG está também envolvida no processamento da ansiedade. Além disso, a PAG estabelece conexões recíprocas com a amígdala e sua lesão resulta em alterações do estado de medo e ansiedade produzidos pela estimulação elétrica ou química da amígdala. Da mesma forma, lesões na amígdala reduzem comportamentos relacionados com medo/ansiedade e antinocicepção (para uma revisão, ver Behbehani, 1995). A PAG recebe também maciça quantidade de projeções do hipotálamo, que constitui uma estação polissináptica envolvida no controle das funções de estruturas sensoriais e autonômicas (para uma revisão, ver Sawchenko et al, 1996).

Vários estudos têm demonstrado que a estimulação de certas estruturas mesencefálicas, como a matéria cinzenta periaquedutal dorsal (dPAG), camadas profundas do colículo superior e colículo inferior culminam em respostas aversivas como comportamentos de fuga, congelamento e hipervigilância (Coimbra & Brandão, 1997; Fardin et al, 1984; Prado et al, 1985; Brandão et al, 1993; Graeff, 1990; Olds et al, 1963; Macedo et al, 2002, Brandão et al, 2003), bem como antinocicepção (Coimbra et al, 1997; Fardin et al, 1984; Prado et al, 1985; Terman et al, 1984; Castilho et al, 1999; Castilho & Brandão, 2001). Atualmente, é aceito que o colículo inferior possui um papel importante no sistema cerebral aversivo (Pandossio et al, 2000; Castilho & Brandão, 2001; Lamprea et al, 2002; Brandão et al 2003). Essa hipótese pode ser corroborada pelo fato de que a prévia estimulação elétrica do colículo inferior produz sensibilização de ratos expostos

subseqüentemente ao LCE, com redução no número de entradas e permanência nos braços abertos do aparelho (Pandossio et al, 2000).

A amígdala também desempenha função crítica em vários componentes das respostas defensivas (exemplos, congelamento, antinocicepção, mudanças na frequência cardíaca e sobressalto), na qual ocorre a entrada das informações autonômicas e sensoriais induzidas por situações que eliciam medo, e a saída para a convergência desses sistemas comportamentais. Corroborando essa informação, estudos com lesões dos núcleos central, lateral e basolateral da amígdala resultaram na interrupção dessas respostas (para uma revisão, ver Rosen & Schulkin, 1998).

O núcleo intersticial da estria terminal (*Bed Nucleus of the Stria terminalis (BNST)*), é anatomica, neuroquímica, citoarquitetônica e embriologicamente relacionado com o núcleo central da amígdala (Alheid et al, 1995), porém supõe-se que essas estruturas podem ser funcionalmente dissociadas, com o BNST mediando o medo incondicionado, enquanto o núcleo central da amígdala mediará respostas de medo condicionado (Walker et al, 2003; Walker e Davis, 1997).

A identificação e validação de genes de expressão imediata como marcadores funcionais da atividade neuronal representa um dos maiores avanços na abordagem dos estudos de relação estrutura-função no sistema nervoso central. O proto-oncogene *c-fos*, tem sido amplamente validado nesse sentido e pode ser visto como o protótipo dos marcadores. O gene *c-fos* codifica para a proteína Fos, envolvida na transdução de sinal da cascata intracelular responsável por mudanças a longo prazo provocadas por eventos extracelulares, através da interação da proteína Fos com os sítios AP-1, regulando a expressão gênica (Morgan e Curran, 1991; Sheng e Greenberg, 1990). No sistema nervoso

central, a expressão basal de *c-fos* é muito baixa, mas aumenta rápida e transitoriamente em resposta a elevações nos níveis intracelulares de cálcio e AMPc ou outros segundos mensageiros (Morgan e Curran, 1991; Sheng e Greenberg, 1990).

Embora a marcação de *c-fos* não seja o único indicador da atividade neural, a expressão da proteína fornece um índice das respostas funcionais do comportamento animal. A avaliação imunocitoquímica da proteína Fos tem sido usada para mapear estruturas do sistema nervoso central em respostas funcionais de animais expostos a vários tipos de situações experimentais. Neste sentido, a expressão da proteína Fos tem sido identificada em várias estruturas límbicas de animais expostos ao LCE (Duncan et al, 1996; Hinks et al, 1996; Silveira et al, 1993). Hinks et al (1996), por exemplo, demonstrou que a exposição de ratos ao LCE resulta no aumento da expressão de proteína Fos no córtex piriforme, giro do cíngulo, hipocampo, amígdala e MCP, estruturas integrantes do sistema de defesa dos animais. Além disso, a exposição de ratos ao labirinto em T elevado produziu aumentos diferenciais na expressão de Fos em diversas estruturas do SNC, de acordo com o tipo de medo ao qual foram submetidos – se condicionado (avaliado pela aquisição de esquiva inibitória) ou incondicionado (avaliado pela fuga do braço aberto). Na situação de esquiva inibitória, um aumento na expressão de Fos foi detectado no núcleo amigdalóide medial, núcleo anterior do hipotálamo e núcleo magno da rafe, enquanto na fuga, as regiões seletivamente ativadas foram a matéria cinzenta periaquedutal dorsal e o núcleo amigdalóide basolateral (Silveira et al, 2001). Outros estudos indicaram que estruturas específicas da circuitaria de medo no prosencéfalo (núcleos central, medial e basolateral da amígdala, núcleo intersticial da estria terminal, septo lateral, núcleos paraventricular, lateral e dorsomedial do hipotálamo, córtex infra-límbico e pré-límbico e partes do córtex motor),

no mesencéfalo (PAG e núcleo dorsal da rafe) e rombencéfalo (núcleo parabraquial, *locus coeruleus* e núcleo do trato solitário) expressaram a proteína Fos depois da administração de drogas ansiogênicas (Singewald & Sharp, 2000; Singewald et al, 2003).

No que diz respeito à indução de *c-fos* por eventos nocivos, vários estudos têm demonstrado que estímulos térmicos, mecânicos, químicos e elétricos induzem a expressão deste proto-oncogene no cérebro e medula espinhal de gatos, cobaias, ratos e camundongos (Harris, 1998, Lamprea et al, 2002). Dentre as estruturas em que foram observadas a expressão de proteína Fos por estímulos nociceptivos de diversas naturezas (injeção i.p. de ácido acético, injeção intraplantar e intravesical de formalina, distensão colo-retal e estimulação dolorosa dos músculos cervicais) estão: núcleo reticular dorsal, matéria cinzenta periaquedutal, núcleo dorsal da rafe, núcleo parabraquial, colículo inferior, hipotálamo lateral e núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo do trato solitário, núcleo parabraquial, núcleos talâmicos e núcleo amigalóide central (Bellavance & Beitz, 1996; Bullit, 1989; Bullit, 1990; Hermanson & Blumqvist, 1996; Keay e Bandler, 1993; Lanteri-Minet et al, 1994; Pan et al, 1994; Pertovaara et al, 1993; Liu et al, 1998; Rodella et al, 1998; Traub et al, 1996; Snowball et al, 2000).

De modo interessante, a expressão de *c-fos* é reduzida por manipulações que provocam analgesia, como a estimulação elétrica do bulbo rostral ventromedial (Jones & Light, 1990), a ativação do sistema antinociceptivo endógeno através da eletroacupuntura (Lee & Beitz, 1992), ou a exposição a estímulos de perigo (Harris et al, Contudo, tais evidências têm sido, em geral, demonstradas apenas na medula espinhal. Desta forma, a avaliação da ativação neuronal através da expressão de proteína Fos em estruturas supramedulares pertencentes ao sistema de defesa dos animais parece ser relevante para a

compreensão dos processos neurobiológicos envolvidos na interação medo-antinocicepção. A redução na expressão de Fos também pode ser obtida após exposição ou manipulação repetidas de animais, o que resulta na “habituação” da expressão da proteína. Porém, vários trabalhos na literatura indicam que essa habituação é estímulo específica, ou seja, o decréscimo da expressão de *c-fos* frente a exposição repetida de um estímulo estressor não previne a expressão do gene na exposição a um novo estímulo estressor (Ryabinin et al, 1999; Melia et al, 1994; Watanabe et al, 1994; Asanuma et al, 1992; Asanuma & Ogawa, 1994).

Recentes resultados obtidos em nosso laboratório (Gomes, K. S.; Garcia, C. A.; Planeta, C. da S.; Nunes de Souza, R. L., *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, submetido) mostraram que apenas a situação ameaçadora (confinamento no braço aberto) foi responsável por aumentar a expressão da proteína Fos em estruturas como o núcleo mediano da rafe (MnR), hipocampo ventral (HV) e colículo inferior (IC). Todavia, quando somado a essa situação ameaçadora há também um estímulo nociceptivo, a diferença na expressão da proteína tendeu a se acentuar no MnR e IC e também na PAG.

2. OBJETIVOS

O propósito do presente estudo foi o de investigar possíveis correlações neuroanatômicas de estruturas envolvidas na modulação do medo e da antinocicepção, em camundongos expostos a diferentes tipos de LCE (padrão e aberto) e tratados ou não com um estímulo nociceptivo. A proteína Fos foi utilizada como marcador funcional de ativação neuronal nas diferentes porções da PAG (dorsal e ventro-lateral), amígdala, núcleo intersticial da estria terminal, núcleo do trato solitário, hipotálamo dorsomedial, núcleos da rafe, colículo superior e inferior e núcleo parabraquial de camundongos submetidos expostos aos diferentes LCEs e tratados ou não com o estímulo nociceptivo. Assim, os objetivos do estudo podem ser resumidos da seguinte forma:

- Avaliar o efeito da exposição aos três tipos de LCE (fechado, padrão e aberto) sobre a resposta nociceptiva nos testes das contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%, teste da formalina e teste da retirada da cauda (*Tail flick*); Com este objetivo pretendemos investigar se a exposição ao LCEp inteiro (isto é, sem o confinamento nos braços do aparelho) e ao LCEa, no qual supostamente não há uma situação de conflito, eliciam antinocicepção em camundongos submetidos a diferentes testes de nocicepção.
- Investigar o efeito da exposição aos diferentes LCEs sobre a marcação de proteína Fos no encéfalo de camundongos tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p.; Desta forma pretendemos avaliar a ocorrência de uma possível correlação neuroanatômica de estruturas envolvidas na modulação do medo e da antinocicepção.

- Avaliar o efeito da manipulação diária sobre a expressão de proteína Fos no encéfalo de camundongos expostos aos diferentes LCEs e tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p. Com esse objetivo, pretendemos avaliar se o manuseio diário dos animais de acordo com as condições experimentais seria capaz de reduzir o efeito da novidade sobre a expressão de Fos, dessa forma reduzindo também um possível efeito teto na expressão da proteína em resposta a manipulação *per se*.

3. EXPERIMENTOS

3.1. EXPERIMENTO I: AVALIAÇÃO DA ANTINOCICEPÇÃO EM DIFERENTES TESTES NOCICEPTIVOS EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO LCE.

3.1.1 MATERIAIS E MÉTODOS

SUJEITOS: Camundongos albinos, machos, pesando entre 23-33g. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), umidade ($55 \pm 5^\circ\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 07:00 h) e tiveram livre acesso ao alimento e a água, exceto durante os períodos de teste.

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

LCE padrão: o LCE padrão é similar àquele descrito por Lister (1987). O aparelho é feito de acrílico transparente e consiste de dois braços abertos ($30 \times 5 \times 0,25$ cm), unidos ortogonalmente a dois braços fechados ($30 \times 5 \times 15$ cm), elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira. O assoalho dos quatro braços do labirinto é também feito de madeira.

LCE fechado: o LCE fechado tem as mesmas dimensões do LCE padrão, exceto que todos os quatro braços apresentam paredes laterais.

LCE aberto: o LCE aberto também apresenta as mesmas dimensões do LCE padrão, exceto que todos os quatro braços são abertos.

TESTES DE NOCICEPÇÃO:

Teste das contorções abdominais

A nocicepção foi avaliada pelo teste de contorções abdominais (Bentley et al., 1983; Siegmund et al, 1957), através da injeção intraperitonal de 0,6% Ácido Acético (10 ml/kg). VanderWende e Margolin (1956) descreveram “severas contrações da musculatura

abdominal acompanhadas pelas contorções que se estendem por todo o corpo e para os membros traseiros” após a injeção de substâncias irritantes do peritônio.

No dia do teste, os camundongos foram tratados com injeção i.p. de ácido acético 0,6% e 8 minutos depois expostos aos diferentes tipos de labirinto (LCEp, LCEf e LCEa), por um período de 5 minutos.

Teste da formalina

A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva bifásica (Dubuisson & Dennis, 1977). A primeira fase (fásica) é observada nos primeiros 5 minutos, enquanto a segunda fase (tônica) inicia-se depois de 20 minutos da injeção de formalina e dura por volta de 40-50 minutos. Essas duas fases envolvem diferentes mecanismos de nocicepção. A primeira fase é ocasionada predominantemente pela ativação de fibras C, enquanto a segunda fase parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico injuriado, com mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinal. Essas mudanças funcionais, análogas ao mecanismo de potencialização a longo prazo, devem-se provavelmente, à atividade neural contínua produzida durante a primeira fase, pois sua atenuação, quando por exemplo o animal é exposto ao estresse, resulta em hipotalgesia na fase tônica (Vaccarino et al, 1992).

No presente estudo, os camundongos foram tratados com 50 µl de solução de formalina a 2,5% injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita. Em seguida, foi registrado por 5 minutos (Fase 1) o tempo de lambidas na pata tratada com formalina. Passados 20 minutos da injeção de formalina, os animais foram individualmente

colocados no LCE: padrão, fechado ou aberto por 10 minutos para o registro da Fase 2 (25-35 minutos) do teste de formalina.

Teste da retirada da cauda (*Tail-Flick Test*)

Para a medida da latência de retirada da cauda, foi utilizado um aparelho similar àquele descrito por Owen et al (1981), que consiste numa fonte de luz posicionada sob a superfície do aparelho, que emite raios de luz através de um orifício, os quais incidem na cauda. Uma fotocélula posicionada acima do orifício e em linha com a fonte de luz permitirá o registro do tempo de retirada da cauda, assim que a mesma for flexionada para fora do feixe de luz, desligando o cronômetro. Os animais foram manipulados gentilmente durante 5 minutos dois dias antes do teste (24 e 48 h antes), onde foram colocados num tubo de PVC (12 X 2,7cm). No dia do teste, os animais foram submetidos a uma medida da latência de retirada da cauda (LRC-basal) previamente a exposição aos diferentes LCEs. Após a LRC basal, os camundongos foram aleatoriamente separados em três grupos e submetidos a exposição ao LCEp, ou LCEf ou LCEa, durante 5 minutos. Em seguida, foram feitas as medidas da LRC aos 0, 5 e 10 minutos pós-exposição ao LCEp, LCEf ou LCEa.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos inicialmente ao teste de Levene para homogeneidade de variâncias. No caso de valores significativos ($p < 0,05$), os dados foram convertidos em escala logarítmica de base 10 para prosseguir a análise. Os resultados dos testes comportamentais nociceptivos foram analisados pela análise de variância (ANOVA) de um fator (tipo de labirinto). Entretanto, para os animais submetidos ao teste de retirada

da cauda, os resultados da nocicepção foram avaliados pela ANOVA de dois fatores [fator 1: tipo de labirinto; fator 2: tempo, com medidas repetidas para o fator 2 (pré-exposição e pós-exposição ao LCE)]. Nos casos de valores significativos de F , os dados foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 serão considerados significantes.

3.1.2. RESULTADOS

Os resultados apresentados nas figuras 1 – 3 referem-se aos experimentos nos quais os animais foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente, mas que não tiveram os encéfalos processados para a imunocitoquímica de Fos.

A figura 1 mostra o número de contorções abdominais apresentadas pelos animais durante os 5 minutos de exposição aos labirintos. Como revelado pelo teste ANOVA, o fator labirinto produziu diferenças no número de contorções ($F_{2,23}=7,73$, $p<0,05$). A análise *Post hoc* com o teste de Duncan mostrou que o número de contorções exibido pelos animais expostos aos LCEa e LCEp foi menor em relação ao LCEf ($p<0,05$).

Figura 1. Número de contorções abdominais exibidas por animais tratados com ácido acético 0,6% i.p., durante 5 minutos de exposição aos labirintos fechado (LCEf), padrão (LCEp) ou aberto (LCEa). Barras: Média $\pm$ EPM. * $p<0,05$ em comparação ao grupo LCEf. N=7-9.

A figura 2 ilustra a latência de retirada de cauda (LRC) antes e depois da exposição aos diferentes labirintos. O teste ANOVA para 2 fatores revelou um efeito significativo do fator tempo sobre a resposta de LCR ($F_{3,75}= 2,99$, $p<0,05$). Embora nenhum resultado significativo tenha sido encontrado para o fator tipo de labirinto e nem para a interação entre os fatores ($F_{2,25}=0,01$ e $F_{6,75}=0,73$, respectivamente), uma tendência de aumento da latência de retirada de cauda pode ser observada para o grupo LCEa no tempo zero, em relação à medida basal.

Figura 2. Latência de retirada da cauda (s) antes e após a exposição de animais aos labirintos fechado (LCEf), padrão (LCEp) e aberto (LCEa). As medidas após a exposição foram feitas no tempo 0 (T0), após 5 minutos (T5) e após 10 minutos (T10). Barras: Média $\pm$ EPM. * $p<0,05$, em comparação ao grupo LCEa basal. N=9-10

A figura 3 ilustra os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório (Mendes-Gomes & Nunes-de-Souza, 2005) com o teste da formalina em animais expostos aos 3 tipos de labirintos. O teste ANOVA unifatorial revelou efeito do tipo de labirinto sobre o tempo de lambidas ($F_{2,22}= 23,27$, $p < 0,001$). A análise *Post hoc* dos resultados

resultaram numa redução significativa do tempo de lambidas nas patas para os animais expostos ao LCEa, em relação ao LCEp e LCEf ($p < 0,05$).

Figura 3. Tempo de lambidas durante 10 minutos de exposição aos labirintos fechado (LCEf), padrão (LCEp) ou aberto (LCEa) de animais que receberam injeção de formalina nas patas. Barras: Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$, em comparação aos grupos LCEf e LCEp. N=7-9.

3.2. EXPERIMENTO II: EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FOS NA INVESTIGAÇÃO DO SUBSTRATO NEURAL DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MEDO

3.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

SUJEITOS: vide experimento I (p. 23).

LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE): ver descrição na página 23.

TESTE DE NOCICEPÇÃO:

Teste das contorções abdominais

A nocicepção foi avaliada pelo teste de contorções abdominais, como descrito para o experimento I (p. 23). No dia do teste, os camundongos foram tratados com injeção i.p. de ácido acético 0,6% e 8 minutos depois expostos aos diferentes tipos de labirinto (LCEp, LCEf e LCEa), por um período de 5 minutos. Paralelamente, três outros grupos foram expostos aos LCEs sem terem recebido nenhum tratamento prévio. Com o propósito de

investigar a marcação média basal de Fos, um outro grupo, sem qualquer exposição ao LCE ou ao tratamento intraperitoneal (sem tratamento), foi acrescentado ao protocolo experimental. Um resumo dos grupos pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos de animais para a avaliação dos comportamentos defensivos e da nocicepção (teste de contorções abdominais).

Avaliação da Marcação de Fos			
LCE padrão	LCE fechado	LCE aberto	Sem exposição
Ac. Acético 0,6% i.p.	Ac. Acético 0,6% i.p.	Ac. Acético 0,6% i.p.	-
Sem tratamento	Sem tratamento	Sem tratamento	Sem tratamento

Avaliação da ansiedade

Os comportamentos foram avaliados através da análise da gravação dos experimentos por um observador treinado. Os comportamentos analisados envolveram as medidas convencionais, tais como, frequência de entradas nos braços abertos e fechados (a entrada em um braço é definida pelo cruzamento com todas as quatro patas para dentro do braço) e duração do tempo gasto nestes compartimentos e na plataforma central. Esses dados foram usados para o cálculo da porcentagem de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (Entradas: $[\text{aberto}/\text{total}] \times 100$; Tempo: $[\text{tempo no compartimento}/300] \times 100$). Uma vez que o contraste dos braços (fechados e abertos) só ocorre para o grupo LCEp, a avaliação dos índices de ansiedade foi feita apenas para os animais expostos a esta condição. Para os grupos expostos aos LCE fechado e aberto, foi registrada a frequência total de entradas nos braços denominados norte (N), sul (S), leste (L) e oeste (O). A orientação dos braços S e N dos LCE fechado e aberto em relação à sala experimental foi semelhante àquela dos braços abertos do LCE padrão.

Imunocitoquímica de Fos

Duas horas após os testes, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental e submetidos à perfusão cardíaca com salina seguida de paraformaldeído 4%. Os encéfalos foram removidos e imersos em uma solução de paraformaldeído 4% por 24 horas, e então fixados. Em seguida, foram transferidos para uma solução crioprotetora (sacarose 30%) onde permaneceram por 24 horas. Os encéfalos foram então seccionados coronalmente em fatias de 30µm de espessura, pelo uso de um Criostato (Leica CM1850). As secções dos encéfalos foram coletadas em PBS (Tampão Fosfato-Salina).

Após a lavagem com PBS, as secções foram transferidas para uma solução contendo anticorpo primário [PBS, triton, soro normal de cabra e anticorpo *c-fos* (sc-52 policlonal, produzido em coelho, *Santa Cruz Biotechnology*)] e incubadas, sob agitação, por 24 horas à temperatura ambiente. Depois de três lavagens de 5 minutos com PBS, as secções foram novamente incubadas por 1 hora, utilizando-se o anticorpo secundário (PBS, triton, soro normal de cabra e anticorpo biotinilado anti-IgG de coelho, produzido em cabra, *Vector Laboratories*), sendo essa incubação sob agitação e à temperatura ambiente.

Novamente, as secções foram submetidas à 3 lavagens de 5 minutos com PBS e, em seguida, incubadas com solução Avidina-Biotina (solução A-B), durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois desse tempo, as secções foram lavadas com PBS para o início da revelação.

Os reagentes usados na revelação foram diaminobenzidina em PBS e H₂O₂ 30%. As secções foram mergulhadas nesta solução, e a reação ocorreu à temperatura ambiente durante 7-10 minutos. O procedimento foi então interrompido e as secções submetidas a duas lavagens com PBS.

Sob lâminas previamente gelatinizadas as secções foram distribuídas e fixadas com lamínulas. A análise quantitativa da marcação de proteína Fos foi realizada utilizando-se um sistema de captura de imagens de um microscópio óptico (Leica DMLB) e uma câmera de vídeo digital (JVC TK-C1480E), acoplados a um computador equipado com um software (Leica Qwin) que realiza a contagem das células marcadas pela maior densidade óptica, em relação ao *background*. Em cada estrutura analisada, a contagem foi realizada a partir de uma área fixa de 0,1 ou 0,2mm². As estruturas foram identificadas com o auxílio do atlas de encéfalo de camundongos de Franklin e Paxinos (1997), e em pelo menos 2 secções de cada estrutura por animal foi realizada a contagem nas regiões de interesse, sendo que os resultados foram expressos como número médio de células positivas para Fos/0,1 mm². A análise das lâminas foi realizada por um observador que desconhecia a qual grupo o respectivo animal pertencia (análise cega).

Procedimento

Entre cada exposição, o LCE foi limpo com papel absorvente embebido em solução alcoólica à 20% e em seguida, seco. Todo o experimento foi gravado através de um circuito de filmadora-vídeocassete-TV para posterior análise do comportamento e análise da resposta nociceptiva (no caso do teste de retirada da cauda, a resposta nociceptiva foi registrada antes e após a exposição ao LCE, não sendo, portanto, filmada).

Duas horas após o teste no LCE, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (150 mg/kg, i.p.) e submetidos à perfusão cardíaca com 50 ml de solução salina seguida da perfusão do mesmo volume de solução de paraformaldeído 4%,

pH 7,4, em tampão fosfato salina (PBS). Os encéfalos foram então removidos e processados para a imunocitoquímica de Fos.

Análise Estatística

Todos os resultados foram submetidos inicialmente ao teste de Levene para homogeneidade de variâncias. No caso de valores significativos ($p < 0,05$), os dados foram convertidos em escala logarítmica de base 10 para prosseguir a análise. Os resultados dos testes comportamentais (exploração nos quatro braços) dos grupos expostos aos 3 tipos de labirinto e que sofreram ou não estimulação nociceptiva foram submetidos à análise de variância de dois fatores [fator 1 (condição): tipo de LCE; fator 2 (dor): tratado ou não com ácido acético 0,6% i.p.]. Para os grupos expostos ao LCEp, adicionalmente foi aplicado o teste ANOVA de dois fatores, no qual foram considerados os dados referentes à exploração dos braços abertos, fechados e plataforma central [fator 1: (braços): BF ou BA; fator 2 (dor): tratado ou não com ácido acético 0,6% i.p.]. No caso de valores significantes de F , foi realizado posteriormente o teste de comparações planejadas. Os resultados imunocitoquímicos foram submetidos inicialmente a ANOVA unifatorial. Nos casos de valores significativos de F , uma análise *Post hoc* com o teste de Duncan foi aplicada. Para verificar um possível efeito do ambiente e do tratamento aos quais os animais foram submetidos, adicionalmente os dados foram submetidos ao teste de análise de variância bifatorial [fator 1 (condição): tipo de LCE; fator 2 (dor): tratado ou não com 0,6% ácido acético i.p.]. Nos casos de valores significantes de F , da mesma forma os resultados foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Duncan. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

3.2.2. RESULTADOS – EXPERIMENTO II

Exploração no LCE

A figura 4 ilustra o número total de entradas nos braços dos 3 tipos de labirintos e a figura 5 mostra o número e porcentagem de entradas nos braços fechados e abertos para os grupos expostos ao LCEp.

Figura 4. Número total de entradas nos braços dos LCEs fechado, padrão ou aberto de animais tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p. Barra= Média ± EPM. *p<0,05 em comparação aos grupos LCEp, LCEa e LCEf tratado com ácido acético. N=5-6

Figura 5. Número e porcentagem de entradas nos braços fechados (BF) e abertos (BA) em animais expostos ao labirinto em cruz elevado padrão (LCEp) e tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p. Barra= Média ± EPM. *p<0,05 comparado ao grupo BF correspondente. N= 5-6. **Legenda:** AA: ácido acético 0,6% i.p.; ST: sem tratamento i.p.

A aplicação do teste ANOVA bifatorial [fator 1 (condição): tipo de LCE; fator 2 (dor): tratado ou não com ácido acético] para o total de entradas nos braços dos LCEs revelou diferenças para os dois fatores analisados, bem como uma interação entre eles ($F_{2,29}= 6,85$; $F_{1,29}= 11,57$ e $F_{2,29}= 3,47$, $p<0,05$ respectivamente). A análise *Post hoc* com o teste de comparações planejadas revelou que o grupo exposto ao LCEf apresentou um maior número de entradas do que os outros grupos que não sofreram estimulação algica ($p<0,05$) e também em comparação ao grupos correspondente tratado com ácido acético (LCEf AA, $p<0,05$).

A ANOVA bifatorial aplicada para os grupos expostos ao LCEp revelou efeitos do fator braços (BF ou BA) para as entradas e porcentagem de entradas ($F_{1,20}= 17,99$, $p<0,05$ e $F_{1,20}= 48,61$, $p<0,05$, respectivamente). As possíveis análises posteriores confirmaram um incremento no número e porcentagem de entradas nos braços BF *versus* os braços BA para os grupos sem tratamento i.p. (ST) ou tratados com ácido acético (AA) (ver tabela 2).

Tabela 2. Análise estatística referente as entradas e porcentagem de entradas nos braços fechados e abertos do LCEp nos grupos que receberam ou não ácido acético 0,6% i.p.

Entradas				
Fatores	F	P	Comparações Planejadas	
Braços	$F_{1,20}= 17,99$	$p<0,05$	BFST x BAST	$F_{1,20}= 9,60$, $p<0,05$
			BFAAx BAAA	$F_{1,20}= 8,36$, $p<0,05$
Dor	$F_{1,20}= 1,04$	$p>0,05$		
Interação	$F_{1,20}= 0,02$	$p>0,05$		
% Entradas				
Braços	$F_{1,20}= 48,61$	$p<0,05$	BFST x BAST	$F_{1,20}=12,57$, $p<0,05$
			BFAA x BAAA	$F_{1,20}= 39,87$, $p<0,05$
Dor	$F_{1,20}= 0,95$	$p>0,05$		
Interação	$F_{1,20}= 3,83$	$p>0,05$		

figura 6 ilustra o tempo de permanência e a porcentagem de tempo em cada braço do LCEp ou na plataforma central dos grupos que receberam ou não estimulação álgica com ácido acético.

Figura 6. Tempo de permanência nos braços fechados, abertos ou plataforma central de animais expostos ao LCEp e tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p. Barra= Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em comparação ao tempo no BF correspondente. N=5-6. **Legenda:** AA: ácido acético 0,6% i.p.; ST: sem tratamento i.p.

Na figura 6 estão representados o tempo e porcentagens de tempo gasto nos braços e plataforma central nos 3 tipos de labirinto utilizados. A análise dos dados através da ANOVA bifatorial mostrou diferenças para o fator local (BF, BA ou PC) tanto para a medida tempo, quanto para as porcentagens ($F_{2,30}=33,16$ e $F_{2,30}= 32,53$, $p < 0,05$). As possíveis comparações posteriores revelaram que houve um aumento nos tempos e porcentagens de tempo de permanência nos braços fechados do LCEp, tanto para o grupo tratado como para o grupo que não recebeu tratamento i.p., conforme pode ser verificado na tabela 3.

Tabela 3. Análise estatística referente tempo e porcentagem de tempo nos braços fechados e abertos do LCEp nos grupos que receberam ou não ácido acético 0,6% i.p.

Tempo				
Fatores	F	P	Comparações Planejadas	
Braços	F _{2,30} = 33,16	p<0,05	BFST x BAST	F _{1,30} = 27,99, p<0,05
			BFST x PCST	F _{1,30} =12,85, p<0,05
			BAST x PCST	F _{1,30} = 2,90, p>0,05
			BFAA x BAAA	F _{1,30} = 35,69, p<0,05
			BFAA x PCAA	F _{1,30} = 16,97, p<0,05
			BAAA x PCAA	F _{1,30} = 3,43, p>0,05
Dor	F _{1,30} = 0,001	p>0,05		
Interação	F _{2,20} = 0,12	p>0,05		
% Tempo				
Braços	F _{2,30} = 32,53	P<0,05	BFST x BAST	F _{1,30} = 27,37, p<0,05
			BFST x PCST	F _{1,30} =13,11, p<0,05
			BAST x PCST	F _{1,30} = 2,59, p>0,05
			BFAA x BAAA	F _{1,30} = 34,90, p<0,05
			BFAA x PCAA	F _{1,30} = 16,95, p<0,05
			BAAA x PCAA	F _{1,30} = 3,36, p>0,05
Dor	F _{1,30} = 3,17.10 ⁻³¹	p>0,05		
Interação	F _{2,30} = 0,11	p>0,05		

A figura 7 ilustra os resultados nociceptivos registrados durante os 5 minutos de exposição aos três LCEs. A análise estatística (ANOVA bifatorial) revelou significância para o fator LCE ($F_{2,14} = 12,55, p < 0,05$). A análise posterior com o teste de Duncan confirmou que o grupo LCEa apresentou menos contorções que os grupos LCEf e LCEp ($p < 0,05$). Porém, quando foram comparados os grupos LCEp e LCEf, nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Figura 7. Número de contorções abdominais exibidas por animais tratados com ácido acético 0,6% i.p., durante 5 minutos de exposição aos labirintos fechado (LCEf), padrão (LCEp) ou aberto (LCEa). Barra= Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo LCEf e LCEp. N=5-6.

Imunocitoquímica de Fos

As figuras e tabelas seguintes contêm os dados referentes à marcação média de Fos/mm² de tecido para as estruturas propostas.

Os dados quantitativos da marcação da proteína fos no encéfalo foram submetidos inicialmente a ANOVA de um fator e também à análise de variância bifatorial [fator 1(condição): tipo de LCE; fator 2 (dor): tratado ou não com ácido acético 0,6% i.p.].

A análise estatística com ANOVA unifatorial acusou significância nas estruturas Núcleo Mediano da Rafe (MnR) [(Bregma: -4,16 a -4,36); $F_{6,34} = 3,43$, $p < 0,05$], Hipotálamo (HYP) ($F_{6,32} = 2,92$, $p < 0,05$) e coluna ventrolateral da Matéria Cinzenta Periaquedutal (vlPAG) [(Bregma: -4,48 a -4,60); $F_{6,34} = 3,96$, $p < 0,05$]. A análise *Post hoc* com o teste de Duncan mostrou um aumento da marcação de Fos no MnR para os grupos LCEf e LCEa em relação ao grupo basal ($p < 0,05$), bem como um decréscimo da marcação no grupo LCEf tratado com ácido em comparação ao mesmo grupo sem tratamento i.p.

($p < 0,05$). Nessa mesma estrutura, uma tendência de diminuição da marcação de Fos para o grupo LCEa que recebeu ácido em relação ao grupo correspondente que não recebeu a estimulação algica também foi observada ($p = 0,06$). Para o HYP e vLPAG, o teste de Duncan mostrou aumentos na marcação de Fos em todos os grupos em relação ao grupo basal ($p < 0,05$).

Os resultados da ANOVA bifatorial indicaram significância para o fator dor para as seguintes estruturas: Núcleo Gigantocelular (Gi) [(Bregma: -6,48 a -6,72); $F_{2,29} = 4,06$, $p = 0,05$], MnR [(Bregma: -4,16 a -4,36); $F_{2,29} = 11,27$, $p < 0,05$], MnR [(Bregma: -4,48 a -4,60); $F_{2,30} = 5,42$, $p < 0,05$] e Colículo superior (SC) [(Bregma: -3,88 a -4,04); $F_{2,29} = 4,32$, $p < 0,05$]. Para a estrutura Núcleo Parabraquial (PB) foi apontada significância para a interação entre os fatores ($F_{2,27} = 3,76$, $p < 0,05$). As possíveis análises posteriores mostraram que para a estrutura PB houve uma redução na marcação da proteína Fos para o grupo LCEf tratado com ácido acético, em comparação ao grupo correspondente sem tratamento i.p. ($p < 0,05$). É importante ressaltar que os valores obtidos na análise do PB apresentaram alta variabilidade, detectada através do teste de homogeneidade de Levene ($p < 0,05$). Os dados foram então convertidos em escala logarítmica para o prosseguimento da análise. Para as outras estruturas nas quais foram encontrados valores significativos, os resultados da análise estatística permitem inferir que a dor interferiu com a expressão de Fos independentemente de qual labirinto os animais foram expostos. Porém, é possível notar no Núcleo Mediano da Rafe (Bregma: -4,16 a -4,36) uma tendência de queda da marcação de Fos para os grupos LCEf e LCEa tratados com ácido acético em relação aos grupos correspondentes sem tratamento i.p. De forma geral, essa mesma tendência pode ser observada em várias estruturas, independentemente do tipo de LCE.

Cabe ressaltar que apesar de terem sido detectadas diferenças somente no núcleo parabraquial, outras estruturas destacaram-se por estarem próximas de alcançar valores de $p=0,05$ para o fator dor, como foram os casos do Núcleo Cuneiforme (CNF), Colículo Superior (SC) (Bregma: -4,48 a -4,60), Amígdala (AMY) ($p=0,07$, para todos), HYP, coluna dorsolateral da Matéria Cinzenta Periaquedutal (dlPAG) (Bregma: -4,48 a -4,60) e coluna lateral da Matéria Cinzenta Periaquedutal (lPAG) [(Bregma: -3,88 a -4,04); $p=0,08$, para todos). As figuras 8, 9 e 10 constituem algumas representações gráficas das marcações médias de Fos, e as figuras 11 e 12 contém fotomicrografias de secções submetidas a imunocitoquímica de Fos de algumas estruturas analisadas. Como pode ser observado, para a maioria das estruturas representadas nas tabelas (Tabela 4 e 5) e/ou nas figuras, a marcação de Fos aumenta em relação ao grupo controle, porém há uma tendência de diminuição da marcação quando há aplicação do estímulo nociceptivo, em relação ao grupo correspondente

Figura 8. Marcação média de Fos/0,1mm² em animais que receberam (A) ou não (S) tratamento i.p. com ácido acético 0,6% e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles (Basal) não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs. **Legenda:** AMY: Amígdala; HYP: Hipotálamo. * $p<0,05$ em comparação ao grupo basal. N=5-6

Figura 9. Marcação média de Fos/0,1mm² em animais que receberam (A) ou não (S) tratamento i.p. com ácido acético 0,6% e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles (Basal) não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs. **Legenda:** Gi: Núcleo Gigantocelular; PB: Núcleo Parabraquial; DR: Núcleo dorsal da rafe; MnR: Núcleo Mediano da Rafe; Barra= Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo LCEf; ** $p < 0,05$ em comparação ao grupo Basal. N=4-6

Figura 10. Marcação média de Fos/0,1mm² na Matéria Cinzenta Periaquedutal (PAG) em animais que receberam (A) ou não (S) tratamento i.p. com ácido acético 0,6% e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles (Basal) não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs. **Legenda:** dm: coluna dorsomedial; dl:coluna dorsolateral; l:coluna lateral; vl:coluna ventrolateral. Barra= Média ± EPM *p<0,05 em comparação ao grupo basal. N=6

Figura 11. Fotomicrografias de cortes coronais encefálicos submetidos a imunocitoquímica de Fos de camundongos que não receberam nenhum tratamento ou exposição ao LCE (Basal), ou que foram expostos por 5 minutos aos diferentes LCEs.

Legenda: dmHYP: Hipotálamo dorsomedial; MnR: Núcleo Mediano da Rafe; LCEf: Labirinto em cruz elevado fechado; LCEp: Labirinto em cruz elevado padrão; LCEa: Labirinto em cruz elevado aberto; AA: ácido acético 0,6% i.p.

Figura 12. Fotomicrografias de cortes coronais encefálicos submetidos a imunocitoquímica de Fos de camundongos que não receberam nenhum tratamento ou exposição ao LCE (Basal), ou que foram expostos por 5 minutos aos diferentes LCEs.

Legenda: PAG: Matéria cinzenta Periaquedutal; l: coluna lateral; dl: coluna dorsolateral; vl: coluna ventrolateral; Aq: Aqueduto; PB: Núcleo Parabraquial; LCEf: Labirinto em cruz elevado fechado; LCEp: Labirinto em cruz elevado padrão; LCEa: Labirinto em cruz elevado aberto; AA: ácido acético

Tabela 4. Análise quantitativa da marcação média de proteína Fos/ $0,1\text{mm}^2$, em animais que receberam ou não tratamento i.p. com ácido acético 0,6% (AA e ST, respectivamente) e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs.

Estrutura	Número de células positivas para Fos/ $0,1\text{mm}^2$ (média±EPM)						
	Basal	LCEf ST	LCEf AA	LCEp ST	LCEp AA	LCEa ST	LCEa AA
Sol	10,27±0,97	23,89±6,96	9,00±1,75	15,12±4,09	11,04±4,30	21,41±5,03	10,27±1,06
Gi (-6,48 a -6,72)	2,55±0,54	9,33±1,73	5,44±1,27	5,32±1,20	6,21±2,20	3,22±0,54	4,25±1,46
RMg	8,92±1,55	12,29±3,37	8,63±1,01	9,70±1,65	12,30±3,80	14,54±5,34	11,33±2,59
PB	8,66±1,9	20,5±3,4	5,9±0,92	15,6±3,8	15,4±4,2	12,3±2,1	17,5±4,3
CNF	5,98±2,0	7,69±1,65	5,27±1,55	12,39±4,17	6,90±1,80	8,12±1,57	5,65±1,37
IC	54,9±17,0	46,63±18,2	25,87±7,0	41,9±15,6	56,62±22,4	44,35±4,08	35,35±7,06
DR	11,29±5,27	23,35±7,51	21,38±4,58	31,96±8,39	23,08±3,35	29,21±9,05	21,67±4,48
MnR (-4,16 a -4,36)	20,75±5,50	45,15±7,2	14,58±2,5	29,17±8,6	26,3±6,64	45,17±6,16	26,75±5,12
SC (-3,88 a -4,04)	28,69±5,51	53,48±7,04	37,39±7,32	45,37±11,2	35,94±7,12	60,05±16,7	36,29±7,62
AMY	12,86±6,0	31,52±7,80	16,79±3,51	25,21±4,46	15,81±4,31	25,95±5,44	23,06±7,86
dmHYP	28,60±5,94	54,08±8,0	42,97±3,45	54,65±1,62	55,22±8,61	62,83±11,6	45,08±4,06
BNST	9,23±3,79	13,83±3,35	16,94±3,62	19,52±7,0	15,81±4,84	27,31±7,19	14,81±3,05

Legendas: Sol: Núcleo do Trato Solitário; Gi: Núcleo Gigantocelular; RMg: Núcleo Magno da Rafe; PB: Núcleo Parabraquial; CNF: Núcleo Cuneiforme; IC: Colículo Inferior; DR: Núcleo Dorsal da Rafe; MnR: Núcleo Mediano da Rafe; SC: Colículo Superior; AMY: Amígdala; HYP: Hipotálamo; BNST: Núcleo Intersticial da Estria Terminal

Tabela 5. Análise quantitativa da marcação média de proteína Fos/ $0,1\text{mm}^2$, na matéria cinzenta periaquedutal (PAG) de animais que receberam ou não tratamento i.p. com ácido acético 0,6% (AA e ST, respectivamente) e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs.

Colunas	Número de células positivas para Fos/ $0,1\text{mm}^2$ (média±EPM) na PAG						
	Controle	LCEf ST	LCEf AA	LCEp ST	LCEp AA	LCEa ST	LCEa AA
PAG Bregma: -3,88 a -4,04 mm							
DM	29,08±6,15	38,25±10,0	35,42±6,5	28,67±5,57	23,58±5,55	34,50±8,71	31,92±5,52
DL	22,17±4,73	42,75±5,72	28,63±5,84	32,75±4,95	23,96±3,11	33,33±10,7	30,46±6,98
L	30,42±5,13	47,33±6,4	37,96±5,11	45,71±4,74	38,54±4,39	50,42±7,22	38,21±5,03
PAG Bregma: -4,16 a -4,36 mm							
DM	28,17±6,89	32,83±8,42	31,67±5,97	23,08±5,36	23,83±4,44	32,33±7,65	29,17±6,04
DL	23,04±6,67	23,04±6,67	23,04±6,67	32,29±5,55	27,38±4,91	34,21±9,79	27,17±5,58
L	27,33±5,89	43,38±3,97	35,04±4,10	43,63±4,55	41,92±8,99	50,29±6,69	45,13±3,8
PAG Bregma: -4,48 a -4,60 mm							
DM	21,17±5,32	26,67±7,79	25,50±5,60	21,42±6,30	21,33±4,53	27,42±7,54	23,08±6,17
DL	18,04±5,78	31,71±5,16	17,88±2,42	27,71±5,78	26,71±6,71	35,21±7,43	25,54±5,05
L	26,17±6,11	44,50±6,70	39,92±3,73	41,83±5,32	40,50±6,18	44,88±6,95	45,0±6,60
VL	10,70±2,25	38,96±8,52	29,17±2,77	37,96±9,12	27,38±5,20	37,88±9,17	28,50±5,76

Continuação Tabela 5.

PAG Bregma: -4,72 a -4,96 mm							
DM	13,5±4,5	14,8±5,7	16,7±4,6	16,8±7,3	18,4±5,6	19,7±4,9	20,1±3,8
DL	16,25±6,17	31,95±11,7	19,06±4,26	21,90±6,33	27,85±6,95	25,95±6,15	29,83±5,43
L	21,75±6,79	39,79±8,25	38,55±5,19	35,71±7,43	41,85±8,10	37,80±7,78	48,50±5,10
VL	15,88±5,77	28,71±6,57	24,0±3,28	26,96±5,46	24,45±6,35	28,45±6,84	25,25±2,84

Legenda: DM: Coluna Dorso-medial; DL: Coluna Dorso-lateral; L: Coluna Lateral; VL: Coluna Ventro-lateral.

Outra observação importante é o fato de os animais controles e expostos ao LCEf comumente apresentarem níveis elevados da expressão da proteína, o que, aliado ao fato de que nem todos os grupos tiveram um $n=6$ (devido a perdas durante a retirada dos encéfalos ou nas técnicas de histologia e imunocitoquímica), pode ter tornado a análise estatística mais rigorosa.

3.3.EXPERIMENTO III: EXPRESSÃO DE PROTEÍNA FOS NA INVESTIGAÇÃO DO SUBSTRATO NEURAL DA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO MEDO: INFLUÊNCIA DA MANIPULAÇÃO PRÉVIA

3.3.1 Justificativa e Materiais e Métodos

O possível efeito teto observado nos resultados do experimento II nos motivou a modificar o protocolo experimental com o objetivo de minimizar a novidade da manipulação e do ambiente no dia do teste. Vários trabalhos na literatura indicam que a exposição ou manipulação repetidas de animais resulta na “habituação” da expressão de *c-fos*. Porém, é importante ressaltar que essa habituação é estímulo específica, ou seja, o decréscimo da expressão de *c-fos* frente a exposição repetida de um estímulo estressor não previne a expressão do gene na exposição a um novo estímulo estressor (Ryabinin et al, 1999; Melia et al, 1994; Watanabe et al, 1994; Asanuma et al, 1992; Asanuma & Ogawa, 1994). As evidências indicam ainda, que a combinação de uma exposição crônica a um estímulo estressor com uma exposição aguda a um novo estímulo não resulta na sensibilização da expressão de *c-fos* ao novo estímulo (Watanabe et al, 1994 e Melia et al, 1994). Enquanto a maioria dos trabalhos já realizados com a investigação da expressão de *c-fos* no encéfalo de ratos após a exposição ao LCE tenha utilizado um protocolo de manipulação dos animais por 3 a 4 dias (Silveira et al, 1993 e 1994), ou simplesmente nenhum protocolo de manipulação (Hinks et al, 1996; Salomé et al, 2004 e Duncan et al,

1996), outros trabalhos que utilizaram estímulos estressores diferentes (ex. imobilização forçada) incluíram um protocolo de manipulação e exposição de até 14 dias. Os resultados obtidos nesses trabalhos, de forma geral, indicam que após 4 dias de manipulação e exposição, já é possível observar diminuição da expressão de *c-fos* em várias regiões, em comparação com animais que receberam o estímulo estressor agudamente (Melia et al, 1994). Porém, após 9 dias ou mais de manipulação e exposição, foi observada diminuição da expressão de *c-fos* nas mesmas regiões comparável à expressão em encéfalos de animais controle, que não receberam nenhuma manipulação (Ryabinin et al, 1999 e Melia et al, 1994).

Com base nessas informações, a modificação no protocolo experimental foi realizada, conforme descrito a seguir. Os animais permaneceram agrupados em um total de 12 sujeitos por 3 dias nas gaiolas-viveiro sem qualquer manipulação, após a sua chegada em nosso biotério. Após esse período, os camundongos passaram por um processo de manipulação diária durante 10 dias, que incluiu a pesagem dos animais, a marcação da cauda com caneta hidrográfica, imobilização com uma flanela, mimetizando uma preparação para aplicação de injeção i.p., a permanência desses animais numa gaiola-viveiro menor por 5 minutos e finalmente a exposição ao LCEf por 5 minutos. Ao final desse processo, os animais foram agrupados numa nova gaiola-viveiro, onde permaneceram até o dia seguinte, no qual um novo ciclo de manipulação foi iniciado. A manipulação dos animais foi cuidadosa no sentido de minimizar ao máximo a contenção pela cauda (o transporte era feito na mão do experimentador, protegida por luva e flanela), e também minimizar o barulho do ambiente. Além disso, a sala experimental permaneceu com a mesma disposição durante todos os dias (nenhum equipamento além da câmera e do

labirinto permaneceu dentro da sala), para todos os ciclos de experimento realizado. Após esses 10 dias, ou seja, no dia do teste, os animais sofreram um processo de manipulação semelhante, porém metade do grupo recebeu injeção de ácido acético 0,6% i.p., e também foi exposto ao LCEp ou LCEa, além do LCEf, conforme ilustrado na tabela abaixo:

Tabela 6. Distribuição dos grupos de animais para a avaliação dos comportamentos defensivos e da nocicepção (teste de contorções abdominais).

Avaliação da Marcação de Fos			
LCE padrão	LCE fechado	LCE aberto	Sem exposição
Ac. Acético 0,6% i.p.	Ac. Acético 0,6% i.p.	Ac. Acético 0,6% i.p.	Ácido acético
Sem tratamento	Sem tratamento	Sem tratamento	Sem tratamento

Paralelamente, outros dois grupos foram incluídos no protocolo experimental, a saber: um grupo sem qualquer manipulação e outro que recebeu somente a estimulação nociceptiva. Este último grupo foi incluído como um controle para os grupos expostos ao LCE e tratados com ácido acético 0,6% i.p.

Da mesma forma como descrito em materiais e métodos para os experimentos I e II, o teste foi gravado através de um circuito de câmera-TV-vídeo, e com o objetivo de investigar se a exposição diária ao LCEf levou a uma habituação da atividade locomotora dos animais, a filmagem do experimento foi realizada também no 1º, 5º e 10º dia de exposição ao aparelho. Passadas 2 horas da exposição aos LCEs, os camundongos tiveram seus encéfalos removidos e processados para a imunocitoquímica de Fos, conforme já descrito para o Experimento II. A análise do comportamento no LCE, bem como a análise estatística foram realizadas de modo similar ao descrito no experimento II. Adicionalmente, os dados referentes ao total de entradas nos braços do LCEf no 1º, 5º e 10º dias foram submetidos ao teste *t* de Student para amostras dependentes.

3.3.2. RESULTADOS – EXPERIMENTO III

Exploração no LCE

Os resultados da análise dos totais de entradas, nos braços do LCEf no primeiro, quinto e décimo dia indicam que houve um decréscimo da locomoção do 5º e 10º dia, em relação ao 1º [$t(101)=5,72$ e $t(98)=3,17$, $p<0,05$]. Porém não houve diferenças entre o 5º e 10º dia.

Já para a exploração dos três tipos de LCE no dia do teste, foi observado que para o total de entradas (figura 13), a análise de variância bifatorial detectou diferenças para o fator dor ($F_{1,48}=26,60$, $p<0,05$) e para a interação entre os fatores tipo de labirinto e dor ($F_{2,48}= 14,23$, $p<0,05$). A aplicação do teste F mostrou diferenças entre os grupos que não sofreram estimulação nociceptiva, sendo que o grupo LCEa apresentou um número menor de entradas nos braços do LCE em comparação aos grupos LCEf ($F_{1,48}= 20,53$, $p<0,05$) e LCEp ($F_{1,48}= 10,44$, $p<0,05$). Já entre os grupos que receberam injeção i.p. de ácido acético, um menor número de entradas foi registrado para o grupo LCEf em relação aos grupos LCEp ($F_{1,48}= 4,8$, $p<0,05$) e LCEa ($F_{1,48}= 8,76$, $p<0,05$). A comparação entre os grupos tratados com ácido *versus* os grupos correspondentes sem tratamento i.p. mostrou-se diferente para os animais expostos ao LCEf ($F_{1,48}= 42,2$, $p<0,05$) e LCEp ($F_{1,48}= 4,5$, $p<0,05$).

Figura 13. Número total de entradas nos braços dos LCEs fechado, padrão ou aberto de animais tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p. Barra= Média ± EPM. * $p < 0,05$ em comparação aos grupos LCEp, LCEa; ** $p < 0,05$ em comparação com os grupos LCEp e LCEa tratados com ácido acético; # $p < 0,05$ em comparação aos grupos correspondentes sem tratamento i.p. N=9

A figura 14 ilustra as entradas e porcentagens de entradas nos braços fechados e abertos dos animais expostos ao LCEp e tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p.

Figura 14. Número e porcentagem de entradas nos braços fechados e abertos em animais expostos ao LCEp e tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p. Barra= Média ± EPM. * $p < 0,05$ comparado ao grupo BF correspondente; # $p < 0,05$ comparado ao grupo correspondente sem tratamento i.p. N= 9

A aplicação da ANOVA bifatorial para as entradas no LCEp mostrou diferenças para o fator braços ($F_{1,32} = 34,49$, $p < 0,05$) e para o fator dor ($F_{1,32} = 0,46$, $p < 0,05$). O teste F

confirmou um aumento das entradas nos braços fechados *versus* braços abertos tanto para o grupo sem tratamento quanto para o grupo tratado com ácido acético ($F_{1,32} = 24,48$ e $F_{1,32} = 13,46$, $p < 0,05$ respectivamente). A comparação entre as entradas nos braços fechados do LCEp para os grupos tratados ou não com ácido também mostrou-se diferente (BF sem tratamento *versus* BF ácido acético: $F_{1,32} = 9,95$, $p < 0,05$). Um resultado semelhante foi obtido quando compararam-se as entradas nos braços abertos dos dois grupos (BA sem tratamento *versus* BA ácido acético: $F_{1,32} = 4,79$, $p < 0,05$).

Em relação ao tempo e % de tempo gastos nos compartimentos do LCEp (Figura 15), o teste ANOVA bifatorial acusou significância para o fator local (BF, BA ou PC) e também uma interação entre os fatores local e dor (Tempo: $F_{2,48} = 48,12$ e $F_{2,48} = 5,32$ $p < 0,05$; % de Tempo: $F_{2,48} = 48,30$ e $F_{2,48} = 5,40$, $p < 0,05$, respectivamente). As análises possíveis com o teste F de comparações planejadas podem ser visualizadas na tabela 7. De forma geral, os animais passaram mais tempo nos braços fechados do aparelho, independentemente de terem recebido ou não a injeção i.p. de ácido acético. Além disso, os animais que sofreram estimulação algica passaram mais tempo no BF e menos tempo na PC em comparação aqueles que não sofreram nenhum tipo de tratamento i.p.

Tabela 7. Análise estatística referente tempo e porcentagem de tempo nos braços fechados e abertos do LCEp nos grupos que receberam ou não ácido acético 0,6% i.p.

Tempo			
Fatores	F	P	Comparações Planejadas
Braços	$F_{2,48} = 48,12$	$p < 0,05$	BF ST x BA ST $F_{1,48} = 29,44$, $p < 0,05$
			BFAA x BA AA $F_{1,48} = 71,12$, $p < 0,05$
			BF STx PC ST $F_{1,48} = 2,16$, $p > 0,05$
			BA ST x PC ST $F_{1,48} = 15,64$, $p < 0,05$

			BF AA x PC AA	$F_{1,48}=36,08, p<0,05$
			BA AA x PC AA	$F_{1,48}=5,88, p<0,05$
Dor	$F_{1,48}=0,002$	$p>0,05$		
Interação	$F_{2,48}=5,32$	$p<0,05$	BF ST x BF AA	$F_{1,48}=6,16, p<0,05$
			BA ST x BA AA	$F_{1,48}=0,27, p>0,05$
			PC ST x PC AA	$F_{1,48}=4,20, p<0,05$
% Tempo				
Braços	$F_{2,48}=48,30$	$p<0,05$	BF ST x BA ST	$F_{1,48}=29,33, p<0,05$
			BFAA x BA AA	$F_{1,48}=71,73, p<0,05$
			BF ST x PC ST	$F_{1,48}=2,15, p>0,05$
			BA ST x PC ST	$F_{1,48}=15,58, p<0,05$
			BF AA x PC AA	$F_{1,48}=36,36, p<0,05$
			BA AA x PC AA	$F_{1,48}=5,95, p<0,05$
Dor	$F_{1,48}=0$	$p>0,05$		
Interação	$F_{2,48}=5,40$	$p<0,05$	BF ST x BF AA	$F_{1,48}=6,44, p<0,05$
			BA ST x BA AA	$F_{1,48}=0,26, p>0,05$
			PC ST x PC AA	$F_{1,48}=4,09, p<0,05$

Figura 15. Tempo de permanência nos braços fechados, abertos ou plataforma central de animais expostos ao LCEP e tratados ou não com ácido acético 0,6% i.p. Barra= Média $\pm$ EPM. * $p<0,05$ em comparação ao tempo e % de tempo no BF correspondente; § $p<0,05$ em comparação ao tempo e % de tempo na PC correspondente; # $p<0,05$ em comparação ao tempo e % de tempo no BF correspondente sem tratamento i.p. N=9.

A figura 16 ilustra os resultados da resposta nociceptiva registrados no dia do teste, durante os 5 minutos de exposição aos 3 LCEs. A análise estatística (ANOVA unifatorial) revelou significância para o fator LCE ($F_{2,25}=5,68$, $p<0,05$). A análise posterior com o teste de Duncan confirmou que os grupos LCEa e LCEp apresentaram menos contorções que o grupo LCEf ($p<0,05$). Porém, quando foram comparados os grupos LCEp e LCEa, nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Figura 16. Número de contorções abdominais exibidas por animais tratados com ácido acético 0,6% i.p., durante 5 minutos de exposição aos labirintos fechado (LCEf), padrão (LCEp) ou aberto (LCEa). * $p<0,05$ em comparação ao grupo LCEf. N=9.

Imunocitoquímica de Fos

As figuras (17, 18 e 19) e tabelas (8 e 9) seguintes contêm os dados referentes à marcação média de Fos/ $0,1\text{mm}^2$ de tecido para as estruturas propostas. As figuras 20, 21 e 22 contêm fotomicrografias de secções submetidas a imunocitoquímica de Fos de algumas estruturas analisadas. Para o núcleo parabraquial, amígdala e colículo inferior, além da análise da expressão de Fos na estrutura considerada como um todo, foi feita também uma análise mais minuciosa, levando-se em consideração a existências de regiões específicas de

cada estrutura. Para o núcleo parabraquial (PB), foram analisados a porção medial (mPB), lateral dorsal (IPBd) e lateral externo (IPBe); para a estrutura colículo inferior, foram estudados os seguintes núcleos: córtex dorsal do colículo inferior (DCIC), córtex externo do colículo inferior (EIC) e núcleo central do colículo inferior (CIC); finalmente para a amígdala, foram investigados os seguintes núcleos: núcleo central e basolateral da amígdala (ceAMY e blAMY). É importante ressaltar que embora os dados comportamentais para o experimento III indiquem um N= 9 animais por grupo, os resultados imunocitoquímicos foram coletados em grupos contendo 6 a 7 animais. Devido a perdas durante a histologia ou nas etapas da reação imunocitoquímica, em algumas estruturas foram analisados cortes de apenas 5 animais, com exceção do grupo que recebeu apenas a estimulação nociceptiva, no qual o número de animais utilizados foi igual a 3.

Tabela 8. Análise quantitativa da marcação média de proteína Fos/0,1mm², em animais que receberam ou não tratamento i.p. com ácido acético 0,6% (AA e ST, respectivamente) e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs.

Número de células positivas para Fos/0,1mm ² (média±EPM)										
Estrutura	Basal	Ácido	LCEf ST	LCEf AA	LCEp ST	LCEp AA	LCEa ST	LCEa AA	Valor de df e F	p
Sol	14,09±5,56	1,67±0,30	14,70±3,81	8,52±2,14	11,19±2,18	2,25±0,33	13,73±2,52	4,37±1,13	7,37=4,35	<0,05
Gi (-6,48 a – 6,72)	4,75±0,96	0,62±0,07	4,18±0,84	1,35±0,5	2,32±0,54	1,85±0,5	3,64±0,58	1,16±0,12	7,38=4,42	<0,05
RMg	2,08±0,52	2,13±0,31	6,08±2,00	2,00±0,59	3,92±1,06	3,00±1,05	4,75±1,04	3,88±0,89	7,37=1,42	>0,05
Gi (-5,80 a – 5,88)	3,71±0,54	2,29±0,75	3,06±0,55	1,90±0,74	2,67±0,35	1,23±0,35	4,19±0,56	3,71±0,54	7,39=0,73	>0,05
mPB	5,91±1,22	6,04±1,25	8,65±3,11	5,02±0,99	6,10±1,69	3,44±0,62	9,06±2,45	4,73±1,70	7,33=1,55	>0,05
lPBe	12,42±2,40	32,4±11,89	11,71±1,97	11,05±1,93	12,50±2,38	10,90±2,30	11,63±3,28	26,29±7,02	7,40=1,88	>0,05
lPBd	13,96±8,37	38,4±23,25	9,75±3,18	10,00±2,13	9,21±3,98	9,25±3,25	8,75±2,68	15,61±5,89	7,37=0,91	>0,05
dIC	15,83±2,47	19,47±3,95	17,68±2,47	7,48±1,88	15,42±1,40	9,45±6,01	15,66±4,83	8,37±1,66	7,39=1,94	>0,05
cIC	11,33±1,41	12,31±4,43	14,73±6,38	5,5±1,65	7,02±1,41	4,82±0,72	7,22±1,97	5,82±1,47	7,33=1,37	>0,05
eIC	25,08±2,63	9,81±4,20	26,96±8,29	16,10±3,14	24±3,85	17,32±3,54	25,32±8,54	15,84±4,33	7,40=1,13	>0,05
IC(-4,72 a – 4,96)	28,94±2,46	19,75±6,51	27,6±7,92	15,75±3,13	23,27±2,46	16,05±5,81	24,10±7,62	11,11±2,21	7,37=1,07	>0,05
DR	3,58±1,49	12,38±1,30	7,63±1,89	5,13±1,15	4,25±0,75	10,57±1,9	4,96±1,17	7,95±1,61	7,42=4,99	<0,05
MnR(-4,48 a – 4,60)	3,92±1,18	14,38±5,41	11,46±2,96	4,13±1,23	6,08±1,92	5,04±1,71	13,25±4,79	6,75±1,95	7,42=1,49	>0,05
SC (-4,16 a – 4,36)	7,07±1,78	20,03±2,40	17,10±4,82	4,85±1,12	7,85±2,30	7,82±1,94	10,08±2,02	8,87±2,78	7,43=0,71	>0,05

Continuação Tabela 8.

MnR(-4,16 a -4,36)	5,63±1,97	12,25±2,13	10,42±1,86	5,02±0,58	8,08±1,67	6,94±1,45	13,83±3,46	8,27±2,37	7,42=2,30	<0,05
SC (-4,48 a -4,60)	14,21±3,22	24,37±4,45	12,31±4,4	7,31±1,32	7,64±1,34	5,03±1,45	7,75±1,11	7,71±1,82	7,42=2,06	>0,05
SC (-3,88 a -4,04)	7,69±2,72	21,87±3,07	13,67±4,23	6,37±1,4	3,02±1,19	4,85±1,45	9,14±2,15	4,39±1,59	7,43=3,14	<0,05
dmHYP	11,37±1,05	56,75±1,79	17,31±6,95	14,33±4,05	15,73±2,39	15,14±2,05	19,69±3,76	14,41±3,93	7,40=3,97	<0,05
AMY	2,00±0,68	19,48±0,51	4,83±1,11	3,51±0,46	6,60±1,89	2,40±0,63	7,65±2,53	4,97±1,25	7,40=4,01	<0,05
ceAMY	4,41±1,45	49,33±3,66	6,21±1,84	10,8±6,86	3,99±1,66	7,75±3,76	4,54±1,14	6,64±1,42	7,40=2,44	<0,05
blAMY	6,25±0,74	17,67±1,35	6,67±1,65	4,30±0,46	7,32±1,54	5,89±2,52	10,5±3,48	6,84±5,86	7,40=3,30	<0,05

Legendas: Sol: Núcleo do Trato Solitário; Gi: Núcleo Gigantocelular; RMg: Núcleo Magno da Rafe; mPB: Núcleo Medial Parabraquial; IPBe: Núcleo Parabraquial Lateral Externo; IPBd: Núcleo Parabraquial Lateral Dorsal; IC: Colículo Inferior; dIC: Córtex Dorsal do Colículo Inferior; eIC: Córtex Externo do Colículo Inferior; cIC: Núcleo Central do Colículo Inferior; DR: Núcleo Dorsal da Rafe; MnR: Núcleo Mediano da Rafe; SC: Colículo Superior; AMY: Amígdala; ceAMY: Núcleo central da amígdala; blAMY: Núcleo basolateral da amígdala; dmHYP: Hipotálamo dorsomedial.

Tabela 9. Análise quantitativa da marcação média de proteína Fos/ $0,1\text{mm}^2$, na matéria cinzenta periaquedutal (PAG) de animais que receberam ou não tratamento i.p. com ácido acético 0,6% (AA e ST, respectivamente) e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs.

Número de células positivas para Fos/ $0,1\text{mm}^2$ (média±EPM)										
Estruturas	Basal	Ácido	LCEf ST	LCEf AA	LCEp ST	LCEp AA	LCEa ST	LCEa AA	Valor de df e F	p
Bregma: -4,72 a -4,96										
DM	4,00±1,13	14,00±5,43	4,42±2,13	2,50±0,75	4,00±0,61	3,00±2,38	3,00±1,02	2,36±0,55	7,41=1,92	>0,05
L	5,58±0,9	23,06±5,04	16,88±5,58	7,00±2,72	8,39±1,84	5,75±2,12	6,04±1,08	9,87±3,09	7,41=2,83	<0,05
VL	3,79±1,09	21,13±5,03	8,29±2,22	2,92±1,11	4,25±0,42	4,55±2,44	4,00±0,95	3,79±1,09	7,41=9,39	<0,05
Bregma: -4,48 a -4,60										
DM	7,08±1,56	17,50±6,96	8,5±2,93	3,33±1,29	7,64±2,31	9,36±3,85	3,00±0,95	6,43±1,83	7,43=1,28	>0,05
DL	5,83±0,77	20,81±4,33	14,83±4,53	5,46±0,76	6,96±1,68	8,93±1,32	7,75±2,32	11,00±4,12	7,41=4,33	<0,05
L	11,17±1,73	25,88±5,63	21,5±5,16	11,46±5,35	15,89±2,19	15,43±1,89	13,08±2,18	15,82±3,25	7,43=1,61	>0,05
VL	7,04±1,05	19,63±4,12	12,63±2,68	5,71±2,08	8,21±1,83	9,11±1,65	6,42±2,29	9,64±2,12	7,43=3,33	<0,05
Bregma: -4,16 a -4,36										
DM	7,58±1,56	23,5±6,28	12,42±2,85	4,33±1,15	8,36±2,15	6,08±2,10	6,08±1,12	6,07±1,71	7,43=2,30	<0,05
DL	3,60±0,7	16,88±1,21	11,46±3,70	2,54±1,43	6,75±1,52	7,75±2,29	7,67±0,85	4,43±1,20	7,43=5,13	<0,05
L	11,63±1,44	29,38±5,90	22,92±5,17	8,63±3,86	18,25±3,43	16,93±3,05	17,67±3,37	14,68±4,4	7,43=2,37	<0,05
Bregma: -3,88 a -4,04										
DM	9,00±1,10	21,63±5,35	7,5±2,75	4,05±1,18	5,96±1,55	9,21±3,48	5,17±1,09	4,79±1,05	7,43=2,28	<0,05
DL	4,63±1,24	18,38±2,73	9,25±2,16	3,13±1,37	7,29±1,87	8,04±2,04	8,67±2,07	5,25±1,56	7,43=4,94	<0,05
L	12,21±3,38	31,50±4,11	21,63±4,73	8,75±3,75	19,71±4,26	20,29±4,56	24,08±3,57	15,18±3,93	7,43=-2,75	<0,05

Legenda: DM: Coluna Dorso-medial; DL: Coluna Dorso-lateral; L: Coluna Lateral; VL: Coluna Ventro-lateral.

A análise estatística com ANOVA bifatorial revelou diferenças para o fator dor para as seguintes estruturas: Sol, Gi (Bregma: -6,48 a -6,72 e -5,80 a -5,88), mPB, dIC, eIC, IC (-4,72 a -4,76), AMY e várias colunas da matéria cinzenta periaquedutal ao longo do eixo rostrocaudal [(vlPAG -4,72 a -4,96; vlPAG -4,48 a -4,60; dmPAG -4,16 a -4,36 e lPAG -3,88 a -4,04)]. Os valores de F podem ser vistos nas tabelas 10 e 11. Para o Núcleo dorsal da rafe e coluna dorsolateral da PAG (Bregma: -4,48 a -4,60 e -4,16 a -4,36), foi revelada significância para a interação entre os fatores condição (tipo de LCE) e dor (tratado ou não com ácido acético). As comparações *Post hoc* com o teste de Duncan no DR confirmaram um incremento na marcação de Fos no grupo LCEp tratado com ácido em comparação ao grupo LCEp sem tratamento ($p < 0,05$). Além disso, dentre os animais que receberam a injeção de ácido, a marcação foi maior para o grupo LCEp em relação ao grupo LCEf ($p < 0,05$). Para a dlPAG (-4,48 a -4,60), o teste de Duncan mostrou uma diminuição significativa da marcação de Fos para os grupos LCEp ST, LCEa ST e LCEf AA em comparação ao grupo LCEf ST ($p < 0,05$). Ainda na coluna dorsolateral da PAG, mas numa porção mais rostral (Bregma: -4,16 a -4,36), diminuições na marcação de Fos também foram confirmadas para os grupos LCEa ST e LCEf AA em comparação ao grupo LCEf ST ($p < 0,05$).

A ANOVA unifatorial revelou resultados significativos em várias estruturas analisadas, como pode ser demonstrado nas tabelas 8 e 9. Em geral, com a observação dos dados e resultados da análise *Post hoc*, nota-se para quase todas as estruturas um aumento significativo da marcação de Fos nos grupos que somente receberam a injeção de ácido, em comparação com a marcação do grupo que não sofreu nenhuma manipulação [DR, MnR, SC (-3,88 a -4,04), dmHYP, AMY, CeAMY, BlAMY, l e vlPAG (-4,72 a -4,96), dlPAG (-

4,48 a -4,60), dl e IPAG (-4,16 a -4,36) e dm, dl e IPAG (-3,88 a -4,04)]. Exceções importantes compreendem o Núcleo do Trato Solitário e Núcleo Gigantocelular (-6,48 a -6,72), nos quais uma diminuição significativa da marcação de Fos foi obtida no grupo ácido acético em comparação com o grupo basal ($p<0,05$). A exposição ao LCEf produziu um aumento na marcação de Fos em relação ao grupo basal no DR, MnR e dlPAG (-4,48 a -4,60 e -4,16 a -4,36). Ainda em comparação ao grupo basal, um aumento na marcação para os grupos LCEp e LCEa nas estruturas MnR e AMY também foi confirmado pelo teste de Duncan ($p<0,05$). Quando foi realizada a comparação dos grupos expostos aos 3 tipos de labirintos e tratados com ácido acético com o grupo apenas tratado com ácido, foram reveladas diminuições significativas da marcação de Fos no SC (-3,88 a -4,04), AMY, CeAMY, BIAMY e para todas as colunas da matéria cinzenta periaquedutal na qual ANOVA teve resultado significativo ($p<0,05$). As únicas exceções consistem no DR e coluna lateral da PAG (-3,88 a -4,04), nas quais apenas os grupos LCEf AA e LCEa AA sofreram diminuições da marcação de Fos em relação ao grupo somente tratado com ácido acético ($p<0,05$).

Além das observações descritas acima, é importante ressaltar também que de modo geral, o número de células positivas para Fos nas estruturas estudadas no experimento III foi menor, independentemente do tratamento e condição dos grupos, em relação ao experimento II, para as estruturas correspondentes.

Figura 17. Marcação média de Fos/0,1mm² em animais que receberam (A) ou não (S) tratamento i.p. com ácido acético 0,6% e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles (Basal) não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs e os animais do grupo Ácido somente receberam injeção i.p. de ác, acético 0,6%. **Legenda:** DR: Núcleo dorsal da rafe; MnR: Núcleo mediano da rafe; dmHYP: Hipotálamo dorsomedial; SC: Colículo superior.*p<0,05 em comparação ao grupo basal; # p<0,05 em comparação ao grupo ácido; +p<0,05 em comparação ao grupo LCEpAA; N=3-7

Figura 18. Marcação média de Fos/0,1mm² em animais que receberam (A) ou não (S) tratamento i.p. com ácido acético 0,6% e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles (Basal) não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs e os animais do grupo Ácido somente receberam injeção i.p. de ácido acético 0,6%. **Legenda:** CeAMY: Núcleo central da amígdala; BIAMY: Núcleo basolateral da amígdala. *p<0,05 em comparação ao grupo basal; #p<0,05 em comparação ao grupo ácido. N=3-7

Figura 19. Marcação média de Fos/0,1mm² na Matéria Cinzenta Periaquedutal (PAG) em animais que receberam (A) ou não (S) tratamento i.p. com ácido acético 0,6% e expostos a diferentes tipos de labirinto em cruz elevado (LCE). Os animais controles (Basal) não receberam nenhum tratamento ou exposição aos LCEs e os animais do grupo Ácido somente receberam injeção i.p. de ác. acético 0,6%. **Legenda:** DM: coluna dorsomedial; DL:coluna dorsolateral; L:coluna lateral; VL:coluna ventrolateral. *p<0,05 em comparação ao grupo basal; #p<0,05 em comparação aos grupos LCEf AA, LCEp AA e LCEa AA; § p<0,05 em comparação ao grupo LCEfAA; N=3-7

Tabela 10. Valores de df, F e p da análise estatística dos dados referentes à marcação média de proteína Fos/0,1mm² para as estruturas propostas.

Estrutura	ANOVA unifatorial		ANOVA bifatorial	
	Valor de df, F e p	Valor de df, F e p para o fator dor	Valor de df, F e p para o fator labirinto	Valor de df, F e p para a interação entre os fatores
Sol	7,37=4,35 p<0,05	1,30=15,67 p<0,05	2,30=2,23 p>0,05	2,30=0,16 p>0,05
Gi (-6,48 a – 6,72)	7,38=4,42 p<0,05	1,30=18,86 p<0,05	2,30=0,48 p>0,05	2,30=2,72 p>0,05
RMg	7,37=1,42 p>0,05	1,30=16,24 p<0,05	2,30=1,94 p>0,05	2,30=0,95 p>0,05
Gi (-5,80 a – 5,88)	7,39=0,73 p>0,05	1,29=3,49 p>0,05	2,29=1,04 p>0,05	2,29=0,51 p>0,05
mPB	7,33=1,55 p>0,05	1,29=4,65 p<0,05	2,29=0,73 p>0,05	2,29=0,08 p>0,05
IPBe	7,40=1,88 p>0,05	1,30=0,62 p>0,05	2,30=0,34, p>0,05	2,30=1,55 p>0,05
IPBd	7,37=0,91 p>0,05	1,29=0,51 p>0,05	2,29=0,31 p>0,05	2,29=0,48 p>0,05
dIC	7,39=1,94 p>0,05	1,29=5,63 p<0,05	2,29=0,18 p>0,05	2,29=0,41 p>0,05
cIC	7,33=1,37 p>0,05	1,28=2,05 p>0,05	2,28=0,22 p>0,05	2,28=0,38 p>0,05
eIC	7,40=1,13 p>0,05	1,30=3,92 p<0,05	2,30=0,01 p>0,05	2,30=0,07 p>0,05
IC(-4,72 a – 4,96)	7,37=1,07 p>0,05	1,28=6,18 p<0,05	2,28=0,30 p>0,05	2,28=0,16 p>0,05
DR	7,42=4,99 p<0,05	1,33=3,48 p>0,05	2,33=0,31 p>0,05	2,33=4,42 p<0,05
MnR(-4,48 a – 4,60)	7,42=1,49 p>0,05	1,32=3,53 p>0,05	2,32=0,29 p>0,05	2,32=0,24 p>0,05
SC (-4,16 a – 4,36)	7,43=0,71 p>0,05	1,33=0,82 p>0,05	2,33=0,48 p>0,05	2,33=0,47 p>0,05
MnR(-4,16 a – 4,36)	7,42=2,30 p<0,05	1,32=1,41 p>0,05	2,32=0,68 p>0,05	2,32=0,39 p>0,05
SC (-4,48 a – 4,60)	7,42=2,06 p>0,05	1,33=2,50 p>0,05	2,33= 0,01 p>0,05	2,33= 0,64 p>0,05
SC (-3,88 a – 4,04)	7,43=3,14 p<0,05	1,33= 0,16 p>0,05	2,33= 2,55 p>0,05	2,33=1,92 p>0,05
dmHYP	7,40=3,97 p<0,05	1,32= 0,77 p>0,05	2,32= 0,08 p>0,05	2,32=0,16 p>0,05
AMY	7,40=4,01 p<0,05	1,29=4,78 p<0,05	2,29=0,77 p>0,05	2,29=0,84 p>0,05
ceAMY	7,40=2,44 p<0,05	1,30=0,78 p>0,05	2,30= 1,03 p>0,05	2,30=0,009 p>0,05
blAMY	7,40=3,30 p<0,05	1,30= 1,79 p>0,05	2,30=1,03 p>0,05	2,30=0,12 p>0,05

Legendas: Sol: Núcleo do Trato Solitário; Gi: Núcleo Gigantocelular; RMg: Núcleo Magno da Rafe; mPB: Núcleo Medial Parabraquial; IPBe: Núcleo Parabraquial Lateral Externo; IPBd: Núcleo Parabraquial Lateral Dorsal; IC: Colículo Inferior; dIC: Córtex Dorsal do Colículo Inferior; eIC: Córtex Externo do Colículo Inferior; cIC: Núcleo Central do Colículo Inferior; DR: Núcleo Dorsal da Rafe; MnR: Núcleo Mediano da Rafe; SC: Colículo Superior; AMY: Amígdala; ceAMY: Núcleo central da amígdala; blAMY: Núcleo basolateral da amígdala dmHYP: Hipotálamo dorsomedial.

Tabela 11. Valores de df, F e p da análise estatística dos dados referentes à marcação média de proteína Fos/0,1mm² nas colunas da matéria cinzenta periaquedutal.

Estrutura	ANOVA unifatorial		ANOVA bifatorial	
	Valor de df, F e p	Valor de df, F e p para o fator dor	Valor de df, F e p para o fator labirinto	Valor de df, F e p para a interação entre os fatores
Bregma: -4,72 a -4,96				
DM	7,41=1,92 p>0,05	1,31=3,11 p>0,05	2,31=0,16 p>0,05	2,31=0,95 p>0,05
L	7,41=2,83 p<0,05	1,31=1,75 p>0,05	2,31=0,24 p>0,05	2,31=1,22 p>0,05
VL	7,41=9,39 p<0,05	1,31=4,10 p<0,05	2,31=0,19 p>0,05	2,31=2,01 p>0,05
Bregma: -4,48 a -4,60				
DM	7,43=1,28 p>0,05	1,33=0,16 p>0,05	2,33=0,16 p>0,05	2,33=1,27 p>0,05
DL	7,41=4,33 p<0,05	1,32=2,02 p>0,05	2,32=0,75 p>0,05	2,32=3,32 p<0,05
L	7,43=1,61 p>0,05	1,33=0,82 p>0,05	2,33=1,65 p>0,05	2,33=1,73 p>0,05
VL	7,43=3,33 p<0,05	1,33=0,29 p>0,05	2,33=0,14 p>0,05	2,33=3,04 p>0,05
Bregma: -4,16 a -4,36				
DM	7,43=2,30 p<0,05	1,32=4,51 p<0,05	2,32=0,65 p>0,05	2,32=2,14 p>0,05
DL	7,43=5,13 p<0,05	1,32=6,44 p<0,05	2,32=0,20 p>0,05	2,32=3,87 p<0,05
L	7,43=2,37 p<0,05	1,33=3,74 p>0,05	2,33=0,12 p>0,05	2,33=1,56 p>0,05
Bregma: -3,88 a -4,04				
DM	7,43=2,28 p<0,05	1,33=0,49 p>0,05	2,33=0,44 p>0,05	2,33=0,73 p>0,05
DL	7,43=4,94 p<0,05	1,33=3,66 p>0,05	2,33=0,30 p>0,05	2,33=1,73 p>0,05
L	7,43=-2,75 p<0,05	1,33=4,23 p<0,05	2,33=0,78 p>0,05	2,33=1,37 p>0,05

Legenda: DM: Coluna Dorso-medial; DL: Coluna Dorso-lateral; L: Coluna Lateral; VL: Coluna Ventro-lateral.

Figura 20. Fotomicrografias de cortes coronais encefálicos submetidos a imunocitoquímica de Fos de camundongos que não receberam nenhum tratamento ou exposição ao LCE (Basal), tratados apenas com ácido acético i.p. (AA) ou que foram expostos por 5 minutos aos diferentes LCEs.

Legenda: DR: Núcleo Dorsal da Rafe; MnR: Núcleo Mediano da Rafe; LCEf: Labirinto em cruz elevado fechado; LCEp: Labirinto em cruz elevado padrão; LCEa: Labirinto em cruz elevado aberto; AA: ácido acético 0,6% i.p.

Figura 21. Fotomicrografias de cortes coronais encefálicos submetidos a imunocitoquímica de Fos de camundongos que não receberam nenhum tratamento ou exposição ao LCE (Basal), tratados apenas com ácido acético i.p. (AA) ou que foram expostos por 5 minutos aos diferentes LCEs.

Legenda: SC: Colículo Superior; dmHYP: Hipotálamo dorsomedial; LCEf: Labirinto em cruz elevado fechado; LCEp: Labirinto em cruz elevado padrão; LCEa: Labirinto em cruz elevado aberto; AA: ácido acético 0,6% i.p.

Figura 22. Fotomicrografias de cortes coronais encefálicos submetidos a imunocitoquímica de Fos de camundongos que não receberam nenhum tratamento ou exposição ao LCE (Basal), tratados apenas com ácido acético i.p. (AA) ou que foram expostos por 5 minutos aos diferentes LCEs.

Legenda: PAG: Matéria cinzenta Periaquedutal; l: coluna lateral; dl: coluna dorsolateral; vl: coluna ventrolateral; Aq: Aqueduto; LCEf: Labirinto em cruz elevado fechado; LCEp: Labirinto em cruz elevado padrão; LCEa: Labirinto em cruz elevado aberto; AA: ácido acético 0,6% i.p.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a exposição de animais ao LCEp e LCEa elicia analgesia em diferentes testes de nocicepção. O teste nociceptivo de contorções abdominais diminui a locomoção apenas dos animais expostos ao LCEf. A análise espaço-temporal do comportamento do LCEp indica que os animais se esquivam dos braços abertos do aparelho, independentemente de terem recebido ou não tratamento i.p. com ácido acético.

A marcação de proteína Fos mostrou que a aplicação de um estímulo nociceptivo em combinação com a exposição ao LCE culmina na redução da expressão da proteína em várias estruturas encefálicas. Embora a marcação da proteína tenha diminuído após a manipulação prévia dos animais, que teve o objetivo de reduzir o efeito da novidade sobre a expressão de Fos, o mesmo padrão de redução da marcação foi obtido quando o estímulo nociceptivo foi aplicado concomitantemente com a exposição ao LCE.

Os resultados do experimento I indicam que a aversão gerada pela exposição ao LCEa é mantida mesmo na ausência de conflito. Essa informação é corroborada pelos dados referentes as respostas nociceptivas exibidas nos 3 testes utilizados. Dessa forma, os animais do grupo LCEa apresentaram analgesia de alta magnitude eliciada pela exposição a esse aparelho, demonstrada nos testes de contorções abdominais e teste da formalina, e pela discreta analgesia demonstrada no teste de retirada da cauda. É importante ressaltar que esses resultados foram obtidos numa primeira fase do trabalho, e que para o teste das contorções, os resultados foram parcialmente reproduzidos nos experimentos posteriores (II e III), nos quais os encéfalos dos animais foram retirados e processados para a imunocitoquímica de Fos. O fato de que a resposta nociceptiva exibida pelos animais

expostos ao LCEp não ter sido reproduzida no experimento II pode ser atribuída ao menor tamanho da amostra analisada. Enquanto no experimento I o número de sujeitos analisado foi de 7 a 9 por grupo, no experimento II o tamanho da amostra consistiu em 6 animais por grupo, o que pode ter tornado a análise estatística mais rigorosa, uma vez que é observável uma tendência de queda da resposta nociceptiva para o grupo LCEp.

De forma interessante, a exposição ao LCEp, no primeiro experimento, eliciou analgesia no teste de contorções abdominais, efeito não demonstrado pelo teste de formalina. Nesta última condição, as porcentagens de entradas e tempo de permanência nos braços abertos (LO) do aparelho [19,7% e 5,8%, respectivamente (resultados não mostrados)], indicam que os animais esquivaram-se dos braços abertos, sugerindo que esse ambiente possui propriedades aversivas (Lister, 1987). É possível que as diferentes respostas nociceptivas observadas com os dois grupos – LCEp e LCEa – no teste da formalina estejam relacionadas a diferenças nas intensidades do estímulo aversivo dos dois labirintos. Em outras palavras, enquanto os camundongos expostos ao LCEp têm acesso aos braços fechados e, portanto, podem expressar dor (lambendo mais a pata nesse compartimento), o grupo exposto ao LCEa não apresenta a mesma oportunidade de escape. Resultados recentes obtidos em nosso laboratório corroboram essa hipótese. Sucintamente, demonstramos que quando expostos ao LCEp, inicialmente (primeiros 5 minutos) os animais apresentam maior exploração dos braços abertos do LCE e menor tempo de lambidas. Entretanto, com o passar do tempo no aparelho, os camundongos diminuem sua exploração nos braços abertos, permanecendo mais tempo nos braços fechados (Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza, 2002). Esses dados corroboram a hipótese de Holmes & Rodgers (1998), que sugere que após os 5 minutos de teste no LCEp os

camundongos passam a evitar mais os braços abertos. Desta forma, esses resultados demonstram que a ansiedade provocada pela exposição ao LCEp também atenua a resposta nociceptiva induzida pelo teste da formalina. Uma vez que são os braços abertos do LCE a principal ameaça para ratos (Pellow et al., 1985) e camundongos (Lister, 1987), levando a exibição de comportamentos de esquiva, é provável que a antinocicepção provocada pela exposição ao LCEa seja devida a característica inescapável do teste. Evidências apoiando essa hipótese podem ser encontradas em estudos anteriores nos quais foi demonstrada a ocorrência de analgesia no teste de contorções abdominais em camundongos confinados no braço aberto do LCEp (Nunes-de-Souza et al., 2000). Neste sentido, os próprios resultados do teste de contorções abdominais obtidos no presente estudo, nos quais a exposição ao LCEa invariavelmente provocou antinocicepção (ao contrário da exposição ao LCEp) reforçam essa hipótese. Outro resultado que corrobora essa hipótese foi o obtido por Rhudy & Meagher (2003), em um estudo com humanos, no qual, a dor provocada por uma fonte de calor radiante em intensidade supralimiar, aplicada nos dedos da mão, foi mensurada em voluntários distribuídos em três grupos de acordo com o estado emocional: pré-exposição a 3 choques (medo), possibilidade de apresentação de choques, porém sem a apresentação de fato (ansiedade) ou nenhuma intervenção (controle). Os resultados mostraram que as condições de ameaça real e potencial eliciaram um estado emocional de medo e também analgesia, sendo que na primeira condição o nível de alerta foi maior, e na segunda condição a analgesia foi de menor magnitude e duração. Esses resultados, de forma semelhante ao que já foi sugerido no presente estudo, reforçam que a característica inescapável da situação ameaçadora constitui um fator importante na modulação da resposta nociceptiva. Em conjunto, essas evidências indicam

que a exposição ao LCEp também é capaz de provocar analgesia, porém de menor magnitude. Esse pode ser o motivo pelo qual nem sempre foi obtida a resposta de antinocicepção para os grupos expostos ao LCEp.

Os resultados obtidos com o teste de retirada da cauda mostraram-se inconsistentes com a literatura, na qual alguns autores demonstraram aumentos de pequena magnitude na LRC de animais expostos ao LCEp (Lee & Rodgers, 1990 e 1991; Rodgers et al, 1992). No presente estudo, somente a exposição ao LCEa provocou uma tendência de aumento da LRC, que apesar de apresentar curta duração, parece corroborar o fato de que é a situação aversiva inescapável a principal responsável por provocar analgesia. Além disso, algumas observações merecem destaque em relação ao teste *per se*: em geral, os testes baseados em estimulação térmica da pele são mais seletivos em estimular receptores cutâneos; dessa forma, categorias específicas de receptores e fibras podem ser excitados (de acordo com intensidades crescentes do estímulo, são ativadas fibras A β , A δ e finalmente fibras C). Considerando essas informações, uma fonte de calor radiante de intensidade crescente irá resultar em uma sequência organizada de ativação de receptores, que consiste primeiramente na ativação de termorreceptores, termorreceptores + nociceptores e então somente nociceptores. Na prática, os animais respondem rapidamente ao estímulo, e dessa forma somente a primeira parte da sequência descrita estaria participando. Além desses potenciais problemas, os aparatos comumente utilizados para estimulação térmica da pele geralmente possuem uma baixa capacidade para a produção de calor (lâmpadas radiantes e resistências) e as fontes de calor radiante emitem a radiação entre o espectro visível e o infravermelho, no qual a pele reflete mais do que absorve (Le Bars et al, 2001). Diante disso, o uso do teste de *Tail flick* constitui algumas desvantagens

para o estudo em questão. É importante ressaltar que na maioria dos estudos sobre o sistema inibitório descendente da dor (SID) em roedores utiliza-se o teste de *Tail flick*, assumindo que a resposta nociceptiva seja unimodal (Lu et al, 2004). Porém, sabe-se que a dor, como um fenômeno polimodal, é bem ilustrada pelas respostas sequenciais observadas após uma lesão, na qual a injúria aguda resulta em dor tipicamente bem localizada e descrita como se fosse uma picada ou ferroadada, resultante da ativação de fibras A δ , enquanto posteriormente a dor profunda, mais intensa e mais difícil de localizar, descrita como uma sensação de queimação, é resultante da ativação de fibras C.

Em adição a existência de modalidades nociceptivas múltiplas, não é surpreendente que a ativação dos dois tipos de fibra descritos seja modulada diferencialmente. Dessa forma, Yeomans & Proudfit (1996a e 1996b) estudaram a latência de retirada da pata em resposta à incidência de calor radiante em ratos e concluíram que um aquecimento rápido (6,5° C/s) provoca uma reação de retirada rápida, com a temperatura da pele alcançando altos níveis, o que sugere a ativação de fibras A δ ; quando o aquecimento é lento (1° C/s), o tempo de reação é maior e a temperatura da pele aumenta vagarosamente, ativando somente fibras do tipo C. O opióide morfina é extensivamente mais ativo no segundo do que no primeiro teste (Lu et al, 1997). Além disso, do ponto de vista farmacológico, há um certo consenso de que o teste de *Tail flick* é mais sensível em revelar a atividade de analgésicos opióides (Le Bars et al, 2001). Essas informações foram confirmadas em estudos recentes com a estimulação do núcleo magno da rafe, uma estrutura sabidamente importante no controle descendente da dor (Fields & Basbaum, 1999). Lu et al (2004) reportaram que foi necessário aplicar mais que o dobro de corrente elétrica no RMg para produzir antinocicepção na medida de respostas

nociceptivas mediadas por fibras A δ , em relação àquelas mediadas por fibras C. Além disso, essas respostas nociceptivas são moduladas por diferentes receptores opióides. Gebhart (2004), em uma revisão, também relatou que a inibição descendente só foi observada quando intensidades mais altas de corrente ou concentrações maiores de glutamato foram aplicadas ao RMg.

No presente estudo, é possível que fibras A δ tenham sido ativadas pela fonte de calor do aparato utilizado, e como as evidências acima apontam para um controle descendente mais evidente em relação as fibras do tipo C, é possível que esse seja o motivo pelo qual não foi obtida uma resposta antinociceptiva nos grupos expostos ao LCEp e LCEa. Ao contrário, quando foram utilizados os outros dois testes de nocicepção, que caracterizam dor persistente com ativação de fibras do tipo C (Le Bars et al, 2001), a resposta antinociceptiva foi obtida. Nesse caso, é possível que a exposição ao LCEp e LCEa ative o sistema inibitório descendente da dor, resultando na inibindo o *input* de informações nociceptivas carregadas por fibras do tipo C e não do tipo A δ . No entanto, experimentos futuros necessitam ser conduzidos para confirmar ou rejeitar essa hipótese.

Em relação ao comportamento exibido pelos animais no LCE para o experimento II, pode-se dizer que a presença de braços abertos diminuiu a atividade geral, uma vez que os animais expostos ao LCEf exibiram um maior número de entradas nos quatro braços do aparelho. Embora essa análise não tenha sido feita, é possível que os animais expostos ao LCEp e LCEa passaram mais tempo executando comportamentos de avaliação de risco [mergulhar (movimento exploratório da cabeça ultrapassando o assoalho do braço aberto do LCE) e esticar (postura exploratória na qual o animal estende o corpo, retraindo-o em seguida para voltar à posição original)]. A estimulação nociceptiva diminuiu a locomoção

apenas para o grupo exposto ao LCEf. É possível que essa diminuição seja devida ao fato de os animais passarem mais tempo expressando comportamentos recuperativos para aliviar os efeitos da estimulação nociceptiva. No entanto, nos animais expostos ao LCEp, a frequência de entradas nos braços fechados, medida amplamente usada para avaliar a atividade locomotora no LCE (Cruz et al, 1994; Setem et al, 1999), não foi alterada com a injeção de ácido acético. Esses resultados sugerem que a frequência de entradas nos braços fechados do LCEp parece não ser adequada para se avaliar a atividade locomotora em animais submetidos concomitantemente a testes nociceptivos.

Em relação a imunocitoquímica de Fos do experimento II, o que pode ser notado é que para a grande maioria das estruturas estudadas, a marcação foi alta já nos animais expostos ao LCEf, e algumas vezes também no grupo basal. Nesse sentido, foi obtido um aumento da marcação de Fos para as estruturas dmHYP e vIPAG (-4,48 a -4,60) em todos os grupos, independentemente do labirinto ao qual foram expostos e do tratamento com o estímulo nociceptivo, em comparação com o grupo basal. Assim, é provável que os aumentos da marcação da proteína nas estruturas analisadas se devam à novidade da manipulação experimental. Essa interpretação encontra apoio em estudos anteriores (Badiani et al, 1998; Kabbaj & Akil, 2001; Montag-Sallaz et al, 1999; Radulovic et al, 1998; Papa et al, 1993), os quais demonstraram que a exposição de animais a um ambiente novo induz a expressão de Fos não só nas regiões diretamente relacionadas com a neurobiologia do estresse, mas também em várias outras regiões nas quais o papel na regulação da resposta ao estresse não é evidente. Tais resultados poderiam explicar a rejeição de nossa hipótese inicial, a qual prediz que a exposição ao LCE aberto, por ser um ambiente com características aversivas, levaria a marcação maior de Fos nas estruturas

propostas. É também possível que a simples manipulação experimental tenha levado ao que *efeito teto* na marcação da proteína. Em outras palavras, o aumento da intensidade do estímulo, no caso a exposição a um ambiente mais aversivo, não se caracterizou num aumento proporcional na expressão da proteína por ter ocorrido o efeito teto. Contudo, cabe ressaltar que os altos níveis de marcação de Fos nos animais do grupo controle (LCEf) podem também ter prejudicado a diferenciação entre os grupos. Apoiando esta hipótese estão os resultados de Hinks e colaboradores (1996), que observaram alta expressão de mRNA de c-fos no cérebro de ratos controles confinados no braço fechado do LCE.

Os resultados significativos com a marcação da proteína no experimento II para o núcleo parabraquial e núcleo mediano da rafe vão ao encontro da literatura, a qual reporta a participação dessas estruturas na neurobiologia da dor e neurobiologia do medo e ansiedade, respectivamente (Millan, 1999; Graeff, 1990 e 1993; Deakin e Graeff, 1991; Brandão et al, 2003; Behbehani, 1995). Além disso, esses mesmos resultados também sugerem que essas estruturas estejam envolvidas na modulação de ambas as respostas de medo e antinocicepção. No entanto, experimentos futuros são necessários para confirmar esta hipótese. Ao contrário da nossa hipótese inicial, a injeção de ácido acético provocou uma tendência de diminuição na marcação de Fos (em comparação com o grupo correspondente) para quase todas as estruturas, alcançando significância no PB e MnR (experimento II).

No experimento III, os dados referentes ao total de entradas mostraram uma diminuição no número de entradas nos braços do LCEa. Assim como foi inferido para o experimento II, essa diminuição pode ser devida a um maior tempo despendido para

expressão de comportamentos defensivos (avaliação de risco). Para o grupo LCEp, o qual não foi diferente do LCEf no que se refere ao total de entradas, é possível que a manipulação prévia tenha influenciado o padrão exploratório, uma vez que no experimento II essa diminuição foi marcante. No entanto, a análise da frequência de entradas nos braços do LCEp indicam que os animais esquivaram-se dos braços abertos, assim como no experimento II, tanto para a condição sem tratamento i.p. com ácido acético 0,6% quanto para os grupos que receberam a estimulação nociceptiva. A injeção de ácido diminuiu a locomoção em animais expostos ao LCEf e LCEa, em comparação aos mesmos grupos que não receberam a estimulação álgica. Novamente, é possível que os animais tenham dispensado mais tempo expressando comportamentos recuperativos da injúria sofrida em um local supostamente seguro (como o braço fechado do LCEp) ao invés de explorar o aparelho. É importante ressaltar que para o LCEp, a diminuição da locomoção devido a estimulação álgica ocorreu em ambos os braços do aparelho.

No experimento III, apesar da preocupação do manuseio diário dos animais a fim de eliminar um possível efeito da novidade da manipulação sobre a expressão de Fos, o mesmo padrão de tendência ou redução na marcação foi obtido nas estruturas Sol, Gi (Bregma: -6,48 a -6,72 e -5,80 a -5,88), AMY e PAG (em várias colunas distribuídas ao longo do eixo antero-posterior) para os grupos que receberam estimulação nociceptiva. Resultados inconsistentes com marcação de Fos em resposta a aplicação de estímulos nociceptivos já foram reportados por Sandkühler (1996). Nesse estudo, no qual foi analisada a expressão de Fos na medula espinal, foi observada uma dissociação entre o comportamento e a marcação de Fos após a aplicação de um estímulo nociceptivo. Nesse sentido, outras manipulações que também afetaram a expressão da proteína Fos também já

foram reportadas, como por exemplo por Bullit (1990), cujo trabalho mostrou que ratos anestesiados apresentam um incremento na marcação de Fos em vários sítios do tronco encefálico. É importante ressaltar que a redução na marcação de Fos ocorre apenas quando a estimulação álgica é apresentada concomitantemente com a exposição ao LCE, em comparação com os seus grupos controles correspondentes (grupo Ácido e grupos expostos aos LCEs sem tratamento i.p.) não se deve ao fato da estimulação álgica *per se*, uma vez que nos animais que somente receberam a injeção i.p. de ácido acético foram obtidos aumentos significativos da marcação em várias estruturas (MnR, DR, SC, dmHYP, AMY, CeAMY, BIAMY, e várias colunas da PAG distribuídas no eixo rostrocaudal). Esse resultado encontra apoio em trabalhos da literatura que também demonstraram aumentos na marcação de Fos nessas e outras estruturas após estimulação visceral nociva (Traub et al, 1996; Rodella et al, 1998; Mönnikes et al, 2003; Keay & Bandler, 1993). Exceção importante compreende o núcleo dorsal da rafe, no qual foi registrado um aumento da marcação para os animais que receberam ácido acético i.p. e expostos ao LCEf em comparação ao grupo exposto ao mesmo labirinto sem tratamento i.p.

Uma possível explicação para as discrepâncias na marcação de Fos entre resultados prévios e os obtidos nos experimentos II e III pode ser atribuída ao fato de que a própria estimulação nociceptiva pode ter ativado o sistema inibitório descendente da dor, que por sua vez pode modular a entrada (*input*) de informações nociceptivas essencialmente de duas maneiras: via inibição de interneurônios excitatórios ou excitação de interneurônios inibitórios no corno dorsal da medula espinal (Millan, 1999). Outros trabalhos também já encontraram reduções na marcação de Fos após manipulações nociceptivas ou farmacológicas. Clemente e colaboradores (1996) encontraram uma redução na marcação

de Fos no colículo superior e inferior de ratos que receberam uma estimulação visceral nociceptiva sob anestesia com halotano. Os autores também relataram que a anestesia e a estimulação nociva *per se* foram responsáveis por aumentos na marcação nessas mesmas estruturas, em comparação com marcações basais. Outro estudo, no qual camundongos expostos ao paradigma do conflito social em combinação com a injeção de cocaína, também encontrou redução significativa da marcação de Fos na matéria cinzenta periaquedutal (Miczeck et al, 1999). Da mesma forma que no estudo conduzido por Clemente et al (1996), a aplicação dos estímulos isoladamente produziu um aumento de Fos na estrutura analisada. Embora os objetivos e metodologia utilizados nos dois estudos citados tenham sido diferentes do presente trabalho, pode ser observada uma evidência de que a administração concorrente de dois estímulos foi responsável por reduzir a marcação da proteína.

Apesar dos resultados contraditórios, aqueles obtidos no núcleo dorsal da rafe no experimento III reforçam a participação dessa estrutura no substrato neural da aversão gerada pela exposição ao LCE, bem como sua participação na neurobiologia da dor (Millan, 1999; Graeff, 1990 e 1993; Deakin e Graeff, 1991; Brandão et al, 2003; Behbehani, 1995). É importante ressaltar que os resultados significativos obtidos com essa estrutura foram específicos para os grupos de animais expostos ao LCEp ou LCEa, mas não ao LCEf. Esses resultados corroboram parcialmente outros trabalhos que estudaram a marcação da proteína após a exposição a esse modelo de ansiedade (Hinks et al, 1996; Silveira et al, 1993; Duncan et al, 1996) e também aqueles obtidos por Bullit (1990), a qual investigou a expressão de Fos no encéfalo de ratos após estimulação nociceptiva.

5. CONCLUSÕES

Em suma, os dados obtidos no presente estudo indicam que:

- A exposição de animais ao LCEp e LCEa elicia analgesia em diferentes testes de nocicepção e que a aversão gerada pela exposição ao LCEa é mantida mesmo na ausência de conflito.
- De modo geral, a exposição aos labirintos com braços abertos (LCEp e LCEa) ou a injeção de ácido resultou numa diminuição no total de entradas no LCE e os animais expostos ao LCEp esquivaram-se dos braços abertos do aparelho independentemente de terem recebido ou não a estimulação álgica.
- A marcação de proteína Fos demonstrou que a aplicação de um estímulo nociceptivo em combinação com a exposição ao LCE resultou na redução da expressão da proteína em várias estruturas encefálicas, mesmo quando os animais foram submetidos a um protocolo de manipulação prévia a fim de se reduzir o efeito da novidade sobre a expressão de Fos. Uma possível explicação encontra apoio no fato de que a própria estimulação nociceptiva poderia estar ativando mecanismos descendentes de controle da dor, que por sua vez atuariam diminuindo a entrada de informações nociceptivas da medula espinhal para estruturas ascendentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. B. Brain mechanisms for offense, defense, and submission. **Behav. Brain Sci.**, v.2, p. 201-241, 1979.

ALHEID, G.; de OLMOS, J. S.; BETTAMINO, C. A. Amygdala and the extended amygdala. In: PAXINOS, G. (Ed). **The Rat Nervous System**. NewYork: Academic Press, 1995, p. 495-578.

ASANUMA, M.; OGAWA, N. Pitfalls in assessment of c-fos mRNA expression in the brain: effects of animal handling. **Rev. Neurosci.**, v. 5, p. 171-178, 1994.

ASANUMA, M.; OGAWA, N.; HIRATA, H.; CHOU, H.; TANKA, K.; MORI, A. Opposite effects of rough and gentle handling with repeated saline administration on *c-fos* mRNA expression in the rat brain. **J. Neural Transm.**, v. 90, p. 163-169, 1992.

BADIANI, A; OATES, M. M.; DAY, H. E.; WATSON, S. J.; AKIL, H.; ROBINSON, T. E. Amphetamine-induced behavior, dopamine release, and c-fos mRNA expression: modulation by environmental novelty. **J. Neurosci.** v. 24. P. 10579-10593, 1998.

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

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control systems Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 309-338, 1984.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. The perception of pain. In: KANDEL, E. I.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. (Eds). **Principles of Neurosciences**. 4. Ed. McGraw-Hill: New York, 2000, p. 473-491.

BEHBEHANI, M. M. Functional Characteristics of the Midbrain Periaqueductal Gray. **Prog. Neurobiol.**, v. 46, p.575-605, 1995.

BELLAVANCE, L L.; BEITZ, A. J. Altered c-fos expression in the parabrachial nucleus in a rodent model of CFA-induced peripheral inflammation. **J. Comp. Neurol.**, v. 366, p. 431-447, 1996.

BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. Studies on the antinociceptive action of α -agonist drugs and their interactions with opioid mechanisms. **Br. J. Pharmacol.**, v. 79, p.125-134, 1983.

BLANCHARD, R. J. & BLANCHARD, D. C. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 39, p. 43-68, 1988.

BLANCHARD, R. J.; GRIEBEL, G.; HENRIE, J. A.; BLANCHARD, D. C. Differentiation of anxiolytic and panicolytic drugs by effects on rat and mouse defense test batteries. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 21, p. 783-789, 1997.

BLANCHARD, R.J.; YUDKO, E. B.; RODGERS R.J.; BLANCHARD, D.C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav. Brain Res.** v. 58, p. 155-165, 1993.

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Beh. Brain Sci.**, v. 3, p. 291-322, 1980.

BRANDÃO, M. L.; MELO, L. L.; CARDOSO, S. H. Mechanisms of defense in the inferior colliculus. **Behav. Brain Res.** v. 58, p. 49-55, 1993.

BRANDÃO, M. L.; TRONCOSO, A. C.; SILVA, M. A. S.; HUSTON, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 225-233, 2003.

BULLIT, E. Expression of c-fos-like proteins as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v.296, p. 517-530, 1990.

BULLIT, E. Induction of c-fos like protein within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation. **Brain Res.**, v. 493, p. 391-397, 1989.

BURSTEIN, R.; FALKOWSKY, O.; BORSOOK, D.; STRASSMAN, A. Distinct lateral and medial projections of the spinohypothalamic tract of the rat. **J. Compar. Neurol.**, v. 373, p. 549-574, 1996.

CARRIVE, P.; LEUNG, P.; HARRIS, J. A.; PAXINOS, G. Conditioned fear to context is associated with increased fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. **Neuroscience**, v. 78, p.165-177, 1997.

CASTILHO, C. M.; BRANDÃO, M. L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A}. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 154-162, 2001.

CASTILHO, V. M.; AVANZI, V.; BRANDÃO, M.L. Antinociception elicited by aversive stimulation of the inferior colliculus. **Pharm. Bioch. Beh.**, v. 62, n. 3, p. 425-431, 1999.

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

CLEMENTE, C.; KEAY, K. A.; OWLER, B. K.; BANDLER, R. Common patterns of increased and decreased Fos expression in midbrain and pons evoked by noxious deep

somatic and noxious visceral manipulations in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 366, p. 495-515, 1996.

COIMBRA, N. C.; BRANDÃO, M. L. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the mesencephalic tectum. **Behav. Brain Res.**, v. 87, p. 97-103, 1997.

CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 49, p. 171-176, 1994.

DARWIN, C. **The expression of emotion in man and animals**. Chicago: The University of Chicago Press, 1965.

DEAKIN, J. F. W.; GRAEFF, F. G. 5-HT and mechanisms of defense. **J. Psychopharmacol.**, v. 5, n.4, p.305-315, 1991.

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

DUNCAN, G. E.; KNAPP, D. J.; BREESE, G. R. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. **Brain Res.**, v.713, p.79-91, 1996.

FANSELOW, M. S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A; BANDLER, R. (Eds). **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. New York: Plenum Press, 1991. p. 151-173.

FARDIN, V.; OLIVEIRAS, J. L.; BESSON, J. M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of the periaqueductal gray matter in the rat. I. The production of behavioral side effects together with analgesia. **Brain Res.** v. 306, p. 105-123, 1984.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (Eds). **Textbook of pain**, Edinburgh: Churchill Livingstone , 1999, p. 309-329. 4. ed.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Endogenous pain control mechanisms. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (Eds). **Textbook of pain**, New York: Churchill Livingstone , 1989, p.206-217.

FRANKLIN, K. B. J.; PAXINOS, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press: California, 1997.

GEBHART, G. F. Descending modulation of pain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 27, p. 729-737, 2004.

GOMES, K. S.; GARCIA, C. A.; PLANETA, C. DA S.; NUNES DE SOUZA, R. L. Fos-like immunoreactivity in the central nervous system in mice simultaneously exposed to

elevated plus maze and nociception. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2004. (submetido)

GRAEFF, F. G. Brain defense systems and anxiety. In: Roth, M.; Noyes, R.; Burrows, G. D. (Eds). **Handbook of anxiety**. Amsterdam:Elsevier, 1990, p. 307-354.

GRAEFF, F. G.; NETTO, C. F.; ZANGROSSI, H. JR. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci. Biobeh. Rev.** v. 23, p. 237-246, 1998.

GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. C. L.; NOGUEIRA, R. L.; AUDI, E. A.; OLIVEIRA, R. M. W. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Beh. Brain Res.**, v. 58, p.123-131, 1993.

GRAY, J. A. & McNAUGAHTON, N. (Eds.) ***The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system***. London: Oxford University Press, 1982.

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

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoreceptor agonist in a maze-exploration model of "fear-motivated behaviour". **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HARRIS, J. A.; WESTBROOK, R. F.; DUFFIELD, T. Q.; BENTIVOGLIO, M. Fos expression in the spinal cord is suppressed in rats displaying conditioned hypoalgesia. **Behav. Neurosci.**, v. 109, p. 320-328, 1995.

HARRIS, J.A. Using c-fos as a neural marker of pain. **Brain Res. Bull.**, v. 45, n. 1, p. 1-8, 1998.

HERMANSON, O.; BLUMQVIST, A. Subnuclear localization of Fos-like immunoreactivity in the rat parabrachial nucleus after nociceptive stimulation. **J. Comp. Neurol.**, v. 368, p. 45-56, 1996.

HESS, W. R. & BRÜGGER, M. Das subkortikale zentrum der affectiven abwehrreaktion. **Helv. Physiol.Pharmacol. Acta**, v. 1, p. 33-52, 1943

HETEM, L. A. B. & GRAEFF, F. G. (Eds). **Transtornos de ansiedade**. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 107-132.

HINKS, G.L.; BROWN, P.; FIELD, M.; POAT, J. A.; HUGHES, J. The anxiolytics CI-988 and chlordiazepoxide fail to reduce immediate early gene mRNA stimulation following exposure to the rat elevated X-maze. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 312, p.153-161, 1996.

HOLMES, A.; RODGERS, R.J. Responses of swiss-webster mice to repeated plus maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.60, p.473-488, 1998.

IKEMOTO, S.; PANKSEPP, J. The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. **Brain Res.**, v. 31, p. 6-41, 1999. *apud* McNAUGHTON, N. & CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neurosci. Biobeh. Rev.**, v. 28, p. 285-305, 2004.

JONES, S. L.; LIGHT, A. R. Electrical stimulation in the medullary nucleus raphe magnus inhibits noxious heat-evoked fos protein-like immunoreactivity in the rat lumbar spinal cord. **Brain Res.**, v. 530, p. 335-338, 1990.

KABBAJ, M.; AKIL, H. Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a c-fos study. **Neurosci.** v. 106. n.3, p. 535-545, 2001.

KEAY, K. A.; BANDLER, R. Deep and superficial noxious stimulation increases Fos-like immunoreactivity in different regions of the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 156, p. 23-26, 1993.

LAMPREA, M. R.; CARDENAS, F. P.; VIANNA, D. M.; CASTILHO, V. M.; CRUZ-MORALES, S. E.; BRANDÃO, M. L. The distribution of fos immunoreactivity in the rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. **Brain Res.**, v. 950, p. 186-194, 2002.

LANG, P. J.; BRADLEY, M. M.; CUTHBERT, B. N. Emotion, motivation and anxiety: brain mechanisms and psychophysiology. **Biol. Psychiatry**, v. 44, p.1248-1263, 1998.

LANTERI-MINET, M.; WEIL-FUGAZZA, J.; DE POMMERRY, J.; MENÉTREY, D. Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-fos and other immediate early gene proteins. **Neuroscience**, v. 58, p. 287-298, 1994.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 4, p. 597-632, 2001.

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

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

LEE, J. H.; BEITZ, A. J. Electroacupuncture modifies the expression of c-fos in the spinal cord induced by noxious stimulation. **Brain Res.**, v. 577, p. 80-91, 1992.

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

LIU, R. J.; QIANG, M.; QIAO, J. T.; Nociceptive c-fos expression in supraspinal areas in avoidance of descending supression at the spinal relay station. **Neuroscience**, v. 85, n. 4, p. 1073-1087, 1998.

LU, Y.; PIREC, V.; YEOMANS, D. C. Differential antinociceptive effects of spinal pioids on foot withdrawal responses evoked by C fibre or Adelta nociceptor activation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 121, p. 1210-1216, 1997.

LU, Y.; SWEITZER, S. M.; LAURITO, C. E.; YEOMNAS, D. C. Differential Opioid inhibition of C- and A δ - Fiber Mediated Thermanociception After Stimulation of the Nucleus Raphe Magnus. **Anesth. Analg.**, v. 98, p. 414-419, 2003.

MACEDO, C. E.; CASTILHO, V. M.; SILVA, M. A. S.; BRANDÃO, M. L. Dual 5-HT mechanisms in basolateral and central nuclei of amygdala in the regulation of the defensive behavior induced by electrical stimulation of the inferior colicullus. **Brain Res. Bull.**, v. 59, n. 3, p. 189-195, 2002

MARKS, I. M. **Fears, phobia and rituals: panic, anxiety and their disorders**. New York: Oxford University Press, 1987.

MELIA, K. R.; RYABININ. A. E.; SCHROEDER, R.; BLOOM, F. E.; WILSON, M. C. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. **J. Neurosci.**, v. 14, n. 10, p. 5929-5938, 1994.

MENDES GOMES, J.; NUNES DE SOUZA, R. L. Papel dos receptores de NMDA e benzodiazepínicos da matéria cinzenta periaquedutal na antinocicepção induzida pelo medo. Araraquara, FCF-UNESP, 2002. 18p. (Relatório de Iniciação Científica, FAPESP-Proc. 02/00736-2).

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Res.**, 2005. Submetido.

MICKZECK, K. A.; NICULINA, E. KREAM, R. M.; KARTER, G.; ESPEJO, E. F. Behavioral sensitization to cocaine after a brief social defeat stress: c-fos expression in the PAG. **Psychopharmacol.**, v.141, n. 3, p. 225-234, 1999.

MILLAN, J. M. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, v. 66, p. 355-374, 2002.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MONNIKES, H.; RUTER, J.; KONIG, M.; GROTE, C.; KOBELT, P.; KLAPP, B. F.; ARNOLD, R.; WIEDENMANN, B.; TEBBE, J.J. Differential induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension: role of afferent C-fibers and 5-HT₃ receptors. **Brain Res.**, v. 966, n. 2, p. 253-264, 2003.

MONTAG-SALLAZ, M.; WELZL, H.; KUHL, D.; MONTAG, D.; SCHACHNER, M. Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg3.1 in the mouse brain. **J. Neurobiol.** v. 38, n. 2, p. 234-246, 1999.

MORGAN, J. L.; CURRAN, T. Stimulus-transcription coupling In the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. **Annu. Rev. Neurosci.** v.14, p.421-451, 1991.

NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R.V.; GRAEFF, F.G; PELÁ, I.R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v. 150, p.300-310, 2000.

OLDS, M. E.; OLDS, J. Approach-avoidance analysis of rat diencephalon. **J. Comp. Neurol.** v. 120, p. 259-295, 1963.

OWEN, J. A.; MILNE, B.; JHAMANDAS, K.; NAKATSU, K. Assembly of an insensitive tail-flick analgesia meter. **J. Pharm. Meth.**, v. 6, p. 33-37, 1981.

PAN, B.; CASTRO-LOPES, J. M.; COIMBRA, A. A c-fos expression in the hypothalamo-pituitary system induced by electroacupuncture or noxious stimulation. **Neuroreport**, v. 5, p. 1649-1652, 1994.

PANDOSSIO, J. E.; MOLINA, V. A.; BRANDÃO, M. L. Prior electrical stimulation of the inferior colliculus sensitizes rats to the stress of the elevated plus-maze test. **Behav. Brain Res.** v. 109, p. 19-25, 2000.

PAPA, M.; PELLICANO, M. P.; WELZL, H.; SADILE, A. G. Distributed changes in c-fos and c-jun immunoreactivity in the rat brain associated with arousal and habituation to novelty. **Brain Res. Bull.** v. 32, n. 5, p. 509-515, 1993.

PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, S. E; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v.14, p.149-167, 1985.

PERTOVAARA, A.; BRAVO, R.; HERDEGEN, T. Induction and suppression of immediate-early genes in the rat brain by a selective alpha-2-adrenoreceptor agonist and antagonist following noxious peripheral stimulation. **Neuroscience**, v. 54, p. 117-126, 1993.

PRADO, W. A. Medicamentos analgésicos de ação central. In: GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S.(Eds). **Fundamentos de Psicofarmacologia**, Atheneu:São Paulo, 1999, p. 175-195.

PRADO, W. A.; ROBERTS, M. H. T. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. **Brain Res.** v. 340, p. 219-228, 1985.

RADULOVIC, J.; KAMMERMEIER, J.;SPIESS, J. Relationship between fos production and classical fear conditioning: effects of novelty, latent inhibition, and unconditioned stimulus preexposure. **J. Neurosci.** v. 18, p. 7452-7461, 1998.

RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N. Peripheral neural mechanisms of nociception . In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (Eds). **Textbook of pain**, 4. ed. Edinburgh: Churchill Livingston , 1999, p. 11-57.

REYNOLDS, D. V. Surgery in rat during eletrical analgesia by focal brain stinulation. **Science**, v. 164, p. 444-445, 1969.

RHUDY, J. L.; MEAGHER, M. W. Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. **Pain**, v. 84, p. 65-75, 2000.

RHUDY, J. L.; MEAGHER, M. W. Negative affect: effects on an evaluative measure of human pain. **Pain**, v. 104, p. 617-626, 2003.

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

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A. (Eds). **Ethology and Psychopharmacology**. Cichester: Wiley, 1994, p. 9-44.

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

ROSEN, J. B.;SCHULKIN, J. From normal fear to pathological anxiety. **Psychol. Rev.**, v. 105, n. 2, p. 325-350, 1998.

RYABININ, A. E.; WANG, Y. M.; FINN, D. A. Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 63, n. 1, p. 143-151, 1999.

SALUM, C.; ROQUE-DA-SILVA, A. C.; MORATO, S. Conflict as a determinant of rat behavior in three types of elevated plus-maze. **Beh. Proc.** , v. 63, n. 2, p.:87-93, 2003.

SANDKÜLLER, J. The organization and function of endogenous antinociceptive systems. **Prog. Neurobiol.**, v. 50, p. 49-81, 1996.

SAWCHENKO, P. E; BROWN, E. R; CHAN, R. K. W.; ERICSSON, A.; LI, H. Y.; ROLAND, B. L.; KOYACS, K. J. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and the Functional Neuroanatomy of Visceromotor Responses to Stress. **Prog. Brain Res.**, v. 107, p. 201-222, 1996.

SETEM, J.; PINHEIRO, A. P.; MOTTA, V. A.; MORATO, S. M.; CRUZ, A. P. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 142, p. 125-133, 1999.

SHENG, M.; GREENBERG, M. E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**, v. 4, p. 477-485, 1990.

SIEGMUND, E; CADMUS, R.; LU, G. A method of evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol.** v. 95, p.729-731, 1957.

SILVEIRA, M. C. L.; ZANGROSSI, H. J.; VIANA, M. B.; SILVEIRA, R.; GRAEFF, F. G. Differential expression of Fos protein in the rat brain induced by performance of avoidance or escape in the elevated T-maze. **Behav. Brain Res.** v. 126, p. 13-21, 2001.

SILVEIRA, MCL; SANDNER, G.; GRAEFF, F. G. Induction of Fos immunoreactivity in brain by exposure to the elevated plus-maze. **Behav. Brain Res.** v. 56, p.115-118, 1993.

SINGEWALD, N.; SALCHNER, P.; SHARP, T. Induction of c-fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. **Biol. Psych.**, v. 53, p. 275-283, 2003.

SINGEWALD, N.; SHARP, T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. **Neurosci.**, v. 98, n. 4, p. 759-770, 2000.

SNOWBALL, R. K.; SEMENENKO, F. M.; LUMB, B. M. Visceral inputs to neurons in the anterior hypothalamus including those that project to the periaqueductal gray: a functional anatomical and electrophysiological study. **Neurosci.**, v. 99, n. 2, p. 351-361, 2000.

TERMAN, G. W.; SHAVIT, Y.; LEWIS, J. W.; CANNON, J. T.; LIEBESKIND, J. C. Intrinsic mechanisms of pain inhibition. Activation by stress. **Science**, v. 226, p. 1270-1277, 1984.

TRAUB, R. J.; SILVA, E.; GEBHART, G. F.; SOLODKIN, A. Noxious colorectal distention induced-c-Fos protein in limbic brain structures in the rat. **Neurosci. Letters**, v. 215, p. 163-168, 1996.

VACCARINO, A.L. et al. NMDA receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia in the formalin test. **Pain**, v.50, p.119-123, 1992.

VANDERWENDE, C.; MARGOLIN, S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed. Proc.**, v.15, p. 494, 1956.

VIANA, M. B; TOMAZ, C; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 49, p. 549-554, 1994.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in the light-enhanced versus fear-potentiated startle. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 9375-9383, 1997.

WALKER, D. L.; TOUFEXIS, D. J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **Europ. J. Pharmacol.**, v. 463, p. 199-216, 2003.

WATANABE, Y.; STONE, E.; McEWEN, B. S. Induction and habituation of c-fos and zif/268 by acute and repeated stressors. **Neuroreport**, v. 5, p. 1321-1324, 1994.

WATKINS, L. R.; MAYER, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Science**, v. 216, p. 1185-1192, 1982

YEOMANS, D. C.; PIREC, V.; PROUDFIT, H. K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: Behavioral evidence. **Pain**, v. 68, p. 133-140, 1996b.

YEOMANS, D. C.; PROUDFIT, H. K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. **Pain**, v. 68, p. 141-150, 1996.

ZANGROSSI, H. JR; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new model of anxiety. **Brain Res. Bull.** v. 44, p. 1-5, 1997.

7. RESUMO

A exposição de animais ao labirinto em cruz elevado (LCE), um modelo animal de ansiedade, resulta na exibição de comportamentos defensivos e antinocicepção, bem como induz a expressão de proteína Fos em várias regiões límbicas em ratos. O presente estudo investigou possíveis correlações neuroanatômicas de estruturas envolvidas na modulação do medo e antinocicepção, em camundongos expostos a diferentes tipos de LCE [fechado (LCEf: quatro braços fechados), padrão (LCEp: dois braços abertos e dois fechados) e aberto (LCEa: quatro braços abertos)] e tratados ou não com um estímulo nociceptivo. A proteína Fos foi utilizada como marcador funcional de ativação neuronal da matéria cinzenta periaquedutal (PAG) (dorsal e ventro-lateral), amígdala (AMY), núcleo intersticial da estria terminal (BNST), núcleo do trato solitário (Sol), hipotálamo dorsomedial (dmHYP), núcleos da rafe [Magno (RmG), Mediano (MnR) e dorsal (DR)], colículo superior (SC) e inferior (IC) e núcleo parabraquial (PB). O Experimento I investigou o efeito da exposição aos diferentes LCEs sobre a resposta nociceptiva de camundongos submetidos ao teste de retirada da cauda (TRC), teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% (TCA) e teste da formalina (TFo). Enquanto a exposição ao LCE produziu resultados inconsistentes no TRC, a exposição ao LCEp e LCEa provocou antinocicepção no TCA e somente a exposição ao LCEa eliciou antinocicepção no TFo. O Experimento II investigou a expressão de Fos em animais submetidos ou não ao TCA e expostos aos diferentes LCEs. Outro grupo, sem qualquer manipulação, foi incluído ao estudo para verificar a expressão basal de Fos. As exposições aos LCEa e LCEp provocaram, respectivamente, antinocicepção e esquiva dos braços abertos sem alterar a nocicepção. Na maioria das estruturas foi encontrado um alto nível da expressão da

proteína no grupo Basal e LCEf. A exposição aos LCEs aumentou a expressão da proteína no dmHYP e na PAG ventrolateral, um efeito que se mostrou independente do estímulo nociceptivo. A injeção de ácido acético tendeu a diminuir a marcação de Fos (em comparação com o grupo correspondente), alcançando significância no PB e MnR. O Experimento III investigou se a manipulação diária (habituação às condições experimentais por 10 dias antes da exposição aos LCEs e do TCA) interfere na expressão de Fos. Um grupo Basal e um somente submetido ao TCA foram incluídos. Semelhante ao Exp. II, os animais se esquivaram dos braços abertos do LCEp, e as exposições aos LCEp e LCEa resultaram em antinocicepção. Em relação ao Exp. II, a expressão de Fos diminuiu na maioria das estruturas, mas o perfil de redução na marcação foi mantido para várias estruturas (Sol, Gi, AMY e PAG) para os animais submetidos ao TCA, com exceção do DR, no qual houve aumento da expressão de Fos no grupo LCEf. A redução na expressão não se deve ao TCA *per se*, pois nos animais submetidos ao TCA e não expostos aos LCEs, houve aumentos na expressão de Fos em várias estruturas (MnR, DR, SC, dmHYP, AMY, CeAMY, BIAMY e PAG). Os resultados do presente estudo indicam que a exposição de animais ao LCEp e LCEa elicia antinocicepção em diferentes testes de nocicepção e que a aversão gerada pela exposição ao LCEa é mantida mesmo na ausência de conflito. É possível que a redução da marcação de Fos provocada em animais expostos concomitantemente aos LCEs e ao TCA esteja associada a inibição em nível espinal da estimulação dos feixes nociceptivos ascendentes provocada pela experiência no LCE.

8. ABSTRACT

The exposure of mice to the elevated plus-maze (EPM), an animal model of anxiety, results in exhibition of defensive behaviors and antinociception. It also induces Fos protein expression in several limbic structures in rats. The present study investigated possible neuroanatomical correlations between the structures involved in the modulation of fear and antinociception in mice exposed to different types of EPM [enclosed (eEPM: four enclosed arms), standard (sEPM: two open and two enclosed arms) and open (oEPM: four open arms)] with or without prior nociceptive stimulation. The evaluation of Fos-like immunoreactivity (FLI) was used as a functional marker of neuronal activation in the periaqueductal gray matter (PAG) (dorsal and ventrolateral), amygdala (AMY), bed nucleus of the stria terminalis (BNST), solitary tract nucleus (Sol), dorsomedial hypothalamus (dmHYP), raphe nuclei [Magno (RMg), Median (MnR) and Dorsal (DR)], superior (SC) and inferior coliculus (IC) and parabrachial nucleus (PB). Experiment I assessed the effect of EPMs exposure under the nociceptive response in three different types of nociception test: tail flick test (TF), writhing test (WT: induced by i.p injection of 0.6% acetic acid) and formalin test (FT). While the EPM exposure produced inconsistent results in the TF, exposure to the sEPM and the oEPM resulted in antinociception in WT. Only the oEPM exposure elicited antinociception in the FT. Experiment II investigated FLI in animals submitted or not to the WT and exposed to the different EPMs (see above). A group without any manipulation to verify the basal expression of Fos was added to the study. Exposure to the oEPM and sEPM provoked, respectively, antinociception and open arm avoidance without any change in nociception. EPM exposure increased protein expression in dmHYP and ventrolateral PAG, an effect that was independent of the

nociceptive stimulation. Acetic acid injection tended to decrease FLI in many structures and a significant effect was recorded in PB and MnR. However, in general, a high level of Fos expression was found in Basal and eEPM groups rendering data interpretation difficult. Experiment III investigated whether diary handling (10 days) would reduce the FLI. Two groups – one group to measure Fos Basal expression and one to measure Fos expression in animals submitted to the WT only – were included to the study. As in EXP II, animals avoided the open arms of the sEPM. Also exposure to sEPM and oEPM provoked antinociception. Compared to Exp. II, FLI was decreased in almost all structures investigated, but as recorded in EXP II, nociceptive stimulation reduced FLI in several structures (Sol, Gi, AMY and PAG) in animals concurrently exposed to EPM. An exception was in the DR, in which an enhancement of Fos expression was revealed in eEPM exposed animals. The reduction in FLI cannot be attributed to the WT *per se*, since an increment of FLI was detected in several structures (MnR, DR, SC, dmHYP, AMY, CeAMY, BIAMY and PAG) in mice submitted to the WT but not exposed to the EPM. Present results indicate that the sEPM and oEPM exposure elicit antinociception evaluated in different chemical nociceptive tests. The antinociceptive response induced by oEPM exposure suggests that conflict situation is not crucial to inhibit pain in mice. It is possible that the FLI reduction recorded in animals exposed concurrently to both EPM and WT is associated with an inhibitory effect of the EPM experience on the nociceptive spinothalamic bundle stimulation induced by WT.

9. ANEXOS

Quadro 1. Número de contorções abdominais exibidas por camundongos submetidos aos três tipos de LCE por 5 minutos e tratados com ácido acético no experimento I.

	LCEf	LCEp	LCEa
	5	6	0
	9	9	3
	24	6	0
	10	3	5
	8	9	9
	17	1	7
	13	12	0
		13	6
		10	3
			3
média	12,3	7,7	3,6
epm	1,43	1,33	0,99

Quadro 2. Dados referentes ao tempo de lambidas (s) de animais expostos aos LCEs no experimento I (Mendes-Gomes & Nunes-de-Souza, 2002)

	LCEf	LCEp	LCEa
Média	140	121	5,9
epm	20,7	15	3

Quadro 3. Tempo de latência de retirada da cauda (s) de animais expostos aos LCEs no experimento I.

LCE fechado				
	LB	L0	L5	L10
	2,9	6	4,65	4,3
	3,5	3,8	3,8	4,05
	5,9	4,4	3,15	4,3
	3,05	6,65	4,12	4,25
	3,6	3,65	6	4,55
	2,55	5,05	3,4	3,9
	5,2	6,05	7,95	4,47
	4	4,1	4,2	5,2
	3,8	4,55	4,45	5,57
média	3,83	4,92	4,64	4,51
epm	0,36	0,36	0,50	0,18
LCE padrão				
	LB	L0	L5	L10

	3,3	2,12	5,6	5,45
	6,8	3,65	4,2	5,4
	3,4	3,3	3,3	2,4
	2,7	4,95	4,25	4,4
	3,7	4,25	5,3	3,6
	3,3	4,05	6,8	4,3
	3,55	4,35	4,3	5,7
	5,9	4,3	3,7	3,5
	3,37	7,9	5,1	6,8
média	4,00	4,32	4,73	4,62
epm	0,46	0,52	0,36	0,45

LCE aberto

	LB	L0	L5	L10
	3,5	4,7	3,45	6,2
	2,02	3,75	2,05	4,3
	3,5	4,45	4,25	4,2
	3,95	4,35	2,2	2,8
	5,1	5,2	4,75	4,4
	3,8	4,4	3,55	4,6
	3,25	6,05	7,55	4,55
	4,45	6,25	4,2	5,45
	3,67	7,15	3,52	3,35
	5,87	5,72	6,2	3,9
média	3,91	5,20	4,17	4,38
epm	0,33	0,34	0,53	0,30

Quadro 4. Dados referentes a análise espaço-temporal dos animais submetidos aos diferentes tipos de LCE, para o experimento II.

LCE fechado sem tratamento										
	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	10	14	120	143	37	41,67	58,33	40	47,66	12,33
	19	15	125	117	58	55,88	44,12	41,66	39	19,33
	14	13	133	133	34	51,85	48,15	44,33	44,33	11,34
	14	17	141	101	58	45,16	54,84	47	33,67	19,33
	19	19	126	174	80	50	50	42	58,00	26,67
	8	7	77	129	94	53,33	46,67	25,67	43,00	31,33
média	14,00	14,17	120,33	132,83	60,17	49,65	50,35	40,11	44,28	20,06
epm	1,84	1,68	9,16	10,13	9,61	2,17	2,17	3,05	3,38	3,20
LCE fechado ácido acético 0,6% i.p.										
	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	10	9	162	81	57	52,63	47,37	54	27	19

	7	3	230	54	16	70	30	76,66	18	5,34
	5	7	59	209	32	41,67	58,33	19,66	69,66	10,66
	6	9	101	156	43	40	60	33,67	52,00	14,33
	9	9	135	126	39	50	50	45,00	42,00	13,00
	2	3	57	234	9	40	60	19,00	78,00	3,00
média	6,50	6,67	124,00	143,33	32,67	49,05	50,95	41,33	47,78	10,89
epm	1,18	1,20	27,11	28,79	7,25	4,73	4,73	9,04	9,59	2,42

LCE padrão sem tratamento

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	0	0	0	300	15	0	0	0	100	0
	6	13	42	191	67	31,58	68,42	14	63,66	22,33
	2	16	25	154	121	11,11	88,89	8,33	51,33	40,33
	4	13	16	192	92	23,53	76,47	5,33	64,00	30,67
	4	14	22	225	53	22,22	77,78	7,33	75,00	17,67
	5	10	46	119	135	33,33	66,67	15,33	39,67	45,00
média	3,50	11,00	25,17	196,83	80,50	20,30	63,04	8,39	65,61	26,00
epm	0,89	2,34	6,94	25,42	18,23	5,19	13,02	2,31	8,47	6,70

LCE padrão ácido acético 0,6% i.p.

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	1	14	1	269	30	6,67	93,33	0,33	89,66	10
	0	9	0	276	24	0	100	0	92	8
	0	5	0	268	32	0	100	0	89,33	10,66
	6	9	65	155	80	40	60	21,67	51,67	26,67
	0	2	0	77	223	0	100	0,00	25,67	74,33
	5	15	26	210	64	25	75	8,67	70,00	21,33
média	2,00	9,00	15,33	209,17	75,50	11,95	88,06	5,11	69,72	25,17
epm	1,13	2,05	10,79	32,61	30,83	6,86	6,86	3,60	10,87	10,28

LCE aberto sem tratamento

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	6	14	78	152	70	30	70	26	50,66	23,33
	3	8	10	248	42	27,27	72,73	3,33	82,66	14
	4	6	74	124	102	40	60	24,66	41,33	34
	6	11	42	199	59	35,29	64,71	14,00	66,33	19,67
	5	7	101	174	25	41,67	58,33	33,67	58,00	8,33
	9	3	145	82	73	75	25	48,33	27,33	24,33
média	5,50	8,17	75,00	163,17	61,83	41,54	58,46	25,00	54,39	20,61
epm	0,85	1,58	19,06	23,70	10,90	7,07	7,07	6,35	7,90	3,63

LCE aberto ácido acético 0,6% i.p.

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	4	5	66	86	148	44,44	55,66	22	28,66	49,33
	1	14	1	202	97	20	80	0,33	67,33	32,33
	4	3	60	32	208	57,14	42,86	20,00	10,67	69,33
	5	1	65	17	218	83,33	16,67	21,67	5,67	72,67
	12	4	160	59	81	75	25	53,33	19,67	27,00

média	5,20	5,40	70,40	79,20	150,40	55,98	44,04	23,47	26,40	50,13
epm	1,83	2,25	25,50	32,89	27,89	11,27	11,27	8,50	10,96	9,30

Quadro 5. Número de contorções abdominais exibidas por camundongos submetidos aos três tipos de LCE por 5 minutos e tratados com ácido acético no experimento II.

	LCEf	LCEp	LCEa
	10	14	4
	15	13	8
	15	14	8
	21	10	7
	21	10	5
	11	12	
Média	14,67	12,17	6,40
epm	1,61	0,75	0,81

Quadro 6. Valores individuais da marcação de Fos/0,1mm² de tecido para as estruturas encefálicas de animais utilizados no experimento II.

Estrutura	Basal	LCEf	LCEf AA	LCEp	LCEp AA	LCEa	LCEa AA
Sol	7,87	11,37	10,75	20,25	6,5	11,87	9,75
	9,75	55,5	7,25		17,25	35,37	35,16
	43,25	31,5		26,62	29,5	36,87	36,75
	12,37	14,87		8,25	1	13,25	
	13,12	16,12		16,62	7,25	22,62	4,25
	8,25	14		3,87	4,75	8,5	3
Gi (-6,48 a -6,72)	1,37	6,5	6,75	9,62	8,25	1,87	3
	4,12	10,25	6,62	6	14,25	2,75	3,5
	23,25	16,5	1,62	2,62	9,75	25,12	10
	2,87	5,25	6,75	4,5	1,25	5	2,62
	3,12	6,25		3,87	2,87	2,62	2,12
	1,25	11,25			0,87	3,87	
Gi (-5,80 a -5,88)	5	7,5	7,12	12,25	7,87	3,37	6,75
	7,87	15,62	4	30,12	10,37	7,75	6,87
	17,87	29,5	8,25	17,37	11,37	26,37	9
	5,37	7,12	3,25	4,12	4,87	9,37	3
	2,75	7,37	4,25	3,62	1	1,37	3,25
	5,5	5,62		3,12	2,12	0,37	1,62
RMg	7,75	2,5	7	7,75	10,5	3,25	8,25
	15	10,75	7,5	11,5	12,5	25,25	9,5
	8,25	26,75	11,5	11,5	26,5	35,75	22
	9,75	9,25	8	4,25	4,5	11,25	15
	9,5	15,75		13,5	7,5	4,75	9,5

	3,25	8,75				7	3,75
PB	7,25	17,75	33,33	20,87	13,75	11,87	27,75
	13,83	27,75	8,75	22,16	27,12	12,66	24
	53,12	33,25	7,37	28,33	13,87	19,25	27,16
	12	16,87	4,75	7,37	6,87	10,62	11,12
	3,25	16,75	4,87	7,87		15,62	13,25
	7	10,62	3,87	7		3,62	1,75
CNF	7	14,87	10,5	31,12	9,12	7,75	1,75
	3,5	6,25	6,37	10,37	12,5	13,59	9,66
	15,5	10,12	5,12	16,25	5,62	12	8,5
	3,87	4,75	2,62	7,5	2	5,5	6,12
	3,5	5,25	1,75	2,87	5,25	5,75	6,25
	2,5	4,87		6,25		4,12	1,62
IC (-4,72 a -4,96)	82,25	27,75	37,62	28,75	26,12	48,62	41,87
	30,25	47,5	44,25	35,62	105,5	57,5	54
	127,62	135	27,37	117,25	116,87	37,75	31,87
	27	13,75	9	12	19,87	34,5	11,12
	23,5	27	11,12	18,25	14,75	43,37	37,87
	38,75	28,75		39,5			
DR	3,25	29,5	20	26	22	18,75	37,25
	9,75	50	42,25	65,25	33,75	47,25	23,5
	37	13,25	23,5	48,25	27,5	64,75	26
	9,5	8,75	11	15,75	27	22,75	22,5
	4,75	15,25	18	24	17,75	15,75	16,75
	3,5		13,5	12,5	10,5	6	4
MnR (-4,48 a -4,60)	14	24,5	23,5	33	21	32,5	25,5
	27,5	35	15,5	14	20	60,5	35
	60,5	70,5	17,5	78,5	55,5	52,5	51,5
	16	32,5	9	16,5	27	43	20
	12	22,5	11	32,5	10	21,5	20
	10,5	27,5	9	19	6,5	15,5	12
SC (-4,48 a -4,60)	35,12	28,37	38,25	29,25	26	45,25	21,25
	40,25	42,12	48,75	59,75	14,62	62	52,25
	20,62	32,12	44,87	56,37	29,12	78,25	35,87
	32,25	32,37	33,5	14,75	15,5	20,25	31,87
		22,87	33,75	23,25		53,75	30,75
			19,5	30,12		34,75	6,5
SC (-4,16 a -4,36)	33,25	28,37	29,37	49	36,87	47,5	52,12
	32,37	61,37	49,87	62,5	116	65,87	55,87

	44,5	71	57	115,5	37	85,87	35,37
	16,25	30,62	52,12	29,25	26,75	35,75	28,5
	21,87	42	27	30,5	39,5	49,25	36,37
	35,37	41,25	14,87	18,37	14,25	8,5	14
MnR (-4,16 a -4,36)	25	37,5	12	28	3,5	35	38,5
	27,5	70,25	23,5	8	19	43,5	38,5
	42,5	35	17,5	66,5	43	64,5	37,5
	12,5	31	18	19	37	63	17
	7,5	52	9	38	41	35,5	14
	9,5		7,5	15,5	14,5	29,5	15
SC (-3,88 a -4,04)	30,87	36,87	42,87	43,37	43,25	65,87	62,87
	32,37	50,25	49,87	62,5	42,12	121,75	35,24
	50,12	82	59,37	87,75	61	29,75	47
	20	42,5	32	35,37	26,87	50,37	34,62
	29	66,12	32,62	37	33,12	32,5	31,62
	9,75	43,12	7,62	6,25	9,25		6,37
AMY	2,62	24,62	14,75	28,62	5,62	15,5	5,87
	3,75	28,25	13,5	24,75	16,75	13,5	14,12
	40,37	65,25	26	36,62	21,75	42,25	32
	16,16	25,62	23,75	28,62	16,5	24,75	57,25
	12,5	37,5	20,37	28,27	31,5	33,75	21
	1,75	7,87	2,37	4,37	2,75		8,12
dmHYP	8,5	23	53,75	49	61,25	43	37,5
	33,75	43	35	56,75	72	30,75	44
	33	58,25	47,5	53	72,12	109,5	36,25
	41,12	60,75	41,62	57	42,12	59,5	57
	42,62	58	37	57,5	28,62	80,87	37,87
	12,62	81,5	17,37	20,25		53,37	57,87
BNST	4	9,12	12,87	20,75	8,75	17,25	19
	7	26,62	28,12	48,75	37	32,16	17,62
	27,12	21,5	22	9,62	13	58,67	26,37
	4,25	11	21,25	11,75	17,87	19	10,5
	10,87	7,25	14,62	6,75	16,25	28,75	7,62
	2,12	7,5	2,75		2	8	7,75
PAG (Bregma: -4,72 a -4,90)							
DM	8,5	5,5	30	9	11,5	25,5	13
	31,5	20,5	25	17	37,5	30,5	29
	21	41		52	18	25,5	22
	11,0	6,0	13,5	9,5			9,5
	8,0	10,5	7,5	11,0	21,0	13,0	27,0
	1,0	5,5	7,5	2,0	4,0	4,0	
DL	12	11,75	16	26,24	13,75	36,24	19,25

	12,24	33	31,74	18	52,75	39,24	37,24
	40,25	76,75	15	43,75	31,25	25,5	33
	12	19	13,5	15,25	25	24,5	
	4,75	19,25		6,25	16,5	4,25	
L	5,5	36	50,75	26,75	33	42,5	36,75
	27,25	44	45,25	53,5	65,5	57,25	54
	46,5	78,5	26,25	61,5	55,25	50	64,5
	33	28	44,5	24,75	34,75	20,5	48,5
	13	25,75	26	33,75	20,75	18,75	38,75
	5,25	26,5		14			
VL	3	14,25	31,5	19	13	27,5	22
	17,25	24,75	28,25	48	46	50,25	36,25
	42,25	58	22,8	38	26,75	35,5	22,25
	14,5	22,3	25,25	16,75	26,25	11,25	25,0
	13,75	17,5	12,25	25,75	10,25	17,75	20,75
	4,5	35,5		14,25			
PAG (Bregma: --4,48 a -4,60)							
DM	16,5	27	30	11,5	24	27	13
	26,5	25	40,5	19	37,5	47	29
	44	62	40,5	51,5	29,5	48,5	45
	18	17	18	17,5	7,5	5,5	21,5
	16,5	24	17	20,5	15,5	29	29
	5,5	5	7	8,5	14	7,5	1
DL	13	23,75	16	35,25	14,25	36	19,25
	17	40,75	28	28,25	52,75	54,5	37,24
	44,5	52,75	16,25	49,75	33,5	58,5	40
	19,25	30	18,25	15	34	28,75	16
	11,75	21	19	27,5	17	19,75	31,25
	2,75	22	9,75	10,5	8,75	13,75	9,5
L	12,5	34,25	50,75	32,5	30,5	47,25	36,75
	37,75	57,75	37,25	53	65,5	48,25	54
	48,25	72	47	61,5	44	73	70,5
	26,5	34,25	32	29,25	46,25	46,5	48,5
	23,25	34,5	45	42,5	34,75	29	35,25
	8,75	34,25	27,5	32,25	22	25,25	25
VL	5,25	45	31,5	32	15	34,25	22
	15	37,5	32	68,25	46	55,75	36,25
	46,25	77,25	38	63	35	74,25	51,5
	17	25,75	28	17,75	31,5	23,5	29
	8,75	18,75	28	29,75	27,75	18,25	21,5
	7,5	29,5	17,5	17	12	21,25	10,75
PAG (Bregma: 4,16 a -4,36)							
DM	37	27	30,5	18,5	18,5	49	30
	26,5	21,5	41,5	17	34	38	46,5
	57	74,5	50	41,5	37,5	50	37
	23	26,5	36,5	36,5	7,5	9,5	18

	15 10,5	27 20,5	23 8,5	18 7	24 21,5	39 8,5	37,5 6
DL	19,5 17 53 18,75 26 4,0	23,75 47 70 26,75 20,5 38,5	24,5 28,5 27,25 29,5 22,75 11,0	27 31 49,75 27 46 13,0	23 41,5 32 23,5 36,5 7,8	39 17,25 78,25 29,75 31,25 9,8	26 46,5 31,25 23,5 31,25 4,5
L	26,5 37,75 50,75 19 17,25 12,75	34,25 52,5 58 40 34,75 40,75	39,75 33,5 49,25 36 33,25 18,5	35 55,5 60 35,25 39,5 36,5	23,5 83 45,5 40,5 35,5 23,5	58 53,75 66,75 62 37,25 24	50,75 52,75 55,75 32,75 37 41,75
PAG (Bregma: -3,88 a -4,04)							
DM	23 38,5 54,0 27,0 11,5 20,5	17,5 28,5 85,0 39,5 38,0 21,0	36,5 41,5 62,0 33,5 22,0 17,0	19 17 41,5 48,0 30,5 16,0	17,5 40,5 33,0 7,0 32,5 11,0	49 38 64,5 10,5 34,5 10,5	29,5 47 40,5 35,0 32,0 7,5
DL	22,25 21,5 43,5 14,0 21,8 10,0	28,25 51,25 65,8 37,3 31,0 43,0	30 28,5 52,8 30,0 21,5 9,0	38 31 49,3 25,8 38,5 14,0	25 33,25 27,5 20,3 26,8 11,0	39 17,25 83,5 28,3 19,8 12,3	22,25 57,5 40,8 28,0 27,0 7,3
L	33 32 53 17,75 21 25,75	40,5 40,75 78 45,5 33,5 45,75	41,5 33,5 59 32,25 40 21,5	49,75 55,5 61,75 35,5 37,75 34	35,25 47 50,5 41,25 37,25 20	58 53,75 77,5 51 34 28,25	32,5 46 60 31 30,25 29,5

Quadro 7. Dados referentes a análise espaço-temporal dos animais submetidos aos diferentes tipos de LCE, para o experimento II.

LCE fechado sem tratamento

ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
25	20	144	107	49	55,56	44,44	48	35,67	16,33
22	20	90	139	71	52,38	47,62	30	46,33	23,67
5	5	139	141	20	50,00	50,00	46,33	47,00	6,67

	10	9	93	109	98	52,63	47,37	31	36,33	32,67
	13	18	104	122	74	41,94	58,06	34,67	40,67	24,67
	9	10	58	185	57	47,37	52,63	19,33	61,67	19,00
	13	16	128	104	68	44,83	55,17	42,67	34,67	22,67
	12	7	188	65	47	63,16	36,84	62,67	21,67	15,67
média	13,63	13,13	118	121,5	60,5	50,98	49,02	39,33	40,5	20,16
epm	2,36	2,14	14,22	12,38	8,15	2,34	2,34	4,74	4,13	2,72

LCE fechado ácido acético 0,6% i.p.

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	2	1	260	34	6	66,67	33,33	86,67	11,33	2,00
	3	4	18	276	6	42,86	57,14	6,00	92,00	2,00
	2	3	28	212	60	40,00	60,00	9,33	70,67	20,00
	2	2	269	15	16	50,00	50,00	89,67	5,00	5,33
	9	1	277	8	15	90,00	10,00	92,33	2,67	5,00
	7	2	268	20	12	77,78	22,22	89,33	6,67	4,00
	4	2	237	35	28	66,67	33,33	79,00	11,67	9,33
	5	6	50	231	19	45,45	54,55	16,67	77,00	6,33
	2	3	27	265	8	40,00	60,00	9,00	88,33	2,67
média	4	2,67	159,33	121,78	18,89	57,71	42,29	53,11	40,59	6,30
epm	0,85	0,53	40,92	39,84	5,65	6,08	6,08	13,64	13,28	1,88

LCE padrão sem tratamento

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	1	22	4	247	49	4,35	95,65	1,33	82,33	16,33
	3	11	46	122	132	21,43	78,57	15,33	40,67	44,00
	7	13	43	147	110	35,00	65,00	14,33	49,00	36,67
	14	12	75	93	132	53,85	46,15	25	31,00	44,00
	8	14	75	130	95	36,36	63,64	25	43,33	31,67
	9	21	48	155	97	30,00	70,00	16	51,67	32,33
	7	18	36	125	139	28,00	72,00	12	41,67	46,33
	11	20	71	73	156	35,48	64,52	23,67	24,33	52,00
	5	6	60	133	107	45,45	54,55	20	44,33	35,67
média	7,22	15,22	50,89	136,11	113,0	32,21	67,79	16,96	45,37	37,67
epm	1,32	1,79	7,61	16,24	10,52	4,71	4,71	2,54	5,41	3,51

LCE padrão ácido acético 0,6% i.p.

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	6	8	80	132	88	42,86	57,14	26,67	44,00	29,33
	4	12	26	224	50	25,00	75,00	8,67	74,67	16,67
	1	10	2	218	80	9,09	90,91	0,67	72,67	26,67
	5	10	62	146	92	33,33	66,67	20,67	48,67	30,67
	1	11	17	176	107	8,33	91,67	5,67	58,67	35,67
	4	9	53	165	82	30,77	69,23	17,67	55,00	27,33
	6	5	110	138	52	54,55	45,45	36,67	46,00	17,33
	3	11	23	187	77	21,43	78,57	8,01	65,16	26,83
	1	12	11	190	99	7,69	92,31	3,67	63,33	33,00
média	3,44	9,78	42,67	175,11	80,78	25,89	74,11	14,26	58,68	27,06
epm	0,69	0,74	12,01	11,04	6,44	5,44	5,44	4,00	3,74	2,14

LCE aberto sem tratamento

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	5	9	76	155	69	35,71	64,29	25,33	51,67	23,00

	7	7	95	64	141	50,00	50,00	31,67	21,33	47,00
	13	5	168	51	81	72,22	27,78	56,00	17,00	27,00
	5	8	76	119	105	38,46	61,54	25,33	39,67	35,00
	2	0	21	0	279	100,00	0,00	7,00	0,00	93,00
	6	4	166	64	70	60,00	40,00	55,33	21,33	23,33
	2	4	60	221	19	33,33	66,67	20,00	73,67	6,33
	13	7	177	74	49	65,00	35,00	59,00	24,67	16,33
	12	6	136	93	71	66,67	33,33	45,33	31,00	23,67
média	7,22	5,56	108,33	93,44	98,22	57,93	42,07	36,11	31,15	32,74
epm	1,47	0,90	18,48	21,52	25,26	7,12	7,12	36,11	31,15	32,74

LCE aberto ácido acético 0,6% i.p.

	ent LO	ent NS	t LO	t NS	t PC	% ent LO	%ent NS	%t LO	%t NS	%t PC
	11	3	170	67	63	78,57	21,43	56,67	22,33	21,00
	13	8	124	71	105	61,90	38,10	41,33	23,67	35,00
	11	9	152	91	57	55,00	45,00	50,67	30,33	19,00
	8	7	89	96	115	53,33	46,67	29,67	32,00	38,33
	14	7	131	77	92	66,67	33,33	43,67	25,67	30,67
	10	3	162	30	108	76,92	23,08	54,00	10,00	36,00
	11	4	141	60	99	73,33	26,67	47,00	20,00	33,00
	3	5	35	193	69	37,50	62,50	11,78	64,98	23,23
	9	5	149	53	98	64,29	35,71	49,67	17,67	32,67
	11	1	127	8	165	91,67	8,33	42,33	2,67	55,00
média	10,10	5,20	128,00	74,60	97,10	65,92	34,08	42,68	24,93	32,39
epm	0,96	0,80	12,61	15,61	9,83	4,83	4,83	4,19	5,26	3,27

Quadro 8. Número de contorções abdominais exibidas por camundongos submetidos aos três tipos de LCE por 5 minutos e tratados com ácido acético no experimento II.

	LCEf	LCEp	LCEa
	21	9	9
	16	12	8
	19	12	14
	16	8	16
	20	11	8
	12	14	11
	18	17	7
	11	9	17
	14	12	16
			3
média	16,33	11,56	10,90
epm	1,17	0,93	1,48

Quadro 9. Valores individuais da marcação de Fos/0,1mm2 de tecido para as estruturas encefálicas de animais utilizados no experimento III.

Estrutura	Basal	Ácido	LCEf	LCEf AA	LCEp	LCEpAA	LCEa	LCEa AA
Sol	6,5	1,25	15,75	11,12	15	1,25	22,25	17,5
	18	2,25	11,75	6,37	4,5	2,75	7	4,5
	18,5	1,5	29,25	16	17,75	3	15,25	3,25
	13,37		8,5	11,25	13,75	3,12	6	2
	9,62		8,25	4,87	10,75	1,75	15,25	6,37
	10,12			1,5	5,37	1,62	16,62	1
								9,12
Gi (-6,48 a -6,72)	3,62	0,75	4,5	3,25	2	2,62	4	0,62
	8,5	0,5	3,37	1,37	4,32	3,12	5,37	1,25
	3,12	0,62	6,62	0,87	3,62	3	4,25	1,25
	4,25		1,37	0,75	1,37	1,37	3,37	1,5
	4,25		6,37	0,5	1,37	0,5	3,75	1,25
	1		2,83		1,25	0,5	1,12	1,37
	2,25							0,87
Gi (-5,80 a -5,88)	4,62	1,25	3	2,12	4	1,5	3,12	3,12
	1,25	3,75	3,37	2,5	2,5	2,62	6,25	0,37
	5	1,87	3,87	4,25	3,37	0,87	3,25	1,25
	3,62		1,5	0,25	2,12	1,62	5,37	1,5
	3,5		5	0,37	1,75	0,25	4,25	3,87
	4,25		1,62		2,25	0,5	2,87	1,37
	2							0,37
	1,37							
RMg	3,5	2,5	11,25	3	2,75	5,5	2,75	2,5
	0,75	1,75	7,5	3,5	2,75	1	8,5	3,75
	2,75		12	2	8,75	6,5	3,5	2,25
	0,5		0,5	1,25	2	1,75	3,5	5,25
	3,25		3,25	0,25	5	0	7,5	6,5
	1,75		2		2,25	3,25	2,75	3
	1,25							
	1,5							
mPB	3,25	13	4,25	9,5	6,75	5,25	6,75	4,5
	4,5	3,5	11	3	3,5	3,75	3,5	8,25
	2	1,37	3,5	4	3,25	3	9	3
	6,75	5,5	7,5	3,75	3	2,25	3,5	3,5
	12,75		7	2,5	10	2,75	9,25	4,5
	8,25		3		9,5	1,5	4,5	1,5
	0,5							2
	1,00							
IPBe	5	32	15,75	17,5	16	20	21,5	30,75
	10,5	62	19,5	8,5	6	8,5	7,25	21,25

	32,25	3,75	9	9,75	15,25	15,5	20,75	26,5
	12,75	32	10,25	13	6,5	5,66	5,75	41
	10		8	6,5	20,75	6,5	12,25	55,55
	4		7,75		10,5	9,25	2,25	3,75
	13,25							5,25
	16,00							
IPBS	4	84,5	12	17,5	10,5	23,75	15	13,25
	6,5	10	20,75	11,5	4,75	9,5	5,5	45
	55,75	20,75	7,5	7,25	3,25	7	18,5	8
	6		6,5	8,5	2,5	4	3,25	11,5
	5,25		2	5,25	28,25	0,75	7,75	27,5
	6,25				6	10,5	2,5	2
	14,25							2
	22,5							
dIC	23,62	12,25	41,87	9	16,25	3,37	38,12	11,37
	16,62	29	29,62	7,87	13,87	6,62	3,62	5,37
	14	13,75	19,37	9,87	18,12	33,25	12,37	13,75
	11,75	22,87	3,62	13,87	16,5	1,62	12,25	10,25
	21,5		10,5	2,12	9,25	2,37	17	6,5
	7,5		1,12	2,12	18,5		10,62	3
	11							
	22,62							
CIC	12	8	48,37	6,75	11,75	3,87	15,62	12,33
	14,87	24,62	12,62	12,62	8,37	3	2,12	4
	13,75	4,25	8,5	3	9,12	7	4,5	8,37
	11,83	12,37	8,37	2,25	6,75	3,5	8,37	5,5
	11,25		9,12	2,87	2	6,75	5,5	2,37
	4,25		1,37		2			2,37
	6,37				9,12			
	26,37							
eIC	24,5	5,75	64,12	11,75	37,12	15	57	23
	26,25	22,25	28,5	28,25	25,37	12,87	9,5	15
	35,37	4	13,87	22,37	34	31,37	20,12	37,75
	25,25	7,25	28,12	14,87	25,12	13	27,75	12,37
	24		22,12	11,5	23,87	14,37	12,25	7,37
	15,12		5	7,87	7,87			12,12
	4,12				14,62			3,25
	24,75							
IC (-4,72 a -4,96)	26,62	31,5	58,75	12,75	25,12	12,62	51,25	14,75
	34,37	9	38,87	26,5	23,87	10,37	7,5	18,16
	36	18,75	27,12	18,75	28,75	39,12	22,37	50,37
	24,75		13,62	20,5	27,87	9,37	27	14,37
	31,5		23,62	5	21,87	8,75	12,37	1,87
	20,37		3,62	11	12,12			9
	12,87							8,5
	34							

DR	10	15,25	7,5	9,75	7,25	8,25	4	9,75
	5,5	13,75	10,75	3,25	3	14,25	4,75	7,37
	0,75	9,5	14,5	7,25	3,25	15	8,5	7
	1	11	5,25	3,25	5,75	9	1,5	5,75
	3,25		6,75	2,5	4	17	2,75	16,25
	1		1	4,75	1,25	7,75	8,25	2,5
	3				5,25	2,75		7
	5,25							
MnR (- 4,48 a – 4,60)	3,5	30,5	20	10	13,5	4,25	16,75	8,25
	6	8,5	16,75	3,75	3,75	13,75	17,5	14,75
	8,25	7,75	9,25	3,5	10,5	2	2,75	3
	1	10,75	6	1,75	2,5	0,75	2,25	4
	4		15,75	2	2,75	8,25	33	11,75
	0,75		1	3,75	3,5	4	7,25	0
	3					2,25		5,5
	2,75							
SC (-4,48 a –4,60)	17,25	32,37	17,75	9,5	12	2,12	9,62	14,5
	17,75	17	20	11,5	10,37	1,25	2,75	4,62
	26	23,75	27,12	8,62	3	11,5	6,5	8,25
	7,37		3,12	7	7,25	1,12	8,87	8,87
	12,75		5,37	4,12	7,12	7,12	9,75	12,75
	4,12		0,5	3,12	3,25	7,12	9	1,62
	9,75				10,5	5		3,37
	9,37							
EIC(-4,48 a –4,60)	16,5	10,87	34,25	11,37	27,5	5,62	24,12	14,62
	23,5	11	5	14,37	14,75	11	5,87	1,87
	32	5,87	6,87	21,12	21,87	22,37	12,5	16,75
	10,87	16,25	20,12	10,25	26,5	3	14,62	4,25
	14,87		9,37	5,12	9,87	12,62	5,37	0,87
	7,25		3,25	4,37	3,62	7,75	4	6,37
	5,25				17,62	6,5		
	15,00							
SC (-4,16 a –4,36)	14,16	18,37	22,87	9,5	19,12	12	13,5	16,12
	8	18,12	26	4,62	9,87	11,75	5,5	9,37
	3,12	16,5	31,37	5,25	3,75	14,25	4,62	3,62
	5,87	27,12	6,87	5,25	4	2,37	17,75	12,87
	9		14,87	3,25	3,25	8,87	9,37	18,62
	2,25		0,62	1,25	3,12	3,5	9,75	0,37
	5,5				11,87	2		1,12
	7,50							
MnR(- 4,16 a – 4,36)	1,5	11,75	9,5	6,62	14,12	5,12	25,25	19,5

	11,5	10,75	11,5	4,25	2,62	8,87	15,75	8,62
	10,5	8,25	11,25	5,5	8,75	9	3,5	2,75
	2,25	18,25	15,25	2,75	7,25	0,87	9,75	6
	7,5		13	4,75	5	13	21,5	13,75
	0,5		2	6,25	10,75	5,25	7,25	3
	1					6,5		4,25
	3,25							
SC(-3,88 a -4,04)	9	26	18,5	10	10	6,87	15,62	11
	19,37	24,62	9,5	8,25	1,87	6,75	5,5	1,12
	9,75	12,75	28,37	9,62	2	11,62	3,62	1,87
	1,87	24,12	5,37	5,5	1,5	2,12	15,37	6,25
	4,12		19,75	2,75	2,87	4,12	9,37	8,62
	2		0,5	2,12	0,62	2	5,37	0,5
	5,75				2,25	0,5		1,37
	6,75							
dmHYP	13,5	61,87	48,87	28,5	24	16,25	27,87	10,5
	14,5	55,62	3,75	3,5	22,25	21,87	25	18,25
	11,5	53,5	8,37	20,25	17,75	8,37	4,87	11,75
	7,12	56	15,25	6,25	7,12	15	12,75	4
	10,75		22,75	19,75	15,87	18,75	20,12	10,37
	10,87		4,87	7,75	8,75	10,62	27,5	10
	11,12				14,37			36
	32,16							
AMY	1,37	20,66	1,75	5	1,75	5	3,75	0,75
	3,25	18,5	7,25	3,37	4,25	0,87	7,66	9,5
	4,75	20	3,87	2,66	4,37	2,25	3,5	4,66
	0,75	18,75	2,25	2,5	5,5	2,12	2	4,87
	1,37		8,5	4	9	23,25	18,62	9,25
	0,5		5,37		14,75	1,75	10,37	3,25
	1,12							2,5
	6,37							
CeAMY	4	37,33	0	4	0	13	7	6
	8	49	14	3,5	3	0	8	9,5
	12,75	68	6,5	38	1,66	3	2,5	12
	4	43	5,75	7	6	5,5	0,5	9
	0,75		6	1,5	2	24	5	4
	1		5		11,25	1	4,25	1
	1,5							5
	3,25							
BIAMY	3,25	18,66	2	5,5	2,5	6,5	5,75	0
	3,5	21	11,5	4	9	1,33	9	15
	4,75	16	5,75	3,5	6,75	3,5	4,25	5,66
	0,25	15	2,25	3,25	3,75	2,5	3,5	5
	0,75		10,5	5,25	9,25	18	25,75	15
	1		8		12,66	3,5	14,75	4,25
	1,5							3
	1,50							

PAG (Bregma: -4,72 a -4,90)								
DM	8	11	1,5	2	5	0	3,5	3,5
	6	9	14	1,5	1	1	1,5	0
	2,5	6	7	5,5	5	12,5	1,5	2
	4	30	2	4	5,5	1	0,5	3,5
	3,5		1	1	5	0,5	7,5	4
	0		1	1	3,5		3,5	1
	1,5				3			2,5
	4,50							
L	7,75	17,75	11,5	19,25	6	2,75	6	7,5
	5	37,75	24,75	1,25	18,25	1,75	3,5	17,5
	6	15,5	38,75	9	6,5	11,75	10	24
	6,75	21,25	19	4,25	8	10	6,5	3,87
	6,5		5,75	6,5	9,5	2,5	2,75	4,75
	1,5		1,5	1,75	8		7,5	1,25
	4				2,5			10,25
	27,5							
VL	0,75	22,75	5,5	1,75	5,75	1,5	1,5	5,25
	6,25	18,5	12,25	2,25	3,75	3	3,5	7,25
	6,75	9,5	16,75	8,25	3,75	14,25	3,5	6,75
	4	33,75	8	1,25	4,75	1,75	3,5	2
	4,5		5,75	1	4,75	2,25	3	4
	0,5		1,5	3	2,25		5,75	1
	2				4,75			1,75
	6,50							
PAG (Bregma: --4,48 a -4,60)								
DM	9,5	33,25	19	9	9	0	3,5	4
	8,5	13,25	5,5	0,5	0,5	10	0,5	5
	5,5	19,25	15,5	2	8,5	19	7	13
	12	17,5	7	5	17,5	1,5	1	13
	6		3	2	3,5	27	3,5	6,5
	1		1	1,5	2	6,5	2,5	0,5
	5,5				12,5	1,5		3
	13,00							
DL	6,25	33,25	13,75	7,5	5,75	7,25	5	5,75
	7,5	13,25	14	7,5	8,75	8,75	5,5	34,25
	7	19,25	34,75	5	9,75	7,25	18,5	13,25
	6,5	17,5	16,25	5,75	14,75	8,5	8,25	10
	5,5		8,75	4,25	2,25	16,25	2	3,25
	2,25		1,5	2,75	2,5	9,25	7,25	7,75
	5				5	5,25		2,75
	14,25							
L	19	42,75	36	37,5	22,5	16,5	13	18
	7,75	20,5	24	5	15,75	19	13,5	31
	12	19,75	32,5	7,75	23,5	16,25	16,5	20
	10,5	20,5	22	7,25	15,75	11,25	9,25	13,5
	10,5		12,5	10	7,5	11,75	5,5	3,75
	7,25		2	1,25	10,5	23,75	20,75	15

	17				15,75	9,5		9,5
	19,25							
VL	9	31	15,5	15,25	17	5,75	5,25	11
	7,75	18,25	15,5	4,75	9,25	13,5	5,25	20,25
	6,25	11,25	22	3,25	5,75	16,25	5,25	12,25
	2,5	18	10,25	2,25	4,5	7,5	3,5	5,75
	9,75		9,75	7,25	4,25	9,5	1,75	3
	7		2,75	1,5	4,75	7,25	17,5	7,75
	10,5				12	4		7,5
	9,00							
PAG (Bregma: 4,16 a -4,36)								
DM	7	19	22	8	10	1	5,5	8
	12	14	9,5	0,5	9,5	10	8	2,5
	9,5	19	19,5	5,5	7	15,5	5,5	3,5
	4,5	42	11	6,5	19	2,5	10,5	14
	10,5		9	2,5	2,5	35	4	9,5
	2		3,5	3	2	4	3	4,5
	8				8,5	3,5		0,5
	18,50							
DL	3,33	19	13,5	9,5	6,75	6,5	8,25	8,75
	5	14	10	0,25	7,5	5,25	6,25	5,75
	2,75	15,75	27,5	0,75	5,5	12,25	8,75	2,75
	2,75	18,75	10,5	1,25	14,5	2,5	10,5	8,25
	6,25		7	2,5	3	19,5	4,5	2,75
	1,5		0,25	1	2,25	3,75	7,75	2,25
	3				7,75	4,5		0,5
	6,25							
L	17	46,25	30,25	26,75	31,25	30,25	20,5	31,25
	9	26,75	20	2,75	20,25	22	12,75	13,25
	12	25,75	40,25	2,5	12,75	19,5	16	18,5
	7,25	18,75	22	9,75	24,75	10,75	29	27,75
	14		23	8	6,25	15	5,25	2,5
	10,5		2	2	9,25	15,75	22,5	6,25
	11,5				23,25	5,25		3,25
	17,50							
PAG (Bregma: -3,88 a -4,04)								
DM	11	20	20	9	13	2	4,5	8
	10,5	11	3,5	0	5	8,5	3	7
	9,5	19	4,75	3,5	8	23,5	7,5	4
	8	36,5	10	4,5	8,25	2	8,5	7,5
	11		5,75	3,5	2,5	21	1,5	3
	4		1	4	1	4	6	0,5
	8,5				4	3,5		3,5
	12,50							
DL	8,5	19,5	16	9,5	11,25	5,75	7	10
	7,25	11,5	7,5	2	8,25	14,5	7,25	7,75
	2,5	24,75	13,5	1,75	8,25	10,25	18,5	1,25

	2,5	17,75	7,25	1,25	15,25	4	8,5	10,75
	6		10,25	4	3	15,25	3,75	1,5
	1		1	0,25	1,5	5,25	7	3,5
	2,5				3,5	1,25		2
	6,75							
L	24,5	41,5	35,5	26	35,25	35,25	29,25	31,5
	7,75	33,75	15,25	3,5	21,75	34,25	31,25	19,25
	16	28,75	29,75	3,5	19,25	25,5	24,5	19
	3,5	22	23,25	8,75	32,75	13,5	29,75	20,25
	17		23,5	10,25	6,25	19,5	7,75	0,5
	4,5		2,5	0,5	7	10,75	22	9,25
	12,25				15,75	3,25		6,5
	10,50							

Quadro 10. Número total de entradas no 1º, 5º e 10º de exposição ao LCEf.

1º DIA	5º DIA	10º DIA
8	8	8
3	3	3
5	5	5
7	7	7
10	10	10
8	8	8
11	11	11
6	6	6
7	7	7
11	11	11
10	10	10
3	3	3
1	1	1
12	12	12
6	6	6
4	4	4
9	9	9
12	12	12
1	1	1
11	11	11
2	2	2
4	4	4
3	3	3
1	1	1
5	5	5
1	1	1
4	4	4
11	11	11
6	6	6

12	12	12
10	10	10
2	2	2
4	4	4
2	2	2
5	5	5
10	10	10
3	3	3
11	11	11
12	12	12
8	8	8
2	2	2
1	1	1
4	4	4
3	3	3
3	3	3
10	10	10
8	8	8
6	6	6
12	12	12
11	11	11
2	2	2
7	7	7