

Alessandra Salvador de Souza

**A SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL
COMO AGENTE COMUTADOR ENTRE HIPERNOCICEPÇÃO
E HIPONOCICEPÇÃO DEPENDENDO DO CONTEXTO**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutor em
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério
Tonussi

Florianópolis
2017

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

Souza, Alessandra Salvador de

A Substância Cinzenta Periaquedutal dorsal como agente comutador entre hipernocicepção e hiponocicepção dependendo do contexto / Alessandra Salvador de Souza ; orientador, Carlos Rogério Tonussi - SC, 2017.

208 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

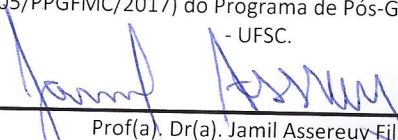
1. Farmacologia. 2. Modulação da nocicepção. 3. Substância Cinzenta Periaquedutal. 4. Contexto. I. Tonussi, Carlos Rogério . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"A substância cinzenta periaqueductal dorsal como agente comutador entre hipernociceção e hiponociceção dependendo do contexto"

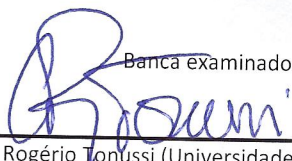
Por

Alessandra Salvador de Souza

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Q5/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.

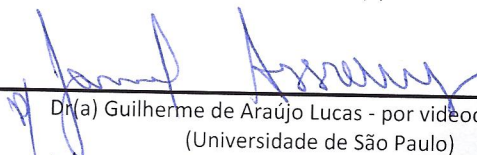


Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy-Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

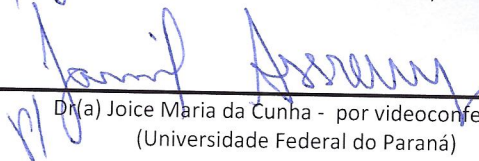


Banca examinadora:

Dr(a) Carlos Rogério Tonussi (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



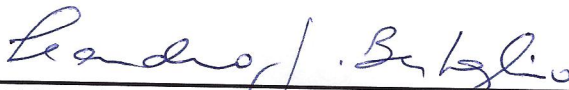
Dr(a) Guilherme de Araújo Lucas - por videoconferência
(Universidade de São Paulo)



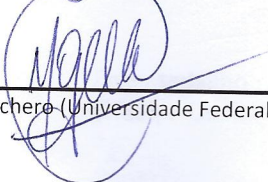
Dr(a) Joice Maria da Cunha - por videoconferência
(Universidade Federal do Paraná)



Dr(a) Fernando Falkenburguer Melleu (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Leandro José Bertoglio (Universidade Federal de Santa Catarina).



Dr(a) Marcelo Giachero (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 03 de fevereiro de 2017.

Este trabalho é dedicado ao meu
príncipe Davi.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Rogério Tonussi, por me receber no LANEN com presteza, por se dispor a me orientar e acreditar na execução desse projeto, apesar de eu ser iniciante na área.

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez, por me apresentar o Departamento de Farmacologia da UFSC.

Aos demais professores do Departamento que sempre me atenderam com prontidão.

Aos companheiros de laboratório Flora, Taciane, Lucas, Maíra, Eduardo e todos os demais que depois chegaram e me acompanharam nessa empreitada. Ao Felipe, pelas longas conversas “etológicas” e por dividir comigo as frustrações e os contentamentos de um resultado. Às minhas queridas Jéssica, Elba e Mariana, pelo suporte “braçal” nas cirurgias e experimentos e na análise comportamental.

À minha amiga querida Cristiane Mochny, que, com carinho e paciência, me ensinou todas as técnicas de estudo cerebral utilizadas neste trabalho, pela leveza nos momentos difíceis e pela sólida amizade que construímos. À Ju Kroon e à Karina Sobotta por dividirem não somente materiais, mas também conhecimento e amizade.

Ao meu marido, companheiro para a vida toda, Adriano Bombassaro, por aguentar a distância, pelos exaustivos quilômetros de indas e vindas semanais, por me acompanhar nessa jornada... com paciência e amor.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

A percepção da dor e as mudanças comportamentais esperadas são influenciadas por processos sensoriais, cognitivos e emocionais que surgem do contexto no qual a experiência dolorosa está inserida. Neste cenário, a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPd) é uma estrutura fundamental no processamento de estratégias de enfrentamento a diferentes tipos de estresse, como ameaça do ambiente externo e dor. A natureza do estressor e o tipo de resposta emocional a ele (medo ou ansiedade) desempenham um papel fundamental para a SCPd produzir analgesia ou hiperalgesia. O tratamento da SCPd com glicina causa hiperalgesia no teste de formalina na pata, o que pode estar relacionado à modulação da nocicepção pela SCPd de acordo à demanda atencional gerada pelo foco estressor. Comportamentos nocifensivos variam em sensibilidade à modulação pela atenção dependendo do nível do sistema nervoso central (SNC) que medeia a resposta comportamental, neste sentido, o comportamento de morder/lamber a pata está vinculado a componentes atencionais da dor induzida por formalina. Neste trabalho, glicina, um co-agonista do complexo receptor NMDA/GLY-B foi microinjetada na SCPd no contexto neutro e no aversivo. No contexto neutro, glicina intra-SCPd aumentou o tempo de manifestação comportamental de morder/lamber. Este efeito hipernociceptivo da glicina intra-SCPd foi revertido no contexto aversivo. Manipulações farmacológicas, por via intratecal, com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ioimbina ou prazosina, sugerem o envolvimento bidirecional de projeções noradrenérgicas descendentes nos efeitos da SCPd, sensibilizada ou não por glicina, sobre a nocicepção que parecem estar relacionadas com a aversividade do contexto e a fase do teste de formalina. Na fase II A do teste algesimétrico, prazosina, antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos, inibiu a facilitação da dor (morder/lamber) induzida por glicina intra-SCPd e aumentou o reflexo nociceptivo (levantar a pata) no contexto neutro. A administração intratecal de 6-OHDA reverteu a analgesia induzida pelo contexto aversivo, sem requerer a sensibilização da SCPd com glicina. Ioimbina por via intratecal evidenciou a participação de receptores α_2 -adrenérgicos espinais nesta ação. Na fase II B do teste de formalina na pata, a injeção intratecal da de 6-OHDA ou de ioimbina previamente à microinjeção de glicina na SCPd promoveu um aumento no tempo gasto no comportamento de morder/lamber. Em relação ao comportamento de congelamento contextualmente induzido, ioimbina *per se* reduziu tal manifestação comportamental. Microinjeção de glicina na SCPd, independente do tratamento intratecal, também diminuiu o

tempo de expressão do comportamento de congelamento, mas não prejudicou a expressão de analgesia induzida por estresse condicionado. Considerando que a SCPd é uma área de integração atencional/emocional e de modulação da dor, nossos resultados sugerem que a sensibilização da SCPd com glicina e a re-exposição ao contexto aversivo influencia a geração de um estado emocional que demanda a atenção para a fonte aversiva mais ameaçadora em um determinado momento, resultando em reversão do efeito hipernociceptivo eliciado pela glicina intra-SCPd no contexto neutro. Mecanismos noradrenérgicos espinais parecem participar sinergisticamente com a glicina intra-SCPd, dependendo da aversividade do contexto e da fase do teste de formalina.

Palavras-chave: SCPd. Atenção. Contexto. Glicina. Estresse. Facilitação da dor. Inibição da dor. Sistema noradrenérgico descendente.

ABSTRACT

Pain perception and the expected behavior changes are influenced by sensory, cognitive and emotional processes that arise from the context in which painful experience is inserted. In this scenario, dorsal periaqueductal gray matter (dPAG) is a fundamental structure in the processing coping strategies to different types of stress, such as the threat of the external environment and pain. The nature of the stressor and the type of emotional response to it (fear or anxiety) play a key role for dPAG to produce analgesia or hyperalgesia. The treatment of dPAG with glycine causes hyperalgesia in the formalin test, which may be related to the modulation of nociception by dPAG according to the attentional demand generated by the stressor focus. Nocifensive behaviors vary in sensitivity to modulation by attention depending on the level of the central nervous system (CNS) that mediates the behavioral response, in this sense, biting / licking behavior is linked to attentional components of formalin-induced pain. Here, glycine, a co-agonist of the NMDA / GLY-B receptor complex, was microinjected into the dPAG in the neutral and aversive context. In the neutral context, intra-dPAG glycine increased the time of biting / licking. This hypernociceptive effect of glycine into the dPAG was reversed in the aversive context. Intrathecal pharmacological manipulations with 6-hydroxydopamine (6-OHDA), yohimbine or prazosin, suggested a bidirectional involvement of the descending noradrenergic projections on the effects of dPAG, sensitized or not by glycine, in nociception, which seemed to be related to the aversivity of context and the formalin test phase. In phase II A of the algesimetric test, prazosin, α_1 -adrenergic receptor antagonist, inhibited intra-dPAG glycine-induced hypernociception (biting/licking) and increased nociceptive reflex (paw lift) in the neutral context. Intrathecal administration of 6-OHDA reversed aversive context-induced analgesia, without requiring dPAG sensitization with glycine. Ioimbine intrathecal evidenced the participation of α_2 -adrenergic spinal receptors in this action. In phase II B of the formalin test, intrathecal injection of 6-OHDA or yohimbine prior intra-dPAG microinjection of glycine caused an increase in the time spent of the biting / licking behavior. Regarding the contextually-induced freezing behavior, yohimbine per se reduced such behavioral manifestation. Intra-dPAG microinjection of glycine, regardless of intrathecal treatment, also decreased expression of the freezing behavior, but did not affect the expression of conditioned stress-induced analgesia. Considering that dPAG is an area of attentional / emotional integration and pain modulation, our results suggest that dPAG

sensitization with glycine and the re-exposure to the aversive context generated an emotional state that demanded the animal attention to the more threatening aversive source at the moment, resulting in reversal of hypernociception elicited by glycine intra-dPAG in a neutral context. Spinal noradrenergic mechanisms seems to participate synergistically with intra-dPAG glycine depending on the aversivity of the context and the phase of the formalin test.

Keywords: dPAG. Attention. Context. Glycine. Stress. Pain facilitation. Pain inhibition. Descending noradrenergic system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sistema descendente modulatório da dor de humanos.....	33
Figura 2 – Ilustração esquemática das subdivisões da SCP de animais a partir de seu eixo rostro-caudal	35
Figura 3 – Injeção intratecal.....	56
Figura 4 – Condicionamento contextual aversivo	63
Figura 5 – Efeito da microinjeção de glicina na SCPd na primeira fase do teste de formalina na pata em ratos	74
Figura 6 – Efeito hipernociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de formalina na pata em ratos	74
Figura 7 – Efeito da microinjeção de glicina na SCPd na fase II B do teste de formalina na pata em ratos.....	75
Figura 8 – Efeito da microinjeção de glicina no CS na primeira fase do teste de formalina na pata em ratos	76
Figura 9 – Efeito da microinjeção de glicina no CS na fase II A do teste de formalina na pata em ratos.....	77
Figura 10 – Efeito da microinjeção de glicina no CS na fase II B do teste de formalina na pata em ratos.....	78
Figura 11 – Congelamento induzido pelo contexto aversivo	78
Figura 12 – Efeitos de choques elétricos de baixas intensidades no dia do condicionamento sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I	79
Figura 13 – Efeitos de estímulos elétricos de baixa intensidade no dia do condicionamento sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A	80
Figura 14 – Efeitos de estímulos elétricos de baixa intensidade no dia do condicionamento sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II B	81
Figura 15 – Efeito do tratamento da SCPd com glicina sobre o tempo de expressão de congelamento na re-exposição ao contexto aversivo.....	82
Figura 16 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I nos contextos neutro e aversivo	83
Figura 17 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A nos contextos neutro e aversivo	84
Figura 18 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II B em diferentes contextos	85

Figura 19 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da degeneração noradrenérgica espinal sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I em diferentes contextos	86
Figura 20 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de ioimbina sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I em diferentes contextos	87
Figura 21 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de prazosina sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I em diferentes contextos	88
Figura 22 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de 6-OHDA sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A em diferentes contextos	89
Figura 23 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de ioimbina sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A em diferentes contextos	91
Figura 24 – Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de prazosina sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A em diferentes contextos	93
Figura 25 – Efeitos da administração de glicina na SCPd e da injeção intratecal de 6-OHDA sobre a manifestação de comportamentos nocifensivos na Fase II B em diferentes contextos	96
Figura 26 – Efeitos da administração de glicina na SCPd e da injeção intratecal de ioimbina sobre a manifestação de comportamentos nocifensivos na Fase II B em diferentes contextos	97
Figura 27 – Efeitos da administração de glicina na SCPd e da injeção intratecal de prazosina sobre a manifestação de comportamentos nocifensivos na Fase II B em diferentes contextos	98
Figura 28 – Efeitos do condicionamento contextual e do tratamento da SCPd após desnervação noradrenérgica com 6-OHDA sobre a expressão de congelamento induzido pelo contexto aversivo	99
Figura 29 – Efeitos do condicionamento contextual e do tratamento da SCPd após injeção intratecal de ioimbina sobre a expressão de congelamento induzido pelo contexto aversivo	100
Figura 30 – Efeitos do condicionamento contextual e do tratamento da SCPd após injeção intratecal de prazosina sobre a expressão de congelamento induzido pelo contexto aversivo	102
Figura 31 – Histologia de confirmação dos sítios de microinjeção cerebral	103

Figura 32 – Esquema da comutação entre hiperalgesia e algésia eliciada pela sensibilização da SCPd por glicina nos contextos neutro aversivo	115
Figura 33 – Vias descendentes da ação pró-nociceptiva da glicina intra-SCPd durante a Fase II A do teste de formalina.....	131
Figura 34 – Vias descendentes da ação antinociceptiva da glicina intra-SCPd durante a Fase II A do teste de formalina.....	133
Figura 35 – Vias descendentes noradrenérgicas envolvidas na antinociceção induzida pelo contexto aversivo durante a Fase II A do teste de formalina	142
Figura 36 – Potenciais vias descendentes ativadas pela glicina intra-SCPd no contexto aversivo durante a Fase II A do teste de formalina.....	144
Figura 37 – Vias noradrenérgicas descendentes inibitórias ativadas pela sensibilização da SCPd com glicina no contexto neutro durante a Fase II B do teste de formalina.....	147
Figura 38 – Potenciais vias descendentes ativadas pela SCPd com glicina exógena durante a antinociceção induzida contextualmente na fase II B do teste de formalina	151

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo dos principais efeitos nocifensivos no contexto neutro dos tratamentos intratecal e intra-SCPd durante a Fase II A do teste de formalina	117
Quadro 2 – Principais efeitos nocifensivos dos tratamentos intratecal e intra-SCPd no contexto aversivo durante a Fase II A do teste de formalina	137
Quadro 3 – Resumo dos principais efeitos nocifensivos dos tratamentos intratecal e intra-SCPd durante a Fase II B do teste de formalina no contexto neutro.....	145
Quadro 4 – Efeitos do tratamento intratecal e intra-SCPd na fase II B do teste de formalina durante re-exposição ao contexto aversivo.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT₁ – receptor serotoninérgico tipo 1
5-HT₂ – receptor serotoninérgico tipo 2
5-HT₃ – receptor serotoninérgico tipo 3
5-HT₇ – receptor serotoninérgico tipo 7
6-OHDA – 6-hidroxi dopamina
7 CL – ácido 7-cloroquinurênico
 α_1 – Receptor Alfa-Adrenérgico Tipo 1
 α_{1A} – Receptor Alfa-Adrenérgico Tipo 1 subtipo A
 α_{1C} – Receptor Alfa-Adrenérgico Tipo 1 subtipo C
 α_{1D} – Receptor Alfa-Adrenérgico Tipo 1 subtipo D
 α_2 – Receptor Adrenérgico Alfa Tipo 2
 α_{2A} – Receptor Alfa-Adrenérgico Tipo 2 subtipo A
 α_{2B} – Receptor Alfa-Adrenérgico Tipo 2 subtipo B
 α_{2C} – Receptor Alfa-Adrenérgico Tipo 2 subtipo C
 μL – Microlitros
 μm – Micrômetros
a. C. – antes de Cristo
AHN – Núcleo Hipotalâmico Anterior
ANOVA – Análise de variância
AP – Ântero-Posterior
Aq – Aqueduto Cerebral
BLA – Núcleo Basolateral da Amígdala
C – Condicionado
 Ca^{2+} – Íon Cálcio
CCA – Córtex Cingulado Anterior
CCAr – Porção Rostral do Córtex Cingulado Anterior
CeA – Núcleo Central da Amígdala
CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais
cm – Centímetros
COF – Córtex Órbita-Frontal
CPF – Córtex Pré-Frontal
CPFdl – Região Dorsolateral do Córtex Pré-Frontal
CPFvm – Região Dorsomedial do Córtex Pré-Frontal
CRF – Fator Liberador de Corticotropina
CS – Colículo Superior
DLPT – Tegmento Pontino Dorsolateral
dmPMD – Região Dorsomedial Do Núcleo Pré-Mamilar Dorsal

dmVMH – Região Dorsomedial do Núcleo Hipotalâmico Ventromedial
dmVMH – Região Dorsomedial do Núcleo Hipotalâmico Ventromedial
DV – Dorso-ventral
EC – Estímulo Condicionado
EI – Estímulo Incondicionado
EPM – Erro Padrão da Média
EVA – Espuma Vinílica Acetinada
F – Valor de ANOVA
g – Gramas
GABA – Ácido Gama Aminobutírico
GABA_A – Receptor Ionotrópico de GABA
G_i – Proteína G inibitória
Gli – Glicina
GLY-A –receptor de glicina sensível à estricnina
GLY-B – sítio de ligação do complexo receptor NMDA/GLY-B
Gq/11– Proteína G estimulatória do tipo q/11
H⁺ – Íon Hidrogênio
HA966 – (±) 3-Amino-1-Hidroxi-2-Pirrolidona
I.A.S.P. – Associação Internacional para o Estudo da Dor
K⁺ – Íon Potássio
Kg – Kilogramas
L5 – Quinto segmento Lombar da Medula Espinal
L6 – Sexto segmento Lombar da Medula Espinal
LA – Núcleo Lateral da Amígdala
LANEN – Laboratório de Neurobiologia da Nocicepção
LC – *Locus Coeruleus*
LCd – Porção dorsal do *Locus Coeruleus*
LCE – Labirinto em Cruz Elevado
LCv – Porção ventral do *Locus Coeruleus*
mA – Miliampére
MEG – Magnetoencefalografia
mg – miligramas
Mg²⁺ – Íon Magnésio
ML – Mesolateral
mm – Milímetros
NaCl – Cloreto de Sódio
NC – Não-condicionado
NDR – Núcleo Dorsal da Rafe

NMDA – N-Metil D-Aspartato
NMDA/GLY-B – Complexo receptor NMDA/GLY-B
nmoles – Nanomoles
NR1/NR2(A à D) – Subunidades do complexo receptor NMDA/GLY-B
NRM – Núcleo Magno da Rafe
°C –Graus Centígrados
P – Probabilidade de Significância
pBMA – Região Posterior da Amígdala Basomedial
PBS – Salina Tampão Fosfato
PKC – Proteína Quinase C
PLC – Proteína Fosfolipase C
pvMEA – Porção Posteroventral da Amígdala Medial
RMf –Ressonância Magnética funcional
RVM – Porção Rostral da Região Ventromedial do Bulbo
s – Segundos
s.c. – Subcutânea
SCP – Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPd – Coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPdl – Coluna dorso-lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPdm – Coluna dorso-medial da Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPl – Coluna lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPvl – Coluna ventro-lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal
SI – Córtex Somatossensorial Primário
SII – Córtex Somatossensorial Secundário
SNC – Sistema Nervoso Central
TEP – Tomografia Por Emissão de Pósitrons
VLM – Região Ventrolateral do Bulbo
vlPMD – Porção ventrolateral do Núcleo Pré-Mamilar Dorsal
vlVMH – Porção ventrolateral do Núcleo Hipotâmico Ventromedial
VMH – Núcleo Hipotalâmico Ventromedial
vs. – Versus
Zn²⁺ – Íon Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	UMA BREVE APRECIÇÃO SOBRE DOR E NOCICEPÇÃO	27
1.2	AS DIFERENTES DIMENSÕES DA DOR E SUA MODULAÇÃO.....	28
1.3	A SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL COMO INTEGRADORA ATENCIONAL E EMOCIONAL NA MODULAÇÃO DA DOR.....	31
1.3.1	Heterogeneidade da SCP	34
1.3.2	A SCPd e a glicina	39
1.3.3	Conectividade funcional da SCP	40
1.3.3.1	Regiões Corticais	40
1.3.3.2	Ínsula.....	41
1.3.3.3	Hipotálamo.....	41
1.3.3.4	Amígdala.....	42
1.4	MODULAÇÃO DA TRANSMISSÃO NOCICEPTIVA ESPINAL POR PROJEÇÕES MONOAMINÉRGICAS DESCENDENTES.....	42
1.5	A FLEXIBILIZAÇÃO DA EXPERIÊNCIA DOLOROSA PELA SCP EM DIFERENTES CONTEXTOS	45
2	HIPÓTESE E OBJETIVOS	51
2.1.	HIPÓTESE E OBJETIVO GERAL.....	51
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	ANIMAIS.....	54
3.2	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	54
3.3	CÂNULAS.....	56
3.4	MICROINJEÇÃO NA COLUNA DORSAL DA SCP.....	56
3.5	INJEÇÃO INTRATECAL	57
3.5.1	Degeneração de terminações catecolaminérgicas da medula espinal	57
3.6	TESTE ALGESIMÉTRICO: TESTE DE FORMALINA NA PATA	57
3.7	CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL AVERSIVO	60
3.8	COMPOSTOS E SOLUÇÕES.....	64
3.9	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	65
3.10	CONFIRMAÇÃO DO SÍTIO DE MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL.....	70

3.11	APRESENTAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	71
4	RESULTADOS	73
4.1	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE GLICINA INTRA-SCPd NO TESTE DE FORMALINA NA PATA.....	73
4.2	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE GLICINA NO COLÍCULO SUPERIOR NO TESTE DE FORMALINA NA PATA .	76
4.3	EFEITOS DE INTENSIDADES CRESCENTES DE CHOQUES ELÉTRICOS NO COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO CONTEXTUALMENTE INDUZIDO	78
4.4	EFEITOS DE INTENSIDADES CRESCENTES DE CHOQUES ELÉTRICOS NA ANALGESIA INDUZIDA CONTEXTUALMENTE.....	79
4.5	EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SCPd SOBRE O COMPORTAMENTO RELACIONADO AO MEDO E COMPORTAMENTOS NOCIFENSIVOS NO CONTEXTO AVERSIVO	82
4.6	EFEITOS DA DEGENERAÇÃO DE FIBRAS NORADRENÉRGICAS DESCENDENTES E DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES α -ADRENÉRGICOS ESPINAIS NAS AÇÕES NOCICEPTIVAS DA GLICINA INTRA-SCPd EM DIFERENTES CONTEXTOS.....	86
4.7	FEITO DA GLICINA INTRA-SCPd SOB NEURODEGENERAÇÃO NORADRENÉRGICA DESCENDENTE NO CONGELAMENTO INDUZIDO CONTEXTUALMENTE.....	99
4.8	EFEITO DA INJEÇÃO INTRATECAL DE IOIMBINA PREVIAMENTE À MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SCPd SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO.....	100
4.9	EFEITO DA INJEÇÃO INTRATECAL DE PRAZOSINA PREVIAMENTE À MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SCPd SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO.....	102
4.10	CONFIRMAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO CEREBRAL.....	103
5	DISCUSSÃO	105
5.1	A REGIÃO CAUDAL DA COLUNA DORSAL DA SCP COMUTA HIPERALGESIA PARA ALGESIA DEPENDENDO DO CONTEXTO EMOCIONAL ONDE OCORRE A NOCICEPÇÃO...	106
5.2	O SISTEMA NORADRENÉRGICO DESCENDENTE MEDEIA OS EFEITOS NOCICEPTIVOS DA MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SCPd EM DIFERENTES CONTEXTOS.....	116
5.2.1	Fase II A.....	117

5.2.1.1	No contexto neutro, vias noradrenérgicas descendentes são ativadas pela SCPd quando esta for sensibilizada por glicina.....	118
5.2.1.2	No contexto aversivo, o sistema noradrenérgico descendente induz analgesia sem a sensibilização da SCPd com glicina	136
5.2.1.3	O componente noradrenérgico da analgesia induzida contextualmente é o receptor α_2 da medula espinal	140
5.2.2	Fase II B.....	145
5.2.2.1	No final do teste de formalina, o componente noradrenérgico é inibitório e precisa ser ativado pela SCPd (sob ação da glicina).....	145
5.2.2.2	Na fase tardia do teste de formalina, a analgesia induzida contextualmente depende da microinjeção de glicina na SCPd e não ativa o sistema noradrenérgico descendente	148
5.3	A ATIVAÇÃO E/OU A SENSIBILIZAÇÃO DA SCPd COM GLICINA INFLUENCIA A EXPRESSÃO DO CONGELAMENTO INDUZIDO CONTEXTUALMENTE.....	152
5.4	O SISTEMA NORADRENÉRGICO DESCENDENTE E A EXPRESSÃO DO CONGELAMENTO INDUZIDO CONTEXTUALMENTE	155
5.5	A MENOR INTENSIDADE DE CHOQUE NO DIA DO CONDICIONAMENTO OCASIONOU MAIOR EXPRESSÃO DE CONGELAMENTO E ANALGESIA NO DIA DO TESTE.....	156
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	159
	REFERÊNCIAS.....	161

1 INTRODUÇÃO

1.1 UMA BREVE APRECIÇÃO SOBRE DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é distinta dos outros sentidos clássicos, porque é multidimensional. Cabem à dor uma sensação de discriminação, uma motivação afetiva, uma potente unidade autônoma e uma estimulação motora reflexiva (CRAIG, 2003). Devido à sua característica aversiva, a dor também pode servir como um sinal de aprendizado aversivo (FIELDS, 1999; JOHANSEN, FIELDS, 2004; JOHANSEN *et al.*, 2010), que permite aprender quais tipos de ações devem ser evitadas para benefício do próprio indivíduo (EIPPERT, TRACEY, 2014).

A dor é, por conseguinte, uma experiência altamente subjetiva, definida por Merskey (1979) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial, ou descrito em termos de tal dano”. Definição que foi então adotada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (I.A.S.P.) e permanece até os dias atuais. Já a nocicepção, devido à ativação de receptores sensoriais seletivos (os nociceptores) que detectam a presença de um estímulo potencialmente nocivo, é apenas parte da experiência total de dor (DE FELICE, OSSIPOV, 2016), trata-se de um termo neurofisiológico para descrever processos de codificação e processamento do estímulo nocivo (LOESER, TREEDE, 2008).

Dor e nocicepção podem ser processos não necessariamente dependentes, uma podendo ocorrer sem a outra. Nem todo estímulo nocivo que ativa os nociceptores resulta necessariamente em uma experiência dolorosa. O estado emocional e atencional do indivíduo, as expectativas em relação à dor e seu tratamento e o contexto no qual ocorre a experiência dolorosa explicam porque indivíduos percebem a dor diferencialmente mesmo na presença de estímulos nociceptivos similares. Essa variabilidade reforça a existência de mecanismos endógenos que modulam a experiência de dor (FAIRHURST *et al.*, 2012; SCHWEINHARDT, BUSHNELL, 2010; DE FELICE, OSSIPOV, 2016). Estudos também mostram que uma experiência dolorosa pode ocorrer sem um estímulo nociceptivo primário (EISENBERGER, LIEBERMAN, WILLIAMS, 2003; DERBYSHIRE *et al.*, 2004; SINGER *et al.*, 2004; RAIJ *et al.*, 2005), por exemplo, a observação de outro indivíduo sentindo dor pode ativar regiões cerebrais relacionadas à dor física (LAMM, DECETY, SINGER, 2011), sendo esta ativação mais proeminente quando se observa um ente querido ao invés de um estranho (CHENG *et al.*, 2010). Porém, apesar de a nocicepção não ser necessária nem

suficiente para a dor, ela é requerida para respostas autonômicas e reflexivas que são essenciais para a sobrevivência (LEE, TRACEY, 2013).

A dor, a despeito de sua valência geralmente aversiva, é benéfica para a sobrevivência, funcionando como um sistema de alarme embutido, alertando sobre uma lesão tecidual direta ou iminente, tendo o propósito de motivar decisões, conduzindo à ação e à mudança de comportamento (EIPPERT, TRACEY, 2014).

É evidente que alguns componentes da experiência de dor podem ser únicos aos humanos e assim não serem acessíveis em testes animais de nocicepção. Porém, apesar de um animal não humano não poder verbalizar o que está sentindo, a forma como ele se comporta pode dizer muito sobre seu estado mental, assim a dor, como experiência subjetiva, pode ser inferida a partir de um comportamento nocifensivo.

1.2 AS DIFERENTES DIMENSÕES DA DOR E SUA MODULAÇÃO

A ideia de que a dor pode ser gerada no cérebro remonta tempos imemoriais. No século V a. C., Hipócrates declarou que a dor, como toda a consciência, deve emergir da atividade cerebral (ADAMS, 2009). Porém estudos iniciais que focalizaram a região cortical mostraram pouco consenso sobre o envolvimento cerebral no processamento da dor. No início do século XX, Head e Holmes observaram indivíduos com ferimentos de guerra e concluíram que o córtex cerebral desempenhava apenas um papel mínimo na percepção da dor (HEAD, HOLMES, 1911). Penfield e Boldrey chegaram a uma conclusão semelhante quando descobriram que pacientes raramente relatavam sensação de dor quando em estimulação elétrica de seu córtex cerebral durante cirurgia para remover focos de crises epiléticas (PENFIELD, BOLDREY, 1937).

No entanto, as observações de Beecher em 1946, reascenderam a discussão a respeito do papel da atividade cerebral na modulação da dor, ao relatar uma notável atenuação da dor experimentada por soldados em situação de combate, mas que reagiam fortemente ao menor procedimento doloroso quando eles voltaram para casa (BEECHER, 1946).

O fato de o mesmo estímulo poder ser experimentado como nocivo em uma situação e inócua em outra e para abordar a variabilidade na percepção da dor, Melzack e Wall propuseram um “portão” hipotético dentro do corno dorsal da medula espinal (ou seja, teoria do controle do portão), que poderia regular o fluxo de informação nociceptiva da periferia para o cérebro. A teoria desses pesquisadores teria incluído processos psicológicos (controles centrais) que emanam de centros

superiores do cérebro que poderiam funcionalmente “fechar o portão” através de vias descendentes, modulando assim a dor (MELZACK, WALL, 1965).

Finalmente, a primeira evidência de que o cérebro poderia influenciar a dor foi apresentada após a estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal (SCP) de ratos (REYNOLDS, 1969), uma estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral, exceto na parte ventral deste (BENARROCH, 2012). Este procedimento não produziu qualquer sinal comportamental manifesto de angústia para um estímulo nocivo (REYNOLDS, 1969), durante a estimulação os animais permanecem alertas e ativos e a maioria das respostas aos estímulos ambientais não mudam, no entanto, respostas esperadas ao estímulo nocivo, como orientação, vocalização e fuga estão ausentes (HEINRICHER, FIELDS, 2013).

A demonstração de que a analgesia produzida por estimulação também pode ser induzida em humanos foi um grande avanço para a compreensão dessa função modulatória do sistema nervoso central (SNC). Como em animais não humanos, a analgesia produzida por estimulação pode ser provocada por estimulação elétrica da SCP e de modo semelhante, a função motora não é afetada e os indivíduos relatam analgesia (BOIVIE, MEYERSON, 1982). Embora este procedimento seja raramente realizado atualmente, a especificidade do efeito analgésico e o fato da analgesia ser induzida em regiões cerebrais discretas que são homólogas a uma variedade de espécies, reforça a importância biológica da modulação da dor (HEINRICHER, FIELDS, 2013).

Pesquisas posteriores demonstraram que a SCP é parte de um circuito central que controla a transmissão nociceptiva ao nível do corno dorsal da medula espinal por meio de uma estação intermediária, a porção rostral da região ventromedial do bulbo (RVM) (BASBAUM, FIELDS, 1984; JONES, GEBHART, 1988).

A observação feita em estudos iniciais sobre a analgesia produzida por estimulação elétrica da SCP (e posteriormente do RVM por MAYER, PRICE, 1976) e o posterior reconhecimento de que o sistema SCP-RVM é recrutado para ações de analgesia induzida por opioides, estigmatizaram, por um tempo, a SCP como um sítio de controle inibitório da dor. Pesquisas das décadas de 1970 e 1980 revelaram influências inibitórias de sítios do mesencéfalo, como a SCP, regiões da Ponte e do RVM (FIELDS *et al.*, 2006; HEINRICHER, INGRAM, 2008, para revisão), focalizando sobre o papel de analgesia endógena em estados de estresse extremo, por exemplo (BOLLES, FANSELOW, 1980). No entanto, desde o início da década de 1990, um número

crescente de estudos tem revelado que o Sistema SCP-RVM também pode facilitar a transmissão espinal da nocicepção (PORRO, CAVAZZUTI, 1993; GEBHART, 1999; URBAN, GEBHART, 1999; PERTOVAARA, 2000; PORRECA *et al.*, 2002). Estudos funcionais têm cada vez mais evidenciado que a facilitação da dor corresponde a maior parte dessa função modulatória do tronco encefálico (PORRECA *et al.*, 2002; HEINRICHER *et al.*, 2009).

Muitos desses estudos iniciais sobre estruturas do SNC envolvidas na modulação da dor eram restritos à pesquisa em animais não humanos devido à característica invasiva dos procedimentos. Eram utilizadas técnicas de transecção da medula espinal, lesão cerebral, estimulação elétrica ou química de áreas localizadas do cérebro. O surgimento de técnicas de neuroimagem em humanos, por exemplo, magnetoencefalografia (MEG), tomografia por emissão de pósitrons (TEP) e ressonância magnética funcional (RMf) criou oportunidades de estudar as bases neurais e a modulação psicológica da dor em humanos de modo não invasivo (LINNMAN *et al.*, 2012).

Várias áreas corticais e subcorticais são ativadas pela dor, entre elas, regiões sensoriais, límbicas e associativas. O tálamo, os córtices somatossensorial primário (SI) e secundário (SII), a ínsula, o núcleo *accumbens*, a amígdala e o córtex cingulado anterior (CCA) são os locais cerebrais primários ativados durante uma experiência de dor aguda (BUSHNELL, APKARIAN, 2005; KNUDSEN *et al.*, 2011; LEE; TRACEY, 2013). Outras regiões cerebrais são ativadas em função do controle endógeno da dor, em particular, a SCP, o RVM e o Tegmento Pontino Dorsolateral (DLPT) (MILLAN, 2002; KNUDSEN *et al.*, 2011; LEE, TRACEY, 2013).

A ativação neural destas áreas é consistente com estudos anatômicos e eletrofisiológicos que mostram possível conectividade nociceptiva aferente para estas regiões (FRIEDMAN *et al.*, 1986; RAUSELL, JONES, 1991; CRAIG, DOSTROVSKY, 1991; SAAB, WILLIS, 2003; APKARIAN *et al.*, 2005; DUM, LEVINHAL, STRICK 2009). O núcleo *accumbens* e a amígdala (BECERRA *et al.*, 2001; BALIKI *et al.*, 2010) provavelmente recebem entrada nociceptiva através de projeções espinoparabraqueoamidaloideas (BERNARD *et al.*, 1996), por exemplo, já a SCP recebe entrada nociceptiva através de vias espinoreticulares (DUNCKLEY *et al.*, 2005).

Como seria esperado, as várias regiões cerebrais e as diferentes vias nociceptivas são importantes para diferentes aspectos da experiência de dor. A dor envolve um componente sensorial que permite classificá-la quanto à qualidade, à duração e à intensidade, além de permitir localizar

e discriminar o estímulo nociceptivo. Estudos de neuroimagem têm revelado que a codificação da informação dessas características sensoriais é realizada pelos córtices somatossensorial primário e secundário (SI e SII) (KENSHALO, ISENSEE, 1983; KENSHALO *et al.*, 1988; CHUDLER *et al.*, 1990; PLONER, FREUND, SCHNITZLER, 1999; GREENSPAN, LEE, LENZ, 1999). Outras regiões como o tálamo e a região posterior da ínsula também constituem a base sensorial da experiência dolorosa (BUSHNELL, APKARIAN, 2005).

No entanto, o que faz da dor uma percepção díspar é o quão desagradável ela pode ser, ou seja, o ônus do caráter emocional da experiência. Enquanto a intensidade da dor reflete um julgamento sobre a magnitude do estímulo nociceptivo, o desagrado da dor condiz ao seu construto aversivo que reflete o significado motivacional e comportamental do estímulo (PRICE, 2000). É o desagrado da dor que motiva o indivíduo a se engajar em um comportamento, que o impulsiona a desenvolver uma estratégia para minimizar a valência negativa geralmente associada à dor, e dependendo da circunstância, isso pode significar ficar imóvel ou voltar à atenção para a fonte nociceptiva.

Dentre as áreas cerebrais que medeiam esses aspectos afetivos/motivacionais da dor estão o córtex cingulado anterior (CCA), o córtex pré-frontal (CPF), a região anterior da ínsula, a amígdala e a SCP (KNUDSEN *et al.*, 2011).

1.3. A SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL COMO INTEGRADORA ATENCIONAL E EMOCIONAL NA MODULAÇÃO DA DOR

Condizente com sua natureza afetiva-motivacional, a dor é significativamente influenciada pelo contexto em que ocorre, pelo estado cognitivo e emocional do indivíduo e por memórias de experiências dolorosas passadas (PRICE, 2000; VILLEMURE BUSHNELL, 2002, ROY, PERETZ, RAINVILLE, 2008; ROY *et al.*, 2011; BUSHNELL, CEKO, LOW, 2013; DE FELICE, OSSIPOV, 2016). A resposta comportamental para um evento nocivo é modificada de acordo com o que é apropriado ou possível em uma situação particular (TRACEY, 2008), assim, a percepção de dor é inerentemente variável entre os indivíduos e até pelo mesmo indivíduo o que pode conduzir a diferentes manifestações comportamentais.

A modificação de respostas neurais, autonômicas e comportamentais à dor por fatores emocionais e cognitivos resulta da ação de redes neurais do SNC que modulam a transmissão da informação

nociceptiva no corno dorsal da medula espinal (HEINRICHER, FIELDS, 2013). A SCP desempenha um papel fundamental nesse cenário, uma vez que constitui uma verdadeira interface anatômica e funcional entre o prosencéfalo, o tronco encefálico inferior e as vias nociceptivas ascendentes, modulando tanto a informação nociceptiva que provém da medula espinal quanto integrando áreas cerebrais que atendem ao componente afetivo-motivacional da dor (BENARROCH, 2012), sendo considerada um sítio crucial para o processamento de estratégias de enfrentamento a diferentes tipos de estresse, como ameaça do ambiente externo e dor (BANDLER, SHIPLEY, 1994).

A SCP modula a transmissão nociceptiva espinal através de suas conexões com outros núcleos do tronco encefálico, incluindo a porção rostral da região ventromedial do bulbo (RVM) e o tegmento pontino dorsolateral (DLPT) (**Fig. 1**) (BASBAUM, FIELDS, 1978; OSSIPOV, DUSSOR, PORRECA, 2010). Este sistema envolve principalmente opioides endógenos, noradrenalina e serotonina.

Eferentes do CCA, CPF, ínsula, amígdala e hipotálamo alcançam a SCP, sugerindo que o contexto emocional, o estado de atenção e expectativas podem alterar as interações entre essas estruturas modulatórias da experiência dolorosa e assim inibir ou facilitar a dor (DE FELICE, OSSIPOV, 2016).

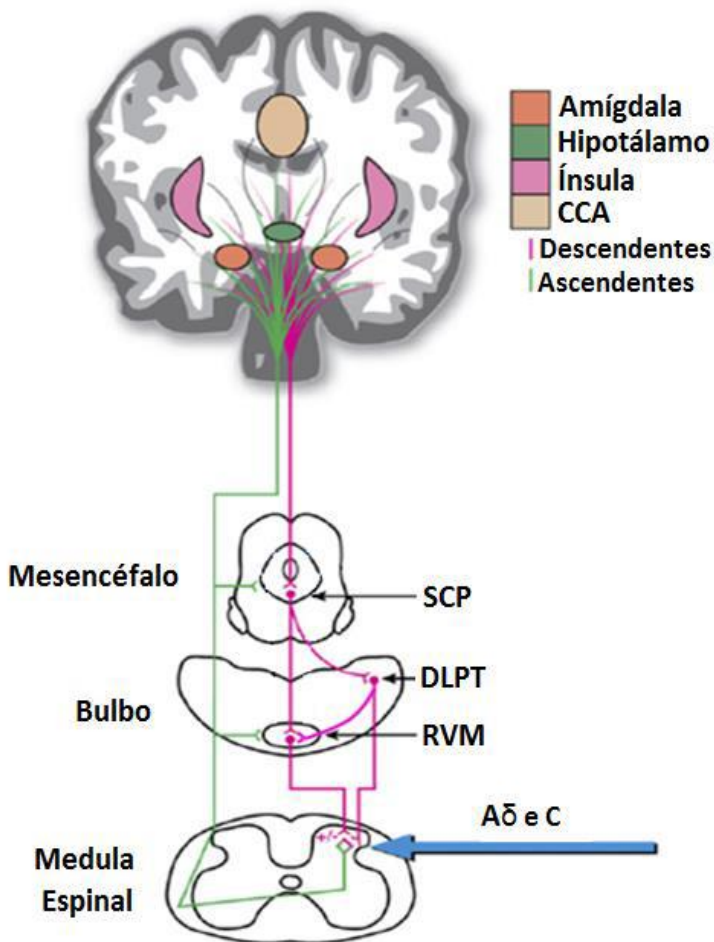


Figura 1. Sistema descendente modulatório da dor de humanos. Córtex cingulado anterior (CCA), ínsula e amígdala ativam projeções para a Substância Cinzenta Periaquedutal (SCP). A SCP modula a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal através de conexões no RVM (porção rostral da região ventromedial do bulbo) e no tegmento pontino dorsolateral (DLPT). O RVM contém neurônios serotoninérgicos e não serotoninérgicos, os quais se projetam diretamente para o corno dorsal, o DLPT projeta neurônios noradrenérgicos para o RVM e para o corno dorsal. A SCP exerce influência bimodulatória sobre a nociceção, ou seja, pró ou antinociceptiva, como indicado por +/-, respectivamente (Adaptado de TRACEY, MANTYH, 2007).

1.3.1 Heterogeneidade da SCP

A SCP não é uma estrutura homogênea e essa ideia emergiu a mais de quatro décadas (HAMILTON, 1973). Experimentos iniciais que utilizaram a microinjeção de aminoácidos excitatórios na SCP (BANDLER, 1982, 1988; HILTON, REDFERN, 1986; KREIGER, GRAEFF, 1985) combinados com traçado retrógrado e anterógrado de substâncias (WIBERG *et al.*, 1987; BLOMQVIST, CRAIG, 1991; CAMERON *et al.*, 1995; KEAY *et al.*, 1997) revelaram que essa estrutura tem um grau peculiar de organização anatômica e funcional na forma de diferentes colunas neuronais que se estendem por variadas distâncias ao longo do seu eixo rostro-caudal. São as colunas dorsomedial, dorsolateral, ventrolateral e lateral, como ilustrado na Figura 2. Essas regiões são distintas quanto à imunorreatividade, densidade de receptores, conexões e, conseqüentemente, funções (BANDLER, CARRIVE, ZHANG, 1991; BANDLER, SHIPLEY, 1994; BANDLER *et al.*, 2000; KEAY, BANDLER, 2002; GROSS, CANTERAS, 2012 para revisão; BORELLI *et al.*, 2013).

Estudos que utilizaram microestimulação química indicaram que as diferentes colunas da SCP organizam diferentes estratégias de enfrentamento à dor e a outros estressores (BANDLER; SHIPLEY, 1994; BANDLER *et al.*, 2000, KEAY, BANDLER, 2002; HEINRICHER, *et al.*, 2009). Estratégias de enfrentamento são geralmente relacionadas à natureza da fonte de estresse, se é escapável ou inescapável (BANDLER *et al.*, 2000). Por exemplo, microinjeções de aminoácidos excitatórios na coluna ventrolateral da SCP (SCPvl) de ratos e gatos, provocam bradicardia, hipotensão, cessação das atividades em curso (quiescência) e diminuição da reponsividade a estímulos ambientais (hipoatividade). Além disso, essas reações foram associadas à redução na responsividade a estímulos nocivos (hiponocicepção) mediada por opioides. Tal repertório pode atender a estratégias de enfrentamento passivas condizentes à presença de um estressor do qual não se pode fugir, como uma lesão traumática severa, por exemplo (BANDLER, SHIPLEY, 1994, BANDLER *et al.*, 2000). Por outro lado, microinjeções de aminoácidos excitatórios nas colunas dorsolateral e lateral da SCP (SCPdl e SCPl) produzem, em ratos e gatos, taquicardia, hipertensão, reações de “luta ou fuga” e hiponocicepção não mediada por opioides, consideradas estratégias ativas de enfrentamento a uma ameaça escapável, da qual se pode fugir (BANDLER, SHIPLEY, 1994; BANDLER *et al.*, 2000). No entanto, um estudo recente de estimulação cerebral profunda em humanos, apresentou evidências diretas que a SCPd (que corresponde às

colunas dorsomedial e dorsolateral da SCP) pode causar analgesia por mecanismos opioidérgicos (PEREIRA *et al.*, 2013).

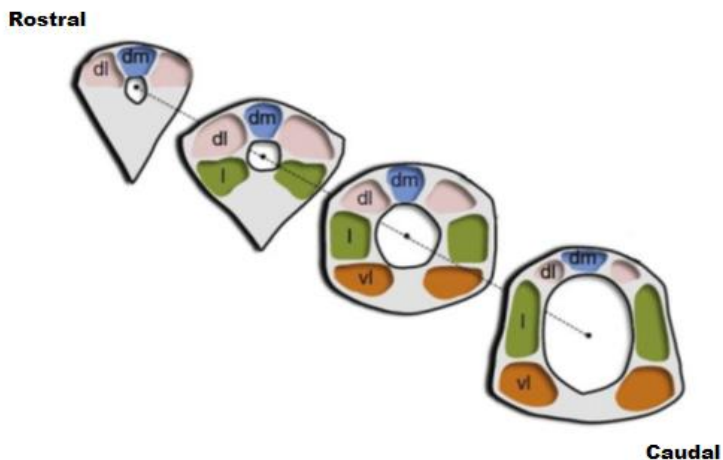


Figura 2. Ilustração esquemática das subdivisões da SCP de ratos, a partir de seu eixo rostro-caudal. dm, dorsomedial, dl, dorsolateral, l, lateral, vl, ventrolateral (Adaptado de LINNMAN *et al.*, 2012).

A hiponociceção mediada por opioides associada à ativação da SCPvl, que tem um perfil temporal duradouro, pode fomentar a recuperação e a cura durante um período de imobilidade após lesão. A hiponociceção não mediada por opioides associada à SCPdl e à SCPl, tem um curto período de duração, e pode atender à função de inibição de comportamentos reflexos incompatíveis com estratégias de defesa ativas (ZHANG *et al.*, 1994; BANDLER, SHIPLEY, 1994; LUMB, 2004), por exemplo, reflexos de retirada e reflexos orofaciais direcionados à fonte nociceptiva.

Assim como outros animais, humanos reagem com diferentes estratégias de enfrentamento emocional para estressores "escapáveis" ou "inescapáveis" e há também segregação das diferentes colunas da SCP na mobilização de diferentes circuitos do SNC que são ativados de acordo com a natureza do estímulo. As estratégias ativas, ocorrem, por exemplo, na presença de dor cutânea de curta duração e estão associadas à ativação motora e simpática. Já o estresse inescapável, como a dor somática ou

visceral profunda, gera estratégias emocionais passivas de enfrentamento (BENARROCH, 2012), como bradicardia e hipotensão, corroborando a sugestão de que a SCPvl pode estar associada à redução da dor envolvendo atividade parassimpática vagal (PEREIRA *et al.*, 2013).

As características funcionais distintas das diferentes colunas da SCP também são evidenciadas na elaboração de estratégias para lidar com outros estressores, além da dor. BORELLI e colaboradores (2013) apresentaram um papel diferencial do fator de liberação de corticotropina (CRF) exógeno sobre as colunas ventrolateral e dorsal da SCP na modulação da expressão de comportamentos relacionados ao medo condicionado. Os pesquisadores concluíram que regiões dorsais da SCP parecem estar envolvidas na expressão de comportamentos incondicionados, enquanto respostas comportamentais condicionadas defensivas parecem recrutar a parte ventral (SCPvl) desta estrutura mesencefálica (BORELLI *et al.*, 2013).

De fato, a literatura sobre os distintos sistemas neurais envolvidos nos diferentes tipos de medo (CANTERAS *et al.*, 2012; GROSS, CANTERAS, 2012 para revisão) reforça a existência de uma especialização na mobilização diferencial das colunas da SCP para organizar respostas defensivas a diferentes classes de ameaça. Medo da dor, medo de predadores e medo de indivíduos agressivos da mesma espécie são processados em vias neuronais independentes que incluem diferentes núcleos da amígdala, do hipotálamo e distintas colunas da SCP. Por exemplo, pistas contextuais que estão associadas ao estímulo doloroso (como choques elétricos) ativam a CeA para induzir comportamentos defensivos através da coluna ventrolateral da SCP (SCPvl), enquanto estímulos de ameaça predatória que eliciam respostas de medo inato ativam a amígdala lateral (LA), a região posterior da amígdala basomedial (pBMA), a porção posteroventral da amígdala medial (pvMEA), a região dorsomedial do hipotálamo ventromedial (dmVMH), a porção ventrolateral do núcleo pré-mamilar dorsal (vlPMD) e a coluna dorsolateral da SCP (SCPdl). O medo de coespecíficos agressivos (medo inato) envolve outra via amigdalá-hipotalâmica, que constitui a região posterodorsal da amígdala medial (pdMEA), a porção ventrolateral do hipotálamo ventromedial (vlVMH), a porção dorsomedial do núcleo pré-mamilar dorsal (dmPMD) e a coluna dorsomedial da SCP (SCPdm) (CANTERAS *et al.*, 2012; GROSS, CANTERAS, 2012 para revisão).

Adicionalmente a estas evidências anatômicas, estudos com abordagem farmacológica (MENDES-GOMES, AMARAL, NUNES-DE-SOUZA, 2011) evidenciam a segregação de funções (como ansiedade

e dor) dentro da SCP, de uma forma dependente do contexto (ligado à natureza do estímulo ameaçador). Os pesquisadores usaram NMDA para lesar a SCPvl e verificaram que esta região é importante para a modulação da nocicepção ao estímulo inescapável formalina, mas não é relevante para certas reações defensivas e para a antinocicepção induzida pelo contexto aversivo. Os resultados estão relacionados, de fato, à natureza do ambiente ameaçador, o labirinto em cruz elevado (LCE), um estímulo aversivo incondicionado. De fato, a expressão de comportamentos defensivos incondicionados requer a coluna dorsal e não a ventrolateral da SCP, como já discutido.

As diferentes colunas da SCP recebem também projeções segregadas funcionalmente também a partir de vias nociceptivas da medula espinal. As colunas lateral e dorsolateral, por exemplo, recebem entradas somatotopicamente organizadas a partir de nociceptores superficiais (principalmente do tipo A δ) retransmitidas pela lâmina superficial do corno dorsal da medula espinal. Em contraste, a coluna ventrolateral da SCP recebe entrada convergente tanto do corno dorsal superficial como do profundo, retransmitindo informações aferentes nociceptivas de nociceptores cutâneos (fibras C), viscerais e musculares, bem como da medula espinal sacral (BANDLER *et al.*, 2000; KEAY; BANDLER, 2002; LUMB, 2004; PARRY *et al.*, 2008).

A heterogeneidade da SCP também se estende às projeções para os núcleos pontinobulbares, especialmente no que se refere às eferências da SCPdl e da SCPvl. Por exemplo, em ratos, a SCPdl projeta-se preferencialmente para o *locus coeruleus* (LC), região do grupo de células noradrenérgicas A7, núcleo gigantocellular *pars-alpha*, parte rostral do núcleo paragigantocellular (localizados no DLPT) e região do grupo de células noradrenérgicas A5 (na região ventrolateral do bulbo, VLM), enquanto a SCPvl apresenta, predominantemente, projeções para o núcleo magno da rafe (NMR), a parte caudal do núcleo paragigantocellular lateral e o núcleo reticular rostroventrolateral (CAMERON, *et al.*, 1995).

O uso de técnicas neuroimagem funcional da SCP humana e outras áreas cerebrais correlacionadas podem reforçar a existência de um padrão semelhante de segregação de funcional dentro desta estrutura mesencefálica, como observado em estudos em animais (LINNMAN, *et al.*, 2012). Um estudo recente, que utilizou RMf para analisar a conectividade funcional das colunas dorsolateral e ventrolateral da SCP humana (COLOUMBE *et al.*, 2016), veio a colaborar em grande parte, com os resultados das pesquisas de segregação anatômica das subdivisões da SCP em animais. Segundo os autores, a SCPdl não apresenta conectividade funcional com o tronco encefálico inferior, sendo que a

conectividade das subregiões da SCP com o bulbo parece ser específica da SCPvl (COLOUMBE *et al.*, 2016). Esse último achado contradiz, em parte, dados primordiais provenientes de pesquisas com primatas não humanos, que mostravam que todas as colunas da SCP se dirigiam ao tronco encefálico inferior, exceto a SCPdl (MANTYH, 1983).

A importância de diferenciação da SCP ao longo do seu eixo longitudinal ou rostro-caudal (BANDLER, DEPAULIS, 1991; BANDLER *et al.*, 2000) também tem sido bastante difundida. Em um estudo de estimulação profunda do cérebro humano, que reforça o conhecimento sobre a modulação diferencial da dor pelas porções ventral e dorsal da SCP através dos sistemas parassimpático e simpático, respectivamente, posicionou eletrodos na parte mais rostral da SCP (PEREIRA *et al.*, 2010), onde os efeitos nociceptivos podem ser menos pronunciados do que os observados mais caudalmente em estudos animais de analgesia induzida por estimulação (BEHBEHANI, 1995). Porém, uma recente meta-análise de dados de neuroimagem sugere que áreas de processamento da dor na SCP humana parecem estar localizadas mais rostralmente nessa estrutura (LINNMAN *et al.*, 2012).

Alguns pesquisadores têm proposto que a organização do polo rostro-caudal da SCP possa implicar em diferentes aspectos modulatórios sobre os comportamentos de defesa (BANDLER, DEPAULIS, 1991; BANDLER *et al.*, 2000), sejam eles nocifensivos ou não nocifensivos, especialmente em relação à SCPd. Por exemplo, distintas porções ao longo do eixo longitudinal da SCPdl medeiam diferentes padrões de atividade somatomotora (luta *versus* fuga) acompanhadas de diferentes padrões de tônus vasoconstritor (BANDLER *et al.*, 2000). Assim como áreas rostrais e caudais da SCPdl parecem modular diferencialmente as respostas comportamentais ao medo inato à pista de predador e medo condicionado olfatório respectivamente, sugerindo ainda uma participação distinta dos receptores NMDA nestas situações (SOUZA, CAROBREZ, 2016).

As porções caudais da SCPd parecem estar implicadas na reação defensiva induzida pelo glutamato e nos efeitos do tipo ansiogênicos e antinociceptivos e/ou hipernociceptivos induzidos pela microinjeção de glicina, um coagonista do complexo receptor NMDA/Glicina-B (NMDA/GLY-B) nestas porções (TEIXEIRA, CAROBREZ, 1999; MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008; MARTINS *et al.*, 2010a), sugerindo que a integridade de mecanismos que requerem glutamato na porção caudal da SCPd parece ser relevante a esses fenômenos.

A este respeito, a SCPd apresenta todos os subtipos de receptores para o glutamato, entretanto, o complexo receptor NMDA/GLY-B parece

ser o principal subtipo envolvido nas ações do glutamato nesta estrutura. Além do sítio de ligação para os agonistas glutamato e NMDA (localizado nas subunidades NR2), que também é alvo de diversos antagonistas, o receptor NMDA apresenta sítios de reconhecimento para moduladores endógenos, incluindo cátions (Zn^{2+} , Mg^{2+} , H^+) e poliaminas, ácido araquidônico e dinorfina, e para a glicina (nas subunidades NR1), em um sítio de ligação que é insensível à estricnina (GLY-B). Como já mencionado, a glicina funciona como um coagonista deste complexo receptor, sua presença em concentrações adequadas é um pré-requisito para a ativação do canal por glutamato ou NMDA (DANYSZ, PARSONS, 1998).

1.3.2 A SCPd e a glicina

Pesquisas têm sugerido a relevância do complexo receptor NMDA/GLY-B da SCPd na modulação de comportamentos relacionados ao medo/ansiedade (para revisão veja CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001) e à nocicepção (MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008; MARTINS *et al.*, 2010a). Com os agonistas desencadeando propriedades ansiogênicas, enquanto os antagonistas mostrando potencial ansiolítico em animais não humanos e humanos (TRULLAS *et al.*, 1989; CORBETT, DUNN, 1991; ANTHONY, NEVINS, 1993; LEESON, IVERSEN, 1994; SCHMITT *et al.*, 1995; BARON *et al.*, 1997; DE-SOUZA *et al.*, 1998; TEIXEIRA, CAROBREZ, 1999; SANTOS *et al.*, 2006).

Da mesma forma que os agonistas deste complexo receptor (glutamato e NMDA), a aplicação na SCPd do coagonista glicina provoca reações de defesa, do tipo ansiogênicas (TEIXEIRA, CAROBREZ, 1999; MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008) e efeito hiponociceptivo (MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008) em teste nociceptivo térmico e hipo ou hipernociceptivo em dois diferentes testes de nocicepção induzida por formalina (MARTINS *et al.*, 2010a). Microinjeções na SCPd do antagonista seletivo do sítio GLY-B do receptor NMDA, o ácido 7-cloroquinurênico (7 CL) e do antagonista parcial deste sítio, o (\pm) -3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona (HA966) têm efeito do tipo ansiolítico (MATHEUS *et al.*, 1994; DE-SOUZA *et al.*, 1998; TEIXEIRA, CAROBREZ, 1999), o último também reverte o efeito hipernociceptivo induzido pela microinjeção de glicina na SCPd no teste de formalina na pata (MARTINS *et al.*, 2010a).

Enquanto a microinjeção de glutamato na SCPd induz reações defensivas vigorosas, como fuga, a microinjeção de agonistas do sítio

GLY-B, como glicina e D-serina, um ligante específico deste sítio, provocam comportamentos do tipo ansiogênicos considerados mais sutis, relacionados ao conflito entre abordagem/esquiva, diminuindo por exemplo, a exploração dos braços abertos no LCE (CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001 para revisão). O efeito comportamental mais discreto induzido pelos agonistas no sítio GLY-B intra-SCPd pode derivar de sua influência essencialmente moduladora sobre as ações de ligantes endógenos do complexo receptor NMDA.

Vários estudos têm mostrado que o glutamato e o NMDA não podem ativar os receptores NMDA, a menos que a glicina esteja presente como um coativador (LESSON, 1993; KLECKNER, DINGLEDINE, 1988; MAYER *et al.*, 1992; DANYSZ, PARSONS, 1998). A literatura é controversa sobre a saturação dos sítios de ligação GLY-B do complexo receptor NMDA/GLY-B *in vivo* (KLECKNER, DINGLEDINE, 1988; KEMP *et al.*, 1988; DANYZ, PARSONS, 1998,). Havia sido proposto que concentrações extracelulares de glicina no SNC seriam suficientemente altas para saturar sítios GLY-B (KEMP *et al.*, 1988). No entanto agonistas exógenos do sítio de GLY-B potencializaram os efeitos de agonistas de receptores NMDA como, por exemplo, despolarização CA1 hipocampal e aumento nos níveis de GMPc no cerebelo (MINOTA *et al.*, 1989, KEMP, LEESON, 1993). Além disso, agonistas do sítio de GLY-B administrados na coluna dorsal da SCP causaram efeito do tipo ansiogênico (CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001, para revisão) e efeitos hiponociceptivo (MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008; MARTINS *et al.*, 2010a) ou hipernociceptivo (MARTINS *et al.*, 2010a). O conjunto dessas pesquisas sugere que sítios GLY-B dos receptores de NMDA parecem não estar totalmente saturados *in vivo*, pelo menos na SCPd ou pelo menos em uma das porções do seu eixo rostro-caudal.

1.3.3 Conectividade funcional da SCP

O entendimento das conexões anatômicas da SCP sustenta seu funcionamento como uma área integradora atencional/emocional e produtora de uma variedade de respostas autonômicas (LOVICK, 1986; DEPAULIS, BANGLES, VERGNES, 1989), sensoriais (REYNOLDS, 1969; MAYER, LIEBESKIND, 1974) e motoras (LARSON, KISTLER, 1986), que são parte do repertório de estratégias de defesa (BANDLER *et al.*, 2000), como já mencionado.

1.3.3.1 Regiões Corticais

Várias áreas corticais se projetam diretamente para a SCP, dentre elas se destacam o CPF, o CCA e o córtex insular (AN *et al.*, 1998, FLOYD *et al.*, 2000). A SCP não somente recebe aferências de regiões corticais mas também se projeta rostralmente para o Tálamo medial, Córtex orbitofrontal (COF), córtex pré-frontal ventromedial (CPFvm) e CCA, fornecendo um possível substrato para o controle ascendente da nocicepção (COFFIELD, BOWEN, MILETIC, 1992; CAMERON *et al.* 1995).

O CPF fornece a principal aferência prosencefálica à SCP (AN *et al.*, 1998), essa região cortical está envolvida na codificação dos aspectos cognitivos como a atenção e as expectativas, principalmente a região dorsolateral do CPF (CPFdl), cujas funções executivas influenciam a dor de uma forma dependente do contexto (AKITSUKI, DECETY, 2009).

O CCA (assim como a região anterior da ínsula), têm papel primordial na codificação dos aspectos emocional e motivacional da dor (RAINVILLE *et al.*, 1997) e se projeta diretamente para a SCP. O CCA parece ser uma região que coordena os impulsos de áreas parietais, envolvidas na percepção de ameaça corporal com os sinais de áreas corticais frontais envolvidas nos planos e prioridades de resposta para comportamentos relacionados à dor (PRICE, 2000). Estudos comportamentais com animais apontam a importância do CCA, especialmente a porção rostral (CCAr) no processamento do aprendizado aversivo relacionado à dor (JOHANSEN, FIELDS, 2004; JOHANSEN, FIELDS, MANNY, 2001).

1.3.3.2 Ínsula

Evidências sustentam que a ínsula está envolvida tanto no aspecto afetivo-motivacional da dor quanto no componente sensorial, com a porção anterior sendo particularmente importante para a experiência subjetiva da dor (BALIKI, GEHA, APKARIAN, 2009; CRAIG, 2011), enquanto que a região insular posterior pode representar um sítio crucial de processamento da informação nociceptiva. Essa região cortical tem sido identificada como a mais consistente área ativada durante a dor induzida por estímulo nociceptivo (APKARIAN *et al.*, 2005).

1.3.3.3 Hipotálamo

O hipotálamo também constitui uma importante fonte de projeções para a SCP (BANDLER, KEAY, 1996, RIZVI *et al.*, 1996). A manipulação de várias regiões do hipotálamo pode produzir analgesia

(RHODES, LIEBESKIND 1978; MANNING, MORGAN, FRANKLIN, 1994; HOLDEN, VAN POPPEL, THOMAS, 2002) ou hiperalgesia (OKA, *et al.* 1995; HEINRICHER *et al.*, 2004;; MARTENSON, CETAS, HEINRICHER, 2009). Estudos mostram que as conexões entre a SCP e o hipotálamo são recíprocas. A coluna dorsolateral, por exemplo, é a subdivisão da SCP preferencialmente conectada com os núcleos hipotalâmicos relacionados a reações de defesa, como os núcleos hipotalâmicos anterior (AHN) e ventromedial (VMH) e o núcleo pré-mamilar dorsal (PMD) (CAMERON *et al.*, 1995; De OLIVEIRA, DEL BEL, GUIMARÃES, 2000). O AHN é o principal núcleo hipotalâmico ativado após estimulação somática nociva e a SCPdl é a estrutura responsável por coordenar as funções autonômicas e sensoriais em resposta a esses aferentes nociceptivos oriundos de diferentes domínios periféricos (PARRY *et al.*, 2002).

Kincheski e colaboradores ratificaram as projeções ascendentes da SCPdl ao tálamo e ao hipotálamo (circuito hipotalâmico defensivo, AHN-VMH-PMD), através de um estudo anatômico de traçado; com uma abordagem farmacológica sugeriram que essas projeções ascendentes da coluna dorsolateral da SCP influenciam o aprendizado associativo aversivo (KINCHESKI *et al.*, 2012).

1.3.3.4 Amígdala

A importância da amígdala em respostas emocionais, no estresse e na ansiedade, sugere que esta estrutura pode ser um sítio onde as emoções são integradas com o processamento da dor (BINGEL, TRACEY, 2008). Suas complexas conexões com o CPF permitem promover a modulação emocional de funções cognitivas em estados de dor persistente, tais como tomada de decisão entre avaliação de risco e recompensa *versus* dor (NEUGEBAUER *et al.*, 2009), essa modulação parece ser mediada através das conexões da amígdala com a SCP. De fato, estudos de imagem mostram aumento de respostas de neurônios da amígdala durante estimulação nociva, bem como interações com regiões corticais e a SCP (BINGEL, TRACEY, 2008). Esses estudos são consistentes com a conclusão de que a antinocicepção induzida por estresse, sensível a opioides, é provável envolver interações entre a amígdala e a SCP e/ou RVM (HOPKINS, *et al.*, 1998).

1.4 MODULAÇÃO DA TRANSMISSÃO NOCICEPTIVA ESPINAL POR PROJEÇÕES MONOAMINÉRGICAS DESCENDENTES

Uma vez que a SCP se projeta apenas minimamente para a medula espinal, as suas conexões com a porção rostral da região ventromedial do bulbo (RVM) e com o tegmento pontino dorsolateral (DLPT) são fundamentais para a modulação da transmissão nociceptiva no corno dorsal. A SCPdl parece não apresentar conexões diretas com o RVM e sim, com o DLPT, que por sua vez, se conecta com o RVM e se projeta para o corno dorsal da medula espinal (HEINRICHER, FIELDS, 2013). De fato, uma linha de pesquisa sugere que a SCPdl supre preferencialmente o *locus coeruleus* (LC) no DLPT e a SCPvl, o NMR (CAMERON *et al.*, 2005).

Apesar de as bases neuroquímicas das projeções descendentes do tronco encefálico para o corno dorsal não estarem bem esclarecidas, as vias serotoninérgicas e noradrenérgicas parecem compreender os maiores componentes destas projeções para a medula espinal.

Os neurônios do RVM (que inclui o núcleo magno da rafe (NRM) e a formação reticular adjacente ventral ao núcleo reticular gigantocelular) constituem, juntamente com o Núcleo Dorsal da Rafe (NDR) fonte de serotonina para o corno dorsal (OSSIPOV, 2012, para revisão; HEINRICHER *et al.*, 2009). Um grupo emergente de pesquisas vem apontando o NDR como um agente facilitatório da nocicepção, aumentando a transmissão nociceptiva espinal, bem como influenciando centros superiores (MARTINS *et al.*, 2013, 2015).

A serotonina pode exercer efeitos pró e antinociceptivos sobre a transmissão nociceptiva espinal. Alguns estudos apontam que o efeito antinociceptivo serotoninérgico é mediado em grande parte, por receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ no corno dorsal da medula espinal (MILLAN, 2002), outros sugerem que a inibição da nocicepção é indireta e pode ser exercida pela excitação de interneurônios GABAérgicos inibitórios mediada por receptores 5-HT₃ medulares (ALHAIDER, LEI, WILCOX, 1991). Já a contribuição pró nociceptiva da serotonina tem sido demonstrada em muitos modelos animais incluindo teste de formalina intraplantar, lesão medular, hiperalgesia e alodinia (GREEN, SCARTH, DICKENSON, 2000; PETERS *et al.*, 2010; SUZUKI *et al.*, 2004; MARSHAL *et al.* 2012). Evidências mostram que o ondansetron, um antagonista do receptor 5-HT₃, pode bloquear as consequências da facilitação descendente quando administrado por via intratecal, diminuindo, por exemplo, reações comportamentais durante a segunda fase do teste de formalina (OYAMA *et al.*, 1996; ZEITZ *et al.*, 2002) e a hiperalgesia produzida pela microinjeção de CCK no RVM, enquanto que a administração intratecal de SB-269970, um antagonista do receptor 5-HT₇ espinal, bloqueou o efeito antinociceptivo da morfina administrada

no RVM (DOGRUL, OSSIPOV, PORRECA, 2009; MARSHAL *et al.*, 2012).

A noradrenalina também desempenha um papel importante na modulação da dor. Esse neurotransmissor modula a transmissão nociceptiva espinal (através de receptores α -adrenérgicos no corno dorsal), bem como a atividade de outros centros moduladores da dor, principalmente o RVM (CLARK, PROUDFIT, 1991) e a amígdala (ORTIZ *et al.*, 2007)

Os principais grupos de células noradrenérgicas estão situados no DLPT. Essa região da ponte contém neurônios noradrenérgicos que se originam no LC, no grupo celular A5 e A7 (Kölliker-Füse), que se projetam para o corno dorsal da medula espinal e centros superiores (HEINRICHER, FIELDS, 2013). Permitindo, à SCP exercer seus efeitos sobre a nocicepção em parte, através de conexões recíprocas com esses núcleos noradrenérgicos.

Na medula espinal existem dois tipos principais de receptores α -adrenérgicos: α_1 e α_2 . Alguns estudos sugerem que a antinocicepção é mediada por receptores espinais α_2 -adrenérgicos e a pró-nocicepção mediada por receptores α_1 -adrenérgicos, enquanto outros, apontam um papel antinociceptivo para os receptores α_1 (PERTOVAARA, 2013, para revisão).

Porém, não é muito elucidador o papel do tônus noradrenérgico à responsividade nociceptiva aguda e tônica (PERTOVAARA, 2013), de modo que diversos grupos relatam que o bloqueio farmacológico de receptores α -adrenérgicos espinais e a depleção de norepinefrina por neurotoxinas têm pouco ou nenhum efeito sobre testes que modelam condição de dor aguda (MARTIN *et al.*, 1999; NUSEIR, PROUDFIT, 2000; JASMIN, BOUDAH, OHARA, 2003). Em contraste, Howorth e colaboradores (2009) relataram hiperalgesia térmica quando uma abordagem baseada em vetor viral foi utilizada para reduzir a excitabilidade de neurônios noradrenérgicos pontinoespinais em animais normais (HOWORTH *et al.*, 2009).

Resultados de estudos envolvendo estados de dor crônica também são contraditórios. Há relatos de que a depleção ou antagonismo noradrenérgico facilitam respostas em estados de dor neuropática, sugerindo que sistemas noradrenérgicos descendentes inibitórios são recrutados após a lesão nervosa (XU, KONTINEN, KALSO, 1999; JASMIN, BOUDAH; OHARA, 2003). No entanto, a redução da excitabilidade dos neurônios noradrenérgicos pontinos não melhorou nem a alodinia nem a hiperalgesia tátil em animais submetidos à lesão nervosa (HOWORTH *et al.*, 2009).

Um fator complicador para a interpretação desses dados é que grupos de células noradrenérgicas têm alvos supraespinhais (córtex insular anterior, por exemplo, JASMIN *et al.*, 2003), bem como conexões recíprocas com a SCP (e RVM) o que poderia contribuir para alterações na nocicepção após a manipulação de corpos celulares noradrenérgicos.

A análise desses estudos traz à tona que a compreensão de como o SNC alterna entre a inibição e facilitação da dor não é uma tarefa previsível. Tanto vias serotoninérgicas quanto noradrenérgicas podem exercer efeitos pró e antinociceptivos dependendo dos tipos (e subtipos) de receptores para serotonina e norepinefrina no corno dorsal da medula espinal e da população de neurônios ativada. Além disso, diferentes espécies de roedores utilizadas nos experimentos (LLORCA-TORRALBA, *et al.*, 2016) e diferentes contextos (grau de aversividade) empregados podem contribuir para resultados contraditórios.

1.5 ATENÇÃO E EMOÇÃO INFLUENCIAM A SCP POR DIFERENTES VIAS

A natureza e os mecanismos de modulação da dor por fatores cognitivos e emocionais parecem ser diferentes. Em situações específicas, como, por exemplo, em estudos que utilizaram manipulações contextuais, foi evidenciado que focalizar a atenção sobre a dor aumenta a intensidade da sensação percebida, sem alterar significativamente o desagrado da dor, enquanto o estado emocional negativo aumenta o desagrado da dor sem alterar a intensidade da sensação (ROY, PERETZ, RAINVILLE, 2008; VILLEMURE, SLOTNICK, BUSHNELL, 2003; LOGGIA, MOGIL, BUSHNELL, 2008 a, b). Em 2009, o estudo de VILLEMURE e BUSHNELL foi o primeiro a dissociar a circuitaria envolvida na modulação emocional e atencional da dor (VILLEMURE, BUSHNELL, 2009).

Estudos de imagem do cérebro humano que manipulam a direção da atenção enquanto controlam o estado emocional (VILLEMURE, BUSHNELL, 2009; PLONER *et al.*, 2011; DUNCKLEY *et al.*, 2007) encontraram que a modulação da dor pela atenção foi relacionada com alteração na atividade induzida pela dor somente na ínsula e no córtex somatossensorial primário, resultado que é consistente com o papel destas regiões na sensação da dor. Em contraste, estudos de neuroimagem avaliando a influência de estados emocionais negativos gerados, por exemplo, pela visão de faces emocionais, por ouvir músicas ou sentir odores desagradáveis, alteram a ativação cortical induzida pela dor principalmente no CCA (VILLEMURE, BUSHNELL, 2009; PLONER

et al., 2011; PHILLIPS *et al.*, 2003; ROY *et al.*, 2009; BERNA *et al.*, 2010), região particularmente importante no desagrado relacionado à dor.

Pesquisas que utilizaram procedimentos que não dissociaram atenção e emoção, ou seja, nos quais procedimentos de distração provavelmente aumentaram emoções negativas apresentaram ativação do córtex cingulofrontal que inclui o CCA e o COF, bem como a ativação da SCP (VALET *et al.*, 2004; PETROVIC *et al.*, 2000; TRACEY *et al.*, 2002). Entretanto, quando a emoção foi dissociada da atenção, o aumento da emoção negativa foi associado com a ativação da circuitaria CCA - CPF- SCP (VILLEMURE, BUSHNELL, 2009).

Em contraste, quando manipulações experimentais fomentaram o direcionamento intencional da atenção para um estímulo doloroso, foram evidenciadas alterações na atividade na ínsula correlacionada com a atividade no córtex parietal superior. Vias descendentes a partir da ínsula para a amígdala alcançam a SCP, fornecendo um possível componente descendente para a modulação da dor pela atenção (CORBETTA, SHULMAN, 2002).

1.6 A FLEXIBILIZAÇÃO DA EXPERIÊNCIA DOLOROSA PELA SCP EM DIFERENTES CONTEXTOS

Todos os processos cognitivos, emocionais e sensoriais que afetam a percepção da dor surgem do contexto ao redor da experiência dolorosa e isso é válido não somente para a percepção da dor *per se*, mas também para a resposta a tratamentos analgésicos (CARLINO, FRISALDI, BENEDETTI, 2014).

Com o aprendizado, pistas contextuais podem adquirir a capacidade de aumentar ou diminuir a atividade nociceptiva de neurônios do corno dorsal, na ausência de um estímulo aversivo. Em situações nas quais indivíduos são condicionados com pistas que prevêem estímulos dolorosos, há um efeito significativo sobre a experiência da dor (SAWAMOTO *et al.*, 2000; PLOGHAUS *et al.*, 2003). Por exemplo, quando pistas preditivas de dor são apresentadas a humanos um pouco antes de um estímulo inócuo, os indivíduos são mais propensos a relatar este estímulo como sendo doloroso (HEINRICHER, FIELDS, 2013). Estudos que utilizaram neuroimagem funcional têm destacado a participação imperativa da SCP durante manipulações contextuais concomitantemente à aplicação do estímulo nocivo (DERBYSHIRE, OSBORN, 2009).

Um desses estudos foi empreendido por Leknes e colaboradores em 2013. A abordagem destes pesquisadores agregou percepção da dor,

condutância da pele (considerada uma medida fisiológica) e padrões da ativação cerebral em resposta a um estímulo térmico de intensidade nociva moderada, idêntico, em dois diferentes contextos. No “contexto controle”, os participantes tinham 50% de chance de receber um estímulo moderadamente nocivo (doloroso) ou um estímulo térmico inócua (morno), enquanto no “contexto alívio relativo”, eles tinham 50% de chance de receber o mesmo estímulo moderadamente nocivo ou um estímulo nocivo intenso (muito doloroso). A dor moderada foi percebida como dolorosa e desagradável no “contexto controle”, mas, surpreendentemente, foi percebida como agradável no “contexto alívio relativo”. A mudança da condutância da pele durante estimulação nociva moderada foi menor neste contexto que no “contexto controle”. Além disso, quando a dor moderada foi percebida como agradável, a atividade na ínsula e no CCA foi atenuada, enquanto a atividade na circuitaria de recompensa foi aumentada, incluindo o CPFvm e essa atividade teve correlação positiva com aumento de atividade na SCP (LEKNES *et al.*, 2013).

Os autores sugerem que o estímulo moderadamente nocivo no “contexto alívio relativo” ativou a circuitaria de recompensa cerebral, que, por sua vez, inibiu regiões de processamento da dor (LEKNES *et al.*, 2013). Sustentando essa interpretação, o CPFvm que tem contribuição importante na avaliação e processamento da recompensa (HOSOKAWA *et al.*, 2007; SEYMOR, McCLURE, 2008), é densamente conectado à SCP e a outros núcleos que fornecem controle descendente de sinais nociceptivos provenientes da medula espinal. Em vários estudos sobre modulação da dor baseada no contexto essa região cortical encontra-se ativada (MEISSNER *et al.*, 2011; WAGER *et al.*, 2011; PETROVIC *et al.*, 2002).

Apesar de não ocorrer efeito do contexto na atividade global da SCP, indivíduos que tiveram maior influência do contexto na supressão da dor ativaram mais fortemente a SCP no contexto “alívio relativo” e a conectividade entre essa estrutura e o núcleo accumbens/ estriado ventral foi também mais positiva neste contexto (LEKNES *et al.*, 2013).

Embora excepcionais, os resultados da abordagem do estudo LEKNES e colaboradores (2013), ajudam a ilustrar como o sistema modulatório da dor não é uma linha rotulada, na qual sempre as mesmas conexões e estruturas são ativadas. Há um dinamismo na ativação de conexões entre estruturas cerebrais modulatórias da dor e esse dinamismo parece depender do significado que o contexto ajuda a estabelecer ao estímulo nocivo. Considerando que em um contexto apropriado a dor pode ter uma aceitação positiva ou uma percepção menos aversiva, poder-

se-ia manipular o contexto positivamente, para uso terapêutico, como a manipulação placebo, um exemplo clássico de como o contexto pode influenciar a percepção da dor.

Pesquisas em animais baseadas no condicionamento Pavloviano e expectativas contribuíram grandemente para o conhecimento sobre o efeito placebo (BENEDETTI *et al.*, 2005; HAOUR, 2005). Estudos translacionais para humanos, baseados nestas pesquisas em animais (COLLOCA, BENEDETTI, 2005; PRICE *et al.*, 2006, 2007), que utilizaram técnicas de imagem (PETROVIC *et al.*, 2002; ZUBIETA *et al.*, 2005) e o paradigma de condicionamento (WAGER *et al.*, 2004), ajudaram a desvendar as bases neuroquímicas para essa manipulação contextual em humanos e sustentam que mecanismos pré-frontais podem desencadear a liberação de opioides na SCP (e outras estruturas do tronco encefálico) durante as expectativas geradas pela manipulação, influenciando o sistema inibitório da dor e subsequentemente, modulando sua percepção (TRACEY, MANTYH, 2007)

Por outro lado, situações que são ameaçadoras também causam analgesia. O estresse é conhecido por induzir analgesia e aumentar o limiar de dor em uma variedade de situações, tanto em modelos animais quanto em seres humanos, o que indica que a antinocicepção observada em animais não é meramente uma hiporreflexia (FLOR *et al.*, 2002; RHUDY, MEAGHER, 2003; YILMAZ *et al.*, 2010).

A natureza do estressor e o tipo de resposta emocional (medo ou ansiedade) a ele desempenham um papel fundamental para produzir analgesia (YILMAZ *et al.*, 2010; CARLINO, FRISALDI, BENEDETTI, 2014). Para um roedor, por exemplo, a presença de um predador ou pistas dele e pistas contextuais aversivas, como às associadas a choques elétricos produzem efeitos antinociceptivos relevantes. Assim, o condicionamento Pavloviano também pode ser usado para gerar aversividade (medo condicionado) e induzir analgesia (FENDT, FANSELOW, 1999), sendo um paradigma comportamental bastante empreendido para verificar como estruturas cerebrais modulatórias da dor são influenciadas pelo contexto emocional (REA, ROCHE, FINN, 2011; OLANGO *et al.*, 2012; BUTTLER *et al.*, 2011; REA *et al.*, 2013).

Considerada uma importante estrutura do sistema defensivo cerebral (GRAEFF, 1990), a SCP tem um papel central na antinocicepção induzida pela aversividade ambiental (contexto), incluindo a sua região dorsal (REA, LANG, FINN, 2009; BUTTLER *et al.*, 2011; OLANGO *et al.*, 2012).

Um estudo recente propôs que SCP funciona na flexibilização da experiência de dor em diferentes contextos. Roy e colaboradores

destacaram a SCP como uma região importante para o aprendizado sobre como se evitar a dor. Esses pesquisadores observaram que erros de predição aversiva apresentaram correlação importante com sinais de RMf da SCP humana. Quando os autores analisaram todo o cérebro, a SCP foi a única área cerebral que atendeu todas as condições da abordagem axiomática utilizada para fundamentar essa correlação (ROY *et al.*, 2014).

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE E OBJETIVO GERAL

Considerando que a SCPd é uma interface integradora de emoções e atenção a informações nociceptivas provenientes da medula espinal, a hipótese é que ela seja uma estrutura flexibilizadora da experiência de dor em diferentes contextos.

Isto posto, o objetivo geral do trabalho é verificar se a SCPd, sensibilizada com glicina, funciona como uma estrutura comutadora entre hiperalgesia e hipoalgesia dependendo do contexto emocional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a (s) concentração (ões) de glicina aplicada (s) na SCPd com potencial (is) de efeito (s) nocifensivo (s) no teste de formalina na pata em um contexto neutro;

- Padronizar um protocolo de condicionamento contextual aversivo, no qual serão avaliados os efeitos de diferentes intensidades de choques elétricos aplicados nas patas no dia do condicionamento sobre o tempo de manifestação comportamental defensiva e nocifensiva no dia da injeção subcutânea de formalina na pata;

- Avaliar os efeitos comportamentais nocifensivos e relacionado ao medo da microinjeção de glicina na SCPd no contexto neutro ou no aversivo;

- Investigar se os efeitos comportamentais nocifensivos e defensivo induzidos pela microinjeção de glicina na SCPd no contexto neutro ou aversivo, após a administração, por via intratecal, da neurotoxina catecolaminérgica 6-Hidroxidopamina (6-OHDA);

- Discriminar farmacologicamente receptores α -adrenérgicos do corno dorsal da medula espinal envolvidos nas respostas comportamentais defensiva e nocifensivas causadas pela microinjeção de glicina na SCPd nos contextos neutro ou aversivo, através da administração por via intratecal de antagonistas dos receptores α_1 (prazosina) e α_2 - adrenérgicos (ioimbina) espinais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, foram utilizados em todos os experimentos. Os animais foram fornecidos pelo Biotério de Criação do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC) e após o desmame, enviados ao Biotério de Manutenção do Departamento de Farmacologia, onde ficaram por um período breve de tempo e então, aos 75 dias de idade, os animais foram enviados ao Biotério de Experimentação do Laboratório de Neurobiologia da Nociceção (LANEN).

No biotério do LANEN os animais foram alojados em caixas plásticas em grupos de cinco, com livre acesso à água e à comida, um ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro (de 12 h).

Com finalidade profilática, no LANEN, os ratos receberam tratamento por via oral contra endo e ectoparasitoses com uma solução aquosa de ivermectina (48mg/L) durante três dias consecutivos (FOLETTI, MARTINS, TONUSSI, 2013). As parasitoses são causas comuns na reprodutibilidade experimental (CARTY, 2008), assim o tratamento contra parasitoses pode contribuir para a redução da quantidade de animais utilizadas nos experimentos.

Ao completarem 90 dias de idade, com peso aproximado de 280 - 330 gramas, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica. Após o procedimento estereotáxico, retornaram ao biotério do LANEN, até o número máximo de três animais por caixa moradia com livre acesso à água e alimento e permaneceram em recuperação por no mínimo sete dias antes do início da fase experimental. Durante o período de recuperação, os mesmos foram observados quanto à manifestação de dor (redução do consumo de ração e água), além de sinais de sangramento no local da cirurgia, infecção, distensão abdominal, entre outros parâmetros.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o guia ético da Associação Internacional para o Estudo da Dor (I.A.S.P., 1995) e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFSC (Protocolo: P00723).

3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais submetidos a este procedimento foram primeiramente submetidos à anestesia geral por via i.p. com cetamina (10%, 90mg/Kg) e xilazina (2%, 10mg/kg). Após a perda do reflexo alérgico, verificado pela pressão cutânea da pata, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico e fixados tanto pelas barras auriculares colocadas nos meatos auditivos quanto pela presilha nasal, que prende os incisivos e o osso nasal. Após assepsia da área com álcool iodado, os animais tiveram a região superior da cabeça tricotomizada e o periósteo foi removido para melhor visualização das suturas cranianas que serviram de referência para a implantação das cânulas-guia. Uma solução de Cloridrato de Lidocaína 3% com Norepinefrina (1:50.000, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) foi injetada por via subcutânea na região dorsal da cabeça, com a finalidade de se promover além de uma anestesia local, redução do extravasamento sanguíneo durante o procedimento cirúrgico. Em seguida, foi realizada uma incisão na pele e remoção do tecido subcutâneo para que se visualizem os pontos cranianos de referência: bregma e lambda. Após a exposição da superfície craniana, 2 parafusos foram colocados, um em cada osso frontal, a fim de proporcionar melhor aderência do acrílico odontológico que foi derramado, sobre toda superfície craniana exposta no final da cirurgia. Em seguida, a horizontalidade do crânio foi verificada e corrigida através do ajuste das coordenadas do lambda e do bregma, de forma que tais pontos ficassem com a mesma altura. Depois de corrigida a inclinação, a partir do bregma, a torre do estereotáxico foi deslocada conforme as coordenadas tridimensionais de acordo com o atlas do cérebro de rato para a região caudal da SCPd esquerda (PAXINOS, WATSON, 2009).

- Ântero-posterior: AP = -7,6 mm em relação ao bregma,
- Meso-lateral: ML = +1,9 mm em relação à sutura sagital,
- Dorso-ventral: DV = -2,0 mm em relação à superfície externa do crânio, em ângulo de 22°.

Com o auxílio de uma broca odontológica, perfurou-se o ponto achado e a cânula-guia foi sutilmente introduzida. Foi adaptado um mandril de aço inox nº 26 (Comercial Rio Verde, Brasil) na cânula com a finalidade de impedir a obstrução desta. Por fim, despejou-se o acrílico auto-polimerizável que se solidifica rapidamente, agregando todas as peças e impedindo o deslocamento da cânula-guia.

Os animais receberam por via intramuscular uma dose única de associação de antibióticos (Pentabiótico®, 1.0mL/kg, Fort Dodge, Brasil) logo após a cirurgia, para prevenir infecções e garantir a boa recuperação

dos animais. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em grupos de 3 em caixas plásticas com serragem limpa em ambiente silencioso e aquecido até o desaparecimento completo dos efeitos da anestesia geral. Em seguida, retornaram ao biotério do LANEN, com livre acesso à água e alimento e permaneceram em recuperação por no mínimo sete dias antes do início da fase experimental. Durante o período de recuperação, os mesmos foram observados quanto à manifestação de dor (redução do consumo de ração e água), além de sinais de sangramento no local da cirurgia e bem-estar físico geral.

3.3 CÂNULAS

Com a finalidade viabilizar as microinjeções na SCPd, foram implantadas cânulas-guia confeccionadas no LANEN, a partir de agulhas hipodérmicas descartáveis (25 x 7 mm), em um comprimento de 13 mm, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo® - Brasil).

3.4 MICROINJEÇÃO NA COLUNA DORSAL DA SCP

Para a realização deste procedimento, foram confeccionadas agulhas com 16,20 mm de comprimento a partir de agulhas gengivais (0,3 mm de diâmetro). Estas eram conectadas por um tubo de polietileno (PE10, 10 mm de diâmetro) à uma microseringa (Hamilton®, 5 µL), a qual foi preenchida com água destilada e com a solução a ser injetada, separadas por uma bolha de ar. O deslocamento desta bolha serviu como indicativo da correta administração das soluções. A agulha possuía 3,20 mm a mais da cânula-guia com o propósito que as soluções fossem realmente microinjetadas na SCPd.

No momento da microinjeção na SCPd, o animal foi sutilmente contido com o auxílio de um pano e a após a retirada do mandril, a cânula-guia foi cuidadosamente desobstruída utilizando uma lima odontológica do mesmo comprimento que a cânula (13 mm). Após esses cuidados, a agulha foi delicadamente introduzida pela cânula-guia e com o auxílio de uma bomba de infusão (Harvard®, modelo HA 22) fez-se a administração de 0,3 µL da solução durante um período de 60 segundos. Após o término da microinjeção cerebral, a agulha foi deixada permanecer por mais 10 s na cânula-guia para garantir completa difusão da substância injetada e para evitar refluxos. Em seguida, o animal foi recolado em sua caixa moradia onde permaneceu por 5 min, até ser submetido às demais fases do protocolo experimental.

Considerando que a difusão de substâncias microinjetadas no tecido cerebral ao redor do local da injeção é diretamente proporcional ao volume injetado (MYERS, 1966, ROUTTENBERG, 1972) e que volumes de 0,5 μL se difundem em média 1,04 mm ao redor do sítio de injeção (MYERS, 1966), foi utilizado um volume de microinjeção menor que 0,5 μL (0,3 μL) para minimizar a difusão para as áreas circundantes da SCPd.

3.5 INJEÇÃO INTRATECAL

Drogas foram injetadas na medula espinal no nível da coluna lombar, utilizando o método previamente descrito por Mestre e colaboradores (1994). Neste procedimento, os animais foram previamente anestesiados com isoflurano (2% em oxigênio hospitalar) e uma agulha (seringa BD Ultra fine; comprimento 12,7 mm; calibre 0,33 ou 29 gauge) foi cuidadosamente inserida perpendicularmente no espaço intervertebral entre L5 e L6, até atingir o espaço subaracnoide. Uma movimentação lateral repentina (mas leve) da cauda (*flick*) era percebida, indicando que o espaço subaracnoideo foi atingido corretamente, permitindo o término da injeção. Os animais que não apresentavam esse movimento lateral da cauda não passavam pelos demais procedimentos experimentais. O volume injetado pela via intratecal foi de 20 μL . O procedimento está ilustrado na figura 3.

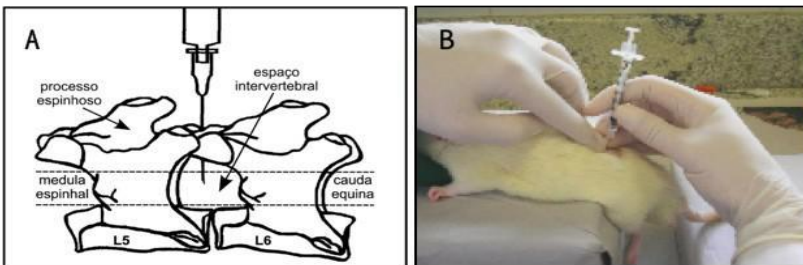


Figura 3. Injeção intratecal. **A:** O diagrama ilustra o ponto de inserção da agulha no espaço intervertebral entre L5 e L6. **B:** Foto ilustrativa da administração intratecal em ratos.

3.5.1 Degeneração de terminações catecolaminérgicas da medula espinal

A neurotoxina catecolamina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) apresenta seletividade para células que expressam tirosina hidroxilase (WOOD, 2008), atuando como útil ferramenta farmacológica na desnervação química de fibras noradrenérgicas (HUNG *et al.*, 2003) e dopaminérgicas (KIM *et al.*, 2015), sendo considerada a neurotoxina mais efetiva na depleção de fibras catecolaminérgicas do SNC e do SNP em comparação aos compostos relacionados utilizados nos estudos que investigam esses neurotransmissores (SCHWARTING, HUSTON, 1996)

A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica (NYGREN, OLSON, SEIGER, 1971), evidências indicam que a administração intratecal desta neurotoxina não leva a sua difusão para regiões supraespinais e que níveis cerebrais de noradrenalina, dopamina e serotonina não diferem entre ratos tratados com 6-OHDA por via intratecal e os animais do grupo controle (GUTIERREZ *et al.*, 2003). A injeção desta neurotoxina por essa via de administração resulta em perda de fibras noradrenérgicas descendentes distais à injeção (NYGREN, OLSON, SEIGER, 1971), com redução dos terminais contendo catecolaminas e redução dos níveis de noradrenalina em ratos tratados em relação aos animais controle durante a primeira semana após a administração (LEI *et al.*, 2011).

Esta neurotoxina atinge o seu desempenho máximo aos 4 dias do tratamento, com o número de fibras noradrenérgicas permanecendo baixo (8 a 10%) (LEI *et al.*, 2011). Estudos mostraram que a administração de 6-OHDA por via intratecal induz depleção seletiva de noradrenalina sem alterar o conteúdo de dopamina e serotonina na medula espinal (HUNG *et al.*, 2003; FASMER *et al.*, 1986; GUTIERREZ *et al.*, 2003).

Há ciência que após a destruição neurotóxica de fibras noradrenérgicas que se dirigem à medula espinal, ocorrem alterações na nocicepção em testes algesimétricos que modelam a dor aguda (MARTIN, *et al.*, 1999, como um exemplo). Especificamente, com a utilização de 6-OHDA têm sido registradas interferências na nocicepção induzida por formalina na pata (TJØLSEN, BERGE, HOLE, 1991; FASMER *et al.*, 1986).

3.6 TESTE ALGESIMÉTRICO: TESTE DE FORMALINA NA PATA

O teste de formalina na pata, desenvolvido por Dubuisson e Dennis em 1977 (DUBUISSON, DENNIS, 1977), foi utilizado para avaliar as

reações comportamentais nocifensivas no presente estudo. Esse teste tem sido descrito como uma ferramenta para modelar uma condição de dor aguda do tipo tônica (ABBOTT, HONG, FRANKLIN, 1996; MOGIL, 2009) com característica persistente (BLACKBURN-MUNRO, 2004; KEEFE, FILLINGIM, WILLIAMS, 1991), que pode melhor mimetizar a ocorrência de dor naturalmente (ABBOTT *et al.*, 1981; KEEFE, FILLINGIM, WILLIAMS, 1991).

Imediatamente após a injeção subcutânea de formalina na pata de roedores, são manifestadas respostas comportamentais nocifensivas que seguem um padrão bifásico, caracterizado por uma fase inicial aguda (Fase I), um breve período de quiescência e uma segunda fase tônica (fase II) de manifestação comportamental nocifensiva, dentre as manifestações mais proeminentes, estão o morder/lamber e a flexão da pata (levantar a pata), que pode ser tônica (levantar sustentado) ou fásica (CAPONE, ALOISI, 2004). O levantar sustentado representa a resposta típica a um estímulo nociceptivo sustentado, o morder/lamber o local da injeção consiste de uma série de movimentos coordenados e rítmicos, envolvendo a língua, a cabeça, o tronco e a pata injetada (ALISI, CARLI, 1996).

Pesquisas mostraram ativação de fibras aferentes do tipo C durante todo o teste de formalina, de forma bifásica, com padrão paralelo aos comportamentos nocifensivos durante as fases I e II (McCALL, TANNER, LEVINE, 1996). A Fase I do teste de formalina parece ser consequência da ativação direta das fibras aferentes primárias do tipo C e A δ por esse agente nocivo (PUIG, SORKIN, 1996; McNAMARA *et al.*, 2007). A Fase II do teste reflete a indução de um estado espinal de facilitação, sensibilização central, desenvolvimento de inflamação e expansão de campos receptivos (WOOLF, KING, 1990; CODERRE, VACCARINO, MELZACK, 1990; CODERRE, MELZACK, 1992; CODERRE, YASHPAL, HENRY, 1994; TJØLSEN *et al.*, 1992; YASHPAL *et al.*, 2001), sendo que a liberação de substância P e glutamato na primeira fase do teste, ativa processos mediados pelo receptor NMDA na segunda fase (ALOISI, CARLI, 1996).

Quando um animal é colocado em um novo ambiente (como uma sala de experimentação) ou uma nova caixa, a sensibilidade do teste de formalina e a resposta comportamental eliciada por ele podem ser alteradas (ABBOTT, FRANKLIN, CONNELL, 1986), seja devida à característica estressora da novidade (ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995) ou, principalmente, decorrente do conflito entre a motivação para explorar o novo ambiente e a necessidade de reagir ao estímulo nocivo (FANSELOW, LESTER, 1988). Considerando essa variável, um dia antes da realização do teste de formalina, os animais

eram colocados na sala de experimentação por aproximadamente 30 minutos para ambientarem com odores, luminosidade e sons do novo ambiente. Após esse período, os animais eram familiarizados à caixa de observação de resposta comportamental. Neste procedimento, os animais eram colocados individualmente nesta caixa por um período de 20 min.

Nos experimentos iniciais (investigação das concentrações de glicina com potencial efeito nociceptivo) desta pesquisa, a caixa de observação era de acrílico, com paredes e assoalho transparentes, medindo 29 cm de largura, altura e profundidade. Nos experimentos que envolviam condicionamento contextual (e posterior análise de resposta comportamental defensiva), a mesma caixa de observação era utilizada, porém, com algumas modificações: as paredes laterais, superior (tampa) e a do fundo eram opacas (a opacidade foi conseguida pela adaptação de folhas de EVA na parte externa das paredes da caixa), a parede anterior era transparente para permitir a visualização do animal e o assoalho gradeado (veja item 3.7). Para facilitar a visualização da pata do animal, adicionou-se um espelho embaixo da caixa, angulado em aproximadamente 45° a uma estrutura metálica que servia como suporte para a caixa de observação.

No dia do experimento, era realizada a injeção subcutânea de 50 µL de formalina a 2% na superfície plantar da pata posterior direita, os animais eram transferidos imediatamente para o interior da caixa de observação para registro e avaliação das respostas comportamentais nocifensivas. Todo o período do teste de formalina foi registrado através de um sistema de vídeo-câmera, o que permitiu, a análise detalhada das respostas comportamentais, *a posteriori*, por um experimentador cego às condições experimentais. Registrou-se a cada bloco de 5 min, durante 60 min, o tempo despendido pelo animal na realização de comportamentos relacionados à nocicepção. O tempo mensurado foi contabilizado em segundos, com o auxílio de um cronômetro.

Os seguintes comportamentos nocifensivos foram avaliados:

- Morder/lamber a pata: foi mensurado o tempo em que o animal despendeu lambendo e/ou mordendo a pata na qual a formalina foi administrada;

- Levantar a pata: foi considerado o tempo em que o animal manteve a pata injetada com formalina sob flexão, sem tocar o chão da caixa de observação (levantar sustentado), ou o tocando levemente (levantar fásico).

Além de permitir ao experimentador observar o animal deambulando, sem restrições ao movimento, durante a manifestação de comportamentos nocifensivos por um período de 1 hora ou mais

(ABBOTT *et al.*, 1981; KEEFE, FILLINGIM, WILLIAMS, 1991), outra vantagem da utilização do teste de formalina é que ele permite avaliar respostas comportamentais nocifensivas simultaneamente à exposição do animal a uma situação aversiva (MENDES-GOMES, AMARAL, NUNES-DE-SOUZA, 2011), notavelmente durante a exposição a um ambiente contextualmente aversivo, como uma caixa de condicionamento previamente pareada com choques elétricos.

3.7 CONDICIONAMENTO CONTEXTUAL AVERSIVO

O paradigma de condicionamento contextual aversivo foi utilizado neste estudo como ferramenta translacional para responder se a função comutadora da SCPd (sensibilizada por glicina) para hiper e hiponocicepção é dependente da valência emocional atribuída ao contexto no qual a nocicepção ocorre.

O condicionamento aversivo é uma forma de condicionamento Pavloviano onde o indivíduo é conduzido a associar um estímulo neutro, sem significado importante em termos biológicos (por exemplo, a apresentação de luz ou som) a um aversivo, chamado de estímulo incondicionado (EI ou 'US', do inglês '*unconditioned stimulus*'), geralmente choques elétricos aplicados nas patas. O EI seria aquele com capacidade inata de induzir uma resposta comportamental específica, geralmente são utilizados choques elétricos aplicados nas patas (FENDT, FANSELOW, 1999), no entanto, outros tipos de EI também podem ser adotados (BLANCHARD *et al.*, 2001; GUITTON, DUDAI, 2004; CAVALLI, BERTOGLIO, CAROBREZ, 2009; PAVESI, CANTERAS, CAROBREZ, 2011). Depois de alguns pareamentos (eventos de associação entre esses dois estímulos), o estímulo neutro por si só prevê a ocorrência do choque, neste momento ele atua como um estímulo condicionado (EC ou 'CS', do inglês '*conditioned stimulus*'), provocando um estado de medo (FENDT, FANSELOW, 1999). No entanto, um animal também pode apresentar respostas comportamentais aversivas para um contexto inicialmente neutro (como uma caixa de condicionamento) no qual o EI (como choque elétrico) foi previamente apresentado (FENDT, FANSELOW, 1999).

No condicionamento contextual aversivo, quando animais são re-expostos ao contexto que inicialmente era neutro, mas que foi previamente pareado com choques elétricos (agora contexto aversivo), eles manifestam uma reação de medo condicionado, consistindo de respostas comportamentais e autonômicas (ANTONIADIS,

MCDONALD, 1999; BOUTON, BOLLES, 1979; FANSELOW, TIGHE, 1988, LeDOUX *et al.*, 1988; RESSTEL *et al.*, 2006)

Uma medida comportamental de medo, comumente utilizada em ratos, é o congelamento (do inglês ‘freezing’) (FANSELOW, 1980). Esta resposta comportamental defensiva é operacionalmente definida como a ausência total de movimentos do corpo e cabeça, exceto àqueles necessários para a respiração (BOUTON, BOLLES, 1979). Neste trabalho, o tempo despendido no congelamento foi utilizado como critério para avaliar se os animais estavam condicionando o ambiente (caixa ou contexto) ao caráter aversivo dos choques elétricos.

No entanto, entenda-se o uso termo “medo” como referência à ativação do sistema comportamental defensivo que desencadeia uma constelação de outras reações ao estímulo ameaçador além do congelamento (FENDT, FANSELOW, 1999), de natureza autonômica e/ou comportamental, tais como defecação (FANSELOW, 1986), aumento da pressão arterial (PAPPAS, DiCARA, MILLER, 1972; HELMSTETTER, TERSHNER, 1994 RESSTEL *et al.*, 2006), vocalizações ultrassônicas (BORSZCZ, 1995; WÖHR, BORTA, SCHWARTING, 2005) e analgesia induzida pelo condicionamento contextual aversivo (FANSELOW, BAACKES, 1982, BUTLER, FINN, 2009; ROCHE *et al.*, 2007, 2010; REA, ROCHE, FINN, 2011; OLANGO *et al.*, 2012; BUTTLER *et al.*, 2011; REA *et al.*, 2013).

A analgesia induzida pelo condicionamento contextual aversivo pode ser definida como a redução da expressão de comportamentos nocifensivos sob a re-exposição de um animal a um contexto previamente pareado com um estímulo aversivo tal como um choque elétrico (FINN *et al.*, 2004; REA, ROCHE, FINN, 2011). Modelos experimentais de condicionamento contextual que induzem analgesia comumente envolvem a exposição de ratos a choques elétricos (CALCAGNETTI, HELMSTETTER, FANSELOW, 1987; FANSELOW, HELMSTETTER, 1988) e a análise, vinte e quatro horas depois, de respostas comportamentais nocifensivas induzidas por formalina no mesmo aparato (OLANGO *et al.*, 2012; BUTTLER *et al.*, 2011; REA *et al.*, 2013).

O condicionamento contextual aversivo no presente estudo foi realizado na mesma caixa de observação do teste de formalina na pata, com algumas modificações (já mencionadas no item 3.7). A caixa consistia de acrílico, com paredes laterais, superior (tampa) e posterior opacas e a parede anterior transparente. O assoalho da caixa era composto de uma grade metálica condutora com barras distanciadas 0,8 cm entre si. Um gerador de choque (EFF 342, Insight®) possibilitou a emissão de impulsos elétricos de baixa intensidade na grade, regulados a partir de

controladores de intensidade e tempo. O condicionamento foi realizado num ambiente com som atenuado, temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e intensidade de luz de 80 lux e foi desenvolvido em três fases ou sessões (**Fig.4**), descritas abaixo.

1ª Familiarização: No primeiro dia, os animais foram colocados na caixa de condicionamento para exploração do ambiente, por 20 min, numa sessão denominada familiarização, para que eles pudessem conhecer esse ambiente e formar uma representação espacial relacionada (FANSELOW, 2000).

2ª Condicionamento: No segundo dia, o dia do condicionamento, os animais foram colocados na caixa de choque e após um período de exploração de aproximadamente 10 min, foram submetidos à emissão de choques elétricos de baixa intensidade nas patas. Nesse momento, ocorre a associação entre os dois estímulos, caixa (até então neutro) e choque (EI). Os animais do grupo não condicionado foram colocados na caixa de condicionamento por igual período de tempo, mas sem emissão de choques elétricos. Após experimentos de padronização deste protocolo, os animais receberam no dia do condicionamento 5 choques de 0,4 mA, com duração de 1 segundo cada, intervalados em 30 segundos.

3ª Teste: No terceiro dia, o dia do teste (um dia depois do dia do condicionamento), os animais foram re-expostos à caixa de condicionamento, desta vez, sem a emissão de choques elétricos, para realização do registro comportamental (respostas nocifensivas e não-nocifensiva). Neste dia, os animais receberam injeções por via intratecal (quando necessário), microinjeção na SCPd (exceto nos experimentos de padronização dos choques elétricos), e injeção subcutânea de formalina na pata, antes da re-exposição ao contexto (como explicado no protocolo experimental, item 3.9).

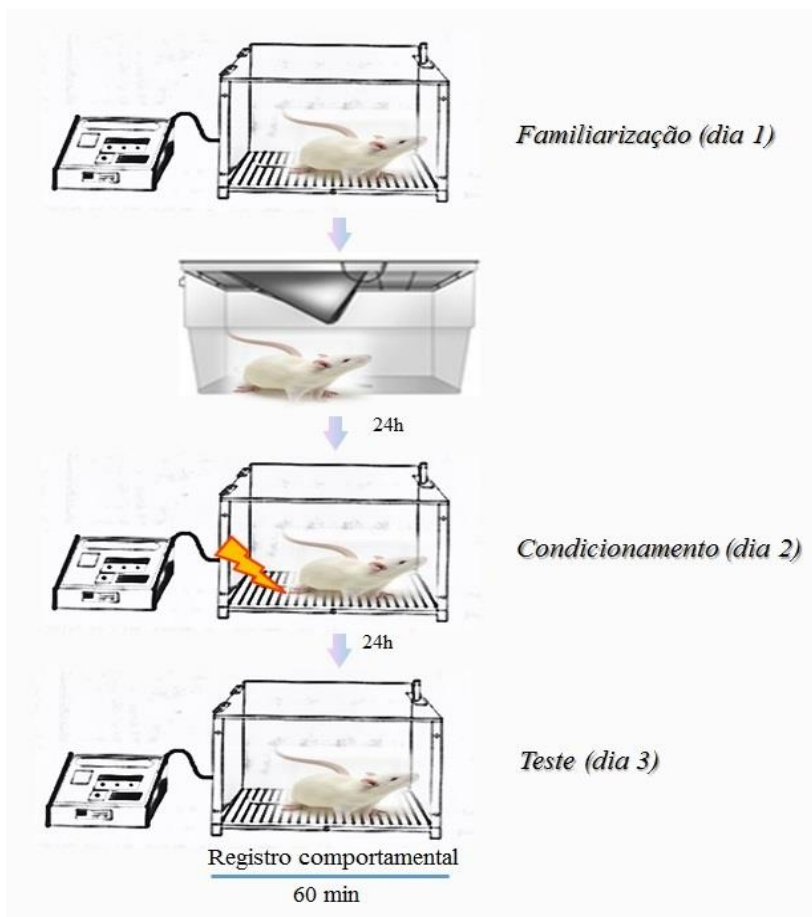


Figura 4. Condicionamento contextual aversivo. Vinte e quatro horas após a familiarização à caixa de condicionamento, os animais foram submetidos a choques elétricos de baixa intensidade nas patas, com intervalo e duração fixos (Sessão de condicionamento). No dia seguinte, dia do Teste, os animais foram re-expostos à caixa (contexto) imediatamente após a injeção intraplantar de formalina e respostas comportamentais nocifensivas e defensiva foram registradas.

Nos intervalos entre as sessões de familiarização, condicionamento e teste foi realizada a assepsia da caixa com etanol 10%. Todas as manifestações comportamentais exibidas durante as diferentes sessões foram registradas através de um sistema de vídeo-câmera, o que permitiu

desta forma, a minuciosa avaliação, *a posteriori*, das respostas comportamentais defensivas ((nocifensivas (levantar e morder/lamber a pata injetada com formalina) e não nocifensivas (congelamento)). A coleta de dados restringiu-se aos comportamentos expressos no dia da sessão teste. O tempo de congelamento e o de manifestações comportamentais nocifensivas foram quantificados em segundos, com o auxílio de um cronômetro.

Antecipadamente à implementação do paradigma de condicionamento contextual aversivo em experimentos envolvendo a microinjeção na SCPd, foram realizados experimentos com a finalidade de padronização de um protocolo de condicionamento, em animais não submetidos à implantação de cânula na SCPd, descrito no item 3.9 (fluxograma 2).

3.8 COMPOSTOS E SOLUÇÕES

Os seguintes compostos (com concentrações/doses e volumes) foram utilizados para a realização dos procedimentos experimentais:

- Cirurgia estereotáxica

- Xilazina (2%, 10mg/kg, Dopaser®, Calier, Espanha) e Cetamina (10%, 90mg/Kg, Dopalen®, Vetbrands, Brasil), 90/10mg/kg, via intraperitoneal (i.p.);

- Anestésico e vasoconstritor local (Cloridrato de Lidocaína 3% com Norepinefrina 1:50.0000, Lidotensim 3%®, Probem, Brasil), 0,2mL, via subcutânea;

- Associação de antibióticos (Pentabiótico®, 1.0mL/kg, Fort Dodge, Brasil).

- Microinjeção na SCPd

- Glicina (Sigma Chemical, EUA) dissolvida em solução de salina tamponada com fosfato (PBS), 10, 20, 50 e 80 nmoles, 0,3 µL, o grupo controle recebia PBS;

- Azul de Evans (Vetec, Brasil) dissolvido em água destilada para a coloração dos sítios das microinjeções, 0,3µL.

- Injeção intratecal

- Isoflorano (2% em oxigênio hospitalar);

- 6-Hidroxidopamina (Sigma, 6-OHDA) dissolvida em PBS e ácido ascórbico, 10 µg/20 µL (Dose efetiva em degenerar as inervações noradrenérgicas nos modelos de degeneração usados por YOU *et al.*, 2010);

- Prazosina (Sigma, EUA), antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos, dissolvida em água destilada (TANABE *et al.*, 2005), 6 µg/20 µL (Dose máxima que não afeta o controle motor conforme KIM *et al.*, 2013),

- Ioimbina (Tocris, EUA), antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, dissolvida em água destilada (PARK *et al.*, 2011; SHIN *et al.*, 2011), 20 µg/20 µL (Dose máxima e dentro da faixa de doses que não afetam o controle motor conforme KIM *et al.*, 2013 e OMOTE *et al.*, 1998; MAJCZYNSKI *et al.*, 2006, respectivamente).

Os controles receberam os respectivos veículos de cada composto.

As doses dos antagonistas de receptores α -adrenérgicos e da neurotoxina catecolaminérgica foram escolhidos com base em estudos que utilizaram doses efetivas em bloquear os efeitos da ativação de fibras noradrenérgicas descendentes (OMOTE *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2011; SHIN *et al.*, 2011, KIM *et al.*, 2013; JEONG *et al.*, 2014; YOU *et al.*, 2010).

- Teste de formalina na pata

- Formaldeído a 37% (Merck AG, Alemanha) diluída a 2% com solução fisiológica (0,9%), considerando a concentração inicial como 100%, volume de 50 µL, por via subcutânea, na pata posterior direita.

- Perfusão intracardíaca

- Cloral hidratado a 15% (2,5 mg/mL/kg), via i.p.,
- Solução salina (NaCl 0,9%) por via intracardíaca,
- Solução de formalina (10%) por via intracardíaca.

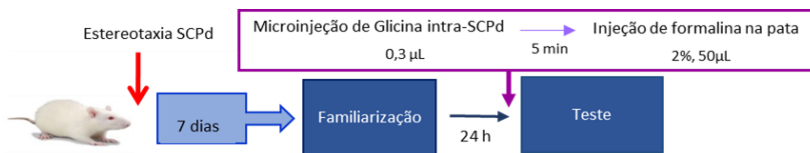
3.9 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Previamente à aplicação do estímulo nocivo (formalina 2% em solução salina a 0,9%, 50 µL) na superfície plantar da pata direita, foram efetuadas a administração de fármacos por via intratecal (quando era o caso) e a microinjeção de glicina (ou PBS) na SCPd, exceto nos grupos referentes aos experimentos de padronização do protocolo de condicionamento contextual aversivo. Porém, do mesmo modo que os

outros grupos, esses animais receberam injeção subcutânea de formalina imediatamente antes da re-exposição ao contexto.

A seguir são apresentados fluxogramas ilustrando o protocolo experimental, o momento e o sítio de administração de drogas divididos conforme os objetivos específicos da pesquisa.

Fluxograma 1. Identificação das concentrações de glicina intra-SCPd com potencial de induzir efeitos na nocicepção no teste de formalina na pata.



Os experimentos iniciais foram realizados com o propósito de verificar os possíveis efeitos da microinjeção de diferentes concentrações de glicina intra-SCPd sobre comportamentos relacionados à nocicepção induzida por formalina na pata, foram testadas as concentrações de 10, 20, 50 e 80 nmoles/sítio em grupos experimentais separados. As concentrações de glicina utilizadas neste estudo foram baseadas em pesquisas que avaliaram seu potencial para produzir efeitos do tipo ansiogênico (SCHMITT *et al.*, 1995; CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001; SANTOS *et al.*, 2006) e efeitos hipo e hipernociceptivos (MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008; MARTINS *et al.*, 2010 a) quando administradas na SCPd. Concentrações maiores de glicina não foram utilizadas nos experimentos devido ao fato de que a microinjeção deste aminoácido na concentração de 100 nmoles induziu em alguns animais comportamento aversivo intenso, caracterizado por exoftalmia, sobressaltos e corridas após 35-40 min e permanecendo por aproximadamente 40 min (MARTINS, 2009).

Apenas a maior concentração de glicina testada, a de 80 nmoles, teve efeito sobre o comportamento de morder/lamber a pata injetada com formalina revelando-se capaz de aumentar o tempo despendido pelos animais na expressão desse comportamento. Por esse motivo, não prosseguimos com as demais concentrações de glicina quando implementamos os demais experimentos utilizando o protocolo de condicionamento contextual aversivo. Algumas considerações ainda devem ser feitas em relação ao teste de formalina na pata:

24 h antes do teste de formalina, os animais foram ambientados (familiarizados) às condições experimentais (caixa de observação, luminosidade, ruído de fundo, odores da sala), porém, sem qualquer fonte nociceptiva,

No fluxograma experimental 1 onde lê-se “Teste” entenda-se a sessão na qual os animais foram colocados na caixa de observação (um dia depois da familiarização), imediatamente após a injeção de formalina na pata, nos experimentos iniciais, não envolvendo condicionamento contextual,

Onde lê-se “Teste” nos demais fluxogramas, entenda-se a sessão na qual os animais foram re-expostos ao contexto aversivo (um dia depois da sessão de condicionamento),

No dia do “Teste” foram mensurados durante 60 minutos, o tempo despendido pelo animal na expressão de comportamentos relacionados à nociceção induzida por formalina (morder/lamber e levantar a pata, fluxogramas 1, 2 a 5) e relacionado ao medo (congelamento, fluxogramas 2 a 5).

Fluxograma 2. Padronização do protocolo de condicionamento contextual aversivo e paradigma de analgesia induzida contextualmente

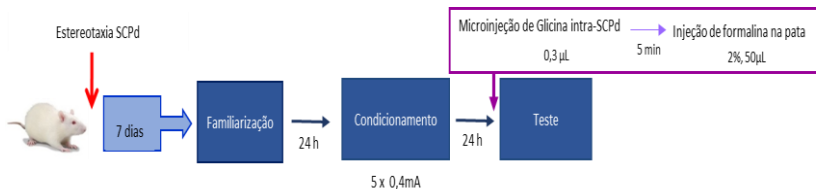


Neste protocolo, os animais foram familiarizados à caixa condicionamento aversivo/observação por aproximadamente 20 min. No dia seguinte, submetidos às outras duas fases: condicionamento e teste, espaçados em 24h. No dia do condicionamento, os animais foram colocados na caixa de condicionamento aversivo/observação e após 10 min de ambientação receberam o primeiro de 5 choques elétricos com duração de um 1s cada e com um intervalo de aplicação entre os choques de 30 s. As intensidades de estímulos elétricos testadas foram 0,4 mA, 0,5 mA, 0,6 mA e 0,7 mA em grupos experimentais diferentes. Dois minutos após o último choque, os animais foram devolvidos as suas caixas moradia. Os animais controle não receberam choques elétricos nas patas, mas permaneceram na caixa de condicionamento/observação por um período de tempo equivalente. No dia do teste, os animais receberam

injeção de formalina (2%/50 μ L) por via subcutânea na pata direita posterior e imediatamente foram colocados na caixa de condicionamento/observação na qual haviam recebido estímulos elétricos no dia anterior. Comportamentos relacionados ao medo (congelamento) e à nocicepção (levantar e morder/lamber a pata injetada com formalina) foram registrados por um sistema vídeo-câmera e analisados, *a posteriori*, por um experimentador cego às condições experimentais.

A duração da expressão de congelamento foi utilizada como índice comportamental relacionado ao condicionamento contextual aversivo (KINSCHECK, WATKINS, MAYER, 1984). O congelamento avaliado neste trabalho refere-se ao comportamento expresso pelo animal no qual ocorre a cessação de todos os movimentos visíveis, exceto o da respiração (BOLLES, COLLIER, 1976; FANSELOW, 1980). Outros parâmetros que acompanham esse comportamento (KINSCHECK, WATKINS, MAYER, 1984) em conjunto ou em parte, também foram observados para auxiliar na análise, como a exoftalmia, micção, defecação e piloereção.

Fluxograma 3. Efeitos da microinjeção de glicina na SCPd sobre respostas comportamentais nocifensivas (morder/lamber e levantar a pata) e não nocifensiva (congelamento) durante a re-exposição ao contexto aversivo

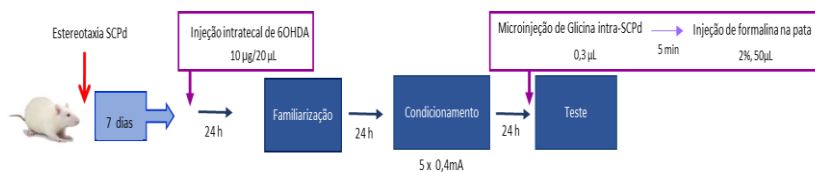


Uma vez constatada a concentração de glicina capaz de eliciar alterações no comportamento relacionado à nocicepção (80 nmoles) e realizada a padronização do protocolo de condicionamento contextual (5 choques com intensidade de 0,4 mA, duração de 1s, intervalo entre os choques de 30s), foram investigados os efeitos da microinjeção de glicina na SCPd sobre a expressão de comportamentos relacionados à nocicepção (levantar e morder/lamber a pata injetada com formalina) e ao medo (congelamento) estando o animal em um ambiente aversivo.

O protocolo de condicionamento foi descrito nos itens 3.8 e 3.9 (fluxograma 2). No entanto, nesta etapa da pesquisa, no dia do teste, os animais receberam microinjeção de 80 nmoles de glicina na SCPd, 5 min

antes da injeção de formalina na pata (e imediata re-exposição ao contexto).

Fluxograma 4. Potencial mediação de fibras noradrenérgicas descendentes nas ações nociceptivas da glicina intra-SCPd nos contextos neutro e aversivo

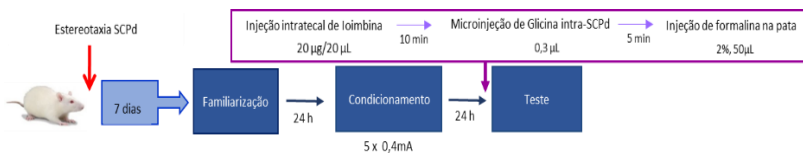


Considerando que a modulação da dor pela atenção (a pistas contextuais, por exemplo) envolve vias descendentes (HEINRICHER, FIELDS, 2013) e que diferentes contextos podem agir em estágios muito iniciais da nociceção (BUSHNELL *et al.*, 1985; MATRE, CASEY, KNARDAHL, 2006; EIPPERT *et al.*, 2009 a, b; SPRENGER, *et al.*, 2012; GEUTER, BÜCHEL, 2013), foram realizados experimentos para investigar a participação de fibras noradrenérgicas descendentes que terminam na medula espinal nos efeitos nociceptivos da glicina (na SCPd) nos contextos neutro e aversivo.

Após 7 dias de recuperação da cirurgia estereotática, os animais foram submetidos à injeção intratecal (como previamente descrito no item 3.5) da neurotoxina 6-OHDA (10 µg / 20 µL) em dose efetiva em degenerar inervações noradrenérgicas (YOU *et al.*, 2010). Após um intervalo de quatro dias do procedimento intratecal, foi empreendida a re-exposição dos animais ao contexto neutro ou aversivo (dia do teste), considerando que o efeito da neurotoxina é máximo 4 dias após o tratamento (LEI *et al.*, 2011).

Fluxograma 5. Discriminação dos receptores α -adrenérgicos espinais envolvidos nos efeitos nociceptivos da microinjeção de glicina na SCPd no contexto neutro e aversivo

5A



5B



A sessão de familiarização e condicionamento já foram descritas anteriormente (item 3.8). No dia do teste, 24 h depois do dia do condicionamento, grupos experimentais separados receberam administração por via intratecal (item 3.5) de ioimbina (20 µg / 20 µL, fluxograma 5A), antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos ou prazosina (6 µg / 20 µL, fluxograma 5B), antagonista seletivo para receptores α_1 -adrenérgicos e 10 min depois foram conduzidos à microinjeção de glicina (80 nmoles / 0,3 µL). Após 5 min da microinjeção cerebral, foram tratados com formalina na pata e colocados na caixa de observação/condicionamento.

3.10 CONFIRMAÇÃO DO SÍTIO DE MICROINJEÇÃO INTRACEREBRAL

Ao término dos procedimentos experimentais, os animais receberam uma solução anestésica contendo cloral hidratado a 15% (2,5 mg/mL/kg) via i.p., seguida por microinjeção intracerebral de azul de evans (0,3 µL) e perfusão intracardíaca, inicialmente com solução salina (NaCl 0,9%), seguida de solução de formalina (10%). Os encéfalos foram, então, retirados e conservados individualmente em recipientes contendo solução de formalina 10%. 48 h antes da realização dos cortes histológicos, os encéfalos foram transferidos para recipientes contendo solução de sacarose 30%, para crioproteção.

Com o propósito de realizar a análise histológica e verificação do sítio de microinjeção, cortes coronais (50 µm de espessura) foram obtidos utilizando um criostato (Leica CM 1850, Microsystems AG, Alemanha)

(-20 °C). Os cortes foram fixados em lâminas de vidro para microscopia, previamente gelatinizadas. Após secagem das lâminas com os cortes fixados, as mesmas foram coradas com a coloração de Giemsa, cobertas com lamínulas e seladas com resina sintética.

As lâminas foram fotografadas em uma lupa acoplada a uma câmera (Motic Moticam 2000, 2.0 MP Live Resolution) associada a um programa de imagens (Motic Image Plus 2.0). Os cortes histológicos foram comparados com os diagramas do atlas de neuroanatomia de rato (PAXINOS, WATSON, 2009).

3.11 APRESENTAÇÃO DOS DADOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Com propósito de análise de dados, os resultados relacionados aos comportamentos nocifensivos induzidos por formalina na pata (levantar e morder/lamber a pata) são apresentados na seguinte disposição:

- Primeira fase do teste de formalina (Fase I), correspondente ao período de 5 minutos após a injeção de formalina na pata, Segunda fase do teste de formalina, que, neste trabalho foi dividida em:

- Fase II A, dos 10 aos 35 minutos do teste nociceptivo,

- Fase II B, dos 35,1 aos 60 minutos após a injeção subcutânea (pata) deste agente nocivo.

A divisão da fase II (fases II A e II B) é semelhante à adotada por Gutierrez e colaboradores e representam o início e o final da fase tardia do teste de formalina (GUTIERREZ *et al.*, 2003).

Os dados referentes ao comportamento de congelamento são apresentados até os 15 minutos após a re-exposição ao contexto aversivo, pois apenas nesse período os animais expressaram esta resposta comportamental defensiva.

As análises estatísticas dos dados dos comportamentos nocifensivos (levantar e morder/lamber a pata) foram realizados conforme a divisão do teste de formalina mencionada acima, ou seja, para a primeira fase do teste (Fase I), para a Fase II A e para a Fase II B. Os dados condizentes ao comportamento de congelamento foram analisados até os 15 minutos após a re-exposição ao contexto aversivo.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, conforme o caso, considerando como fatores independentes o tratamento da SCPd ou o tratamento da SCPd e o condicionamento ou o tratamento da SCPd, o condicionamento e o tratamento intratecal, respectivamente. Após essas análises, foi utilizado o teste *post-hoc* de Dunnet, para determinar as diferenças em relação ao grupo controle, quando necessário, ou o teste *post-hoc* de

Duncan, para estabelecer as diferenças entre os grupos experimentais, ambos considerando o valor de significância estatística de $P < 0,05$. Os dados foram analisados utilizando o programa Statistica® 7 (StatSoft Inc., EUA) e representados em gráficos confeccionados com o programa GraphPad Prism® 5 (GraphPad Prism, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

4 RESULTADOS

Os resultados referentes aos comportamentos nocifensivos (levantar e morder/lamber a pata) induzidos por formalina serão descritos em três partes, conforme divisão do teste de formalina já mencionada: uma fase inicial, denominada de Fase I, correspondente ao período de 5 minutos após a injeção de formalina na pata, Fase II A, dos 10 aos 35 minutos do teste de formalina e Fase II B, dos 35,1 aos 60 minutos do teste algesimétrico. Efeitos diferenciais da microinjeção de glicina intra-SCPd dos 10 aos 35 min e dos 35,1 aos 60 min do teste de formalina direcionou a escolha da divisão da análise dos dados e apresentação dos resultados em Fase II A e Fase II B. Os resultados pertencentes ao comportamento de congelamento correspondem ao período de 15 minutos após a re-exposição ao contexto aversivo, pois apenas neste período os animais manifestaram este comportamento, apesar de serem re-expostos ao contexto por 60 min.

4.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE GLICINA INTRA-SCPd NO TESTE DE FORMALINA NA PATA

Esse experimento teve como objetivo determinar a (s) concentração (ões) de glicina com potencial (is) para alterar o tempo de expressão dos comportamentos nocifensivos de levantar e morder/lamber a pata injetada com formalina. As concentrações de glicina utilizadas neste estudo foram baseadas em pesquisas que avaliaram seus potenciais para produzir efeitos do tipo ansiogênico (SCHMITT *et al.*, 1995; CAROBREZ *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2006) ou efeitos hiponocifensivo e/ou hipernocifensivo (MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008; MARTINS *et al.*, 2010) quando microinjetadas na SCPd.

FASE I

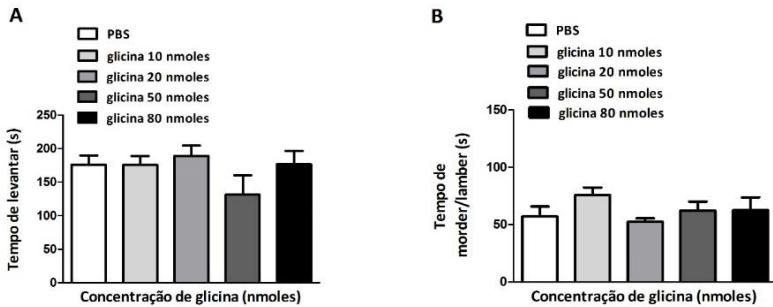


Figura 5. Efeito da microinjeção de glicina na SCPd na primeira fase do teste de formalina na pata em ratos. A administração de glicina na SCPd não alterou o tempo de expressão do comportamento de levantar a pata (**A**) nem o tempo de manifestação do comportamento de morder/lamber (**B**) a pata injetada com formalina em relação ao grupo que recebeu PBS na SCPd. As barras representam a média ± E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via.

Durante a primeira fase do teste de formalina, a ANOVA de uma via mostrou que não houve efeito do tratamento da SCPd sobre o tempo despendido pelo animal em levantar ($F_{4,30} = 1,35$; $P = 0,2724$) ou morder/lamber ($F_{4,30} = 1,20$; $P = 0,3282$) a pata injetada com formalina (**Fig. 5A** e **Fig. 5B**, respectivamente).

FASE II A

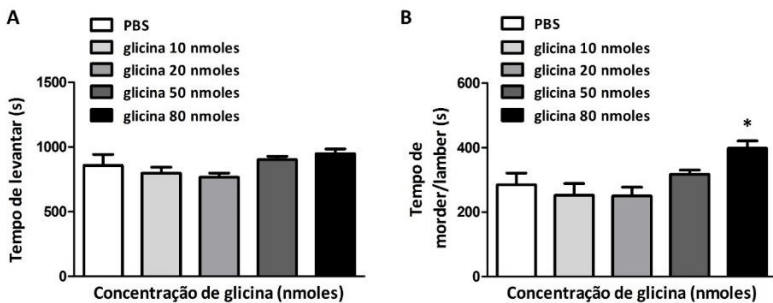


Figura 6. Efeito hipernociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de formalina na pata em ratos. Em A: microinjeção de glicina na SCPd

não ocasionou alterações no tempo de manifestação da resposta nocifensiva de levantar a pata. Em **B**: 80 nmoles de glicina tiveram efeito significativo sobre a nocicepção induzida por formalina na pata. O grupo que recebeu 80 nmoles de glicina intra-SCPd aumentou o tempo de expressão do comportamento de morder/lamber em comparação ao grupo controle, tratado com PBS intra-SCPd. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via seguida do teste *Post hoc* de Dunnet. * $P < 0,05$.

Dos 10 aos 35 minutos do teste de formalina, a ANOVA de uma via mostrou que o tratamento da SCPd com glicina ($F_{4,30} = 2,19$; $P = 0,09316$) não teve efeito sobre o comportamento de levantar a pata (**Fig. 6A**). Em relação ao comportamento de morder/lamber a pata, houve efeito do fator tratamento da SCPd neste período do teste de formalina, como indicado pela ANOVA de uma via ($F_{4,30} = 4,60$; $P = 0,0051$) (**Fig. 6B**). Os dados mostraram que o grupo tratado com 80 nmoles de glicina teve aumento no tempo despendido na expressão deste comportamento relacionado à nocicepção. O teste *post-hoc* de Dunnet indicou diferença significativa entre o grupo tratado com glicina e o grupo controle, tratado com PBS ($P = 0,0285$). O efeito pró-nocifensivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de formalina na pata mostrado nesse experimento é sustentado pelo resultado obtido por MARTINS *et al.* (2010 a), que mostrou que a microinjeção de 80 nmoles de glicina na SCPd aumentou o número de comportamentos nocifensivos durante o teste de formalina na pata. Assim, esta concentração de glicina foi selecionada para o tratamento da SCPd nos experimentos seguintes do presente trabalho.

FASE II B

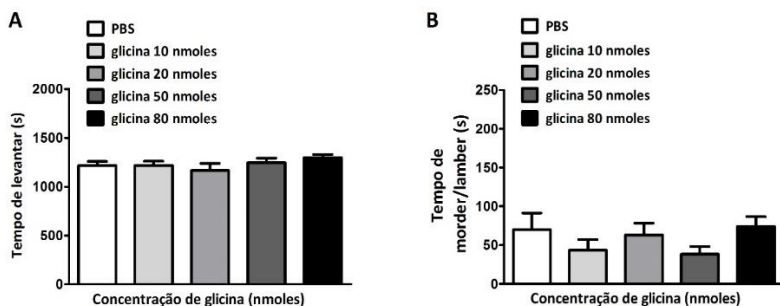


Figura 7. Efeito da microinjeção de glicina na SCPd na fase II B do teste de formalina na pata em ratos. A microinjeção de glicina na coluna dorsal da SCP

não alterou o tempo de expressão dos comportamentos nocifensivos de levantar (A) e de morder/lamber a pata (B) comparando-se ao grupo que recebeu PBS na SCPd. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via.

Não houve efeito do tratamento da SCPd com glicina sobre os comportamentos nocifensivos dos 35,1 aos 60 min do teste de formalina, conforme mostrou a ANOVA de uma via para o comportamento de levantar (Fig 7A; $F_{4,30} = 0,95$; $P = 0,4440$) e para o comportamento de morder/lamber (Fig 7B; $F_{4,30} = 1,10$; $P = 0,3720$) a pata injetada com formalina.

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE GLICINA NO COLÍCULO SUPERIOR NO TESTE DE FORMALINA NA PATA

Alguns procedimentos estereotáxicos não obtiveram êxito em acertar o sítio cerebral desejado, a SCPd. Dentre os pontos fora da SCPd, o colículo superior (CS) foi a estrutura mais atingida. Assim, microinjeções das mesmas concentrações de glicina administradas na SCPd também foram realizadas no CS. Microinjeções em outras colunas da SCP, ou seja, na SCPvl e na SCPI também foram realizadas, porém as amostras não atingiram o número suficiente para a apresentação destes dados.

FASE I

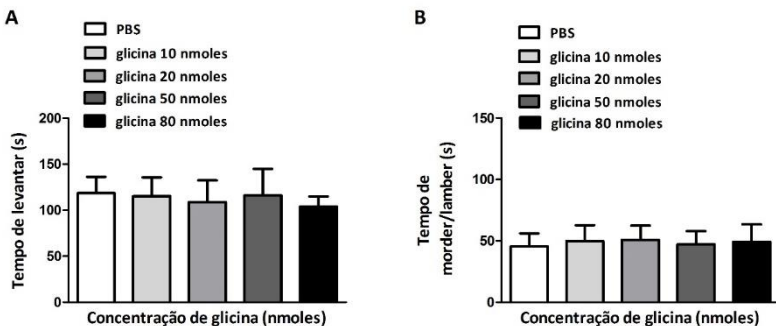


Figura 8. Efeito da microinjeção de glicina no CS na primeira fase do teste de formalina na pata em ratos. A administração de glicina no CS não alterou o tempo de expressão do comportamento de levantar a pata (A) nem o tempo de manifestação do comportamento de morder/lamber (B) a pata injetada com

formalina em relação ao grupo que recebeu PBS no CS. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via.

Durante a primeira fase do teste de formalina, a ANOVA de uma via mostrou que não houve efeito do tratamento do CS sobre o tempo despendido pelo animal em levantar (**Fig. 8A**; $F_{4,30} = 0,08$; $P = 0,9873$) ou morder/lamber (**Fig. 8B**; $F_{4,30} = 0,03$; $P = 0,99$) a pata injetada com formalina.

FASE II A

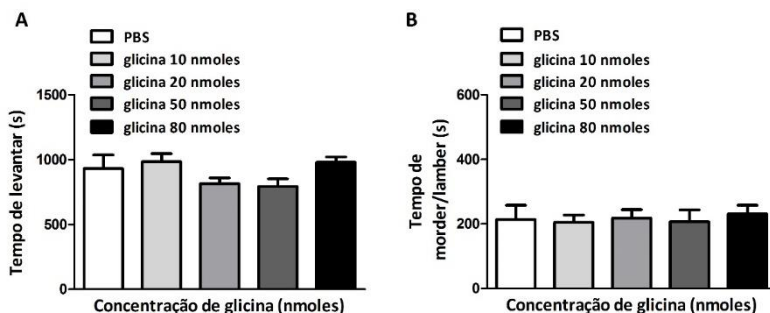


Figura 9. Efeito da microinjeção de glicina no CS na fase II A do teste de formalina na pata em ratos. A administração de glicina no CS não alterou o tempo de expressão do comportamento de levantar a pata (**A**) nem o tempo de manifestação do comportamento de morder/lamber (**B**) a pata injetada com formalina em relação ao grupo que recebeu PBS na SCPd. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via.

Dos 10 aos 35 minutos do teste de formalina na pata não houve efeito do tratamento do CS sobre o tempo de manifestação dos comportamentos de levantar (**Fig. 9A**; $F_{4,30} = 1,82$; $P = 0,1504$) e morder/lamber a pata (**Fig. 9B**; $F_{4,30} = 0,10$; $P = 0,97$), conforme indicado pela ANOVA de 1 via.

FASE II B

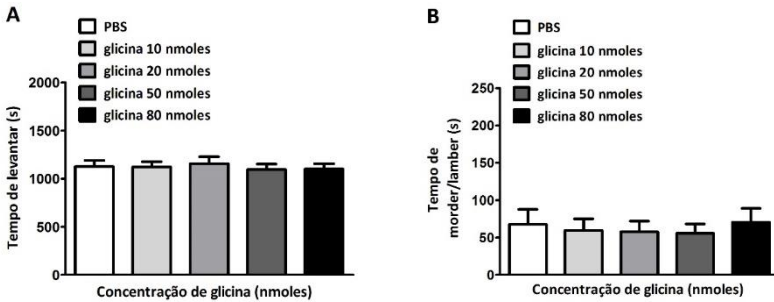


Figura 10. Efeito da microinjeção de glicina no CS na fase II B do teste de formalina na pata em ratos. A administração de glicina no CS não alterou o tempo de expressão do comportamento de levantar a pata (A) nem o tempo de manifestação do comportamento de morder/lamber (B) a pata injetada com formalina em relação ao grupo que recebeu PBS na SCPd. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via.

A ANOVA de 1 via mostrou que a microinjeção de glicina no CS não ocasionou efeito sobre o tempo de manifestação dos comportamentos nocifensivos de levantar (Fig. 10 A; $F_{4,30} = 0,16$; $P = 0,9548$) e morder/lamber (Fig. 10 B; $F_{4,30} = 0,15$; $P = 0,9581$) a pata.

4.3 EFEITOS DE INTENSIDADES CRESCENTES DE CHOQUES ELÉTRICOS NO COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO CONTEXTUALMENTE INDUZIDO

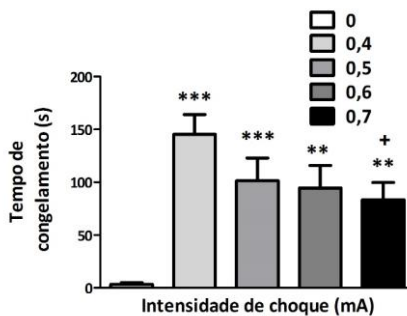


Figura 11. Congelamento induzido pelo contexto aversivo. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. Efeito de diferentes intensidades de choques elétricos no tempo de expressão de comportamento relacionado ao medo. Menores intensidades causaram maiores períodos de manifestação de

congelamento. ANOVA de 1 via, seguida pelo *post hoc* de Dunnet.*** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle, não condicionado. + $P < 0,05$ em comparação a intensidade de 0,4 mA.

Esses experimentos foram realizados em animais não submetidos à estereotaxia, mas tratados com formalina na pata, com o propósito de padronização do protocolo de condicionamento contextual aversivo no teste de formalina. A duração da resposta defensiva de congelamento foi utilizada como um critério comportamental para avaliação deste protocolo (KINSCHECK, WATKINS, MAYER, 1984).

A ANOVA de uma via indicou que houve efeito do fator intensidade de choque (**Fig. 11**; $F_{4,30} = 8,68$; $P = 0,0001$) sobre o tempo despendido pelo animal na expressão do comportamento de congelamento. O teste *post-hoc* de Duncan indicou diferença significativa na manifestação comportamental de congelamento no dia do teste, entre os grupos de animais submetidos ao estímulo elétrico nas patas e o grupo que não recebeu o estímulo no dia do condicionamento (0,4 mA, $P = 0,0001$; 0,5 mA, $P = 0,0008$; 0,6 mA, $P = 0,0013$; 0,7 mA, $P = 0,0031$), confirmando a expressão de comportamento relacionado ao medo contextualmente induzido. O grupo que recebeu a maior intensidade de estimulação elétrica nas patas (0,7 mA) expressou por menor tempo o comportamento de congelamento que o grupo que recebeu a intensidade menor (0,4 mA). (0,7 mA vs. 0,4 mA, $P = 0,0276$).

4.4 EFEITOS DE INTENSIDADES CRESCENTES DE CHOQUES ELÉTRICOS NA ANALGESIA INDUZIDA CONTEXTUALMENTE

FASE I

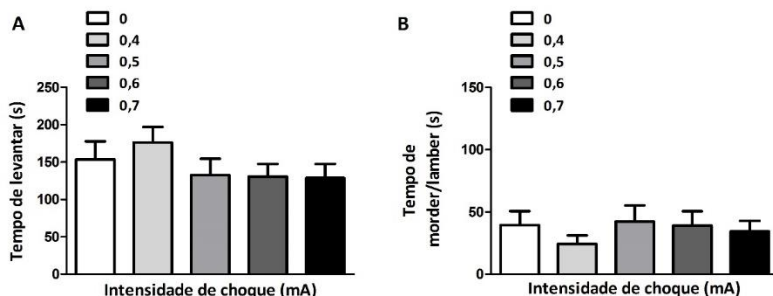


Figura 12. Efeitos de choques elétricos de baixas intensidades no dia do condicionamento sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via mostrou que não houve efeito da estimulação elétrica no dia do condicionamento sobre comportamentos nocifensivos na primeira fase do teste de formalina expressos no dia do teste. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina.

Compondo o processo de padronização do protocolo e condicionamento contextual, a analgesia induzida pelo contexto aversivo foi verificada um dia após o pareamento do contexto com diferentes intensidades de choques elétricos. A ANOVA de 1 via mostrou que na fase I do teste de formalina, não houve efeito de quaisquer intensidade de estimulação elétrica sobre a expressão comportamental de levantar (**Fig. 12 A**; $F_{4,30} = 0,98$; $P = 0,4282$) e de morder/lamber a pata injetada com formalina (**Fig 12 B**; $F_{4,30} = 0,44$; $P = 0,7700$).

FASE II A

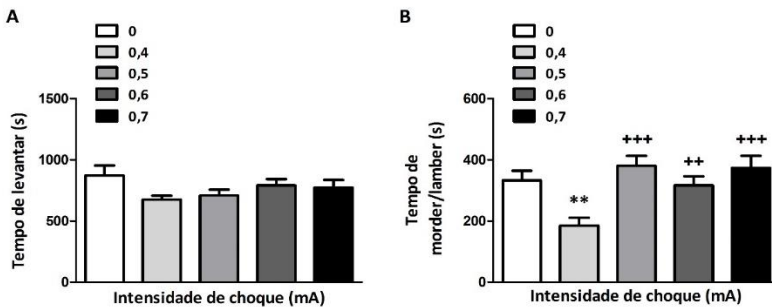


Figura 13. Efeitos de estímulos elétricos de baixa intensidade no dia do condicionamento sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via, seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett. $** P < 0,01$; em relação ao grupo controle, não condicionado. $++ P < 0,01$; $+++ P < 0,001$ em comparação a intensidade de 0,4 mA. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber.

A ANOVA de 1 via indicou que diferentes intensidades de choques elétricos aplicados na pata dos animais no dia do condicionamento não tiveram efeito sobre a manifestação do comportamento de levantar a pata (**Fig. 13 A** ; $F_{4,30} = 1,74$; $P = 0,16552$) na fase IIA do teste de formalina, mas reduziram o tempo de expressão comportamental de morder/lamber

(Fig. 13 B ; $F_{4,30} = 6,09$; $P = 0,0010$). O teste *post hoc* de Duncan apontou diferença entre o grupo estimulado com 0,4 mA e o grupo controle, não submetido ao estímulo incondicionado ($P = 0,0036$) e entre os demais grupos (0,4 vs. 0,5 $P = 0,0003$; 0,4 vs. 0,6 $P = 0,0068$; 0,4 vs. 0,7 $P = 0,0004$).

FASE II B

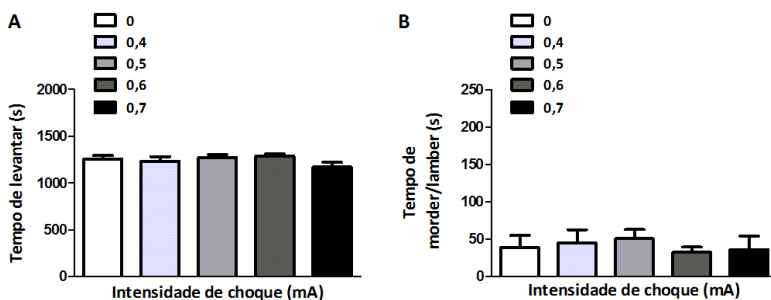


Figura 14. Efeitos de estímulos elétricos de baixa intensidade no dia do condicionamento sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II B. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 1 via. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina.

Na fase II B do teste de formalina, a ANOVA de 1 via mostrou não haver efeito de choques elétricos de distintas intensidades aplicados nas patas no dia do condicionamento, sobre a manifestação nocifensiva no dia do teste (**Fig. 14 A:** levantar, $F_{4,30} = 1,39$, $P = 0,2587$; **Fig 14 B:** morder/lamber, $F_{4,30} = 0,29$, $P = 0,8766$).

Apesar de todas as intensidades de choques elétricos utilizadas no dia do condicionamento induzirem, no dia do teste, aumento do índice comportamental de medo (tempo de congelamento), apenas a intensidade de 0,4 mA, na fase II A (**Fig. 10 B**), resultou em redução significativa do comportamento relacionado à nocicepção morder/lamber (analgesia induzida pelo condicionamento contextual) quando os animais foram re-expostos ao contexto no dia do teste (dia em que ocorreu a injeção de formalina). Por esse motivo, nos demais protocolos padronizou-se a intensidade de 0,4 mA de estímulo elétrico para ser aplicada no dia do condicionamento. Após padronização do protocolo de condicionamento contextual aversivo, implementamos, no dia do teste, a manipulação farmacológica da SCPd, com glicina e a injeção intraplantar de formalina

4.5 EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SCPd SOBRE O COMPORTAMENTO RELACIONADO AO MEDO E COMPORTAMENTOS NOCIFENSIVOS NO CONTEXTO AVERSIVO

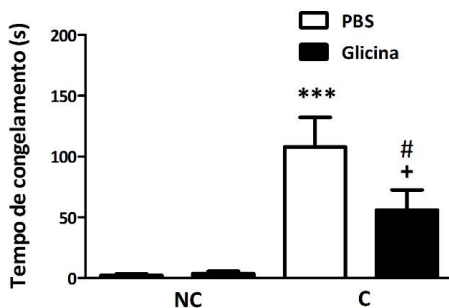


Figura 15. Efeito do tratamento da SCPd com glicina sobre o tempo de expressão de congelamento na re-exposição ao contexto aversivo. O eixo y corresponde ao tempo despendido no congelamento induzido contextualmente. No eixo x, NC = grupos não-condicionado; C = grupos condicionados. ANOVA de 2 vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. *** $P < 0,001$, em relação ao grupo controle, não condicionado; + $P < 0,05$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com glicina intra-SCPd; # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle condicionado, que recebeu PBS na SCPd. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Os dados mostraram que os animais do grupo não condicionado manifestaram muito pouco ou nenhum congelamento induzido pelo contexto aversivo (**Fig. 15**). A ANOVA de duas vias indicou efeito do condicionamento contextual aversivo sobre o tempo despendido pelos animais no comportamento de congelamento (**Fig. 15**; $F_{1,24} = 28,58$; $P = 0,0001$). A re-exposição dos animais que receberam PBS na SCPd ao contexto, pareado 24 antes com choques elétricos, resultou em evidente aumento do tempo de expressão do comportamento de congelamento comparando-se com o grupo controle não condicionado. O teste *post-hoc* de Duncan apontou diferença significativa entre os dois grupos (C-PBS vs. NC-PBS, $P = 0,0001$). O grupo condicionado tratado com glicina intra-SCPd apresentou maior tempo na manifestação desse comportamento contextualmente induzido em relação ao seu grupo contraparte não condicionado (C-glicina vs. NC-glicina, teste *post-hoc* de Duncan, $P = 0,0194$) e menor duração na expressão do congelamento em comparação ao grupo controle condicionado, tratado com PBS, existindo

diferença significativa entre esses dois grupos (C-glicina vs. C-PBS, $P = 0,0206$), conforme indicado pelo teste *post-hoc* de Duncan.

FASE I

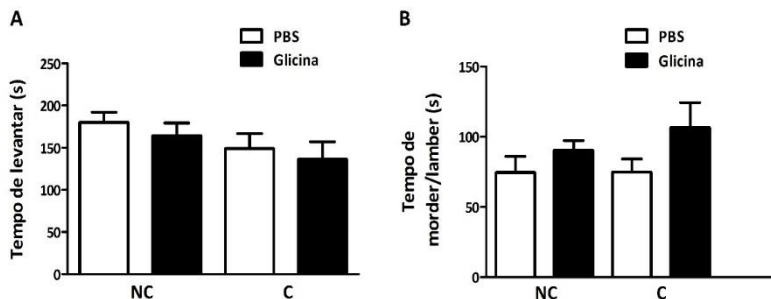


Figura 16. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I nos contextos neutro e aversivo. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 2 vias seguida do *post hoc* de Duncan. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Durante a primeira fase do teste de formalina, a ANOVA de duas vias indicou que não houve efeito do condicionamento e do tratamento da SCPd, nem interação entre esses dois fatores sobre os comportamentos de levantar e morder/lamber a pata (**Fig. 16 A e B**; condicionamento, $F_{1,24} = 3,09$; $P = 0,0912$; tratamento da SCPd, $F_{1,24} = 0,74$; $P = 0,3968$ e interação, $F_{1,24} = 0,00$; $P = 0,9259$, para o levantar a pata, **Fig. 16A**; Condicionamento, $F_{1,24} = 0,73$; $P = 0,3987$; tratamento da SCPd, $F_{1,24} = 0,18$; $P = 0,6750$; interação, $F_{1,24} = 0,17$; $P = 0,6778$, para o morder/lamber a pata injetada com formalina, **Fig. 16 B**).

FASE II A

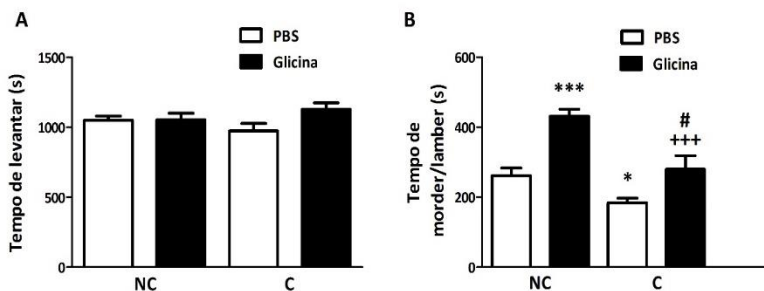


Figura 17. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A nos contextos neutro e aversivo. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 2 vias, seguida de *post hoc* de Duncan. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ em relação ao grupo controle, não condicionado; +++ $P < 0,001$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com glicina intra-SCPd; # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle condicionado, que recebeu PBS na SCPd. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Dos 10 aos 35 minutos do teste de formalina, a ANOVA de duas vias mostrou que não houve efeito do fator condicionamento (**Fig. 17 A**; $F_{1,24} = 0,01$; $P = 0,9035$), do fator tratamento da SCPd (**Fig. 17 A**; $F_{1,24} = 3,53$; $P = 0,0721$), nem interação entre os fatores (**Fig. 17 A**; $F_{1,24} = 2,43$; $P = 0,1319$) sobre a expressão do comportamento de levantar a pata injetada com formalina.

A ANOVA de duas vias indicou que houve efeito do fator condicionamento (**Fig. 17 B**; $F_{1,24} = 20,68$; $P = 0,0001$) e do fator tratamento da SCPd (**Fig. 17 B**; $F_{1,24} = 27,69$; $P = 0,0001$) sobre o comportamento de morder/lamber dos 10 aos 35 minutos do teste de formalina. Os dados mostraram que a re-exposição dos animais que receberam PBS intra-SCPd ao contexto previamente pareado com choques elétricos resultou em redução deste comportamento nocifensivo, comparando-se com animais do grupo não condicionado, tratados com PBS intra-SCPd. O teste *post-hoc* de Duncan indicou diferença significativa entre esses dois grupos (C-PBS vs. NC-PBS, $P = 0,0380$), confirmando a expressão de analgesia induzida pelo condicionamento contextual. A microinjeção de glicina intra-SCPd aumentou o tempo despendido em morder/lamber a pata injetada com formalina dos animais não condicionados (NC-PBS vs. NC-glicina, teste *post-hoc* de Duncan, P

= 0,0001), reproduzindo os resultados do primeiro experimento, condizentes à ação hipernociceptiva do tratamento da SCPd com glicina. Os animais do grupo condicionado que receberam glicina intra-SCPd reduziram o tempo de expressão do comportamento de morder/lamber a pata injetada com formalina em comparação aos animais do grupo não condicionado tratados com glicina intra-SCPd, havendo diferença significativa entre esses dois grupos, conforme apontado pelo teste *post-hoc* de Duncan (C-glicina vs. NC-glicina, $P = 0,0004$), sugerindo que o condicionamento contextual aversivo impediu o efeito hipernociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de formalina na pata. O grupo condicionado, que recebeu glicina foi diferente do grupo condicionado que recebeu PBS na SCPd (C-glicina vs. C- PBS, $P = 0,0162$).

FASE II B

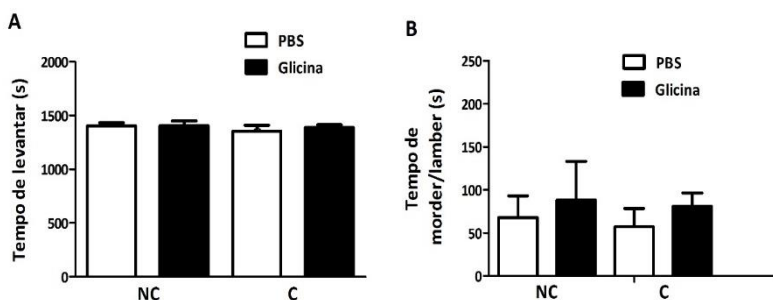


Figura 18. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II B em diferentes contextos. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 2 vias. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Dos 35,1 aos 60 minutos do teste de formalina, não houve efeito do tratamento da SCPd, do condicionamento e nem interação entre eles sobre o comportamento de levantar a pata (**Fig. 18 A**, condicionamento, $F_{1,24} = 0,73$; $P = 0,3987$; tratamento da SCPd, $F_{1,24} = 0,18$; $P = 0,6750$; interação, $F_{1,24} = 0,17$; $P = 0,6775$) e sobre o comportamento de morder/lamber a pata tratada com formalina (**Fig. 18 B**, condicionamento, $F_{1,24} = 0,09$; $P = 0,7630$; tratamento da SCPd, $F_{1,24} = 0,58$; $P = 0,4533$;

interação, $F_{1,24} = 0,00$; $P = 0,9534$), como indicado pela ANOVA de 2 vias.

Os resultados referentes aos comportamentos nocifensivos de levantar e morder/lamber a pata dos experimentos que utilizaram a injeção por via intratecal da neurotoxina de fibras noradrenérgicas 6-OHDA e dos antagonistas de receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos (prazosina e ioimbina) previamente ao tratamento da SCPd, serão descritos em conjunto, adotando a divisão do teste de formalina em três períodos: Fase I, Fase II A (dos 10 aos 35 minutos) e Fase II B (dos 40 aos 60 minutos). Logo depois, segue a descrição dos resultados dos experimentos de manipulação farmacológica intratecal e intracerebral (SCPd) associados ao comportamento de congelamento.

4.6 EFEITOS DA DEGENERAÇÃO DE FIBRAS NORADRENÉRGICAS DESCENDENTES E DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES α -ADRENÉRGICOS ESPINAIS NAS AÇÕES NOCICEPTIVAS DA GLICINA INTRA-SCPd EM DIFERENTES CONTEXTOS

FASE I

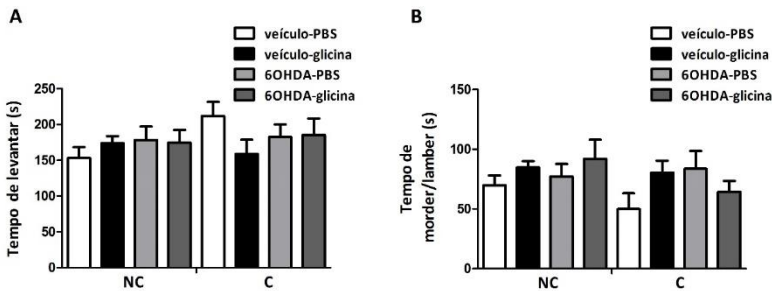


Figura 19. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da degeneração noradrenérgica espinal sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I em diferentes contextos. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 3 vias seguida do *post hoc* de Duncan. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Nenhum dos três fatores independentes (condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd) teve efeito sobre os comportamentos de levantar (**Fig. 19 A**; condicionamento, $F_{1,48} = 1,31$; P

= 0,2578; tratamento intatecal, $F_{1,48} = 0,20$; $P = 0,6557$; tratamento da SCPd, $F_{1,48} = 0,41$; $P = 0,5228$) e morder/lamber a pata (**Fig. 19 B**; condicionamento, $F_{1,48} = 1,97$; $P = 0,1667$; tratamento intatecal, $F_{1,48} = 0,96$; $P = 0,3306$; tratamento da SCPd, $F_{1,48} = 1,57$, $P = 0,2155$); durante a primeira fase do teste de formalina nos grupos experimentais condizentes ao protocolo que utilizou a neurotoxina 6-OHDA por via intratecal, também não houve interação entre os fatores, conforme indicado pela ANOVA de três vias; para o levantar a pata (condicionamento e intratecal, $F_{1,48} = 0,29$; $P = 0,5894$; condicionamento e SCPd, $F_{1,48} = 1,69$ $P = 0,1994$; intratecal e SCPd, $F_{1,48} = 0,38$; $P = 0,5373$; condicionamento, intratecal e SCPd, $F_{1,48} = 2,46$; $P = 0,1232$); para o morder/lamber a pata (condicionamento e intratecal, $F_{1,48} = 0,01$; $P = 0,9096$; condicionamento e SCPd, $F_{1,48} = 0,33$ $P = 0,5651$; intratecal e SCPd, $F_{1,48} = 2,33$; $P = 0,1333$; condicionamento, intratecal e SCPd, $F_{1,48} = 2,30$; $P = 0,1355$).

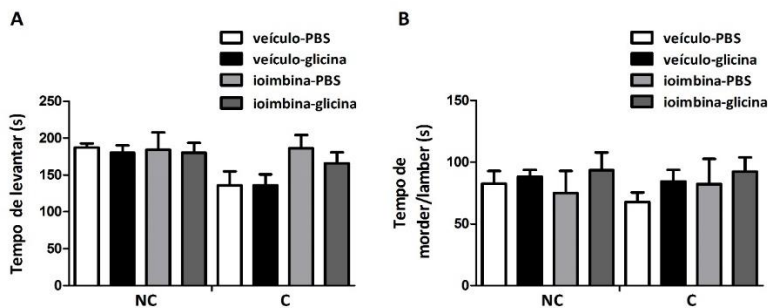


Figura 20. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de ioimbina sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I em diferentes contextos. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 3 vias seguida do *post hoc* de Duncan. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Nos experimentos referentes à injeção intratecal de ioimbina previamente à microinjeção de glicina intra-SCPd, A ANOVA de três vias indicou efeito do fator condicionamento sobre o comportamento de levantar a pata (**Fig. 20 A**) durante a primeira fase do teste de formalina ($F_{1,48} = 5,76$; $P = 0,0203$), porém, o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que não houve diferença significativa entre os grupos. Não houve efeito do tratamento intratecal ($F_{1,48} = 2,97$; $P = 0,9125$) e da SCPd ($F_{1,48} = 0,49$; $P = 0,4859$) sobre a expressão deste comportamento nocifensivo. A

ANOVA de 3 vias também indicou que não houve interação ente o condicionamento e o tratamento intratecal ($F_{1,48} = 3,49$; $P = 0,0675$), condicionamento e o tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,03$; $P = 0,8439$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 0,14$; $P = 0,7081$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,27$; $P = 0,6031$). Em relação ao comportamento de morder/lamber (**Fig. 20 B**), não ocorreu efeito de quaisquer dos três fatores independentes ((tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,28$; $P = 0,5935$); condicionamento ($F_{1,48} = 0,11$; $P = 0,7323$) e tratamento da SCPd ($F_{1,48} =$; $P =$)), nem interação entre eles ((condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,44$; $P = 0,5069$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,00$; $P = 0,947$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 0,02$; $P = 0,8747$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,28$; $P = 0,5989$)) sobre este comportamento relacionado à nocicepção.

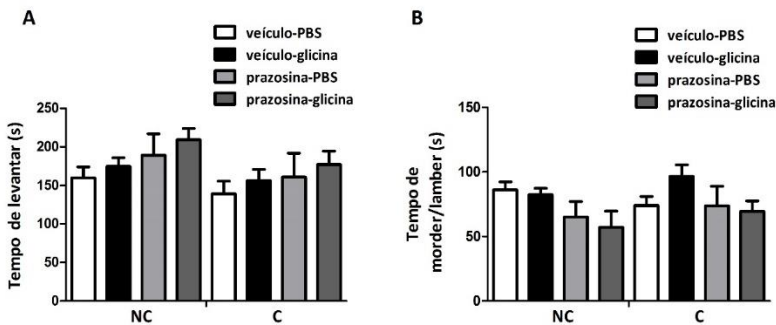


Figura 21. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de prazosina sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase I em diferentes contextos. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 3 vias seguida do *post hoc* de Duncan. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber. NC = não-condicionado; C = condicionado.

A ANOVA de três vias indicou efeito significativo do tratamento intratecal com prazosina sobre o comportamento de morder/lamber a pata (**Fig. 21 B**) durante a primeira fase do teste de formalina ($F_{1,48} = 6,83$, $P = 0,0118$), porém, o teste *post-hoc* de Duncan indicou que não houve diferença significativa entre os grupos não condicionado e condicionado em relação aos seus respectivos controles, nem entre os animais do mesmo grupo (tanto para o grupo não condicionado, quanto para o condicionado) em relação aos tratamentos intratecal e intracerebral. Nenhum dos outros fatores independentes teve efeito sobre o

comportamento de morder/lamber a pata (**Fig. 21 B**; condicionamento, $F_{1,48} = 0,70$; $P = 0,4062$; tratamento da SCPd, $F_{1,48} = 0,05$; $P = 0,8202$). A ANOVA de três vias indicou não haver efeito de interação entre os fatores sobre a manifestação do comportamento de morder/lamber ((condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,46$; $P = 0,4963$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 1,14$; $P = 0,2893$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 1,21$; $P = 0,2760$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,65$; $P = 0,4234$)).

Não houve efeito significativo dos três fatores independentes sobre o comportamento de levantar a pata (**Fig. 21 A**; condicionamento, $F_{1,48} = 3,21$; $P = 0,0793$; tratamento intratecal, $F_{1,48} = 3,69$; $P = 0,0606$ e tratamento da SCPd, $F_{1,48} = 1,55$; $P = 0,2185$) durante a primeira fase do teste de formalina, também não houve efeito de interação entre os fatores, conforme mostrado pela ANOVA de três vias ((condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,14$; $P = 0,7047$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,00$; $P = 0,9795$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 0,00$; $P = 0,9346$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,01$; $P = 0,9143$)).

FASE II A

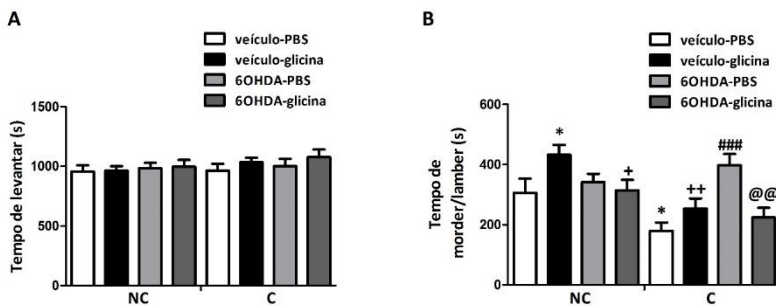


Figura 22. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de 6-OHDA sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A em diferentes contextos. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 3 vias, seguida de *post hoc* de Duncan. * $P < 0,05$ e em relação ao grupo controle, não condicionado, tratado com veículo e PBS; + $P < 0,05$ e ++ $P < 0,01$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com veículo por via intratecal glicina intra-SCPd; ### $P < 0,001$ em relação ao grupo controle condicionado, que recebeu veículo intratecalmente e PBS na SCPd. @@ $P < 0,01$ em comparação ao grupo condicionado tratado com 6-OHDA por via intratecal e

PBS intra-SCPd. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Nos experimentos correspondentes à administração de 6-OHDA por via intratecal, previamente à microinjeção de glicina na SCPd, A ANOVA de três vias mostrou que dos 10 aos 35 minutos do teste de formalina, houve efeito do fator condicionamento ($F_{1, 48} = 11,84$; $P = 0,0012$), interação entre o condicionamento e o tratamento intratecal ($F_{1, 48} = 7,63$; $P = 0,0081$), entre o condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1, 48} = 4,06$; $P = 0,0493$) e entre o tratamento intratecal e o tratamento da SCPd ($F_{1, 48} = 16,60$; $P = 0,0001$) sobre o tempo de despendido em morder/lamber a pata (**Fig. 22 B**). O teste *post-hoc* de Duncan indicou diferença significativa entre o grupo condicionado, tratado com veículo por via intratecal e PBS intra-SCPd e o grupo controle, não condicionado, com igual tratamento intratecal e intracerebral (C-veículo-PBS vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0214$), sendo que o grupo condicionado reduziu o tempo de manifestação do comportamento de morder/lamber a pata em relação ao grupo não condicionado, confirmando a expressão de analgesia induzida pelo condicionamento contextual. Os animais não condicionados, tratados com veículo intratecal, que receberam glicina intra-SCPd despenderam mais tempo no comportamento de morder/lamber do que o grupo não condicionado-veículo-PBS (teste *post-hoc* de Duncan, NC-veículo-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0238$), corroborando resultados anteriores deste trabalho que mostraram que a microinjeção de glicina na SCPd aumenta o tempo de expressão deste comportamento relacionado à nocicepção. Animais submetidos ao condicionamento contextual, que receberam veículo intratecal e tratados com glicina intra-SCPd manifestaram por menos tempo o comportamento de morder/lamber que o grupo contraparte não condicionado (teste *post-hoc* de Duncan, C-veículo-glicina vs. NC-veículo-glicina, $P = 0,0016$), indicando inibição do efeito hipernociceptivo da glicina intra-SCPd no contexto aversivo, confirmando resultados de experimentos anteriores deste estudo. Os animais condicionados, que receberam a neurotoxina noradrenérgica 6-OHDA por via intratecal e PBS por via intracerebral (SCPd) não apresentaram diferença significativa de seus contrapartes não-condicionados (C-6-OHDA-PBS vs. NC-6-OHDA-PBS, $P = 0,2607$), porém o teste *post-hoc* de Duncan mostrou que esse grupo teve diferença significativa em relação ao grupo controle condicionado (C-6-OHDA-PBS vs. C-veículo-PBS $P = 0,0001$), indicando reversão da analgesia induzida pelo condicionamento aversivo contextual. O grupo C-6-

OHDA-glicina também foi diferente do grupo C-6-OHDA-PBS ($P = 0,0023$).

Em relação ao comportamento de levantar a pata injetada com formalina (**Fig. 22 A**), a ANOVA de três vias mostrou que nenhum dos fatores independentes ((condicionamento ($F_{1,48} = 1,36$; $P = 0,2489$); tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,85$; $P = 0,3595$) e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 1,24$; $P = 0,2702$)) teve efeito sobre este comportamento relacionado à nocicepção. A ANOVA de três vias indicou também ausência de interação entre os três fatores ((condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,01$; $P = 0,9019$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,70$; $P = 0,4069$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 0,00$; $P = 0,9276$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,00$; $P = 0,9824$)).

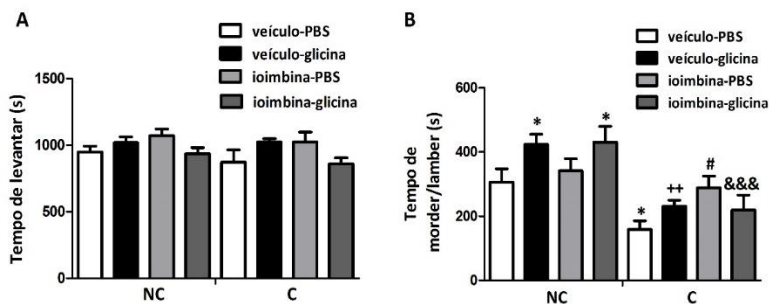


Figura 23. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de ioimbina sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A em diferentes contextos. ANOVA de 3 vias, seguida de *post hoc* de Duncan. * $P < 0,05$ e em relação ao grupo controle, não condicionado; ** $P < 0,01$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com glicina intra-SCPd; # $P < 0,05$ em relação ao grupo controle condicionado, que recebeu PBS na SCPd e veículo por via intratecal. *** $P < 0,001$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com ioimbina por via intratecal e glicina intra-SCPd. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais.

No período entre 10 e 35 minutos do teste de formalina dos experimentos que utilizaram injeção intratecal de ioimbina previamente à microinjeção cerebral de glicina, a ANOVA de três vias indicou que houve interação entre o tratamento intratecal e o tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 10,63$, $P = 0,0020$) sobre o comportamento de levantar a pata (**Fig. 23 A**), porém o teste *post-hoc* de Duncan mostrou não haver diferença

significante entre os grupos condicionados e não condicionados correspondentes com igual tratamento intracerebral e intratecal. Os fatores independentes sozinhos não tiveram efeito significativo sobre este comportamento ((condicionamento ($F_{1,48} = 1,53$; $P = 0,2209$); tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,03$; $P = ,8554$) e tratamento da SCPd ($F_{1,408} = 0,23$; $P = 0,6303$)). A ANOVA de três vias indicou também ausência de interação entre os fatores ((condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,09$; $P = 0,76247$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,10$; $P = 0,7447$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,46$; $P = 0,4991$)).

Em relação ao comportamento de morder/lamber (**Fig. 23 B**), a ANOVA de três vias indicou efeito do fator condicionamento ($F_{1,48} = 32,45$, $P = 0,0001$), sobre este comportamento neste período do teste de formalina. Os dados mostraram que os animais não condicionados, que receberam veículo por via intratecal e microinjeção cerebral de glicina despenderam mais tempo expressando o morder/lamber que os animais controle, não condicionados, que receberam veículo intratecal e PBS intra-SCPd, havendo diferença significativa entre os dois grupos (teste *post-hoc* de Duncan, NC-veículo-PBS vs. NC-veículo-glicina, $P = 0,0400$), ratificando resultados anteriores deste trabalho. O teste *post-hoc* de Duncan também indicou haver diferença significativa entre o grupo não condicionado, tratado com ioimbina por via intratecal e glicina intra-SCPd e o grupo controle, não condicionado, que recebeu veículo intratecal e PBS intra-SCPd (NC-ioimbina-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0358$) sobre o comportamento de morder/lamber a pata injetada com formalina.

O grupo condicionado, que recebeu veículo intratecal e PBS intra-SCPd passou menos tempo executando o morder/lamber a pata que o grupo controle não condicionado. O teste *post-hoc* de Duncan indicou diferença significativa entre esses dois grupos (C-veículo-PBS vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0145$), confirmando a expressão de analgesia relacionada ao condicionamento contextual aversivo. Os animais previamente pareados com choques elétricos (1 dia antes) que receberam veículo por via intratecal e microinjeção cerebral de glicina ficaram menos tempo expressando o comportamento de morder/lamber a pata no dia do teste que os animais não condicionados que receberam igual tratamento intratecal e intracerebral, (teste *post-hoc* de Duncan, C-veículo-glicina vs. NC-veículo-glicina, $P = 0,0014$), corroborando resultados de experimentos anteriores deste estudo, sugerindo que o condicionamento contextual aversivo impede o a ação hipernociceptiva da glicina exógena intra-SCPd no teste de formalina.

Os dados também mostraram que o grupo condicionado, que recebeu ioimbina por via intratecal e glicina intra-SCPd despendeu menos tempo em morder/lamber a pata que o grupo contraparte não condicionado (teste *post-hoc* de Duncan, C-ioimbina-glicina vs. NC-ioimbina-glicina $P = 0,0006$). Os animais do grupo condicionado, tratados com ioimbina por via intratecal e PBS por via intracerebral apresentaram diferença significativa em relação ao grupo condicionado, que recebeu veículo por via intratecal e PBS por via intracerebral, como indicou o teste *post-hoc* de Duncan (C-ioimbina-PBS vs C-veículo-PBS, $P = 0,0277$), apontando a reversão da analgesia induzida pelo condicionamento contextual aversivo.

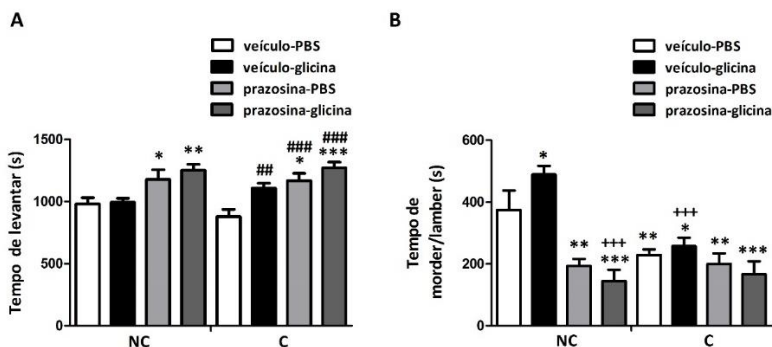


Figura 24. Efeitos da glicina exógena intra-SCPd e da administração por via intratecal de prazosina sobre a expressão comportamental nocifensiva na Fase II A em diferentes contextos. ANOVA de 3 vias, seguida de *post hoc* de Duncan. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao grupo controle, não condicionado; +++ $P < 0,001$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com glicina intra-SCPd; ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ em relação ao grupo controle condicionado, que recebeu PBS na SCPd e veículo por via intratecal **A**: levantar a pata; **B**: morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não condicionado; C = condicionado. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais.

ANOVA de três fatores dos dados experimentais condizentes ao uso de prazosina por via intratecal previamente à microinjeção de glicina, mostrou que entre 10 e 35 minutos do teste de formalina, os tratamentos intratecal ($F_{1, 48} = 36,23$, $P = 0,0001$) e intra-SCPd ($F_{1, 48} = 7,74$, $P = 0,0076$) tiveram efeito sobre o tempo gasto pelos animais na expressão do comportamento de levantar a pata injetada com formalina (**Fig. 24 A**). Independente do condicionamento e do tratamento da SCPd, os grupos

que receberam injeção intratecal de prazosina despenderam mais tempo em levantar a pata injetada com formalina que o grupo controle, não condicionado, tratado com veículo por via intratecal e PBS por via intracerebral. O teste *post-hoc* de Duncan indicou diferenças significantes entre os referidos grupos e o grupo controle não condicionado (NC-prazosina-PBS vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0211$; NC-prazosina-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0018$; C-prazosina-PBS vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0249$; C-prazosina-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0010$). Os animais dos grupos condicionados independente do tratamento intratecal ou intra-SCPd também apresentaram diferenças significantes em relação ao grupo controle condicionado, como mostrado pelo teste *post-hoc* de Duncan (C-veículo-glicina vs. C-veículo-PBS, $P = 0,0065$; C-prazosina-PBS vs. C-veículo-PBS; $P = 0,0008$; C-prazosina-glicina vs. C-veículo-PBS; $P = 0,0001$).

Em relação ao comportamento de morder/lamber a pata (**Fig. 24 B**), a ANOVA de três vias indicou efeito do condicionamento ($F_{1, 48} = 11,51$; $P = 0,0013$), do tratamento intratecal ($F_{1, 48} = 39,36$; $P = 0,0001$), interação entre o condicionamento e o tratamento intratecal ($F_{1, 48} = 15,70$; $P = 0,0002$) e entre o tratamento intratecal e o da SCPd ($F_{1, 48} = 4,88$; $P = 0,0318$) dos 10 aos 35 minutos do teste de formalina. Os dados mostraram que o grupo não condicionado, que recebeu veículo por via intratecal e microinjeção por via cerebral (SCPd) de glicina despendeu mais tempo em expressar o morder/lamber que o grupo o controle, não condicionado, tratado com veículo por via intratecal e PBS intra SCPd, o teste *post-hoc* de Duncan apontou diferença significativa entre esses dois grupos (NC-veículo-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0311$), reproduzindo dados anteriores deste trabalho que mostraram efeito hipernociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de formalina na pata.

O teste *post-hoc* de Duncan também indicou diferença significativa entre os animais do grupo não condicionado, tratados com prazosina por via intratecal e com PBS intra-SCPd e o grupo controle não condicionado (NC-prazosina-PBS vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0020$), sendo que os primeiros expressaram o comportamento de morder/lamber a pata por um período de tempo menor que o grupo controle, apontando uma ação hiponociceptiva da prazosina por via intratecal no teste de formalina.

Os dados mostraram que o grupo não condicionado, tratado com prazosina e que recebeu glicina intra-SCPd expressou por menos tempo o comportamento de morder/lamber em relação a ambos os grupos, grupo controle, não condicionado, tratado com PBS (teste *post-hoc* de Duncan, NC-prazosina-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0001$) e o grupo não

condicionado, tratado com veículo por via intratecal e glicina intra-SCPd (teste *post-hoc* de Duncan, NC-prazosina-glicina vs. NC-veículo-glicina, $P = 0,0001$), indicando que o tratamento por via intratecal com prazosina reverteu o efeito hipernociceptivo da glicina intra-SCPd.

O teste *post-hoc* de Duncan indicou que o grupo submetido ao condicionamento, que recebeu veículo por via intratecal e microinjeção cerebral (SCPd) de PBS foi diferente estatisticamente do seu grupo contraparte controle, não condicionado (C-veículo-PBS vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0085$), despendendo por menos tempo o comportamento nocifensivo de morder/ lamber a pata injetada com formalina, confirmando a expressão de analgesia induzida pelo condicionamento contextual aversivo. Os demais grupos condicionados, independente do tratamento intratecal (veículo ou prazosina) e do tratamento da SCPd (PBS ou glicina) também reduziram o tempo em que morderam/lamberam a pata em comparação ao grupo controle não condicionado (teste *post-hoc* de Duncan, C-veículo-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0273$; C-prazosina-PBS vs. NC-veículo-PBS; $P = 0,0034$; C-prazosina-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0023$). Os dados mostraram que os animais condicionados, tratados com veículo por via intratecal e glicina intra-SCPd manifestaram por menos tempo o comportamento de morder/lamber que seus contrapartes não condicionados que receberam igual tratamento intratecal e intracerebral (teste *post-hoc* de Duncan, C-veículo-glicina vs. NC-veículo-glicina, $P = 0,0001$), como este grupo também apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, não condicionado, tratado com veículo intratecal e PBS intra-SCPd, como mencionado acima (C-veículo-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0311$), os resultados indicam que o condicionamento contextual aversivo é capaz de reverter o efeito hipernociceptivo derivado do tratamento da SCPd com glicina.

FASE II B

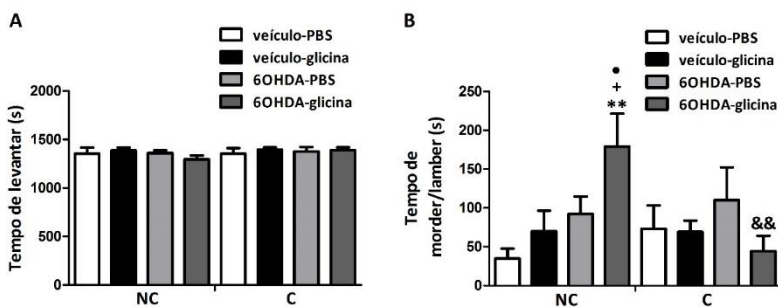


Figura 25. Efeitos da administração de glicina na SCPd e da injeção intratecal de 6-OHDA sobre a manifestação de comportamentos nocifensivos na Fase II B em diferentes contextos. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 3 vias, seguida de *post hoc* de Duncan. ** $P < 0,01$ e em relação ao grupo controle, não condicionado, tratado com veículo e PBS; * $P < 0,05$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com veículo por via intratecal glicina intra-SCPd; • $P < 0,05$ em relação ao grupo não condicionado que recebeu 6-OHDA por via intratecal e PBS na SCPd; && $P < 0,01$ em relação ao grupo não condicionado, que recebeu 6-OHDA intratecalmente e glicina na SCPd. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Em relação aos dados dos experimentos que utilizaram injeção intratecal de 6-OHDA previamente ao tratamento da SCPd com glicina, a ANOVA de três vias mostrou que, dos 35,1 aos 60 minutos do teste de formalina, não houve efeito do condicionamento ($F_{1,48} = 0,86$; $P = 0,3569$), do tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,33$; $P = 0,5646$) e da SCPd ($F_{1,48} = 0,02$; $P = 0,8645$), nem interação entre esses fatores ((condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,78$; $P = 0,3810$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,52$; $P = 0,4714$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 1,12$; $P = 0,2937$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,35$; $P = 0,5532$)), sobre o tempo de expressão do comportamento de levantar a pata (**Fig. 25 A**).

No referente ao comportamento de morder/lamber a pata (**Fig. 25 B**), a ANOVA de três fatores indicou que houve efeito do tratamento intratecal ($F_{1,48} = 4,99$; $P = 0,0301$) e interação entre o condicionamento e o tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 5,71$, $P = 0,0207$) sobre o tempo de manifestação deste comportamento nocifensivo na fase tardia do teste de

formalina (40 a 60 minutos após injeção de formalina na pata). Os dados mostraram que grupo não condicionado, que recebeu 6-OHDA por via intratecal e glicina intra-SCPd despendeu maior tempo em morder/lamber a pata injetada com formalina que o grupo controle (teste *post-hoc* de Duncan: NC-6-OHDA-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0022$), que o grupo não condicionado-veículo-glicina (NC-6-OHDA-glicina vs. NC-veículo-glicina, $P = 0,0166$) e que o grupo não condicionado, que recebeu 6-OHDA por via intratecal e PBS intra-SCPd (NC-6-OHDA-glicina vs. NC-6-OHDA-PBS, $P = 0,0445$). Enquanto que o grupo condicionado, que recebeu 6-OHDA por via intratecal e glicina intra-SCPd expressou por menos tempo o morder/lamber a pata injetada com formalina que seu grupo equivalente não condicionado (teste *post-hoc* de Duncan: C-6-OHDA-glicina vs. NC-6-OHDA-glicina, $P = 0,0040$).

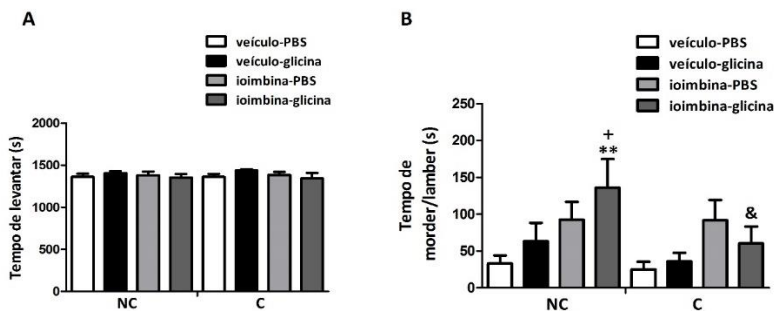


Figura 26. Efeitos da administração de glicina na SCPd e da injeção intratecal de ioimbina sobre a manifestação de comportamentos nocifensivos na Fase II B em diferentes contextos. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 3 vias, seguida de *post hoc* de Duncan. ** $P < 0,01$ e em relação ao grupo controle, não condicionado, tratado com veículo e PBS; * $P < 0,05$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com veículo por via intratecal glicina intra-SCPd; • $P < 0,05$ em relação ao grupo não condicionado que recebeu ioimbina por via intratecal e PBS na SCPd; & $P < 0,05$ em relação ao grupo não condicionado, que recebeu 6-OHDA intratecalmente e glicina na SCPd. **A:** levantar a pata; **B:** morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Nos dados experimentais referentes à injeção intratecal de ioimbina previamente à microinjeção de glicina intra-SCPd, a ANOVA de três fatores mostrou que houve efeito do tratamento intratecal sobre a expressão do comportamento de morder/lamber (**Fig. 26 B**; $F_{1,48} = 11,50$, $P = 0,0014$) dos 35,1 aos 60 minutos do teste de formalina. O teste *post-hoc* de Duncan indicou que houve diferença significativa entre o grupo

não condicionado-ioimbina-glicina e o grupo controle (NC-ioimbina-glicina vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0076$), os dados mostraram efeito hipernocifensivo do tratamento com ioimbina por via intratecal e glicina intra-SCPd. Já o grupo condicionado que recebeu ioimbina por via intratecal e glicina intra-SCPd expressou o comportamento de morder/lamber por menos tempo que o grupo não condicionado com igual tratamento intratecal e intracerebral (teste *post-hoc* de Duncan, C-ioimbina-glicina vs. NC-ioimbina-glicina, $P = 0,0446$). Não houve efeito do condicionamento ($F_{1,48} = 0,03$; $P = 0,8476$), do tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,81$; $P = 0,3712$) e do tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,18$; $P = 0,6730$), nem interação entre esses fatores sobre o tempo de expressão do comportamento de levantar a pata ((**Fig. 26 A**; condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,12$; $P = 0,7253$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,02$; $P = 0,8734$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 2,83$; $P = 0,0988$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,17$; $P = 0,6748$)).

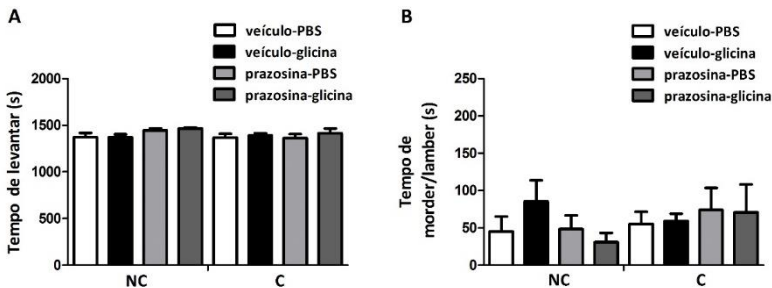


Figura 27. Efeitos da administração de glicina na SCPd e da injeção intratecal de prazosina sobre a manifestação de comportamentos nocifensivos na Fase II B em diferentes contextos. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. ANOVA de 3 vias, seguida de *post hoc* de Duncan **A**: levantar a pata; **B**: morder/lamber a pata injetada com formalina. NC = não-condicionado; C = condicionado.

A ANOVA de três vias dos dados dos experimentos que utilizaram prazosina (intratecal) previamente à microinjeção intracerebral de glicina, mostrou que dos 40 aos 60 minutos do teste de formalina, nenhum dos fatores independentes teve efeito sobre o tempo de manifestação dos comportamentos de levantar ((**Fig. 27 A**; condicionamento ($F_{1,48} = 1,44$; $P = 0,2352$), tratamento intratecal ($F_{1,48} = 3,32$; $P = 0,0742$) e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,88$; $P = 0,3513$)) e morder/lamber a pata injetada com

formalina ((Fig. 27 B; condicionamento ($F_{1,48} = 0,56$; $P = 0,4572$), tratamento intratecal ($F_{1,48} = 0,10$; $P = 0,7475$) e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,12$; $P = 0,7280$)). Também não houve interação entre os fatores sobre os comportamentos nocifensivos de levantar ((condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 2,13$; $P = 0,1500$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,33$; $P = 0,5632$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 0,24$; $P = 0,6227$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,00$; $P = 0,9233$)) e de morder/lamber (condicionamento e tratamento intratecal ($F_{1,48} = 1,55$; $P = 0,2192$), condicionamento e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,11$; $P = 0,7410$), tratamento intratecal e da SCPd ($F_{1,48} = 0,97$; $P = 0,3279$) e condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 0,59$; $P = 0,4443$)).

4.7 EFEITO DA GLICINA INTRA-SCPd SOB NEURODEGENERAÇÃO NORADRENÉRGICA DESCENDENTE NO CONGELAMENTO INDUZIDO CONTEXTUALMENTE

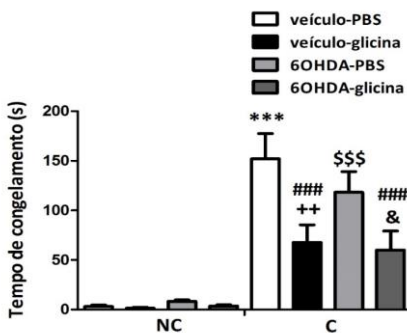


Figura 28. Efeitos do condicionamento contextual e do tratamento da SCPd após desnervação noradrenérgica com 6-OHDA sobre a expressão de congelamento induzido pelo contexto aversivo. ANOVA de 3 vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. *** $P < 0,001$, em relação ao grupo controle, não condicionado; ++ $P < 0,01$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com glicina intra-SCPd; \$\$\$ $P < 0,001$ em comparação ao grupo não condicionado, tratado com 6-OHDA por via intratecal e PBS intra-SCPd; & $P < 0,05$ em relação ao grupo tratado com 6-OHDA por via intratecal e glicina intra-SCPd e ### $P < 0,001$ em relação ao grupo controle condicionado, que recebeu veiculo intratecal e PBS na SCPd. As barras representam a média ± E.P.M. de 7 animais. NC = não-condicionado; C = condicionado.

A ANOVA de três vias mostrou que houve efeito do fator condicionamento ($F_{1,48} = 82,77$; $P = 0,0001$), do tratamento da SCPd ($F_{1,48} = 12,63$; $P = 0,0008$) e interação entre esses dois fatores ($F_{1,48} = 10,55$; $P = 0,0021$) sobre o tempo despendido no comportamento de congelamento. O condicionamento contextual foi associado com maior tempo de expressão do comportamento de congelamento (**Fig. 28**). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que houve diferença significativa entre os animais dos grupos condicionados e os animais dos grupos não condicionados (C-veículo-PBS vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0001$; C-veículo-glicina vs. NC-veículo-glicina, $P = 0,0062$; C-6OHDA-PBS vs. NC-6OHDA-PBS, $P = 0,0001$; C-6OHDA-glicina vs. NC-6OHDA-glicina, $P = 0,0131$). Os animais do grupo condicionado tratados com veículo por via intratecal e com glicina intra-SCPd e os animais do grupo condicionado que receberam injeção intratecal de 6-OHDA e glicina intra-SCPd despenderam menos tempo no comportamento de congelamento que os animais do grupo condicionado controle, que receberam veículo por via intratecal e PBS por via cerebral (C-veículo-glicina vs. C-veículo-PBS, $P = 0,0003$; C-6-OHDA-glicina vs. C-veículo-PBS, $P = 0,0001$; *post-hoc* de Duncan).

4.8 EFEITO DA INJEÇÃO INTRATECAL DE IOIMBINA PREVIAMENTE À MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SCPd SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO

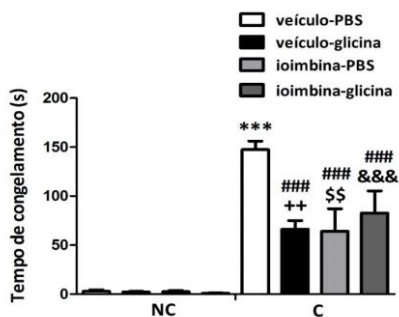


Figura 29. Efeitos do condicionamento contextual e do tratamento da SCPd após injeção intratecal de ioimbina sobre a expressão de congelamento induzido pelo contexto aversivo. ANOVA de 3 vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. *** $P < 0,001$, em relação ao grupo controle, não condicionado; ++ $P < 0,01$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com glicina intra-SCPd; \$\$ $P < 0,01$ em comparação ao grupo não condicionado, tratado com ioimbina por via intratecal e PBS intra-SCPd; &&& $P < 0,001$ em relação ao grupo

tratado com ioimbina por via intratecal e glicina intra-SCPd e ^{###} $P < 0,001$ em relação ao grupo controle condicionado, que recebeu veículo intratecal e PBS na SCPd. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Os dados mostraram que os animais submetidos ao condicionamento contextual aversivo despenderam mais tempo na expressão do congelamento em comparação aos animais do grupo não condicionado (**Fig. 29**). A ANOVA de três fatores apontou efeito do condicionamento ($F_{1, 48} = 103,71$, $P = 0,0001$), interação entre o tratamento intratecal e o tratamento da SCPd ($F_{1, 48} = 8,24$, $P = 0,0060$) e interação entre o condicionamento, o tratamento intratecal e o tratamento da SCPd ($F_{1, 48} = 8,53$, $P = 0,0053$) sobre o tempo de congelamento contextualmente induzido. O teste *post-hoc* de Duncan indicou diferença significativa entre os grupos condicionados e seus controles não condicionados (condicionado-veículo-PBS e não condicionado-veículo-PBS, $P = 0,0001$; condicionado-veículo-glicina e não condicionado-veículo-glicina, $P = 0,0012$; condicionado-ioimbina-PBS e não condicionado-ioimbina-PBS, $P = 0,0012$ e condicionado-ioimbina-glicina e não condicionado-ioimbina-glicina, $P = 0,0001$), bem como entre os grupos condicionados tratados com veículo ou ioimbina por via intratecal e PBS ou glicina por via cerebral (SCPd) e o grupo controle condicionado (condicionado-veículo-glicina vs. condicionado-veículo-PBS, $P = 0,0001$; condicionado-ioimbina-PBS vs. condicionado-veículo-PBS, $P = 0,0001$ e condicionado-ioimbina-glicina vs. condicionado-veículo-PBS, $P = 0,0005$).

4.9 EFEITO DA INJEÇÃO INTRATECAL DE PRAZOSINA PREVIAMENTE À MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SCPd SOBRE O COMPORTAMENTO DE CONGELAMENTO

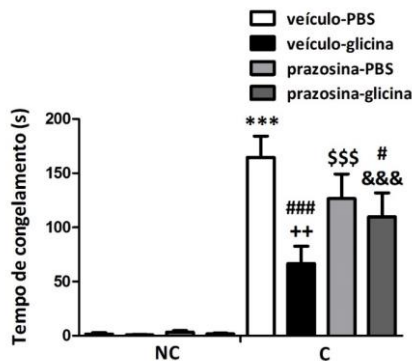


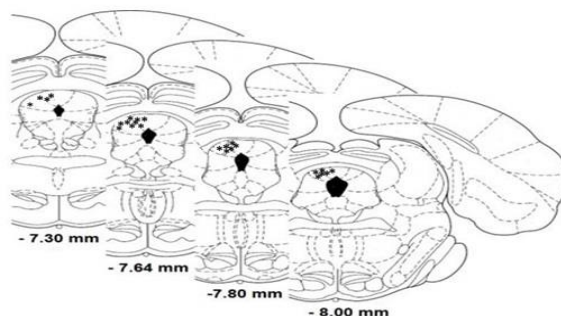
Figura 30. Efeitos do condicionamento contextual e do tratamento da SCPd após injeção intratecal de prazosina sobre a expressão de congelamento induzido pelo contexto aversivo. ANOVA de 3 vias, seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. *** $P < 0,001$, em relação ao grupo controle, não condicionado; ++ $P < 0,01$ em comparação ao grupo não condicionado tratado com glicina intra-SCPd; \$\$\$ $P < 0,01$ em comparação ao grupo não condicionado, tratado com prazosina por via intratecal e PBS intra-SCPd; &&& $P < 0,001$ em relação ao grupo não condicionado tratado com prazosina por via intratecal e glicina intra-SCPd; # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ em relação ao grupo controle condicionado, que recebeu veículo intratecal e PBS na SCPd. As barras representam a média \pm E.P.M. de 7 animais. NC = não-condicionado; C = condicionado.

Os resultados mostraram que todos os animais dos grupos condicionados expressaram por mais tempo o comportamento de congelamento em comparação aos animais não condicionados (**Fig. 30**). A ANOVA de três vias indicou que houve efeito do condicionamento ($F_{1, 48} = 128,63$, $P = 0,0001$), do tratamento da SCPd: $F_{1, 48} = 8,35$, $P = 0,0057$) e interação entre estes dois fatores ($F_{1, 48} = 7,67$, $P = 0,0079$) sobre o tempo de congelamento contextualmente induzido. Além disso, a ANOVA também apontou uma interação entre os três fatores, condicionamento, tratamento intratecal e tratamento da SCPd ($F_{1, 48} = 4,07$, $P = 0,0492$). O teste *post-hoc* de Duncan mostrou que os grupos condicionados apresentaram diferenças significantes em relação aos grupos não condicionados equivalentes quanto ao tratamento intratecal e intracerebral (C-veículo-PBS vs. NC-veículo-PBS, $P = 0,0001$; C-veículo-glicina vs. NC-veículo-glicina, $P = 0,0043$; C-prazosina-PBS vs.

NC-prazosina-PBS, $P = 0,0001$; C-prazosina-glicina vs. NC-prazosina-glicina, $P = 0,0001$). Os animais dos grupos condicionados tratados com glicina intra-SCPd, independente do tratamento intratecal que receberam, manifestaram por menos tempo o comportamento de congelamento que os do grupo condicionado controle (C-veículo-glicina vs. C-veículo-PBS, $P = 0,0001$; C-prazosina-glicina vs. C-veículo-PBS, $P = 0,0127$).

4.10. CONFIRMAÇÃO DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO CEREBRAL

A



B

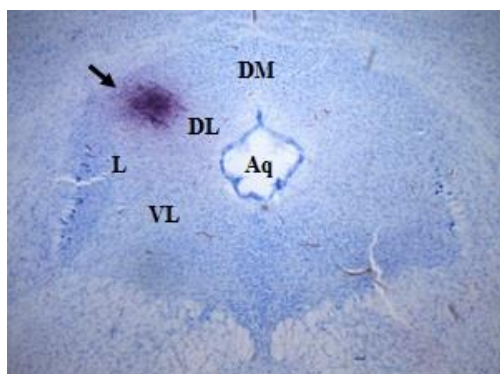


Figura 31. Histologia de confirmação dos sítios de microinjeção cerebral. A: Diagrama dos cortes coronais de cérebro de rato, redesenhados a partir de Paxinos e Watson (2009). Os sítios de microinjeção (*) foram marcados pela injeção de Azul de Evans na SCPd, predominantemente na porção caudal (-7,64 a -8,00 mm

a partir do bregma). Para evitar sobreposições, o número de pontos na figura é menor do que o de ratos utilizados. **B:** Fotomicrografia de uma lâmina de mesencéfalo de um animal representativo, indicando o sítio de microinjeção dentro da coluna dorsolateral da SCP. O corte corresponde a -7,6 mm a partir do bregma no atlas de Paxinos e Watson (2009). DM, dorsomedial, DL, dorsolateral, L, lateral, VL, ventrolateral, Aq, aqueduto cerebral.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a administração de glicina, um co-agonista do complexo receptor NMDA/GLY-B, na coluna dorsal da SCP (principalmente na porção caudal da SCPdI, **Fig. 31**) ocasionou aumento do tempo despendido na manifestação do comportamento de morder/lamber dos 10 aos 35 minutos do teste de formalina na pata.

Os resultados histológicos da localização do sítio de microinjeção mostraram que os efeitos nociceptivos da microinjeção intracerebral de glicina são devidos à SCPd e não a outras regiões. De fato, a administração de glicina no CS, como apresentado, SCPI, SCPvI e aqueduto cerebral (dados não mostrados devido ao número insuficiente de integrantes da amostra) não causou quaisquer efeitos sobre a nocicepção induzida por formalina.

É de nosso conhecimento que a difusão de substâncias microinjetadas no tecido cerebral ao redor do local da injeção é diretamente proporcional ao volume injetado (MYERS, 1966, ROTTENBERG, 1972) e que volumes de 0,5 μ L se difundem em média 1,04 mm ao redor do sítio de injeção (MYERS, 1966). É muito pouco plausível que o volume da solução de glicina que empregamos tenha se difundido para regiões vizinhas à SCPd. Esse risco foi bastante minimizado, ao utilizarmos um volume de microinjeção menor que 0,5 μ L, ou seja, 0,3 μ L.

Contrastando estudos que apontaram para efeitos hiponociceptivos da estimulação elétrica ou química do CS (COIMBRA, TOMAZ, BRANDÃO, 1992; COIMBRA, BRANDÃO, 1993), nossos dados não mostraram efeitos nociceptivos da administração de glicina nesta estrutura. Deve-se ponderar que nestes estudos foram utilizados volumes de microinjeção relativamente grandes (0,5 μ L) e estimulação elétrica. Devido à proximidade entre a SCPd e as camadas profundas do CS, é difícil anular a possibilidade destas manipulações terem atingido a coluna dorsal da SCP.

O efeito hipernociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd foi impedido quando empregamos o paradigma de condicionamento contextual aversivo e envolve mecanismos de modulação noradrenérgicos da medula espinal, dos quais se sobressaem receptores α_1 -adrenérgicos, tanto na modulação do componente emocional/atencional da nocicepção (morder/lamber) quanto no controle do reflexo motor (levantar a pata). Mostramos também que o sistema noradrenérgico descendente revelou-se importante para a analgesia induzida pelo condicionamento contextual, sem necessitar que a SCPd

seja sensibilizada por glicina exógena. Um dos mediadores espinais desta expressão comportamental são os receptores α_2 -adrenérgicos espinais. Na fase tardia do teste de formalina na pata (35,1 a 60 minutos), a injeção intratecal da neurotoxina noradrenérgica 6-OHDA ou de ioimbina previamente à microinjeção de glicina na SCPd promoveu aumento no tempo gasto na manifestação do comportamento de morder/lamber. Em relação ao comportamento de congelamento contextualmente induzido, glicina exógena na SCPd causou um menor tempo de expressão desta resposta comportamental defensiva comparando-se ao grupo controle condicionado, que recebeu PBS na SCPd, independente do tratamento intratecal, apesar de não prejudicar a expressão de analgesia induzida contextualmente.

5.1 A REGIÃO CAUDAL DA COLUNA DORSAL DA SCP COMUTA HIPERALGESIA PARA ALGESIA DEPENDENDO DO CONTEXTO EMOCIONAL

Nos procedimentos experimentais do presente trabalho, o sítio de microinjeção de glicina adotado foi a coluna dorsal da SCP (principalmente a coluna dorsolateral), em porções mais caudais, com base em estudos que mostraram aumento de respostas comportamentais nocifensivas no teste de formalina na pata (MARTINS *et al.*, 2010a) e de respostas defensivas, do tipo ansiogênicas no LCE (CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001; MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008) após administração deste coagonista do complexo receptor NMDA/GLY-B nesta região da SCP.

Evidências relatam uma participação diferencial das regiões rostral e caudal da SCPd na mediação de comportamentos defensivos (BANDLER *et al.*, 2000, para revisão), especialmente em relação aos efeitos do tipo ansiogênicos da glicina (TEIXEIRA, CAROBREZ, 1999, SOUZA, CAROBREZ, 2016). Enquanto o antagonista do sítio GLY-B, HA966 induziu efeito do tipo ansiolítico em todos os níveis (rostral, intermediário e caudal) da SCPd, a glicina produziu efeito do tipo ansiogênico somente na parte caudal da SCPd (TEIXEIRA, CAROBREZ, 1999). Talvez a saturação dos sítios de ligação GLY-B na porção rostral da SCPd (FLETCHER, LODGE, 1988; KEMP *et al.*, 1988), pode ter tornado essa área não responsiva à glicina exógena (CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001).

Outro aspecto que deve ser considerado é a possível distribuição diferencial de subunidades do complexo receptor NMDA/GLY-B ao

longo do eixo rostro-caudal da SCPd. Estudos eletrofisiológicos (PRIESTLEY *et al.*, 1995; NAHUM-LEVY *et al.*, 2001) apresentaram a seguinte ordem de classificação para afinidades relativas da glicina ao sítio de ligação GLY-B: NR1/NR2D > NR1/NR2C > NR1/NR2B > NR1/NR2A. A porção rostral da SCPd possui maior distribuição de receptores NMDA compostos por subunidades NR1/NR2A, o que teria levado à redução do efeito do tipo ansiogênico da glicina exógena nesta porção do eixo rostro-caudal da SCP (CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001), considerando os dados referentes à saturação dos sítios GLY-B e afinidade da glicina a ele na porção rostral da SCPd, escolhemos como alvo farmacológico a região caudal da coluna dorsal desta estrutura mesencefálica, onde esse aminoácido exerce efeito do tipo ansiogênico nesta região. Esse efeito, como discutido a seguir, está relacionado ao aumento da nocicepção ocasionado pela administração da glicina intra-SCPd caudal no teste de formalina na pata (MARTINS *et al.*, 2010a).

Estudos anteriores realizados no nosso laboratório indicaram que dependendo da concentração e do teste nociceptivo empregado, a glicina administrada na porção caudal da SCPd pode diminuir a nocicepção (hiponocicepção) ou aumentá-la (hipernocicepção) (MARTINS, CAROBREZ; TONUSSI, 2008; MARTINS *et al.*, 2010a). Os dados obtidos no presente trabalho referentes a ação hipernociceptiva da glicina corroboram os resultados de MARTINS e colaboradores (MARTINS *et al.*, 2010a). Esse efeito parece ser mediado pelo sítio GLY-B do complexo receptor NMDA/GLY-B, pois a microinjeção de HA966 na SCPd caudal, um antagonista do sítio GLY-B, reverteu o efeito facilitatório causado pela microinjeção intra-SCPd de glicina sobre a nocicepção induzida por formalina subcutânea (pata) e a microinjeção de estricnina, um antagonista seletivo para receptores de glicina GLY-A no mesmo sítio, não reverteu a hipernocicepção causada por glicina exógena na SCPd (MARTINS *et al.*, 2010a).

Além de seus efeitos sobre a nocicepção, a microinjeção de glicina, em porções mais caudais da SCPd, tem efeito do tipo ansiogênico (TEIXEIRA, CAROBREZ, 1999; MARTINS, CAROBREZ, TONUSSI, 2008), como já mencionado. Considerando que a ansiedade pode causar hiperalgesia devido à antecipação da dor em si (BENEDETTI *et al.*, 2006; SAWAMOTO, *et al.*, 2000; KOYAMA, *et al.*, 2005; KELTNER, *et al.*, 2006) e que em condições clínicas é bem difundido que a ansiedade está associada à exacerbação dos sintomas de dor (McCRACKEN *et al.*, 1993; FERGUSON, AHLES, 1998), a ativação do sistema facilitatório descendente da SCP pode ser relevante a este fenômeno. De fato, um estudo de imagem em humanos indicou que a SCP se torna ativa em

situações ambientais que induzem hiperalgesia em resposta ao estresse ansiogênico (FAIRHURST *et al.*, 2007). A este respeito supõe-se que a microinjeção de glicina na SCPd pode causar um estado ansiogênico semelhante, que seria capaz de aumentar a nocicepção à um estímulo nocivo (MARTINS *et al.*, 2010a).

Tem sido sugerido que a estimulação da SCPd com glicina, que causa comportamentos sutis relacionados à avaliação de risco e esquiva, possa aumentar a valência aversiva de potenciais fontes de ameaça ao animal (para revisão veja CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001), conseqüentemente, a atenção do animal pode ser direcionada para a fonte que lhe parece mais ameaçadora em uma determinada circunstância. É difundido que a ansiedade aumenta a nocicepção quando esta for a principal fonte de estresse (BUSHNELL *et al.*, 1985; MIRON, DUNCAN, BUSHNELL, 1989; ARNTZ *et al.*, 1994; RHUDY, MEAGHER 2000; PLOGHAUS *et al.*, 2003), em humanos, de forma semelhante, na hiperalgesia induzida por ansiedade, a atenção está focada na dor iminente (COLLOCA, BENEDETTI, 2007) assim, o tratamento da SCPd com glicina, pode ter desviado o foco de atenção do animal para a principal fonte estressora, a pata injetada com formalina, favorecendo a nocicepção (MARTINS *et al.*, 2010a) em um contexto ambiental neutro, não aversivo (**Fig. 32 B**). Uma abordagem experimental para confirmar esse construto, até então, pelo nosso conhecimento, não havia sido realizada.

Tendo isso em mente, o questionamento diferencial do presente trabalho foi se um contexto com valência emocional negativa poderia modificar o efeito hipernociceptivo produzido pela sensibilização da SCPd com glicina, ou seja, se ao colocar o animal em um ambiente aversivo, ele mudaria o foco de atenção da pata (injetada com formalina) para o ambiente (agora a principal fonte de ansiedade), ocorrendo a reversão da hipernocicepção provocada pela microinjeção de glicina na SCPd. Para testar essa hipótese, empregamos o paradigma de analgesia induzida pelo condicionamento contextual aversivo.

A analgesia induzida pelo condicionamento contextual aversivo é um fenômeno pelo qual a re-exposição de um animal a um contexto previamente pareado com um estímulo aversivo (como emissão de choques elétricos nas patas) resulta em analgesia (REA, LANG, FINN, 2009). A porção caudal, mas não a rostral, da SCPd é apontada como necessária para a aquisição e/ou execução deste tipo de analgesia (KINSHECK, WATKINS, MAYER, 1984).

Entenda-se o uso do termo “sensibilização” da SCPd com glicina no sentido de que a microinjeção deste coagonista do complexo receptor

NMDA na SCPd foi realizada antes da injeção de formalina na pata, que inicia a nocicepção e *per se* ativa a SCPd (embora não diretamente). A microinjeção de glicina intra-SCPd não causou dor em animais que receberam salina na pata (dados não mostrados). Poderíamos aplicar o termo “ativação” quando considerarmos que a glicina na SCPd *per se* gera ansiedade (CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001, para revisão). Assim, possivelmente “ativamos” a SCPd com glicina para o estresse ansiogênico, mas a “sensibilizamos” para a nocicepção que vai ser induzida por formalina.

Estudo anterior do nosso laboratório (MARTINS *et al.*, 2010a) investigou os efeitos nociceptivos da glicina intra-SCP no teste de formalina na pata, contabilizando o número de comportamentos nocifensivos e os agregando como uma resposta única (somatório do número de chacoalhadas, mordidas/lambidas e levantadas da pata). No atual trabalho, optamos pela análise do tempo despendido na manifestação de dois comportamentos distintos relacionados à nocicepção, o levantar e o morder/lamber a pata injetada com formalina, considerados separadamente e em dois contextos distintos, neutro e aversivo. A este respeito pesquisas indicam que aspectos temporais (latência, duração e curso) de cada resposta comportamental para a formalina subcutânea pode ter diferentes distribuições (TJØLSEN *et al.*, 1992, PORRO; CAVAZZUTI, 1993; ALOISI, CARLI, 1996).

Evidências experimentais também mostram que alguns agentes como naloxona, neurotoxinas, pentobarbital, ketamina, amitriptilina e beta endorfinas (GISPEN *et al.*, 1976; PORRO *et al.*, 1991; ALOISI, PANERAI, CARLI, 1992; TJØLSEN, BERGE, HOLE, 1991; WHEELER-ACETO, COWAN, 1993; ABBOTT, FRANKLIN, WESTBROOK, 1995; SAWYNOK, REID, 2001) exercem efeitos diferenciais sobre distintos comportamentos relacionados à nocicepção. O apanhado geral desses estudos implica que alguma informação poderia ser perdida se tais comportamentos fossem analisados como uma única resposta ou se apenas um dos comportamentos fosse monitorado.

Além disso, medidas comportamentais de dor variam em sua sensibilidade à modulação pela atenção e emoção dependendo do nível do SNC que medeia a resposta (KEEFE, FILLINGIM, WILLIAMS, 1991), de fato, os comportamentos nocifensivos de levantar e de morder/lamber a pata injetada com formalina são devidos a diferentes mecanismos neurais (DONAHUE *et al.*, 2001; PORRO *et al.*, 2003). O primeiro pode ser considerado uma atividade não focalizada à dor (ALMEIDA *et al.*, 1999; POTES *et al.*, 2006; POTES *et al.*, 2016), com processamento proeminentemente espinal (DONAHUE *et al.*, 2001;

PORRO *et al.*, 2003) e o segundo, uma atividade focalizada, na qual o animal localiza a fonte da dor persistente e dirige sua atenção à ela (ALMEIDA *et al.*, 1999; POTES *et al.*, 2006), tendo processamento predominantemente supraespinal (DONAHUE *et al.*, 2001, PORRO *et al.*, 2003), requerendo a modulação por estruturas corticais (como o CCA) e subcorticais (como os núcleos da base) (DONAHUE *et al.*, 2001; WANG, REDGRAVE, 1997).

Regiões supraespinais como o estriado, a substância negra (BARASI, 1979; CHUDLER, SUGIYAMA, DONG, 1993) e os colículos superiores (STEIN, DIXON, 1978; McHAFFIE, KAO, STEIN, 1989; REDGRAVE, MCHAFFIE, STEIN, 1996.), além de células nervosas associadas à orientação e movimentos orofaciais, têm populações significativas de neurônios nociceptivos, cuja função destina-se à organização de movimentos induzidos por estímulos dolorosos (MAO, MAYER, PRICE, 1993; CHUDLER, DONG, 1995; WANG, REDGRAVE, 1997). Os núcleos da base (principalmente o estriado), através do colículo superior lateral, controlam o comportamento de morder/lamber a pata injetada com formalina (WANG, REDGRAVE, 1997). Recentemente, um estudo de imagem em humanos evidenciou que os núcleos da base têm papel crucial no processamento da mudança do foco de atenção para informações mais importantes, por modular a atividade de conexões a partir de regiões corticais, como o CPF (VAN SCHOUWENBURG, DEN OUDEN, COOLS, 2015), esses estudos reforçam o entendimento que a manifestação do comportamento de morder/lamber a pata está vinculada a componentes atencionais da dor induzida por formalina (**Fig. 32 A**).

Nossos dados mostraram que ao empregarmos o paradigma de analgesia provocada pelo condicionamento contextual aversivo, os animais tratados com glicina (intra-SCPd) no dia do teste, que foram re-expostos ao contexto no qual haviam recebido um dia antes uma leve estimulação elétrica nas patas, reduziram o tempo de expressão apenas do comportamento de morder/lamber, enquanto o tempo de manifestação do levantar a pata não foi alterado.

Ora, se o comportamento de levantar a pata após estímulo nocivo químico (formalina) pode ser considerado predominantemente um reflexo espinal (DONAHUE *et al.*, 2001; PORRO *et al.*, 2003), ou seja, pode ser acionado pela nocicepção, porém pouco influenciado por aspectos atencionais e emocionais da dor e se o comportamento de morder/lamber é principalmente a representação de mecanismos supraespinais (como os núcleos da base e o CCA) que podem envolver o valor emocional negativo do estímulo nocivo, e portanto, podem depender de um

componente emocional e/ou atencional para ser expresso (DONAHUE *et al.*, 2001; POTES *et al.*, 2016), nossos resultados sugerem que a SCPd pode exercer um papel de comutador na nocicepção, aumentando ou diminuindo o tempo de manifestação da atividade comportamental focalizada à dor, o morder/lamber a pata (ALMEIDA *et al.*, 1999; POTES *et al.*, 2006; POTES *et al.*, 2016), dependendo da importância emocional e/ou atencional que foi atribuída ao contexto no qual a dor ocorre.

Nossos dados mostraram que a sensibilização da SCPd com glicina em um contexto aversivo impediu o aumento do tempo gasto na expressão do comportamento de morder/lamber que ocorreria em um contexto neutro, sugerindo que a microinjeção de glicina na SCPd aumentou o valor aversivo de pistas ambientais, o que influenciou a percepção da dor. Considerando que a dor não é apenas uma consequência perceptual, mas também tem o propósito de motivar decisões, conduzindo a ações e/ou levando à mudança de comportamento (EIPPERT, TRACEY, 2014), o não acréscimo do tempo de expressão do comportamento de morder/lamber a pata no contexto aversivo, apesar da sensibilização da SCPd com glicina, pode refletir uma alteração de aspectos afetivos-motivacionais do processamento nociceptivo. Estudos indicam que alterações neste comportamento conjecturam o componente afetivo-motivacional da dor (DONAHUE *et al.*, 2001; LaBUDA, FUCHS, 2000; YI *et al.*, 2011), o que mais se aproximaria da condição real de dor como percepção subjetiva, levando a uma mudança de estratégia comportamental frente à nova ameaça representada pelo ambiente aversivo e a SCPd comutou de hiperalgesia para algisia.

Pesquisas em animais indicam que a manipulação de estruturas do sistema límbico altera o processamento nociceptivo através da modulação seletiva de componentes afetivo-motivacionais da dor. Dentre as estruturas cerebrais estudadas, destaca-se o CCA. Um estudo que utilizou lesão eletrotóxica bilateral do CCA de ratos mostrou redução no tempo despendido na expressão do comportamento de morder/lamber a pata injetada com formalina (DONAHUE *et al.*, 2001).

Sugere-se que a consequência primária de lesões do CCA é interromper o processamento da informação relacionada ao valor emocional negativo do estímulo nocivo, representado pelo comportamento de morder/lamber, ao invés da intensidade do estímulo, correspondente ao comportamento de levantar a pata injetada com formalina (DONAHUE *et al.*, 2001). Corroborando esses resultados, estudos que utilizaram paradigmas de condicionamento (preferência de lugar e esquivas) com o propósito de mensurar a natureza aversiva do

processamento nociceptivo induzido pelo estímulo nocivo em ratos (LaBUDA, FUCHS, 2000; JOHANSEN *et al.*, 2001), indicaram que lesões no CCA seletivamente interromperam a qualidade (cognição/emoção) e não a intensidade (sensorial) do estímulo (LaGRAIZE *et al.*, 2000).

Esses dados são condizentes com a função do CCA no processamento do componente afetivo-motivacional da dor, sendo parte de um sistema responsável por engajar comportamentos dirigidos à metas (VOGT, SIKES, 2009; SHACKMAN *et al.*, 2011; MISRA, COOMBES, 2014), como poderia ser engajado o morder/lamber a pata injetada com formalina, um comportamento focado à dor, que é considerado por alguns autores (DONAHUE *et al.*, 2001; POTES *et al.*, 2016), uma manifestação do processamento emocional da dor. Considerando que a atenção pode ser considerada um componente da emoção (OHMAN, FLYKT, ESTEVES, 2001), essas informações reforçam o nosso entendimento de que o morder-lamber pode ser considerado uma representação mais fiel de aspectos atencionais da dor em relação ao levantar a pata injetada com formalina. De fato, na maioria dos resultados deste trabalho, foi o comportamento que teve alterações no seu tempo de manifestação.

A SCP é influenciada por áreas corticais ativadas pela apresentação de pistas contextuais preditivas de dor (como o CCA), por exemplo, pistas que remetem choques elétricos no dia do condicionamento. Existem projeções diretas do CCA para a SCP ou esta região cortical pode alcançá-la através de projeções que faz com o hipotálamo e com a BLA (VOGT *et al.*, 1993; KNISHIO, HABER, 1994).

Mas a SCP não é somente um sítio para o controle cortical e subcortical da dor, também pode influenciar esses centros superiores. A SCP projeta-se rostralmente para o tálamo medial, circuito hipotalâmico defensivo, COF e CCA, fornecendo um possível substrato para o controle ascendente da nocicepção (COFFIELD, BOWEN, MILETIC, 1992; CAMERON *et al.*, 1995) e de comportamentos defensivos (SEMENENKO, LUMB, 1992; KINCHESKI *et al.*, 2012).

Regiões como COF e o CCA participam do aspecto atencional da modulação da dor e pesquisas sustentam o envolvimento da SCP nesta modulação (PETROVIC *et al.*, 2000; TRACEY *et al.*, 2002; VALET *et al.*, 2004). Estudos em animais evidenciaram efeitos cognitivos de ligantes do sítio GLY-B do receptor NMDA da SCPd, dentre eles, a glicina (SANTOS *et al.*, 2006; CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001 para revisão) e em humanos, a administração de bioglicina, um análogo biologicamente ativo da glicina, melhora a atenção (FILE,

FLUCK, FERNANDES, 1999). Considerando essas informações e que a função psicológica da atenção é motivar um comportamento (LINTON, SHAW, 2011), sugerimos que a sensibilização da coluna dorsal da SCP com glicina pode ter levado essa estrutura cerebral a desempenhar um papel na modulação atencional da dor (através de centros superiores), motivando um comportamento nocifensivo conforme o valor emocional do ambiente onde a nocicepção estava ocorrendo.

A atenção pode ser considerada um elemento crucial do estado emocional, que pode modular respostas comportamentais ao estímulo nocivo (LINTON, SHAW, 2011). Na verdade, o estado emocional pode influenciar a direção da atenção (OHMAN, FLYKT, ESTEVES, 2001), tanto a atenção para a dor (KEOGH *et al.*, 2000; BUSHNELL *et al.*, 1985) quanto a distração dela (VALET *et al.*, 2004; PETROVIC *et al.*, 2000; TRACEY *et al.*, 2002). A distração da dor pode reduzir comportamentos relacionados à nocicepção (FORD *et al.*, 2008), incluindo quando a distração não está dissociada de um componente emocional aversivo (OLANGO *et al.*, 2012; BUTLER *et al.*, 2011; REA *et al.*, 2013), como na abordagem deste trabalho, ao utilizarmos o paradigma de analgesia induzida pelo condicionamento contextual aversivo.

Em uma perspectiva comportamental, a dor e o medo são estados motivacionais competitivos (FANSELOW, 1986) e de acordo com o modelo de motivação-decisão da dor, proposto por Fields, a premissa básica para o processo de decisão é que tudo o que é potencialmente mais importante para a sobrevivência do animal do que a dor deveria exercer efeito antinociceptivo (FIELDS, 2007). Considerando que a representação neural do choque foi adquirida no dia do condicionamento, é plausível que tenha ocorrido concorrência entre a expectativa do choque e a presença da dor induzida por formalina no dia do teste. Assim o animal ignorou, em parte, a dor (induzida por formalina) e atendeu ao evento mais urgente no momento, desviando o foco de atenção para o ambiente aversivo (Fig. 32 C).

O circuito neuronal referente ao modelo de motivação-decisão envolve neurônios do CPF, hipotálamo e amígdala que controlam vias aferentes nociceptivas da medula espinal (FIELDS, 2007; TRACEY, MANTYH, 2007). Interações entre áreas corticais e a amígdala fornecem uma modulação afetiva-emocional de funções cognitivas (como a atenção) sobre a dor, tais como tomada de decisão entre avaliação de risco/ recompensa *versus* dor (NEUGEBAUER *et al.*, 2009) e essa influência é mediada através das conexões da amígdala com a SCP (FOO,

HELMSTETTER, 1999; McGARAUGHTY, HEINRICHER, 2002; McGARAUGHTY, FARR, HEINRICHER, 2004).

Ponderando que a modulação da dor implica a seleção de uma ação ou tomada de decisão (FIELDS, 2007), uma das principais funções da SCPd poderia residir em influenciar na comutação de decisões comportamentais para responder ou não a um estímulo nocivo frente a desafios, sejam estes provenientes do meio ambiente interno (dor induzida por formalina) ou do meio ambiente externo (contexto aversivo). A comutação para hiper ou hiponocicepção pela SCPd pode estar vinculada às condições ambientais específicas, biologicamente relevantes, onde a resposta comportamental ao estímulo nocivo pode entrar em conflito com outras atividades que mudam atenção para longe da dor.

Assim, a sensibilização da SCPd com glicina e a posterior re-exposição do animal ao contexto aversivo pode ter gerado um estado emocional que teria recrutado processos de atenção de ordem superior do cérebro envolvidos em uma tarefa focada no contexto ambiental, possivelmente concomitante com a ativação de mecanismos defensivos. Considerando que a sensibilização da SCPd com glicina pode aumentar a valência aversiva de uma potencial fonte de ameaça (CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001, para revisão), o valor emocional negativo do ambiente foi aumentado, requerendo atenção em um patamar concorrente com a dor, não havendo aumento na nocicepção (**Fig. 32 D**), que outrora havia sido eliciado pela glicina intra-SCPd no contexto neutro.

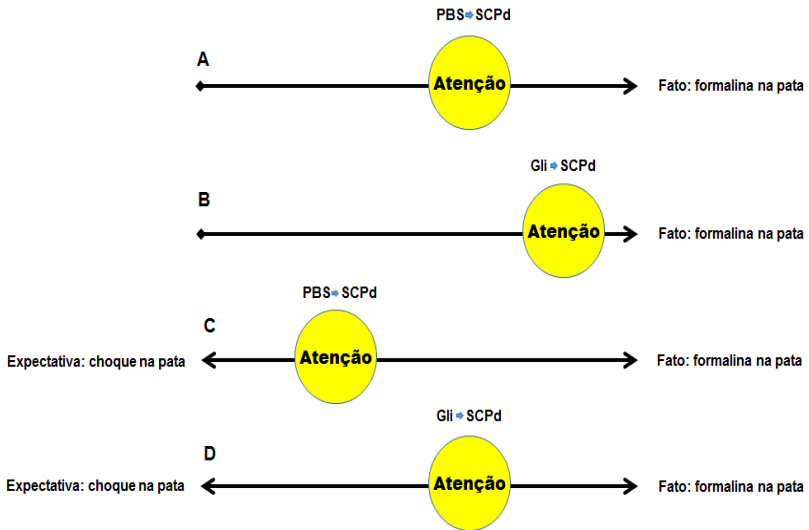


Figura 32. Esquema da comutação entre hiperalgesia e algesia eliciada pela sensibilização da SCPd por glicina nos contextos neutro (A, B) e aversivo (C, D). Em **A**: No contexto neutro, o estímulo ameaçador é a formalina, o foco de atenção é dirigido para este. Em **B**: glicina intra-SCPd aumenta a valência aversiva da fonte de ameaça no contexto neutro, a pata injetada com formalina, influenciando o aumento da atenção para a dor. Em **C**: quando a SCPd não está sensibilizada com glicina, a expectativa do choque compete com a dor, com favorecimento da expectativa do estímulo aversivo, o foco de atenção é desviado para o contexto (aversivo) e ocorre hipoalgesia. Em **D**: no contexto aversivo, a sensibilização da SCPd com glicina conduz a um estado de competição entre o medo do choque e a dor (fato), a nocicepção volta a um patamar semelhante ao do grupo controle (**A**), não havendo a hipernocicepção que havia sido causada por glicina em um contexto neutro. (**C**) e (**D**) podem ser aplicados também aos efeitos da ausência ou presença de glicina exógena na SCPd sobre o congelamento induzido contextualmente (Fonte: Autoria própria).

Tendo em mente que a SCP funciona como uma área de integração atencional/emocional e de modulação da dor, a abordagem utilizada nesta etapa do trabalho e os resultados decorrentes dela ajudam a sustentar a hipótese de que a SCPd seria uma candidata natural à estrutura comutadora entre facilitação e inibição da dor dependente da valência emocional/atencional que é atribuída ao contexto onde ocorre a nocicepção.

5.2 O SISTEMA NORADRENÉRGICO DESCENDENTE MEDEIA OS EFEITOS NOCICEPTIVOS DA MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SCPd NO CONTEXTO NEUTRO

Com o propósito de investigar se fibras descendentes noradrenérgicas e seus receptores espinais α_1 e α_2 estariam mediando os efeitos nociceptivos decorrentes da sensibilização da SCPd com glicina, empreendemos em nossos experimentos, o tratamento por via intratecal com a neurotoxina 6-OHDA e com os antagonistas dos receptores espinais α_1 e α_2 -adrenérgicos, prazosina e ioimbina, respectivamente, previamente ao tratamento da SCPd com glicina.

Aplicamos esse ferramental farmacológico igualmente à medula espinal de ambos os grupos, não-condicionado e condicionado, ao considerar que fatores cognitivos, como a atenção, podem ser preditores da percepção da dor (KLENERMAN *et al.*, 1995) e que existem evidências de que a modulação atencional da dor envolve vias descendentes (HEINRICHER, FIELDS, 2013). Assim, diferentes contextos, apesar de ativarem regiões corticais e subcorticais envolvidas no processamento atencional e emocional da dor, também podem modular a transmissão no corno dorsal da medula espinal, agindo em estágios muito iniciais da nocicepção (BUSHNELL *et al.*, 1985; MATRE, CASEY, KNARDAHL, 2006; EIPPERT *et al.*, 2009 a, b; SPRENGER, *et al.*, 2012; GEUTER, BÜCHEL, 2013).

Em um contexto neutro, tem sido difundido que as projeções noradrenérgicas descendentes podem exercer um controle bidirecional da nocicepção espinal (HOLDEN, SCHWARTZ, PROUDFIT, 1999; NUSEIR, PROUDFIT, 2000), com a inibição da nocicepção mediada por receptores α_2 -adrenérgicos (OMOTE *et al.*, 1998; BABA, SHIMOJI, YOSHIMURA, 2000; BABA *et al.*, 2000, SONOHATA *et al.*, 2004), e efeito pró-nociceptivo dirigido por receptores α_1 -adrenérgicos espinais (BRODIE, PROUDFIT, 1986; FANG, PROUDFIT, 1998; HOLDEN, SCHWARTZ, PROUDFIT, 1999; MATOS *et al.*, 2016).

Dados sobre a ação modulatória de vias descendentes espinais na analgesia induzida pelo condicionamento contextual aversivo são escassos. Estudos indicam a participação de receptores canabinoides do corno dorsal nesta expressão comportamental (SUPLITA *et al.*, 2006; OLANGO *et al.*, 2014).

Deste modo, investigamos a potencial mobilização do sistema noradrenérgico descendente da dor (ativação de fibras noradrenérgicas que se projetam à medula espinal e mediação de receptores α_1 e α_2 -

adrenérgicos espinais) na ação da SCPd em aumentar e/ou reduzir a nocicepção em dois contextos distintos (neuro e aversivo).

De forma semelhante à empregada na descrição dos resultados, a discussão a partir desse ponto será desenvolvida conforme a divisão dos dados referentes ao teste de formalina adotada neste trabalho, iniciando com o período correspondente dos 10 aos 35 min após a injeção na pata deste agente nocivo (Fase II A) e por fim, com a Fase II B do teste nociceptivo (dos 35,1 aos 60 minutos).

5.2.1 Fase II A

O quadro 1 resume os principais achados desse trabalho no contexto neutro durante a fase II A do teste de formalina.

Quadro 1 - Resumo dos principais efeitos nocifensivos no contexto neutro dos tratamentos intratecal e intra-SCPd durante a Fase II A do teste de formalina.

Tratamento	Efeito
6-OHDA (i.t.)	-
6-OHDA (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	Reverteu o efeito hipernociceptivo da glicina
Ioimbina (i.t.)	-
Ioimbina (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	↑ nocicepção
Prazosina (i.t.)	↓ nocicepção
Prazosina (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	Suprimiu o efeito hipernociceptivo da glicina

Tratamento: 6-OHDA = 6-hidroxidopamina, i.t. = Intratecal, SCPd = Substância cinzenta periaquedutal dorsal.

Efeito: (-) = sem efeito, ↑ = aumento, ↓ = diminuição.

5.2.1.1 No contexto neutro, vias noradrenérgicas descendentes são ativadas pela SCPd quando esta for sensibilizada por glicina

Neste trabalho, a ênfase a respeito da degeneração catecolaminérgica descendente foi dada as fibras noradrenérgicas, apesar de haver conhecimento de que a toxina utilizada (6-OHDA) pôde ocasionar a depleção de outras fibras catecolaminérgicas descendentes que não as noradrenérgicas, como as dopaminérgicas. Tratos descendentes dopaminérgicos se originam nos grupos celulares A9 e A11 localizados no hipotálamo e se dirigem à medula espinal (DAHLSTROM, FUXE, 1964) e há evidências do envolvimento da dopamina na transmissão nociceptiva espinal (YANG *et al.*, 2005; TANIGUCHI *et al.* 2011; KIM *et al.*, 2015)

Em contrapartida, estudos mostraram que a injeção intratecal de 6-OHDA depletou seletivamente noradrenalina na medula espinal sem afetar os níveis de dopamina ou serotonina (FASMER *et al.*, 1986; FERIA *et al.*, 1992; POST *et al.*, 1987; TJØLSEN, BERGE, HOLE, 1991; HUNG *et al.*, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2003). Considerando que a maioria das fibras catecolaminérgicas na medula espinal são noradrenérgicas (HEINRICHER, FIELDS, 2013), sendo que as fibras dopaminérgicas correspondem apenas a 10% dessa inervação (SKAGEBERG *et al.*, 1982), a interferência da neurotransmissão dopaminérgica no funcionamento do corno dorsal pode ser tão pequena, que a degeneração dopaminérgica por 6-OHDA não produziria efeitos robustos, por isso enfatizamos a participação do sistema noradrenérgico na interpretação dos nossos resultados.

Nossos dados mostraram que a degeneração química das fibras catecolaminérgicas (especialmente noradrenérgicas) da medula espinal pela neurotoxina 6-OHDA administrada por via intratecal não teve efeito sobre o tempo de manifestação do comportamento nocifensivo de morder/lamber a pata injetada com formalina, nos animais não-condicionados que receberam microinjeção cerebral (SCPd) de PBS.

Esse resultado é sustentado por vários estudos que indicam que o sistema noradrenérgico descendente parece não estar tonicamente ativo em condições normais (WEST *et al.*, 1993; MARTIN *et al.*, 1999; TAYLOR, RODERICK, BASBAUM, 2000; JASMIN *et al.*, 2003; HAYASHIDA *et al.*, 2012), ou seja, em estados de dor não patológica (TAYLOR, WESTLUND, 2016), não ficando claro se o tônus noradrenérgico tem influência significativa sobre a resposta nociceptiva aguda e tônica (HEINRICHER, FIELDS, 2013; PERTOVAARA, 2013).

De fato, nossos dados indicaram que somente nos grupos que tiveram a SCPd sensibilizada com glicina houve ativação do sistema noradrenérgico descendente, revelando-se um mediador da hipernocicepção induzida pela glicina intra-SCP.

Diversos grupos relataram que a depleção de norepinefrina na medula espinal (pela administração de neurotoxinas que degeneram fibras noradrenérgicas) e o bloqueio farmacológico de receptores noradrenérgicos espinais α_1 e α_2 têm pouco ou nenhum efeito sobre testes de dor aguda e tônica (MARTIN *et al.*, 1999; NUSEIR, PROUDFIT, 2000; JASMIN, BOUDAH, OHARA, 2003). Em contraste, Howorth e colaboradores (2009) relataram hiperalgesia térmica quando uma abordagem baseada em vetor viral foi utilizada para reduzir a excitabilidade de neurônios noradrenérgicos pontinoespinais em animais normais (HOWORTH *et al.*, 2009).

Resultados discrepantes em relação a este componente da modulação descendente se aplicam também ao teste de formalina, com nenhum efeito (SAWYNOK, REID, DOAK, 1995) e respostas reduzidas em animais submetidos à degeneração de fibras noradrenérgicas descendentes por 6-OHDA (FASMER *et al.*, 1986; TJØLSEN, BERGE, HOLE, 1991) ou respostas aumentadas pela depleção de norepinefrina com o uso da imunotoxina dopamina β -hidroxilase (DBH)-saporina (MARTIN *et al.*, 1999) e supressão da excitabilidade neuronal noradrenérgica (HOWORTH *et al.*, 2009).

Um importante fator que poderia gerar resultados contraditórios em relação ao sistema noradrenérgico descendente é que esses estudos, em sua maioria, foram realizados em roedores, portanto, é crucial levar em consideração as características particulares de diferentes espécies e de certas cepas de ratos (CLARK, YEOMANS, PROUDFIT, 1991; SLUKA, WESTLUND, 1992; BRUINSTROOP *et al.*, 2012). Por exemplo, existem diferenças em relação à inervação espinal que provém do LC e do grupo de células noradrenérgicas A7 entre cepas de ratos Sprague-Dawley (SLUKA, WESTLUND, 1992) e entre estas e ratos Wistar (HOWORTH *et al.*, 2009).

Enquanto que em animais Sprague-Dawley Sasco, a maioria da inervação noradrenérgica proveniente do LC termina no corno ventral da medula espinal (CLARK, YEOMANS, PROUDFIT, 1991; SLUKA, WESTLUND, 1992), em ratos Harlan, a maioria inerva o corno dorsal (FRITSCHY *et al.*, 1987; FRITSCHY, GRZANNA, 1990; GRZANNA, FRITSCHY, 1991). Em relação às fibras noradrenérgicas que se originam do grupo celular da área A7, a maioria termina no corno dorsal

dos animais Sasco, enquanto que, nos ratos Harlan, no corno ventral (BRUINSTROOP *et al.*, 2012).

Em ratos Wistar, utilizados em nossos experimentos, a literatura indica que as projeções noradrenérgicas originam-se de todos os três grupos de neurônios noradrenérgicos pontinos que se dirigem à medula espinal (A5, LC e A7) e em sua maioria, as fibras terminam no corno dorsal superficial (HOWORTH *et al.*, 2009), apesar de um moderado número de terminais axônicos de fibras noradrenérgicas serem encontrados também no corno ventral e nas camadas mais profundas do corno dorsal (LLORCA-TORRALBA *et al.*, 2016).

Diferentes modelos animais de nocicepção utilizados nos estudos sobre o sistema noradrenérgico descentente também devem ser ponderados com cautela na interpretação dos dados, já que podem exercer diferentes efeitos aversivos (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). Por exemplo, testes de nocicepção considerados escapáveis tais como retirada de cauda (*tail flick*) induzida por estímulo térmico nocivo podem ter baixo potencial para produzir ansiedade em relação ao estímulo, uma vez que o animal pode ter controle sobre a intensidade da nocicepção a qual ele é submetido. Por outro lado, testes nociceptivos tônicos ou persistentes e/ou não escapáveis (formalina, por exemplo) podem ser proporcionalmente mais aversivos para os animais.

As circunstâncias (por exemplo, a aversividade do contexto ambiental) que influenciam o SNC em decidir por facilitar ou inibir a nocicepção também pode ser de grande valia na explanação dos dados dos estudos mencionados e dos nossos resultados. De fato, diferente do que foi verificado no contexto neutro, o sistema noradrenérgico descentente mostrou-se ativo no contexto aversivo, sem requerer sensibilização da SCPd com glicina, como discutido na próxima sessão.

No presente estudo, animais que receberam PBS intra-SCPd e 6-OHDA por via intratecal exibiram padrão comportamental nocifensivo semelhante aos tratados com veículo por via intratecal (e com PBS na SCPd). Apesar de pesquisas indicarem níveis similares de comportamentos nocifensivos induzidos por formalina entre grupos tratados com essa neurotoxina e o grupo controle (SAWYNOK, REID, DOAK, 1995; GUTIERREZ, *et al.*, 2003), a análise comportamental nesses estudos ocorreu em uma fase tardia (7 a 14 dias) após o tratamento com 6-OHDA. Segundo Lei e colaboradores (2011), essa toxina tem seu desempenho máximo aos 4 dias de tratamento (LEI *et al.*, 2011), faixa de tempo seguida no atual trabalho para análise comportamental.

A falta de alteração no tempo despendido em morder/lamber no grupo de animais que teve degeneração de fibras noradrenérgicas por 6-

OHDA (e que recebeu PBS intra-SCPd) poderia estar relacionada ao característico efeito bidirecional da noradrenalina sobre a transmissão nociceptiva espinal (HEDO, LOPEZ-GARCIA, 2001). Assim a desnervação noradrenérgica poderia ter conduzido a um efeito nulo sobre o tempo de manifestação comportamental, possivelmente porque tanto a facilitação nociceptiva mediada por receptores α_1 e a inibição, por receptores α_2 -adrenérgicos (PERTOVAARA, 2013 para revisão) estariam igualmente comprometidas. Porém, essa situação não deve se aplicar aos nossos resultados, pois a nocicepção induzida por formalina foi reduzida quando aplicamos por via intratecal prazosina (antagonista seletivo para receptores α_1 -adrenérgicos) e não foi alterada com a administração de ioimbina (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) pela mesma via. Assim, o componente noradrenérgico modula a nocicepção induzida por formalina e revela-se predominantemente facilitatório após manipulação dos receptores α -adrenérgicos espinais com antagonistas.

Então devemos considerar duas possibilidades na interpretação desses dados. Primeira, pode não ter ocorrido a degeneração de todas as fibras noradrenérgicas com terminações na medula espinal, como se esperava. Utilizamos em nossos experimentos a neurotoxina 6-OHDA por via intratecal. Alguns pesquisadores sugerem que esta toxina é específica para axônios neuroadrenérgicos cujos soma estão localizados no LC (LLORCA-TORRALBA, 2016). McBride e colaboradores (1985) descobriram que a 6-OHDA destrói axônios noradrenérgicos espinais do LC, mas não axônios do grupo de células noradrenérgicas da área tegmental lateral (MCBRIDE *et al.*, 1985).

Assim, influências noradrenérgicas provenientes de outras áreas, como as do grupo celular A7 poderiam estar atuantes no corno dorsal, mascarando os efeitos globais deste sistema sobre a nocicepção induzida por formalina. De fato, o resultado proveniente do uso de 6-OHDA (nenhum efeito significativo) e da administração de antagonistas por via intratecal (efeito inibidor da prazosina, indicando efeito facilitador do receptor α_1 -adrenérgico) foram diferentes.

Segunda, o antagonismo de receptores α_2 -adrenérgicos (por ioimbina) não alterou os comportamentos nocifensivos induzidos por formalina, o que nos leva a supor que poderia ter ocorrido o envolvimento de outro sistema monoaminérgico descendente mediando inibição do teste de formalina, como o sistema serotoninérgico. A ativação de receptores serotoninérgicos espinais, como 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} e 5-HT₇ desencadeiam mecanismos que inibem a nocicepção (DROGUL,

OSSIPOV, PORRECA, 2009; RAHMAN, *et al.*, 2009; SUZUKI, DICKENSON, 2004).

A potencial antinocicepção pelo sistema serotoninérgico (pelo neurotransmissor serotonina) poderia ter sido contrabalanceada pela influência facilitatória exercida por fibras noradrenérgicas descendentes provenientes de outras regiões que não o LC e mediada por receptores α_1 no corno dorsal. O resultado do balanço entre suposta antinocicepção pelo sistema serotoninérgico e pró-nocicepção mediada por receptores α_1 seria nulo. A participação de receptores serotoninérgicos espinais trata-se de uma suposição teórica não observável a partir dos dados apresentados. Experimentos adicionais precisariam ser realizados para testar esta hipótese.

No entanto, ao sensibilizarmos a SCPd com glicina (antes da aplicação do estímulo nocivo, formalina), o animal vai para a caixa de observação mais atento à pata, e mantém-se focado nela (pois estamos falando de contexto neutro), ocorrendo hipernocicepção. Possivelmente a sensibilização da SCPd sobrepujou os potenciais efeitos da ativação do componente inibitório do sistema serotoninérgico, resultando em hipernocicepção. O efeito pró-nociceptivo mediado pelo sistema noradrenérgico apareceu somente quando animais tiveram a SCPd sensibilizada com glicina (a 6-OHDA diminuiu o tempo de morder/lamber). Assim, nossos resultados sugerem que o balanço final das funções modulatórias do sistema noradrenérgico descendente sobre a nocicepção induzida por formalina, parece ser destacado apenas quando seu tônus à medula espinal for melhorado, tendo a SCPd participação nesse processo.

Por outro lado, a injeção intratecal de 6-OHDA no grupo que recebeu glicina não somente diminuiu o tempo da expressão do comportamento nocifensivo em relação ao grupo contraparte (que recebeu injeção intratecal de veículo e microinjeção de glicina na SCPd), mas também conduziu o comportamento a um patamar semelhante ao do grupo controle não-condicionado (tratado com veículo e PBS). Indicando que a ação hipernociceptiva da glicina na coluna dorsal da SCP depende da existência de um sistema noradrenérgico descendente funcional e este aminoácido, é um dos ativadores deste sistema por sensibilizar a SCPd à nocicepção. A SCP e o corno dorsal da medula espinal não contêm neurônios noradrenérgicos (DAHLSTRÖM, FUXE, 1964; HÖKFELT JOHANSSON, GOLDSTEINM, 1984), assim, neurônios da SCPd devem direta ou indiretamente ativar neurônios noradrenérgicos cujas projeções terminam na medula espinal. De fato, a SCPd tem amplas projeções aos núcleos pontinos noradrenérgicos que possuem projeção espinal, como o

LC (A6) e o grupo de células noradrenérgicas A7 (WESTLUND, COULTER, 1980; WESTLUND *et al.*, 1981, 1982, 1983; CAMERON *et al.*, 1995).

Ao implementarmos a discriminação farmacológica de receptores α -adrenérgicos envolvidos na hipernocicepção ocasionada pela microinjeção de glicina na SCPd, constatamos que o grupo não-condicionado que recebeu ioimbina (um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) por via intratecal previamente à microinjeção de glicina intra-SCPd, não teve alteração no tempo gasto na expressão de morder/lamber em relação ao seu grupo contraparte (pré-tratado com veículo por via intratecal e tratado com glicina por via intracerebral) indicando que o aumento na nocicepção eliciado pela glicina não requer mediação de receptores α_2 -adrenérgicos espinais.

A administração intratecal de ioimbina *per se* não ocasionou alteração com efeito significativo sobre o tempo gasto em morder/lamber comparando-se ao grupo controle (que recebeu veículo por via intratecal e PBS por via intracerebral), esses dados são corroborados pelos resultados de Ouyang e colaboradores, que encontraram que ioimbina sozinha, por via intratecal, não apresentou qualquer alteração na nocicepção induzida por formalina (OUYANG *et al.*, 2015).

Supõe-se que o fluxo noradrenérgico descendente é baixo ou ausente em condições de dor não patológica (HEIRICHER, FIELDS, 2013), pelo menos o fluxo de um dos componentes desse sistema, como observamos. Existem fundamentos de que os níveis de noradrenalina liberada na medula espinal pelo LC (uma das principais fontes de noradrenalina para o corno dorsal) em condições normais de dor são insuficientes para modular as respostas basais (MUTO, *et al.*, 2012). Especificamente, a participação dos receptores α_2 -adrenérgicos nessas condições foi investigada por um estudo que utilizou knockout de genes dos subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos. Nenhum subtipo influenciou o comportamento relacionado à nocicepção induzido por estímulo periférico em animais sem dor sustentada (MALMBERG *et al.*, 2001).

A ioimbina é frequentemente utilizada para induzir melhora na atividade noradrenérgica, já que esta impede a ação inibitória dos receptores α_2 pré-sinápticos, levando ao aumento da liberação de noradrenalina em diversas regiões do SNC (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988; CRESPI, 2009). A ioimbina pode assim ser considerada um agente simpatomimético indireto, uma vez que aumenta a quantidade de noradrenalina disponível no corno dorsal, sua ação assim, se aproxima das condições fisiológicas existentes.

Estudos mostraram que a ioimbina, além de agir sobre os receptores α_2 -adrenérgicos (pré e pós-sinápticos), pode atuar também em receptores de outras vias de transmissão monoaminérgica, como receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A} (MILLAN, 2000; HOLMES, QUIRK, 2010), que são pós-sinápticos e inibem a excitabilidade de neurônios do trato espinotalâmico e de interneurônios excitatórios (PERTOVAARA, 2006). Em receptores 5-HT_{1A} de roedores e humanos, este alcalóide exibe atividade de agonista parcial (KAWAI *et al.*, 1994; LLADÓ, ESTEBAN, GARCÍA-SEVILLA, 1996; NEWMAN-TANCREDI *et al.*, 1998; OWEN, WHITTON, 2003).

Assim, supomos que na dose utilizada neste trabalho, a ação antagonística da ioimbina sobre receptores α_2 -adrenérgicos pós-sinápticos (ação que resulta em aumento da nocicepção) seria contrabalanceada por seu efeito agonístico sobre receptores 5-HT_{1A}, (causando diminuição da nocicepção), o que poderia justificar a falta de efeito da ioimbina sobre a nocicepção induzida por formalina.

Por outro lado, nossos dados mostraram que a prazosina *per se* teve efeito evidente na nocicepção induzida por formalina. A injeção intratecal deste antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos no grupo não-condicionado que recebeu PBS intra-SCP ocasionou redução do tempo de morder/lamber a pata em relação ao grupo controle (tratado com veículo por via intratecal e PBS por via intracerebral), indicando que receptores α_1 -adrenérgicos são participantes da mediação da facilitação descendente que controla e mantém a fase II A do teste de formalina (AMBRIZ-TUTUTI *et al.*, 2011; GREEN, SCARTH, DICKENSON, 2000; WIERTELAK *et al.*, 1994). Esse resultado também é respaldado pelo que foi enfatizado por Vanegas e Shaible em relação ao teste de formalina, de que a resposta nocifensiva à injeção deste agente nocivo é predominantemente facilitada (em vez de inibida) na ausência de estresse psicológico (VANEGAS, SCHAIBLE, 2004), como em um contexto não aversivo (neutro).

Um dos principais achados do nosso trabalho foi a reversão do efeito hipernociceptivo (eliciado pela microinjeção de glicina na SCPd) pelo pré-tratamento com prazosina por via intratecal. A prazosina não apenas reduziu o tempo de manifestação comportamental nocifensiva em relação ao grupo contraparte tratado com veículo intratecalmente (NC-veículo-glicina), mas também diminuiu o tempo de morder/lamber a níveis abaixo dos expressos pelo grupo controle, tratado com veículo e PBS (NC-veículo-PBS).

Assim, no contexto neutro, projeções noradrenérgicas para a medula espinal são ativadas pela SCPd (sob sensibilização com glicina) e facilitam a nocicepção pela mediação de receptores espinais α_1 -adrenérgicos. Algumas evidências de outros estudos e do presente, sustentam nossos achados. Primeira, a estimulação elétrica da SCP leva à liberação de noradrenalina na medula espinal (FENG, MCADOO, WILLIS, 1998), considerando que a SCPd se projeta apenas minimamente para a medula espinal (DAMPNEY *et al.*, 2013), os efeitos noradrenérgicos da estimulação da SCPd devem-se às suas conexões diretas ou indiretas aos núcleos de células noradrenérgicas da Ponte. De fato, a SCPd tem projeções, através do hipotálamo e do NMR, para o grupo celular A7 e diretamente para o LC (região suprida grandemente pela porção dorsolateral da SCP) (CAMERON *et al.*, 1995), principais fontes de noradrenalina para a medula espinal (HEINRIQUER, FIELDS, 2013).

Segunda, terminações nervosas dopaminérgicas são mínimas na medula espinal (SKAGEBERG *et al.*, 1982), assim, é plausível que a ação degenerativa da 6-OHDA atinga principalmente terminações noradrenérgicas no corno dorsal (MAEDA *et al.*, 2009; LLORCA-TORRALBA, *et al.*, 2016). Além disso, essa neurotoxina tem seletividade para fibras noradrenérgicas do LC (McBRIDE *et al.*, 1985), principal local onde terminam projeções da coluna dorsolateral da SCP no tronco encefálico, como já mencionado.

A terceira evidência é sustentada pela discriminação farmacológica de receptores α -adrenérgicos espinais no nosso trabalho. A hipernocicepção induzida pela microinjeção de glicina intra-SCPd não foi bloqueada pelo pré-tratamento com ioimbina, mas foi suprimida pela injeção intratecal de prazosina, um antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos.

Vários estudos apontam os receptores α_1 -adrenérgicos do corno dorsal como mediadores pró-nociceptivos (HOLDEN, SCHWARTZ, PROUDFIT, 1999; FAN, PROUDFIT, 1998; HOLDEN, NALEWAY, 2001; JEONG *et al.*, 2012). As abordagens experimentais destes pesquisadores implicaram o grupo de células A7 de ratos Sprague-Dawley, linhagem Sasco, região que, nesta linhagem de ratos, as projeções terminam no corno dorsal da medula espinal (HOLDEN, SCHWARTZ, PROUDFIT, 1999; FAN, PROUDFIT, 1998), de forma semelhante às projeções espinais da região A7 de ratos da linhagem Wistar (HOWORTH *et al.*, 2009), animais utilizados no nosso trabalho.

O grupo de células A7, descrito por Dahlström e Fuxe em 1964, (DAHLSTRÖM, FUXE, 1964) fornece a maior inervação noradrenérgica

das lâminas I-IV no corno dorsal (CLARK, PROUDFIT, 1991), que é o principal campo para onde se dirigem os ramos centrais de nociceptores e onde muitos neurônios de segunda ordem do trato espinotalâmico estão localizados (LIGHT, PERL, 1979), os últimos recebem inervação direta de terminações axônicas de fibras noradrenérgicas descendentes (WESTLUND *et al.*, 1990).

Estudos morfológicos e farmacológicos *in vivo* sugerem que a área A7 é uma parte importante do sistema de modulação da dor e que muitos outros componentes deste sistema podem exercer seus efeitos nociceptivos controlando a excitabilidade dos neurônios noradrenérgicos desta área (YEOMANS *et al.*, 1992; HOLDEN *et al.*, 1999; NUSEIR, HEIDENREICH, PROUDFIT, 1999; NUSEIR, PROUDFIT, 2000; MIN *et al.*, 2008, 2009, 2010; BAJIC, COMMONS, 2010). Neurônios da região A7 recebem densa inervação diretamente do LC (WEI, PERTOVAARA, 2013), do NMR (BRODIE, PROUDFIT, 1986), de algumas regiões do hipotálamo (HOLDEN, NALEWAY, 2001; JEONG *et al.*, 2012) e da SCPv1 (BAJIC *et al.*, 2009), todas essas regiões tem conexões com neurônios da SCPd.

Um grupo de pesquisadores (HOLDEN, NALEWAY, 2001; JEONG *et al.*, 2012) evidenciou o papel bimodal dos neurônios noradrenérgicos do grupo A7 sobre a nocicepção, demonstrando o envolvimento de receptores α -adrenérgicos espinais nessa função, evidenciando as conexões desta área com o hipotálamo.

O hipotálamo lateral (HOLDEN, NALEWAY, 2001) e o hipotálamo posterior (JEONG *et al.*, 2012) modulam a nocicepção por meio de efeitos opostos, através de conexões com a região A7, a antinocicepção ocorre a partir de ações da noradrenalina em receptores α_2 -adrenérgicos, enquanto a hipernocicepção ocorre a partir de ações deste neurotransmissor em receptores α_1 no corno dorsal (HOLDEN, NALEWAY, 2001; JEONG *et al.*, 2012). Em estudo anterior, eles haviam sugerido que a modulação da nocicepção por essa área é influenciada por neurônios opioides. A microinjeção de baixas doses de morfina no grupo celular A7 resultou em efeito hipernociceptivo, que foi bloqueado por injeção intratecal de antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos (WB4101). No entanto, esse efeito pró-nociceptivo não foi reduzido pelo antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos ioimbina (HOLDEN, SCHWARTZ, PROUDFIT, 1999). Esses últimos dados referentes à mediação do efeito hipernociceptivo da área A7 por receptores α_1 -adrenérgicos espinais, são comparáveis aos resultados do nosso estudo (ação hipernociceptiva da microinjeção de glicina na SCPd,

bloqueada por antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos espinais e não reduzido pelo antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos ioimbina).

Na medula espinal, os terminais sinápticos da área A7 que contêm dopamina- β -hidroxilase parecem formar sinapses tanto com neurônios do trato espinotalâmico (WESTLUND *et al.*, 1990) quanto com neurônios do corno dorsal não identificados (HAGIHIRA *et al.*, 1990; DOYLE, MAXWELL, 1991 a ,b). Receptores α -adrenérgicos são receptores metabotrópicos, os do tipo α_1 estão acoplados à proteína Gq/11 e ativam a fosfolipase C (PLC) que conduz ao aumento intracelular da concentração de íons cálcio e ativação de proteína quinase C (PKC) (HAGUE *et al.*, 2003), levando à despolarização da membrana celular e aumentando respostas neuronais para a transmissão nociceptiva na medula espinal (BUDAI, HARASAWA, FIELDS, 1998).

Nossa sugestão é que a microinjeção de glicina na SCPd poderia ativar, possivelmente indiretamente, o núcleo pontino A7, que, por sua vez, tem projeções ao corno dorsal, liberando noradrenalina na medula espinal e excitando neurônios do trato espinotalâmico, através da ativação de receptores α_1 -adrenérgicos (**Fig. 33**).

Considerando que intervenções por via intratecal com neurotoxinas de fibras noradrenérgicas descendentes podem revelar a atividade bilateral do LC (LLORCA-TORRALBA *et al.*, 2016) e que a degeneração de fibras noradrenérgicas por 6-OHDA (que tem preferência por fibras do LC, como já mencionado), reduziu a hipernocicepção eliciada por glicina, podemos sugerir que a glicina na SCPd pode facilitar a nocicepção através da ativação de certos neurônios do LC (em adição às fibras do grupo celular A7 ativadas pela SCPd).

Um emergente corpo de pesquisa vem registrando efeitos pró-nociceptivos descendentes pela ativação do LC (BRIGHTWELL, TAYLOR, 2009; MARTIN *et al.*, 1999; MARTINS *et al.*, 2010b; LLORCA-TORRALBA *et al.*, 2016; TAYLOR, WESTLUND, 2016). Porém, a maioria desses neurônios facilitatórios do LC parece não ter projeção espinal (HICKEY *et al.*, 2014). Existem recentes explanações sobre o LC como um importante gerador de dor na transição da dor aguda para a dor crônica, bem como durante a manutenção da dor crônica (LLORCA-TORRALBA *et al.*, 2016; TAYLOR, WESTLUND, 2016 para revisões).

Um estudo que utilizou uma abordagem optogenética sugeriu que populações específicas de neurônios (ventral e dorsal) do LC são associadas aos efeitos anti e pró-nociceptivos. Os pesquisadores concluíram que o efeito antinociceptivo é oriundo de neurônios situados ventralmente nesse núcleo, isso implica que os efeitos pró-nociceptivos

se originariam de neurônios localizados mais dorsalmente (HICKEY *et al.*, 2014). De fato, neurônios da região ventral do LC são os que têm projeções para a medula espinal (WESTLUND *et al.*, 1983; BRUINSTROOP *et al.*, 2012),

Martins e colaboradores (2013) implicaram a ideia de que o LC exerce efeitos pró-nociceptivos no teste de formalina indiretamente, devido às suas projeções ao núcleo dorsal da rafe (NDR) (MARTINS, *et al.*, 2013). O NDR é um núcleo bulbar serotoninérgico considerado exercer um papel importante na facilitação da transmissão nociceptiva na medula espinal (ALMEIDA *et al.*, 2006; HEINRICHER *et al.*, 2009; LIMA, ALMEIDA, 2002) e a inervação noradrenérgica ao NDR contribui para essa função. Esse núcleo conecta-se reciprocamente com a medula espinal, através de uma suposta via direta e excitatória (LIMA, ALMEIDA, 2002). Os neurônios do LC compreendem uma das principais aferências ao NDR (MARTINS *et al.*, 2008).

Manipulações farmacológicas do NDR corroboram para sua importância na facilitação da dor. A diminuição dos níveis locais de noradrenalina no NDR (com entrega de antisense tirosina hidroxilase mediada por vetor viral) reduziram um estado de dor neuropática (MARTINS *et al.*, 2010b) e comportamentos nocifensivos no teste de formalina (MARTINS *et al.*, 2013), enquanto que o aumento dos níveis de noradrenalina (com nomifensina, inibidor da recaptação de noradrenalina) aumentou respostas comportamentais no teste de formalina (MARTINS *et al.*, 2013) e o estado de dor neuropática (MARTINS *et al.*, 2015). A microinjeção de prazosina, mas não de atipamezole (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) no NDR reverteu esses efeitos (MARTINS *et al.*, 2013, 2015), indicando que receptores α_1 -adrenérgicos medeiam facilitação da nocicepção também em áreas supraespinais.

A chegada contínua de informação nociceptiva a partir da medula espinal a áreas cerebrais, como o LC, que ocorre durante a instalação da dor crônica pode desencadear a facilitação descendente da dor (TRACEY, MANTHY, 2007; HEINRICHER *et al.*, 2009; TAVARES, LIMA, 2007). A ativação do LC induz a liberação de noradrenalina (ABERCROMBIE, KELLER, ZIGMOND, 1988; BRUN *et al.*, 1993; ASTON-JHONES, COHEN, 2005). Mas no processo pró-nociceptivo, a liberação de noradrenalina no corno dorsal pela ativação do LC, parece não ocorrer por projeções diretas deste núcleo a medula espinal (HICKEY *et al.*, 2014). Nossos resultados indicaram que o receptor noradrenérgico α_1 aumentou a dor induzida por formalina mesmo sem a sensibilização da SCPd com glicina. Assim possivelmente, um fluxo de transmissão

nociceptiva sustentada da medula espinal ao LC (devido a ativação de neurônios de 2ª ordem) ocorreu durante a fase IIA no teste de formalina (mesmo sem a SCPd estar sensibilizada com glicina), assim o teste algométrico utilizado no nosso trabalho pôde ter uma contribuição relevante para a facilitação descendente da dor causada pela administração de glicina na SCPd.

Considerando os estudos mencionados acima e os resultados de MARTINS e colaboradores (2013, 2015), sugerimos que uma das supostas vias para os efeitos pró-nociceptivos da microinjeção de glicina na SCPd (especialmente a SCPdl, que supre preferencialmente o LC) é que a coluna dorsal ativou projeções à região dorsal do LC que, por sua vez acionou, o NDR, que tem neurônios com projeções diretas ao corno dorsal, de natureza serotoninérgica (**Fig. 33**).

Apesar de observarmos considerável reversão da hipernocicepção eliciada pela glicina intra-SCPd com o bloqueio de receptores α_1 -adrenérgicos espinais, não podemos descartar a potencial participação de vias serotoninérgicas descendentes. A liberação de serotonina no corno dorsal pelo NDR poderia contribuir para a pró-nocicepção através da ativação de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} e 5-HT₃, por exemplo, cuja ativação é facilitatória (DROGUL, OSSIPOV, PORRECA, 2009; RAHMAN, *et al.*, 2009; SUZUKI, DICKENSON, 2004). A investigação do envolvimento dos receptores serotoninérgicos espinais nos efeitos nociceptivos da glicina não foi contemplada no presente estudo. Experimentos adicionais são necessários para confirmar esse construto.

No entanto, a glicina intra-SCPd parece não ativar exclusivamente projeções facilitatórias do sistema noradrenérgico para a medula espinal. Nossos dados mostraram que vias noradrenérgicas inibitórias também são ativadas pela SCPd, em menor grau, em estado sensibilizado (com glicina) desta estrutura. O efeito inibitório da glicina sobre a nocicepção foi revelado somente quando empreendemos o bloqueio de receptores α_2 -adrenérgicos espinais por ioimbina administrada por via intratecal (previamente ao tratamento da SCPd com esse aminoácido) em uma dose na qual em outros estudos, impediu a antinocicepção (OMOTE *et al.*, 1998, SHIN *et al.*, 2011, PARK, *et al.*, 2011, KIM *et al.*, 2013, JEONG *et al.*, 2014). Corroborando este resultado, um estudo eletrofisiológico mostrou que a inibição dos neurônios nociceptivos do corno dorsal produzida pela estimulação da SCP é antagonizada pela administração intratecal de ioimbina (PENG, LIN, WILLIS, 1996), antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos e agonista de receptores 5-HT_{1A}. O impedimento da chegada de informação nociceptiva a partir da medula espinal ativa o LC (BRIGHTWELL, TAYLOR, 2009; SABBATINI *et*

al., 2004). As ações de ioimbina sobre os receptores α_2 espinais poderia ter ativado ainda mais os neurônios do LC.

Existem projeções recíprocas entre o LC e o grupo de células A7, de modo que a ativação do LC poderia ter ativado também a área A7, esta área possui projeções diretas ao corno dorsal, liberando mais noradrenalina, ativando receptores α_1 possivelmente localizados em neurônios do trato espinotalâmico (**Fig. 33**), conduzindo ao efeito hipernociceptivo da glicina que observamos.

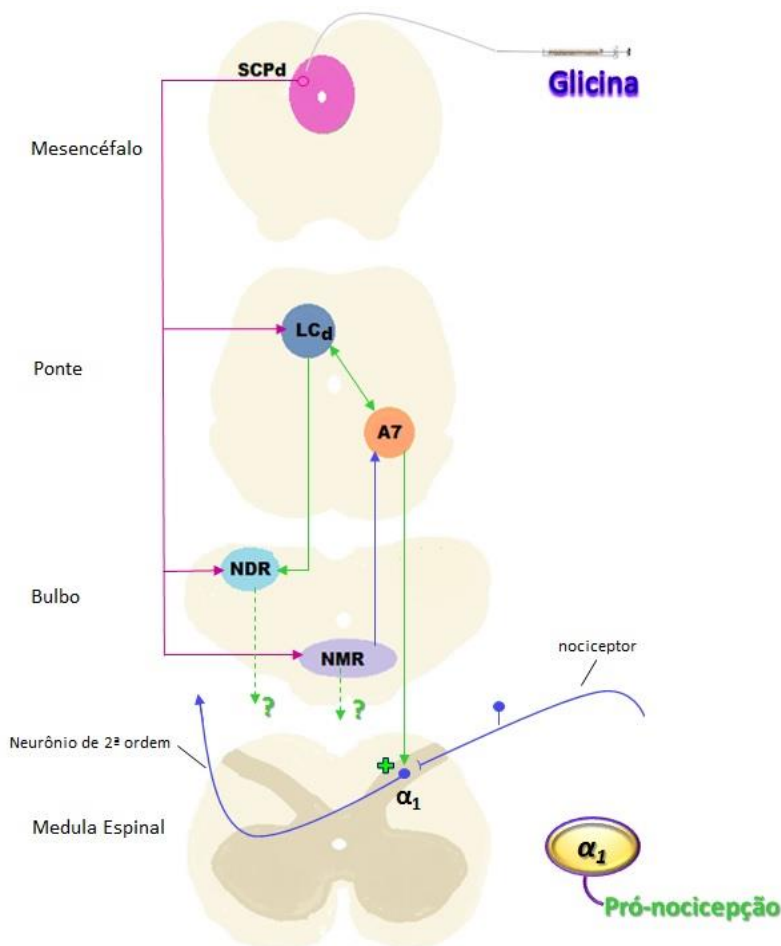


Figura 33. Vias descendentes da ação pró-nociceptiva da glicina intra-SCPd durante a Fase II A do teste de formalina. No contexto neutro, a sensibilização da SCPd com glicina ativa o LCd, que, por sua vez, ativa projeções noradrenérgicas descendentes do grupo celular A7. A noradrenalina liberada no corno dorsal ativa receptores α_1 -adrenérgicos situados em neurônios de segunda ordem (trato espinotalâmico), eliciando potenciais de ação e hipernocicepção. Alternativamente, a SCPd sensibilizada com glicina pode ativar outra via a partir do LCd, que envolve NDR e/ou NMR. SCPd: Coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal; LCd: região dorsal do *locus coeruleus*; NDR: Núcleo Dorsal da Rafe; NMR: Núcleo Magno da Rafe; +: influência pró-nociceptiva; ?: vias não contempladas em nossa abordagem experimental. Em azul, vias

nociceptivas ascendentes; em rosa, projeções descendentes facilitatórias da nocicepção a partir da SCPd; em verde (seta única), projeções descendentes noradrenérgicas facilitatórias da nocicepção (traço contínuo) e serotoninérgicas (traço pontilhado) (Fonte: Autoria própria).

No corno dorsal, os receptores α_2 -adrenérgicos tem papel crucial na mediação da noradrenalina na supressão da transmissão nociceptiva (YAKH, 2006; TAKASU *et al.*, 2006; HAYASHIDA *et al.*, 2007). Existem três subtipos de receptores α_2 : α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} (AANTAA, MARJAMÄKI, SCHEININ, 1995; BYLUND, 1995). Esses receptores são acoplados à proteína Gi/o (PERTOVAARA, 2013) e podem exercer suas ações antinociceptivas por diversos mecanismos, como, por exemplo, inibição pré-sináptica através de receptores do tipo α_{2A} , localizados no ramo central de fibras aferentes primárias, reduzindo a liberação de aminoácidos excitatórios (KAWASAKI *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2002) por inibição do influxo de cálcio (RUFFOLO, HIEBLE, 1994), hiperpolarização de neurônios de segunda ordem do trato espinotalâmico (α_{2A}), ou seja, inibição pós-sináptica por indução de corrente de K^+ (SONOHANATA *et al.*, 2004) e inibição pós-sináptica de interneurônios excitatórios, por ativação de receptores α_{2C} (OLAVE, MAXWELL, 2003; GASSNER, RUSCHEWEYH, SANDKÜHLER, 2009). O antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos empregado em nossos experimentos, a ioimbina, é um antagonista a este receptor, sem, contudo, apresentar seletividade diferencial a qualquer dos subtipos mencionados.

Assim, sugerimos que a administração de glicina na SCPd pode ter ativado a região ventral do LC, (indiretamente, por conexões com a SCPvl) cujas fibras se dirigem e terminam na medula espinal (HICKEY *et al.*, 2014), causando liberação de noradrenalina no corno dorsal que, agindo em receptores α_2 -adrenérgicos espinais promoveu hiponocicepção (Fig. 34).

Porém, em nosso estudo, o efeito antinociceptivo, mediado por receptores α_2 , não sobrepujou o efeito facilitatório da glicina sobre a nocicepção, mediado por receptores espinais α_1 -adrenérgicos. Nossos resultados implicam que o componente inibitório do sistema noradrenérgico descendente precisa ser ativado para exercer efeito analgésico, pois sua ação despontou apenas quando a SCPd foi sensibilizada com glicina. Em contrapartida, o componente facilitatório do sistema noradrenérgico descendente parece estar tonicamente ativo em condições normais, pois a prazosina *per se* (e não a ioimbina) produziu alteração no tempo gasto em morder/lamber, provocando hiponocicepção que foi reforçada pela microinjeção de glicina na coluna dorsal da SCP.

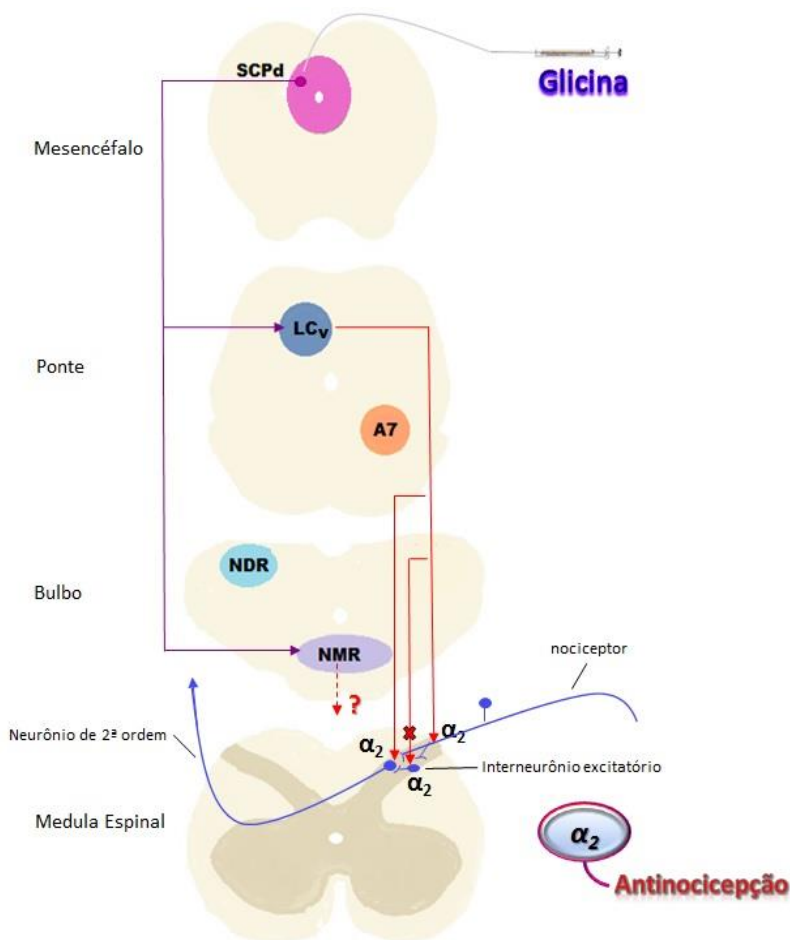


Figura 34. Vias descendentes da ação antinociceptiva da glicina intra-SCPd durante a Fase II A do teste de formalina. No contexto neutro, a sensibilização da SCPd com glicina ativa projeções noradrenérgicas a partir do LCv à medula espinal. A noradrenalina liberada no corno dorsal ativa receptores α_2 -adrenérgicos situados em neurônios de segunda ordem (trato espinotalâmico) ou em interneurônios excitatórios causando inibição pós-sináptica. Esse neurotransmissor também pode ativar receptores α_2 -adrenérgicos no ramo central de nociceptores, eliciando inibição pré-sináptica. O resultado geral é hiperpolarização celular e inibição da transmissão nociceptiva espinal. SCPd: Coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedual; LCv: região ventral do

locus coeruleus; NDR: Núcleo Dorsal da Rafe; NMR: Núcleo Magno da Rafe; x: influências antinociceptivas; ? : vias não contempladas em nossa abordagem experimental. Em azul, vias nociceptivas ascendentes; em roxo, projeções descendentes inibitórias da nocicepção a partir da SCPd; em vermelho traço contínuo, projeções descendentes noradrenérgicas inibitórias da nocicepção e em vermelho traço pontilhado, projeções descendentes serotonérgicas inibitórias da nocicepção (Fonte: Autoria própria).

Em suma, nossos resultados mostraram que em um contexto neutro, a sensibilização da SCPd com glicina ativa o sistema noradrenérgico descendente que exerce um efeito bidirecional sobre a nocicepção espinal, com balanço positivo para o componente facilitatório, pois quando os dois tipos de receptores noradrenérgicos (α_1 e α_2) não foram manipulados farmacologicamente, a facilitação da dor prevaleceu. Influências da glicina predominantemente sobre o componente afetivo/motivacional da dor, mediadas por sua ligação ao sítio GLY-B de receptores NMDA na SCPd, podem ser relevantes a esse fenômeno.

A administração de prazosina por via intratecal, independente do tratamento da SCPd (PBS ou glicina), provocou aumento no tempo despendido em levantar a pata e redução no tempo de manifestação do comportamento morder/lamber, indicando que o receptor α_1 -adrenérgico espinal se sobressai tanto na modulação do componente emocional/atencional da nocicepção (morder/lamber) quanto no controle do componente reflexo da dor (levantar a pata). Devido a sua ação facilitatória sobre o teste de formalina (microinjeção de PBS na SCPd) supomos que a ativação de receptores α_1 -adrenérgicos espinais levou à diminuição do reflexo nocifensivo e ao aumento da dor (morder/lamber) antes mesmo da ativação do sistema noradrenérgico com glicina exógena na SCPd.

Desde que alguns estudos em animais avaliam a dor baseando-se na manifestação do reflexo motor nocifensivo (como, por exemplo, o levantar a pata injetada com formalina), é crucial excluir efeitos confusos induzidos por alterações do comportamento motor quando avaliamos ações de componentes noradrenérgicos administrados por via intratecal em animais (PERTOVAARA, 2013). A dose de prazosina utilizada no presente trabalho foi testada por outro estudo (KIM *et al.*, 2013) que indicou não afetar a atividade locomotora. Além disso, não observamos prejuízos na locomoção dos animais, eles deambularam livremente durante e entre a manifestação comportamental induzida por formalina. Nossos dados mostraram que este antagonista reduziu a resposta nocifensiva focada à dor (morder/lamber), que requer mecanismos

predominantemente supraespinais (inclusive atencionais) para ser expressa, assim, a possibilidade dos efeitos da prazosina serem puramente alterações motoras é bastante reduzida.

Neurônios descendentes da porção caudal de neurônios localizados ventralmente no LC inervam o corno ventral da medula espinal (BJÖRKLUND, SKAGERBERG, 1982; CLARK, PROUDFIT, 1991; CLARK, YEOMANS, PROUDFIT, 1991; PROUDFIT, CLARK, 1991; CLARK, PROUDFIT, 1992) e estão relacionados ao controle de reflexos motores (FUNG, *et al.*, 1991).

A noradrenalina, no corno ventral da medula espinal, devido a sua ação direta sobre receptores α_1 -adrenérgicos, pode facilitar o reflexo nocifensivo por aumentar a excitabilidade de motoneurônios - α (WADA, HASEGAWA, ONO, 1997; DAY *et al.*, 1997). Existem três principais subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos: α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} (HIEBLE *et al.*, 1995), todos são encontrados na medula espinal (XIE *et al.*, 2001). A prazosina tem forte afinidade para todos os subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos (WADA, HASEGAWA, ONO, 1997). A caracterização dos subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos no corno ventral da medula espinal lombar, indicou que os receptores α_{1A} e α_{1B} representam 70% e 30%, respectivamente, da população total de receptores α_1 , enquanto poucos receptores do subtipo α_{1D} estão presentes (WADA *et al.*, 1996). Os do subtipo α_{1A} parecem ser os receptores adrenérgicos funcionalmente predominantes na facilitação da atividade de motoneurônios- α no corno ventral (WADA, HASEGAWA, ONO, 1997).

Porém, nossos resultados mostraram que o antagonismo de receptores α_1 -adrenérgicos espinais (injeção intratecal de prazosina) conduziu à facilitação do reflexo motor (aumentou o comportamento de levantar a pata), sugerindo que estes receptores estão envolvidos na inibição do reflexo motor no teste de formalina. A interpretação deste dado exige parcimônia e requer algumas considerações. Primeira, diferentes subpopulações de motoneurônios - α podem ser recrutadas na nocicepção induzida por formalina. Uma que inerva músculos flexores e outra que inerva preferencialmente músculos extensores. No trabalho de Wada, Hasegawa e Ono, foram utilizadas preparações isoladas de fatias da medula espinal, então não foi possível verificar se os motoneurônios estudados estavam inervando músculos flexores ou extensores (WADA, HASEGAWA, ONO, 1997). Esse fator é relevante, visto que outra monoamina, a serotonina, que assim como a noradrenalina medeia o reflexo motor, aumenta principalmente a atividade extensora (CONWAY *et al.*, 1988; HOUNSGAARD *et al.*, 1988). Assim se a injeção intratecal de prazosina antagonizou preferencialmente a atividade de receptores α_1 -

adrenérgicos situados em motoneurônios- α que inervam músculos extensores, a ativação destes receptores por noradrenalina conduziria à inibição do reflexo nociceptivo.

A segunda consideração é que o reflexo nociceptivo é polissináptico (WIESENFELD-HALLINS, 1987; SCHOUENBORG, KALLIOMÄKI, 1990) e receptores α_1 -adrenérgicos no corno ventral também estão situados em interneurônios que modulam a excitabilidade de motoneurônios – α . Isso implica que a ativação de receptores α_1 -adrenérgicos localizados na membrana celular de interneurônios inibitórios poderia conduzir à despolarização e excitação destes, consequentemente, a atividade de motoneurônios- α que inervam músculos flexores seria inibida e o reflexo espinal nociceptivo também.

Outra consideração que pode ser pertinente é que baixas doses de noradrenalina, administradas por via intratecal inibiram o reflexo nociceptivo em ratos (WIESENFELD-HALLINS, 1987), para explicar esse resultado o autor sugeriu que receptores noradrenérgicos do corno dorsal são mais sensíveis à noradrenalina que os do corno ventral, ao considerar que noradrenalina no corno dorsal medeia apenas antinociceção (WIESENFELD-HALLINS, 1987). Atualmente, é bem difundido o efeito bidirecional do sistema noradrenérgico sobre a nociceção (PERTOVAARA, 2006 e 2013 para revisão). Assim, uma explicação alternativa para nossos resultados é que a quantidade de noradrenalina liberada no corno ventral nas nossas manipulações experimentais talvez não seja suficiente para ativar o reflexo nociceptivo, pelo contrário, verificamos a diminuição na manifestação do comportamento de levantar a pata, mas suficiente no corno dorsal para propulsionar a nociceção (sugerimos receptores α_1 -adrenérgicos estão envolvidos no aumento do tempo despendido em morder-lamber, como já mencionado).

Vale ressaltar que estas são suposições meramente teóricas, não observáveis a partir de nossa abordagem. O entendimento da ação facilitatória da prazosina sobre o reflexo nociceptivo (ou ação inibitória dos receptores α_1 -adrenérgicos) constatada em nossos resultados fica a ser elucidado.

5.2.1.2 No contexto aversivo, o sistema noradrenérgico descendente induz analgesia sem a sensibilização da SCPd com glicina

O quadro 2 sintetiza os principais resultados no contexto aversivo durante a fase IIA do teste de formalina.

Quadro 2 - Principais efeitos nocifensivos dos tratamentos intratecal e intra-SCPd no contexto aversivo durante a Fase II A do teste de formalina.

Tratamento	Efeito
6-OHDA (i.t.)	Reverteu a AIC
6-OHDA (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	Não AIC
Ioimbina (i.t.)	Reverteu a AIC
Ioimbina (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	AIC
Prazosina (i.t.)	Não AIC
Prazosina (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	Não AIC

Tratamento: 6-OHDA = 6-hidroxidopamina, i.t. = Intratecal, SCPd = Substância cinzenta periaquedutal dorsal.

Efeito: AIC = Analgesia induzida contextualmente

Nossos resultados revelaram que a analgesia induzida pelo contexto aversivo requer modulação descendente noradrenérgica quando a SCP não for sensibilizada pela glicina, ou seja, esse componente do sistema descendente modulatório da dor parece ser ativado em condições aversivas para reduzir a nocicepção. Os animais do grupo condicionado, que receberam tratamento intratecal com a 6-OHDA e PBS intra-SCP não somente manifestaram por mais tempo o morder/lamber, mas também reverteram a analgesia induzida pelo condicionamento contextual em comparação ao grupo controle condicionado (C-veículo-PBS).

A ação antinociceptiva do sistema noradrenérgico descendente no contexto aversivo está de acordo com o condizente ao repertório comportamental e autonômico frente à uma ameaça, desencadeado por simpatooexcitação. Quando um animal é exposto a estímulo ameaçador, como um ambiente aversivo, alterações fisiológicas ocorrem para preparar o animal para lidar com essa ameaça (BANDLER *et al.*, 2000). Estas alterações incluem ativação do eixo hipotálamo-hipófise e liberação de adrenalina e noradrenalina a partir da medula adrenal e sistema

autônomo simpático, respectivamente, ambos modulam a nociceção (CAPONE, ALOISI, 2004).

Estudos que usaram microestimulação química indicaram que diferentes colunas da SCP organizam diferentes estratégias para enfrentar uma ameaça (BANDLER, SHIPLEY, 1994; BANDLER *et al.*, 2000; KEAY, BANDLER, 2002; HEINRICHER, *et al.*, 2009), como um ambiente hostil. A SCPd neste contexto inicia respostas de “luta ou fuga”, associadas com taquicardia, hipertensão e redistribuição do fluxo sanguíneo (BANDLER, SHIPLEY, 1994; BANDLER *et al.*, 2000), assim, nossos resultados são colaborados pela a sugestão de que a SCPd está associada naturalmente (sem precisar de glicina exógena) à redução da dor frente a pistas temíveis (como pistas contextuais aversivas) através do aumento da atividade simpática e liberação de noradrenalina no corno dorsal. No contexto aversivo, a hiponociceção parece ser crucial para inibir a manifestação de comportamentos nocifensivos (como morder/lamber) incompatíveis com estratégias de defesa que garantam a sobrevivência (ZHANG *et al.*, 1994; BANDLER, SHIPLEY, 1994; MORGAN, *et al.*, 1998; LUMB, 2004; FIELDS, 2007).

A informação de que a SCPd desempenha um papel importante na integração de comportamentos defensivos e analgesia (BANDLER, 1988; GRAEFF, 1990; BANDLER *et al.*, 2000; COIMBRA, BRANDÃO, 1993) tem sido bastante difundida e esta estrutura está ligada a núcleos monoaminérgicos como o NDR e o LC (FREITAS *et al.*, 2005).

Estudos neurofarmacológicos e hodológicos evidenciam que a elaboração da antinociceção induzida pelo medo é realizada por vias do LC (COIMBRA *et al.*, 2006, BIAGIONI *et al.*, 2013). A modulação dessa função do LC é feita por neurônios serotoninérgicos da SCPd (COIMBRA *et al.*, 2006) e do NDR (BIAGIONI *et al.*, 2013), que também possuem conexões mutuas. Ambos modulam a organização de comportamentos defensivos no hipotálamo dorsomedial (BIAGIONI, SILVA, COIMBRA, 2012, BIAGIONI *et al.*, 2016).

Assim, o LC pode ser considerado um candidato a conter os corpos celulares dos neurônios noradrenérgicos cujas fibras pontinoespinais desencadearam mecanismos de antinociceção induzida pelo contexto aversivo no nosso estudo. Além das informações acima, duas considerações contribuem para essa suposição. A primeira é que a administração por via intratecal da neurotoxina 6-OHDA utilizada no presente estudo, leva à degeneração preferencial de fibras pontinoespinais do LC, assim esse procedimento pode refletir a atividade deste núcleo na medula espinal (MCBRIDE *et al.*, 1985 LLORCA-TORRALBA, 2016),

segunda, em nossos experimentos a 6-OHDA administrada por via intratecal provavelmente não atingiu corpos celulares do LC. Evidências indicam que a aplicação intratecal de 6-OHDA não causa sua difusão para regiões supraespinais e níveis cerebrais de noradrenalina também não são alterados (GUTIERREZ *et al.*, 2003).

Entre as funções do LC em ratos e primatas, estão a promoção do estado de vigília, a atenção e a motivação (CARTER *et al.*, 2010), como parte de um sistema concentrador de recursos cognitivos (HICKEY *et al.*, 2014). Um subconjunto de neurônios do LC tem projeções ascendentes ao CPFm, formando circuito LC-CPFm, que otimiza funções cognitivas relevantes à manifestação de determinados comportamentos (ASTON-JONES, COHEN, 2005; MARZO *et al.*, 2014) que possam aumentar a chance de sobrevivência do animal em uma determinada circunstância (FIELDS, 2007), motivando ignorar a dor, ou seja, gerar analgesia induzida pelo medo ou prestar atenção nela. Estressores externos (contexto aversivo) ou internos (glicina, que é ansiogênica) podem alterar a função de populações neuronais do circuito LC-CPFm, esse processo parece ser mediado pela liberação de noradrenalina no CPFm e pode mudar o balanço excitação/inibição do CPFm (TAYLOR, WESTLUND, 2016). Nossa teoria é que a SCPd (sem ser sensibilizada com glicina) no contexto aversivo pode ativar o LC (diretamente ou através do NDR) e este desvia (juntamente com áreas corticais) o foco de atenção para o ambiente aversivo, e a dor seria reduzida (**Fig. 35**). A mudança do foco de atenção foi em direção oposta no contexto neutro, no qual a SCPd precisou ser sensibilizada com glicina para que a atividade de fibras noradrenérgicas descendentes (e indiretamente a do LC) aparecessem. Animais do grupo não condicionado tratado com 6-OHDA e glicina, despenderam menos tempo em morder lambar que seu grupo controle (tratado com veículo e glicina), indicando que o efeito hipernociceptivo produzido pela administração de glicina na SCPd depende do funcionamento do sistema noradrenérgico. O LC no contexto neutro pode ter ajudado a SCPd a recrutar a atenção para a pata injetada com formalina, mais ameaçadora que o contexto. A relação contexto e sistema noradrenérgico têm um ponto em comum: o sistema noradrenérgico precisou ser ativado pela SCPd, seja pela glicina (contexto neutro), seja por pistas ambientais ameaçadoras (contexto aversivo) para que fosse revelada a importância deste sistema na nocicepção induzida por formalina em diferentes contextos.

O grupo condicionado que foi tratado com glicina após a degeneração das fibras noradrenérgicas, não teve, de modo significativo, redução do tempo de expressão do comportamento nocifensivo

(morder/lamber) em comparação ao seu grupo controle não condicionado (com igual tratamento intratecal e intracerebral), apesar de ser evidente uma diminuição no tempo desta resposta comportamental. No entanto, o grupo condicionado tratado com 6-OHDA e glicina foi diferente estatisticamente de seu contraparte condicionado tratado com 6-OHDA e PBS (que reverteu a analgesia induzida contextualmente), o que pode indicar que a reação defensiva de analgesia ao contexto aversivo mediada pela glicina na SCPd talvez requeira outro sistema de modulação descendente que não o noradrenérgico, como, por exemplo, o serotonérgico.

O NDR (e o NMR) recebe projeções serotonérgicas da SCPd (COIMBRA *et al.*, 2006) e além de vias ascendentes, tem projeções diretas à medula espinal, liberando serotonina no corno dorsal. A ativação de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} 5-HT₇, por serotonina na medula espinal inibe a nocicepção (DROGUL, OSSIPOV, PORRECA, 2009; RAHMAN, *et al.*, 2009; SUZUKI, DICKENSON, 2004). Nossa suposição teórica é que, no contexto aversivo, a administração de glicina na SCPd tenha ativado outra população de neurônios no NDR (e/ou no NMR) que, diferente da população de neurônios do NDR ativada no contexto neutro, possa ter projeções espinais ao corno dorsal cuja serotonina liberada desencadeia mecanismos de antinocicepção (e não hipernocicepção) mediados por receptores serotonérgicos inibitórios (**Fig. 36**).

5.2.1.3 O componente noradrenérgico da analgesia induzida contextualmente é o receptor α_2 da medula espinal

A injeção intratecal de ioimbina nos animais do grupo condicionado que receberam PBS intra-SCPd ocasionou maior tempo de manifestação do comportamento nocifensivo de morder/lamber e reverteu a analgesia causada por pistas contextuais aversivas. Esses dados vêm a confirmar os resultados com 6-OHDA. O condicionamento aversivo leva à liberação de noradrenalina na medula espinal (provavelmente pela ativação do LC), sem necessitar de sensibilização prévia da SCPd com glicina. Esse neurotransmissor age sobre receptores α_2 -adrenérgicos da medula espinal, levando à redução (induzida contextualmente) da nocicepção (**Fig. 34**).

Outro cenário comportamental revelou-se quando animais do grupo condicionado receberam ioimbina por via intratecal e glicina por

via intracerebral. Houve redução no tempo de manifestação do morder/lamber a pata, em relação ao grupo controle não condicionado (que recebeu tratamento igual), ocorrendo a expressão de analgesia induzida contextualmente apesar do bloqueio de receptores α_2 -adrenérgicos com ioimbina, o que pode indicar que os receptores α_2 do corno dorsal não medeiam ação da glicina na SCPd na antinocicepção causada pelo contexto aversivo. Esses dados são condizentes com os resultados dos experimentos com 6-OHDA, que apontaram que neste contexto, a glicina exógena na SCPd parece não recrutar o sistema noradrenérgico para causar analgesia. O componente serotoninérgico descendente poderia atender a essa função (**Fig. 36**), como já mencionado.

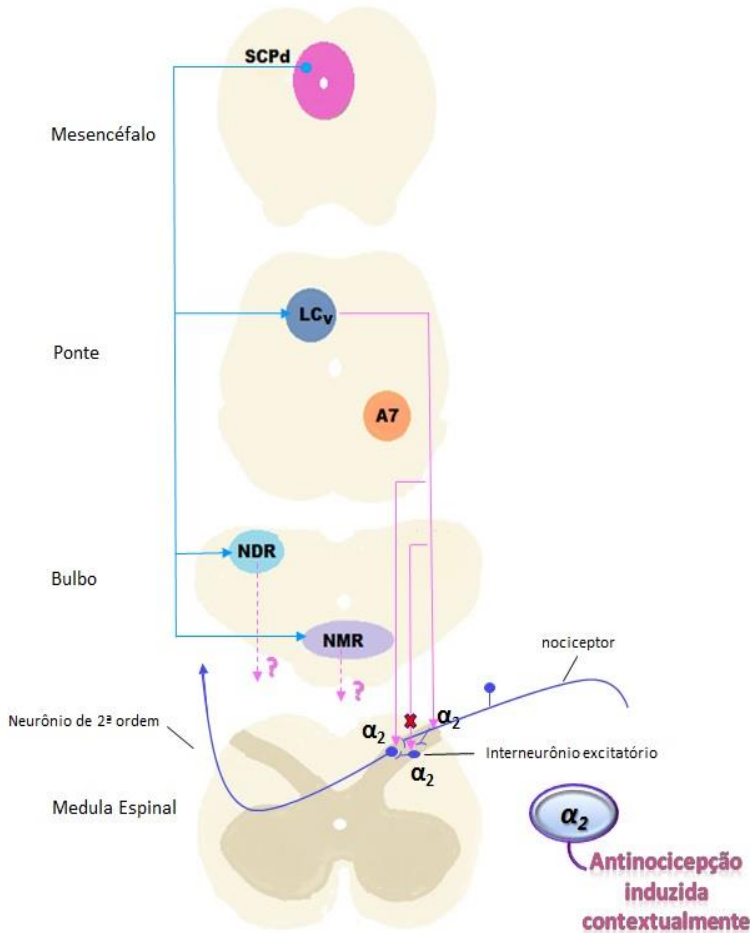


Figura 35. Vias descendentes noradrenérgicas envolvidas na antinociceção induzida pelo contexto aversivo durante a Fase II A do teste de formalina. Neste contexto, a SCPd, sem requerer de sensibilização com glicina, pode ou não ativar, direta ou indiretamente, projeções noradrenérgicas a partir do LCv à medula espinhal. A noradrenalina liberada no corno dorsal causa a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos situados em neurônios de segunda ordem (trato espinotalâmico) ou em interneurônios excitatórios causando inibição pós-sináptica. Esse neurotransmissor também pode ativar receptores α_2 -adrenérgicos no ramo central de nociceptores, ocasionando inibição pré-sináptica. O resultado geral é hiperpolarização celular e inibição da transmissão nociceptiva espinhal. SCPd: Coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedual; LCv: região ventral

do *locus coeruleus*; NDR: Núcleo Dorsal da Rafe; NMR: Núcleo Magno da Rafe; x: influências antinociceptivas; ? : vias não discriminadas em nossos experimentos. Em azul escuro, vias nociceptivas ascendentes; em azul claro, projeções descendentes inibitórias da nocicepção a partir da SCPd; em rosa, traço contínuo, projeções descendentes noradrenérgicas inibitórias da nocicepção ativadas pelo contexto aversivo e em rosa, traço pontilhado, potenciais projeções descendentes serotonérgicas inibitórias da nocicepção (Fonte: Autoria própria).

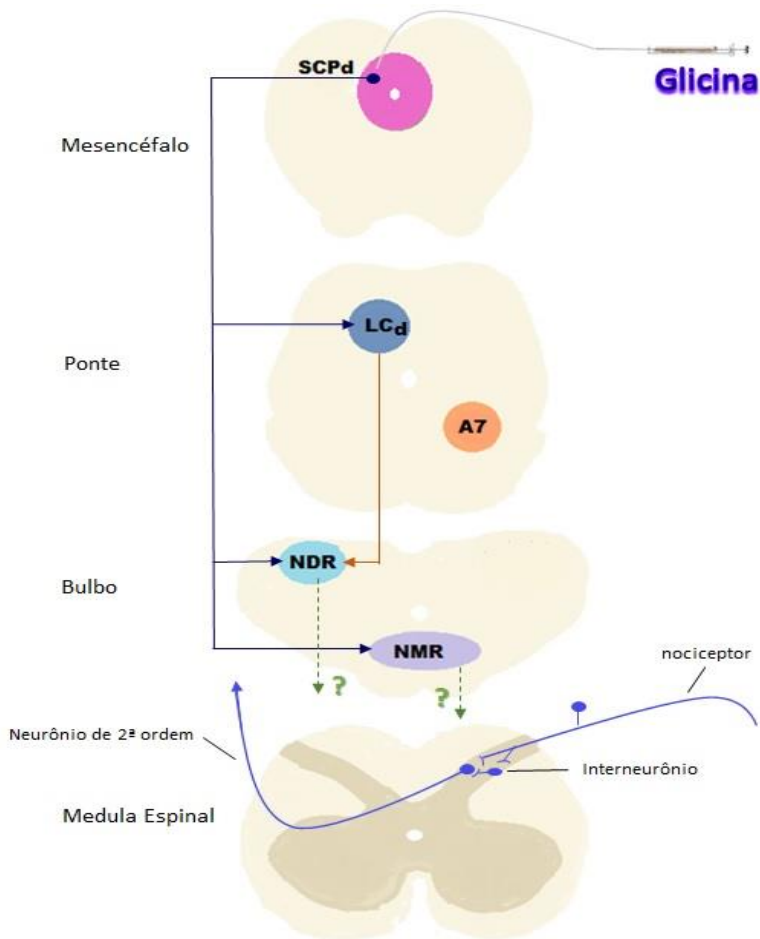


Figura 36. Potenciais vias descendentes ativadas pela glicina intra-SCPd no contexto aversivo durante a Fase II A do teste de formalina. Neste contexto, a sensibilização da SCPd com glicina potencialmente ativa direta (azul escuro) ou indiretamente (marrom), através do LCd, núcleos serotoninérgicos como o NDR e/ou o NMR, que, por sua vez, ativam projeções serotoninérgicas descendentes ao corno dorsal, inibindo a transmissão nociceptiva à medula espinhal. SCPd: Coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal; LCd: *locus coeruleus* dorsal; NDR: Núcleo Dorsal da Rafe; NMR: Núcleo Magno da Rafe; ?: vias descendentes à medula espinhal não discriminadas em nossa abordagem experimental. Em azul claro, vias nociceptivas ascendentes; em azul escuro, potenciais projeções descendentes inibitórias da nocicepção ativadas a partir da SCPd no contexto

aversivo; em verde (traço pontilhado), potenciais vias serotoninérgicas descendentes envolvidas na antinociceção induzida contextualmente (Fonte: Autoria própria).

5.2.2 Fase II B

Os resultados referentes a esta fase do teste de formalina no contexto neutro estão sumarizados no quadro 3.

Quadro 3 - Resumo dos principais efeitos nocifensivos dos tratamentos intratecal e intra-SCPd durante a Fase II B do teste de formalina no contexto neutro.

Tratamento	Efeito
6-OHDA (i.t.)	-
6-OHDA (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	↑ nociceção
Ioimbina (i.t.)	-
Ioimbina (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	↑ nociceção
Prazosina (i.t.)	-
Prazosina (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	-

Tratamento: 6-OHDA = 6-hidroxidopamina, i.t. = Intratecal, SCPd = Substância cinzenta periaquedutal dorsal.

Efeito: (-) = sem efeito, ↑ = aumento.

5.2.2.1 No final do teste de formalina, o componente noradrenérgico é inibitório e precisa ser ativado pela SCPd (sob ação da glicina)

A injeção intratecal de neurotoxina noradrenérgica 6-OHDA previamente à microinjeção de glicina na SCPd e a re-exposição dos animais ao contexto neutro promoveu aumento no tempo gasto na manifestação do comportamento de morder/lamber dos 35,1 aos 60 minutos após a injeção de formalina na pata.

O pré-tratamento intratecal com ioimbina (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) e o tratamento intracerebral com glicina também incrementou o tempo de expressão da resposta comportamental nocifensiva (morder/lamber), sugerindo que o efeito noradrenérgico acionado pela microinjeção de glicina intra-SCPd é mediado por receptores α_2 -adrenérgicos espinais e é analgésico.

Por outro lado, sem o tratamento da SCPd com glicina, a depleção de fibras noradrenérgicas (por 6-OHDA) não ocasionou alteração no tempo despendido pelos animais em morder/lamber a pata. De forma plausível, os resultados também mostraram que a ioimbina por via intratecal não eliciou efeito de modo significativo no tempo de manifestação comportamental nocifensiva no grupo que não teve a SCPd sensibilizada.

A interpretação mais parcimoniosa desses dados é que no período final do teste de formalina, o processo algésico (e mecanismos inibitórios deste) encontra-se em declínio de atividade. Neste período do teste, a entrada aferente nociceptiva induzida por formalina está bastante reduzida (DICKENSON, SULLIVAN, 1987) e a facilitação central mantém um grau menor de expressão de comportamentos nocifensivos (YAKSH, *et al.*, 1999). De fato, o tempo de manifestação do comportamento nocifensivo (morder/lamber) foi predominantemente maior na Fase II A. Nossos resultados estão de acordo com os de estudo anterior do nosso laboratório (VANZ, 2014) e de outros (SUGIMOTO *et al.*, 1986, WHEELER-ACETO, COWAM, 1991).

Dois fatores contribuem para essa interpretação. O efeito analgésico do sistema noradrenérgico descendente somente foi revelado quando ocorreu incremento em sua atividade, ou seja, na presença de glicina. Porém, distintamente da fase anterior (dos 10 aos 35 minutos), na fase II B ou tardia, a ativação do sistema noradrenérgico descendente pela SCPd sensibilizada com glicina, levou à analgesia apenas.

Outro fator é que a implementação de ioimbina por via intratecal no grupo que recebeu glicina intra-SCPd retomou a expressão da resposta nocifensiva (aumentou o tempo de expressão). A atuação inibitória do sistema noradrenérgico descendente na fase tardia do teste de formalina, que estava latente sem a sensibilização da SCPd com glicina, revelou-se novamente, com a microrinjeção de glicina na SCPd, por intermédio de receptores α_2 -adrenérgicos.

Assim, na fase II B do teste de formalina, sugerimos que a ativação de vias descendentes noradrenérgicas que terminam no corno dorsal depende da glicina na coluna dorsal da SCP. Possivelmente essas fibras noradrenérgicas têm origem em corpos celulares de neurônios localizados

na região ventral do LC, que aumentam a liberação de noradrenalina no corno dorsal, que por sua vez, desencadeia mecanismos de anti-nociceção mediados por receptores α_2 -adrenérgicos (**Fig. 37**).

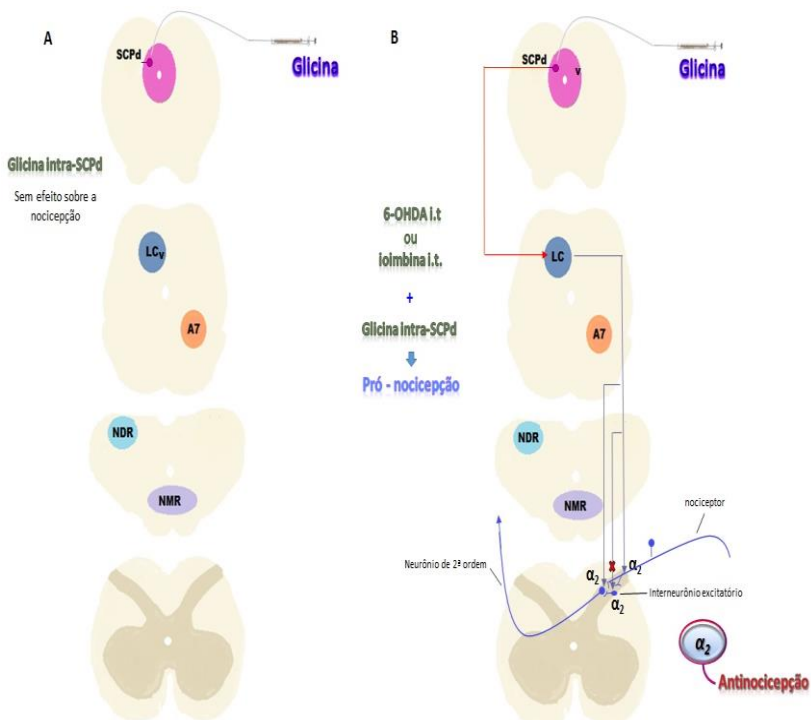


Figura 37. Vias noradrenérgicas descendentes inibitórias ativadas pela sensibilização da SCPd com glicina no contexto neutro durante a Fase II B do teste de formalina. Em **A**: microinjeção de glicina intra-SCPd não tem efeitos nociceptivos na fase tardia do teste de formalina. Em **B**: Injeção intratecal de 6-OHDA (neurotoxina de fibras noradrenérgicas) ou de ioimbina (antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos) previamente à microinjeção de glicina na SCPd aumentou a nociceção. Supõe-se que projeções noradrenérgicas descendentes inibitórias, possivelmente a partir do LCv, são ativadas apenas quando glicina é administrada na SCPd. A noradrenalina liberada no corno dorsal causa a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos situados em neurônios de segunda ordem (trato espinotalâmico) ou em interneurônios excitatórios causando inibição pós-sináptica. Esse neurotransmissor também pode ativar receptores α_2 -adrenérgicos no ramo central de nociceptores, ocasionando inibição pré-sináptica. O resultado geral é hiperpolarização celular e inibição da transmissão nociceptiva espinal. SCPd: Coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedutal; LCv: região ventral

do *locus coeruleus*; NDR: Núcleo Dorsal da Rafe; NMR: Núcleo Magno da Rafe; A7: grupo celular noradrenérgico A7; x: influências antinociceptivas. Em azul, vias nociceptivas ascendentes; em laranja, projeções descendentes inibitórias da nocicepção a partir da SCPd; em cinza, projeções descendentes noradrenérgicas inibitórias da transmissão nociceptiva espinal (Fonte: Autoria própria).

Deve-se notar que a administração de glicina na SCP não provocou hipernocicepção na fase II B do teste de formalina. Considerando que a glicina na SCPd aumenta a atenção do animal para potenciais fontes de ameaça, como já discorrido em outros itens do trabalho, nossa teoria é que sendo a entrada nociceptiva menor na fase tardia, a pata injetada com formalina poderia ser considerada pelo sistema defensivo (SCPd sensibilizada) uma fonte de ameaça não tão pujante como era na fase II A, assim, o animal não necessitaria gastar maior tempo na atividade comportamental focada à dor.

Outra informação a partir dos nossos resultados é que os receptores α_1 -adrenérgicos parecem que estão pouco ativados na fase II B do teste de formalina, visto que a prazosina administrada por via intratecal, tão atuante na fase II A, não alterou o tempo de expressão do comportamento de morder/lamber, independentemente do tratamento da SCP. Esse dado nos leva à sugestão de que na fase II B possa ter ocorrido taquifilaxia dos receptores α_1 -adrenérgicos.

5.2.2.2 Na fase tardia do teste de formalina, a analgesia induzida contextualmente depende da microinjeção de glicina na SCPd e não ativa o sistema noradrenérgico descendente

Os achados referentes à fase II B no contexto aversivo estão resumidos a seguir, no quadro 4.

Quadro 4 - Efeitos do tratamento intratecal e intra-SCPd na fase II B do teste de formalina durante re-exposição ao contexto aversivo.

Tratamento	Efeito
6-OHDA (i.t.)	Não AIC
6-OHDA (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	AIC
Ioimbina (i.t.)	Não AIC
Ioimbina (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	AIC
Prazosina (i.t.)	Não AIC
Prazosina (i.t.) + Glicina (intra-SCPd)	Não AIC

Tratamento: 6-OHDA = 6-hidroxidopamina, i.t. = Intratecal, SCPd = Substância cinzenta periaquedutal dorsal.

Efeito: AIC = Analgesia induzida contextualmente

Dos 35,1 aos 60 minutos do teste de formalina não houve expressão comportamental de analgesia induzida pelo condicionamento contextual em condições normais, ou seja, sem a manipulação farmacológica da SCPd (com glicina) e da medula espinal (com 6-OHDA ou antagonistas). Esta manifestação comportamental provocada por pistas contextuais aversivas somente revelou-se quando empreendemos a destruição química das fibras noradrenérgicas descendentes por 6-OHDA ou o antagonismo de receptores α_2 -adrenérgicos previamente à microinjeção de glicina na SCP (e re-expomos os animais ao contexto aversivo).

Considerando que a dor se encontra em declínio na fase tardia do teste de formalina, o efeito inibitório do sistema noradrenérgico somente foi revelado com a sensibilização da SCPd com glicina, no contexto neutro, como já discutido. Porém quando animais com ausência de fibras noradrenérgicas descendentes (tratamento com 6-OHDA) ou bloqueio de receptores α_2 -adrenérgicos espinais (por ioimbina) foram colocados em um ambiente aversivo, observamos analgesia. Esses dados indicam que a

anti-nociceção causada por pistas contextuais aversivas, na Fase II B do teste de formalina, requer a mediação de outro componente do sistema descendente inibitório, possivelmente o sistema serotoninérgico.

Supomos que, no final do teste de formalina, a re-exposição do animal ao contexto aversivo, com a SCPd sensibilizada com glicina, possa ter levado à ativação de um subconjunto de neurônios do LC distinto do requerido para causar antinociceção no contexto neutro, potencialmente, um subconjunto da porção dorsal do LC, já que a degeneração de fibras descendentes à medula espinal por 6-OHDA não causou alteração na analgesia induzida aversivamente. Neurônios do LCd poderiam ativar conexões com outros núcleos supraespinais e áreas corticais, conduzindo o foco de atenção para o ambiente. De fato, a entrada nociceptiva neste período do teste algesimétrico é menor, o que poderia favorecer essa mudança atencional, reduzindo ainda mais a nociceção. Além disso, a injeção intratecal de ioimbina previamente ao tratamento da SCPd com glicina, também não alterou a antinociceção induzida pelo contexto aversivo, o que nos leva a supor que outra via descendente, que não a noradrenérgica, está envolvida neste tipo de antinociceção (**Fig. 38**).

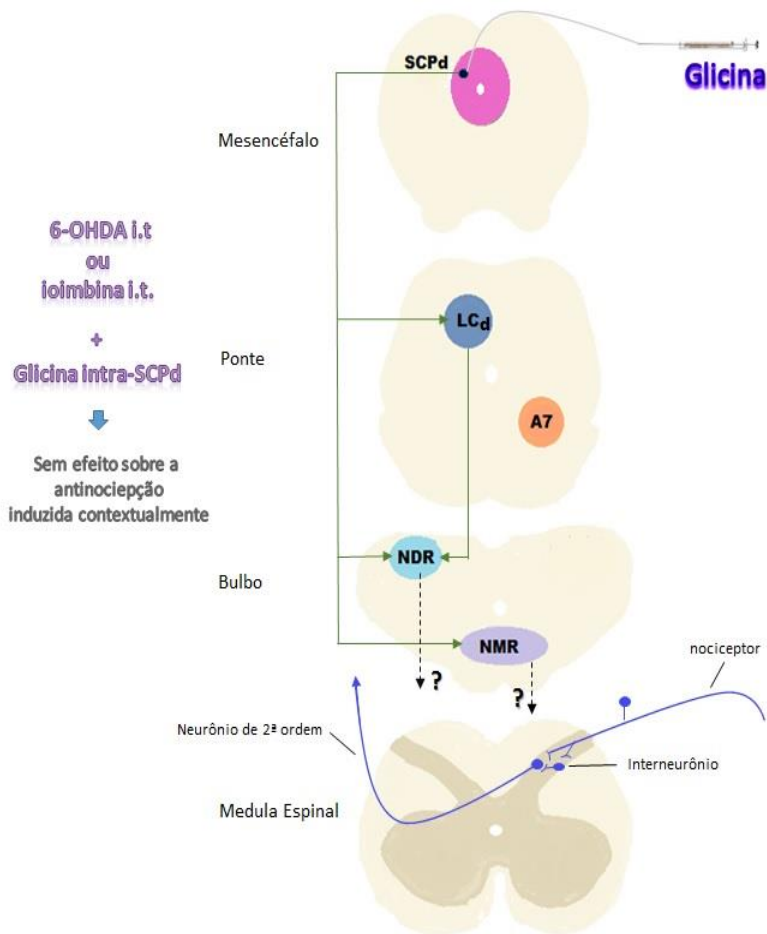


Figura 38. Potenciais vias descendentes ativadas pela SCPd com glicina exógena durante a antinociceção induzida contextualmente na fase II B do teste de formalina. Na fase tardia do teste de formalina, a antinociceção causada pelo contexto aversivo foi observada somente quando houve tratamento por via intratecal com 6-OHDA ou com ioimbina previamente à administração de glicina na SCPd, indicando que esta fase do teste algesimétrico não requer o sistema noradrenérgico descendente. A SCPd sensibilizada com glicina poderia ativar direta ou indiretamente, através do LCd, núcleos serotoninérgicos no bulbo, como o NDR e/ou o NMR. Projeções destes núcleos serotoninérgicos para a medula espinhal seriam candidatas à mediar hiponociceção induzida pelo contexto aversivo. SCPd: Coluna dorsal da Substância Cinzenta Periaquedual; LCd:

região dorsal do *locus coeruleus*; NDR: Núcleo Dorsal da Rafe; NMR: Núcleo Magno da Rafe; ? : vias não contempladas em nossa abordagem experimental. Em azul, vias nociceptivas ascendentes; em verde, projeções descendentes inibitórias da nocicepção a partir da SCPd; em preto pontilhado, vias serotoninérgicas com potencial envolvimento na antinocicepção induzida pelo contexto aversivo (Fonte: Autoria própria).

5.3. A ATIVAÇÃO E/OU A SENSIBILIZAÇÃO DA SCPd COM GLICINA INFLUENCIA A EXPRESSÃO DO CONGELAMENTO INDUZIDO CONTEXTUALMENTE

No presente estudo, a resposta de congelamento induzido por estímulo condicionado (através do paradigma do condicionamento clássico ou Pavloviano) foi monitorada no dia do teste como índice comportamental da resposta de medo.

De acordo com o modelo de Rescorla-Wagner, o condicionamento Pavloviano é a aquisição de uma expectativa de um evento proeminente, cuja força associativa é controlada pela discrepância entre a intensidade esperada e a intensidade real do estímulo incondicionado (RESCORLA, WAGNER, 1972). Após esse "erro de predição", o comportamento é ajustado de acordo com as predições corrigidas do estímulo incondicionado (PLOGHAUS *et al.*, 2000).

Na última década, estudos em animais vêm sugerindo que a SCP é um sítio importante para codificação de erros de predição aversiva (McNALLY, JOHANSEN, BLAIR, 2010; JOHANSEN *et al.*, 2010). Em humanos, um modelo da mais provável arquitetura funcional que implementa o aprendizado de esquiva da dor foi proposto recentemente. Regiões corticais como o CPFvm, o COF e o CCA recebe influências nociceptivas ascendentes da medula espinal (ROY *et al.*, 2014), com a SCP exercendo uma função central nesta circuitaria.

A despeito do estímulo incondicionado utilizado nesse trabalho ser de natureza nociceptiva (choque elétrico) e a re-exposição ao contexto previamente pareado a choques elétricos, vinte e quatro horas após a sessão de condicionamento, ocorrer imediatamente após a aplicação do estímulo nocivo (formalina), devemos ressaltar que o termo condicionamento referido nesta discussão é empregado no sentido de ser uma forma particular de aprendizado, ou seja, uma mudança na resposta comportamental devida a alterações ambientais (PIERCE, CHENEY, 2013) e não modulação da dor condicionada, na qual a exposição simultânea de um estímulo doloroso leva à redução de um segundo estímulo da mesma natureza (YARNITSKY *et al.*, 2015).

Uma vez que a expectativa do choque e sua representação mental é adquirida no dia do condicionamento, medo do choque e comportamentos defensivos associados (como congelamento e analgesia) serão ativados como respostas ao estímulo condicionado (contexto aversivo) (VLAEYEN, 2015), no dia do teste.

A predição pode ser realizada pela detecção de pistas que sinalizam a potencial ocorrência de uma ameaça (VLAEYEN, 2015), como pistas contextuais que fazem alusão à ocorrência de choques elétricos. Assim podemos considerar que no dia do teste, no qual ocorreu manipulação farmacológica, expectativas a respeito desta ameaça potencial também se cumpriram, dado que todos os animais dos grupos condicionados expressaram congelamento contextualmente induzido.

Em relação ao comportamento de congelamento, um dado comum observado em todos os experimentos foi que a glicina exógena na SCPd eliciou menos tempo de manifestação deste comportamento defensivo em relação ao grupo controle condicionado, independente do tratamento intratecal, apesar de não prejudicar a expressão de analgesia induzida contextualmente.

O condicionamento aversivo ao contexto requer a integração de pistas difusas espacialmente, o que exige longos períodos de tempo e elicia mecanismos neurobiológicos que são bastante susceptíveis a interferências pós-condicionamento temporalmente graduadas (FANSELOW, 2000, RUDY, 2009).

Pesquisas apontam que o condicionamento ao contexto pode ser reduzido pela experiência com estressores psicológicos após a sessão de condicionamento (McNALLY, WESTBROOK, 2003; RUDY, 1996). Esse efeito pode ser devido a mecanismos de estimulação do SNC que são comuns às respostas a estressores que exercem efeitos negativos sobre a cognição (JOHNSTON *et al.*, 2012).

Nesta conjuntura, é de nosso conhecimento que a microinjeção de glicina na SCPd tem ação ansiogênica (CAROBREZ, TEIXEIRA, GRAEFF, 2001 para revisão), podemos então considerá-la *per se* um agente estressor. Além disso, nossos resultados mostraram que em um contexto neutro, esse aminoácido tem ação pró-nociceptiva quando aplicado à SCPd e que este efeito não foi anulado no contexto aversivo e sim revertido. No contexto aversivo, o animal é conduzido a fazer uma escolha entre o medo do choque, que é uma expectativa, um estímulo aversivo em potencial e a presença real do agente nocivo (formalina), levando a atenção a um patamar concorrente entre a dor e o contexto aversivo. Supomos, então, que os animais dos grupos condicionados-glicina manifestaram por menos tempo o comportamento de

congelamento em relação aos animais dos grupos condicionado-PBS, porque a administração de glicina na SCPd após o condicionamento pode ter gerado alterações motivacionais e cognitivas relacionadas à dor e assim ter prejudicado a evocação da memória e/ou a expressão do comportamento de congelamento durante a fase de teste (**Fig. 29 C e Fig. D**).

Outro aspecto relevante a ser considerado na interpretação dos nossos dados condiz à região da SCP onde a glicina foi microinjetada (coluna dorsal) e à região da SCP responsável pela execução do comportamento de congelamento eliciado pelo estímulo condicionado (coluna ventrolateral).

Apesar da SCPd desempenhar um papel importante na integração de comportamentos defensivos e analgesia (BANDLER, 1988; GRAEFF, 1990; BANDLER *et al.*, 2000; COIMBRA, TOMAZ, BRANDÃO, 1992; COIMBRA, BRANDÃO, 1993), há um grande corpo de evidências de que a coluna ventrolateral é a região da SCP preferencialmente envolvida na expressão comportamental do medo condicionado (De OCA *et al.*, 1998; VIANA, LANDEIRA-FERNANDEZ, BRANDÃO; 2001, McNALLY, JOHANSEN, BLAIR, 2011; GROSS, CANTERAS, 2012; BORELLI *et al.*, 2013; TOVOTE *et al.*, 2016).

A SCPd tem projeções à SCPvl (JANSEN *et al.*, 1998; De OCA *et al.*, 1998, TOVOTE *et al.*, 2016). Um grupo de pesquisadores verificou que a lesão da coluna dorsal da SCP antes da sessão de condicionamento (e não após) levou ao aumento da expressão de congelamento e propôs que esta região da SCP exerce influência inibitória sobre um conjunto de neurônios da SCPvl durante a fase de aquisição da memória (De OCA *et al.*, 1998).

Realizamos a manipulação farmacológica da SCPd após a fase de condicionamento. Apesar de a lesão da SCPd pós-condicionamento não ocasionar alteração no comportamento de congelamento induzido pelo contexto aversivo (KIM, RISON, FANSELOW, 1993; De OCA *et al.*, 1998), isso não significa que podemos automaticamente descartar o envolvimento da SCPd na expressão deste comportamento defensivo. A interpretação dos resultados dos experimentos de lesão supracitados nos leva a supor que a SCPd parece não ser fundamental ou insubstituível para o congelamento induzido por estímulo condicionado, de modo que outra estrutura do sistema defensivo pode realizar tal função sem sua presença (ou influência). No entanto, nossos dados apontam claramente para um papel da SCPd na resposta defensiva relacionada ao medo condicionado. A sutil ativação e/ou sensibilização desta estrutura com glicina no dia do teste ocasionou redução do congelamento induzido por estímulo

condicionado (contexto). Um grupo de pesquisa que realizou manipulação farmacológica da SCPd no dia do teste, assim como no nosso protocolo, também verificou alteração na expressão deste tipo de congelamento na presença de formalina (OLANGO *et al.*, 2012), sustentando nossa hipótese de que a coluna dorsal da SCP está envolvida na manifestação desta reação de defesa na presença de um tom nociceptivo. Assim, inferimos que a ativação e/ou sensibilização da SCPd com glicina poderia levar à inibição de um conjunto de neurônios da SCPvl (e talvez do prosencéfalo) envolvidos com comportamentos de defesa, resultando em menor tempo de manifestação do congelamento induzido por estímulo condicionado (contexto).

5.4. O SISTEMA NORADRENÉRGICO DESCENDENTE E A EXPRESSÃO DO CONGELAMENTO INDUZIDO CONTEXTUALMENTE

Tem sido difundido que núcleos monoaminérgicos do sistema modulatório da dor, como os núcleos da rafe e o LC aos quais a SCP está ligada (FREITAS *et al.*, 2005), podem exercer um papel no comportamento de congelamento, bem como no comportamento de antinocicepção induzida pelo medo mediada por monoaminas (COIMBRA *et al.*, 2006).

Apesar da injeção intratecal de neurotoxina noradrenérgica 6-OHDA ter revertido a antinocicepção induzida pelo condicionamento contextual na Fase II A do teste de formalina, mostrando a importância do componente noradrenérgico descendente nesta reação defensiva, nossa abordagem experimental não constatou a relevância deste sistema para a expressão do congelamento contextualmente induzido. Considerando que a execução do comportamento de congelamento eliciado por estímulo condicionado é realizada proeminentemente pela coluna ventrolateral da SCP (De OCA *et al.*, 1998; VIANA, LANDEIRA-FERNANDEZ, BRANDÃO, 2001; McNALLY, JOHANSEN, BLAIR, 2011; GROSS, CANTERAS, 2012; BORELLI *et al.*, 2013; TOVOTE *et al.*, 2016) e que esta região supre preferencialmente o NMR (CAMERON *et al.*, 1995), um núcleo bulbar serotoninérgico que tem projeções à medula espinal, é plausível que a degeneração preferencial de fibras noradrenérgicas descendentes originárias do LC por 6-OHDA (MCBRIDE *et al.*, 1985; LLORCA-TORRALBA, 2016), não afete de modo significativo a execução desta resposta comportamental defensiva. Porém, não podemos desconsiderar que a noradrenalina proveniente de

outras projeções pontinoespinais pode atuar no corno dorsal e participar da mediação desta expressão comportamental defensiva.

A administração por via intratecal de antagonistas de receptores α -adrenérgicos espinais pôde fornecer uma visão mais geral do envolvimento do componente noradrenérgico na manifestação do congelamento, por permitir o antagonismo de receptores α -adrenérgicos ativados por noradrenalina liberada de fibras noradrenérgicas descendentes cujos corpos celulares situam-se em outros núcleos pontinos além do LC. Ao implementarmos a aplicação de ioimbina por via intratecal, um antagonista de receptores α_2 -adrenérgicos, observamos redução do tempo de congelamento em comparação ao grupo controle condicionado. Esse dado indica que o receptor adrenérgico espinal envolvido na expressão do congelamento contextualmente induzido (assim como para a analgesia relacionada) é o receptor α_2 .

5.5. A MENOR INTENSIDADE DE CHOQUE NO DIA DO CONDICIONAMENTO OCASIONOU MAIOR EXPRESSÃO DE CONGELAMENTO E ANALGESIA NO DIA DO TESTE

No condicionamento Pavloviano, a expressão comportamental da associação entre o estímulo incondicionado (EI) e o estímulo condicionado (EC) depende de um mecanismo que envolve a intensidade do estímulo incondicionado e a predição do estímulo condicionado (YOUNG, FANSELOW, 1992).

O EI massivamente utilizado neste tipo de condicionamento é o choque elétrico (LI, McNALLY, 2014). O EC adquire a capacidade de eliciar respostas, designadas por vários autores (FANSELOW, BOLLES, 1979; ROSS, RANDICH, 1985; YOUNG, FANSELOW, 1992; BRANDÃO *et al.*, 2008; LI, McNALLY, 2014) como “respostas condicionadas” caracterizadas como respostas relacionadas ao medo. Em roedores, uma resposta comportamental comum ao medo é o congelamento (FANSELOW, BOLLES, 1979).

Durante o condicionamento aversivo, o EC irá predizer o EI e irá resultar em um segundo tipo de resposta, a analgesia condicionada, sendo esta mediada por opioides (CHANCE, KRYNOCK, ROSECRANS, 1978; FANSELOW, 1984; FANSELOW, BOLLES, 1979; ROSS, RANDICH, 1985).

Com o decorrer do condicionamento, a analgesia gerada atenua o aspecto aversivo do choque, já que este é de natureza nociceptiva. Assim, há um mecanismo de retroalimentação negativa desencadeado pela

analgésia condicionada que controla a quantidade de condicionamento que cada choque suporta. Como o EC vai se tornando cada vez mais fortemente associado com o EI, o animal torna-se cada vez mais analgésico e cada choque adicional vai suportar menos condicionamento, levando à assíntona da curva do aprendizado (YOUNG, FANSELOW, 1992).

Ao considerar que no decorrer da sessão de condicionamento a analgesia gerada tem um impacto direto sobre a capacidade de cada choque em promover associação entre o EI e o estímulo neutro, uma quantidade excessiva de choques poderia ser desnecessária para o aprendizado associativo. Assim, nos experimentos de padronização do protocolo de condicionamento contextual aversivo, utilizamos cinco apresentações de estímulos elétricos nas patas no dia do condicionamento, metade da quantidade geralmente empregada por estudos farmacológicos e moleculares que associam medo condicionado e dor (REA, ROCHE, FINN, 2011, OLANGO *et al.*, 2012, BUTTLER *et al.*, 2011, REA *et al.*, 2013).

Nossos resultados apontaram uma relação inversa entre a intensidade de choque empregada no dia do condicionamento e a resposta comportamental ao medo condicionado (congelamento) no dia do teste, ou seja, a menor intensidade de choque, 0,4 mA, gerou mais tempo na manifestação de congelamento, enquanto a maior intensidade, 0,7 mA, menos tempo. De fato, choques de baixa intensidade são correlacionados com uma menor assíntota, pois menos da resposta condicionada analgésica é necessária para bloquear o impacto do choque. Alternativamente, choques de intensidade mais alta requerem mais analgesia e são correlacionados com uma assíntota de condicionamento superior (YOUNG, FANSELOW, 1992).

A influência da intensidade do EI sobre a aquisição da memória no condicionamento clássico já havia sido proposta em 1972 por Rescorla e Wagner. Esses pesquisadores propuseram um modelo no qual a taxa de crescimento da curva de aprendizado é parcialmente determinada por um parâmetro, β , que é específico para o EI, sendo que uma determinante para esse parâmetro é a intensidade deste estímulo (RESCORLA, WAGNER 1972).

A fisiologia subjacente ao modelo de retroalimentação negativa sustenta que β deve ser determinado pela intensidade percebida e não pela intensidade física do choque (YOUNG, FANSELOW, 1992). Como a analgesia atenua os estímulos dolorosos presinápticamente na primeira sinapse aferente (WATKINS, MAYER, 1982), as informações emocionais sobre a intensidade física do choque não são disponíveis para

níveis mais elevados do SNC, conseqüentemente, a intensidade percebida diminui, assim como a efetividade associativa do choque (YOUNG, FANSELOW, 1992).

Possivelmente, em nossos experimentos, estímulos elétricos nas patas superiores a 0,4 mA podem ter causado diminuição da associação choque-contexto no dia do condicionamento, e, conseqüentemente, no dia do teste, redução do tempo de expressão comportamental durante a evocação dessa associação. Outra manifestação comportamental da evocação da associação choque-contexto foi influenciada por intensidades maiores de choque, a analgesia induzida pelo contexto aversivo. Esta expressão comportamental foi observada no dia do teste, apenas no grupo que recebeu choques com intensidade de 0,4 mA no dia do condicionamento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que o sistema modulatório da dor não depende de uma via neural rotulada ou pré-estabelecida, na qual as mesmas estruturas são redundantemente ativadas. A percepção da dor e a motivação gerada por ela, ou seja, a tomada de decisão ou a mudança de comportamento requer a ativação de diferentes sistemas neuroquímicos em diferentes contextos emocionais/atencionais;

Dependendo da valência emocional atribuída à fonte de estresse (pata ou contexto), ou mesmo, da fase do teste algométrico empregado (formalina), a sensibilização da SCPd com glicina melhora a atividade do sistema noradrenérgico ou este age sozinho (sem necessitar que a SCPd seja sensibilizada por glicina) na modulação de comportamentos defensivos sejam eles nocifensivos ou não (congelamento);

Projeções noradrenérgicas descendentes à medula espinal são importantes para a expressão de analgesia induzida contextualmente. O componente noradrenérgico envolvido nesta função é o receptor α_2 espinal.

Apesar do sobrepujante efeito hipernociceptivo da sensibilização da SCPd com glicina, mediado, na medula espinal, pelo receptor α_1 -adrenérgico, nossos dados indicaram que a microinjeção desse co-agonista do receptor NMDA/GLY-B tem ação bidirecional sobre a nocicepção, podendo também agir de forma inibitória, mas esse resultado somente foi revelado após antagonismo farmacológico do receptor α_2 -adrenérgico; e ação agonística em receptores 5-HT_{1A};

No contexto aversivo, a sensibilização da SCPd com glicina requer outro sistema descendente que não o noradrenérgico;

Nossos dados mostraram que a re-exposição ao contexto aversivo impediu o aumento da nocicepção eliciado pela administração de glicina na SCPd no contexto neutro. Os resultados dessa abordagem experimental nos conduzem à sugestão de que a sensibilização da SCPd com glicina e a re-exposição ao contexto aversivo possa ter gerado um estado emocional que mudou, parcialmente, o foco de atenção da fonte de ameaça, ou seja, da pata para o contexto, resultando em reversão da hipernocicepção. Inferimos então que a SCPd é uma área candidata a comutar entre facilitação da nocicepção e impedimento deste favorecimento dependendo da valência emocional do contexto.

REFERÊNCIAS

- AANTAA, R., MARJAMÄKI, A., SCHEININ, M. Molecular pharmacology of alpha 2-adrenoceptor subtypes. **Ann Med**, v. 27, n.4, p. 439-449, 1995.
- ABBOTT, F. V., FRANKLIN, K. B. J., LUDWICK, R. J., MELZACK, R. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia on different types of pain. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 15, p. 637-640, 1981.
- ABBOTT, F.V., FRANKLIN, K.B., WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, p. 91–102, 1995.
- ABBOTT, F.V., FRANKLIN, K.B.J., CONNELL B. The stress of novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur J Pharmacol**, v. 126, n. 1-2, p. 141-144, 1986.
- ABBOTT, F.V., HONG, Y., FRANKLIN, K.B. J. The effect of lesions of the dorsolateral funiculus on formalin pain and morphine analgesia: a dose-response analysis. **Pain**, v. 65, n. 1, p. 17-23, 1996.
- ABERCROMBIE, E.D., KELLER JR., R.W., ZIGMOND, M.J. Characterization of hippocampal norepinephrine release as measured by microdialysis perfusion: pharmacological and behavioral studies. **Neuroscience**, v. 27, p. 897-904, 1988.
- ADAMS, F. **The Law, Oath of Hippocrates, on the Surgery, and on the Sacred Disease**. Gloucester, United Kingdom: Dodo Press, 2009.
- AKITSUKI, Y., DECETY, J. Social context and perceived agency affects empathy for pain: an event-related fMRI investigation. **Neuroimage**, v. 47, n. 2, p. 722-34, 2009.
- ALHAIDER, A.A., LEI, S.Z., WILCOX, G.L. Spinal 5-HT3 receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. **J Neurosci**, v 11, p.1881-1888, 1991.

ALMEIDA, A., LEITE-ALMEIDA, H., TAVARES, I. Medullary control of nociceptive inputs: reciprocal communications with the spinal cord. **Drug discov today dis mech**, v. 3, n. 3, p. 306-312, 2006.

ALMEIDA, A., STORKSON, R., LIMA, D., HOLE, K., TJØLSEN, A. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. **Eur J Neurosci**, v. 11, p. 110–122, 1999.

ALOISI, A.M., CARLI, G. Nociceptive, environmental and neuroendocrine factors determining pain behaviour in animals. **Prog Brain Res**, v. 110, p. 33-46, 1996.

ALOISI, A.M., PANERAI, A.E., CARLI, G. Nociceptive induced activation of exploratory behavior: a role for β -endorphin. **Med Sci Res**, v. 20, p. 25–26, 1992.

AMBRIZ-TUTUTI, M., S.L. CRUZ, S.L., URQUIZA-MARIN, H., GRANADOS-SOTO, V. Formalin-induced long-term secondary allodynia and hyperalgesia are maintained by descending facilitation. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 98, p. 417-424, 2011.

AN, X., BANDLER, R., ONGUR, D., PRICE, J.L. Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. **J Com Neurol**, v. 401, p.455–479, 1998.

ANTHONY, E.W., NEVINS, M.E. Anxiolytic-like effects of N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor ligands in the rat potentiated startle test. **Eur J Pharmacol**, v. 250, p. 317–324, 1993.

ANTONIADIS, E.A., MCDONALD, R.J. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. **Behav Brain Res**, v. 101, n. 1, p. 1–13, 1999.

APKARIAN, A.V., BUSHNELL, M.C., TREEDE, R.D., ZUBIETA, J.K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **Eur J Pain**, v. 9, p. 463–84, 2005.

ARNTZ, A., DREESSEN, L., DE JONG, P. The influence of anxiety on pain: attentional and attributional mediators. **Pain**, v. 56, p. 307–314, 1994.

ASTON-JONES, G., COHEN, J.D. An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. **Annu Rev Neurosci**, v. 28, p. 403–450, 2005.

BABA H, SHIMOJI K, YOSHIMURA M. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons. **Anesthesiology**, v. 92, p. 473–474, 2000.

BABA, H., GOLDSTEIN, P.A., OKAMOTO, M., KOHNO, T., ATAKA, T., YOSHIMURA, M., SHIMOJ, K. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2): effects on somatodendritic sites of GABAergic neurons. **Anesthesiology**, v. 92, p. 485–492, 2000.

BALIKI, M. N., GEHA, P. Y., APKARIAN, A. V. Parsing pain perception between nociceptive representation and magnitude estimation. **J. Neurophysiol.**, v. 101, p. 875–887, 2009.

BALIKI, M. N., GEHA, P. Y., FIELDS, H. L., APKARIAN, A. V. Predicting value of pain and analgesia: nucleus accumbens response to noxious stimuli changes in the presence of chronic pain. **Neuron**, v. 66, p. 149–160, 2010.

BANDLER, R. Induction of rage following microinjections of glutamate

BANDLER, R., CARRIVE, P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal gray region of restrained cat. **Brain Res.**, v. 439, p. 95-106, 1988.

BANDLER, R., CARRIVE, P., ZHANG, S. P. Integration of somatic and autonomic reactions within the midbrain periaqueductal grey: Viscerotopic, somatotopic and functional organization. **Prog Brain Res**, n. 87, p. 67–154, 1991.

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

BANDLER, R., KEAY, K. A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. **Prog Brain Res**, v. 106, p. 285–300 1996.

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

BANDLER, R., SHIPLEY, M.T., Columnar organization in the midbrain periaqueductal grey: modules for emotional expression? **Trends Neurosci**, v. 17, n. 9, p. 379–389, 1994.

BARASI, S. Responses of substantia nigra neurones to noxious stimulation. **Brain Res**, v. 171, p. 121–130, 1979.

BARON, B.M., HARRISON, B.L., KEHNE, J.H., SCHMIDT, C.J., VANGIERSBERGEN, P.L.M., WHITE, H.S., SIEGEL, B.W., SENYAH, Y., MCCLOSKEY, T.C., FADAYEL, G.M., TAYLOR, V.L., MURAWSKY, M.K., NYCE, P., SALITURO, F.G. Pharmacological characterization of MDL-105,519, an NMDA receptor glycine site antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 323, p. 181–192, 1997.

BASBAUM, A. I., FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Ann Neurol**, v. 4, p. 451–462, 1978.

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

BECERRA, L., BREITER, H. C., WISE, R., GONZALEZ, R. G., BORSOOK, D. Reward circuitry activation by noxious thermal stimuli. **Neuron**, v. 32, p. 927–946, 2001.

BEECHER, H. K. Pain in men wounded in battle. **Ann Surg**, v. 123, p. 96–105, 1946.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog Neurobiol**, v. 46, p. 575 – 605, 1995. in midbrain but not hypothalamus of cats. **Neurosci. Lett.**, v. 30, p.183–188, 1982.

BENEDETTI, F., AMANZIO, M., VIGHETTI, S., ASTEGGIANO, G. The biochemical and neuroendocrine bases of the hyperalgesic nocebo effect. **J Neurosci**, v. 26, p. 12014–12022, 2006.

BENEDETTI, F., MAYBERG, H.S., WAGER, T.D., STOHLER, C.S., AND ZUBIETA, J.K. Neurobiological mechanisms of the placebo effect. **J Neurosci**, v. 25, p. 10390–10402, 2005.

BERNA, C., LEKNES, S., HOLMES, E.A., EDWARDS, R. R., GOODWIN, G. M., TRACEY, I. Induction of depressed mood disrupts emotion regulation neurocircuitry and enhances pain unpleasantness. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 11, p. 1083–1090, 2010.

BERNARD, J. F., BESTER, H., BESSON, J. M. Involvement of the spino-parabrachio -amygdaloid and -hypothalamic pathways in the autonomic and affective emotional aspects of pain. **Prog Brain Res**, v. 107, p. 243–255, 1996.

BIAGIONI, A.F., DE FREITAS, R.L., DA SILVA, J.A., DE OLIVEIRA, R.C., DE OLIVEIRA, R., ALVES, V.M., COIMBRA, N.C. Serotonergic neural links from the dorsal raphe nucleus modulate defensive behaviours organised by the dorsomedial hypothalamus and the elaboration of fear-induced antinociception via locus coeruleus pathways. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 379-394, 2013.

BIAGIONI, A.F., SILVA, J.A., COIMBRA N.C. Panic-like defensive behavior but not fear-induced antinociception is differently organized by dorsomedial and posterior hypothalamic nuclei of *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). **Braz J Med Biol Res**, v. 45, p. 328-336, 2012.

BINGEL U, TRACEY I. Imaging CNS modulation of pain in humans. **Physiol (Bethesda)**, v. 23, n. 3, p. 371–380, 2008.

BJÖRKLUND, A., SKAGERBERG, G. Descending monoaminergic projections to the spinal cord. In: **Brain stem control of spinal mechanisms**. ((Sjolund, B., björklund, A. (eds)), p. 55-88, Amsterdam: Elsevier, 1982.

BLACKBURN-MUNRO, G. Pain-like behaviours in animals – how human are they? **Trends Pharmacol Sci**, v.25, n. 6, 2004.

- BLANCHARD, R.J., YANG, M., LI C.I., GERVACIO, A.,
BLANCHARD, D.C. Cue and context conditioning of defensive behaviors to cat odor stimuli. **Neurosci Biobehav VerRev**, v. 25, 7-8, p. 587-595, 2001.
- BLOMQUIST, A., CRAIG, A. D. Organization of spinal and trigeminal input to the PAG. In: **The midbrain periaqueductal gray matter: Functional, anatomical and neurochemical organization**, p. 345–364 ((Depaulis, A., Bandler, R. (eds)). New York: Plenum, 1991.
- BOIVIE, J. B.A. MEYERSON, B.A.: A correlative anatomical and clinical study of pain suppression by deep brain stimulation. **Pain**, v. 13, p.113-126, 1982.
- BOLLES, R. C., COLLIER, A. C. The effect of predictive cues on freezing in rats. *Anim Learn Behav*, v. 4, p 6–8, 1976.
- BOLLES, R. C., FANSELOW, M. S. A perceptual defensive-recuperative model of fear and pain. **Behav Brain Sci**, v. 3, p. 291-323, 1980.
- BORELLI, K.G., ALBRECHET-SOUZA, L. FEDOCE, A. G., FABRI, D.S. , RESSTEL, L. B., MARCUS L., BRANDÃO, M.L. Conditioned fear is modulated by CRF mechanisms in the periaqueductal gray columns. **Hormo Behav**, v. 63 p. 791–799, 2013.
- BORSZCZ, G.S. Pavlovian conditional vocalizations of the rat: a model system for analyzing the fear of pain. **Behav Neurosci**, v. 109, p. 648–662, 1995.
- BOUTON, M.E., BOLLES, R.C., 1979. Role of conditioned contextual stimuli in reinstatement of extinguished fear. **J. Exp . Psychol. Anim . Behav.**, Process. 5, 368–378, 1979.
- BRIGHTWELL, J.J., TAYLOR, B.K. Noradrenergic neurons in the locus coeruleus contribute to neuropathic pain. **Neuroscience**, 2009;v. 160:, p.174–85, 2009.
- BRODIE, M.S., PROUDFIT, H.K. Antinociception induced by local injections of carbachol into the nucleus raphe magnus in rats: alteration

by intrathecal injection of monoaminergic antagonists. **Brain Res**, v. 371, n. 1, p. 70-79, 1986.

BRUINSTROOP, E., CANO, G., VANDERHORST, V.G., CAVALCANTE, J.C., WIRTH, J., SENA-ESTEVEZ, M., SAPER, C.B. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. **J Comp Neurol**, v. 520, p. 1985–2001, 2012.

BRUN, P., SUAUD-CHAGNY, M.F., GONON, F., BUDA, M. In vivo noradrenaline release evoked in the anteroventral thalamic nucleus by locus coeruleus activation: an electrochemical study. **Neuroscience**, v. 52, p. 961-972, 1993.

BUDAI, D., HARASAWA, I., FIELDS, H.L. Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha 2- adrenergic receptors. **J Neurophysiol**, v.80, n.5, p. 2244–2254 ,2254, 1998.

BUSHNELL, M.C, APKARIAN, A.V. Representation of pain in the brain. In: **Textbook of Pain**, p. 107–24 ((McMahon, S.B., Koltzenburg, M., (eds)). London: Churchill Livingstone, 2005.

BUSHNELL, M. C., CEKO, M., LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nature Neurosci.**, v. 14, p. 502-511, 2013.

BUSHNELL, M.C., DUNCAN, G.H., DUBNER, R., JONES, R.L., MAIXNER, W. Attentional influences on noxious and innocuous cutaneous heat detection in humans and monkeys. **J Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 1103-1110, 1985.and (1984). , **J Neurophysiol**, v. 52, n.1, p.170-187. 1984.

BUTLER, R.K., FINN, D.P. Stress-induced analgesia. **Prog Neurobiol**, v. 88, p. 184–202, 2009.

BUTLER, R.K.,; FORD, G.K.,; HOGAN, M.,; ROCHE, M.,; DOYLE, K.M.,; KELLY, J.P.,; KENDALL, D.A.,; CHAPMAN, V.,; FINN, D.P. Fear-induced suppression of nociceptive behaviour and activation of Akt signalling in the rat periaqueductal grey: role of fatty acid amide hydrolase. **J. Psychopharmacoll.**, v. 26, p.83–91, 2011.

BYLUND, D.B. Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. **Ann NY Acad Sci**, v. 12, n. 763, p. 1-7, 1995.

CALCAGNETTI, D.J.,; HELMSTETTER, F.J., FANSELOW,; M.S. Quaternary naltrexone reveals the central mediation of conditional opioid analgesia. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 27, p. 529-31, 1987.

CAMERON, A.A.,; KHAN, I.A.,; WESTLUND, K. N., WILLIS, W. D. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris -leucoagglutinin study. I. Ascending projections. **J Comp Neurol**, v. 351, p. 568-584, 1995.

CANTERAS, N.S., MOTA-ORTIZ, S.R., MOTTA, S.C. What ethologically based models have taught us about the neural systems underlying fear and anxiety. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 4, p. 321-327, 2012.

CAPONE, F., ALOISI, A. M. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. **Ann Ist Super Sanità**, v. 40, n. 2, p. 223-229, 2004.

CAROBREZ, A.P.,; TEIXEIRA, K.V.,; GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, p. 697-709, 2001.

CARTER, M.E., YIZHAR, O., CHIKAHISA, S., NGUYEN, H., ADAMANTIDIS, A., NISHINO, S., DEISSEROTH, K., DE LECEA, L. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. **Nat Neurosci**, v. 13, p.1526-1533, 2010.

CARTY, A. J. Opportunistic infections of mice and rats: Jacoby and Lindsey revisited. **ILAR J**, v. 49, n. 3, p. 272-276, 2008.

CAVALLI, J., BERTOGLIO, L.J., CAROBREZ, A.P. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 92, p. 512-518, 2009.

CHANCE, W. T., KRYNOCK, G. M., ROSECRANS, J. A. Antinociception following lesion-induced hyperemotionality and conditioned fear. **Pain**, v. 4, n. 3, p. 243-52, 1978.

CHENG, Y., CHEN, C., LIN, C. P., CHOU, K. H., DECETY, J. Love hurts: an fMRI study. **Neuroimage**, v. 51, p. 923–929, 2010.

CHUDLER, E. H., ANTON, F., DUBNER, R., KENSHALO, D. R. Jr. Responses of nociceptive SI neurons in monkeys and pain sensation in humans elicited by noxious thermal stimulation: effect of interstimulus interval. **J Neurophysiol**, v. 63, p. 559–569, 1990.

CHUDLER, E. H., DONG, W. K. The role of the basal ganglia in nociception and pain. **Pain**, v. 60, p. 3–38, 1995.

CHUDLER, E. H., SUGIYAMA, K., DONG, W. K. Nociceptive responses in the neostriatum and globus pallidus of the anesthetized rat. **J Neurophysiol**, v. 69, p. 1890–1903, 1993.

CLARK, F.M., PROUDFIT, H.K. Anatomical evidence for genetic differences in the innervation of the rat spinal cord by noradrenergic locus coeruleus neurons. **Brain Res**, v. 591, p. 44–53. 1992.

CLARK, F.M., PROUDFIT, H.K. The projection of noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat demonstrated by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. **Brain Res**, v. 547, p. 279–288, 1991.

CLARK, F.M., YEOMANS, D.C., PROUDFIT, H.K. The noradrenergic innervation of the spinal cord: differences between two substrains of Sprague-Dawley rats determined using retrograde tracers combined with immunocytochemistry. **Neurosci Lett**, v. 125, p. 155–158, 1991.

CODERRE, T.J., MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J Neurosci**, v.12, n. 9, p. 3665-70, 1992.

CODERRE, T.J., VACCARINO, A.L., MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, v. 535, n.1, p.155-158, 1990.

CODERRE, T.J., YASHPAL, K., HENRY, J.L. Specific contribution of lumbar spinal mechanisms to persistente nociceptive responses in the formalin test. **Neuro Report** v. 5, p. 1337-1340, 1994.

COFFIELD, J.A., BOWEN, K.K., MILETIC, V. Retrograde tracing of projections between the nucleus submedialis, the ventrolateral orbital cortex, and the midbrain in the rat. **J Comp Neurol**, v. 321, p.488-499, 1992.

COIMBRA, N.C., BRANDÃO, M.L. GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. **Behav Brain Res**, v. 59, p. 131– 139, 1993.

COIMBRA, N.C., DE OLIVEIRA, R., FREITAS, R.L., RIBEIRO, S.J., BORELLI, K.G., PACAGNELLA, R.C., MOREIRA, J.E., DA SILVA, L.A., MELO, L.L., LUNARDI, L.O., BRANDÃO, M.L. Neuroanatomical approaches of the tectum-reticular pathways and immunohistochemical evidence for serotonin-positive perikarya on neuronal substrates of the superior colliculus and periaqueductal gray matter involved in the elaboration of the defensive behavior and fear-induced analgesia. **Exp Neurol**, v. 197, n. 1, p. 93-112, 2006.

COIMBRA, N.C., TOMAZ, C., BRANDÃO, M.L. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. **Behav Brain Res**, v. 50, p. 77– 83, 1992.

COLLOCA, L., BENEDETTI, F. Nocebo hyperalgesia: how anxiety is turned into pain. **Cur Opin Anaesthesiol**, v. 20, p. 435–439, 2007.

COLLOCA, L., BENEDETTI, F. Placebos and painkillers: is mind as real as matter? **Nat Rev Neurosci**, v. 6, p. 545–552, 2005.

CONWAY, B.A., HULTBORN, H., KIEHN, O., MINTZ, I. Plateau potentials in alpha-motoneurons induced by intravenous injection of L-dopa and clonidine in the spinal cat. **J Physiol**, v. 405, p. 369-384, 1988.
CORBETT, R., DUNN, R.W. Effects of 5,7 dichlorokynurenic acid on conflict, social interaction and plus maze behaviors. **Neuropharmacol**, v. 32, n. 5, p. 461-6, 1993.

CORBETTA, M., SHULMAN, G. L. Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. **Nature Rev Neurosci**, v. 3, p. 201–215, 2002.

CRAIG, A. D. Significance of the insula for the evolution of human awareness of feelings from the body. **Ann NY Acad Sci**, v. 1225, p. 72–82, 2011.

CRAIG, A. D., DOSTROVSKY, J. O. Thermoreceptive lamina I trigeminothalamic neurons project to the nucleus submedius in the cat. **Exp Brain Res**, v. 85, p. 470–474, 1991.

CRAIG, A.D. A new view of pain as a homeostatic emotion. **Trends Neurosci** v. 26, n. 6, p. 303-307, 2003.

CRESPI, F. Anxiolytics antagonize yohimbine-induced central noradrenergic activity: a concomitant in vivo voltammetry-electrophysiology model of anxiety. **J Neurosci Methods**, v. 180, p. 97-105, 2009.

DAHLSTRÖM, A., FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta Physiol Scand**, v. 62, s. 232, p.1–55, 1964.

DANYSZ, W., PARSONS, C.G. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. **Pharmacol Rev**, v. 50, p. 597–664, 1998.

DAY, H.E., CAMPEAU, S., WATSON, S.J. JR, AKIL, H. Distribution of α_{1a} -, α_{1b} - and α_{1d} - adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. **J Chem Neuroanat**, v. 13, n. 2, p. 115-139, 1997.

DE FELICE, M., OSSIPOV M.H. Cortical and subcortical modulation of pain. **Pain Manag**, v. 6, n. 2, p. 111-120., 2016.

DE OCA, B.M., DECOLA, J.P., MAREN, S., FANSELOW, M.S. Distinct regions of the periaqueductal gray are involved in the acquisition and expression of defensive responses. **J Neurosci**, v. 18, n. 9, p. 3426-3432, 1998.

DE OLIVEIRA, R.W., DEL BEL, E.A., GUIMARÃES, F.S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res Bull**, v. 51, n. 6, p. 457-464, 2000.

DEPAULIS, A., BANDLER, R., VERGNES, M. Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjections of kainic acid. **Brain Res**, v. 486, n. 1, p. 121-32, 1989.

DERBYSHIRE, S. W. G., OSBORN, J. Offset analgesia is mediated by activation in the region of the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Neuroimage**, v. 47, n. 3, p. 1002–1006, 2009.

DERBYSHIRE, S.W.G., WHALLEY, M. G., STENGER, V. A., OAKLEY, D. A. Cerebral activation during hypnotically induced and imagined pain. **Neuroimage**, v. 23, p. 392– 401, 2004.

DE-SOUZA, M.M., SCHENBERG, L.C., CAROBREZ, A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxioselective drug effects on plus-maze performance. **Behav Brain Res**, v. 90, p. 157-165, 1998.

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

DOGRUL, A, OSSIPOV, M.H., PORRECA, F. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. **Brain Res**, v. 1280, p. 52-59, 2009.

DONAHUE, R.R., STACEY, C., LA GRAIZE, S.C., PERRY, N., FUCHS, P.N. Electrolytic lesion of the anterior cingulate cortex decreases inflammatory, but not neuropathic nociceptive behavior in rats. **Brain Res.**, v. 89, p. 7131–7138, 2001.

DOYLE, C., MAXWELL, D. Catecholamine innervation of the spinal dorsal horn: A correlated light and electron microscopic analysis of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive fibers in the cat. **Neuroscience**, v. 45, n.1, p. 161–176, 1991a.

DOYLE, C., MAXWELL, D. Ultrastructural analysis of noradrenergic nerve terminals in the cat lumbosacral spinal dorsal horn: A dopamine-

B-hydroxylase immunocytochemical study. **Brain Res**, v., 563, n. 1-2, p. 329–333, 1991b.

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

DUM, R. P., LEVINTHAL, D. J., STRICK, P. L. The spinothalamic system targets motor and sensory areas in the cerebral cortex of monkeys. **J Neurosci**, v. 29, p. 14223–14235, 2009.

DUNCKLEY, P. AZIZ, Q., WISE, R.G., BROOKS, J., TRACEY, I., CHANG, L. et al. Attentional modulation of visceral and somatic pain. **Neurogastroenterol Motil**, v. 19, p. 569–577, 2007.

DUNCKLEY, P., WISE, R.G., FAIRHURST, M. HOBDEN, P. AZIZ, Q., CHANG, L. TRACEY, I. et al. A comparison of visceral and somatic pain processing in the human brainstem using functional magnetic resonance imaging. **J Neurosci**, v. 25, p. 7333–7341, 2005.

EIPPERT, F, TRACEY, I. The spinal cord is never at rest. **eLife**, v. 3, p. 1-3, 2014.

EIPPERT, F., BINGEL, U. , SCHOELL, E.D., YACUBIAN, J., KLINGER, R., LORENZ J., BÜCHEL, C. Activation of the opioidergic descending pain control system underlies placebo analgesia. **Neuron**, v. 63, p. 533–543, 2009 a.

EIPPERT, F., FINSTERBUSCH, J., BINGEL, U., BÜCHEL, C. Direct evidence for spinal cord involvement in placebo analgesia. **Science**, v. 326, p. 404, 2009 b.

EISENBERGER, N.I., LIEBERMAN, M.D., WILLIAMS, K.D. Does rejection hurt? An fMRI study of social exclusion. **Science**, v. 302, p. 290–292, 2003.

FAIRHURST, M., FAIRHURST, K., BERNA, C., TRACEY I. An fMRI study exploring the overlap and differences between neural representations of physical and recalled pain. **PLoS One**, v. 7, p. 1-10, 2012.

- FAIRHURST, M., WIECH, K., DUNCKLEY, P., TRACEY, I.,
Anticipatory brainstem activity predicts neural processing of pain in humans. **Pain**, v. 128, p. 101–110, 2007.
- FANG, F., PROUDFIT H. K. Antinociception produced by microinjection of morphine in the periaqueductal gray is enhanced in the rat foot, but not the tail, by intrathecal injection of alpha1-adrenoceptor antagonists. **Brain Res**, v. 790, p. 14–24, 1998.
- FANSELOW, M.S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. **Pavlov J Biol Sci**, v. 15, p. 177-182, 1980.
- FANSELOW, M.S. Conditioned fear-induced opiate analgesia: a competing motivational state theory of stress analgesia. **Ann New York Acad Sci**, v. 467, p. 40–54, 1986.
- FANSELOW, M.S. Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. **Behav Brain Res**, v. 110, p. 73-81, 2000.
- FANSELOW, M.S. Opiate modulation of the active and inactive components of the postshock reaction: parallels between naloxone pretreatment and shock intensity. **Behav Neurosci**, v. 98, n. 2, p. 269-277, 1984.
- FANSELOW, M.S., BAACKES, M.P. Conditioned fear-induced opiate analgesia on the formalin test: evidence for two aversive motivational systems. **Learn Motiv**, v. 13, p. 200–221, 1982.
- FANSELOW, M.S., BOLLES, R.C. Naloxone and shock-eliciting freezing in the rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 93, p. 736–744, 1979.
- FANSELOW, M.S., HELMSTETTER, F.J. Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. **Behav Neurosci**, v. 102, p. 233–243, 1988.
- FANSELOW, M.S., LESTER, L.S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behaviour: predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behaviour. In: **Evolution and learning**. Bolles, R.C., Beecher, M.D. (Ed.). Erlbaum: Hillsdale, p. 185-212, 1988.

FANSELOW, M.S., TIGHE, T.J. Contextual conditioning with massed versus distributed unconditional stimuli in the absence of explicit conditional stimuli. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 14, p. 187–199, 1988.

FASMER, O.B., BERGE, O.G., TVEITEN, L. AND HOLE, K., Changes in nociception after 6-hydroxydopamine lesions of descending catecholaminergic pathways in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 24, p. 1441–1444, 1986.

FENDT, M., FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 23, p. 743–760, 1999.

FERIA, M., SANCHEZ, A., ABAD, F., ABREU, P. Effects of selective neurotoxic lesion of lumbosacral serotonergic and noradrenergic systems on autotomy behaviour in rats. **Pain** v. 51 p. 101–109, 1992.

FERGUSON, R., AHLES, T.A. Private body consciousness, anxiety and pain symptom reports of chronic pain patients. **Behav Res Ther**, v. 36, n. 5, p. 527–535, 1998

FIELDS, H. L. Pain: an unpleasant topic. **Pain**, v. 82, s. 1, p. s61–s69, 1999.

FIELDS, H. L. Understanding how opioids contribute to reward and analgesia. **Reg Anesth Pain Med.**, v. 32, p. 242–246, 2007.

FILE, S.E., FLUCK, E., FERNANDES, C. Beneficial effects of glycine (bioglycin) on memory and attention in young and middle-aged adults. **J Clin Psychopharmacol**, v.19, n. 6, p. 506–512, 1999.

FINN, D.P., BECKETT, S.R., RICHARDSON, D., KENDALL, D.A., MARSDEN, C.A., CHAPMAN, V. Evidence for differential modulation of conditioned aversion and fear conditioned analgesia by CB1 receptors. **Eur J Neurosci**, v. 20, p. 848–52, 2004.

FLETCHER, E.J., LODGE, D. Glycine reverses antagonism of N-methyl-D-aspartate (NMDA) by 1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2 (HA-

966) but not by D-2- amino-5-phosphonovalerate (D-AP5) on rat cortical slices. **Eur J Pharmacol**, v.151, p. 161–162, 1988.

FLOR, H., BIRBAUMER, N., SCHULZ, R., GRÜSSER, S.M., MUCHA, R.F. Pavlovian conditioning of opioid and nonopioid pain inhibitory mechanisms in humans. **Eur. J. Pain**, v. 6, n. 5, p. 395-402, 2002.

FLOYD, N.S., PRICE, J.L., FERRY, A.T., KEAY, K.A, BANDLER, R. Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. **J Comp Neurol**, v. 422, p. 556-578, 2000.

FOLETTI, V.R.S., MARTINS, M.A., TONUSSI, C.R. The Involvement of potassium channels in the peripheral antiedematogenic effect of intrathecally injected morphine in rats. **Anesth Analg**, v. 116, n. 1, p. 232–238, 2013.

FOO, H., HELMSTETTER, F.J. Hypoalgesia elicited by a conditioned stimulus is blocked by a mu, but not a delta or a kappa, opioid antagonist injected into the rostral ventromedial medulla. **Pain**, v. 83, p. 427-431, 1999.

FORD, G. K., MORIARTY, O., MCGUIRE, B. E., FINN, D. P. Investigating the effects of distracting stimuli on nociceptive behaviour and associated alterations in brain monoamines in rats. **Eur J Pain**, v. 12, p. 970–979, 2008.

FRIEDMAN, D. P., MURRAY, E. A., O'NEILL, J. B., MISHKIN, M. Cortical connections of the somatosensory fields of the lateral sulcus of macaques: evidence for a corticolimbic pathway for touch. **J Comp Neurol**, v. 252, p. 323–347, 1986.

FRITSCHY, J. M., GRZANNA, R. Demonstration of two separate descending noradrenergic pathways to the rat spinal cord: Evidence for an intragriseal trajectory of locus coeruleus axons in the superficial layers of the dorsal horn. **J Comp Neurol**, v. 291, p. 553-582, 1990.

FRITSCHY, J. M., LYONS, W. E., MULLEN, C. A., KOSOFSKY, B. E., MOLLIVER, M. E., GRZANNA, R.: Distribution of locus coeruleus

axons in the rat spinal cord: A combined anterograde transport and immunohistochemical study. **Brain Res**, v. 437, p. 176-180, 1987.

FUNG, S.J., MANZONI, D., CHAN, J.Y.H., POMPEIANO, O., BARNES, C.D. Locus coeruleus control of spinal motor output. **Prog Brain Res**, v. 88, p. 395-409, 1991.

reports of chronic pain patients. **Behav Brain Res**, v. 36, n.5, p. 527-35, 1998.

GASSNER, M., RUSCHEWEYH, R., SANDKÜHLER, J. Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. **Pain**, v. 145, n. 1-2, p. 204-210, 2009.

GEUTER, S., BÜCHEL, C. Facilitation of pain in the human spinal cord by placebo treatment. **J Neurosci**, v. 33, p. 13784-13790, 2013.

GISPEN, W.H., WIEGANT, V.M., BRADBURY, A.F., HULME, E.C., SMYTH, D.G., GREEN, G.M., SCARTH, J., DICKENSON, A. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission, state-dependent actions via dorsal horn 5-HT (3) receptors in the anaesthetized rat. **Pain**, v. 89, p. 81-88, 2000.

GREENSPAN, J. D., LEE, R. R., LENZ, F. A. Pain sensitivity alterations as a function of lesion location in the parasympathetic cortex. **Pain**, v. 81, p. 273-282, 1999.

GROSS, C.T., CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature Neurosci**, v.13, p. 651-658, 2012.

GRZANNA, R., FRITSCHY, J. M. Efferent projections of different subpopulations of central noradrenaline neurons. **Prog Brain Res**, v. 88, p. 89-101, 1991.

GUITTON, M.J., DUDAI, Y. Anxiety-like state associates with taste to produce conditioned taste aversion. **Biol Psychiatry**, v. 56, p. 901-904, 2004.

GUTIERREZ, T., NACKLEY, A.G., NEELY, M.H., FREEMAN, K.G., EDWARDS, G.L., HOHMANN, A.G. Effects of neurotoxic destruction of descending noradrenergic pathways on cannabinoid

antinociception in models of acute and tonic nociception. **Brain Res**, v. 987, n. 2, p. 176-85, 2003.

HAGIHIRA, S., SENBA, E., YOSHIDA, S., TOHYAMA, M., YOSHIYA, I. Fine structure of noradrenergic terminals and their synapses in the rat spinal dorsal horn: An immunohistochemical study. **Brain Res**, v. 526, n. 1, p. 73–80, 1990.

HAGUE, C., UBERTI, M., CHEN, Z. J., AND MINNEMAN, K. P. Alpha (1) adrenergic receptor subtypes: non-identical triplets with different dancing partners? **Life Sci**, v. 74, n. 4, p. 411- 418, 2003.

HAMILTON, B.L. Citoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. **J Comp Neurol**, v. 149, p. 1-128, 1973.

HAOUR, F. Mechanisms of the placebo effect and of conditioning. **Neuroimmunomodulation**, v. 12, p. 195–200, 2005.

HAYASHIDA, K., DEGOES, S., CURRY, R., EISENACH, J.C. Gabapentin activates spinal noradrenergic activity in rats and humans and reduces hypersensitivity after surgery. **Anesthesiology**, v. 106, n. 3, p. 557-62, 2007.

HAYASHIDA, K., PETERS, C.M., GUTIERREZ, S., EISENACH, J.C. Depletion of endogenous noradrenaline does not prevent spinal cord plasticity following peripheral nerve injury. **J Pain**, v. 13, n. 1, p. 49-57, 2012.

HEAD, H., HOLMES, G. Sensory disturbances from cerebral lesions. **Brain**, v. 34, p. 102-254, 1911.

HEDO, G., LOPEZ-GARCIA, J.A. Alpha-1A adrenoceptors modulate potentiation of spinal nociceptive pathways in the rat spinal cord in vitro. **Neuropharmacol**, v. 41, p.862–869, 2001.

HEINRICHER, M. M., TAVARES, I., LEITH, J.L., LUMB, B.M. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res Rev**, v. 60, p. 214-225, 2009.

HEINRICHER, M.M., FIELDS, H.L. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: **Wall and Melzack's textbook of**

pain, 6th edition ((McMahon SB, Koltzenburg M, Tracey, I., Turk, D.C. (eds)), p. 129-142. EUA: Elsevier Saunders, Philadelphia, 2013.

HEINRICHER, M.M., NEUBERT, M.J., MARTENSON, M.E., GONÇALVES, L. Prostaglandin E2 in the medial preoptic area produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla. **Neuroscience**, v. 128, n. 2, p. 389-398, 2004.

HELMSTETTER, F.J., TERSHNER, S.A. Lesions of the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla disrupt antinociceptive but not cardiovascular aversive conditional responses. **J Neurosci**, v. 14, n. 11, p. 7099-70108, 1994.

HICKEY, L., LI Y., FYSON, S.J., WATSON, T.C., PERRINS, R., HEWINSON, J., TESCHEMACHER, A.G., FURUE, H., LUMB, B.M., PICKERING, A.E. et al., 2014). Optoactivation of locus ceruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. **J Neurosci**, v. 34, n. 12, p. 4148-60, 2014.

HIEBLE, J.P., BYLUND, D.B., CLARKE, D.E., EIKENBERG, D.C., LANGER, S.Z., HILTON, S. M., REDFERN, W. S. A search for brainstem cell groups integrating the defence reaction in the rat. **J Physiol (Lond.)**, v. 378, p.213–228, 1986.

HÖKFELT, T., JOHANSSON, O., GOLDSTEIN, M. Central catecholamine neurons as revealed by immunohistochemistry with special reference to adrenaline neurons. In: **Handbook of chemical neuroanatomy**, p. 157–276 ((Bjorklund, A., Hokfelt, T., (eds)). Amsterdam: Elsevier, 1984.

HOLDEN, J. E., NALEWAY, E. Microinjection of carbachol in the lateral hypothalamus produces opposing actions on nociception mediated by $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ – adrenoceptors. **Brain Res**, v. 911, p. 27–36, 2001.

HOLDEN, J.E., SCHWARTZ, E.J., PROUDFIT, H.K. Microinjection of morphine in the A7 catecholamine cell group produces opposing effects on nociception that are mediated by $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ – adrenoceptors. **Neuroscience**, v. 91, p. 979– 990, 1999.

- HOLDEN, J.E., VAN POPPEL, A.Y., THOMAS, S. Antinociception from lateral hypothalamic stimulation may be mediated by NK(1) receptors in the A7 catecholamine cell group in rat. **Brain Res**, v. 953, n. 1-2, p. 195-204, 2002.
- HOLMES, A., QUIRK, G.J. Pharmacological facilitation of fear extinction and the search for adjunct treatments for anxiety disorders-the case of yohimbine. **Trends Pharmacol Sci**, v. 31, p. 2-7, 2010.
- HOSOKAWA, T., KATO, K., INOUE, M., MIKAMI, A. Neurons in the macaque orbitofrontal cortex code relative preference of both rewarding and aversive outcomes. **Neurosci Res**, v. 57, p. 434-445, 2007.
- HOUNSGAARD, J., HULTBORN, H., JESPERSEN, B., KIEHN, O. Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. **J Physiol**, v. 405, p. 345-367, 1988.
- HOWORTH, P.W., THORNTON, S.R., O'BRIEN, V., SMITH, W.D., NIKIFOROVA, N., TESCHEMACHER, A.G., PICKERING, A. Retrograde viral vector-mediated inhibition of pontospinal noradrenergic neurons causes hyperalgesia in rats. **J Neurosci**, v. 29, p. 12855-12864, 2009.
- HUNG, K.C., WU, H.E., MIZOGUCHI, H., LEITERMANN, R., TSENG, L.F. Intrathecal treatment with 6-hydroxydopamine or 5,7-dihydroxytryptamine blocks the antinociception induced by endomorphin-1 and endomorphin-2 given intracerebroventricularly in the mouse. **J Pharmacol Sci**, v. 93: p. 299-306, 2003.
- JANSEN, A.S.P., FARKAS, E., MAC SAMS, J., LOEWY, A.D. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. **Brain Res**, v. 797, n. 2, p. 368, 1998.
- JASMIN, L., BOUDAH, A., OHARA, P.T. Long-term effects of decreased noradrenergic central nervous system innervation on pain behavior and opioid antinociception. **J Compar Neurol**, v. 460, p. 38-55, 2003.

JASMIN, L., RABKIN, S.D., GRANATO, A., BOUDAH, A., OHARA, P.T. Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. **Nature**, v. 424, p. 316-320, 2003.

JENSEN, K. B. BERNA, C., LOGGIA, M.L., WASAN, A.D., EDWARDS, R.R., GOLLUB, R.L. The use of functional neuroimaging to evaluate psychological and other nonpharmacological treatments for clinical pain. **Neurosci Lett**, v. 520, p. 156-164, 2012.

JEONG, S. H., HEO, B. H., PARK, S. H., KIM, W. M., LEE, H. G., YOON, M. H. CHOI, J. I. I. Spinal noradrenergic modulation and the role of the alpha-2 receptor in the antinociceptive effect of intrathecal nefopam in the formalin test. **Korean J Pain**, v. 27, n. 1, p. 23-29, 2014.

JEONG, Y., MOES, J.R., WAGNER, M., HOLDEN, J.E. The Posterior Hypothalamus Exerts Opposing Effects on Nociception via the A7 Catecholamine Cell Group in Rat. **Neuroscience**, v. 227, p. 144-153, 2012.

JOHANSEN, J.P., FIELDS, H.L. Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. **Nature Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 398-403, 2004.

JOHANSEN, J.P., FIELDS, H.L., MANNING, B.H. The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 8077-8082, 2001.

JOHANSEN, J.P., TARPLEY, J.W., LEDOUX, J.E., BLAIR, H.T. Neural substrates for expectation-modulated fear learning in the amygdala and periaqueductal gray. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 8, p. 979-986, 2010.

JOHNSTON, I.N., MAIER, S.F., RUDY, J.W., WATKINS, L.R. Post-conditioning experience with acute or chronic inflammatory pain reduces contextual fear conditioning in the rat. **Behav Brain Res**, v. 226, n. 2, p. 361-368, 2012.

KAWAI, N., YAMAMOTO, T., BABA, A., YAMAMOTO, H., MOROJI, T. Inhibitory effect of idazoxan on forskolin-stimulated

adenylate cyclase activity through 5-hydroxytryptamine_{1a} receptors.

Arzneim Forsch Drug Res, v. 44, p.1–3, 1994.

KAWASAKI, Y., KUMAMOTO, E., FURUE, H., YOSHIMURA, M. Alpha 2 adrenoceptor-mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons.

Anesthesiology, v. 98, p. 682–689, 2003.

KEAY, K. A., FEIL, K., GORDON, B. D., HERBERT, H., BANDLER, R. Spinal afferents to functionally distinct periaqueductal gray columns in the rat: An anterograde and retrograde tracing study. **J. Comp.**

Neurol., v. 385, p. 207–229, 1997.

KEAY, K.A., BANDLER, R. Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculation. **Exp Physiol**, v. 87, p. 275–279, 2002.

KEEFE, F.J. FILLINGIM, R.B. WILLIAMS, D.A. Behavioral assessment of pain: nonverbal measures in animals and humans. **ILAR**, v. 33, n. 1 -2, p. 3-13, 1991.

KELTNER, J. R., FURST, A., FAN, C., REDFERN, R., INGLIS, B., FIELDS, H.L. Isolating the modulatory effect of expectation on pain transmission: a functional magnetic resonance imaging study. **J**

Neurosci, v. 26, p. 4437–4443, 2006.

KEMP, J.A, FOSTER, AC, LEESON, PD, PRIESTLY, T, TRIDGETT, R, IVERSEN L.L., WOODRUFF, G.N. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, p. 6547–6550, 1988.

KEMP, J.A., LEESON, P.D. The glycine site of the NMDA receptor: 5 years on. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14, n.1, p. 20-25, 1993.

KENSHALO, D. R. JR, CHUDLER, E. H., ANTON, F., DUBNER, R. SI nociceptive neurons participate in the encoding process by which monkeys perceive the intensity of noxious thermal stimulation. **Brain Research**, v. 454, p. 378–382, 1988.

KENSHALO, D. R. JR, ISENSEE, O. Responses of primate SI cortical neurons to noxious stimuli. **J Neurophysiol**, v. 50, p. 1479–1496, 1983.

KEOGH, E., HATTON, K., ELLERY, D. Avoidance versus focused attention and the perception of pain: differential effects for men and women. **Pain**, v. 85, n. 1-2, p.225–230, 2000.

KIM, I. J., PARK, S. H., LEE, H. S., YOON, M. H. The role of spinal adrenergic receptors on the antinociception of ginsenosides in a rat postoperative pain model. **Korean J Anesthesiol**, v. 65, n. 1, p. 55-60, 2013.

KIM, J.J., RISON, R.A., FANSELOW, M.S. Effects of amygdala, hippocampus, and periaqueductal gray lesions on short- and long-term contextual fear. **Behav Neurosci**, v. 107, n. 6, p. 1093-1098, 1993.

KIM, J.Y., TILLU, D.V., QUINN, T.L., MEJIA, G.L., SHY, A., ASIEDU, M.N., MURAD, E., SCHUMANN, A.P., TOTSCH, S.K., SORGE, R.E., MANTYH, P.W., DUSSOR, G., PRICE, T.J. Spinal dopaminergic projections control the transition to pathological pain plasticity via a D1/D5-mediated mechanism. **J Neurosci**, v. 35, n. 16, p. 6307-6317, 2015.

KINCHESKI, G. C., MOTA-ORTIZ, S. R., PAVESI, E., CANTERAS, N.S., CAROBREZ, A.P. The Dorsolateral Periaqueductal Gray and Its Role in Mediating Fear Learning to Life Threatening Events. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 1-14, 2012.

KLECKNER, N.W., DINGLELINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Science**, v. 241, p. 835-837, 1988.

KLENERMAN, L., SLADE, P.D., STANLEY, I.M., PENNIE, B., REILLY, J.P., ATCHISON, L.E., TROUP, J.D., ROSE, M.J. The prediction of chronicity in patients with an acute attack of low back pain in a general practice setting. **Spine (Phila Pa, 1976)**, v. 20, n. 4, p. 478-484, 1995.

KNUDSEN, L. PETERSEN, G.L., NØRSKOV, K. N. FINNERUP, L.V.N., JENSEN, T.S., SVENSSON, P. Review of neuroimaging studies related to pain modulation. **Scand J Pain**, v. 2, p. 108–120, 2011.

KOYAMA, T., MCHAFFIE, J.G., LAURIENTI, P.J., COGHILL, R.C. The subjective experience of pain: where expectations become reality. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 36, p. 12950-12955, 2005.

KREIGER, J. E., GRAEFF, F. G. Defensive behaviour and hypertension induced by glutamate in the midbrain central grey of the rat. **Braz J Med Biol Res**, v. 18, p. 61– 67, 1985.

LaBUDA, C. J., FUCHS, P. N. A behavioral test paradigm to measure the aversive quality of inflammatory and neuropathic pain in rats. **Exp Neurol**, v.163, p. 490–494, 2000.

LaGRAIZE, S.C., LaBUDA, C.J., DONAHUE, R.R., RUTLEDGE, M.A., JACKSON, R.L., FUCHS, P.N. Cingulate cortex lesions attenuate escape / avoidance behavior but have no effect on hyperalgesia following L5 ligation in rats, **Soc Neurosci Abstr**, v. 26, p. 650, 2000.

LAMM, C., DECETY, J., SINGER, T. Meta-analytic evidence for common and distinct neural networks associated with directly experienced pain and empathy for pain. **Neuroimage**, v. 54, p. 2492–2502, 2011.

LARSON, C.R., KISTLER, M.K. The relationship of periaqueductal gray neurons to vocalization and laryngeal EMG in the behaving monkey. **Exp Brain Res**, v. 63, n. 3, p. 596-606, 1986.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, n.4, p. 597–652, 2001.

LeDOUX, J. E., IWATA, J., CICCHETTI, P., REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **J Neurosci**, v. 8, p. 2517–2529, 1988.

LEE, M. C., TRACEY, I. Imaging pain: a potent means for investigating pain mechanisms in patients. **Br J Anaesth**, v. 111, n. 1, p. 64–72, 2013.

LEESON, P.D. Glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. In: **Drug Design for Neuroscience** ((Kozikowski, A. P. (ed.)), p. 339-381. Raven Press, New York, 1993.

LEESON, P.D., IVERSEN, L.L. The glycine site on the NMDA receptor: Structure activity relationships and therapeutic potential. **J Med Chem**, v. 37, p. 4053–4067, 1994.

LEFKOWITZ, R.J., MINNEMAN, K.P., RUFFOLO, R. JR. International Union of Pharmacology X. Recommendation for nomenclature of α 1-adrenoceptors: Consensus update. *Pharmacol Ver*, v. 47, p. 267–270, 1995.

LEI, J., JIN L., ZHAO, Y., SUI, M.Y., HUANG, L., TAN, Y.X., CHEN, Y.K., YOU, H.J. Sex-related differences in descending norepinephrine and serotonin controls of spinal withdrawal reflex during intramuscular saline induced muscle nociception in rats. **Exp. Neurol**, v. 228, n. 2, p. 206–14, 2011.

LEKNES, S., BERNA, C., LEE, M.C., SNYDER, G.D., BIELE, G., TRACEY, I. The importance of context: When relative relief renders pain pleasant. **Pain**, v. 154, p. 402–410, 2013.

LI, S .S. Y., McNALLY, G. P. The conditions that promote fear learning: Prediction error and Pavlovian fear conditioning. **Neurobiol Learn Mem**, v. 108, p. 14-21, 2014.

LIGHT, A.R., PERL, E.R. Spinal termination of functionally identified primary afferent neurons with slowly conducting myelinated fibers. **J Comp Neurol**, v. 186, n. 2, p. 133-50, 1979.

LIMA, D., ALMEIDA, A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. **Prog Neurobiol**, v. 66, p. 81–108, 2002.

LINNMAN, C., MOULTON, E. A., BARMETTLER, G., BECERRA, L., BORSOOK, D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: State of the field. **Neuroimage**, v. 60, p. 505–522, 2012.

LINTON, S.J., SHAW. W. S. Impact of psychological factors in the experience of pain. **Phys Ther**, v. 91, n. 5, 2011.

LLADÓ, J., ESTEBAN, S, GARCÍA-SEVILLA, J.A. The α 2-adrenoceptor antagonist idazoxan is an agonist at 5-HT_{1A} autoreceptors

modulating serotonin synthesis in the rat brain in vivo. **Neurosci Lett**, v. 218, p.111–114, 1996.

LLORCA-TORRALBA, M., BORGES, G., NETO, F., MICO, J.A., BERROCOSO, E. Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. **Neuroscience**, v. 338, p. 93-113, 2016.

LOGGIA, M. L., MOGIL, J. S., BUSHNELL, M. C. Empathy hurts: compassion for another increases both sensory and affective components of pain perception. **Pain**, v.136, p. 168–176, 2008 b.

LOGGIA, M. L., MOGIL, J. S., BUSHNELL, M. C. Experimentally induced mood changes preferentially affect pain unpleasantness. **J Pain**, v. 9, n. 9, p. 784–791, 2008 a.

LOVICK, T.A. Analgesia and the cardiovascular changes evoked by stimulating neurones in the ventrolateral medulla in rats. **Pain**, v. 25, n. 2, p.259-268, 1986.

LUMB, B.M. Hypothalamic and midbrain circuitry that distinguishes between escapable and inescapable pain. **News Physiol Sci**, v.19, p. 22–26, 2004.

MAEDA, M., TSURUOKA, M., HAYASHI, B., NAGASAWA, I., INOUE, T. Descending pathways from activated locus coeruleus/subcoeruleus following unilateral hindpaw inflammation in the rat. **Brain Res Bull**, v. 78, p. 170–174, 2009.

MAJCZYNSKI, H., CABAJ, A., SŁAWINSKA, U., GÓRSKA, T. Intrathecal administration of yohimbine impairs locomotion in intact rats. **Behav Brain Res**, v. 175, p. 315–322, 2006.

MALMBERG, A.B., HEDLEY, L.R., JASPER, J.R., HUNTER, J.C., BASBAUM, A.I. Contribution of alpha (2) receptor subtypes to nerve injury-induced pain and its regulation by dexmedetomidine. **Br J Pharmacol**, v. 132, n. 8, p. 1827-36, 2001.

MANNING, B.H., MORGAN, M.J., FRANKLIN, K.B. Morphine analgesia in the formalin test: evidence for forebrain and midbrain sites of action. **Neuroscience**, v. 63, p. 289–294, 1994.

MANTYH, P.W. Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey: II: descending efferent projections. **J Neurophysiol**, v. 49, p. 582–594, 1983.

MAO, J. R., MAYER, D. J., PRICE, D. D. Patterns of increased brain activity indicative of pain in a rat model of peripheral mononeuropathy. **J Neurosci** v.13, p. 2689–2702, 1993.

MARTENSON, M.E., CETAS, J.S., HEINRICHER, M.M. A possible neural basis for stress-induced hyperalgesia. **Pain**, v. 142, n. 3, p. 236–244, 2009.

MARTIN, W.J, GUPTA, N.K., LOO, C.M., ROHDE, D.S., BASBAUM, A.I. Differential effects of neurotoxic destruction of descending noradrenergic pathways on acute and persistent nociceptive processing. **Pain**, v. 80, p.57-65, 1999.

MARTINS, M. A. Injeção de glicina na substância cinzenta periaqueductal dorsal facilita ou inibe a nocicepção dependendo do contexto nociceptivo (Tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MARTINS, I., CARVALHO, P., DE VRIES, M.G., TEIXEIRA-PINTO, A., WILSON, S.P., WESTERINK, B.H., TAVARES, I. Increased noradrenergic neurotransmission to a pain facilitatory area of the brain is implicated in facilitation of chronic pain. **Anesthesiology**, v. 123, n. 3, p. 642-653, 2015.

MARTINS, I., COSTA-ARAÚJO, S., FADEL, J., WILSON, S.P., LIMA, D., TAVARES, I. Reversal of neuropathic pain by HSV-1-mediated decrease of noradrenaline in a pain facilitatory area of the brain. **Pain**, v. 151, p. 137–145, 2010b.

MARTINS, I., DE VRIES, M.G., TEIXEIRA-PINTO, A., FADEL, J., WILSON, S.P., WESTERINK, B.H., TAVARES, I. Noradrenaline increases pain facilitation from the brain during inflammatory pain. **Neuropharmacol**, v. 71, p. 299–307, 2013.

MARTINS, I., PINTO, M., WILSON, S.P., LIMA, D., TAVARES, I. Dynamic of migration of HSV-1 from a medullary pronociceptive

centre: Antinociception by overexpression of the preproenkephalin transgene. **Eur J Neurosci**, v. 28, p. 2075–2083, 2008.

MARTINS, M. A, CAROBREZ, A.P., TONUSSI, C. R. Activation of dorsal periaqueductal gray by glycine produces long lasting hyponociception in rats without overt defensive behaviors. **Life Sci**, v. 83, p. 118-121, 2008.

MARTINS, M. A, DE CASTRO BASTOS L., MELO, N. E. B, TONUSSI, C. R. Dependency of nociception facilitation or inhibition after periaqueductal gray matter stimulation on the context. **Behav Brain Res**, v. 214, p. 260-276, 2010a.

MARZO, A., TOTAH, N.K., NEVES,R.M., LOGOTHETIS, N.K., ESCHENKO, O. Unilateral electrical stimulation of rat locus coeruleus elicits bilateral response of norepinephrine neurons and sustained activation of medial prefrontal cortex. **J Neurophysiol**, v. 111, p. 2570–2588, 2014.

MATHEUS, M.G., NOGUEIRA, R.L., CAROBREZ, A.P., GRAEFF, F.G., GUIMARÃES, F.S. Anxiolytic effect of glycine antagonists microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacol**, v.113, p. 565-569, 1994.

MATOS, R., CORDEIRO, J.M., COELHO, A., FERREIRA, S., SILVA, C., IGAWA, Y., CRUZ, F., CHARRUA, A. Bladder pain induced by prolonged peripheral alpha 1A adrenoceptor stimulation involves the enhancement of transient receptor potential vanilloid 1 activity and an increase of urothelial adenosine triphosphate release. **Acta Physiol (Oxf)** v. 218, n. 4, p. 265-275, 2016.

MATRE, D., CASEY, K.L., AND KNARDAHL, S. Placebo-induced changes in spinal cord pain processing. **J Neurosci**, v. 26, p. 559–563, 2006.

MAYER, D.J., LIEBESKIND, J.C. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. **Brain Res**, v. 68, n. 1, P. 73-93, 1974.

MAYER, D.J., PRICE, D. D. Central nervous system mechanisms of analgesia. **Pain**, v. 2, n. 4, p. 379-404, 1976.

MAYER, M. L., BENVEMSTE, M., PATNEU, D.K. AND VYKLICKY, L., Pharmacologic properties of NMDA receptors. **Ann NY Acad Sci**, v. 648, p. 194-204, 1992.

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

McCRACKEN, L.M., GROSS, R.T., SORG, P.J., EDMANDS, T.A. Prediction of pain in patients with chronic low back pain: effects of inaccurate prediction and pain-related anxiety. **Behav Res Ther**, v. 31, n. 7, p. 647-652, 1993.

McGARAUGHTY, S, HEINRICHER, M.M. Microinjection of morphine into various amygdaloid nuclei differentially affects nociceptive responsiveness and RVM neuronal activity. **Pain**, v. 96, p.153-162, 2002.

McGARAUGHTY, S., FARR, D.A., HEINRICHER, M.M. Lesions of the periaqueductal gray disrupt input to the rostral ventromedial medulla following microinjections of morphine into the medial or basolateral nuclei of the amygdala. **Brain Res**, v. 1009, p. 223-227, 2004.

McHAFFIE, J. G., KAO, C.-Q., STEIN, B. E. Nociceptive neurons in rat superior colliculus: response properties, topography and functional implications. **J Neurophysiol** v. 62, p. 510–525, 1989.

MCNALLY, G.P., JOHANSEN, J.P., BLAIR, H.T. Placing prediction into the fear circuit. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 6, p. 283-292, 2011.

MCNALLY, G.P, WESTBROOK, R.F. Temporally graded, context-specific retrograde amnesia and its alleviation by context preexposure: effects of postconditioning exposures to morphine in the rat. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 29, n. 2, p. 130-42, 2003.

MEISSNER, K., BINGEL, U., COLLOCA, L., WAGER, T.D., WATSON, A., FLATEN, M.A. The placebo effect: advances from different methodological approaches. **J Neurosci**, v. 31, p. 16117–16124, 2011.

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

MENDES-GOMES, J., AMARAL, V.C., NUNES-DE-SOUZA, R.L. Ventrolateral periaqueductal gray lesion attenuates nociception but does not change anxiety-like indices or fear-induced antinociception in mice. **Behav Brain Res**, v. 219, n. 2, p. 248-253, 2011.

MERSKEY, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. **Pain**, v. 6, p. 249-252, 1979.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v. 66, p. 355-474, 2002.

MILLAN, M.J., NEWMAN-TANCREDI, A., AUDINOT, V., CUSSAC, D., LEJEUNE, F., NICOLAS, J.P., COGÉ, F., GALIZZI, J.P., BOUTIN, J.A., RIVET, J.M., DEKEYNE, A., GOBERT, A. Agonist and antagonist actions of yohimbine as compared to fluparoxan at alpha(2)-adrenergic receptors (AR)s, serotonin (5-HT)(1A), 5-HT(1B), 5-HT(1D) and dopamine D(2) and D(3) receptors. Significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive states. **Synapse**, v. 35, n. 2, p. 79-95, 2000.

MIN, M.Y., SHIH, P.Y., WU, Y.W., LU, H.W., LEE, M.L., YANG, H.W. Neurokinin 1 receptor activates transient receptor potential-like currents in noradrenergic A7 neurons in rats. **Mol Cell Neurosci**, v. 42, p. 56-65, 2009.

MIN, M.Y., WU, Y.W., SHIH, P.Y., LU, H.W., LIN, C.C., WU, Y., LI, M.J., YANG, H.W. Physiological and morphological properties of, and effect of substance P on, neurons in the A7 catecholamine cell group in rats. **Neuroscience**, v. 153, n. 4, p. 1020-33, 2008.

MIN, M.Y., WU, Y.W., SHIH, P.Y., LU, H.W., WU, Y., LI, M.J., YANG, H.W. Roles of A-type potassium currents in tuning spike frequency and integrating synaptic transmission in noradrenergic neurons of the A7 catecholamine cell group in rats. **Neuroscience**, v.168 , n.3 , p. 633-645, 2010.

MINOTA, S., MIYAZAKI, T., WANG, M.Y., READ, H.L. DUN, N.J. Glycine potentiates NMDA responses in rat hippocampal CA1 neurons. **Neurosci Lett**, v. 100, p. 237–242, 1989.

MIRON, D., DUNCAN, G.H., BUSHNELL, M.C. Effects of attention on the intensity and unpleasantness of thermal pain. **Pain**, v. 39, p. 345–352, 1989.

MISRA, G., COOMBES, S.A. Neuroimaging evidence of motor control and pain processing in the human midcingulate cortex. **Cereb Cortex**, v. 25, n. 7, p. 1906–1919, 2014.

MUTO, Y., SAKAI, A., SAKAMOTO, A., SUZUKI, H. Activation of NK₁ receptors in the locus coeruleus induces analgesia through noradrenergic-mediated descending inhibition in a rat model of neuropathic pain. **Br J Pharmacol**, v. 166, n. 3, p.1047-1057, 2012.

MYERS, R.D. Injection of solutions into cerebral tissue: relation between volume and diffusion. **Physiol Behav**, v.1, 171-174, 1966.

NAHUM-LEVY, R., LIPINSKI, D., SHAVIT, S., BENVENISTE, M. Desensitization of NMDA receptor channels is modulated by glutamate agonists. **Biophys J**, v. 80, p. 2152–2166, 2001.

NEUGEBAUER, V., GALHARDO, V., MAIONE, S., MACKEY, S.C. Forebrain pain mechanisms. **Brain Res Rev**, v. 60, n. 1, p. 226–242, 2009.

NEWMAN-TANCREDI, A., NICOLAS, J.P., AUDINOT, V., GAVAUDAN, S., VERRIE'LE, L., TOUZARD, M., CHAPUT, C., RICHARD, N., MILLAN, M.J. 1998. Actions of $\alpha 2$ adrenoceptors ligands at $\alpha 2$ A and 5-HT1A receptors: the antagonist, atipamezole, and the agonist, dexmedetomidine, are highly selective for α 2A adrenoceptors. **Naunyn Schmiedeb Arch Pharmacol**, v. 358, p.197–206, 1998.

NUSEIR, K., HEIDENREICH, B. A., PROUDFIT, H. K. The antinociception produced by microinjection of a cholinergic agonist in the ventromedial medulla is mediated by noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group. **Brain Res**, v. 822, n. 1-2, p. 1–7, 1999.

NUSEIR, K., PROUDFIT, H. K. Bidirectional modulation of nociception by GABA neurons in the dorsolateral pontine tegmentum that tonically inhibit spinally projecting noradrenergic A7 neurons. **Neuroscience**, v. 96, n. 4, p.773-783, 2000.

NYGREN, L. G.; OLSON, L.; SEIGER, A. Regeneration of monoamine-containing axons in the developing and adult spinal cord of the rat following intraspinal 6-OH-dopamine injections or transections. **Histochemie**, v. 28, n. 1, p. 1–15, 1971.

OHMAN, A., FLYKT, A., ESTEVES, F. Emotion drives attention: detecting the snake in the grass. **J Exp Psychol Gen**, v. 130, n. 3, p.466–478, 2001.

OKA, T., OKA, K., HOSOI, M., AOU, S., HORI, T. The opposing effects of interleukin -1 beta microinjected into the preoptic hypothalamus and the ventromedial hypothalamus on nociceptive behavior in rats. **Brain Res**, v. 700, n. 1-2, p. 271-278, 1995.

OLANGO, W.M. GÉRANTON, S.M., ROCHE, M., HUNT, S.P., FINN, D. P. Novel molecular correlates of endocannabinoid-mediated fear-conditioned analgesia in rats **Eur J Pain**, v. 18, p. 182–191, 2014.

OLANGO, W.M., ROCHE, M., FORD, G.K., HARHEN, B., FINN, D.P. The endocannabinoid system in the rat dorsolateral periaqueductal grey mediates fear-conditioned analgesia and controls fear expression in the presence of nociceptive tone. **Br J Pharmacol**, v. 165, p. 2549–60, 2012.

OLAVE, M.J., MAXWELL, D.J. Neurokinin-1 projection cells in the rat dorsal horn receive synaptic contacts from axons that possess alpha 2C-adrenergic receptors. **J Neurosci**, v. 23, n. 17, p. 6837-6846, 2003.

OMOTE, K., KAWAMATA, T., KAWAMATA, M., NAMIKI, A. Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. **Brain Res**, v. 814, n. 1-2, p.194-198, 1998.

OSSIPOV, M. H. The Perception and Endogenous Modulation of Pain. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-25, 2012.

OSSIPOV, M. H., DUSSOR, G. O., PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, p. 3779–3787, 2010.

OUYANG, H, WANG, P., HUANG, W., LI, Q., NIE, B., ZENG, W. Spinal antinociceptive action of amiloride and its interaction with tizanidine in the rat formalin test. **Pain Res Manag**, v. 20, n. 6, p. 321-326, 2015.

OWEN, J.C., WHITTON, P.S. Reboxetine modulates norepinephrine efflux in the frontal cortex of the freely moving rat: the involvement of alpha 2 and 5-HT1A receptors. **Neurosci Lett**, v. 348, n. 3, p. 171-174, 2003.

OYAMA, T., UEDA, M., KURAIISHI, Y., AKAIKE, A., SATOH, M. Dual effect of serotonin on formalin-induced nociception in the rat spinal cord. **Neurosci Res**, v. 25, p. 129-135, 1996.

PAN, Y.Z., LI, D.P., PAN, H.L. Inhibition of glutamatergic synaptic input to spinal lamina II (o) neurons by presynaptic α_2 -adrenergic receptors. **J Neurophysiol**, v. 87, p. 1938–1947, 2002.

PAPPAS, B. A., DiCARA, L.V., MILLER, N. E. Acute sympathectomy by 6-hydroxydopamine in the Adult rat: Effects on cardiovascular conditioning and fear retention. **J Comp Physiol Psychol**, v. 79, n. 2, p. 230-236, 1972.

PARK, C.H., LEE, H.G., LEE, S.H., CHUNG, C.W., YOON, M.H. The role of adrenergic and cholinergic receptors on the antinociception of sildenafil in the spinal cord of rats. **Neurosci Lett**, v. 502, n. 2, p. 99-102, 2011.

PARRY, D.M., MACMILLAN, F.M., KOUTSIKOU, S., MCMULLAN, S., LUMB, B.M. Separation of A- versus C-nociceptive inputs into spinal-brainstem circuits. **Neuroscience**, v. 152, p. 1076–1085, 2008.

PARRY, D.M., SEMENENKO, F.M., CONLEY, R.K., LUMB, B.M. Noxious somatic inputs to hypothalamic-midbrain projections neurons: a comparison of the columnar organization of somatic and visceral inputs to the periaqueductal gray in the rat. **Exp Physiol**, v. 87, n. 2, p. 117-122, 2002.

PAVESI, E., CANTERAS, N.S., CAROBREZ, A.P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using β -adrenoceptor activation of the dorsal preammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. **Neuropsychopharmacology**, 36,5, 926-939, 2011.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego, Academic Press, 2009.

PENFIELD, W., BOLDREY, E. Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. **Brain**, v. 60, p. 389–443, 1937.

PENG, Y.B., LIN, Q., WILLIS, W.D Involvement of alpha-2 adrenoceptors in the periaqueductal gray-induced inhibition of dorsal horn cell activity in rats. **J Pharm Exp Ther**, v. 278, n. 1, p. 125-135, 1996.

PEREIRA, E.A., LU, G., WANG, S., SCHWEDER, P.M., HYAM, J.A., STEIN, J.F., PATERSON, D.J., AZIZ, T.Z., GREEN, A.L., Ventral periaqueductal grey stimulation alters heart rate variability in humans with chronic pain. **Exp Neurol**, v. 223, n. 2, p. 574–581, 2010.

PEREIRA, E.A.C., SHOUYAN W., PEACHEY, T., LU, G., SHLUGMAN, D., STEIN, J.F., TIPU Z. AZIZ, T.Z., GREEN, A. L. Elevated gamma band power in humans receiving naloxone suggests dorsal periaqueductal and periventricular gray deep brain stimulation produced analgesia is opioid mediated **Exp Neurol**, v. 239, p. 248–255, 2013.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Prog Neurobiol**, v. 80, p. 53–83, 2006.

PERTOVAARA, A. The noradrenergic pain regulation system: A potential target for pain therapy. **Eur J Pharmacol**, v. 716, p. 2–7, 2013.

PETERS, C.M. , HAYASHIDA, K., EWAN, E.E., NAKAJIMA, K., OBATA, H., XU, Q., YAKSH T.L., EISENACH, J.C. Lack of analgesic efficacy of spinal ondansetron on thermal and mechanical

hypersensitivity following spinal nerve ligation in the rat. **Brain Res**, v.1352, p. 83-93, 2010.

PETROVIC, P., KALSO, E., PETERSSON, K.M., INGVAR, M. Placebo and opioid analgesia - imaging a shared neuronal network. **Science**, v. 295, p.1737–1740, 2002.

PETROVIC, P., PETERSSON, K. M., GHATAN, P. H., STONE-ELANDER, S., INGVAR, M. Pain-related cerebral activation is altered by a distracting cognitive task. **Pain**, v. 85, p. 19-30, 2000.

PHILLIPS, M. L., GREGORY, L.J, CULLEN, S., COEN, S., NG, V., ANDREW, C., GIAMPIETRO, V., BULLMORE, E., ZELAYA, F., AMARO, E., THOMPSON, D.G., HOBSON, A.R, WILLIAMS, S.C., BRAMMER, M., AZIZ, Q. The effect of negative emotional context on neural and behavioural responses to oesophageal stimulation. **Brain**, v. 126, p. 669–684, 2003.

PIERCE, W.D., CHENEY, C.D. **Behavior analysis and learning**: 5th edition, p. 485. New York and London: Psychology Press, 2013.

PLOGHAUS, A., BECERRA, L., BORRAS, C., BORSOOK, D. Neural circuitry underlying pain modulation: expectation, hypnosis, placebo. **Trends Cogn Sci**, v.7, n.5, p.197-200, 2003.

PLOGHAUS, A., TRACEY, I., CLARE, S., GATI, J.S., RAWLINS, J.N., MATTHEWS, P.M. Learning about pain: the neural substrate of the prediction error for aversive events. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 97, p. 9281–9286, 2000.

PLONER, M., FREUND, H. J., SCHNITZLER, A. Pain affect without pain sensation in a patient with a postcentral lesion. **Pain**, v. 81, p. 211–214, 1999.

PLONER, M., LEE, M. C., WIECH, K., BINGEL, U., TRACEY, I. Flexible cerebral connectivity patterns subserve contextual modulations of pain. **Cereb Cortex**, v. 21, p. 719–726, 2011.

PORRO, C. A., CAVAZZUTI, M., LUIC, F., GIULIANIC, D., PELLEGRINIC, M., BARALDIC, P. Independent time courses of

supraspinal nociceptive activity and spinally mediated behavior during tonic pain. **Pain**, v. 104, p. 291–301, 2003.

PORRO, C.A. CAVAZZUTI, M. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. **Prog Neurobiol**, v. 41, p. 565– 607, 1993.

PORRO, C.A., CAVAZZUTI, M., GALETTI, A., SASSATELLI, L. Functional activity mapping of the rat brainstem during formalin-induced noxious stimulation. **Neuroscience**, 41, 667–680, 1991b.

PORRO, C.A., CAVAZZUTI, M., GALETTI, A., SASSATELLI, L., BARBIERI, G.C. Functional activity mapping of the rat spinal cord during formalin-induced noxious stimulation. **Neuroscience**, 41, 655–665, 1991a.

POST, C., PERSSON, M. L., ARCHER, T., MINOR, B. G., DANYSZ, W., SUNDSTROM, E. Increased antinociception by alpha-adrenoceptor drugs after spinal cord noradrenaline depletion. **tj**, v. 137, n.1, p. 107-116, 1987.

POTES, C.S., NETO, F.L., CASTRO-LOPES, J.M. Inhibition of pain behavior by GABA (B) receptors in the thalamic ventrobasal complex: Effect on normal rats subjected to the formalin test of nociception. **Brain Res**, v. 1115, p. 37–47, 2006.

POTES, C.S., PESTANA, A.C., PONTES, M., CARAMELO, A.S., NETO, F.L. Amylin modulates the formalin-induced tonic pain behaviours in rats. **Eur J Pain** v. 20, n. 10, p. 1741-1752, 2016.

PRICE, D.D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science**, v. 288, p. 1769-1771, 2000.

PRICE, D.D., CRAGGS, J., VERNE, G.N., PERLSTEIN, W.M., AND ROBINSON, M.E. Placebo analgesia is accompanied by large reductions in pain-related brain activity in irritable bowel syndrome patients. **Pain**, v. 127, p. 63–72, 2007.

PRICE, D.D., FILLINGIM, R.B., ROBINSON, M.E. Placebo analgesia: friend or foe? **Curr Rheumatol Rep**, v. 8, p. 418–424, 2006.

PRIESTLEY, T., LAUGHTON, P., MYERS, J., LEBOURDELLES, B., KERBY, J., WHITING, P.J. Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2a and NR1a/NR2b subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. **Mol Pharmacol**, v. 48, p. 841–848, 1995.

PROUDFIT, H.K., CLARK, F.M. The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord. **Prog Brain Res**, v. 88, p. 123–141, 1991.

RAHMAN, W., BAUER, C.S., BANNISTER, K., VONSY, J.L., DOLPHIN, A.C., DICKENSON, A.H. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. **Mol Pain**, v. 5, p. 45, 2009.

RAIJ, T.T., NUMMINEN, J., NÄRVÄNEN, S., HILTUNEN, J., HARI, R. Brain correlates of subjective reality of physically and psychologically induced pain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 6, p. 2147-2151, 2005.

RAINVILLE, P., DUNCAN, G. H., PRICE, D. D., CARRIER, B., BUSHNELL, M. C. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. **Science**, v. 277, p. 968-971, 1997.

RAUSELL, E., JONES, E. G. Histochemical and immunocytochemical compartments of the thalamic VPM nucleus in monkeys and their relationship to the representational map. **J Neurosci**, v. 11, p. 210–225, 1991.

REA, K., LANG, Y., FINN, D.P. Alterations in extracellular levels of gamma-aminobutyric acid in the rat basolateral amygdala and periaqueductal gray during conditioned fear, persistent pain and fearconditioned analgesia. **J Pain**, v. 10, p. 1088–1098, 2009.

REA, K., OLANGO, E.M., HARHEN, B., KERR, D.M., GALLIGAN, K.R., FITZGERALD, S., MOORE, M., ROCHE, M., FINN, D. P. Evidence for a role of GABAergic and glutamatergic signaling in the basolateral amygdala in endocannabinoid-mediated fear-conditioned analgesia in rats. **Pain**, v.154, p. 576–585, 2013.

REA, K., ROCHE, M., FINN, D.P. Modulation of conditioned fear, fear-conditioned analgesia, and brain regional c-Fos expression following administration of muscimol into the rat basolateral amygdala. **J Pain**, v. 12, n. 6, p. 712-21, 2011.

REDGRAVE P., McHAFFIE J. G., STEIN B. E. Nociceptive neurones in rat superior colliculus, I. Antidromic activation from the contralateral predorsal bundle. **Expl Brain Res**, v. 109, p. 185–196, 1996.

RESCORLA, R.A., WAGNER, A.R. A theory of Pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and non-reinforcement. In: **Classical conditioning II: current research and theory**. ((Black, A.H. Prokasy, W.F., (eds)), p. 64–99. New York: Appleton Century Crofts, 1972.

RESSTEL, L.B., JOCA, S.R., GUIMARÃES, F.G., CORRÊA, F.M. Involvement of medial pré-frontal cortex neurons in behavioral and cardiovascular responses to contextual fear conditioning. **Neuroscience**, v. 1, n.143, p. 377–385, 2006.

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

RHODES, D.L., LIEBESKIND, J.C. Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. **Brain Res**, v. 143, n. 3, p. 521-532, 1978.

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

RHUDY, J.L., MEAGHER, M.W. Individual differences in the emotional reaction to shock determine whether hypoalgesia is observed. **Pain Med.**, v. 4, p.244-256, 2003.

RIZVI, T.A., MURPHY, A.Z., ENNIS, M., BEHBEHANI, M.M., SHIPLEY, M.T. Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study. **J Neurosci**, v.16, n. 1, p. 333-344, 1996.

ROCHE, M., JOHNSTON, P., MHUIRCHEARTAIGH, O.N., OLANGO, W.M., MACKIE, K., FINN, D.P. Effects of intra-basolateral amygdala administration of rimonabant on nociceptive behaviour and

neuronal activity in the presence or absence of contextual fear. **Eur J Pain**, v. 14, p. 487– 495, 2010.

ROCHE, M., O'CONNOR, E., DISKIN, C., FINN, D. The effect of CB (1) receptor antagonism in the right basolateral amygdala on conditioned fear and associated analgesia in rats. **Eur J Neurosci**, v. 26, p. 2643–2653, 2007.

ROSS, R. T., RANDICH, A. Associative aspects of conditioned analgesia. **Anim Learn Behav**, v. 13, p. 419-431, 1985.

ROUTTENBERG, A. Intracranial chemical injections and behavior: a critical review. **Behav Biol**, v. 7, n. 5, p. 601-41 , 1972.

ROY M., SHOHAMY, D., DAW, N., JEPMA, M., WIMMER, E., WAGER, T. D. Representation of aversive prediction errors in the human periaqueductal gray. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 11, p. 1607–1612, 2014.

ROY, M. LEBUIS, A., PERETZ, I. RAINVILLE, P. The modulation of pain by attention and emotion: a dissociation of perceptual and spinal nociceptive processes. **Eur J Pain**, v. 15, n. 6, p. 641 e1 - 641 e10, 2011.

ROY, M., PERETZ, I., RAINVILLE, P. Emotional valence contributes to music-induced analgesia. **Pain**, v. 134, p. 140–147. 2008.

ROY, M., PICHE, M., CHEN, J. I., PERETZ, I., RAINVILLE, P. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **Proc Natl Acad Sc. USA**, v. 106, p. 20900–20905, 2009.

RUDY, J.W. Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. **Learn Mem**, v. 16, n. 10, p. 573-585, 2009.

RUDY, J.W. Postconditioning isolation disrupts contextual conditioning: na experimental analysis. **Behav Neurosci**, v.110, n. 2, p. 238-46, 1996.

RUFFOLO, R. R. JR, HIEBLE, J.P. Alfa-adrenoceptors. **Pharmac Thee**, v. 61, p. 1-64, 1994.

SAAB, C. Y., WILLIS, W. D. The cerebellum: organization, functions and its role in nociception. **Brain Res Rev**, v. 42, p. 85–95, 2003.

SABBATINI, M., MOLINARI, C., GROSSINI, E., MARY, D.A., VACCA, G., CANNAS, M. The pattern of c-Fos immunoreactivity in the hindbrain of the rat following stomach distension. **Exp Brain Res**, v. 157, n. 3, p. 315-323, 2004.

SANTOS, P., BITTENCOURT, A.S., SCHENBERG, L.C., CAROBREZ, A.P., Elevated T-maze evaluation of anxiety and memory effects of NMDA/glycine-B site ligands injected into the dorsal periaqueductal gray matter and the superior colliculus of rats. **Neuropharmacol**, v. 51, n. 2, p. 203-212, 2006.

SAWAMOTO, N., HONDA, M., OKADA, T., HANAKAWA, T., KANDA, M., FUKUYAMA, H., KONISHI, J., SHIBASAKI H. Expectation of pain enhances responses to nonpainful somatosensory stimulation in the anterior cingulate cortex and parietal operculum/posterior insula: an event-related functional magnetic resonance imaging study. **J Neurosci**, v. 20, n. 19, p.7438 – 7445, 2000.

SAWYNOK, J., REID, A. Antinociception by tricyclic antidepressants in the rat formalin test: differential effects on different behaviours following systemic and spinal administration. **Pain**, v. 93, p. 51–59, 2001.

SAWYNOK, J., REID, A.R., DOAK, G.J. Caffeine antinociception in the rat hot-plate and formalin tests and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. **Pain**, v. 61, n. 2, p. 203-213, 1995.

SCHMITT, M.L., COELHO, W., LOPES-DE-SOUZA, A.S., GUIMARÃES, F.S., CAROBREZ, A.P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. **Neurosci Lett**, v. 189, p. 93-96, 1995.

SCHOUENBORG, J., KALLIOMÄKI, J. Functional organization of the nociceptive withdrawal reflexes. I. Activation of hindlimb muscles in the rat. **Exp Brain Res**, v. 83, n. 1, p. 67-78, 1990.

SCHWARTING, R.; HUSTON, J. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Prog Neurobiol**, v. 50, n. 2-3, p. 275–331, 1996.

SCHWEINHARDT, P., BUSHNELL, M. C. Pain imaging in health and disease--how far have we come? **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3788 – 3797, 2010.

SEMENENKO, F.M., LUMB, B.M. Projections of anterior hypothalamic neurones to the dorsal and ventral periaqueductal grey in the rat. **Brain Res**, v. 582, p. 237-245, 1992.

SEYMOUR, B., McCLURE, S.M. Anchors, scales and the relative coding of value in the brain. *Curr Opin Neurobiol*, v. 18, p. 173–178, 2008.

SHACKMAN, A.J., SALOMONS, T.V., SLAGTER, H.A., FOX, A.S., WINTER, J.J., DAVIDSON, R.J. The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 3, p. 154–167, 2011.

SHIN, D.J., JEONG, C.W., LEE, S.H., YOON, M.H. Receptors involved in the antinociception of intrathecal melatonin in formalin test of rats. **Neurosci Lett**, v. 494, n. 3, p. 207-210, 2011.

SINGER, T., SEYMOUR, B., O'DOHERTY, J., KAUBE, H., DOLAN, R.J., FRITH, C.D. Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. **Science**, v. 303, p. 1157 – 1162, 2004.

SKAGEBERG, G., BJÖRKLUND, A., LINDVALL, O., SCHMIDT, R. H. Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat. **Brain Res Bull**, v. 9, p. 237-244, 1982.

SLUKA, K.A., WESTLUND, K.N. Spinal projections of the locus coeruleus and the nucleus subcoeruleus in the Harlan and the Sasco Sprague-Dawley rat. **Brain Res**, v. 579, n. 1, p. 67-73, 1992.

SONOHATA, M., FURUE, H., KATAFUCHI, T., YASAKA, T., DOI, A., KUMAMOTO, E., YOSHIMURA, M. Actions of noradrenaline on

substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivo patch recording. **J Physiol**, v. 555, p. 515–526, 2004.

SOUZA, R.R., CAROBREZ, A.P. Acquisition and expression of fear memories are distinctly modulated along the dorsolateral periaqueductal gray axis of rats exposed to predator odor. **Behav Brain Res**, v. 315, p. 160-167, 2016.

SPRENGER, C., EIPPERT, F., FINSTERBUSCH, J., BINGEL, U., ROSE, M., BUCHEL, C. Attention modulates spinal cord responses to pain. **Curr Biol**, v. 22, p. 1019–22, 2012.

STEIN, B. E., DIXON, J. P. Superior colliculus cells respond to noxious stimuli. **Brain Res**, v. 158, p. 65–73, 1978.

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

SUPLITA, R.L., GUTIERREZ, T., FEGLEY, D., PIOMELLI, D., HOHMANN, A.G. Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress- induced analgesia. **Neuropharmacol**, v. 50, p. 372–379, 2006.

SUZUKI, R., RAHMAN, W., HUNT, S.P., DICKENSON, A. H. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury. **Brain Res**, v. 1019, n. 1, p.68–76, 2004.

SUZUKI, R., RYGH, L.J., DICKENSON, A.H. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 12, p. 613–617, 2004.

TAKASU, K., HONDA, M., ONO, H., TANABE, M. 2006. Spinal alpha (2)-adrenergic and muscarinic receptors and the NO release cascade mediate supraspinally produced effectiveness of gabapentin at decreasing mechanical hypersensitivity in mice after partial nerve injury. **Br J Pharmacol**, v. 148, n. 2, p. 233-244, 2006.

TANABE, M., TAKASU, K., KASUYA, N., SHIMIZU, S., HONDA, M., ONO, H. Role of descending noradrenergic system and spinal alpha₂-adrenergic receptors in the effects of gabapentin on thermal and mechanical nociception after partial nerve injury in the mouse. **Br J Pharmacol**, v. 144, n. 5, p. 703-714, 2005.

TANIGUCHI, W., NAKATSUKA, T., MIYAZAKI, N., YAMADA, H., TAKEDA, D., FUJITA, T., KUMAMOTO, E., YOSHIDA, M. In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. **Pain**, v. 152, p. 95–105, 2011.

TAYLOR, B. K., RODERICK, R.E., BASBAUM, A.I. Brainstem noradrenergic control of nociception is abnormal in the spontaneously hypertensive rat. **Neurosci Lett**, v. 291, p.139–142, 2000.

TAYLOR, B. K., WESTLUND, K., N. The noradrenergic locus coeruleus as a chronic pain generator. **J Neurosci Res.**, p. 01-11, 2016.

TEIXEIRA, K.V., CAROBREZ, A.P., Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis the dorsal periaqueductal gray matter on rats's performance in the elevated plus-maze task. **Behav Neurosci**, v.113, n. 1, p. 196-203, 1999.

TJØLSEN, A., BERGE, O.-G., HOLE, K., Lesions of bulbo-spinal serotonergic or noradrenergic pathways reduce nociception as measured by the formalin test. **Acta Physiol Stand**, v. 142, p. 229-236, 1991.

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

TRACEY, I., PLOGHAUS, A., GATI J.S., CLARE, S., SMITH, S., MENON, R.S., MATTHEWS, P.M. Imaging attentional modulation of pain in the periaqueductal gray in humans. **J Neurosci**, v. 22, n.7, p. 2748–2752, 2002.

TRACEY, I.: MANTYH, P, W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v. 55, p.377-390, 2007.

TRULLAS, R., JACKSON, B., SKOLNICK, P. (1989) Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand at strychnine-insensitive glycine receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 34, p.313–316, 1989.

VALET, M., SPRENGER, T., BOECKER, H., WILLOCH, F., RUMMENY, E., CONRAD, B., ERHARD, P., TOLLE, T.R. Distraction modulates connectivity of the cingulo–frontal cortex and the midbrain during pain — an fMRI analysis. **Pain**, v.109, p. 399–408, 2004.

VAN SCHOUWENBURG, M.R., DEN OUDEN, H.E.M., COOLS, R. Selective Attentional Enhancement and Inhibition of Fronto-Posterior Connectivity by the Basal Ganglia During Attention Switching. **Cereb cortex**, v. 25, p. 1527–1534, 2015.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?. **Brain Res Rev**, v. 46, p. 295-309, 2004.

VANZ, F. Análise comportamental e farmacológica da nocicepção cutânea e articular induzida por formalina. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

VILLEMURE, C., BUSHNELL, M. C. Mood influences supraspinal pain processing separately from attention. **J Neurosci**, v. 29, p. 705–715, 2009.

VILLEMURE, C., SLOTNICK, B. M., BUSHNELL, M. C. Effects of odors on pain perception: deciphering the roles of emotion and attention. **Pain**, v.106, p. 101–108, 2003.

VLAEYEN, J.W. Learning to predict and control harmful events: chronic pain and conditioning. **Pain**, v. 156, Suppl 1, p. S86-93, 2015.

VOGT, B.A., SIKES, R.W. Cingulate nociceptive circuitry and roles in pain processing: the cingulate premotor pain model. In: **Cingulate Neurobiology and Disease** (Vogt, B.A. (ed)), p. 311–338. UK: Oxford Univ. Press, Oxford, 2009.

WADA, T., HASEGAWA, Y., ONO, H. Characterization of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in facilitation of rats pinal motoneuron activity. **Eur J Pharmacol**, v. 340, p. 45–52, 1997.

WADA, T., OTSU, T., HASEGAWA, Y., MIZUCHI, A., ONO, H. Characterization of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat spinal cord. **Eur J Pharmacol**, v. 312, n. 2, p. 263-266, 1996.

WAGER, T.D., ATLAS, L. Y., LEOTTI, L. A., RILLING, J.K., Predicting individual differences in placebo analgesia: contributions of brain activity during anticipation and pain experience. **J Neurosci**, v. 31, p. 439–452, 2011.

WAGER, T.D., RILLING, J.K., SMITH, E.E., SOKOLIK, A., CASEY, K.L., DAVIDSON, R.J., KOSSLYN, S.M., ROSE, R.M., COHEN, J.D. Placebo-induced changes in FMRI in the anticipation and experience of pain. **Science**, v. 303, p. 1162–1167, 2004.

WANG, S., REDGRAVE, P. Microinjections of muscimol into lateral superior colliculus disrupt orienting and oral movements in the formalin model of pain. **Neuroscience**, v. 81, p. 967–988, 1997.

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

WESTLUND K. N., CARLTON, S. M., ZHANG, D., WILLIS, W. D. Direct catecholaminergic innervation of primate spinothalamic tract neurons. **J comp Neurol**, v. 299, p. 178–186, 1990.

WESTLUND, K.N., BOWKER, R.M., ZIEGLER, M.G., COULTER, J.D. Descending noradrenergic projections and their spinal terminations. **Prog Brain Res**, v. 57, p. 219–238, 1982.

WESTLUND, K.N., BOWKER, R.M., ZIEGLER, M.G., COULTER, J.D. Noradrenergic projections to the spinal cord in the rat. **Brain Res**, v. 263, p. 15–31, 1983.

WESTLUND, K.N., BOWKER, R.M., ZIEGLER, M.G., COULTER, J.D. Origins of spinal noradrenergic pathways demonstrated by

retrograde transport of antibody to dopamine- β -hydroxylase. **Neurosci Lett**, v. 25, p. 243–249, 1981.

WESTLUND, K.N., COULTER, J.D. Descending projections of the locus coeruleus and subcoeruleus/medial parabrachial nuclei in monkey: axonal transport studies and dopamine-b-hydroxylase. **Brain Res Rev**, v. 2, p. 235–264, 1980.

WHEELER-ACETO, H., COWAN, A. Naloxone causes apparent antinociception and pronociception simultaneously in the rat paw formalin test. **Eur J Pharmacol**, v. 236, p. 193–199, 1993.

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

WIBERG, M., WESTMAN, J., BLOMQUIST, A. Somatosensory projection to the mesencephalon: An anatomical study in the monkey. **J Comp Neurol**, v. 264, p. 92–117, 1987.

WIERTELAK, E.P., FURNESS, L.E., HORAN, R., MARTINEZ, J., WIESENFELD-HALLINS, Z. Intrathecal vasoactive intestinal polypeptide modulates spinal reflex excitability primarily to cutaneous thermal stimuli in rats. **Neurosci Lett**, v. 80, n. 3, p. 293-297, 1987.

WOOD, P.B. Role of central dopamine in pain and analgesia. **Expert Rev Neurother**, v.8, n. 5, p. 781-97, 2008.

WÖHR, M., BORTA, A., SCHWARTING, R.K. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose–response study in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 84, p. 228–240, 2005.

WOOLF, C.J., KING, A.E. Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. **J Neurosci**, v. 10, n. 8, p. 2717-26, 1990.

XIE, J., HO LEE, Y., WANG, C., MO CHUNG J., CHUNG, K. Differential expression of alpha1-adrenoceptor subtype mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve ligation. **Brain Res Mol Brain**, v. 93, n. 2, p. 164-172, 2001.

XU, M., KONTINEN, V.K., KALSO, E. Endogenous noradrenergic tone controls symptoms of allodynia in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 366, p. 41-45, 1999.

YAKSH, T., L., HUA, X-Y., KALCHEVA, I., NOZAKI-TAGUCHI, N., MARSALA, M. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 7680–7686, 1999.

YANG, H.W., ZHOU, L.J., H.U., N.W., XIN,W.J., LIU, X.G. Activation of spinal D1/D5 receptors induces late-phase LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. **J Neurophysiol**, v. 94, p. 961–967, 2005.

YARNITSKY, D., BOUHASSIRA, D., DREWES, A.M., FILLINGIM, R.B., GRANOT, M., HANSSON, P., LANDAU, R., MARCHAND, S., MATRE, D., NILSEN, K.B., STUBHAUG, A., TREEDE, R.D., WILDER-SMITH, O.H. Recommendations on practice of conditioned pain modulation (CPM) testing. **Eur J Pain**, v. 19, n. 6, p. 805-6, 2015.

YASHPAL, K., FISHER, K., CHABOT, J.G., CODERRE, T.J. Differential effects of NMDA and group I mGluR antagonists on both nociception and spinal cord protein kinase C translocation in the formalin test and a model of neuropathic pain in rats. **Pain**, v. 94, n. 1, p. 17-29, 2001.

YI, M., ZHANG, H., LAO, L., XING, G. WAN, Y. Anterior cingulate cortex is crucial for contra- but not ipsi-lateral electro-acupuncture in the formalin induced inflammatory pain model of rats. **Mol Pain**, v. 7, p. 01-07, 2011.

YILMAZ, P., DIERS, M., DIENER, S., RANCE, M., WESSA, M., FLOR, H. Brain correlates of stress-induced analgesia. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 522-529, 2010.

YOU, H.J., LEI, J., SUI, M.Y., HUANG, L., TAN, Y.X., TJØLSEN, A., ARENDT-NIELSEN, L. Endogenous descending modulation: spatiotemporal effect of dynamic imbalance between descending facilitation and inhibition of nociception. **J Physiol**, v. 588, p. 4177-4188, 2010.

YOUNG, S.L., FANSELOW, M. S. Associative regulation of Pavlovian fear conditioning: unconditional stimulus intensity, incentive shifts, and latent inhibition. **J Exp Psychol Anim Behav Process**, v. 18, n. 4, p. 400-413, 1992.

ZEITZ, K.P., GUY, N., MALMBERG, A.B., DIRAJLAL, S., MARTIN, W.J., SUN, L., BONHAUS, D.W., STUCKY, C.L., JULIUS, D., BASBAUM, A.I. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. **J Neurosci**, v. 22, n. 3, p. 1010-1019, 2002.

ZHANG, S. P., DAVIS, P., BANDLER, R. CARRIVE, P. Brainstem integration of vocalization: Role of the midbrain periaqueductal gray. **J Neurophysiol**, v. 72, p. 1337–1356; 1994.

ZUBIETA, J.K., BUELLER, J.A., JACKSON, L.R., SCOTT, D.J., XU, Y., KOEPPE, R.A., NICHOLS, T.E., STOHLER, C.S. Placebo effects mediated by endogenous opioid activity on mu-opioid receptors. **J Neurosci**, v. 25, p. 7754–7762, 2005.