

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA RIBEIRO BARROSO

ANÁLISE DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS PARA O ESTUDO DO
COMPONENTE AFETIVO E DA MODULAÇÃO DA DOR OROFACIAL
AGUDA EM DIFERENTES CONTEXTOS SOCIAIS.

CURITIBA

2019

AMANDA RIBEIRO BARROSO

ANÁLISE DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS PARA O ESTUDO DO
COMPONENTE AFETIVO E DA MODULAÇÃO DA DOR OROFACIAL AGUDA EM
DIFERENTES CONTEXTOS SOCIAIS.

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no
curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Geremias
Chichorro

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Barroso, Amanda Ribeiro

Análise das vocalizações ultrassônicas para o estudo do componente afetivo e da modulação da dor orofacial aguda em diferentes contextos sociais. / Amanda Ribeiro Barroso. – Curitiba, 2019.
63 p.: il.

Orientador: Juliana Geremias Chichorro
Coorientador: Roberto Andreatini

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Dor orofacial 2. Interação social 3. Empatia I. Título II. Chichorro, Juliana Geremias III. Andreatini, Roberto IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.0472



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **AMANDA RIBEIRO BARROSO** intitulada: **Análise das vocalizações ultrassônicas para o estudo do componente afetivo e da modulação da dor orofacial aguda em diferentes contextos sociais.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Abril de 2019.

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UFPR)

JÓICE MARIA DA CUNHA

Avaliador Interno (UFPR)

Às minhas irmãs e à Leandra, mulheres fortes e determinadas, que são um tesouro na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A toda grandeza e ajuda que recebemos no caminho que torna a vida cheia de gratidão.

Aos meus pais, Mário Átila e Elaine, pelo incondicional amor e confiança.

Às minhas irmãs, Bruna e Marina, que são fonte de luz na minha vida.

À minha namorada Leandra, por todo o companheirismo e amor.

À minha admirável orientadora Juliana Chichorro, por colocar excelência em tudo que realiza. Você engrandece as pessoas.

À minha querida amiga Erika, por sua criatividade, empenho, confiança, ensinamento e encorajamento desde o início desse trabalho.

À Joelle e ao Carlos, que se tornaram amigos encantadores.

Às minhas amigas, Thaís e Marina, pelo carinho e suporte de cada dia.

À adorável professora Joice e aos amigos Daiany, Evelize, Aléxia, Eduardo, Darciane e Laura por tornar o laboratório incrível.

Ao professor Roberto Andreatini e a doutoranda Camila que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

À minha tia Cida, por me guiar com sua sabedoria.

A todos os profissionais do Departamento de Farmacologia.

A todos os animais que permitiram a realização desse estudo.

À Universidade Federal do Paraná pela qualidade de ensino e pela oportunidade de crescimento profissional.

À CAPES pelo financiamento.

“Hoje sei que somos corresponsáveis pela realidade em que vivemos, pelo mundo em que estamos e que não adianta reclamar, é preciso agir para transformar.”

Monja Coen

RESUMO

A dor é uma experiência multidimensional, que envolve não somente os aspectos sensoriais-discriminativos, mas também os aspectos cognitivos e afetivos. Além disso, a dor é compreendida como um fenômeno social, que pode sofrer modulações em diferentes contextos sociais através de habilidades empáticas. Do mesmo modo, as vocalizações ultrassônicas (USVs), conhecidas por função comunicativa que refletem estados emocionais, podem ser moduladas e induzidas em diferentes contextos sociais. Especificamente, as vocalizações de 50-kHz e 22-kHz são emitidas em contextos positivos e negativos, respectivamente, e podem provocar o contágio emocional, expressão básica da empatia, definido pela correspondência dos estados emocionais entre um alvo e um observador. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a emissão de vocalizações ultrassônicas representa um parâmetro para o estudo do componente afetivo em modelos de dor orofacial aguda, bem como uma ferramenta para o estudo da modulação da dor em ratos em diferentes contextos sociais. Para isso, foi avaliado o comportamento de *grooming* facial e as emissões de USVs durante 30 minutos após a injeção de formalina orofacial (2,5%). Foram avaliados ambos os parâmetros no animal isolado e em diferentes contextos sociais como entre familiares, familiares separados por uma barreira visual, não-familiares e entre ratos machos na presença de fêmeas. Nossos resultados demonstraram que a injeção de formalina orofacial em ratos foi capaz de induzir concomitantemente as emissões de USVs de 22-kHz e o comportamento de *grooming* facial e ambos os parâmetros foram reduzidos pelo pré-tratamento com morfina. No contexto familiar, os ratos tratados com formalina não tiveram modificações nos parâmetros avaliados pela presença do observador, entretanto, na análise dos observadores foi demonstrado o contágio emocional da dor (i.e. aumento do *grooming* facial e redução das USVs apetitivas). Esse comportamento não foi visto em observadores na presença de demonstradores familiares separado por barreira visual bem como nos ratos não-familiares, indicando a importância do contato visual e da familiaridade no contágio emocional da dor. Além disso, os ratos tratados com formalina na presença de observadores não-familiares diminuíram o comportamento nociceptivo e demonstraram aumento da emissão de vocalizações aversivas. A presença das fêmeas reduziu a emissão de USVs aversivas e o comportamento nociceptivo, mas aumentou o número de vocalizações apetitivas, as quais foram reduzidas quando os animais receberam a injeção de formalina. Nossos resultados indicam que a análise de USVs pode ser uma medida útil e adicional na avaliação da dor orofacial e para o estudo da modulação da dor em diferentes contextos sociais. Sugerimos que o contágio emocional da dor depende da familiaridade e do contato visual e a analgesia pode ser resultado da presença de um rato não-familiar ou de uma fêmea, devido a razões que ainda precisam ser exploradas.

Palavras-chave: Teste da formalina. Interação social. Contágio emocional. Vocalizações apetitivas. Vocalizações aversivas.

ABSTRACT

Pain is a multidimensional experience, involving not only the sensory-discriminative aspects, but also the cognitive and affective aspects. In addition, pain is considered as a social phenomenon, which can be modulated in different social contexts through empathic abilities. Likewise, ultrasonic vocalizations (USVs) are well known for their communicative function and ability to express emotional states, which maybe modulated and induced by different social contexts. Specifically, 50-kHz and 22-kHz USVs are emitted in positive and negative contexts, respectively, and can induce emotional contagion, a basic expression of empathy, which is defined by the correspondence of the emotional states between a target and an observer. Thus, the aim of the current study was to evaluate if the emission of ultrasonic vocalizations represents a parameter for the study of the affective component of acute orofacial pain and if it represents a tool for the study of pain modulation in rats exposed to different social contexts. For this, the facial grooming behavior and USV emission were analyzed during 30 minutes after orofacial formalin injection (2.5%). Both parameters were analyzed in isolated rats and in different social contexts: cagemates, cagemates separated by visual barrier, non-cagemates and in the presence of female rats. Our results demonstrated that orofacial formalin injection in rats was able to induce concomitant emission of 22-kHz USVs and facial grooming behavior and the pre-treatment with morphine reduced both parameters. In the cagemate context, the formalin-injected rats in presence of an observer did not show differences in both parameters evaluated, but the observer showed emotional contagion of pain (i.e. increased facial grooming and reduction of appetitive calls). However, the emotional contagion of pain was not seen in observers in the presence of a cagemate separated by visual barrier or non-cagemate demonstrators, indicating the importance of visual contact and familiarity in the emotional contagion of pain. In addition, formalin-injected rats in the presence of a non-cagemate observer decreased the nociceptive behavior and increased the emission of aversive vocalization. Lastly, in the presence of female rats, males reduced the emission of aversive USVs and nociceptive behavior, but increased the number of appetite USVs, which were reduced when the animals received the formalin injection. Our results indicate that USV analysis may represent a useful and additional measure in the evaluation of orofacial pain and for the study of pain modulation in different social contexts. We suggest that emotional contagion of pain depends on familiarity and visual contact and analgesia may be a result of social interaction with a non-cagemate or with a female, due to reasons that remain to be explored.

Keywords: Formalin test. Social interaction. Emotional interaction. Appetitive vocalization. Aversive vocalization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AVALIAÇÃO DA EMISSÃO DE USV E COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL.....	29
FIGURA 2-	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR DE ANIMAIS ISOLADOS.....	32
FIGURA 3-	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR NOS DEMONSTRADORES.....	34
FIGURA 4-	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÕES DE USVs NOS RATOS OBSERVADORES FAMILIARES.....	35
FIGURA 5-	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR NOS DEMONSTRADORES FAMILIARES SEPARADOS POR BARREIRA VISUAL.....	37
FIGURA 6-	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÕES DE USVs EM RATOS OBSERVADORES FAMILIARES SEPARADOS POR BARREIRA VISUAL.....	38
FIGURA 7-	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR NOS DEMONSTRADORES NÃO-FAMILIARES.....	40
FIGURA 8-	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÕES DE USVs EM RATOS OBSERVADORES NÃO-FAMILIARES.....	41
FIGURA 9-	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR EM RATOS MACHOS NA PRESENÇA DE UMA FÊMEA.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PRINCIPAIS RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÃO DE USV ENTRE OS GRUPOS.....	44
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ACC	Córtex cingulado anterior
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
BK	Bradicinina
Cav1.2	Canais de cálcio 1.2 (voltage dependentes)
Cm	Centímetro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
C1	Cervical 1
C2	Cervical 2
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CFA	Adjuvante completo de Freund
EPM	Erro Padrão da Média
g	Grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
i.p	Intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
Kg	Quilograma
kHz	Quilohertz
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
ms	Milissegundo
RVM	Bulbo rostral ventromedial
s.c	Subcutâneo

Sp5	Núcleo do trato espinhal
Sp5C	Núcleo do trato espinhal caudal
Sp5I	Núcleo do trato espinhal interpolar
Sp5O	Núcleo do trato espinhal oral
USV	Vocalização ultrassônica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DOR OROFACIAL.....	13
1.2 TESTE DA FORMALINA OROFACIAL	15
1.3 ASPECTO AFETIVO DA DOR.....	16
1.3 DOR E COMUNICAÇÃO SOCIAL.....	17
1.5 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS (USV).....	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODO	25
3.1 ANIMAIS.....	25
3.2 DROGAS E SOLUÇÕES.....	25
3.3 TESTE DA FORMALINA OROFACIAL E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL	25
3.4 AVALIAÇÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS (USVS).....	26
3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	27
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4 RESULTADOS	31
4.1 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E DAS EMISSÕES DE USVs INDUZIDAS PELA FORMALINA NOS RATOS ISOLADOS.....	31
4.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E DAS EMISSÕES DE USVs INDUZIDAS PELA FORMALINA EM RATOS FAMILIARES	33
4.3 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E DAS EMISSÕES DE USVs INDUZIDAS PELA FORMALINA NOS RATOS FAMILIARES SEPARADOS POR UMA BARREIRA VISUAL	35
4.4 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E NAS EMISSÕES DE USVs INDUZIDAS PELA FORMALINA EM RATOS NÃO-FAMILIARES	38
4.5 INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO SOCIAL COM UMA FÊMEA NO COMPORTAMENTO DE <i>GROOMING</i> FACIAL E EMISSÃO DE USVs INDUZIDOS POR FORMALINA EM RATOS MACHOS.....	41
4.6 RESUMO DOS RESULTADOS.....	44

5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO I – CERTIFICADO DE CURSO TEÓRICO SOBRE MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR OROFACIAL

Como uma das regiões mais inervadas do corpo, a região orofacial é conhecida por apresentar condições frequentes de dor aguda e crônica, além de apresentar grande importância na expressão de emoções, funções sensoriais e atividades cotidianas (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017). Além disso, o sistema sensorial trigeminal apresenta anatomia única envolvendo o gânglio trigeminal e seus núcleos localizados no tronco cerebral, vias para a condução de sensações faciais como a temperatura, toque, propriocepção e nocicepção (WAITE; ASHWALL, 2012).

A região orofacial é inervada principalmente pelo nervo trigêmeo, ou V par craniano, que se divide em três ramificações denominadas: oftálmica, maxilar e mandibular. O ramo oftálmico inerva a órbita ocular, mucosas sinusais, cavidade nasal, testa, dentre outras estruturas. O ramo maxilar inerva regiões tais como as porções laterais do nariz, lábio superior, parte da cavidade oral e nasal, palato, maxilar superior e arcada dental superior. Com função motora e sensitiva, o ramo mandibular inerva músculos mastigatórios e estruturas como a gengiva, queixo, bochechas, arcada dental inferior, assoalho da boca e dois terços anteriores da língua (WAITE; ASHWELL, 2004; FRIED *et al.*, 2001).

As fibras aferentes, de acordo com o calibre, velocidade de condução e característica sensorial, podem ser do tipo A α , A β , A δ e C. As duas primeiras são de grande calibre e altamente mielinizadas, conduzindo estímulos proprioceptivos e mecânicos com alta velocidade. As fibras nociceptivas A δ e C possuem médio e pequeno calibre e diâmetro, respectivamente, com pouca ou nenhuma mielinização e são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos (DUBNER; BENNETT, 1983; LAWSON, 1996).

Os corpos celulares dessas fibras aferentes estão localizados principalmente no gânglio do trigêmeo, estrutura que é conhecida por conter de peptídeos como o CGRP, substância P e transmissores como o glutamato e o GABA (para revisão WAITE; ASHWALL, 2012). Os axônios projetam para a região central, através do tronco cerebral, nos núcleos do complexo sensorial do trigêmeo, para a realização

da sinapse com os neurônios de segunda ordem. Os componentes dos núcleos do complexo sensorial trigeminal incluem o núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinhal (Sp5), sendo que esse último se divide em três diferentes subnúcleos: *oralis* (Sp5O), *interpolaris* (Sp5I) e *caudalis* (Sp5C) (SESSLE, 2011). Os neurônios ativados por estímulos nocivos se projetam principalmente para o subnúcleo *caudalis*, que corresponde à região do corno dorsal da medula C1-C2 (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017), e é considerado o principal subnúcleo de informação nociceptiva da região orofacial. No entanto, os subnúcleos *oralis* e *interpolaris* também participam da transmissão nociceptiva (SESSLE, 2000).

Os neurônios nociceptivos de segunda ordem podem ser do tipo nociceptivo-específicos ou de ampla faixa dinâmica. Os primeiros são ativados por estímulos exclusivamente nocivos pela ativação das fibras aferentes do tipo A δ e C, enquanto os últimos são ativados por estímulos nocivos ou inócuos de fibras aferentes dos tipos A β , A δ e C. Muito dos neurônios nociceptivos de segunda ordem estão localizados na região do subnúcleo *caudalis* (SESSLE, 2011). Posteriormente, a transmissão nociceptiva é levada a regiões superiores do cérebro que vão processar aspectos discriminativo-sensoriais, bem como afetivo-motivacionais da dor (CHICHORRO; PORRECA; SESSLE, 2017).

Os neurônios localizados nos núcleos do complexo sensorial trigeminal projetam para diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC) ou podem ter projeções intrínsecas, ou seja, sua terminação é no próprio complexo de núcleos. Além disso, a região do subnúcleo *caudalis* recebe projeções de áreas cerebrais com função modulatória na transmissão somatosensorial. Ademais, há neurônios que projetam diretamente ou indiretamente para a região do tálamo, estas últimas por vias polissinápticas, envolvendo estruturas do tronco cerebral como o núcleo parabraquial e a formação reticular (SESSLE, 2005).

Neurônios nociceptivos localizados na região do núcleo ventral posteromedial (VPM) do tálamo possuem conexões com o córtex somatossensorial, indicando um papel na localização e discriminação de estímulos nocivos. Entretanto, os neurônios nociceptivos localizados nos núcleos mais mediais do tálamo estão conectados a áreas como o hipotálamo e córtex cingulado anterior que estão envolvidos nas dimensões afetivas e motivacionais da dor (SESSLE, 2005).

A modulação da dor ocorre por vias descendentes, que podem tanto inibir ou

facilitar a percepção da dor (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Das regiões do hipotálamo, amígdala, córtex cingulado anterior rostral originam circuitos que adentram a região da PAG com saída para o bulbo. Os neurônios do núcleo de rafe e do núcleo gigantocelular, incluídos no bulbo ventromedial rostral (RVM), emitem projeções para a medula espinhal e bulbo com a finalidade de modular a experiência da dor. Portanto, as vias descendentes da dor ajudam a explicar como a experiência da dor é individual e como os estados emocionais e de estresse, experiências passadas e crenças sociais podem afetar a experiência da dor (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010).

Especificamente, as regiões do núcleo parabraquial lateral e amígdala, importantes no aspecto afetivo da dor, são intensamente ativadas por estímulos nocivos aplicados na face. Assim, estudos sugerem que um estímulo de uma mesma intensidade induz uma dor mais acentuada na face que em outras regiões do corpo (RODRIGUEZ *et al.*, 2017). Devido a essa complexidade que integra a dor, a região orofacial, especificamente, tem uma expressão única para cada indivíduo, visto que a região tem um significado psicológico, emocional e biológico (SESSLE, 2005). Apesar disso, os mecanismos neurais envolvidos no aumento da dor, nessa região, ainda permanecem desconhecidos.

1.2 TESTE DA FORMALINA OROFACIAL

A administração subcutânea de formalina na região orofacial, no lábio superior, representa um modelo inflamatório agudo confiável e válido que induz uma resposta comportamental em ratos, como os movimentos de limpeza facial bilateral (i.e. *grooming*) que persiste por vários minutos (DALLEL *et al.*, 1995). Essa resposta comportamental é bifásica, no qual há uma primeira fase de curta duração, seguida de uma fase quiescente e, posteriormente, uma segunda fase de longa duração (TJOLSEN *et al.*, 1992). Há evidências de que a primeira fase represente a estimulação direta dos terminais aferentes nociceptivos, enquanto a segunda fase é caracterizada pela inflamação localizada e sensibilização central (DALLEL *et al.*, 1995). A resposta comportamental no teste da formalina orofacial é sensível a classes de fármacos com propriedades analgésicas, incluindo anestésicos locais e opioides (fase I e fase II) e anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e não-esteroidais

(AINEs) (fase II) (RABOISSON; DALLEL, 2004; CLAVELOU *et al.*, 1989; TJOLSEN *et al.*, 1992).

Portanto, o teste da formalina orofacial é válido para o estudo da dor orofacial pela possibilidade de induzir e quantificar a dor nessa região e ser susceptível à inibição por fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. Entretanto, o teste demonstra limitações pelo método de avaliação do comportamento de resposta-reação como medida de nocicepção e, desse modo, não avalia outros aspectos da dor.

1.3 ASPECTO AFETIVO DA DOR

A experiência da dor é subjetiva e envolve várias dimensões, como a sensorial-discriminativa, cognitiva e afetiva. Por exemplo, a dimensão sensorial-discriminativa envolve características da intensidade, localidade e a qualidade do estímulo, que estão relacionados à ativação dos nociceptores. A dimensão cognitiva envolve a atenção, expectativa e memória no processamento da dor e, por último, a dimensão afetiva está relacionada à característica aversiva da dor (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Nos estudos pré-clínicos, geralmente, apenas o aspecto sensorial é explorado, o que resultou em avanços significativos na compreensão dos componentes nociceptivos (NEUGEBAUER *et al.*, 2009). Por outro lado, os aspectos afetivos são bem menos compreendidos, em parte pela dificuldade de avaliar experimentalmente esse aspecto. Tem sido descrito que o componente afetivo pode ser discriminado do componente sensorial, por exemplo, pela falta de correlação entre a intensidade da dor e a característica e/ou tipo da lesão (PORRECA; NAVRATILOVA, 2017). Em vista disso, segundo a IASP (International Association for the Study of Pain), a dor é a experiência em que relacionamos com um dano tecidual ou potencial, que está associada a uma sensação percebida em uma parte do corpo que é sempre desagradável, desse modo, torna-se uma experiência emocional. Nesse sentido, foi relatado pelos pacientes submetidos à cingulotomia anterior a percepção dos componentes sensoriais e discriminativos da dor, no entanto, esses estímulos não eram percebidos como desagradáveis (YEN *et al.*, 2009). A desagradabilidade da dor é a principal reclamação dos pacientes e essa sensação leva ao comportamento de motivação para buscar o alívio (PORRECA;

NAVRATILOVA, 2017). Dessa maneira, a qualidade adicional da aversão está envolvida no processo de sobrevivência do indivíduo para promover o aprendizado e influenciar decisões futuras para prevenir lesões futuras (NAVRATILOVA; PORRECA, 2014). Portanto, devido à importância do aspecto afetivo da dor, vêm crescendo o interesse em medidas que possam capturar a qualidade desagradável da dor em modelos experimentais.

1.3 DOR E COMUNICAÇÃO SOCIAL

Acredita-se que parte da população irá sofrer em algum momento da vida uma dor severa que poderá ser controlada, mas entre 7% a 64% indivíduos irão sofrer uma dor persistente ou recorrente dependendo da metodologia e da população estudada (PERQUIN *et al.*, 2000; PETERSEN; BRULIN; BERGSTRÖM, 2006). No Brasil, acredita-se que aproximadamente 39% da população sejam afetadas por dores crônicas (SOUZA *et al.*, 2017). Em vista dos números apresentados, a maioria dos modelos biomédicos se concentra no componente sensorial, representando de forma incompleta a multidimensionalidade da dor, que não levam em consideração os parâmetros sociais dos indivíduos (SULLIVAN, 2008; CRAIG, 2009). Portanto, isso gera um desafio na prestação de cuidados ao paciente (CRAIG, 2009).

Atualmente, há grande interesse no entendimento da dinâmica entre os fatores sociais, psicológicos e biológicos da dor (CRAIG, 2015). Um modelo foi proposto por Craig (2015) para aumentar a compreensão no entendimento da complexidade da dor, no qual a novidade está na inclusão de outro indivíduo, ou seja, um observador que tem a capacidade de influenciar o indivíduo com dor e, conseqüentemente, ser influenciado por ela. Nesse modelo, as influências intrapessoais, fatores biológicos e experiências dolorosas durante a vida, podem modificar a expressão da dor. Existem também as influências interpessoais que se direcionam ao segundo indivíduo, em que as disposições biológicas para reagir ao sofrimento da outra pessoa, juntamente as experiências dolorosas que influenciam tomadas de decisões direcionadas ao indivíduo em sofrimento, podem resultar na desconsideração, no aumento ou diminuição da dor do outro. Desse modo, existem consideráveis evidências que o ambiente social pode desempenhar um papel

importante no aumento ou inibição da dor (STURGEON; ZAUTRA, 2016).

Dessa forma, existe a compreensão da dor como um fenômeno social, que exige a consideração de características sociais e comunicativas (HADJISTAVROPOULOS *et al.*, 2011). Assim, a comunicação da dor se baseia em ações verbais e não-verbais e essas habilidades de expressão são adquiridas em contextos familiares e étnicos que permitem que o indivíduo que sofre consiga perceber as vantagens do cuidado e das intervenções sociais (PALERMO; CHAMBERS, 2005; MOGIL, 2015). Existem evidências da possível evolução da comunicação da dor, no qual razões adaptativas indicam vantagens para quem recebe informações, por exemplo, sobre possíveis perigos ou pelo aprendizado pela observação e para o indivíduo que dá informações, podendo receber ajuda para o alívio da dor ou para afastar possíveis agressores (MOGIL, 2015). Entretanto, para que o indivíduo com dor possa obter ajuda de outros indivíduos, a comunicação entre eles precisa ser eficiente (CHAMBERS; MOGIL, 2015). Portanto, é necessário que os indivíduos tenham a habilidade de entender pistas sociais e essa habilidade é chamada de empatia (HADJISTAVROPOULOS *et al.*, 2011; MARTIN; TUTTLE; MOGIL, 2014).

A empatia é definida como a capacidade do observador entender e compartilhar o estado do outro ativando a representação mental, neural e pessoal desse estado (para revisão WAAL; PRESTON, 2017). A partir dela, é permitido que haja entre os indivíduos o compartilhamento de experiências, necessidades e objetivos, portanto, dependem de mecanismos sociais (CARR *et al.*, 2003). Waal (2008) propôs um modelo para o entendimento da evolução da empatia, conhecido como o modelo da Boneca Russa, que representa, em formas de adição de camadas, os comportamentos empáticos integrados entre si. No coração dessa boneca, está a expressão mais básica chamada de contágio emocional, que induz um comportamento similar entre o estado emocional do observador e o alvo. Nas camadas mais exteriores estão expressões que exigem crescente regulação da emoção, cognição e a percepção de si. Atualmente, existem evidências que além dos humanos, outros animais são capazes de expressar comportamentos empáticos (PANKSEPP; LAHVIS, 2011). Algumas espécies, como os roedores, têm a capacidade de expressar o comportamento pró-social e o contágio emocional e os primatas humanos e não humanos, por exemplo, são capazes de expressar níveis

mais complexos como a empatia cognitiva, que permite que o observador imagine como o alvo se sente, mesmo na sua ausência (SIVASELVACHANDRAN *et al.*, 2018).

A dor pode ser sentida, reconhecida e entendida por um observador e essa habilidade é chamada de empatia pela dor (LU *et al.*, 2017). Singer e colaboradores (2004) demonstraram que a empatia pela dor envolve a ativação de áreas cerebrais responsáveis pelo componente afetivo da dor, como o córtex cingulado anterior rostral e ínsula anterior. Desse modo, os autores sugerem que as duas regiões cerebrais sejam as principais responsáveis pela experiência emocional que evoca reações de dor e que sejam a base neural para o entendimento das emoções dos outros e de si mesmo. Existem várias evidências que a dor aguda pode ser modulada em diferentes contextos sociais em humanos e em roedores através das habilidades empáticas, como por exemplo, o contágio emocional, *social buffering*, comportamento pró-social, estresse social e aprendizado por observação (MARTIN; TUTTLE; MOGIL, 2014).

O comportamento pró-social dos roedores foi uma das primeiras evidências da habilidade empática dos roedores. Church (1959) observou que os ratos treinados a pressionar um dispositivo para receber comida, paravam de pressioná-lo quando percebiam que essa ação causava choques elétricos no segundo rato. Posteriormente, Rice e Gainer (1962) observaram que os ratos ajudavam a abaixar ratos içados de forma espontânea. Para avaliar se a dor poderia motivar o comportamento pró-social, Lu e colaboradores (2018) demonstraram que ratos observadores direcionavam o comportamento de *grooming* para o rato (*allogrooming*) que recebeu a injeção de ácido acético, comportamento considerado como um tipo de consolo. Assim, a dor pode ser um estímulo que provoca uma ação em benefício de outro indivíduo (LU *et al.*, 2018).

O contágio emocional é a forma mais primitiva da empatia, por envolver mecanismos de percepção-ação e é considerado, ao menos em parte, responsável pela transferência do estado emocional negativo para um observador (MOGIL, 2015). O contágio emocional requer que dois indivíduos, simultaneamente, expressem um comportamento que pode refletir uma experiência comum, como, por exemplo, o choro contagiante entre bebês e o bocejo entre adultos (PANKSEPP; LAHVIS, 2011). Estudos demonstram que o contágio emocional pode alterar a

sensibilidade a dor do observador, apenas pela observação direta de um coespecífico com dor (GONZALEZ-LIENCRES *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; MARTIN *et al.*, 2015; LANGFORD *et al.*, 2006; LANGFORD *et al.*, 2010).

Além disso, através da interação social é possível diminuir um estímulo aversivo (MARTIN; TUTTLE; MOGIL, 2014). Essa modulação social, chamada *social buffering*, foi observada em estudos envolvendo humanos e roedores (MOGIL, 2015). Na clínica, o *social buffering* é conhecido pelo efeito analgésico nas dores de parto, quando há a presença de um indivíduo que dê suporte à parturiente (COGAN; SPINNATO, 1988). As evidências de que roedores tinham comportamentos de *social buffering* vieram de observações de que ratos em grupos exibiam menos comportamento de *freezing* quando comparados a ratos testados sozinhos (DAVITZ; MASON, 1955). Ademais, a companhia de um rato diminuiu níveis de corticosterona e o comportamento relacionados ao estresse quando ambos eram colocados em um novo ambiente (LESHEM; SHERMAN, 2006). O comportamento de *social buffering* parece depender da comunicação e a relação entre os indivíduos (KIYOKAWA *et al.*, 2012).

A evolução da comunicação da dor demonstra que através da interação social, a informação sobre a dor pode ser aprendida somente pela observação (para revisão GOUBERT *et al.*, 2011). Além disso, esse fenômeno social é importante para o desenvolvimento dos efeitos de placebo e nocebo (COLLOCA; BENEDETTI, 2009). Em roedores, foi observado por Jeon e colaboradores (2010), que através da observação social do sofrimento de um estímulo aversivo, os camundongos observadores desenvolviam o comportamento de *freezing* pela observação de outro camundongo submetido a choques repetidos na pata.

O estresse animal pode ser induzido por vários fatores ambientais, tais como a contenção, choque elétrico e o nado forçado. A interação social também pode ser um indutor de estresse animal e por consequência, pode modificar a resposta a dor (MARTIN; TUTTLE; MOGIL, 2014). Há estudos que relatam que o estresse social induziu tanto a analgesia quanto a hiperalgesia (PEETERS; VLAEYEN, 2011; BORSOOK; MACDONALD, 2010).

Portanto, existem evidências que a dor tem a capacidade de alterar as interações sociais e ser modulada por elas através de fenômenos empáticos

(MOGIL, 2015). Entretanto, os mecanismos envolvidos nos processos da empatia pela dor ainda não estão claros e precisam ser explorados.

1.5 VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS (USV)

Roedores são conhecidos por emitirem vocalizações audíveis e inaudíveis, isto é, em uma faixa de alcance abaixo de 20-kHz e acima de 20-kHz, respectivamente. As vocalizações audíveis ou sônicas são percebidas para humanos e são utilizadas para uma confrontação direta com o predador (comunicação heteroespecífica), sinalizando perigo ou ameaça (LITVIN; BLANCHARD; BLANCHARD, 2007). As vocalizações inaudíveis ou ultrassônicas (USV) representam um dos principais meios de comunicação utilizados por ratos. Esse tipo de comunicação é utilizado dentro de um grupo social, exclusivamente por indivíduos da mesma espécie e para curtas distâncias. Acredita-se que esse tipo de comunicação é uma adaptação da espécie que tem o objetivo de aumentar a proteção contrao predador, diminuindo as chances de ser percebido por ele (BRUDZYNSKI; FLETCHER, 2010).

Dentro das USVs emitidas por ratos, há três tipos de classificação que se diferenciam pela frequência dominante ou pelo pico médio: 40-kHz, 22-kHz e 50-kHz. As vocalizações de 40-kHz são emitidas por filhotes quando são separados da mãe e da ninhada e estão relacionadas à ansiedade e/ou angústia (SIMOLA, 2015). As USVs de 22-kHz e 50-kHz são emitidas por ratos jovens e adultos em diferentes contextos, ou em consequência de estados disfóricos ou eufóricos (WÖHR; SCHWARTING, 2013).

Considerada homóloga a risada humana, as USVs de 50-kHz estão associadas às situações apetitivas e prazerosas (PANKSEPP; BURGDORF, 2003; WOHR; SCHWARTING, 2013). Por exemplo, durante a brincadeira entre ratos juvenis e com humanos (*tickling*), acasalamento e abuso de drogas (KNUTSON; BURGDORF; PANKSEPP, 1998; BURGDORF; PANKSEPP, 2003; BARFIELD *et al.*, 1979; BURGDORF *et al.*, 2001). Além disso, existem quatro subclassificações de USVs de 50-kHz que podem indicar uma chamada de contato para interação social, classificada como “flat calls”, com frequência de som constante e USVs com frequências moduladas que podem expressar recompensa e motivação como as

“step calls” ou alto grau de motivação como as “trills” (BRUDZYNSKI, 2015; WENDLER *et al.*, 2016; BRENES *et al.*, 2016). Estudos demonstram que as USVs de 50-kHz estão associadas à ativação dopaminérgica no núcleo accumbens e essa liberação de dopamina medeia emoções positivas (HORI *et al.*, 2013). Logo, as USVs de 50-kHz estão sendo utilizadas para a avaliação dos efeitos motivacionais de drogas de abuso como a cocaína, MDMA, anfetaminas, nicotina e psicoestimulantes como a cafeína (para revisão SIMOLA, 2015) e para estudos da doença de Parkinson e mania (PEREIRA *et al.*, 2014; WENDLER *et al.*, 2016).

As USVs de 22-kHz foram registradas em diversos contextos como o enfrentamento com o predador, choque elétrico na pata, durante agressão entre machos e na manipulação por humanos (*handling*) (BLANCHARD *et al.*, 1991; BORTA; WÖHR; SCHWARTING, 2006; VIVIAN; MICZEK, 1993; BRUDZYNSKI *et al.*, 1993). Esses contextos podem indicar estados negativos como dor, ansiedade, medo e depressão (JOURDAN *et al.*, 1995; KNUTSON; BURGDORF; PANKSEPP, 1998; DINH *et al.*, 1999; KNUTSON; BURGDORF; PANKSEPP, 2002; BRUDZYNSKI, 2005; BRUDZYNSKI, 2009). Estudos têm demonstrado o envolvimento de áreas cerebrais como a amígdala e córtex perirrinal associadas às USV de 22-kHz e a eventos negativos (SADANANDA; WÖHR; SCHWARTING, 2008). Assim, estudos de *screening* de medicamentos têm utilizado as USV de 22-kHz para avaliar propriedades ansiolíticas, antidepressivas, antipsicóticas, bem como na avaliação de medicamentos para o transtorno do pânico e com potencial analgésico (SIMOLA, 2015).

Nesse sentido, as vocalizações de 22-kHz vêm sendo utilizadas para ampliar os parâmetros de avaliação da dor em diferentes modelos, como o modelo agudo pelo teste da formalina na pata e em modelos de indução de migrânea (OLIVEIRA; BARROS, 2006; BOBADE *et al.*, 2015; MARTINO; PERKINS, 2008), modelos de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) ou caolim, modelo de dor inflamatória por carragenina (CALVINO *et al.*, 1996; HAN; NEUGEBAUER., 2005) e em modelo de dor neuropática por lesão parcial do nervo ciático (LIM *et al.* 2014; LIM; KIM; KIM., 2016 ; LIM *et al.*, 2017). Em todos os estudos citados acima houve um aumento das vocalizações de 22-kHz após os procedimentos e o tratamento com analgésicos foi capaz de reduzir a emissão dessas vocalizações. Em contraste, alguns estudos que utilizaram modelos de dor aguda e crônica não detectaram USV

de 22-kHz pelos animais (JOURDAN; ARDID; ESCHALIER, 2002; WALLACE; NORBURY; RICE, 2005). Entretanto, não há estudos que avaliam as USVs nos modelos de dor orofacial ou que avaliam vocalizações de 50-kHz, que podem refletir alterações do estado afetivo do animal com dor. Além disso, não há estudos da modulação da dor em diferentes contextos sociais através da avaliação das USVs. Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar se as vocalizações ultrassônicas (USVs) podem representar um parâmetro para o estudo do componente afetivo em modelos de dor orofacial aguda bem como uma ferramenta para o estudo da modulação da dor em ratos em diferentes contextos sociais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar se a emissão de vocalizações ultrassônicas representa um parâmetro para o estudo do componente afetivo em modelos de dor orofacial aguda, bem como uma ferramenta para o estudo da modulação da dor em ratos em diferentes contextos sociais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a injeção de formalina na região orofacial induz a emissão de USV em ratos;
- Avaliar a influência do tratamento sistêmico com morfina nas USV e na resposta comportamental evocada pela formalina orofacial;
- Avaliar a emissão das USVs e a resposta comportamental evocadas por formalina na região orofacial no demonstrador na presença de um observador familiar, familiar separados por uma barreira visual, não-familiar e uma observadora fêmea;
- Avaliar a emissão das USVs e a resposta comportamental no observador na presença de um demonstrador familiar, familiar separado por uma barreira visual e não-familiar.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Para a realização desse estudo foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* variedade Wistar machos e fêmeas, pesando entre 280 g e 300 g e 180 g e 220 g, respectivamente. Os animais foram provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todos os animais foram mantidos juntos, em grupos de no máximo quatro, por pelo menos uma semana antes dos testes. Os animais foram mantidos em condições controladas de luminosidade (12:12 ciclo claro:ciclo escuro) e temperatura (entre 21 ± 1 °C) com acesso livre a ração e água. Todos os experimentos foram conduzidos entre os horários 9h e 16h e os animais foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos, bem como diferentes períodos de avaliação. Os protocolos utilizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR; autorização nº 1151) e estão de acordo com as diretrizes brasileiras do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) e das diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983).

3.2 DROGAS E SOLUÇÕES

A formalina foi obtida a partir da diluição do formaldeído (Alphatec, Brasil) em 2,5% em 0,9% de salina e foi administrada por via subcutânea (2,5%/50 µL) no lábio superior direito. O cloridrato de morfina (Merck S.A-São Paulo-Brasil) foi administrado sistemicamente na dose de 2,5 mg/kg diluída em 0,9% em salina estéril. O veículo utilizado nesse estudo foi a salina estéril 0,9%.

3.3 TESTE DA FORMALINA OROFACIAL E AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE GROOMING FACIAL

Este teste foi conduzido como descrito anteriormente, com algumas modificações (CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPRONIO, 2004; HUMMIG;

KOPRUSZINSKI; CHICHORRO, 2014). Cada animal foi colocado em uma caixa de plástico individual (caixa de acrílico transparente, 40 × 40 × 40 cm) contendo maravalha e deixado para a habituação ao ambiente silencioso por pelo menos 15 minutos. Posteriormente, cada animal foi gentilmente segurado e recebeu uma injeção subcutânea de 50 µL de formalina a 2,5% ou veículo no lábio superior direito e retornou imediatamente à caixa de observação. Os animais foram gravados por uma câmera localizada frontalmente a caixa de observação por 30 minutos, para posterior análise da contagem do tempo despendido pelos animais executando os movimentos de limpeza (i.e. *grooming* facial bilateral). A primeira e segunda fases da resposta à formalina foram consideradas entre 0 e 3 minutos e 12 a 30 minutos após a injeção de formalina, respectivamente. Concomitantemente, a emissão de vocalizações ultrassônicas foi registrada, conforme descrito no item seguinte.

3.4 AVALIAÇÃO DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS (USVS)

Para a avaliação das USVs, somente um rato foi gravado por vez seguindo a metodologia descrita previamente por Oliveira e Barros (2006), com pequenas modificações. A emissão das USVs foi registada por um microfone ultrassônico CM16 (Avisoft Bioacoustics, Berlim, Alemanha), sensível a frequências entre 15 e 180 kHz. Este aparelho foi montado 45 cm acima da caixa de observação e conectado a um computador com o software de gravação Avisoft Recorder (versão 2.95, Avisoft Bioacoustics). Os experimentos foram realizados sob iluminação de 40 lux e as USVs foram registradas durante 30 minutos, imediatamente após a administração subcutânea de formalina (2,5%) ou veículo no lábio superior direito. O efeito da presença de um conspecífico foi avaliado pela presença ou ausência de um segundo animal colocado em outra caixa de acrílico, a 60 cm do animal em gravação. Este protocolo foi repetido em ratos submetidos a diferentes contextos sociais, conforme descrito no item 3.5 (procedimentos experimentais) abaixo. É importante ressaltar que a distância usada para separar os animais permitiu somente a gravação de um rato no contexto social, isto é, observador ou demonstrador. A análise das USVs emitidas pelo rato experimental foi feita posteriormente, usando o software Avisoft SAS Lab Pro (versão 4.34; Avisoft Bioacoustics). Para a contagem e classificação manual das USVs, os espectrogramas dos registros foram gerados em

uma resolução de frequência de 488 Hz e uma resolução temporal de 0,512 ms (PEREIRA *et al.*, 2014; WENDLER *et al.*, 2019; NATUSCH; SCHWARTING, 2010). As USVs de 22 kHz foram definidas como emissões nas frequências entre 21 a 30 kHz (BRUDZYNSKI *et al.*, 1993; STERN *et al.*, 2017; MICZEK; VAN DER POEL, 1991, YEE *et al.*, 2012). Todas as USVs acima de 33 kHz foram denominadas USV de 50 kHz e sua classificação em subtipos foi baseada em suas formas espectrográficas, sendo chamadas de flat quando as mudanças de pico de frequência eram iguais ou menores que 5 kHz dentro de uma única emissão; Step, quando há uma sobreposição de um flat curta acima de 5 kHz de uma flat principal; Trill, uma única emissão tem com mudanças de frequência de pico de pelo menos 5 kHz em sentidos opostos, formando um “zig-zag”; e mista, que foram emissões que não se encaixavam em outras categorias (PEREIRA *et al.*, 2014; WÖHR *et al.*, 2015; WENDLER *et al.*, 2019).

3.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

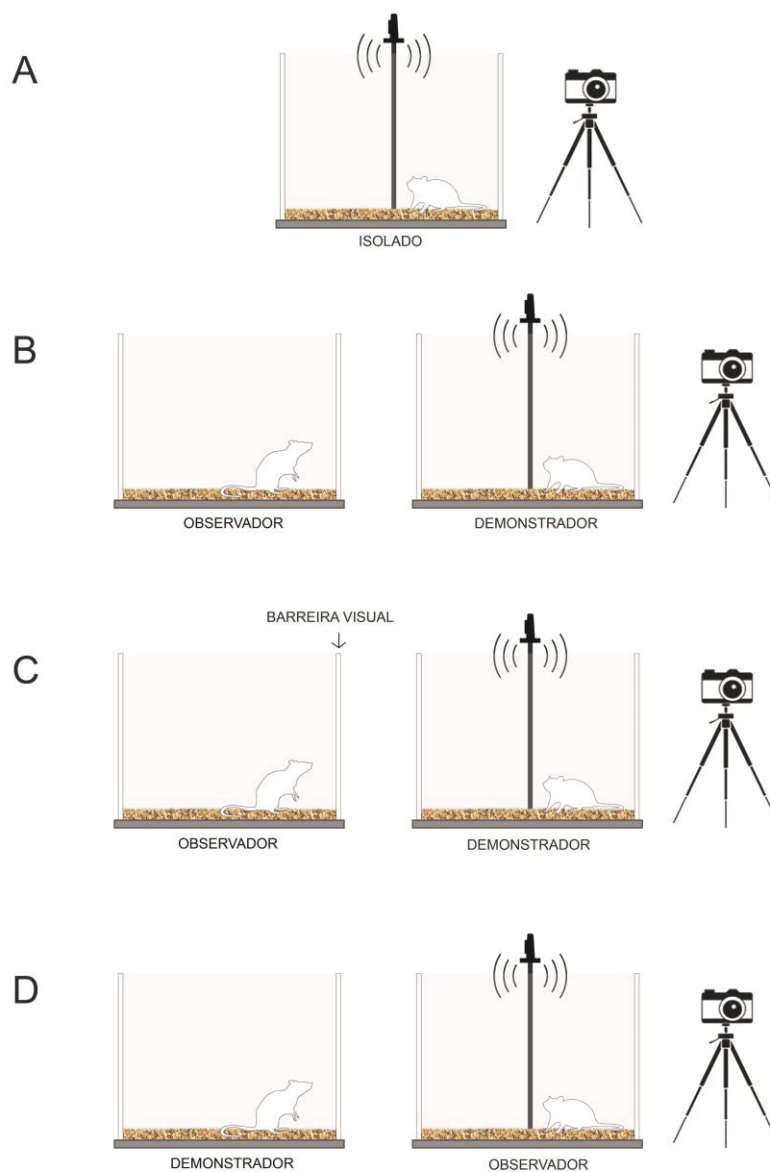
O termo “isolado” refere-se a ratos colocados sozinhos apenas para a condução de experimentos; o termo “familiar” refere-se a ratos retirados da mesma caixa; “não-familiar” refere-se a ratos retirados de caixas diferentes, “familiares separados por barreira visual” refere-se a ratos retirados da mesma caixa, mas eram separados por uma barreira visual, um lado branco da caixa entre eles durante o teste. O termo “demonstrador” é usado para definir os ratos que receberam injeção de formalina ou salina. O termo “observador” refere-se a ratos *naive* na presença de um rato injetado com solução salina ou formalina. Todos os ratos foram testados apenas uma vez.

Para avaliar se a injeção de formalina orofacial foi capaz de induzir o comportamento de *grooming* facial e emitir USVs em ratos isolados, os animais receberam 50 µL de formalina (2,5%) ou veículo via subcutânea no lábio superior direito e foram colocados, imediatamente, na caixa de experimentação. Um grupo separado de animais recebeu morfina (2,5 mg/kg, s.c.) ou veículo (1 ml/kg) 30 minutos antes da administração de formalina. Na caixa de observação, o comportamento do *grooming* facial foi filmado concomitantemente ao registro de vocalização ultrassônica, ambos por 30 minutos (Figura 1A).

Em segundo lugar, para avaliar se o rato demonstrador manifestou alterações no comportamento de *grooming* facial e/ou nas emissões de USVs pela presença de um rato observador, os animais demonstradores foram submetidos à injeção de formalina ou salina, entretanto eles também estavam na presença de ratos familiares, familiares separados por barreira visual, não-familiares e na presença de fêmeas (Figura 1B e 1C). Ambos os parâmetros avaliados, comportamento de *grooming* facial e a emissão de USV, foram registrados no animal demonstrador na presença do outro animal do contexto social separado por uma distância de 60 cm entre as caixas.

Em terceiro lugar, para analisar se o comportamento de *grooming* facial e emissão de USVs foram modificados nos ratos observadores pela presença de ratos demonstradores, ou seja, que receberam a injeção de formalina ou salina, o rato observador foi colocado na caixa de experimentação, em diferentes contextos sociais: na presença de familiares, familiares separados por barreira visual e não-familiares (Figura 1D). Como citado anteriormente, tanto o comportamento de *grooming* facial quanto a emissão de USV pelo observador foram registrados na presença de outro animal, com as caixas dos animais separados por uma distância de 60 cm. No final de todos os experimentos, cada animal foi colocado em uma nova caixa para evitar o contato com os animais que não passaram pelo experimento.

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO REGISTRO DA EMISSÃO DE USV E COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL.



LEGENDA—A. O grupo isolado consistiu em ratos colocados sozinhos na caixa de experimentação para avaliar o comportamento *grooming* facial e a emissão de USVs. B. Os ratos demonstradores foram colocados na caixa de experimentação na presença de um observador familiar, não-familiar ou uma fêmea durante a gravação das USVs e do comportamento de *grooming* facial. C. Análise de um demonstrador na presença de um observador familiar, separado por uma barreira visual, para impedir o contato visual entre os ratos durante a gravação das USVs e *grooming* facial. D. Os observadores foram colocados na caixa de experimentação para a análise das USVs e *grooming* facial na presença de um demonstrador familiar, familiar separados por uma barreira visual ou não-familiares.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

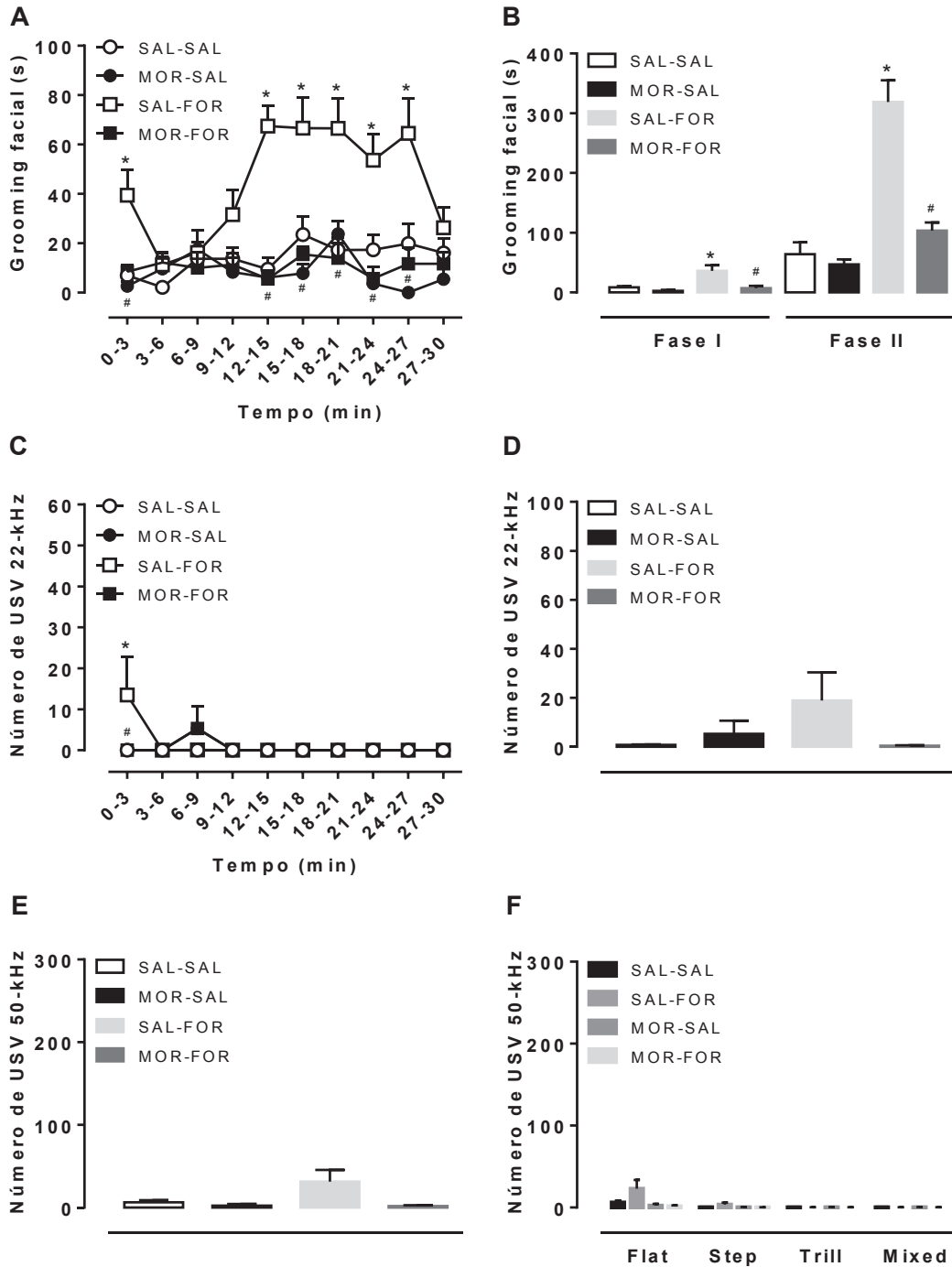
Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 6-11 animais por grupo. ANOVA de 2 vias foi utilizada para a avaliação do decurso temporal do comportamento de *grooming* facial, o número de USVs de 22-kHz em cada intervalo do tempo e o número total de subtipos de USVs de 50-kHz. Os diferentes intervalos de tempo, o tratamento e os subtipos de USV de 50-kHz foram considerados como variáveis independentes. ANOVA de 1 via e o teste t não-pareado foram utilizados para analisar o número total de USVs de 22-kHz e 50-kHz, a resposta cumulativa do *grooming* facial para a fase 1 e fase 2 no grupo isolado e nos grupos de contexto social, respectivamente. Quando apropriado, análise utilizando post-hoc Bonferroni para comparações múltiplas foi aplicada. Os dados foram transformados na função $y = \log + 1$ quando o teste F para comparação de variâncias demonstrou $p < 0,05$. A significância estatística foi definida $p \leq 0,05$ para todas as análises estatísticas. Todos os testes foram conduzidos utilizando o software GraphPad Prism (versão 6, San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E DAS EMISSÕES DE USVs INDUZIDAS PELA FORMALINA NOS RATOS ISOLADOS

A administração subcutânea de formalina (2.5%/50 μ L) no lábio superior dos ratos isolados induziu um aumento no comportamento de *grooming* facial durante a fase 1 e fase 2 do teste da formalina, nos intervalos de 0-3 e 12-27 minutos, respectivamente (tempo: $F_{(9, 270)} = 3.289$, $*p < 0,001$; tratamento: $F_{(3, 270)} = 55.44$, $*p < 0.001$; interação: $F_{(27, 270)} = 2.573$, $*p < 0,001$, Figura 2A e 2B). O pré-tratamento com morfina (2,5 mg/kg, s.c.) foi capaz de inibir ambas as fases do comportamento de *grooming* facial (tratamento: $F_{(3, 28)} = 5.678$, $*p = 0,0036$, Figura 2A e 2B). Na avaliação das emissões de USVs de 22-kHz, os animais que receberam injeção de formalina emitiram um maior número de vocalizações no intervalo de 0-3 minutos, correspondente a fase 1, no qual a morfina foi capaz de inibir a emissão das mesmas (tempo: $F_{(9, 240)} = 1.126$, $p = 0,344$; tratamento: $F_{(3, 240)} = 0.645$, $p = 0,586$, Figura 2C). Entretanto, quando o número total de USVs de 22-kHz e 50-kHz é avaliado, não houve diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$, Figura 2D e 2E).

FIGURA 2 - ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR DE ANIMAIS ISOLADOS



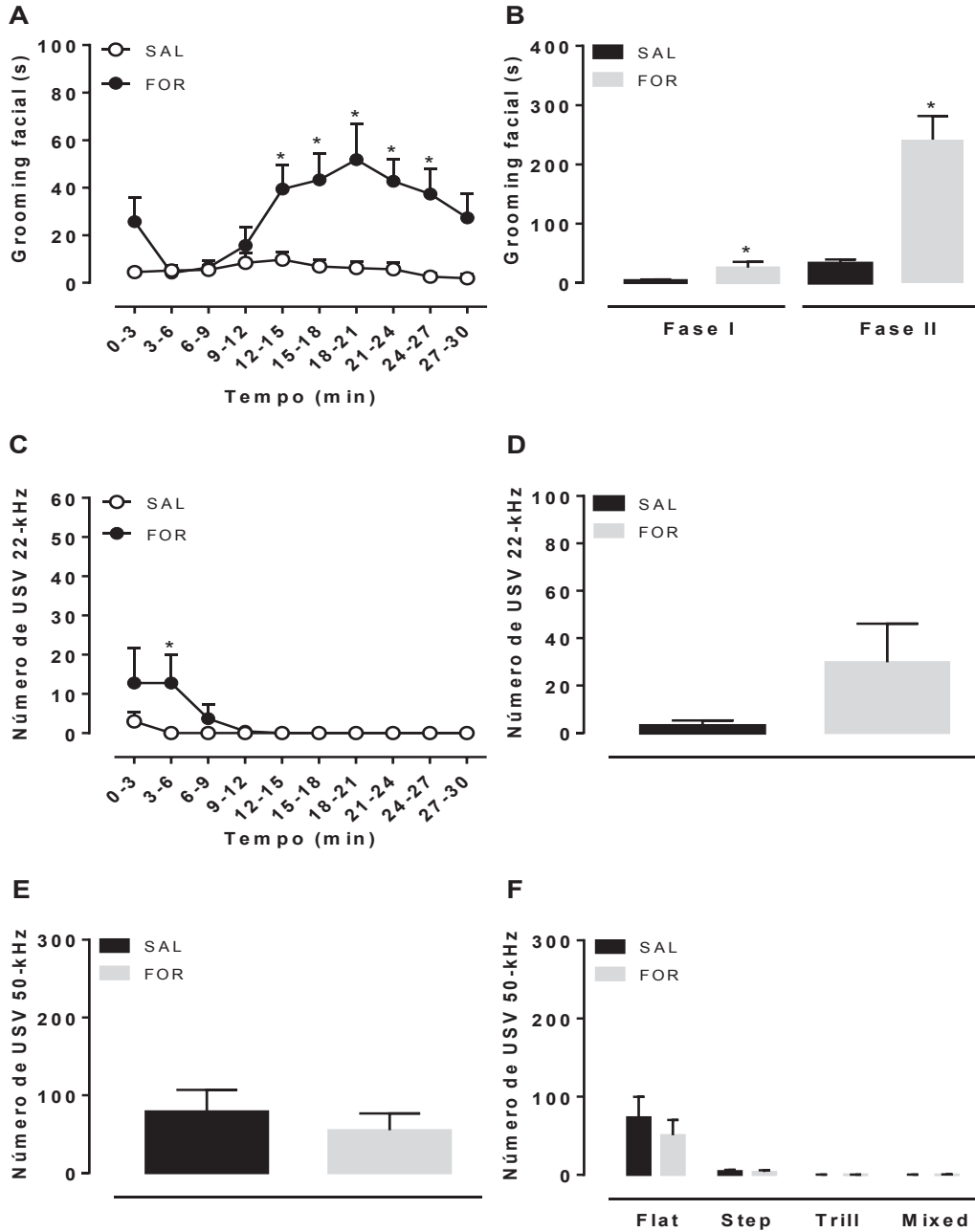
LEGENDA—A. Decurso temporal do comportamento de *grooming* facial. B. Resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial. C. Decurso temporal do número de emissões de USVs de 22-kHz. D. Número total de USVs de 22-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. E. Número total de USVs de 50-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. * $p \leq 0,05$ vs SAL-SAL, # $p \leq 0,05$ vs SAL-FOR. N = 6-10. ANOVA de 2 vias (A e C) e ANOVA de 1 via (B, D e E) seguido do teste post hoc Bonferroni. Os valores representam a média \pm EPM. SAL salina, FOR formalina, MOR morfina.

4.2 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E DAS EMISSÕES DE USVs INDUZIDAS PELA FORMALINA EM RATOS FAMILIARES

Na análise do comportamento de *grooming* facial dos ratos demonstradores que foram injetados com formalina, na presença de observadores familiares, foi observada uma diferença estatística nos intervalos entre 12-27 minutos (tempo: $F_{(9, 180)} = 2.867$, $*p = 0,0035$; tratamento: $F_{(1, 180)} = 57.22$, $*p < 0,0001$; interação: $F_{(9,180)} = 2.693$, $*p = 0,0058$, Figura 3A). Pela análise da resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial, demonstrado pela figura 3B, foi observado uma resposta nas fases 1 e 2 ($*p \leq 0,05$, Figura 3B). As vocalizações de 22-kHz foram emitidas em maior número no intervalo de 3-6 minutos, que corresponde à fase quiescente, após a injeção de formalina (tempo: $F_{(9, 180)} = 2.428$, $*p = 0,0126$; tratamento: $F_{(1, 180)} = 4.908$, $*p = 0,0280$, Figura 3C). No entanto, não houve diferenças estatísticas quando o número total de USV de 22-kHz e 50-kHz foi avaliado ($p > 0,05$, Figura 3D e 3E), bem como no número total de subtipos de USV de 50-kHz ($p > 0,05$, Figura 3F).

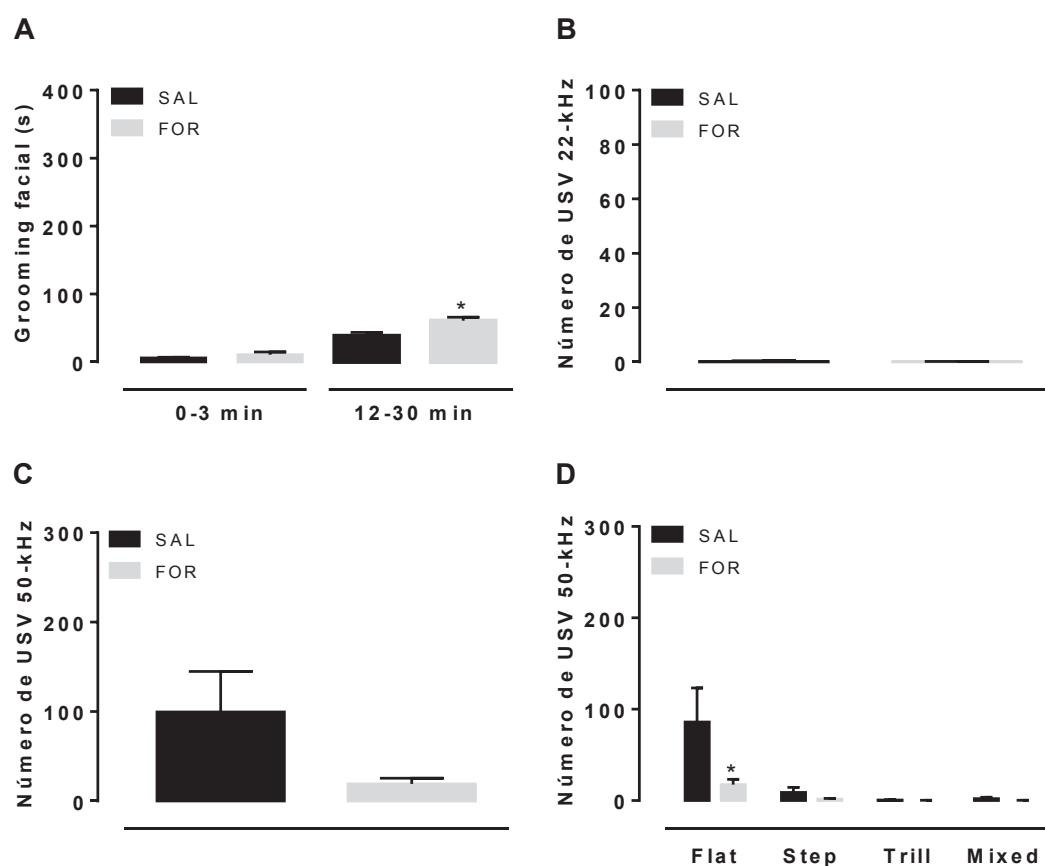
Na avaliação do rato observador na presença de um demonstrador familiar, a figura 4A revela que os observadores aumentaram o comportamento de *grooming* facial no período correspondente à fase 2, quando estão na presença de um demonstrador familiar que recebeu a injeção de formalina ($*p < 0,01$, Figura 4A). Além disso, foi observada uma redução na emissão de USVs de 50-kHz do tipo flat nos observadores que estavam na presença de um demonstrador familiar que recebeu formalina (USV: $F_{(3, 60)} = 7.597$, $*p = 0,0002$; tratamento: $F_{(1, 60)} = 4.758$, $*p = 0.0331$; interação: $F_{(3, 60)} = 3.296$, $*p = 0,0264$, Figura 3D). Entretanto, não houve diferenças estatísticas na emissão total de USVs de 22-kHz e 50-kHz ($p > 0,05$, Figuras 4B e4C).

FIGURA 3 - ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR NOS DEMONSTRADORES NA PRESENÇA DE OBSERVADORES FAMILIARES



LEGENDA—A. Decurso temporal do comportamento de *grooming* facial. B. Resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial. C. Decurso temporal do número de emissões de USVs de 22-kHz. D. Número total de USVs de 22-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. E. Número total de USVs de 50-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. F. Número total de subtipos de USVs de 50-kHz: flat, step, trill e mixed. * $p \leq 0,05$. N = 10. ANOVA de 2 vias (A, C e E) seguido do teste post hoc Bonferroni e teste t não-pareado (B e D). Os valores representam a média \pm EPM. SAL salina, FOR formalina.

FIGURA 4 - ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÕES DE USVs NOS RATOS OBSERVADORES FAMILIARES



LEGENDA—A. Resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial. B. Número total de USVs de 22-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. C. Número total de USVs de 50-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. D. Número total de subtipos de USVs de 50-kHz: flat, step, trill e mixed. * $p \leq 0,05$. $N=10$. ANOVA de 2 vias seguida do teste post hoc Bonferroni (D) e teste t não pareado (A, B e C). Os valores representam a média \pm EPM. SAL salina, FOR formalina.

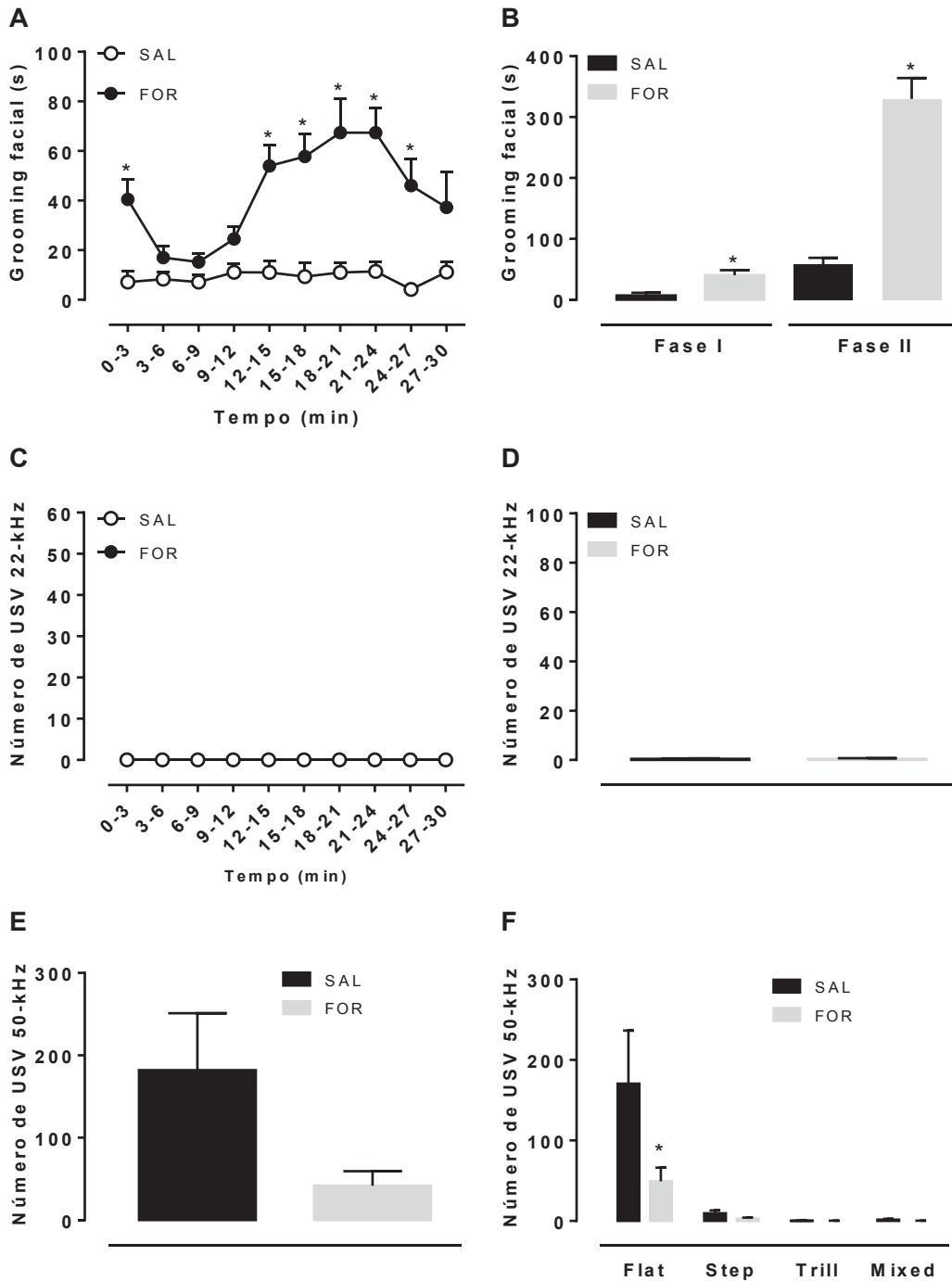
4.3 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E DAS EMISSÕES DE USVs INDUZIDAS PELA FORMALINA NOS RATOS FAMILIARES SEPARADOS POR UMA BARREIRA VISUAL

Na presença de uma barreira visual entre os ratos familiares, o rato demonstrador exibiu um aumento do comportamento de *grooming* facial na fase 1 e fase 2, após receberem a injeção de formalina no lábio superior (tempo: $F(9, 160) = 4.665$, * $p < 0,0001$; tratamento: $F(1, 160) = 127.4$, * $p < 0,0001$; interação: $F(9, 160) = 3.940$, * $p < 0,0001$, Figura 5A) (* $p < 0.01$ para a fase 1 e fase 2, Figura 5B). Entretanto, não houve emissão de USVs de 22-kHz após a injeção de formalina ou

salina ($p > 0,05$, Figura 5C e 5D) bem como não apresentaram diferença estatística no número total de USV de 50-kHz. Contudo, quando os animais receberam a injeção de formalina, houve uma redução no número de emissões de USVs do tipo flat (USV: $F_{(3, 72)} = 9.942$, $*p < 0,0001$; tratamento: $F_{(1, 72)} = 3.617$, $p = 0,061$; interação: $F_{(3, 72)} = 3.019$, $*p = 0,0353$, Figura 5F).

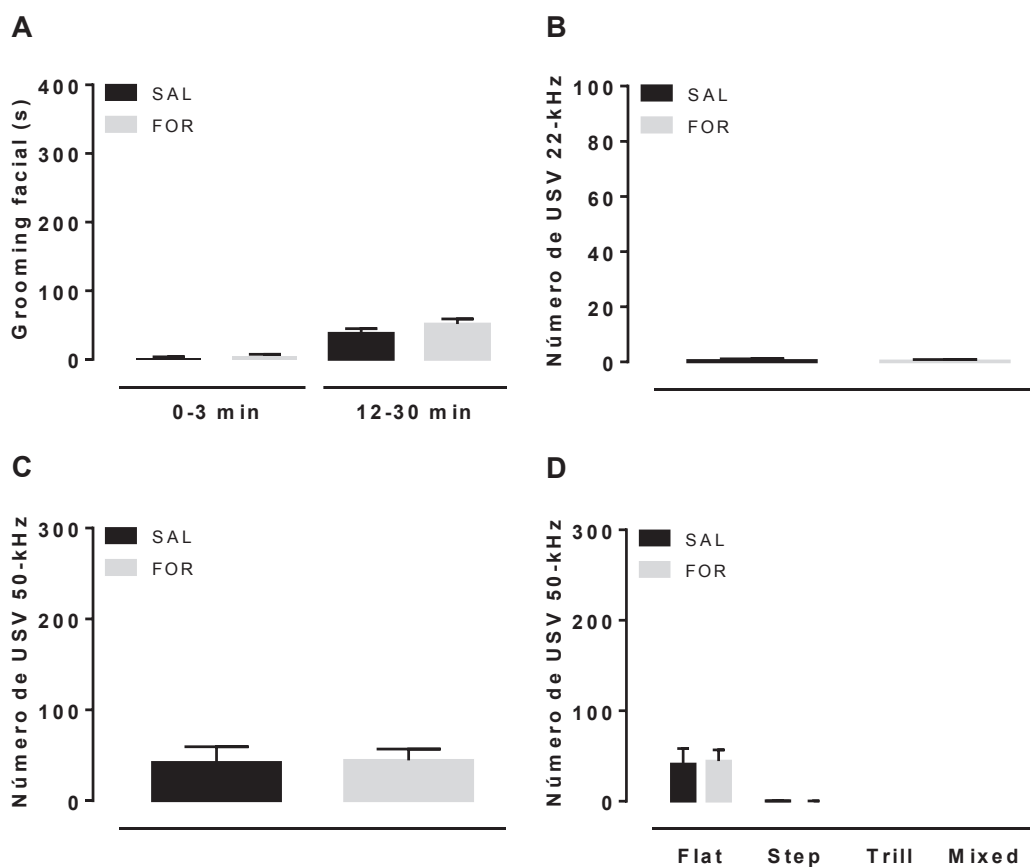
Os animais observadores separados por barreira visual dos demonstradores familiares, não demonstraram diferença no comportamento de *grooming* facial, no número total de emissões de USVs de 50-kHz e seus subtipos e não emitiram USVs de 22-kHz ($p > 0,05$, Figura 6A, B, C e D).

FIGURA 5 - ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR NOS DEMONSTRADORES SEPARADOS POR BARREIRA VISUAL NA PRESENÇA DE UM OBSERVADOR FAMILIAR



LEGENDA—A. Decurso temporal do comportamento de *grooming* facial. B. Resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial. C. Decurso temporal do número de emissões de USVs de 22-kHz. D. Número total de USVs de 22-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. E. Número total de USVs de 50-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. F. Número total de subtipos de USVs de 50-kHz: flat, step, trill e mixed. * $p \leq 0,05$. $N = 8-10$. ANOVA de 2 vias (A, C e F) seguida do teste post hoc Bonferroni e teste t não-pareado (B e D). Os valores representam a média \pm EPM. SAL salina, FOR formalina.

FIGURA 6 - ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÕES DE USVs EM RATOS OBSERVADORES FAMILIARES SEPARADOS POR BARREIRA VISUAL



LEGENDA—A. Resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial. B. Número total de USVs de 22-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. C. Número total de USVs de 50-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. D. Número total de subtipos de USVs de 50-kHz: flat, step, trill e mixed. * $p \leq 0,05$. $N = 8-10$. ANOVA de 2 vias seguida do teste post hoc Bonferroni (D) e teste t não pareado (A, B e C). Os valores representam a média \pm EPM. SAL salina, FOR formalina.

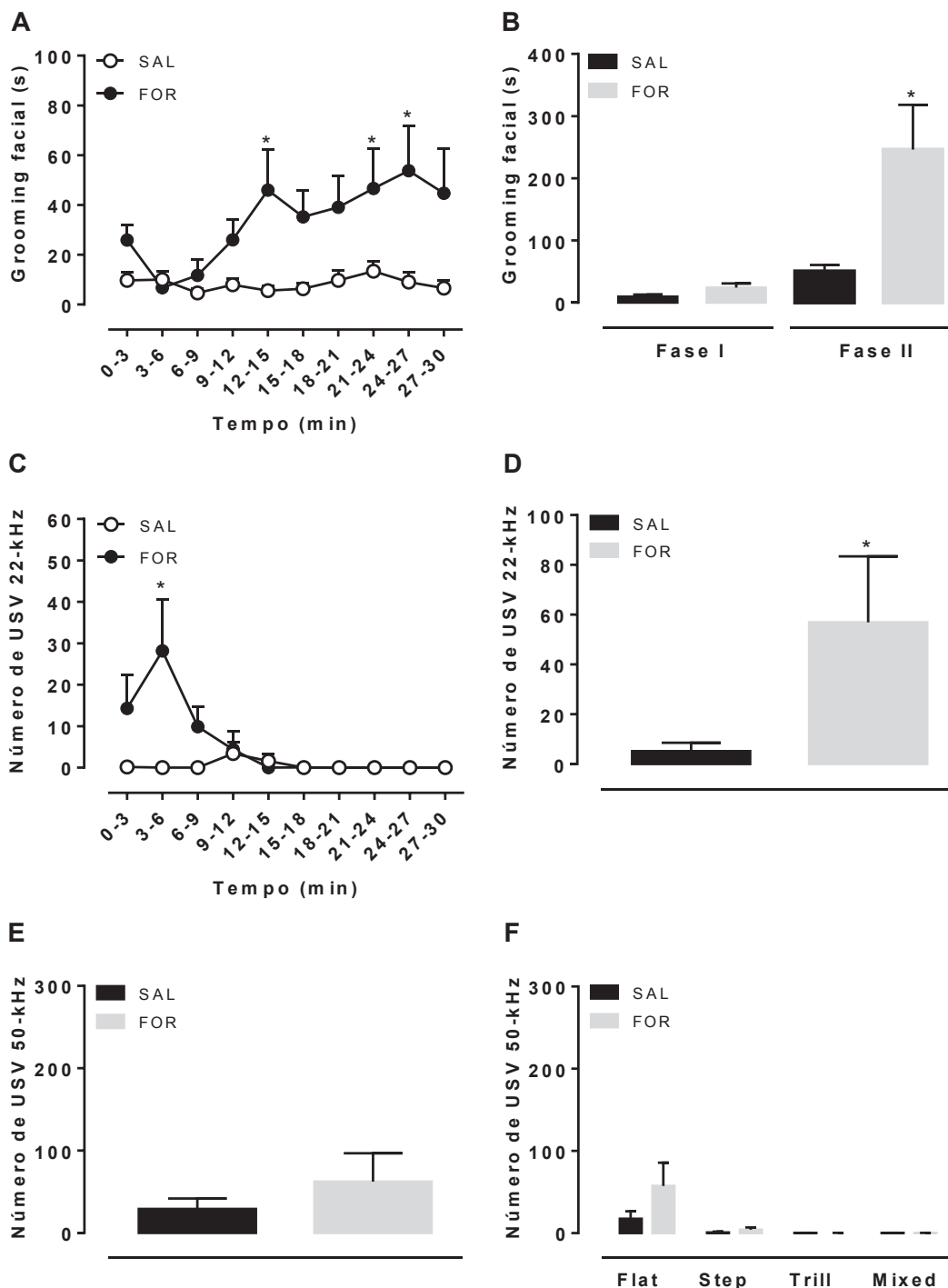
4.4 ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E NAS EMISSÕES DE USVs INDUZIDAS PELA FORMALINA EM RATOS NÃO-FAMILIARES

Na presença de um rato observador não-familiar, os demonstradores não exibiram o comportamento de *grooming* facial na fase 1, após receberem injeção de formalina ($p > 0,05$, Figura 7A e 7B), mas o comportamento foi significativo na segunda fase, como demonstrado pelo gráfico da resposta cumulativa (* $p \leq 0,05$, Figura 7B). Na avaliação do decurso temporal, foi observado um aumento significativo do comportamento de *grooming* nos intervalos de 12-15 minutos e 24-30 minutos (tratamento: $F_{(1, 180)} = 38.06$, * $p < 0,0001$; Figura 7A). O demonstrador, na presença de um observador não-familiar, emitiu um maior número de USVs de 22-

kHz no intervalo de 3-6 minutos, período correspondente à fase quiescente, após a administração de formalina (tempo: $F_{(9, 180)} = 3.172$, $*p = 0,0014$; tratamento: $F_{(1, 180)} = 9.767$, $*p = 0,0021$; interação: $F_{(9, 180)} = 3.363$, $*p = 0.0008$, Figura 7C). Além disso, houve uma diferença significativa no número total de USVs de 22-kHz quando comparado ao grupo controle ($*p < 0,05$, Figura 4C), contudo não houve diferença estatística no número total de USV de 50-kHz e seus subtipos ($p > 0,05$, Figura 7D e 7E).

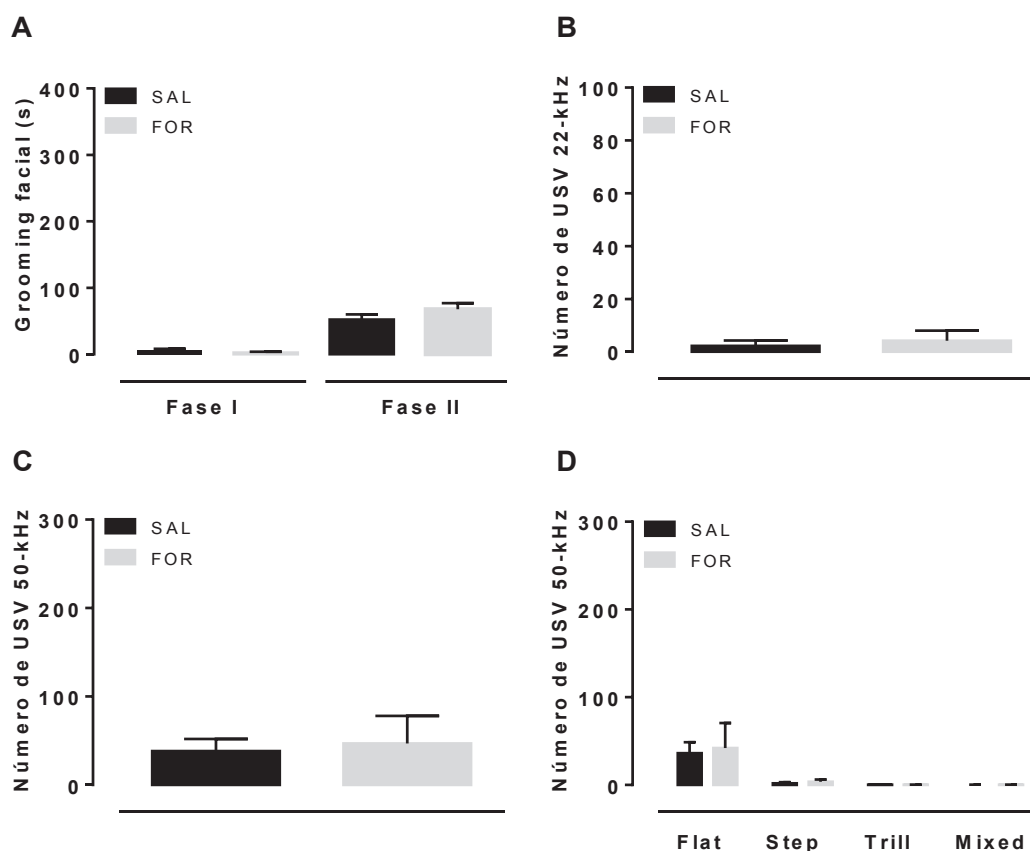
A análise dos ratos observadores não revelou diferença estatística no comportamento de *grooming* facial ($p > 0,05$, Figura 8A) e na emissão de USVs ($p > 0,05$, Figuras 8B, C e D) na presença de demonstradores não-familiares que receberam formalina ou veículo.

FIGURA 7 - ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR NOS DEMONSTRADORES NA PRESENÇA DE OBSERVADORES NÃO-FAMILIARES



LEGENDA—A. Decurso temporal do comportamento de *grooming* facial. B. Resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial. C. Decurso temporal do número de emissões de USVs de 22-kHz. D. Número total de USVs de 22-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. E. Número total de USVs de 50-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. F. Número total de subtipos de USVs de 50-kHz: flat, step, trill e mixed. * $p \leq 0,05$. $N = 10$. ANOVA de 2 vias (A, C e F) seguida do teste post hoc Bonferroni e teste t não-pareado (B, D e E). Os valores representam a média \pm EPM. SAL salina, FOR formalina.

FIGURA 8 - ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÕES DE USVs EM RATOS OBSERVADORES NÃO-FAMILIARES



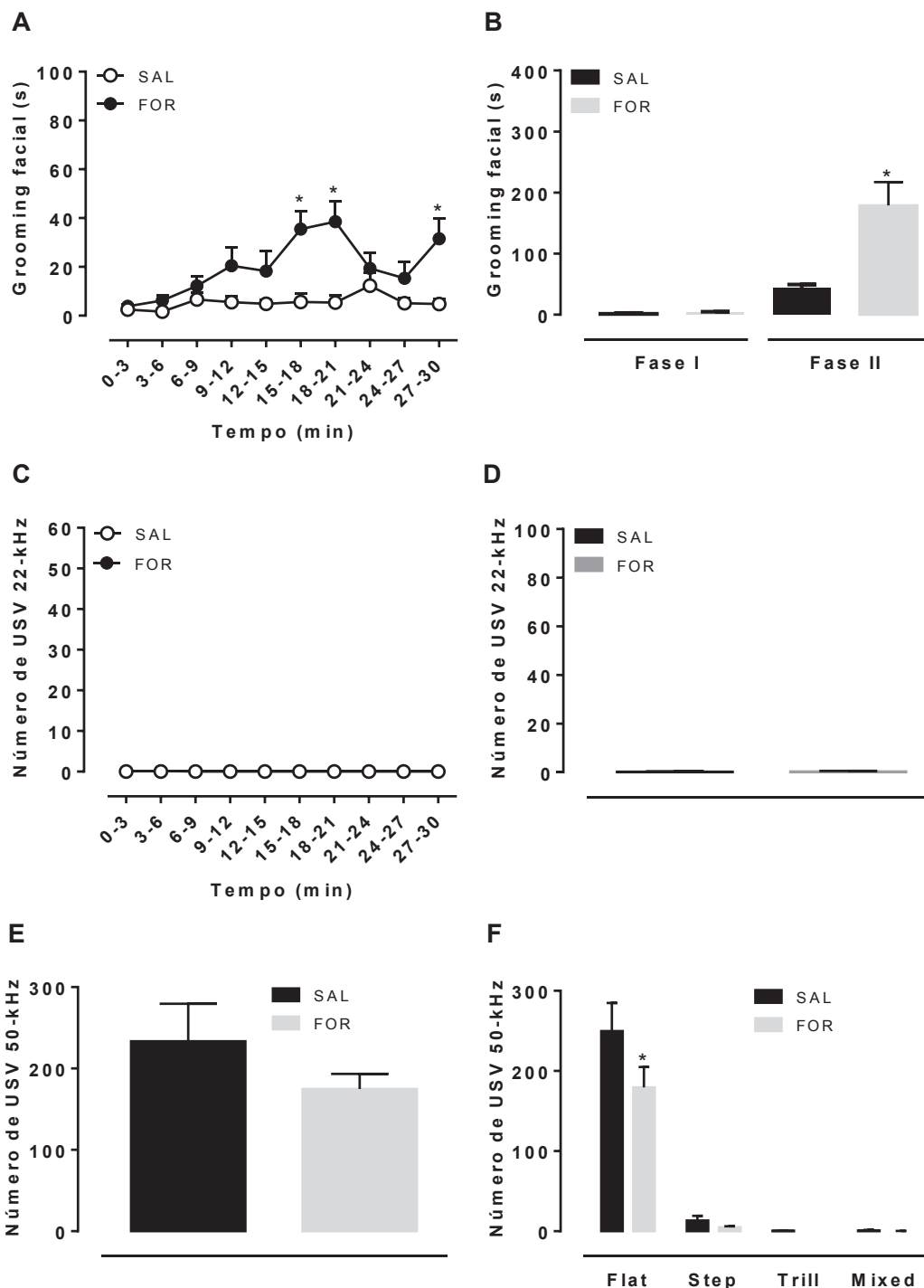
LEGENDA—A. Resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial. B. Número total de USVs de 22-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. C. Número total de USVs de 50-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. D. Número total de subtipos de USVs de 50-kHz: flat, step, trill e mixed. * $p \leq 0,05$. $N = 8-10$. ANOVA de 2 vias seguida do teste post hoc Bonferroni (D) e teste t não pareado (A, B e C). Os valores representam a média \pm EPM. SAL salina, FOR formalina.

4.5 INFLUÊNCIA DA INTERAÇÃO SOCIAL COM UMA FÊMEA NO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÃO DE USVs INDUZIDOS POR FORMALINA EM RATOS MACHOS

O rato macho na presença de uma fêmea não demonstrou um aumento do comportamento de *grooming* facial na fase 1, mas a resposta na fase 2 ainda foi diferente do grupo controle (tempo: $F(9, 160) = 2.747$, * $p = 0,0052$; tratamento: $F(1, 160) = 35.77$, * $p < 0,0001$; interação: $F(9, 160) = 2.134$, * $p = 0,0295$, Figura 9A) (* $p \leq 0,05$, Figura 9B). Além disso, a presença da fêmea aboliu as emissões de USVs de 22-kHz dos ratos que receberam formalina ou veículo ($p > 0,05$, Figura 9C e 9D). Na avaliação do número total de USVs de 50-kHz não houve diferença estatística entre

os grupos. Entretanto, quando os subtipos de USVs de 50-kHz foram analisados, houve um aumento do número de emissões do tipo flat pelos animais controle (média = 249.85) e foi reduzida nos animais redução na após os ratos machos receberem injeção de formalina (USV: $F_{(3, 60)} = 99.25$, $*p < 0,0001$; Figura 9E).

FIGURA 9 - ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE *GROOMING* FACIAL E EMISSÕES DE USVs APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE FORMALINA NO LÁBIO SUPERIOR EM RATOS MACHOS NA PRESENÇA DE UMA FÊMEA



LEGENDA—A. Decurso temporal do comportamento de *grooming* facial. B. Resposta cumulativa do comportamento de *grooming* facial. C. Decurso temporal do número de emissões de USVs de 22-kHz. D. Número total de USVs de 22-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. E. Número total de USVs de 50-kHz emitidas durante os 30 minutos de análise. F. Número total de subtipos de USVs de 50-kHz: flat, step, trill e mixed. * $p \leq 0,05$. $N = 8-10$. ANOVA de 2 vias (A, C e F) seguida do teste post hoc Bonferroni e teste t não-pareado (B, D e E). Os valores representam a média \pm EPM. SAL salina, FOR formalina.

4.6 RESUMO DOS RESULTADOS

TABELA 1 – PRINCIPAIS RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE GROOMING FACIAL E EMISSÃO DE USV ENTRE OS GRUPOS

GRUPOS	GROOMING FACIAL			EMISSÃO DE USV DE 22-KHZ			EMISSÃO DE USV DE 50-KHZ
	FASE 1	QUIESCENTE	FASE 2	FASE 1	QUIESCENTE	FASE 2	
ISOLADO	↑	—	↑	↑	—	—	—
DEMONSTRADOR FAMILIAR	↑	—	↑	—	↑	—	—
OBSERVADOR FAMILIAR	—	—	↑	—	—	—	↓
DEMONSTRADOR FAMILIAR SEPARADO POR BARREIRA VISUAL	↑	—	↑	—	—	—	↓
OBSERVADOR FAMILIAR SEPARADO POR BARREIRA VISUAL	—	—	—	—	—	—	—
DEMONSTRADOR NÃO-FAMILIAR	—	—	↑	—	↑	—	—
OBSERVADOR NÃO-FAMILIAR	—	—	—	—	—	—	—
MACHO NA PRESENÇA DE FÊMEA	—	—	↑	—	—	—	↓

NOTA– Os símbolos ↑, ↓ e — indicam aumento, redução e sem alteração, respectivamente. Os resultados representados na tabela indicam o aumento, redução e sem alteração em relação ao grupo salina.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a administração de formalina (2,5%) resultou no aumento do comportamento de *grooming* facial na fase 1, seguido da fase quiescente (i.e. comportamento nociceptivo é reduzido) e segunda fase, em que o comportamento de *grooming* facial é aumentado novamente. Estudos prévios corroboram nossos resultados, no qual a formalina orofacial é capaz de induzir uma resposta bifásica (CLAVELOU *et al.*, 1989; CHICHORRO; LORENZETTI; ZAMPONIO, 2004; HUMMIG; KOPRUSZINSKI; CHICHORRO, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2019) e essa resposta bifásica é reduzida pelo pré-tratamento sistêmico com morfina, resultado demonstrado também por Clavelou e colaboradores (1989). Além disso, o pré-tratamento com morfina foi capaz de inibir as emissões de USVs de 22-kHz induzidas pela formalina orofacial no período correspondente à fase 1. Esse efeito do tratamento com morfina na emissão de vocalizações aversivas foi observado também no modelo utilizando o choque elétrico na caudae em modelo de dor crônica pela indução de artrite por adjuvante completo de Freund (CFA) (JOURDAN *et al.*, 1998; CALVINO *et al.*, 1996). Em adição, o estudo de Oliveira e Barros (2006) mostrou que a administração de formalina (12,5%) na pata foi capaz de induzir um aumento da emissão de USVs de 22-kHz no período correspondente a fase quiescente e o pré-tratamento sistêmico com morfina foi capaz de reduzir a emissão dessas vocalizações em todas as doses utilizadas (1; 2,5; 5 mg/kg), resultado revertido pela administração de naloxona. Apesar das diferenças nas concentrações utilizadas no presente estudo (2,5%) e no estudo de Oliveira e Barros (2006) (12,5%) e na fase onde ocorreu um aumento das emissões de USVs de 22-kHz, na fase 1 e na fase quiescente, respectivamente, ambos estudos sugerem que a análise das USVs de 22-kHz podem ser um parâmetro adicional na avaliação do teste da formalina. Essa idéia corrobora o estudo de Bardin e colaboradores (2010), em que o tratamento com os antidepressivos, milnaciprano e duloxetina e o anticonvulsivante pregabalina foram capazes de inibir as USVs de 22-kHz nas mesmas doses que inibiram a fase inflamatória induzida pela formalina em ratos (2,5%).

A redução da emissão de vocalizações aversivas foi observada em diferentes modelos, como a lesão parcial do nervo ciático e em modelos de

migrânea, pelo tratamento com AINEs e triptanos, respectivamente. (LIM *et al.*, 2014; LIM; KIM; KIM, 2016; LIM *et al.*, 2017; MARTINO; PERKINS, 2008; BOBADE *et al.*, 2015). Especificamente, nos modelos de indução de migrânea, pela administração intra-arterial de bradicinina (BK), o tratamento com sumatriptano foi capaz de reduzir o número de vocalizações induzidos pela BK. Similarmente, com o intuito de avaliar terapias para a migrânea, Martino e Perkins (2008) observaram um aumento das vocalizações de 22-kHz induzidas por uma corrente de ar focada na cabeça, após a sensibilização induzida por inflamação central por injeção intracerebroventricular de lipopolissacarídeo (LPS). Entretanto, a administração de triptanos como o zolmitriptano e sumatriptano, morfina, toradol, diidroergotamina e os antagonistas do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) foram capazes de diminuir as USV de 22-kHz, embora o antagonista da neurocinina-1, não demonstrou esse efeito. Esses resultados apontam para uma correlação com os resultados encontrados na clínica. Portanto, os modelos de dor citados acima indicam que a emissão das USVs aversivas pode ser reduzida pelo tratamento com analgésicos. Especificamente, os opioides têm a ação preferencialmente seletiva para a modulação afetiva da dor, diminuindo seu aspecto aversivo (MAY, 2008), e, no presente estudo, o tratamento com morfina foi capaz de inibir o comportamento nociceptivo e a emissão de vocalizações aversivas. Assim, a inibição da emissão das USVs de 22-kHz, caracterizadas pela estreita relação com o estado emocional aversivo dos animais, pela morfina, pode refletir uma medida do componente afetivo da dor. Apesar dos efeitos euforizantes conhecidos dos agonistas opioides, a administração aguda de morfina, na dose utilizada no presente trabalho, não tem efeitos sobre a emissão de USVs de 50-kHz em ratos da variedade Wistar (MANDUCA *et al.*, 2013). Desse modo, em consequência da ação analgésica da morfina e seu efeito sobre as USVs de 22-kHz, sugere-se que a análise das USVs seja uma medida de dor.

No primeiro contexto social analisado, o demonstrador familiar exibiu resposta bifásica de *grooming* facial e emitiu um maior número de USVs de 22-kHz na fase quiescente. Esses resultados indicam que a presença de um observador familiar não foi capaz de alterar os dois parâmetros avaliados (i.e *grooming* facial e USVs). Nossos resultados corroboram o estudo de Langford *et al.* (2006) em que não foi observado efeito no comportamento nociceptivo no demonstrador na

presença de um observador familiar. Entretanto, quando o observador é analisado, na presença de um demonstrador que recebeu formalina, os resultados mostraram um aumento do comportamento de *grooming* facial no período correspondente à fase 2 do teste da formalina. Nesse contexto, existem vários estudos que indicam a presença do contágio emocional nos roedores, em que o estado de dor de um roedor pode aumentar a resposta de outro coespecífico observador (WAAL; PRESTON, 2017). No estudo de Langford e colaboradores (2006) foi demonstrado que o camundongo observador apresentou hiperalgesia térmica após interação social com o coespecífico familiar que recebeu injeção de ácido acético. Em adição, apenas os ratos observadores familiares demonstraram o contágio emocional da dor, no qual exibiram hiperalgesia mecânica bilateral e comportamento de sacudir a pata (conhecido como *flinch*) após a injeção de veneno de abelha (LI *et al.*, 2014). A importância da familiaridade também foi observada no estudo de Gonzalez-liencres *et al.* (2014), no qual observadores têm um comportamento de *freezing* maior na presença de um camundongo familiar que recebe choques elétricos. Dessa forma, há várias evidências que indicam a habilidade dos roedores de compartilhar estados emocionais a partir de modelos de dor, em que a familiaridade vai direcionar esse tipo de comportamento (LI *et al.*, 2014; MARTIN *et al.*, 2015; LANGFORD *et al.*, 2010). De acordo com essa ideia, os observadores não-familiares, no presente estudo, não demonstraram diferenças no comportamento de *grooming* facial na presença do demonstrador que recebeu formalina. Resultados semelhantes já foram reportados em estudos envolvendo humanos e roedores, em que a exposição a desconhecidos inibe o contágio emocional da dor (MARTIN *et al.*, 2015). Assim, acredita-se que o estresse da interação social entre desconhecidos pode inibir manifestações da empatia, dado que a inibição da síntese de glicocorticoides ou o bloqueio de receptores mineralocorticoides e glicocorticoides podem restabelecer o contágio emocional da dor (MARTIN *et al.*, 2015). Portanto, esses resultados dão suporte a ideia de que o contágio emocional é inibido entre indivíduos não-familiares devido ao estresse social.

Além do comportamento nociceptivo, os observadores reduziram o número de emissões de USVs de 50-kHz do tipo flat na presença de demonstradores familiares com dor. É importante ressaltar que este é o primeiro estudo, de que temos conhecimento, no qual as USVs apetitivas são analisadas em modelos de dor.

Portanto, a implicação desses resultados ainda precisa ser melhor esclarecida. Embora, algumas hipóteses possam ser aventadas. As emissões das USVs do tipo flat indicam uma chamada para interação social (BRUDZYNSKI, 2015). Assim, as emissões podem refletir uma chamada para interação social, tal como exibida quando o demonstrador familiar recebeu a injeção de salina. Apesar disso, quando o demonstrador familiar recebe injeção de formalina, o observador reduz a emissão de USVs do tipo flat. Nesse sentido, pode-se sugerir que a emissão de USVs de 22-kHz, emitidas pelo demonstrador familiar, no presente estudo, pode servir de alerta a coespecíficos sobre informações de um estado negativo e, conseqüentemente, podem induzir contágio social para diminuir as chances da colônia ser detectada, portanto pode haver redução nas emissões de USVs pelo observador (INAGAKI; USHIDA, 2017; BRUDZYNSKI; FLETCHER, 2010). Nesse sentido, foi observado que as USVs podem induzir o contágio emocional (SAITO *et al.*, 2016). Nesse estudo foi demonstrado que no experimento de viés cognitivo, uma pista ambígua foi percebida como positiva quando os ratos ouviram USVs de 50-kHz e negativa quando ouviram USVs de 22-kHz. Logo, esses resultados sugerem que as USVs podem orientar estados positivos e negativos, alterando os estados afetivos dos ratos. Como exemplo, Kim e colaboradores (2010) mostraram que a emissão de USVs de 22-kHz por um demonstrador foi capaz de induzir um comportamento de medo no observador familiar. Além disso, há evidências que a emissão de USVs de 50-kHz e a avaliação subjetiva de eventos apetitivos e aversivos que ocorrem com o coespecífico estão relacionadas com a liberação de dopamina na área mesolímbica (BRUDZYNSKI, 2015; LICHTENBERG *et al.*, 2018). Mais especificamente, o estudo de Lichtenberg e colaboradores (2018) sugere que o rato observador recebe pistas (vocalizações, odores, visuais, etc.) do coespecífico para detectar que o choque foi direcionado para coespecífico e não para ele. No presente estudo, os observadores não-familiares não modificaram a emissão de USVs do tipo flat, sugerindo que a modulação da comunicação social causada pelo contágio emocional, esteja relacionada também à familiaridade entre os coespecíficos. Dentro dessas perspectivas, a emissão de USVs pode representar um novo parâmetro de avaliação que envolva aspectos afetivos e de interação social, aspectos importantes que envolvem a dor.

A importância da familiaridade na comunicação da dor foi observada também na análise dos ratos familiares separados por uma barreira visual, em que os animais que receberam a injeção de formalina reduziram a emissão das USVs de 50-kHz. A redução dessa emissão pode estar relacionada com a diminuição da liberação de DA, mecanismo conhecido pela participação na modulação da dor e na emissão das USVs apetitivas (FARAMARZI; ZENDEHDEL; HAGHPARAST, 2016; SIAHPOSHT-KHACHAKI *et al.*, 2017; SHAFIEI *et al.*, 2018; BRUDZYNSKI, 2015). Ademais, a barreira visual entre os ratos familiares aboliu a emissão de USV de 22-kHz pelos demonstradores, mas não alterou a resposta do *grooming* facial em ambas as fases do teste de formalina. No estudo de Langford *et al.* (2006) foi sugerido que a visão seria o sentido mais significativo na mediação da comunicação da dor entre roedores. Para isso, os autores avaliaram por qual estímulo sensorial o contágio emocional da dor se estabeleceria, então, colocaram uma barreira opaca entre os camundongos para impedir a visão, induziram a perda do olfato, a perda de vibrissas e audição. Dentre as modalidades testadas, a única que preveniu o aumento de contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético (0,9%) foi a barreira visual. Dessa forma, nossos resultados sugerem que as USVs aversivas emitidas no contexto social dependem, pelo menos, parcialmente do contato visual. Além disso, o impedimento do contato visual entre os familiares preveniu alterações no comportamento de *grooming* facial e nas emissões de USVs dos observadores na presença do demonstrador injetado com formalina, o que dá suporte a nossa ideia.

Outra influência do contexto social foi encontrada pela análise dos ratos não-familiares, na qual os demonstradores não exibiram o comportamento de *grooming* facial na fase 1 do teste da formalina e aumentaram o número total de emissões de USVs de 22-kHz. O primeiro resultado corrobora observações prévias que indicam que o estresse social, relacionado com a possibilidade de agressão entre roedores machos, pode induzir analgesia em animais (para revisão ver MOGIL, 2015). Langford e colaboradores (2011) demonstraram que os camundongos machos reduziram o número de contorções abdominais induzida por administração de ácido acético (0,9%) na presença de um coespecífico macho não-familiar, de maneira dependente da testosterona. Do mesmo modo, foi mostrado também que quando ambos os camundongos não-familiares eram submetidos à administração de ácido

acético (0,9%), ambos reduzem o número de contorções abdominais, possivelmente devido à distração ou pela analgesia induzida pelo estresse (LANGFORD *et al.*, 2006). Os mesmos autores indicam uma possível tendência dos machos roedores de suprimir a exibição de comportamentos que indiquem a dor na presença de um coespecífico ameaçador. Entretanto, não é possível distinguir se a inibição do comportamento nociceptivo, pelo estímulo social, é causada verdadeiramente pela analgesia induzida pelo estresse ou simplesmente pela diminuição do comportamento de dor, consciente ou não, sem nenhuma redução da dor percebida por eles (LANGFORD *et al.*, 2011). No segundo resultado desse contexto social, foi observado um aumento das emissões de vocalizações aversivas. É conhecido que situações de estresse e dor podem provocar uma série de comportamentos e respostas fisiológicas em animais e uma delas é a emissão de vocalização aversiva (SÁNCHEZ, 2003). A emissão dessas vocalizações estão baseadas em como o animal percebe a situação como ameaçadora (SIMOLA; GRANON, 2018). Portanto, a presença de um animal desconhecido, no presente trabalho, pode induzir o aumento a resposta de estresse dos eventos negativos e assim aumentar as vocalizações aversivas. É importante ressaltar que apesar da redução do comportamento de *grooming* na primeira fase indicando possível analgesia, a emissão de USVs de 22-kHz foi mantida, demonstrando diferenças na exibição desses comportamentos.

Por fim, a presença de fêmeas teve o maior impacto nos parâmetros avaliados. Na avaliação do comportamento de *grooming* facial, os animais que receberam a injeção de formalina não exibiram comportamento de *grooming* facial na primeira fase e exibiram uma tendência de redução da segunda fase, indicada pelas médias do tempo total de *grooming* facial entre os demonstradores na presença de fêmeas, familiares e não-familiares, respectivamente ($179 \pm 38,2 \times 241,8 \pm 39,8 \times 246,3 \pm 71,7$). Berman e Rodin (1982) observaram que ratos machos, quando coabitados com fêmeas, podem diminuir o comportamento de autotomia, após o procedimento de rizotomia. Em outro estudo, foi visto que o comportamento sexual pode diminuir a sensibilidade da dor e vocalizações audíveis induzidos por choque elétrico (SZECHTMAN; HERSHKOWITZ; SIMANTOV, 1981). Ademais, estudos indicam que as fêmeas apresentam um maior comportamento pró-social, definido como ações que tem a intenção de beneficiar o outro, bem como

apresentam maior capacidade de abordagem social (BARTAL; DECETY; MASON, 2011; LANGFORD *et al.*, 2010). Assim, o maior comportamento empático pode induzir efeito analgésico nos coespecíficos, através do fenômeno do *social buffering*, por exemplo, em que há diminuição de um estímulo aversivo pelo contexto social (MARTIN; TUTTLE; MOGIL, 2014). Tem sugerido que o sistema olfatório contribua para esse fenômeno, embora o contato físico não pareça ser necessário (KIYOKAWA *et al.*, 2012). Nesse sentido, os resultados demonstraram que a presença das fêmeas aboliu a emissão de vocalizações aversivas dos demonstradores, o que pode indicar um efeito no aspecto afetivo da dor, diferentemente da analgesia observada no contexto entre não-familiares, onde o estresse social é observado somente entre ratos machos desconhecidos (LANGFORD *et al.*, 2011).

Os efeitos da presença das fêmeas foram observados também na emissão de vocalizações apetitivas pelos animais controle, no qual a média do número total de USV reflete essa diferença ($233,4 \pm 46,10 \times 79,20 \pm 27,70 \times 29,30 \pm 12,70$, número total de emissões de USV de 50-kHz pelos demonstradores na presença de fêmeas, familiares e não-familiares, respectivamente). Esses dados estão de acordo com estudos prévios que indicam que a exposição das fêmeas a coespecíficos machos pode aumentar o número de emissões de vocalizações apetitivas e elas constituem uma resposta influenciada pela condição hormonal e sexual da fêmea coespecífica (RINGEL *et al.*, 2013; BARFIELD *et al.*, 1979). Logo, essas vocalizações juntamente com pistas olfatórias podem aumentar o comportamento de aproximação e assim, a probabilidade de um acasalamento bem-sucedido (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 2009; GEYER; MCINTOSH; BARFIELD, 1978). McIntosh, Barfield e Geyer (1978) observaram que as vocalizações apetitivas, nesse contexto, têm uma função precisa para a comunicação e são conhecidas como chamadas de acasalamento. Além disso, a fêmea exibe uma série de comportamentos padrões indicando receptividade para a cópula. No entanto, é um pré-requisito que o macho esteja “intacto” para o comportamento de solicitação da fêmea e o comportamento de dor pode representar vulnerabilidade (BARFIELD *et al.*, 1979; LANGFORD *et al.*, 2011). De acordo com essa hipótese, foi observado no presente estudo, que quando os animais recebem injeção de formalina, o número de vocalizações apetitivas é reduzido. Nossos resultados indicam, pela primeira vez,

que a indução de dor aguda é capaz de reduzir o número de emissão de vocalização de 50-kHz do tipo flat em contextos sociais.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a injeção de formalina orofacial é capaz de induzir o comportamento de *grooming* facial concomitante a emissão de USV de 22-kHz em ratos isolados na fase 1, e o pré-tratamento com morfina é capaz de inibir os dois parâmetros. Esses resultados corroboram observações prévias de que as USVs representam uma medida pré-clínica adicional, uma vez que pode refletir o aspecto afetivo da dor.

O presente estudo também contribui para o entendimento de que a análise das USVs pode representar uma ferramenta para o estudo da modulação da dor em diferentes contextos sociais. Foi demonstrado pela primeira vez que a injeção de formalina é capaz de reduzir a emissão de USVs de 50-kHz do subtipo flat nos grupos de familiares separados por barreira visual e na presença de fêmeas.

Portanto, nossos dados contribuem para o conhecimento atual de como as interações sociais podem modular a dor, demonstrando que o contágio emocional depende da familiaridade e que o contato visual pode representar um estímulo sensorial importante para esse tipo de comportamento empático. Ademais, foi observada analgesia nos contextos sociais entre não-familiares e machos na presença de fêmeas, entretanto, a razão para esse resultado pode ser diferente para os grupos e precisam ser exploradas.

REFERÊNCIAS

- BARDIN, L. et al. Comparison of milnacipran, duloxetine and pregabalin in the formalin pain test and in a model of stress-induced ultrasonic vocalizations in rats. **Neuroscience research**, v. 66, n. 2, p. 135-140, 2010.
- BARFIELD, R. J. et al. Ultrasonic vocalizations in rat sexual behavior. **American Zoologist**, v. 19, n. 2, p. 469-480, 1979.
- BARTAL, I. B. A.; DECETY, J.; MASON, P. Empathy and pro-social behavior in rats. **Science**, v. 334, n. 6061, p. 1427-1430, 2011.
- BERMAN, D; RODIN, B. E. The influence of housing condition on autotomy following dorsal rhizotomy in rats. **Pain**, v. 13, n. 3, p. 307-311, 1982.
- BLANCHARD, R. J. et al. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. **Physiology & behavior**, v. 50, n. 5, p. 967-972, 1991.
- BOBADE, V. et al. Prophylactic effects of asiaticoside-based standardized extract of *Centella asiatica* (L.) Urban leaves on experimental migraine: Involvement of 5HT1A/1B receptors. **Chinese journal of natural medicines**, v. 13, n. 4, p. 274-282, 2015.
- BORSOOK, T. K.; MACDONALD, G. Mildly negative social encounters reduce physical pain sensitivity. **PAIN**, v. 151, n. 2, p. 372-377, 2010.
- BORTA, A.; WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K. W. Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. **Behavioural brain research**, v. 166, n. 2, p. 271-280, 2006.
- BRENES, J. C. et al. Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 8, p. 1586-1607, 2016.
- BRUDZYNSKI, S. M.; FLETCHER, N. H. Rat ultrasonic vocalization: short-range communication. In: **Handbook of Behavioral Neuroscience**. Elsevier. p. 69-76. 2010.
- BRUDZYNSKI, S. M. et al. Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: long and short calls. **Physiology & behavior**, v. 54, n. 2, p. 215-221, 1993.
- BRUDZYNSKI, S. M. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. **Behavior genetics**, v. 35, n. 1, p. 85-92, 2005.
- BRUDZYNSKI, S. M. Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches. **ILAR journal**, v. 50, n. 1, p. 43-50, 2009.

BRUDZYNSKI, S.M. Pharmacology of ultrasonic vocalizations in adult rats: significance, call classification and neural substrate. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 180-192, 2015.

BURGDORF, J. et al. Breeding for 50-kHz positive affective vocalization in rats. **Behavior genetics**, v. 35, n. 1, p. 67-72, 2005.

BURGDORF, J. et al. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Behavioral neuroscience**, v. 115, n. 4, p. 940, 2001.

CALVINO, B. et al. Ultrasonic vocalization (22-28 kHz) in a model of chronic pain, the arthritic rat: effects of analgesic drugs. **Neuroreport: An International Journal for the Rapid Communication of Research in Neuroscience**, 1996.

CARR, L. et al. Neural mechanisms of empathy in humans: a relay from neural systems for imitation to limbic areas. **Proceedings of the national Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5497-5502, 2003.

CHAMBERS, C. T.; MOGIL, J. S. Ontogeny and phylogeny of facial expression of pain. **Pain**, v. 156, n. 5, p. 798-799, 2015.

CHICHORRO, J. G; PORRECA, F.; SESSLE, B. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 613-626, 2017.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British journal of pharmacology**, v. 141, n. 7, p. 1175-1184, 2004.

CHURCH, R. M. Emotional reactions of rats to the pain of others. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 52, n. 2, p. 132, 1959.

CLAVELOU, P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience letters**, v. 103, n. 3, p. 349-353, 1989.

COGAN, R.; SPINNATO, J. A. Social support during premature labor: Effects on labor and the newborn. **Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology**, v. 8, n. 3, p. 209-216, 1988.

COLLOCA, L.; BENEDETTI, F. Placebo analgesia induced by social observational learning. **PAIN**, v. 144, n. 1-2, p. 28-34, 2009.

CRAIG, K. D. The social communication model of pain. **Canadian Psychology/Psychologiecanadienne**, v. 50, n. 1, p. 22, 2009.

CRAIG, K. D. Social communication model of pain. **Pain**, v. 156, n. 7, p. 1198-1199, 2015.

DALLEL, R. et al. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, v. 61, n. 1, p. 11-16, 1995.

DAVITZ, J. R.; MASON, D. J. Socially facilitated reduction of a fear response in rats. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 48, n. 3, p. 149, 1955.

DINH, H. et al. Rat ultrasound model for measuring pain resulting from intramuscularly injected antimicrobials. **PDA journal of pharmaceutical science and technology**, v. 53, n. 1, p. 40-43, 1999.

DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**, v. 6, p. 381-418, 1983.

FARAMARZI, G.; ZENDEHDEL, M.; HAGHPARAST, A. D1-and D2-like dopamine receptors within the nucleus accumbens contribute to stress-induced analgesia in formalin-related pain behaviours in rats. **European Journal of Pain**, v. 20, n. 9, p. 1423-1432, 2016.

FRIED, K. et al. Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. **Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 155-165, Apr 2001.

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

GOUBERT, L. et al. Learning about pain from others: an observational learning account. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 2, p. 167-174, 2011.

HADJISTAVROPOULOS, T. et al. A biopsychosocial formulation of pain communication. **Psychological bulletin**, v. 137, n. 6, p. 910, 2011.

HAMMERSCHMIDT, K. et al. Female mice respond to male ultrasonic 'songs' with approach behaviour. **Biology letters**, v. 5, n. 5, p. 589-592, 2009.

HAN, J. S.; NEUGEBAUER, V. mGluR1 and mGluR5 antagonists in the amygdala inhibit different components of audible and ultrasonic vocalizations in a model of arthritic pain. **Pain**, v. 113, n. 1-2, p. 211-222, 2005.

HORI, M. et al. Tickling increases dopamine release in the nucleus accumbens and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent rats. **Neuroreport**, v. 24, n. 5, p. 241-245, 2013.

HUMMIG, W.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CHICHORRO, J. G. Pregabalin reduces acute inflammatory and persistent pain associated with nerve injury and cancer in rat models of orofacial pain. **Journal of Oral & Facial Pain & Headache**, v. 28, n. 4, 2014.

INAGAKI, H.; USHIDA, T. Changes in acoustic startle reflex in rats induced by playback of 22-kHz calls. **Physiology & behavior**, v. 169, p. 189-194, 2017.

JEON, D. et al. Observational fear learning involves affective pain system and Ca v 1.2 Ca 2+ channels in ACC. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 482, 2010.

JOURDAN, D. et al. Audible and ultrasonic vocalization elicited by single electrical nociceptive stimuli to the tail in the rat. **PAIN**, v. 63, n. 2, p. 237-249, 1995.

JOURDAN, D. et al. Effect of analgesics on audible and ultrasonic pain-induced vocalization in the rat. **Life sciences**, v. 63, n. 20, p. 1761-1768, 1998.

JOURDAN, D.; ARDID, D.; ESCHALIER, A. Analysis of ultrasonic vocalisation does not allow chronic pain to be evaluated in rats. **Pain**, v. 95, n. 1-2, p. 165-173, 2002.

KIYOKAWA, Y. et al. The neural pathway underlying social buffering of conditioned fear responses in male rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 10, p. 3429-3437, 2012.

KNUTSON, B.; BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. **Psychological bulletin**, v. 128, n. 6, p. 961, 2002.

KNUTSON, B.; BURGDORF, J.; PANKSEPP, J. Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. **Journal of Comparative Psychology**, v. 112, n. 1, p. 65, 1998.

LANGFORD, D. J. et al. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. **Science**, v. 312, n. 5782, p. 1967-1970, 2006.

LANGFORD, D. J. et al. Social approach to pain in laboratory mice. **Social neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 163-170, 2010.

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

LAWSON, S. N. Peptides and cutaneous polymodal nociceptor neurones. In: **Progress in brain research**. Elsevier, p. 369-385.1996.

LESHEM, M.; SHERMAN, M. Troubles shared are troubles halved: stress in rats is reduced in proportion to social propinquity. **Physiology & behavior**, v. 89, n. 3, p. 399-401, 2006.

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

LIM, D. et al. Analgesic effect of Harpagophytum procumbens on postoperative and neuropathic pain in rats. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1060-1068, 2014.

LIM, D.; KIM, J.; KIM, Y. Analgesic Effect of Indian Gooseberry (*Emblica officinalis* Fruit) Extracts on Postoperative and Neuropathic Pain in Rats. **Nutrients**, v. 8, n. 12, p. 760, 2016.

LIM, D. et al. Antihyperalgesic effects of ashwagandha (*Withania somnifera* root extract) in rat models of postoperative and neuropathic pain. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 207-215, 2018.

LICHTENBERG, N. T. et al. Rat behavior and dopamine release are modulated by conspecific distress. **eLife**, v. 7, p. e38090, 2018.

LITVIN, Y.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. **Behavioural brain research**, v. 182, n. 2, p. 166-172, 2007.

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

LÜ, Y. et al. The Locus Coeruleus–Norepinephrine System Mediates Empathy for Pain through Selective Up-Regulation of P2X3 Receptor in Dorsal Root Ganglia in Rats. **Frontiers in neural circuits**, v. 11, p. 66, 2017.

MANDUCA, A. et al. Social play behavior, ultrasonic vocalizations and their modulation by morphine and amphetamine in Wistar and Sprague-Dawley rats. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 8, p. 1661-1673, 2014.

MARTIN, L. J. et al. Reducing social stress elicits emotional contagion of pain in mouse and human strangers. **Current Biology**, v. 25, n. 3, p. 326-332, 2015.

MARTIN, L. J.; TUTTLE, A. H.; MOGIL, J. S. The interaction between pain and social behavior in humans and rodents. In: **Behavioral neurobiology of chronic pain**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 233-250. 2014.

MARTINO, G.; PERKINS, M. N. Tactile-induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel assay to assess anti-migraine therapies in vivo. **Cephalalgia**, v. 28, n. 7, p. 723-733, 2008.

MAY, A. Chronic pain may change the structure of the brain. **PAIN**, v. 137, n. 1, p. 7-15, 2008.

MCINTOSH, T. K.; BARFIELD, R. J.; GEYER, L. A. Ultrasonic vocalisations facilitate sexual behaviour of female rats. **Nature**, v. 272, n. 5649, p. 163, 1978.

MICZEK, K. A.; VAN DER POEL, A. M. Long ultrasonic calls in male rats following mating, defeat and aversive stimulation: frequency modulation and bout structure. **Behaviour**, v. 119, n. 1-2, p. 127-142, 1991.

- MOGIL, J. S. Social modulation of and by pain in humans and rodents. **Pain**, v. 156, p. S35-S41, 2015.
- NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 1304, 2014.
- NATUSCH, C.; SCHWARTING, R. K. W. Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 96, n. 3, p. 251-259, 2010.
- NEUGEBAUER, V. et al. Forebrain pain mechanisms. **Brain research reviews**, v. 60, n. 1, p. 226-242, 2009.
- OLIVEIRA, S. B. et al. Comparison of antinociceptive effects of plain lidocaine versus lidocaine complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin in animal models of acute and persistent orofacial pain. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, p. 1-11, 2019.
- OLIVEIRA, A. R.; BARROS, H. M. T. Ultrasonic rat vocalizations during the formalin test: a measure of the affective dimension of pain?. **Anesthesia & Analgesia**, v. 102, n. 3, p. 832-839, 2006.
- OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779-3787, 2010.
- PALERMO, T. M.; CHAMBERS, C. T. Parent and family factors in pediatric chronic pain and disability: an integrative approach. **Pain**, v. 119, n. 1-3, p. 1-4, 2005.
- PANKSEPP, J. B.; LAHVIS, G. P. Rodent empathy and affective neuroscience. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 9, p. 1864-1875, 2011.
- PANKSEPP, J.; BURGDORF, J. "Laughing" rats and the evolutionary antecedents of human joy?. **Physiology & behavior**, v. 79, n. 3, p. 533-547, 2003.
- PEETERS, P. A. M.; VLAEYEN, J. W. S. Feeling more pain, yet showing less: the influence of social threat on pain. **The Journal of Pain**, v. 12, n. 12, p. 1255-1261, 2011.
- PEREIRA, M. et al. Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania?. **Psychopharmacology**, v. 231, n. 13, p. 2567-2577, 2014
- PERQUIN, C. W. et al. Pain in children and adolescents: a common experience. **Pain**, v. 87, n. 1, p. 51-58, 2000.
- PETERSEN, S; BRULIN, C; BERGSTRÖM, E. Recurrent pain symptoms in young schoolchildren are often multiple. **Pain**, v. 121, n. 1-2, p. 145-150, 2006.

PORRECA, F.; NAVRATILOVA, E. Reward, motivation and emotion of pain and its relief. **Pain**, v. 158, n. Suppl 1, p. S43, 2017.

RABOISSON, P; DALLEL, R. The orofacial formalin test. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 2, p. 219-226, 2004

RICE, G. E.; GAINER, P. "Altruism" in the albino rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 55, n. 1, p. 123, 1962.

RINGEL, L. E. et al. Dopamine D1 and D2 receptor antagonism effects on rat ultrasonic vocalizations. **Behavioural brain research**, v. 252, p. 252-259, 2013.

RODRIGUEZ, E. et al. A craniofacial-specific monosynaptic circuit enables heightened affective pain. **Nature neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 1734, 2017.

SADANANDA, M.; WÖHR, M; SCHWARTING, R. K. W. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. **Neuroscience letters**, v. 435, n. 1, p. 17-23, 2008.

SAITO, Y. et al. Cognitive bias in rats evoked by ultrasonic vocalizations suggests emotional contagion. **Behavioural processes**, v. 132, p. 5-11, 2016.

SÁNCHEZ, C. R-citalopram attenuates anxiolytic effects of escitalopram in a rat ultrasonic vocalisation model. **European journal of pharmacology**, v. 464, n. 2-3, p. 155-158, 2003.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. In: **International review of neurobiology**. Academic Press. p. 179-206. 2011.

SESSLE, B. J. Acute and chronic craniofacial pain: Brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 57-91, Feb 2000.

SESSLE, B. J. et al. Properties and plasticity of the primate somatosensory and motor cortex related to orofacial sensorimotor function. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 1-2, p. 109-114, Jan-Feb 2005.

SHAFIEI, I. et al. Role of D1-and D2-like dopaminergic receptors in the nucleus accumbens in modulation of formalin-induced orofacial pain: Involvement of lateral hypothalamus. **Physiology & behavior**, v. 188, p. 25-31, 2018.

SIAHPOSHT-KHACHAKI, A. et al. Nucleus accumbens dopamine receptors mediate hypothalamus-induced antinociception in the rat formalin test. **European Journal of Pain**, v. 21, n. 7, p. 1285-1294, 2017.

SIMOLA, N. Rat ultrasonic vocalizations and behavioral neuropharmacology: from the screening of drugs to the study of disease. **Current neuropharmacology**, v. 13, n. 2, p. 164-179, 2015.

SIMOLA, N.; GRANON, S. Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. **Neuropharmacology**, 2018.

SINGER, T. et al. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. **Science**, v. 303, n. 5661, p. 1157-1162, 2004.

SIVASELVACHANDRAN, S. et al. Behavioral and mechanistic insight into rodent empathy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 91, p. 130-137, 2018.

DE SOUZA, J. B. et al. Prevalence of chronic pain, treatments, perception, and interference on life activities: Brazilian population-based survey. **Pain Research and Management**, v. 2017, 2017.

STERN, C. A. J. et al. Cannabidiol disrupts the consolidation of specific and generalized fear memories via dorsal hippocampus CB1 and CB2 receptors. **Neuropharmacology**, v. 125, p. 220-230, 2017.

STURGEON, J. A.; ZAUTRA, A. J. Social pain and physical pain: shared paths to resilience. **Pain Management**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2016.

SULLIVAN, M. J. L. Toward a biopsychomotor conceptualization of pain: implications for research and intervention. **The Clinical journal of pain**, v. 24, n. 4, p. 281-290, 2008.

SZECHTMAN, H.; HERSHKOWITZ, M.; SIMANTOV, R. Sexual behavior decreases pain sensitivity and stimulates endogenous opioids in male rats. **European journal of pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 279-285, 1981.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992

VIVIAN, J. A.; MICZEK, K. A. Morphine attenuates ultrasonic vocalization during agonistic encounters in adult male rats. **Psychopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 367-375, 1993.

WAITE, P.; ASHWELL, K. Trigeminal Sensory System. **The Human Nervous System**. p. 1093-124, USA: Elsevier, 2004.

WAITE, P.; ASHWELL, K. Trigeminal Sensory System. **The Human Nervous System**. p. 1010-1142, USA: Elsevier, 2012.

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

WAAL, F. B. M.; PRESTON, S. D. Mammalian empathy: behavioural manifestations and neural basis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 498, 2017.

WALLACE, V. C. J.; NORBURY, T. A.; RICE, A. S. C. Ultrasound vocalisation by

rodents does not correlate with behavioural measures of persistent pain. **European journal of pain**, v. 9, n. 4, p. 445-452, 2005.

WENDLER, E. et al. Evaluation of 50-kHz ultrasonic vocalizations in animal models of mania: ketamine and lisdexamfetamine-induced hyperlocomotion in rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, n. 12, p. 1900-1908, 2016.

WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K. W. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. **Cell and tissue research**, v. 354, n. 1, p. 81-97, 2013.

WÖHR, M. et al. Critical involvement of 5-HT_{2C} receptor function in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 10, p. 1817-1829, 2015.

YEE, N. et al. Juvenile stress potentiates aversive 22-kHz ultrasonic vocalizations and freezing during auditory fear conditioning in adult male rats. **Stress**, v. 15, n. 5, p. 533-544, 2012.

YEN, C. et al. Impact of bilateral anterior cingulotomy on neurocognitive function in patients with intractable pain. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 214-219, 2009.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ANEXO I – CERTIFICADO DE CURSO TEÓRICO SOBRE MANIPULAÇÃO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA
COORDENADORIA DE EXTENSÃO



Certificado

AMANDA RIBEIRO BARROSO

frequentou o curso de extensão "Curso Teórico sobre Manipulação na Experimentação Animal - 12ª edição (09/2017)", realizado no período de 25/09/2017 a 29/09/2017, num total de 40 horas, conforme programa no verso, promovido pelo(a) Departamento de Patologia Básica, do(a) Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, obtendo aprovação com frequência: 100% e aproveitamento: 95, conforme Resolução 72/11 - CEPE.

17 de Maio de 2018.

Prof. Dr. Leandro Franklin Gorsdorf
Pró-Reitor de Extensão e Cultura

Profª. Drª. Maria Virginia Filomena Cremasco
Coordenadora de Extensão

Código de validação: "PT11992"
Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse:
<https://intranet.ufpr.br/sigeu/public/certificado/execute/validade>



CURSO DE EXTENSÃO

Curso Teórico sobre Manipulação na Experimentação Animal - 12ª edição (09/2017)

PROGRAMAÇÃO:

Programa da aula teórica

- Legislação
- Estruturas reguladoras da Experimentação Animal (SBCAL, CONCEA, IAP, IBAMA).
- Necessidade do curso em experimentação
- Certificado de participação, permissão para manipular animais
- Histórico do Desenvolvimento da Experimentação Animal.
- Animais de experimentação
- Padrão sanitário e genético dos animais de laboratório
- Etologia e experimentação animal
- Métodos alternativos para substituição de Animais: vantagens e desvantagens (software, manequins, artefatos anatómicos, outros)
- Zoonose
- Zoonoses mais frequentes em biotério (vírus, bactéria e parasito)
- Biossegurança (cuidados do manipulador)
- Manipulação de animais
- Bem estar animal
- Estresse em animais de experimentação
- Enriquecimento de ambiente
- Técnicas de contenção de animais de laboratório
- Vias de inoculação
- Vias de coleta de material biológico
- Anestesia e analgesia para animais de experimentação
- Formas de eutanásia
- Ética na pesquisa com peixes

COORDENADOR(A): MARCIA KIYOE SHIMADA

Código de validação: "PT11992"

Para verificar a autenticidade deste certificado, acesse: <https://intranet.ufpr.br/sigeu/public/certificado/execute/validade>