

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

MARIA ALCINA MARTINS

**INJEÇÃO DE GLICINA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL FACILITA OU INIBE A
NOCICEPÇÃO DEPENDENDO DO CONTEXTO
NOCICEPTIVO**

Florianópolis

2009

MARIA ALCINA MARTINS

**INJEÇÃO DE GLICINA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL DORSAL FACILITA OU INIBE A
NOCICEPÇÃO DEPENDENDO DO CONTEXTO
NOCICEPTIVO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Florianópolis

2009

***À minha família,
minha base, meu tudo.***

AGRADECIMENTOS

Foram muitos, os que me ajudaram a concluir este trabalho.

Meus sinceros agradecimentos...

...a Deus por trilhar os caminhos da minha vida, e ter me dado condições para alcançar todos os meus objetivos. Confiar Nele me fez acreditar que tudo é possível;

...ao professor Dr. Carlos Rogério Tonussi, meu especial agradecimento por ter dado a oportunidade de sua orientação, pelos conhecimentos ofertados, e acima de tudo pela dedicação, amizade e confiança;

...aos meus irmãos Júnior e Alcindo, ao meu pai Armando e em especial a minha companheira e amada mãe Claudete, por ter sempre me ajudado a vencer as dificuldades;

...ao meu marido Alécio, que com muito amor e carinho ficou do meu lado, me ajudando a crescer, a vencer todos os obstáculos e conquistar meus sonhos;

...aos meus familiares, em especial a minha avó Maria, pela constante preocupação com meu bem estar e por acreditar na minha capacidade.

...à minha quase cunhada, mas irmã de coração Kelly, pelo apoio e pela confiança;

...aos professores do departamento de Farmacologia, pelo companheirismo e pela contribuição à minha formação científica;

...aos professores Pádua, Leandro, Giles, Thereza e Rui, por ter aceitado avaliar esse trabalho, no momento da qualificação ou na defesa da tese. Agradeço também aos professores Ricardo Nunes de Souza e Claudia Herrera Tambeli, por terem se disponibilizado a participar da banca;

...aos colegas do LANEN, principalmente a amiga Lúcia pelo carinho e ajuda.

Sentirei saudades do dias que passamos juntas. E espero que possamos trabalhar juntas novamente;

...aos colegas dos outros laboratórios, pela amizade, colaboração e troca de informações;

...aos funcionários e amigos desse departamento, em especial ao Pedro e a Rita, que sempre me ajudaram quando precisei;

...ao CNPq, e a CAPES, pelo apoio financeiro.

*Que sensação é essa que desfigura, subtrai, subjuga, ultraja, dilacera, isola,
deprime, indigna, apavora, maltrata?*

*Faz de mim um avesso, sem saber o que é direito, sem saber transformar, para
onde ir, que sentido virar, que posição ocupar, que sentimento relaxar ou reprimir.*

Que sensação é essa que me faz ninguém, perante o mensurável e imensurável?

*Neste instante não sou nada, não tenho nada, sou o que um ser puder curar, sou o
que a vida puder sanar, sou um ai no ar...*

(Thelma Prado Moraes)

RESUMO

A Substância Cinzenta Periaqueductal dorsal (SCPd) é reconhecida como uma estrutura do sistema nervoso central (SNC) responsável por coordenar as funções autonômicas e comportamentais em situações de ameaça ou perigo iminente, estando bem estabelecido que sua ativação desencadeia comportamentos de defesa e inibição da dor. Porém, sabe-se que tanto na clínica, quanto em modelos experimentais, o estresse/ansiedade podem produzir tanto efeitos inibitórios quanto facilitatórios da nocicepção. Ao menos em grande parte destes estudos, tem-se dado maior ênfase ao modelo de estresse, sem levar-se em conta o nível de aversividade do estímulo nociceptivo. Assim, como a estimulação da SCPd modifica o caráter aversivo de estímulos externos, a manipulação dessa estrutura em diferentes modelos de nocicepção, com diferentes níveis de aversividade, ajudaria a compreender como o SNC pode fazer a escolha entre aumentar ou inibir a nocicepção. Nesse trabalho, a SCPd de ratos foi injetada com glicina (GLI), o que mostrou previamente produzir efeito tipo-ansiolítico progressivo (dose-dependente). GLI (10-80 nmoles) facilitou e inibiu a nocicepção, dependendo da dose injetada e do teste nociceptivo empregado. GLI apenas aumentou, e na concentração mais alta testada, a nocicepção no teste de formalina na pata (mais aversivo). No teste de aversividade intermediária, formalina intra-articular, a GLI facilitou o comportamento de nocicepção nas concentrações menores (10 e 20 nmoles), porém o inibiu nas concentrações maiores (50 e 80 nmoles). No teste de aversividade menor, dor térmica escapável, a GLI apenas causou aumento da latência de retirada, ou hiponocicepção. Ambos os efeitos foram inibidos, pela co-aplicação de GLI e ácido 7-cloroquinurênico ou HA966, antagonistas total e parcial, respectivamente, dos receptores GLI_B . No entanto, a estriçnina, antagonista do receptor GLI_A aplicado na SCPd induziu os mesmos efeitos da glicina nos modelos de nocicepção e no teste do labirinto em cruz elevado causou efeito tipo-ansiolítico. A aplicação sistêmica, ou na SCPd de naloxona (antagonista dos receptores opióides) e de metisergida (antagonista dos receptores serotoninérgicos) preveniu as ações de GLI na SCPd. Nossos dados mostraram que existe um controle bidirecional da SCPd na nocicepção dependente da ativação local do receptor GLI_B e de vias opioidérgicas e serotoninérgicas presentes em algum ponto da circuitaria modulatória da dor. O receptor GLI_A demonstrou atuar de forma oposta aos receptores GLI_B na SCPd. Estamos sugerindo que o estresse induzido pela glicina na SCPd juntamente com o do teste nociceptivo, aumentam a nocicepção quando esta for o principal foco de atenção. Assim, a SCPd pode ser responsável por modular a nocicepção de acordo com a demanda atencional gerada pelo foco estressor.

Palavras-chaves: SCPd, hiponocicepção, hipernocicepção, estresse, glicina.

ABSTRACT

The dorsal column of periaqueductal grey matter is recognized for the coordination of autonomic and behavioral responses elicited by imminent threat or danger situations. It is well established that its activation elicits defense-related behaviors, as well as pain inhibition. However, it is known that either in the clinic or in experimental models, the stress/anxiety may produce hyperalgesia as well as pain inhibition. At least in a number of these studies, more emphasis was given to the stress paradigms, without taking in to account the aversion level of the nociception test. Since the dPAG stimulation modifies the aversive characteristic of external stimuli, its manipulation under nociceptive paradigms with different aversion levels, may help to understand how the SNC shifts between facilitation or pain inhibition. Here, dPAG was stimulated with glycine (GLY), which was previously shown to produce a dose-related anxiety-like behavior. GLY (10-80 nmols) either facilitated or inhibited the nociception, depending on the injected concentration and on the nociception test. GLY only increased, and in the highest concentration, the nociception induced by formalin into the paw (more aversive test). In the model with intermediate aversiveness, intra-articular formalin, the lower concentration of GLY (10 and 20 nmols) facilitated the nociception behavior, however, it was inhibited with higher concentration (50 and 80 nmols). In the model with lowest aversiveness, heat escapable pain, GLY only caused the increased of withdrawal latency, or hyponociception. Both effects were inhibited by GLY co-injection with 7-Chlorokinurenic acid, or HA-966, total and partial GLY_B antagonists, respectively, into dPAG. However, dPAG injection of the GLY_A antagonist strychnine alone induced similar effects as that observed with GLY in the present nociception models, and also caused anxiety-like behavior in the plus-maze test. Systemic or intra-dPAG injection of naloxone (opioid antagonist) or methysergide (5-HT antagonist) prevented GLY effects. The present data suggest that dPAG exerts a bidirectional effect on nociception, which is mediated by glutamate (via NMDA/GLY_B), opioids and 5-HT. The GLY_A receptor was shown to act as opposed to GLY_B receptor into the dPAG. Moreover, it is discussed here that the anxiety produced by dPAG activation will increase nociception when the nociception model is the main source of stress, but conversely will decrease nociception when it is not. Thus dPAG may be responsible to modulate nociception according to the attentional needs.

Key words: dPAG, hyponociception, hypernociception, stress, glycine.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Sistema descendente modulatório da dor com as principais conexões na substância cinzenta periaquedutal (SCP) e na região rostral ventromedial do bulbo (RVM)..... | 08 |
| Figura 2. Desenho ilustrando a localização e a organização das colunas da SCP ao longo do seu eixo rostro-caudal..... | 09 |
| Figura 3. Efeito hiper e hiponociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos..... | 32 |
| Figura 4. Histologia de confirmação dos sítios das microinjeções..... | 33 |
| Figura 5. Efeito da glicina no colículo superior (CS) no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos..... | 34 |
| Figura 6. Efeito hipernociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de formalina na pata em ratos..... | 37 |
| Figura 7. Efeito hiponociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste do <i>tail flick</i> em ratos..... | 39 |
| Figura 8. Efeito da microinjeção de glicina no colículo superior (CS) em ratos submetidos ao teste do <i>tail flick</i> | 40 |
| Figura 9. Efeito da microinjeção de glicina associada com estriçnina na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos..... | 42 |
| Figura 10. Efeito hipernociceptivo da microinjeção de estriçnina na SCPd no teste de formalina na pata em ratos..... | 44 |
| Figura 11. Efeito hiponociceptivo da microinjeção de estriçnina na SCPd no teste do <i>tail flick</i> em ratos..... | 46 |
| Figura12. Efeito tipo-ansioçênico da estriçnina microinjetada na SCPd de ratos, no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)..... | 48 |
| Figura 13. Efeito da microinjeção de glicina associada com HA966 (HA) na SCPd, no teste do <i>tail flick</i> e no teste de formalina na pata, em ratos.... | 50 |
| Figura 14. Efeito da microinjeção de HA966 (HA) na SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos..... | 51 |
| Figura 15. Efeito do ácido 7 cloroquinurênico (7CL) microinjetado na SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos..... | 52 |

LISTA DE FIGURAS (Continuação)

- Figura 16.** Efeito do tratamento sistêmico com naloxona (nx), nas ações hiper e hiponociceptivas da glicina na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos..... 54
- Figura 17.** Efeito da microinjeção de glicina associada com naloxona na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos..... 55
- Figura 18.** Efeito do tratamento sistêmico com metisergida nas ações hiper e hiponociceptivas da glicina na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos..... 57
- Figura 19.** Efeito da microinjeção de glicina associada com metisergida na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos..... 58
- Figura 20.** Proposta de modulação glicinérgica entre as células localizadas na SCPd..... 72

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Coordenadas de microinjeção para a SCPdl..... | 21 |
| Tabela 2- Resumo dos principais efeitos dos tratamentos intra-SCPd nos testes de incapacitação articular induzida por formalina (2%), formalina na pata (FP), <i>tail flick</i> e labirinto em cruz elevado (LCE)..... | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| 5-HT | 5-hidroxitriptamina (serotonina) |
| AHN | Núcleo hipotalâmico anterior |
| ANOVA | Análise de variância |
| Aq | Aqueduto cerebral |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| AP | Antero-posterior |
| CCK | Colecistocinina |
| CeA | Núcleo central da amígdala |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| CL ⁻ | Íon cloro |
| 7CL | Ácido 7-cloroquinurênico |
| °C | Graus centígrados |
| cm | Centímetro |
| cm ³ | Centímetro cúbico |
| CS | Colículo superior |
| DLPT | Dorso-lateral da ponte |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| DV | Dorso-ventral |
| EA | Entrada nos braços abertos |
| EPM | Erro padrão da média |
| F | Valor do teste de ANOVA |
| Fig | Figura |
| F1 | Fase 1 |
| F2 | Fase 2 |
| fMRI | Imagem de ressonância magnética funcional |
| g | Gramma |
| G | Gauge |
| GABA | Ácido gama aminobutírico |

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuação)

| | |
|------------------|--|
| GLI | Glicina |
| GLIT1 | Transportador de glicina 1 |
| GLU | Glutamato |
| GRD | Gânglio da raiz dorsal |
| h | Hora |
| HA966 | (±)-3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona |
| HMD | Núcleo hipotalâmico dorsomedial |
| I.A.S.P. | Organização Internacional para o Estudo da dor |
| i.p. | Intraperitoneal |
| K_i | Constante inibitória |
| LCE | Labirinto em cruz elevado |
| LPS | Lipopolissacarídeo bacteriano |
| LTF | Latência <i>tail flick</i> |
| m/s | Metros por Segundo |
| min | Minutos |
| Met | Metisergida |
| MPE | Efeito máximo possível |
| ML | Meso-lateral |
| ml | Mililitros |
| mm | Milímetros |
| μ l | Microlitro |
| μ m | Micrômetro |
| Na^{2+} | Íon sódio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NCN | Número de comportamentos nociceptivos |
| Nx | Naloxona |
| NMDA | N-metil-D Aspartato |
| nmoles | Nanomoles |

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuação)

| | |
|--------|--|
| NO | Óxido nítrico |
| NRM | Núcleo magno da rafe |
| PBN | Núcleo parabraquial |
| PBNI | Núcleo parabraquial lateral |
| PBS | Salina tampão fosfato |
| PC | Computador pessoal |
| PE | Polietileno |
| PET | Tomografia por emissão de prótons |
| PMD | Núcleo pré-mamilar dorsal |
| r.p.m. | Rotações por minuto |
| RVM | Bulbo rostral ventro-medial |
| Sal | Salina |
| s.c. | Subcutânea |
| SCP | Substância cinzenta periaquedutal |
| SCPd | Substância cinzenta periaquedutal dorsal |
| SCPdl | Substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral |
| SCPdm | Substância cinzenta periaquedutal dorso-medial |
| SCPl | Substância cinzenta periaquedutal lateral |
| SCPvl | Substância cinzenta periaquedutal ventro-lateral |
| s | Segundos |
| SI | Área somatossensorial primária |
| SII | Área somatossensorial secundária |
| SNC | Sistema nervoso central |
| STR | Estricnina |
| t | Valor do teste t de <i>Student</i> |
| TA | Tempo nos braços abertos |
| TEA | Tentativas de entradas nos braços abertos |
| TEP | Tempo de elevação da pata |

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuação)

| | |
|--------|-----------------------------------|
| VIP | Polipeptídeo intestinal vasoativo |
| VMH | Núcleo hipotalâmico ventro-medial |
| pmoles | Picomoles |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 1.1 Dor e nocicepção..... | 01 |
| 1.2 Modulação da dor..... | 05 |
| 1.3 Substância cinzenta periaquedutal..... | 06 |
| 1.3.1 Conexões da SCP..... | 11 |
| 1.4 Vias descendentes modulatórias da dor..... | 13 |
| 1.5 Estresse e dor..... | 15 |
| 1.6 SCPd, estresse e nocicepção..... | 16 |
| 2 OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 19 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 Animais..... | 20 |
| 3.2 Cirurgia estereotáxica..... | 20 |
| 3.3 Cânulas..... | 22 |
| 3.4 Microinjeção intra-cerebral..... | 22 |
| 3.5 Compostos e soluções..... | 23 |
| 3.6 Testes nociceptivos..... | 23 |
| 3.6.1 Incapacitação articular induzida por formalina..... | 23 |
| 3.6.2 Teste de formalina na pata..... | 24 |
| 3.6.3 Teste do estímulo térmico quente na cauda (<i>tail flick</i>)..... | 24 |
| 3.7 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)..... | 25 |
| 3.8 Protocolo experimental..... | 26 |
| 3.9 Confirmação do sítio da microinjeção intracerebral..... | 29 |
| 3.10 Análise estatística..... | 29 |
| 4 RESULTADOS..... | 30 |
| 4.1 Efeito da glicina intra-SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina..... | 30 |
| 4.2 Efeito da glicina intra-SCPd no teste de formalina na pata..... | 35 |
| 4.3 Efeito da glicina intra-SCPd no teste do <i>tail flick</i> | 38 |

SUMÁRIO (Continuação)

| | |
|---|------------|
| 4.4 Efeito do antagonista do receptor GLI_A (Estricnina) intra-SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina..... | 41 |
| 4.5 Efeito do antagonista do receptor GLI_A (Estricnina) intra-SCPd no teste de formalina na pata..... | 43 |
| 4.6 Efeito do antagonista do receptor GLI_A (Estricnina) intra-SCPd no teste do <i>tail flick</i> | 45 |
| 4.7 Efeito do antagonista do receptor GLI_A (Estricnina) intra-SCPd no teste do labirinto em cruz elevado..... | 47 |
| 4.8 Efeito dos antagonistas do receptor GLI_B -NMDA (7CL e HA) intra-SCPd nos três testes nociceptivos..... | 49 |
| 4.9 Efeito do tratamento sistêmico e intra-SCPd com naloxona no teste de incapacitação articular induzido por formalina..... | 53 |
| 4.10 Efeito do tratamento sistêmico e intra-SCPd com metisergida no teste de incapacitação articular induzida pela formalina..... | 56 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 59 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 76 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 77 |
| APÊNDICE A - Subunidades e mecanismo de ação dos receptores NMDA..... | 101 |
| APÊNDICE B - Subunidades e mecanismo de ação dos receptores GLI_A..... | 102 |
| ANEXO A - Artigo publicado ou em edição..... | 103 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR E NOCICEPÇÃO

O sistema sensorial tem o papel de informar o cérebro sobre o estado dos ambientes externo e interno do corpo. A dor, enquanto modalidade de percepção, constitui um sistema de alarme cuja função é proteger o organismo de uma lesão tecidual, através da ativação de mecanismos que envolvem vias reflexas medulares e supramedulares (DRAY, 1995; JULIUS e BASBAUM, 2001; Le BARS et al., 2001).

Assim, a dor, como a visão, a audição, o tato e o olfato, é uma sensação específica, com estruturas específicas identificadas. Há mais de um século, Sherrington (1906) sugeriu a existência de nociceptores, representado por neurônios sensoriais primários, que são ativados por estímulos periféricos capazes de gerar danos teciduais, transformando os estímulos iniciais em impulsos nervosos. Desta forma, o calor, o frio, a pressão, a distensão, os traumas, os estímulos químicos, dentre outros, podem, direta ou indiretamente, ativar os nociceptores (BESSOU e PERL, 1969).

A dor pode ser modulada por uma série de experiências comportamentais, pois não envolve somente a transmissão do estímulo nocivo, mas também fatores emocionais, genéticos, sociais, culturais, ambientais e cognitivos (MERSKEY, 1979; RUSSO e BROSE, 1998; JULIUS e BASBAUM, 2001). Nem todo estímulo nocivo que ativa os nociceptores resulta necessariamente em uma experiência dolorosa. Além disso, estudos recentes mostram que uma experiência dolorosa também pode ocorrer sem um estímulo nociceptivo primário (EISENBERGER et al., 2003; DERBYSHIRE et al., 2004; SINGER et al., 2004; RAIJ et al., 2005). De forma que, a relação entre a ativação dos nociceptores e a percepção da dor envolve um complexo processamento através das vias sensoriais e, a natureza altamente subjetiva da dor dificulta sua compreensão, investigação, controle e seu tratamento clínico (BASBAUM e JESSEL, 2000).

Sendo assim, se faz necessária a distinção entre os termos dor e nocicepção. Nocicepção é um termo neurofisiológico que se refere somente à percepção sensorial do sistema nervoso central (SNC), evocada pela ativação de receptores

sensoriais especializados (nociceptores) existentes no local do estímulo (FÜRST, 1999). Entretanto, a dor envolve funções cerebrocorticais com ativação dos componentes discriminativo, afetivo-emocional, cognitivo e locomotor (RIEDEL e NEECK, 2001). A dor é desta maneira, uma experiência altamente subjetiva, e 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”. Essa definição foi então adotada pela Organização Internacional para o Estudo da dor (I.A.S.P.) e permanece até os dias atuais (LOESER e TREEDE, 2008).

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

A dor pode ser classificada de múltiplas maneiras. Sob o ponto de vista de duração, a sensação dolorosa pode ser qualificada como do tipo **transitória**, **aguda** ou **crônica**. Tanto na dor transitória como na aguda, a causa é bem definida e o curso temporal de ambas é delimitado, podendo desaparecer antes mesmo da remoção da causa ou reparo do dano tecidual. A diferença entre as duas é a que na dor transitória, a ativação dos nociceptores acontece na ausência de qualquer dano tecidual e na dor aguda a lesão no tecido tem que estar presente. Ao contrário, a dor crônica é geralmente causada por lesões ou doenças que superam a capacidade de recuperação do organismo, podendo persistir até mesmo após o desaparecimento do trauma inicial, estendendo-se por meses ou anos, perdendo seu caráter protetor e comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (ASHBURN e STAATS, 1999; LOESER e MELZACK, 1999; LOESER, 2003; SKØTT, 2003).

No que tange o conceito de localização, a dor pode ser classificada em **somática** ou **visceral** dependendo da origem do estímulo nociceptivo. A dor somática ocorre quando os estímulos nociceptivos provêm ou de estruturas superficiais do corpo, como pele e tecido conjuntivo (**dor somática superficial**) ou de estruturas mais profundas como ossos, articulações, músculos e tendões (**dor**

somática profunda). A dor visceral, por sua vez, ocorre quando os estímulos que vão produzir a sensação de dor provêm de órgãos localizados no interior das principais cavidades corporais como, por exemplo, coração, fígado, pulmões (para revisão, ver RAJA et al., 2006).

Tanto no tecido superficial quanto no profundo, o sinal nociceptivo alcança o SNC devido à presença de terminações nervosas livres (assim chamadas por não serem equipadas com corpúsculos ou órgãos) das fibras aferentes primárias, que transmitem a informação dolorosa para os neurônios do corno dorsal da medula espinhal (BASBAUM e JESSEL, 2000). Os corpos celulares das terminações nervosa livres da região da cabeça e do corpo localizam-se, respectivamente, no trigêmeo e no gânglio da raiz dorsal, e podem ser agrupados em três categorias com base em seus diâmetros, estruturas e velocidades de condução (JULIUS e BASBAUM, 2001). As fibras C, que por serem amielinizadas são as de condução mais lenta (0,5-2 m/s) e as de menor diâmetro (0,4-1,2 μm). Na segunda categoria encontram-se as fibras A δ , mielinizadas (2-6 μm) e de velocidade intermediária (12-30 m/s). Finalmente, existem as fibras A α e A β da terceira categoria, mielinizadas de largo calibre e de condução rápida (10 μm , 100 m/s), responsáveis pela informação proprioceptiva (toque leve e pressão). A maioria das fibras C é chamada de nociceptor polimodal devido a sua habilidade de responder a estímulos nociceptivos mecânicos (pressão dolorosa, distensão, corte tecidual), térmicos (calor ou frio) ou químicos. No entanto, sua ativação por estímulos mecânicos depende das substâncias químicas liberadas como resultado da lesão tecidual (DAVIS et al., 1993). As fibras A δ , por sua vez, são conhecidas como mecanotermo nociceptores, são responsivas às estimulações nociceptivas mecânicas e térmicas (JULIUS e BASBAUM, 2001). As fibras A δ geram sensações de picada, pontiagudas, dor aguda e bem localizada, enquanto as fibras C geram sensações de dor em queimação, mal localizada, difusa e contínua (RAJA et al., 2006; JULIUS e BASBAUM, 2001). As fibras A β , numa proporção substancial nos aferentes sensoriais da pele, músculos, articulações e tendões, geralmente são unimodais e respondem a estímulos de baixa (JULIUS e BASBAUM, 2001), e de alta intensidade (DJOUHRI e LAWSON, 2004). Estudos utilizando animais transgênicos em conjunto com abordagens fisiológicas, farmacológicas e bioquímicas, têm demonstrado a participação das três categorias de fibras sensoriais nos processos de dor

persistente (BESSION, 1999; URBAN e GEBHART, 1999).

Os nociceptores são equipados com moléculas sensoriais (receptores), para diversas substâncias algogênicas expressas na membrana plasmática e que traduzem o sinal externo em potenciais de ação. Estes por sua vez, são propagados ao longo dos seus axônios até seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal (GRD), bem como ao corno dorsal da medula espinhal. Entretanto, os nociceptores também podem exercer funções eferentes no tecido periférico através da liberação de neuropéptídeos dos seus terminais sensoriais, entre eles; substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Desta maneira induzindo vasodilatação, extravasamento plasmático e outros efeitos como, por exemplo; atração de macrófagos ou degranulação de mastócitos. A inflamação produzida pelos nociceptores é chamada de inflamação neurogênica (FOREMAN, 1987; LYNN, 1996).

No corno dorsal da medula espinhal, os nociceptores ativam sinapticamente neurônios que ascendem (também chamados de fibras aferentes secundárias ou neurônios de projeção) para estruturas supramedulares, através da liberação de transmissores nociceptivos. Entre os vários candidatos a transmissores, podemos destacar o glutamato, a substância P, o CGRP, o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e a somatostatina, moléculas liberadas no corno dorsal após ativação das fibras C (para revisão, ver YAKSH, 2006). Após a sinapse medular, vias ascendentes no trato espinotalâmico ativam o sistema tálamo-cortical que é o responsável pela consciência da sensação da dor. A sensação da dor é composta por dois componentes, o primeiro é o aspecto sensorial-discriminativo, reflete a análise do estímulo nocivo em termos da sua localização, duração e intensidade. É produzido pelo sistema tálamo-cortical lateral, que é formado pelos núcleos laterais do tálamo e áreas somatosensorial primária e secundária (SI e SII) no giro pós-central. O segundo componente da sensação da dor é o aspecto afetivo, isto é; o estímulo nocivo é sentido como desagradável e causa reações aversivas. Este componente é produzido pelo sistema tálamo-cortical medial, que consiste nos núcleos central e medial do tálamo, córtex cingulado anterior (ACC), ínsula e córtex pré-frontal (TREEDE, 1999; BASBAUM e JESSEL, 2000).

1.2. MODULAÇÃO DA DOR

Pelo fato da dor ser importante para a sobrevivência, torna-se indispensável sua regulação no SNC. Head e Holmes postularam influências modulatórias da dor e propuseram que o tálamo é o centro para a percepção da dor e que o neocórtex, o centro da percepção discriminativa, poderia interferir nas respostas do tálamo aos estímulos nocivos (HEAD e HOLMES, 1911). Mais tarde, em 1954, Hagbarth e Kerr apresentaram as primeiras evidências diretas que os sítios supramedulares controlariam as vias ascendentes (presumivelmente sensoriais), e Carpenter e colaboradores (1965) demonstraram o controle descendente dos eferentes sensoriais para vias ascendentes. No entanto, a existência de um sistema modulatório específico da dor só foi claramente articulada em 1965, na teoria de controle do “portão” da dor, proposta por Wall e Melzack. De acordo com essa teoria, os interneurônios da lâmina II da medula espinhal (também chamada de substância gelatinosa) poderiam inibir ou facilitar os fluxos dos aferentes dentro do corno dorsal antes deles evocarem a resposta e a percepção da dor.

As vias modulatórias da dor controlam a liberação de neurotransmissores dos terminais nociceptivos das fibras aferentes primárias no corno dorsal da medula espinhal. A ativação das vias descendentes inibitórias bloqueia direta e indiretamente os neurônios de projeção no corno dorsal. Diretamente, através de seus eferentes serotoninérgicos e catecolaminérgicos (WESTLUND et al., 1990) e indiretamente através ou da inibição dos interneurônios excitatórios (LIGHT e KAVOOKJIAN, 1988) ou da excitação dos interneurônios inibitórios os quais contém neurotransmissores GABA (ácido gama aminobutírico) e glicina (TODD et al., 1996). Além desses, interneurônios opioidérgicos também são ativados pelas vias descendentes modulatórias e inibem tanto as fibras aferentes primárias quanto nos interneurônios excitatórios (DUGGAN et al., 1976; BENNETT et al., 1979).

As vias descendentes modulatórias não exercem funções exclusivamente inibitórias no corno dorsal. Existem evidências nas quais os mecanismos descendentes facilitatórios apresentam ações excitatórias tanto no terminal da fibra aferente primária, quanto na atividade intrínseca dos neurônios do corno dorsal. As vias descendentes inibitórias e facilitatórias podem ser derivadas da mesma estrutura supramedular (ALMEIDA et al., 1996).

Tem-se proposto que ambas as vias descendentes estão ativas sob condições normais. No entanto, parece existir predomínio de uma pequena parcela de influência facilitatória na transmissão do sinal nociceptivo (KOVÉLOWSKY et al., 2000; BEE e DICKENSON, 2007). O balanço entre o nível de atividade nas vias descendentes, facilitatórias e inibitórias, não é estático, e aparece em um estado de fluxo dinâmico devido à influência de vários fatores como a presença de outros estímulos somáticos e de fatores psicológicos como excitação, atenção, expectativa e ansiedade (BEECHER, 1959; MELZACK e WALL, 1982; MARINO et al., 1989; JANSSEN e ARTNZ, 1996; JAMES e HARDARDOTTIR, 2002). Tais fatores desempenham um papel crítico na determinação final da experiência da dor, uma vez que decidem a inclinação desse balanço entre os níveis de atividade nas vias de controle descendente, em favor de um estado hiper ou hiponociceptivo.

Presumivelmente, os circuitos neuronais que modulam a dor existem porque a habilidade de suprimir ou aumentar os reflexos nocifensivos e outras respostas normalmente desencadeadas pelo estímulo nocivo aumentam as chances de sobrevivência do indivíduo. Assim, por exemplo, a supressão do reflexo nocifensivo pode facilitar a fuga frente a uma ameaça, enquanto o aumento da dor na presença da lesão tecidual e da inflamação poderia promover recuperação e cura (WATKINS et al., 1995).

1.3 SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL

As evidências de que o sistema descendente poderia seletivamente modular a dor foram primeiramente colocadas após a descoberta da antinocicepção produzida por estimulação elétrica focal do cérebro (REYNOLDS, 1969; MEYER et al., 1971; MEYER e PRICE, 1976). A antinocicepção produzida pela estimulação elétrica é uma supressão altamente específica das respostas comportamentais aos estímulos nocivos induzida por estimulação de determinadas áreas cerebrais. A primeira antinocicepção produzida por estimulação elétrica foi evocada pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal (SCP). Durante a antinocicepção, os animais permanecem alerta e ativos, e suas respostas a maioria dos estímulos ambientais estão inalteradas, no entanto, as respostas aos estímulos nocivos, como orientação, vocalização e fuga estão ausentes. A analgesia produzida por

estimulação elétrica também pode ser produzida em humanos (para revisão, ver BOIVIE e MEYERSON, 1982; BASKIN et al., 1986). Em pacientes com dor crônica, a analgesia por estimulação elétrica é produzida sem evocar qualquer movimento ou sensação subjetiva consistente. Como em roedores, a analgesia por estimulação elétrica é induzida por estimulação da SCP e por estruturas periventriculares mais rostrais.

A descoberta do papel modulatório da dor da SCP foi um importante avanço para o conhecimento dos mecanismos modulatórios da dor. Pesquisas subsequentes demonstraram que a SCP é parte de um circuito do SNC que controla a transmissão nociceptiva na medula espinhal (**Fig.1**) (FIELDS et al., 1991). Em animais, a estimulação da SCP inibe reflexos provocados por estímulos nocivos simples como o *tail flick* ou retirada de pata (BASBAUM e FIELDS, 1978, 1984). Somado a isso, neurônios nociceptivos na medula espinhal são seletivamente inibidos pela estimulação da SCP (WATERS e LUMB, 1997) e lesões no funículo dorso-lateral (feixe nervoso pelo qual se projetam as vias descendentes inibitórias da dor oriundas do sistema SCP e do bulbo rostral ventro-medial) bloqueiam a inibição tronco cerebral dos neurônios medulares nociceptivos e respostas reflexas nocifensivas (RYAN et al., 1985).

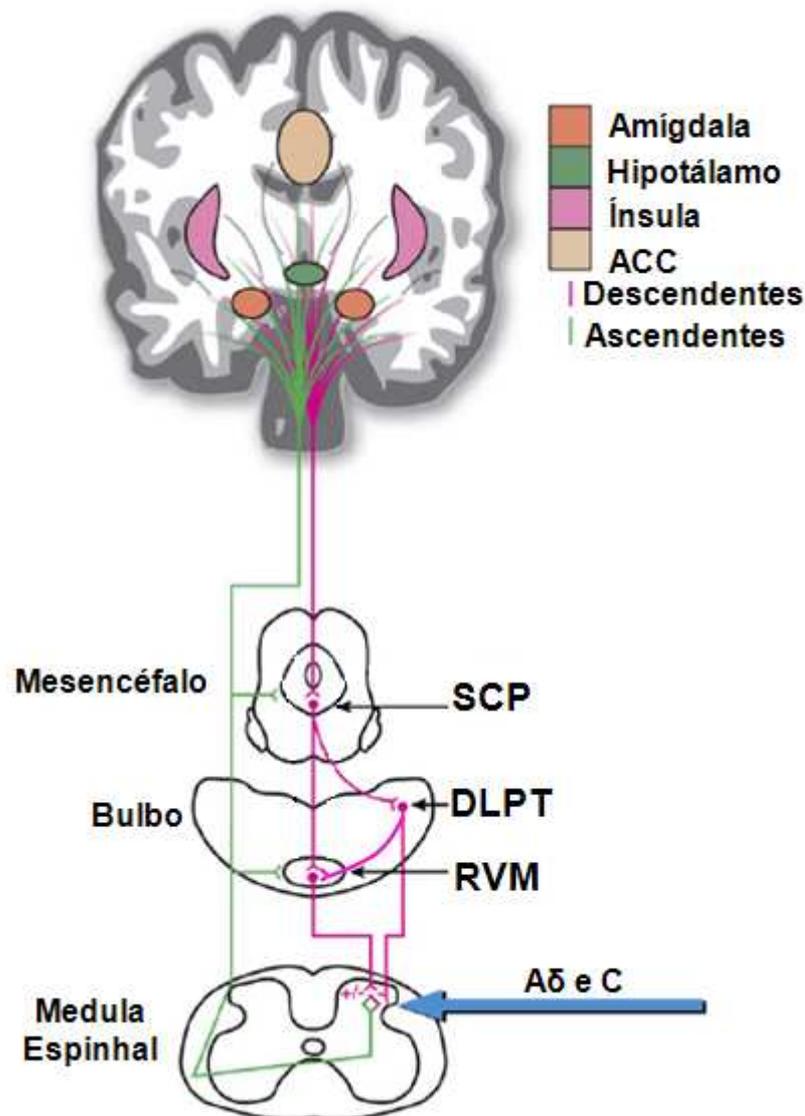


Figura 1. Sistema descendente modulatório da dor com as principais conexões na substância cinzenta periaquedual (SCP) e na região rostral ventro-medial do bulbo (RVM). Córtex cingulado anterior (ACC), ínsula e amígdala ativam projeções descendentes diretamente ou via hipotálamo para a SCP. A SCP controla os neurônios nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal através de conexões no RVM e na região dorso-lateral da ponte (DLPT). O RVM contém ambas as células, serotoninérgica e não-serotoninérgica, as quais se projetam diretamente para o corno dorsal; o DLPT projeta neurônios noradrenérgicos para o RVM e para o corno dorsal. O RVM exibe controle bidirecional sobre a transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal. +/- indicam influências hiper e hiponociceptivas, respectivamente (Modificado de TRACEY e MANTYH, 2007)

A SCP pode ser dividida em quatro colunas longitudinais que variam ao longo do seu eixo rostro-caudal (**Fig.a 2**). São elas: dorso-lateral (dl), dorso-medial (dm), lateral (l) e ventro-lateral (vl), que se diferem em características imunohistoquímicas, densidade de receptores, conexões e funções (BANDLER e SHIPLEY, 1994; BANDLER e KEAY, 1996). Por exemplo, microinjeções de aminoácidos excitatórios nas colunas dorso-lateral e lateral da SCP produzem, em ratos e gatos, aumento das respostas autonômicas e comportamentais caracterizadas por taquicardia, hipertensão, reações de “luta ou fuga” e hiponocicepção não mediada por opióides (BANDLER et al., 2000). Por outro lado, na coluna ventro-lateral da SCP, injeções de aminoácidos excitatórios evocam respostas depressoras do tipo: bradicardia, hipotensão, quiescência, hipoatividade, juntamente com hiponocicepção opióide dependente (BANDLER et al., 2000). Alguns autores apontam o sistema serotoninérgico mediando a hiponocicepção oriunda da estimulação química e elétrica da SCPd, uma vez que esta foi totalmente bloqueada por antagonistas serotoninérgicos (JENSEN e YAKSH, 1984, NICHOLS et al., 1889; COIMBRA e BRANDÃO, 1997; BRANDÃO et al., 1999).

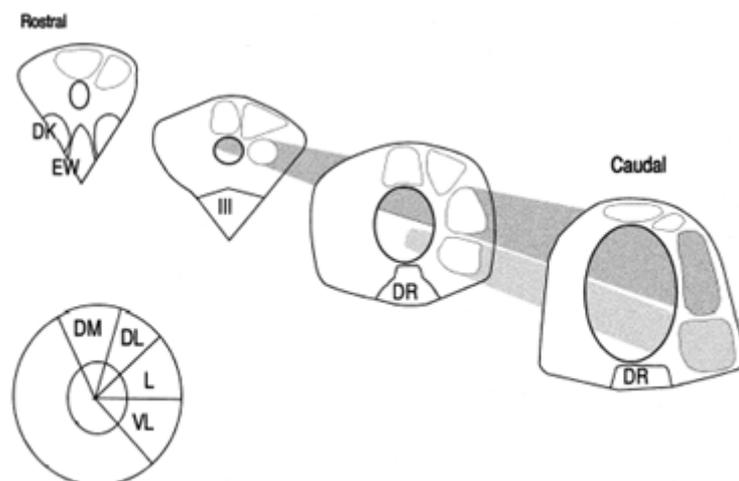


Figura 2. Desenho ilustrando a organização das colunas na SCP ao longo do seu eixo rostro-caudal. DM: dorso-medial; DL: dorso-lateral; L: lateral; VL: ventro-lateral; DW: núcleo Darkschewitsch; EW: núcleo Edinger-Westphal; III: núcleo óculomotor; DR: rafe dorsal (Modificado de BANDLER et al., 1991).

Pesquisas recentes têm identificado uma projeção facilitatória descendente da SCP, que como o sistema descendente inibitório, conecta-se com o RVM. No entanto, a projeção produz efeitos hipernociceptivos por aumentar a transmissão medular do sinal nociceptivo (HEINRICHER et al., 2004; GEBHART, 2004; CARLSON et al., 2007; TILLU et al., 2008). O aumento da nocicepção através do sistema SCP / RVM tem sido visto em modelos de neuropatia, na dependência de opióides e na inflamação (PORRECA et al., 2002; REN e DUBNER, 2002; HEINRICHER et al., 2003). Acredita-se que é a ativação sustentada desse sistema descendente facilitatório que pode fundamentar alguns estados de dor crônica (PORRECA et al., 2002; GEBHART, 2004; SUZUKI et al., 2004) e dor por lesão de nervo (PERTOVAARA, 2000; PORRECA et al., 2002; OSSIPOV et al., 2006). Assim, esse sistema modulatório descendente exerce controle bidirecional do processamento nociceptivo. No entanto, as bases neuronais da facilitação descendente têm recebido relativamente pouca atenção experimental.

Estudos com o RVM sugerem que a estimulação dessa porção do bulbo é capaz de exercer efeitos inibitórios e excitatórios sobre a nocicepção. Doses baixas de estímulo elétrico ou baixas concentrações de agonista excitatório no mesmo sítio, induzem facilitação da nocicepção medular, enquanto doses altas inibem a nocicepção (ZHUO e GEBHART, 1992; URBAN e SMITH, 1993; URBAN e GEBHART, 1997; ZHUO e GEBHART, 1997). Essas influências opostas sobre a nocicepção parecem envolver vias medulares anatomicamente distintas e são mediadas por diferentes receptores medulares. Por exemplo, a alta intensidade de estimulação elétrica ou altas doses de glutamato e neurotensina no RVM inibem a transmissão nociceptiva medular via projeções descendentes no funículo dorso-lateral e ativação de receptores colinérgicos e monoaminérgicos medulares. Ao contrário, influências facilitatórias do RVM, produzidos por estimulação elétrica de baixa intensidade ou doses baixas de glutamato e neurotensina, envolvem projeções descendentes no funículo ventro-lateral e são mediados por receptores serotoninérgicos e colecistocinérgicos (ZHUO e GEBHART, 1990; ZHUO e GEBHART, 1991; ZHUO e GEBHART, 1992; URBAN e SMITH, 1996; URBAN e GEBHART, 1997).

Dados sobre as vias descendentes ativadas pela estimulação da SCP são mais escassos, alguns estudos mostraram que a inibição dos neurônios nociceptivos

do corno dorsal produzida pela estimulação da SCP é antagonizada pela administração intratecal de antagonistas dos receptores serotoninérgicos 5-HT₁ e 5-HT₃ bem como antagonistas dos receptores α_2 adrenérgicos (LIN, 1996; PENG et al., 1996a, 1996b).

O entendimento dos mecanismos que fundamentam a facilitação e a inibição da nocicepção e as condições sob as quais esses fenômenos tornam-se ativos poderiam ter significantes implicações clínicas para o refinamento de terapias analgésicas como, por exemplo, no combate às hiperalgesias induzidas pelo estresse bem como os quadros de dor associados a processos crônicos ou neuropáticos.

As ferramentas de neuroimagem como, por exemplo, a tomografia por emissão de prótons (PET) e imagem de ressonância magnética funcional (fMRI) em humanos e animais estão auxiliando na descoberta de estruturas cerebrais envolvidas no controle descendente da dor, uma vez que permite acessar, de forma não invasiva, o SNC (MOOROW et al., 1998; TRACEY et al., 2002; TRACEY e LANNETTI, 2006). Estudos iniciais têm mostrado que as estruturas do tronco encefálico estão envolvidas mais na facilitação do que na inibição da dor (TRACEY e DUNCKLEY, 2004).

1.3.1 Conexões da SCP

Essa pequena área de substância cinzenta mesencefálica que circunda o canal cerebral (aqueduto de Sylvius) integra os eferentes do sistema límbico prosencefálico e do diencéfalo com os eferentes nociceptivos ascendentes do corno dorsal (BANDLER e KEAY, 1996). Existem projeções diretas para a SCP de um número de áreas do córtex pré-frontal medial, como o córtex cingulado anterior e córtex insular.

A maior fonte de aferentes diencefálicos para a SCP é o hipotálamo (BANDLER e KEAY, 1996) e a estimulação elétrica ou a microinjeção de opióides em certas regiões do hipotálamo produz analgesia (RHODES e LIEBSKIND, 1978; MANNING et al., 1994; HOLDEN et al., 2002). De-Oliveira e colaboradores (2000), através de estudos com indução da proteína Fos, revelaram que a microinjeção de

doador de óxido nítrico na SCPdl, ativa os seguintes núcleos hipotalâmicos: anterior (AHN), ventro-medial (VMH) e o pré-mamilar dorsal (PMD). A SCPdl projeta neurônios para núcleos hipotalâmicos relacionados com as respostas de defesa, o AHN e o núcleo hipotalâmico dorso-medial (HMD)(CAMERON et al., 1995). Evidências sugerem que o AHN é o principal núcleo ativado após estimulação somática nociva e que a SCPdl é a estrutura responsável por coordenar as funções autonômicas e sensoriais em resposta a esses eferentes nociceptivos oriundos dos diferentes domínios periféricos (PARRY et al., 2002).

A amígdala, a qual recebe muitos eferentes do hipotálamo e neocórtex, é outra importante fonte de eferentes para a SCP (AGGLETON, 1986). Essa estrutura límbica desempenha um papel chave na emocionalidade, na avaliação emocional do estímulo sensorial, no aprendizado emocional, na memória e nos distúrbios afetivos como ansiedade e depressão. É formada por diversos núcleos, sendo que o central (CeA) é o que atua tanto na resposta afetiva-emocional quanto na modulação da dor (para revisão ver, NEUGEBAUER, 2004). Aferentes corticais projetam-se para o núcleo basolateral da amígdala o qual se projeta para o núcleo central, que por sua vez apresenta densas projeções para a SCP (RIZVI et al., 1991). O CeA também recebe eferentes nociceptivos do corno dorsal da medula espinhal, direta ou indiretamente através do núcleo parabraquial (GAURIAU e BERNARD, 2002). A analgesia resultante da estimulação elétrica do CeA é bloqueada pela inativação com lidocaína ou injeção de antagonistas opióides, serotoninérgicos e β -adrenérgicos na SCP (PAVLOVIC et al., 1996; HELMSTETTER et al., 1998). Por outro lado, a inativação do CeA não altera a hiponocicepção sobre o estímulo térmico na cauda (teste do *tail flick*) após a estimulação elétrica da SCP (OLIVEIRA e PRADO, 2001). A amígdala e a SCP apresentam conexões diretas e recíprocas, e ambos eferentes e aferentes da amígdala e a SCP envolvem preferencialmente a SCPvl.

O núcleo acumbens, localizado no estriado ventromedial, também está implicado na modulação da dor (GEAR et al., 1999). O núcleo acumbens recebe importantes projeções da amígdala basolateral e embora não se conecte diretamente com SCP, projeta neurônios para o hipotálamo lateral e para amígdala, os quais então se projetam para a SCP.

No tronco encefálico, a SCP projeta-se predominantemente para a região rostral ventro-medial do bulbo (RVM), o qual inclui o núcleo magno da rafe (NRM)

bem como os núcleos gigantocelulares reticulares pars alfa e paragingantocelular lateral (FIELDS et al., 1991). Assim como na SCP, estimulação elétrica ou microinjeção de aminoácidos excitatórios ou opióides no RVM, também produz hiponocicepção e inibe a resposta do corno dorsal aos estímulos dolorosos (BASBAUM e FIELDS, 1984; FIELDS et al., 1991). Sugere-se que a conexão SCP-RVM seja a mais importante para a modulação da dor. Lesões anatômicas, inativação com lidocaína ou ainda microinjeção dos antagonistas dos aminoácidos excitatórios no RVM abolem a analgesia da SCP (BEHBEHANI e FIELDS, 1979; AIMONE e GEBHART, 1986). Os neurônios glutamatérgicos, serotoninérgicos e neurotensinérgicos da SCP são os que participam da ativação do RVM (para revisão, ver MILLAN, 2002).

A SCPdl parece não apresentar conexões diretas com o RVM e sim, com a região dorso-lateral da ponte (DLPT), a qual, através de neurônios catecolaminérgicos, se conecta com o RVM. O DLPT, que também apresenta participação na modulação da dor, é formado pelos núcleos cuneiforme, subcoerulear, parabraquial e núcleos noradrenérgicos (*locus coeruleus*, A₅ e A₇) (para revisão, ver FIELDS e BASBAUM, 1999). Além da DLPT, a SCPdl projeta-se também para região ventro-lateral do bulbo (grupo de células noradrenérgicas -A5), ambas áreas implicadas no controle autonômico (CAMERON et al., 1995).

1.4 VIAS DESCENDENTES MODULATÓRIAS DA DOR

A observação, em diferentes trabalhos de, que a estimulação elétrica do RVM poderia produzir inibição ou facilitação do processamento nociceptivo no corno dorsal da medula espinhal (GEBHART, 1992) direcionou a caracterização fisiológica individual dos neurônios do RVM. Entre os vários tipos de células do RVM, aquelas que exibiam uma resposta excitatória à estimulação nociva imediatamente antes do reflexo de retirada nociceptivo (células *ON*) parecem ter um papel facilitatório, enquanto, aquelas que exibiam uma resposta inibitória à estimulação nociva (células *OFF*) parecem ter um papel inibitório da dor (FIELDS et al., 2006). Um terceiro tipo de célula do RVM, que não responde à estimulação nociva (célula neutra), não tem um papel claro, embora seja proposto que estas células contribuam para a modulação tônica de vários processos medulares incluindo a nocicepção (MASON,

2006). Uma proporção significativa dos neurônios de cada uma dessas classes é projetada para a medula espinhal. Essas lâminas são alvos dos aferentes nociceptivos primários e seus neurônios constituintes respondem intensamente à estimulação nociva (WILLIS e COGGESHALL, 1991). Ambas as células respondem às manipulações da SCP que produzem analgesia, o que indica que estas células poderiam ser responsáveis pela influência descendente da SCP na nocicepção.

As células *OFF* exercem um efeito inibitório na nocicepção, uma vez que sua ativação é suficiente para produzir hiponocicepção (HEINRICHER *et al.*, 1994) e é requerida para as ações hiponociceptivas dos opióides. Por outro lado, as células *ON* exercem efeito facilitatório na nocicepção, uma vez que o aumento dos seus disparos foi associado com aumento da nocicepção em vários paradigmas (HEINRICHER *et al.*, 1989; RAMIREZ e VANEGAS, 1989; BEDERSON *et al.*, 1990; FOO e MASON, 2003). Adicionalmente, a ativação seletiva das células *ON* produz hipernocicepção em ratos levemente anestesiados (NEUBERT *et al.*, 2004). Neurônios na SCP e na DLPT podem ser divididos nas mesmas três classes de células: *ON*, *OFF* e neutras (HAWS *et al.*, 1989), o que sugere mecanismos neurais comuns para a modulação da dor existente no bulbo, na ponte e no mesencéfalo.

Microinjeções de morfina na SCP produzem hiponocicepção através da inibição de neurônios GABAérgicos, assim levando a desinibição dos neurônios aferentes da SCP para o RVM (VAUGHAN e CHRISTIE, 1997; VAUGHAN *et al.*, 1997). Quando a morfina ou outro agonista dos receptores μ -opióides é dado na SCP ou no RVM, as células *OFF* são ativadas, as células *ON* inibidas e as células neutras não são afetadas (HEINRICHER *et al.*, 1994; FIELDS, 2004). Desta forma, tem-se sugerido que os aferentes da SCP para o RVM produzem hiponocicepção através da ativação das *OFF* e/ou inibição das *ON* (TORTORICCI e MORGAN, 2002). Recentemente, Morgan e colaboradores (2008) demonstraram, através de estudos eletrofisiológicos e imuno-histoquímicos, que os aferentes da SCP para o RVM (os derivados da coluna ventro-lateral) realizam sinapse direta tanto com as células *ON* quanto com as *OFF* as quais se projetam diretamente para a medula espinhal. Essas projeções da SCP incluem as GABAérgicas para células *ON* GABAérgicas e projeções não-GABAérgicas (possivelmente glutamatérgicas) para células *OFF* também GABAérgicas.

Todos os neurônios serotoninérgicos do RVM, o correspondente a 20% do

total de neurônios dessa estrutura (MOORE, 1981), foram identificados como células neutras (POTREBIC et al., 1994; GAO e MASON, 2000) e não são afetados nem por opióides e nem por estimulação elétrica da SCP (GAO et al., 1997, 1998). Embora não haja evidências do envolvimento dessas células com a modulação da dor, há uma literatura extensa indicando a serotonina na modulação descendente da transmissão da dor (para revisão, ver Le BARS, 1988). Como os neurônios serotoninérgicos do RVM apresentam disparos tônicos e representam a única fonte da serotonina no corno dorsal, tem-se proposto que o RVM libera tonicamente serotonina no corno dorsal, modulando a ação de outros sistemas descendentes (MASON, 1997; MASON e GAO, 1998). Somado a isso, a atividade dos neurônios serotoninérgicos é determinada pelo estado comportamental do animal, como por exemplo, nível de alerta ou estágio de sono (FORNAL et al., 1985). Um exemplo particular é o ciclo vicioso que ocorre entre insônia e dor persistente, onde a insônia exacerba a dor reportada e vice-versa (para revisão, ver FOO e MASON, 2003).

1.5 ESTRESSE E DOR

Como já vimos, a ansiedade é um dos vários fatores que pode influenciar a percepção da dor (JAMES e HARDARDOTTIR, 2002). De uma maneira geral, define-se ansiedade como a emoção relacionada ao comportamento de avaliação de risco, quando a atenção do animal é focalizada ao objeto, ou ao ambiente potencialmente ameaçador (BLANCHARD e BLANCHARD, 1988).

Estudos com pacientes humanos mostram que o estado de ansiedade é capaz de aumentar tanto a dor aguda (MEAGHER et al., 2001; MARCHAND e ARSENAULT, 2002; VILLEMURE et al., 2003) quanto crônica (CORNWALL e DONDERI, 1988; JONES et al., 2003; VICKERS e BOOCOOCK, 2005; CHRISTIE e MOORE, 2005). Outras pesquisas também mostram que o uso de técnicas que reduzem a ansiedade (isto é; técnicas ansiolíticas) como acupuntura, massagem, meditação, e hipnose (ANBAR e GEISLER, 2005; DENG e CASSILETH, 2005), ou ainda a terapêutica com fármacos ansiolíticos ajudam a controlar a dor (JANSSEN e ARNTZ, 1999).

Experimentos usando modelos animais reforçam a influência da ansiedade na nocicepção. No entanto, os resultados são bastante conflitantes. Em alguns estudos,

a diminuição da ansiedade através do uso de fármacos ansiolíticos resultou em efeito hiponociceptivo moderado (ZAMBOTTI et al., 1991; PANG et al., 2001; MARTINS et al., 2006), nenhum efeito (PALAOGLU e AYHAN, 1986; TONUSSI e FERREIRA, 1992; GATCH, 1999) e até mesmo efeito hipernociceptivo (TATSUO et al., 1999). Fármacos ansiogênicos (que aumentam a ansiedade) têm mostrado que podem ou não ter efeito (MARTINS et al., 2006) ou também induzem hiponocicepção (SHANNOM e LUTZ, 2000; VELAZQUEZ et al., 2006). As inconsistências ainda se estendem para os estudos envolvendo testes os quais produzem estresse nos animais. Por exemplo, a exposição dos animais a diferentes situações estressantes (como: conflito social, teste do labirinto em cruz elevado, exposição à novidade, nado forçado, entre outros) para alguns autores causa hiponocicepção (TESKEY et al., 1984; RODGERS e RANDALL, 1987; KAVALIERS e INNES, 1988; RODGERS e SHEPHERD, 1989; RODGERS et al., 1992; LEE e RODGERS, 1992; HELMSTETTER, 1993; BELLGOWAN e HELMSTETTER, 1996; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000; TERSHNER e HELMSTETTER, 2000; VENDRUSCOLO et al., 2004), para outros, hipernocicepção (VIDAL e JACOB, 1982; JORUM, 1989; QUINTERO et al., 2000; ANDRÉ *et al.*, 2005, GAMEIRO et al., 2006; GEERSE et al., 2006). Uma possível explicação para as diferenças encontradas nesses estudos pode ser devido às diferentes intensidades dos estímulos estressantes e também ao tipo de estímulo nociceptivo empregado. Uma vez que, quando o teste nociceptivo é a fonte de maior ansiedade para o animal, manipulações para aumentar a ansiedade devem aumentar a nocicepção. Ao contrário, quando o teste nociceptivo tem menor potencial ansiogênico, situações ansiogênicas devem diminuir a nocicepção (BUSHNELL et al., 1985; MIRON et al., 1989; ARNTZ et al., 1994; RHUDY e MEAGHER 2000; PLOGHAUS et al., 2003).

1.6 SCPd, ESTRESSE E NOCICEPÇÃO

A SCPd é um importante sítio neuronal que regula várias funções fisiológicas relacionadas às reações comportamentais de defesa, incluindo comportamentos de aversão/ansiedade e a dor, como já foi mencionado (BANDLER e CARRIVE 1988; BLANCHARD e BLANCHARD, 1988, 1989; LOVICK et al., 1996; CAROBREZ ET AL., 2001; BITTENCOURT et al., 2004). De fato, a estimulação elétrica ou glutamatérgica da SCPd tem a possibilidade de causar comportamentos intensos de

defesa como sobressaltos, corridas e vocalização, acompanhados geralmente por hiponocicepção não-opiíide (JACQUET, 1988; JENSEN e YAKSH, 1992; MORGAN e FRANKLIN, 1988). No entanto, os comportamentos apresentados pelos animais são desproporcionais ao estímulo externo e muitas vezes estereotipados. Por outro lado, a aplicação de antagonistas do glutamato na SCPd apresenta efeito anti-aversivo em modelos de estresse (MATHEUS et al., 1994; DE-SOUZA et al., 1998). O que sugere que situações aversivas ativam a neurotransmissão glutamatérgica nessa região, que por sua vez dá origem às repostas autonômicas e comportamentais ajustadas ao estímulo. Além disso, a microinjeção de glicina na SCPd induziu hipernocicepção em modelo de nocicepção persistente e inescapável e, em concentração maior, hiponocicepção em modelo de nocicepção escapável (MARTINS, 2005). A aplicação de glicina na SCPd também evoca reações de aversão muito mais sutis, detectadas pela redução na exploração dos compartimentos abertos nos testes do labirinto em cruz elevado e labirinto em T elevado (SCHMITT et al., 1995; TEIXEIRA et al., 1997; DE-SOUZA et al., 1998; SANTOS et al., 2006). Tanto o efeito hiponociceptivo, como o efeito ansiogênico produzido pela glicina foram revertidos por antagonistas do sítio GLI_B do receptor NMDA glutamatérgico (TEIXEIRA et al., 1997; DE-SOUZA et al., 1998; MARTINS, 2006). A glicina age neste sítio em receptores NMDA como co-agonista do glutamato (JOHNSON e ASCHER, 1987; BOURNE e NICOLL, 1993; YONEDA e OGITA, 1991) (para mais detalhes sobre o receptor NMDA, ver apêndice A), o que deve aumentar a transmissão glutamatérgica por este receptor, sem aumentar sua ação em receptores não-NMDA, como ocorre quando se aplicam agonistas glutamatérgicos. No entanto, a SCPd também apresenta receptores de glicina sensíveis à estricnina, ou GLI_A (Betz, 1991; FUJITA et al., 1991; FUJIWARA et al., 1998) hiperpolarizantes da membrana neuronal (para mais detalhes sobre o receptor GLI_A , ver apêndice B). Na SCP, a ativação dos receptores GLI_A inibe a despolarização evocada pelo glutamato e reprime os disparos neuronais que formam parte das vias descendentes que controlam a dor (MIN et al., 1996; ONAKA et al., 1996). Porém pouco se sabe sobre os efeitos da ativação destes receptores na resposta de aversão e de nocicepção, e é possível que os efeitos da glicina até agora observados possam ser devidos a uma combinação de ações nos receptores GLI_A e GLI_B .

Esses achados reforçam o papel da SCPd ativando repostas comportamentais de aversão e hiponocicepção, porém sugerem que esta região

também pode aumentar a nocicepção. No entanto, os estudos mostrando os efeitos modulatórios da SCPd na nocicepção não têm levado em conta o aspecto aversivo/ansiogênico do modelo nociceptivo em si. O que nos leva a questionar se o modelo nociceptivo empregado pode determinar que tipo de influência modulatória, hiper ou hiponociceptiva, a SCPd pode ter. Como a estimulação progressiva da SCPd parece modificar proporcionalmente o valor aversivo de estímulos externos (SCHMITT et al., 1995; TEIXEIRA et al., 1997; DE-SOUZA et al., 1998; SANTOS et al., 2006), a hipótese do presente trabalho é que a ativação dessa estrutura com glicina em diferentes modelos comportamentais de nocicepção, com diferentes características aversivas, poderia ajudar a compreender como o SNC escolhe entre a facilitação ou a inibição da nocicepção em situações de estresse.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar se diferentes modelos nociceptivos podem determinar qual o tipo de influência modulatória, hiper ou hiponociceptiva, seria ativada pela estimulação da SCPd com glicina.

2.2 Objetivos específicos

- I) Identificar quais são as doses de glicina aplicada na SCPd capazes de induzir efeitos na nocicepção no teste de incapacitação articular induzida por formalina, no teste de formalina na pata e no teste de estímulo térmico quente na cauda;
- II) Investigar qual (is) é (são) o(s) receptore(s) envolvido(s) nos efeitos da glicina nos três testes de nociceptivos, através do uso do antagonista seletivo para GLI_A (estricnina) e dos antagonistas do GLI_B , o (+/-)-3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona ou HA-966), e o ácido 7-cloroquinurênico, microinjetados com glicina no mesmo sítio na SCPd;
- III) Avaliar o efeito do antagonista dos receptores GLI_A (estricnina) no teste do labirinto em cruz elevado.
- IV) Identificar se os efeitos induzidos pela injeção de glicina na SCPd apresentam mediação opióide ou serotoninérgica, através da aplicação sistêmica e intra-SCPd de antagonista dos receptores μ -opióide (naloxona) e dos receptores $5HT_1$ e $5HT_2$ da serotonina (metisergida).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia ético da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1995), e aprovados pelo Comitê de Ética local de Pesquisa animal (Proc. Nº: 23080.032820/2003-74).

Utilizaram-se ratos Wistar machos com \pm 3 meses de idade e com peso corporal variando de 250-350 g. Os animais foram criados pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e após período de aproximadamente 21 dias, encaminhados ao biotério do laboratório de Neurobiologia da Nocicepção do Departamento de Farmacologia desta instituição. Os animais permaneceram alojados em caixas plásticas em grupos de 06, com livre acesso à água e à comida. Aos 60 dias de idade, receberam tratamento preventivo para as endo e ectoparasitoses (Albendazole 10% e Fipronil, respectivamente). Controlou-se ainda, temperatura ($22 \pm 1^\circ$ C) e ciclo de luz claro/escuro (de 12 h).

3.2 Cirurgia estereotáxica

A neurocirurgia estereotáxica fundamenta-se no deslocamento tridimensional de um ponto, obedecendo coordenadas determinadas, e que permite a projeção espacial deste ponto, e a localização precisa de qualquer estrutura por ele representada. É usada quando se deseja atuar especificadamente sobre uma determinada estrutura encefálica. Para isso, a cirurgia é realizada com auxílio de um aparelho estereotáxico.

Os ratos foram primeiramente anestesiados por via intra-peritoneal (0,1 ml/100 g de rato) com uma solução 1:1 de cetamina (Dopalem[®]) e xilazina (Dopaser[®]). Após a perda do reflexo álgico (que foi verificado pela pressão da pata do animal), os ratos tiveram a região superior da cabeça tricotomizada e em seguida 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 com solução de álcool iodado, injetou-se subcutaneamente lidocaína a 3% (com vasoconstritor) 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, fez-se a incisão da pele e remoção do tecido subcutâneo para se visualizar os pontos cranianos de referência: bregma e lambda. Após a exposição da superfície craniana, 2 parafusos foram colocados, um em cada osso parietal, a fim de proporcionar melhor aderência do acrílico odontológico 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 em um mesmo plano. Depois de corrigida a inclinação, a partir do bregma, a torre do estereotáxico com a cânula-guia foi deslocada conforme as coordenadas tridimensionais da SCPd¹ (**Tabela 1**).

Tabela 1. Coordenadas de microinjeção para a SCPd

| Local | A.P. (mm) | M.L. (mm) | D.V. (mm) |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| SCPd | -7,6 mm | +1,9 | -2,0 |

A.P.: Antero-posterior, M.L.: Meso-lateral, D.V.: Dorso-ventral.

As coordenadas AP e ML foram calculadas a partir do bregma (ponto zero) e DV, a partir da superfície externa do osso craniano, em ângulo de 22°. No ponto tridimensional achado, perfurou-se a calota craniana (com auxílio de uma broca odontológica) para a implantação da cânula guia. Por fim, despejou-se o acrílico auto-polimerizável que se solidifica rapidamente, agregando todas as peças e impedindo o deslocamento da cânula-guia.

Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de antibiótico (Pentabiótico Veterinário®). Em seguida, foram colocados em grupos de 3 ou 4, em gaiolas plásticas com serragem limpa e mantidos em ambiente silencioso e aquecido até completa restabilização da consciência. Esses animais implantados foram utilizados para experimentos após um período mínimo de recuperação de sete dias. 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 parâmet

¹ As coordenadas foram calculadas a partir do Atlas Paxinos e Watson (1998).

3.3 Cânulas

As cânulas-guias implantadas a fim de viabilizar as microinjeções na SCPd foram confeccionadas no laboratório a partir de agulhas hipodérmicas descartáveis 25,0 x 7,0 mm. Com auxílio do paquímetro (Mitutoyo® - Brasil) as cânulas foram cortadas no comprimento de 13 mm.

3.4 Microinjeção intracerebral

Foram utilizadas agulhas de 16,25 mm e 0,3 mm de diâmetro (confeccionadas a partir de agulhas gengivais), conectadas por um tubo de polietileno (PE10) à microseringa (Hamilton® - 5,0 µl). A microseringa foi preenchida com água destilada e com a solução a ser injetada, separadas por uma bolha de ar. O deslocamento desta bolha representava o volume da solução microinjetada. A agulha possuía 3,25 mm a mais da cânula-guia de maneira que as drogas fossem realmente microinjetadas na SCPd.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado com um pano e a cânula foi cuidadosamente desobstruída com auxílio de uma lima odontológica (13 mm). Posteriormente, a agulha foi introduzida através da cânula e injetou-se 0,3 µl da solução, durante 60 s. Em seguida, o animal foi recolado em sua caixa onde permaneceu por 5 min, até ser submetido ao teste experimental.

3.5 Compostos e soluções

Para a realização dos experimentos desse estudo, os seguintes compostos foram utilizados: 1) Glicina (Sigma, EUA); 2) (+/-)-3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona (HA-966; Sigma, EUA); 3) Estricnina (Tocris, EUA), dissolvidos em solução salina tamponada com fosfato (PBS); 4) Ácido 7 Cloroquinurênico (RBI, EUA), dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO), não excedendo 5% do volume total em PBS; 5) Naloxona (Sigma, EUA) e 6) Metisergida (Sigma, EUA) dissolvidos em PBS para aplicação intra-cerebral ou solução fisiológica para aplicação subcutânea; 7) Azul de

Evans (Vetec, Brasil) dissolvido em água destilada para a coloração dos sítios das microinjeções. Os controles receberam os respectivos veículos de cada composto.

Nos testes com formalina foi utilizado Formaldeído 37% (Merck AG, Germany) diluída a 2% com solução fisiológica (0,9%), considerando a concentração inicial como 100%.

3.6 Testes nociceptivos

Foram utilizados três testes nociceptivos em grupos independentes de animais: o teste de incapacitação articular induzido por formalina, o teste de formalina aplicada na pata e o teste de estímulo térmico quente na cauda (*tail flick*).

3.6.1 Incapacitação articular induzida por formalina

O modelo de incapacitação articular foi desenvolvido Tonussi e Ferreira (1992) e, posteriormente, Martins e colaboradores, (2006) adaptaram-no para o estudo de nocicepção tônica em ratos. O equipamento consiste de um cilindro (30 cm de diâmetro) revestido por malha de aço inox (2 mm), com separadores os quais formam 3 trilhas de 10 cm sobre ele. São adaptadas às patas traseiras de cada rato, sapatilhas metálicas confeccionadas em folha de flandres. Uma das sapatilhas fica conectada, por fios de aço, à porta paralela de um microcomputador PC compatível.

Os animais são colocados no topo do cilindro em rotação (3 rpm), para forçá-los a caminhar. Através do eletrodo conectado à sapatilha da pata estudada, o computador registra o tempo total que esta pata se eleva durante um período de 60 s. A este registro denominamos de Tempo de Elevação da Pata (TEP). Normalmente, os animais controles apresentam um TEP de aproximadamente 10 s. A administração de substâncias algogênicas dentro dos joelhos desses animais provoca um aumento desse parâmetro. Neste trabalho, a incapacitação articular foi induzida no joelho direito dos animais através da aplicação de uma solução de formalina a 2% (50 µl). A concentração de formalina foi baseada em um estudo anterior (MARTINS et al., 2006) no qual demonstrou ser essa a ideal para induzir uma resposta comportamental submáxima, a fim de se permitir detectar aumento ou diminuição nas respostas. Um dia antes dos testes, as gaiolas com os animais foram

colocadas por 1 h na sala de experimentos para ambientação. Em seguida, os animais foram treinados no modelo e após um breve período de adaptação (15 min por animal), registraram-se os valores basais (TEP sem a formalina intra-articular).

Outro tipo de avaliação foi conduzida com alguns animais após a injeção de formalina intra-articular. Nessa, os animais, imediatamente após receberem formalina a 2% (50 µl) no joelho direito, eram colocados em caixas de observação (descrita com detalhes logo abaixo). Registrou-se, a cada bloco de 5 min durante 60 min, o número total de comportamentos nociceptivos (NCN) entre eles: retiradas e/ou erguidas (3 s de permanência) da pata injetada.

3.6.2 Teste de formalina na pata

O outro teste de formalina utilizado foi o teste descrito por DUBUISSON e DENNIS (1977). A ambientação foi realizada 24 h antes do teste e consistia da colocação individual dos animais na caixa de observação por um período aproximado de 20 min. A caixa de observação é de acrílico transparente, medindo 29 cm de largura, altura e profundidade. Para facilitar a avaliação da pata do animal, adicionaram-se espelhos, angulados em aproximadamente 45° nas laterais e atrás. No dia do experimento, imediatamente após a injeção subcutânea de formalina a 2% (50 µl) na superfície plantar da pata direita traseira, os animais foram transferidos para dentro da caixa de observação para a avaliação e registro das respostas comportamentais nociceptivas. A concentração de formalina considerada foi a mesma aplicada no teste de incapacitação articular. Registrou-se a cada bloco de 5 min, durante 60 min, o número total de comportamentos nociceptivos (NCN) entre eles: chacoalhadas, lambidas, mordidas, retiradas e/ou erguidas (3 s de permanência) da pata injetada.

3.6.3 Teste de estímulo térmico quente na cauda (*tail flick*)

O teste utilizado é conhecido como teste do *tail flick*, descrito há mais de 60 anos (D'AMOUR e SMITH, 1941) e ainda amplamente utilizado como teste de nociceção em ratos e camundongos. É um teste relativamente simples, não invasivo, e que é constituído por um aparelho que aplica um feixe de luz radiante o

qual provoca o aquecimento e a retirada da cauda através de um movimento breve e vigoroso (*tail flick*). O tempo de reação deste movimento foi registrado denominado de Latência *Tail Flick* (LTF). As LTFs (em segundos) foram avaliadas a cada 5 min, durante 60 min.

Para a realização deste teste, os animais são posicionados sobre a plataforma do aparelho de maneira que a cauda (aproximadamente a 1 cm da ponta no sentido proximal) fique em cima do foco de luz. O aparelho fica programado para emitir um foco de luz de 25 W de potência bem como, para cessar a sua emissão aos 21 s (*“cut-off”*) evitando assim qualquer dano tecidual. O aquecimento da cauda ocorre de maneira lenta, uma vez que as LTFs basais ficam entre de 5-7 s (Le BARS, 2001). O registro da LTF basal era repetido por mais 2 vezes com intervalo de ± 15 min entre eles, e a média das três LTFs representava o valor basal. A sala de experimento teve temperatura controlada em 23 ± 1 °C durante a ambientação, o treino e a realização do teste.

Um dia antes dos testes, treinou-se os animais no modelo, isto é, foram colocados individualmente em cima da plataforma e, após um período de 5 min, aplicou-se o estímulo térmico quente na cauda para a registro das LTFs basais.

A porcentagem de efeito máximo possível também foi representada na forma de média \pm erro padrão da média e calculada seguindo-se a fórmula que segue:

$$\% \text{ MPE} = \frac{\text{LTF}_{\text{basal}} - \text{LTF}_{\text{teste}}}{\text{Cut-off}} \times 100$$

3.7 Teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Esse teste comportamental foi desenvolvido por Handley e Mithani (1984) e posteriormente validado através de estudos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos por Pellow e colaboradores (1985). O modelo do LCE baseia-se no comportamento exploratório espontâneo de roedores em um ambiente com dois níveis de maior (braços abertos) ou menor (braços fechados com paredes) característica aversiva. Esse fato gera inicialmente um conflito aproximação-esquiva

aos braços abertos, resultado da tendência exploratória do roedor e do medo/novidade.

O labirinto, feito de madeira (Insight[®]) dispõe-se em forma de cruz, elevado a 40 cm do chão, composto por dois braços fechados com paredes (50x10x40 cm) e dois braços abertos (50x10 cm) opostos entre si. Os experimentos foram realizados numa sala com luz amarela, cuja intensidade não ultrapassava 40 lux. Após o teste de cada animal, o labirinto foi limpo com solução de etanol a 10%.

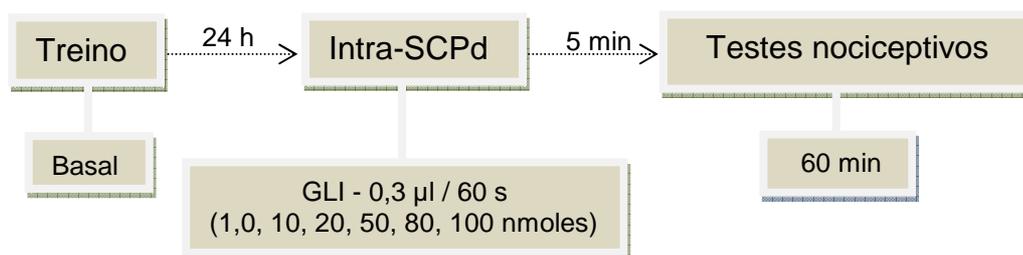
Todo o experimento foi registrado com uma câmera de vídeo, para posterior análise dos índices tradicionais de ansiedade: porcentagem de entrada e de tempo nos braços abertos em relação ao tempo total de exposição ao teste, 300 s (% EA, % TA; respectivamente), bem como o número de entradas nos braços fechados (EF) e o número de tentativas de entradas nos braços abertos (TEA).

3.8 Protocolo experimental

Previamente (5 min) à aplicação do estímulo nocivo nos três testes, foram efetuadas as microinjeções intracerebrais das seguintes soluções: solução salina tamponada (PBS); glicina (1, 10, 20, 50, 80 e 100 nmoles / sítio), (+/-)-3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona (HA-966, 10 nmoles / sítio), ácido 7-cloroquinurênico (10 nmoles / sítio), estricnina (5 e 10 nmoles / sítio), naloxona (0,01 pmoles) e metisergida (0,03 pmoles) isolados ou em associação com glicina. O volume e a velocidade de injeção foram fixados em 0,3 µl / 60 s.

Além das microinjeções intracerebrais, alguns grupos de animais avaliados no teste de incapacitação articular induzida por formalina foram pré-tratados com naloxona ou metisergida, nas doses de 1,0 mg / kg; por via subcutânea, 30 min antes da glicina intra-SCPd. Logo abaixo seguem os esquemas dos protocolos experimentais da presente pesquisa.

Esquema 1: Identificação das doses de glicina (GLI) intra-SCPd capazes de induzir efeitos na nocicepção no teste de incapacitação articular induzida por formalina, no teste de formalina na pata e no teste do *tail flick*.



As doses de glicina utilizada neste estudo foram baseadas em pesquisas as quais avaliaram seu potencial para produzir efeitos do tipo-ansiolítico quando aplicada na SCPd (SCHMITT et al., 1995; CAROBREZ et al., 2001; SANTOS et al., 2006).

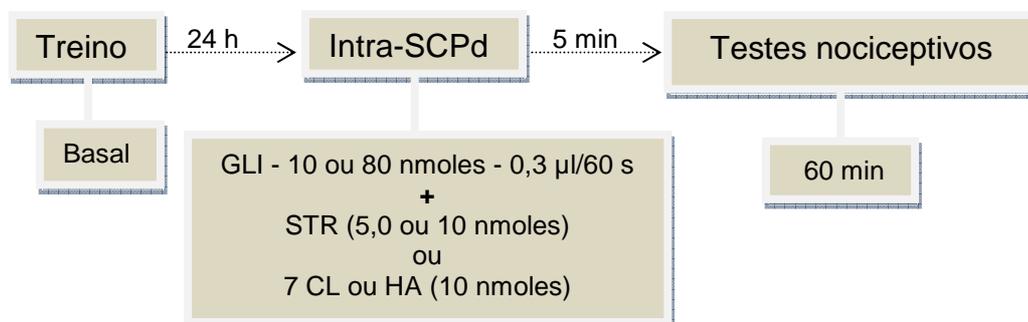
Para o teste de formalina aplicada na pata, algumas considerações devem ser feitas:

- 1) 24 h antes do teste, os animais foram apenas ambientados às condições do teste, porém sem qualquer fonte nociceptiva;
- 2) As doses de glicina testadas foram apenas aquelas as quais apresentaram efeito significativo no teste de incapacitação articular; isto é 20 nmoles (dose hipernociceptiva) e 80 nmoles (dose hiponociceptiva);
- 3) A avaliação do comportamento do animal em resposta à injeção intra-plantar de formalina foi realizada em blocos consecutivos de 5 min, a cada 5 min, durante 60 min.

Além dos três testes, um quarto teste foi realizado, quando então os animais eram colocados também em caixas de observação após a injeção de formalina intra-articular (diferentemente do protocolo de formalina na pata) foi criado com o objetivo de verificar se a microinjeção de glicina na SCPd causava os mesmos efeitos observados no teste de incapacitação articular. Neste experimento, as doses de glicina utilizadas foram de 10 e 80 nmoles as quais induziram respectivamente, aumento e diminuição significativa da nocicepção no teste de incapacitação articular induzida por formalina.

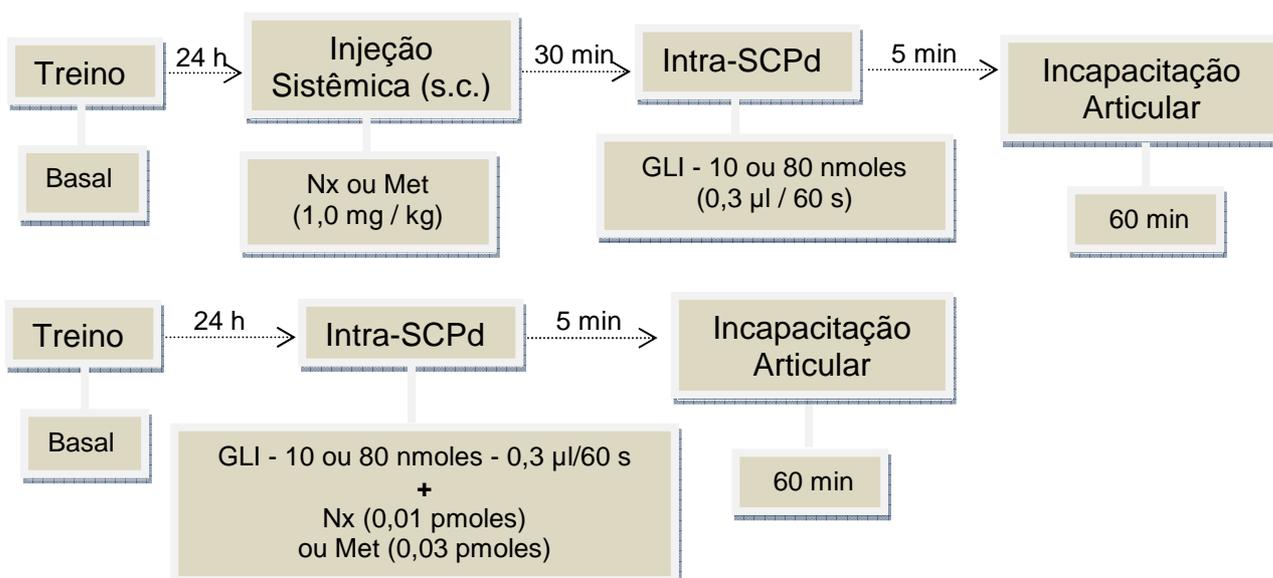
Esquema 2: Investigação do(s) receptore(s) envolvido(s) nos efeitos da glicina, nos 3 testes nociceptivos, através do uso do antagonista seletivo para GLI_A (Estricnina; STR) e dos antagonistas do receptor GLI_B -NMDA, o (+/-)-3-amino-1-hidroxi-2-

pirrolidona ou HA-966; HA) e o ácido 7-cloroquinurênico (7CL), co-microinjetados com glicina na SCPd, nas doses hiper e hiponociceptivas observadas em cada teste.



As doses de estricnina e HA, utilizadas neste protocolo, foram baseadas em WHITE (1985) e TEIXEIRA et al., (1999), respectivamente.

Esquema 3: Identificação da mediação opióide ou serotoninérgica nos efeitos hiper e hiponociceptivos induzidos pela injeção de glicina na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida pela formalina, através da aplicação sistêmica e intra-SCPd de antagonista dos receptores μ -opióide (Naloxona; Nx) e dos receptores 5HT₁ e 5HT₂ da serotonina (Metisergida; Met).



As doses de naloxona e metisergida foram determinadas a partir do K_i (Constante inibitória) de cada uma (CODD et al., 1995; 5-HT ...2008).

3.9 Confirmação do sítio da microinjeção intracerebral

Após os experimentos os animais foram profundamente anestesiados com xilazina 2% (0,2 ml / rato) e hidrato de cloral 1,5% (1,0 ml / rato), e com auxílio da cânula-guia fez-se a coloração do sítio de microinjeção, com a injeção de Azul de Evans (0,5 % - 0,3 µl). Em seguida e após a perda completa dos reflexos palpebral, corneal e interdigital, os animais foram perfundidos intracardialmente com solução de salina (NACL; 0,9 %) seguida por solução de formaldeído (10 %). Após a rigidez de muscular, os ratos foram decapitados e os cérebros removidos e armazenados, primeiramente em solução de formaldeído a 10 % por 24 h, e, em seguida, em solução de sacarose a 30% por mais 24 h. Após esse período, os cérebros foram seccionados (cortes de 50 µm) no Criostato (Leica CM1850), colocados em lâminas gelatinizadas e a localização dos sítios das injeções era feita através de microscopia, comparando-se os cortes com o diagrama do Atlas de cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998).

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) de uma via com medidas repetidas, seguida pelo teste de Dunnett. Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da glicina intra-SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina.

A formalina (2%) intra-articular induziu resposta nocifensiva, identificada pela incapacidade do rato em articular o joelho afetado e registrada como o aumento no tempo de elevação da pata (TEP) para caminhar (nesse momento os animais apresentavam-se com o joelho flexionado).

O TEP ocorreu em duas fases distintas do teste. Se observarmos a curva dos animais controle (**Fig. 3A**: PBS), na primeira fase (F1= 0-5 min), o aumento do TEP foi imediatamente após a injeção de formalina ($TEP_B = 9,12 \pm 0,27$ s e $TEP_{0min} = 33,98 \pm 4,27$ s) e na segunda fase (F2 = 10-40 min), o aumento do TEP deu-se de maneira mais lenta, alcançando efeito máximo por volta dos 15 min ($TEP_{15min} = 30,61 \pm 4,28$ s) durando 40 min ($TEP_{40min} = 13,68 \pm 1,12$ s) após a aplicação da formalina. Essas duas fases foram interpostas por um período denominado de quiescência, no qual o animal voltava a deambular normalmente. Na quiescência, o valor do TEP declina e alcança o índice basal ($TEP_{5min} = 13,11 \pm 0,81$ s). O registro do TEP durou 60 min, nesse momento os animais não apresentavam mais o comportamento de flexionar a pata, embora o joelho ainda apresentasse sinais de edema (aumento de volume). Após o teste e já nas caixas, esses animais não demonstravam mais comportamentos nociceptivos.

O TEP causado pela formalina i.art. apresentou importantes variações no modelo de incapacitação articular, com o tratamento prévio dos animais com glicina (GLI) intra-SCPd. Microinjetada em baixas doses, 10 e 20 nmoles, a GLI foi capaz de causar aumento significativo do TEP (hipernocicepção) na F2 (t=10-30 min) de resposta nocifensiva da formalina (ANOVA; $F_{(3,20)} = 6,15$). Os TEPs dos animais que receberam 10 e 20 nmoles foram respectivamente $35,50 \pm 6,47$ s e $33,98 \pm 4,27$ s, como registrado 10 min após a injeção de formalina (t= 10 min) (**Fig.3A**). Nesse momento, em relação ao grupo controle (PBS) o TEP aumentou $64,32 \pm 29,94$ % no grupo que recebeu 10 nmoles e $47,48 \pm 27,16$ % no grupo que recebeu 20 nmoles.

Microinjetada em altas doses, 80 e 100 nmoles, a glicina diminuiu de forma significativa o TEP (hiponocicepção) nas fases1 e 2 do teste de formalina (ANOVA;

$F_{(2,22)}= 6,04$ e $F_{(2,18)}= 29,07$; respectivamente). Na primeira fase ($t= 0$ min), os TEPs registrados foram $19,87 \pm 3,06$ s e $23,03 \pm 3,05$ s para GLI80 e GLI100, respectivamente. Durante a segunda fase, aos 25 min após formalina, por exemplo, os valores registrados foram: $TEP_{PBS}= 39,24 \pm 4,38$ s; $TEP_{GLI80}= 16,91 \pm 3,69$ s e $TEP_{GLI100} = 16,31 \pm 1,99$ s (**Fig.3B**). Em relação ao grupo controle (PBS), a diminuição do TEP na primeira fase do teste foi de $45,24 \pm 8,45$ e $36,56 \pm 8,41$ % e na segunda fase ($t= 25$ min), $56,91 \pm 9,4$ e $58,44 \pm 5,06$ % nos grupos que receberam 80 e 100 nmoles, respectivamente.

Ainda que ambas as doses altas tenham induzido hiponocicepção, a glicina na dose de 100 nmoles não foi mais utilizada nos experimentos posteriores, pelo fato de que, em alguns animais, ela também induziu comportamento aversivo intenso, caracterizado por exoftalmia, sobressaltos e corridas após 35-40 min e permanecendo por aproximadamente 40 min. Glicina, na dose de 1,0 (**Fig.3A**) bem como na dose de 50 nmoles (dados não mostrados), não provocou alteração significativa em ambas as fases no TEP dos animais, após a injeção intra-articular de formalina.

Os resultados obtidos durante o teste de incapacitação articular induzida por formalina foram consequentes da aplicação de glicina nas porções mais caudais da SCPd (principalmente na coluna DL) (**Fig 4A e B**). Devido o ângulo da cânula guia (22°) algumas injeções foram feitas em outras colunas da SCP ou em estruturas vizinhas à SCPd. Microinjeções feitas nas colunas L, VL ou no aqueduto cerebral não causaram mudanças significativas no TEP (dados não mostrados devido ao número de elementos insuficientes na amostra). Microinjeções de glicina (10, 20 e 80 nmoles) efetuadas nas lâminas profundas do Colículo Superior (CS) também não foram capazes de modificar significativamente os valores de TEP (**Fig.5**).

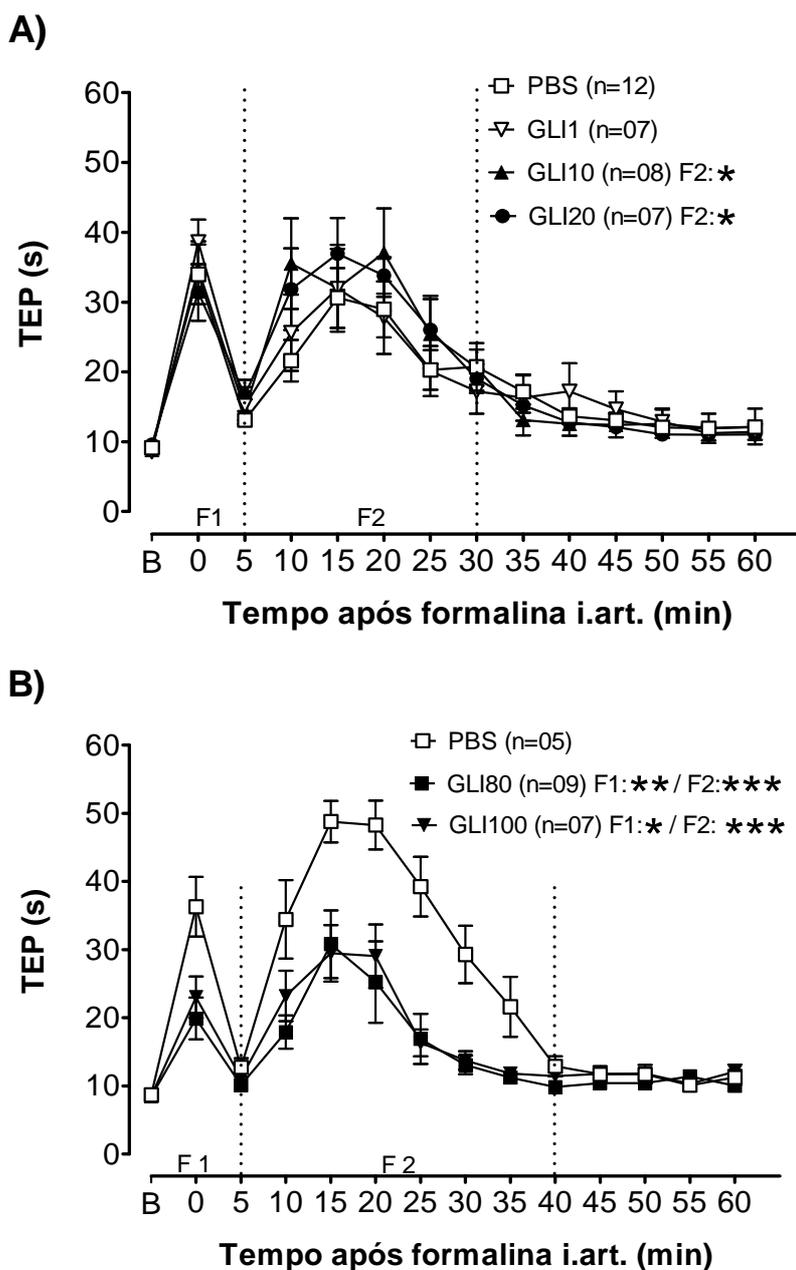
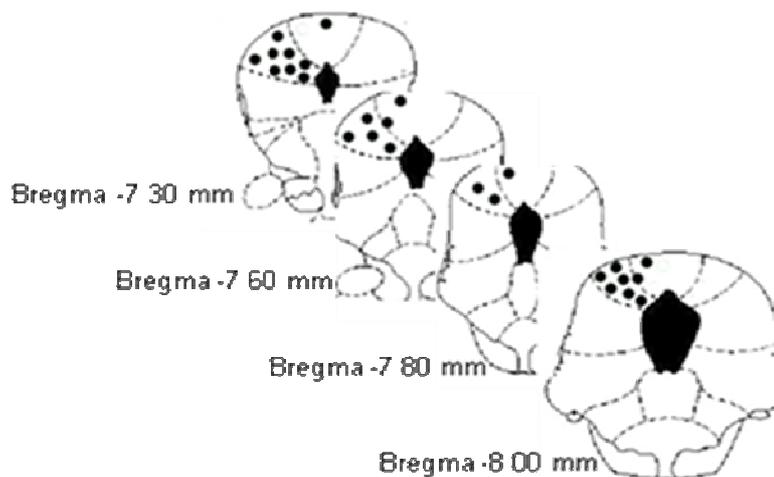


Figura 3. Efeito hiper e hiponociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos. Glicina, microinjetada na SCPd em baixas doses (**A**: GLI10 e GLI20 nmoles), aumentou de forma significativa o TEP durante a segunda fase (F2) e, em altas doses (**B**: GLI80 e GLI100 nmoles), diminuiu o TEP nas fases 1 (F1) e 2 (F2), comparada com a microinjeção controle (PBS). A letra **B** no eixo das abcissas representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal; **F1** e **F2** significam fases 1 (0 min) e 2 (10-30/40 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% intra-articular e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao grupo PBS, onde * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$.

A)



B)

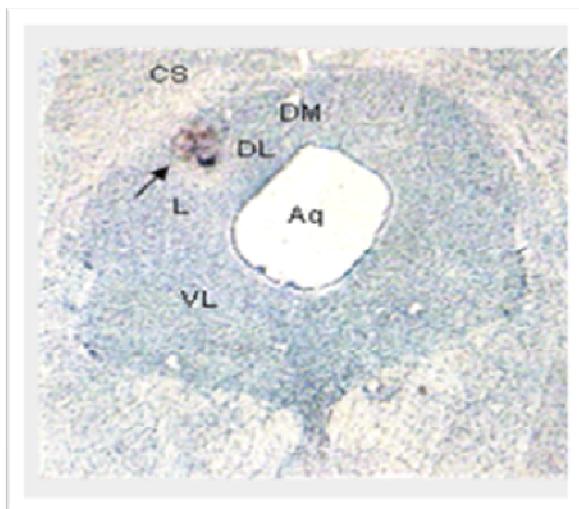


Figura 4. Histologia de confirmação dos sítios das microinjeções. A) Diagrama dos cortes coronais do mesencéfalo de rato, redesenhado a partir do atlas Paxinos e Watson (1998). Os sítios das microinjeções (●) foram marcados pela injeção de Azul de Evans na SCPd, com predomínio das microinjeções nas porções mais caudais da SCPdl (-7,60 e -7,80 mm). O número de pontos nas figuras é menor do que o número total de ratos usados, para evitar sobreposição. (B) Fotomicrografia de uma lâmina do mesencéfalo de um animal representativo, mostrando um sítio de microinjeção (→) dentro da coluna dorso-lateral. O corte corresponde a -8,00 mm do bregma no atlas Paxinos e Watson (1998). DM, Dorso-Medial; DL, Dorso-Lateral; L, Lateral; VL, Ventro-Lateral; Aq, Aqueduto; CS, Colículo Superior. Coloração: Giemsa.

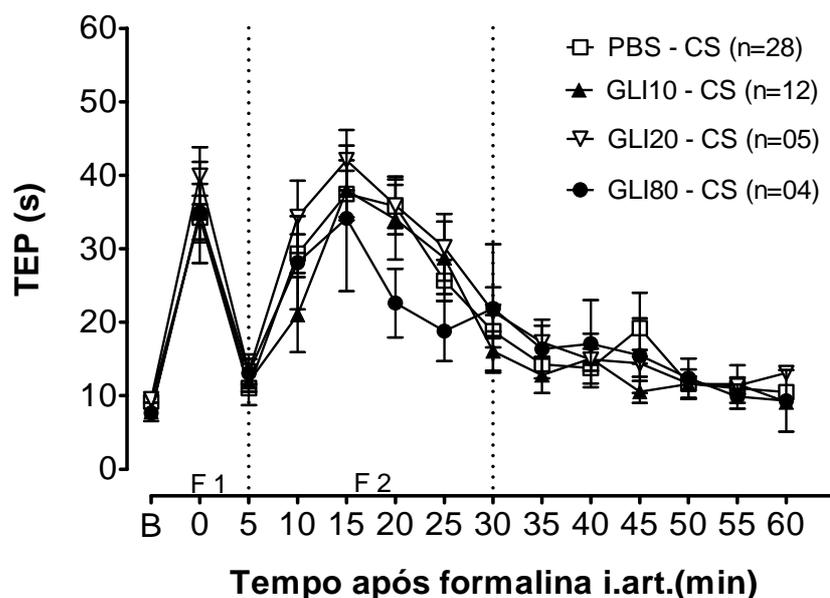


Figura 5. Efeito da glicina no colículo superior (CS) no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos. Glicina, microinjetada no CS, 5 min antes do teste, nas doses de 10, 20 e 80 nmoles (GLI10, GLI20 e GLI80, respectivamente) não alterou de forma significativa o TEP durante a primeira (F1) ou a segunda fase (F2), comparada com a microinjeção controle (PBS). A letra **B** representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal; **F1** e **F2** significam fases 1 (0 min) e 2 (10-30 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% intra-articular e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm e foram analisados pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao grupo PBS.

4.2 Efeito da glicina intra-SCPd no teste de formalina na pata.

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

A injeção de formalina na pata induziu duas fases de respostas nocifensivas intercaladas por um período de quiescência. Imediatamente após a injeção de formalina (F1= 0-5 min), ocorreu um rápido aumento no número de comportamentos nociceptivos (NCN), seguido por um período sem manifestação nociceptiva (quiescência). Em seguida, o NCN aumentou de maneira gradativa e sustentada, caracterizando a segunda fase do teste (F2= 15-60 min) (**Fig. 6**). Após os 60 min de teste, embora ainda manifestassem comportamentos nociceptivos, edema e eritema da pata injetada, os animais foram recolocados nas caixas.

No grupo controle (PBS), o NCN registrados nas primeira e segunda fases foram respectivamente: $NCN_{0min} = 65 \pm 2,77$ s e $NCN_{35min} = 57,6 \pm 6,57$ s. Glicina intra-SCPd, na dose de 80 nmoles, aumentou significativamente o NCN (hipernocicepção) durante a segunda fase de resposta nocifensiva da formalina na pata (ANOVA; $F_{(2,30)} = 16,95$). O aumento do NCN teve início aos 25 min, atingiu valor máximo nos 35 min ($NCN_{GLI80} = 93,5 \pm 8,94$) e perdurou por mais de 60 min após a injeção de formalina. Em relação ao grupo controle, o incremento no NCN aos 35 min de teste foi de $76,3 \pm 17,23$ %. Os grupos que receberam glicina intra-SCPd na menor dose (20 nmoles), não diferiram significativamente do NCN daqueles que receberam PBS como controle (**Fig. 6**).

Com o objetivo de avaliar se as diferenças observadas com a glicina intra-SCPd nos dois testes de formalina deveu-se ao local da aplicação do agente flogístico, imediatamente após a injeção de formalina no joelho, os animais foram colocados na mesma caixa de observação do teste de formalina na pata. Avaliaram-se como comportamentos nociceptivos (NCN): o número de flexão do joelho (a cada três segundos= 01 comportamento) número de lambidas e número de contrações ou espasmos no membro afetado.

Após a injeção de formalina intra-articular, os animais não manifestaram comportamentos de agitação, micção, defecação ou de lambidas compulsivas no assoalho, como aqueles observados com a injeção s.c. na pata. Dentre os comportamentos nociceptivos considerados, a flexão espontânea e sustentada do joelho afetado foi o mais predominante durante todo o teste. Apenas no período de quiescência, os animais caminhavam normalmente ou permaneciam parados com as quatro patas no chão. Não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados com glicina (10 ou 80 nmoles) e os animais tratados com PBS (dados não mostrados).

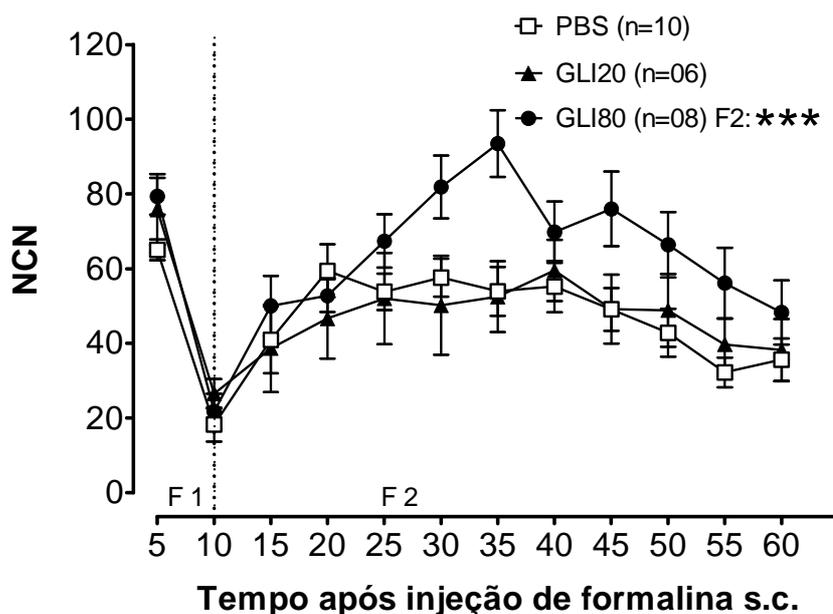


Figura 6. Efeito hipernociceptivo da microinjeção de glicina na SCPd no teste de formalina na pata em ratos. 80 nmoles de glicina (GLI80) aumentaram, de forma significativa, o número de comportamentos nociceptivos (NCN) durante a segunda fase da formalina (F2), comparado com a microinjeção controle de PBS. **F1** e **F2** significam fases 1 (0-5 min) e 2 (10-60 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% subcutânea na pata e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via, para medidas repetidas, seguida do teste de Dunnet em relação ao grupo PBS, onde ***= $P < 0,001$.

4.3 Efeito da glicina intra-SCPd no teste do *tail flick*.

Os animais, entre si, respondiam de maneira muito similar à aplicação do estímulo térmico quente, através de uma reação reflexa de retirada da calda (*tail flick*). As latências *tail flick* (LTFs) basais foram de aproximadamente 6,0 s em todos os grupos testados. No grupo controle (PBS), as LTFs registradas imediatamente após 5 min da microinjeção e a cada 10 min durante 60 min, não foram diferentes significativamente da LTF basal, o que quer dizer que a estimulação térmica consecutiva não foi capaz de alterar o limiar nociceptivo.

Glicina intra-SCPd (50 e 80 nmoles) induziu aumento significativo das LTFs (hiponocicepção) numa maneira dose-dependente (ANOVA; $F_{(4,30)} = 16,87$), o qual já se fez presente desde os 5 min após a microinjeção. Ao final do teste (t= 55 min), as LTFs registradas para os grupos GLI50 e GLI80 foram respectivamente; $9,20 \pm 1,96$ s e $12,48 \pm 1,96$ s (**Fig.7**), o correspondente a $20,24 \pm 14,31$ e $39,68 \pm 15,15$ % do MPE (efeito máximo possível). Em baixas doses (10 e 20 nmoles), glicina não foi capaz de modificar, de forma significativa, as LTFs quando toda a curva foi considerada (**Fig.7**). Nessa faixa de dose, 10 a 80 nmoles, não foram observados comportamentos defensivos intensos como imobilidade, exoftalmia, corridas, sobressaltos, micção e defecação.

As microinjeções de glicina efetuadas nas lâminas profundas do Colículo Superior, não causaram efeito na nocicepção ao estímulo térmico quente, uma vez que não houve diferenças significativas nas LTFs (teste t de *Student* pareado) (**Fig.8**). Glicina microinjetada diretamente no aqueduto cerebral também não alterou a LTFs (dados não mostrados).

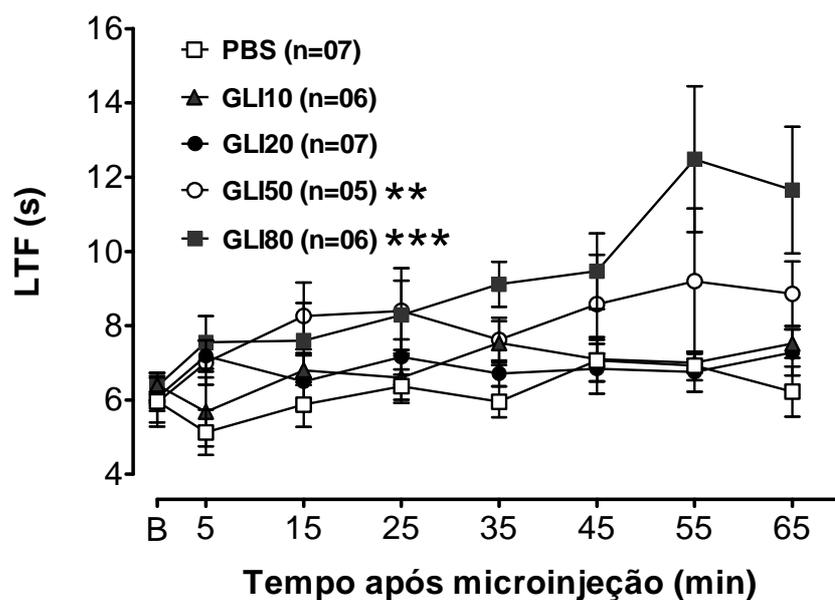


Figura 7. Efeito hipnocéptico da microinjeção de glicina na SCPd no teste do tail flick em ratos. Glicina (GLI50 e GLI80 nmoles), 5 min antes do teste, aumentou significativamente as latências *tail flick* (LTFs) dos ratos submetidos ao estímulo térmico quente na cauda, em relação ao grupo que recebeu a solução controle intra-SCPd (PBS). Os dados estão representados em forma de média \pm epm das LTFs, a cada 5 min após as microinjeções, durante 60 min. No tempo=0 min estão ilustrados os valores basais. Diferenças estatísticas foram mostradas pela ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida pelo teste de Dunnet em relação ao grupo PBS, onde ** = $P < 0,01$ e *** = $P < 0,001$.

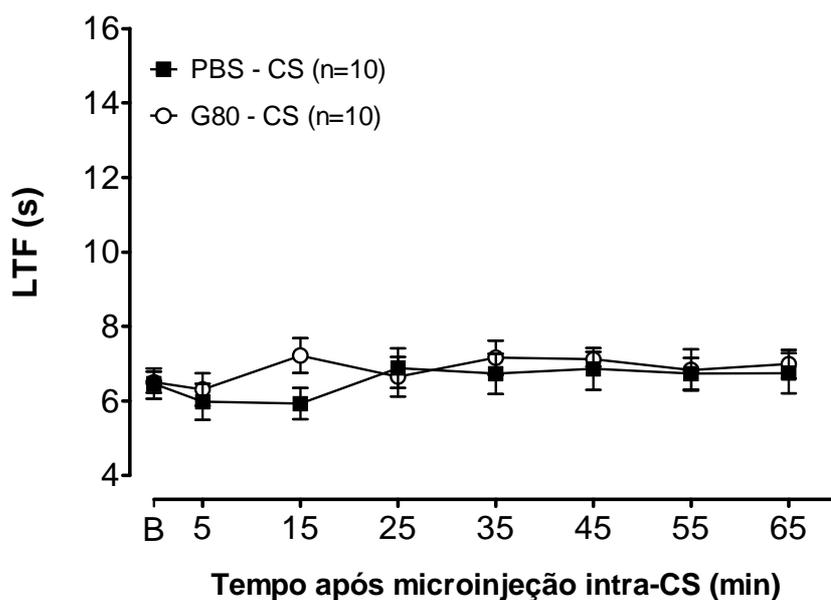


Figura 8. Efeito da microinjeção de glicina no colículo superior (CS) em ratos submetidos ao teste do *tail flick*. A microinjeção de glicina (GLI80 nmoles), no colículo superior 5 min antes do estímulo térmico na cauda, não alterou de forma significativa a latência *tail flick* (LTF) dos animais submetidos ao teste, comparado com a microinjeção controle de PBS. Os dados estão representados em forma de média \pm epm das LTFs, a cada 5 minutos após as microinjeções, durante 60 min. No tempo=0 min estão ilustrados os valores basais. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste t de *Student* pareado.

4.4 Efeito do antagonista do receptor GLI_A (Estricnina) intra-SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina

No segundo protocolo com o teste de incapacitação, novamente a glicina intra-SCPd, na segunda fase do teste, causou hiper e hiponocicepção, em dose baixa e alta, respectivamente (ANOVA; $F_{(3,24)}= 5,04$ e $F_{(3,24)}= 14,81$). A glicina em dose alta (80 nmoles) induziu apenas uma tendência em reduzir o TEP na primeira fase (ANOVA; $F_{(3,24)}= 2,43$). Aos 15 min, os TEPs registrados dos grupos controle (PBS), GLI10 e GLI80 foram de $33,23 \pm 4,63$ s; $52,3 \pm 3,5$ s e $19,87 \pm 5,45$ s, respectivamente. Dos grupos que receberam microinjeção conjunta de glicina com estricnina, o grupo STR+GLI10 apresentou aumento significativo de TEP na segunda fase (ANOVA; $F_{(3,24)}= 5,04$) e o grupo STR+GLI80 não apresentou alteração significativa do TEP em ambas as fases do teste (**Fig.9A e B**). No intervalo de 15-40 min a microinjeção isolada do antagonista (STR) aumentou significativamente o TEP dos animais (ANOVA; $F_{(3,20)}= 18,53$) (**Fig.9B**).

A estricnina, somente nesse teste, foi avaliada também na dose de 10 nmoles intra-SCPd. Nessa dose, 50% os animais utilizados (7/14) não foram analisados estatisticamente em virtude de comportamentos como sobressaltos e corridas, observados após 15 minutos da microinjeção. Os animais que não manifestaram os mesmos comportamentos tiveram uma diminuição significativa do TEP em relação ao grupo PBS (hiponocicepção); (Dados não mostrados).

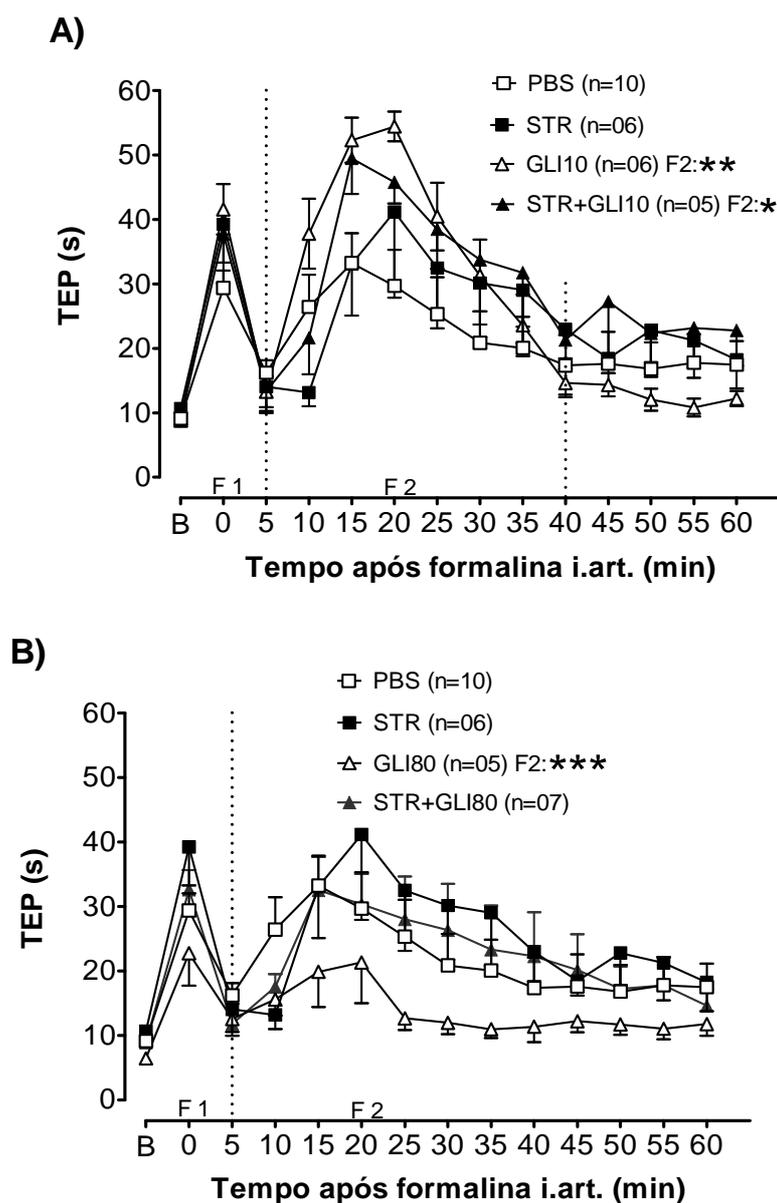


Figura 9. Efeito da microinjeção de glicina associada com estriçnina na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos. A) Glicina, na dose de 10 nmoles, intra-SCPd sozinha ou com stricnina 5 nmoles (GLI10 e STR+GLI10, respectivamente), aumentou o TEP na fase 2, de forma significativa, em relação ao grupo PBS (controle). **B)** GLI, na dose de 80 nmoles, intra-SCPd (GLI80), diminuiu o TEP na fase 2, de forma significativa, em relação ao grupo PBS. A microinjeção na SCPd foi realizada 5 minutos antes da injeção de formalina 2% (50 μ l) intra-articular (0 min). A letra **B** no eixo das abcissas, representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal, **F1** e **F2** significam fases 1 (0 min) e 2 (10-60 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% intra-articular e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao grupo PBS, onde * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

4.5 Efeito do antagonista do receptor GLI_A (Estricnina) intra-SCPd no teste de formalina na pata.

No segundo protocolo do *teste de formalina na pata*, durante a primeira fase do teste ($t=0$ min), a microinjeção isolada de estricnina (STR) na SCPd foi capaz de aumentar de forma significativa o NCN, em relação ao grupo controle (PBS) (ANOVA; $F_{(3,25)}= 3,84$). Os NCN registrados nesse período foram de $116,5 \pm 12,15$ e $166,75 \pm 9,17$ para os grupos PBS e STR, respectivamente. Durante a quiescência ($t= 15-20$ min), os grupos STR e STR+GLI80 tiveram aumento significativo do NCN em relação ao controle (ANOVA, $F_{(3,4)}= 17,28$). Na segunda fase ($t= 25-60$ min) de resposta à formalina na pata, todos os grupos (STR, GLI80, STR+GLI80) apresentaram aumento significativo do NCN, em relação ao grupo PBS (ANOVA; $F_{(3,40)}= 13,08$). Aos 25 min de efeito da formalina, os seguintes NCN foram registrados: $NCN_{PBS}= 77,88 \pm 11,79$; $NCN_{GLI80}= 112,14 \pm 10,5$; $NCN_{STR}= 114,75 \pm 9,04$; $NCN_{STR + GLI80}= 105 \pm 12,95$ (**Fig.10**).

Dos 17 animais utilizados nesse protocolo que receberam glicina, 80 nmoles, intra-SCPd, um (01) animal apresentou reações de defesa intensa como piloereção, exoftalmia, sobressaltos, corridas, cauda levantada e antinocicepção completa. Esses comportamentos começaram após ± 35 min da microinjeção. Por outro lado, dos 14 animais que receberam microinjeção de estricnina mais glicina (STR+GLI80) na SCPd, 02 apresentaram comportamento de “congelamento” com completa antinocicepção também. O congelamento iniciou durante a fase de quiescência e permaneceu até o final do teste (± 40 min). Esses 03 animais não foram agrupados na análise estatística.

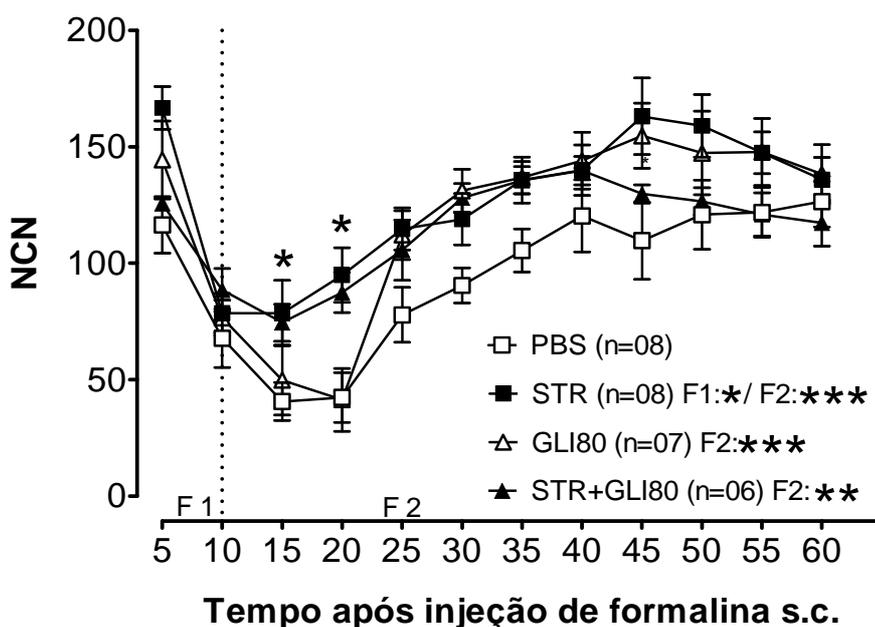


Figura 10. Efeito hipernociceptivo da microinjeção de estricnina na SCPd no teste de formalina na pata em ratos. Estricnina (STR; 5 nmoles) intra-SCPd, 5 min antes da aplicação de formalina na pata, aumentou, significativamente, o número de comportamentos nociceptivos (NCN) em todas as fases do teste (F1 e F2), comparada com a microinjeção controle de PBS. Glicina, microinjetada isoladamente (GLI80) ou associada com estricnina (STR+GLI80) aumentou o NCN durante a F2. Durante a quiescência (15-20 min) os grupos STR e STR+GLI80 aumentaram significativamente o TEP. **F1** e **F2** significam fases 1 (0-5 min) e 2 (10-60 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm. Diferenças estatísticas foram reveladas pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao grupo PBS, onde * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

4.6 Efeito do antagonista do receptor GLI_A (Estricnina) intra-SCPd no teste do *tail flick*.

No teste do *tail flick*, as microinjeções de glicina (GLI80), estricnina (STR) ou estricnina mais glicina (STR+GLI80) na SCPd aumentaram, significativamente, as LTFs (isto é; causaram hiponocicepção), do início ao final do teste (ANOVA; $F_{(3,24)}=37,54$). Cinco min após as microinjeções, as LTFs registradas foram $5,56 \pm 0,61$ s; $13,57 \pm 2,44$ s; $11,24 \pm 1,59$ s; e $10,40 \pm 1,15$ s para os grupos PBS, GLI80, STR e STR+GLI80, respectivamente (**Fig.11**).

Dos 17 animais utilizados nesse protocolo experimental, 01 animal que recebeu glicina e 02, que receberam a associação de estricnina mais glicina apresentaram reações de defesa intensas como piloereção, exoftalmia, sobressaltos e corridas, após aproximadamente 45 minutos da microinjeção. Os 02 animais que receberam STR+GLI80, antes da manifestação desses comportamentos, tiveram antinocicepção dos 25 aos 45 min do teste, com os valores das LTFs alcançando o valor *cut-off*, isto é, 21 s de teste. Esses 03 animais não foram agrupados na análise estatística.

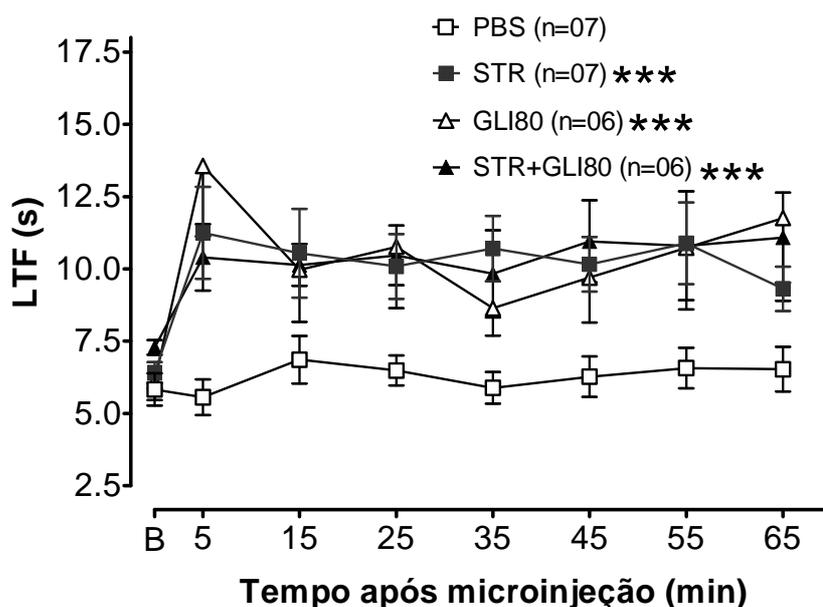


Figura 11. Efeito hiponociceptivo da microinjeção de estricnina na SCPd no teste do tail flick em ratos. Estricnina (STR; 5 moles), 5 min antes do estímulo térmico na cauda, aumentou significativamente as latências *Tail Flick* (LTFs) dos ratos submetidos ao teste, em relação ao grupo que recebeu o controle (PBS). Glicina, microinjetada isoladamente (GLI80) ou associada à estricnina (STR+GLI80) também aumentou as LTFs durante todo o teste. Os dados estão representados em forma de média \pm epm das LTFs, a cada 5 min após as microinjeções, durante 60 min. No tempo=0 min estão ilustrados os valores basais. Diferenças estatísticas foram mostradas pela ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida pelo teste de Dunnet em relação ao grupo PBS, onde ***= $P < 0,001$.

4.7 Efeito do antagonista do receptor GLI_A (Estricnina) intra-SCPd no teste do labirinto em cruz elevado.

Em virtude dos resultados obtidos com a injeção de estricnina, principalmente os relacionados às reações de defesas, optou-se por avaliar esse antagonista no labirinto em cruz elevado (LCE), teste que avalia o possível efeito tipo-ansiolítico das substâncias. No LCE, estricnina intra-SCPd (STR; 5 nmoles/0,3 μ l) induziu efeito do tipo-ansiolítico evidenciado pela diminuição significativa da porcentagem de tempo (% TA) e de entradas (%EA) nos braços abertos, comparado com os animais controles (PBS) ($t_{(0,05, 22)}= 3,90$ e $t_{(0,05, 22)}= 2,95$, respectivamente). A STR também diminuiu, de forma significativa, o número de entradas nos braços fechados (EF) ($t_{(0,05, 22)}= 2,28$), e não alterou o número de tentativas de entrada nos braços abertos (TEA) (**Fig.12**). Após 5 min da microinjeção de STR e já posicionados no interior dos braços fechados do LCE, os animais apresentavam-se com a cauda erguida, piloereção e imóveis. Após o término do teste, na retirada do labirinto, os animais exibiam resistência à captura.

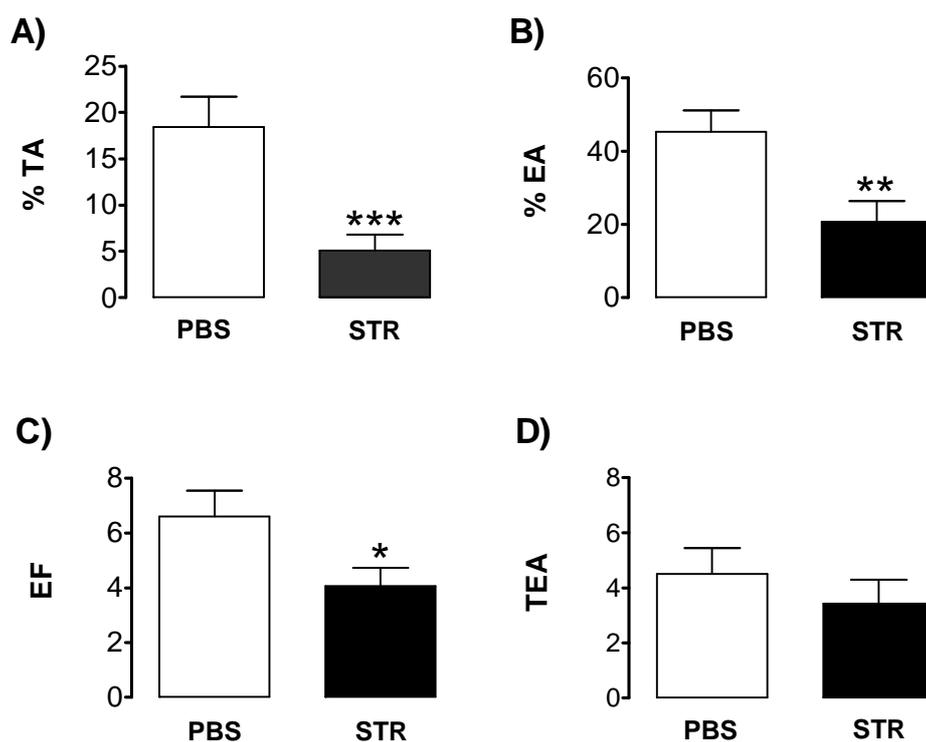


Figura 12: Efeito tipo-ansiolítico da estricnina microinjetada na SCPd de ratos, no teste do labirinto em cruz elevado (LCE). As colunas representam a média \pm epm da porcentagem de tempo (A) e de entrada nos braços abertos (B), do número de entrada nos braços fechados (C) e de tentativas de entradas nos braços abertos (D). Estricnina (STR= 5 nmoles, n=14), microinjetada 5 min antes da exposição ao LCE, diminuiu a %TA, a %EA e EF, em relação ao grupo controle que recebeu PBS (n=10) na SCPd. Diferenças estatísticas foram reveladas pelo teste t de *Student* não pareado, onde *= $P < 0,05$; **= $P < 0,01$; ***= $P < 0,001$.

4.8 Efeito dos antagonistas do receptor GLI_B -NMDA (7CL e HA) intra-SCPd nos três testes nociceptivos.

A co-administração do HA966 (HA; 10 nmoles) com glicina na dose de 80 nmoles (HA+GLI80; 0,3 μ l) 5 min antes do teste do *tail flick*, preveniu o efeito inibitório da glicina na latência *tail flick* (LTF) (ANOVA; $F_{(3,21)}= 19,77$). Aos 35 min de teste, a LTF do grupo GLI80 foi $9,37 \pm 0,94$ s contra $7,46 \pm 0,5$ s do grupo HA+GLI80. O efeito hiponociceptivo induzido pela GLI80 durou pelo menos 45 min e em alguns experimentos foi até ao final do teste (65 min) (**Fig.13A**).

No teste de **formalina na pata**, o efeito facilitatório da glicina intra-SCPd, na dose de 80 nmoles foi prevenido pela co-injeção de HA (10 nmoles) com glicina (ANOVA; $F_{(3,29)}= 8,76$). Aos 35 min de teste, por exemplo, o grupo que recebeu apenas glicina (GLI80) apresentava NCN igual a $88,6 \pm 9,25$ e o grupo que recebeu HA com glicina (HA+GLI80), $65,83 \pm 6,39$. (**Fig.13B**).

O antagonista aplicado isoladamente na SCPd não induziu efeito *per se* tanto no teste do *tail flick* quanto no teste de formalina na pata, uma vez que não foram observadas alterações significativas nas LTFs e no NCN, respectivamente (**Fig.13A e B**). No entanto, no teste de **incapacitação articular induzida por formalina**, a microinjeção do HA, na mesma dose (10 nmoles), induziu aumento significativo do TEP durante a segunda fase de resposta à formalina intra-articular (ANOVA; $F_{(3,20)}= 45,32$). Aos 20 min, os TEPs registrados foram de $37,92 \pm 4,4$ s e $54,74 \pm 1,3$ s para os grupos PBS (controle) e HA, respectivamente (**Fig.14**). Desta forma, optou-se por utilizar outro antagonista do GLI_B -NMDA, o ácido 7-cloroquinurênico (7CL). A associação de 7CL (10 nmoles) com glicina nas doses de 10 e 80 nmoles (7CL+GLI10 e 7CL+GLI80, respectivamente) bloqueou, de forma significativa, a hipernocicepção na F2 (**Fig.15A**: ANOVA; $F_{(3,40)}= 13,31$) e a hiponocicepção nas fases 1 (**Fig.15B**: ANOVA; $F_{(3,23)}= 8,29$) e 2 (ANOVA; $F_{(3,40)}= 14,66$). O bloqueio do efeito hipernociceptivo da glicina pôde ser melhor observado, por exemplo, aos 45 min do teste, onde $TEP_{PBS}= 11,34 \pm 1,26$ s, $TEP_{GLI10}= 41,83 \pm 5,07$ s e $TEP_{7CL+GLI10}= 11,48 \pm 1,76$ s) (**Fig.15A**). A inibição do efeito hiponociceptivo da glicina, pode ser vista, por exemplo, aos 5 min ($TEP_{PBS}= 36,75 \pm 3,18$ s, $TEP_{GLI80}= 20,11 \pm 2,75$ s e $TEP_{7CL+GLI80}= 39,79 \pm 3,05$ s) e aos 25 min após formalina intra-articular ($TEP_{PBS}= 34,45 \pm 4,18$ s, $TEP_{GLI80}= 17,05 \pm 3,30$ s e $TEP_{7CL+GLI80}= 32,08 \pm 5,28$ s) (**Fig.15B**).

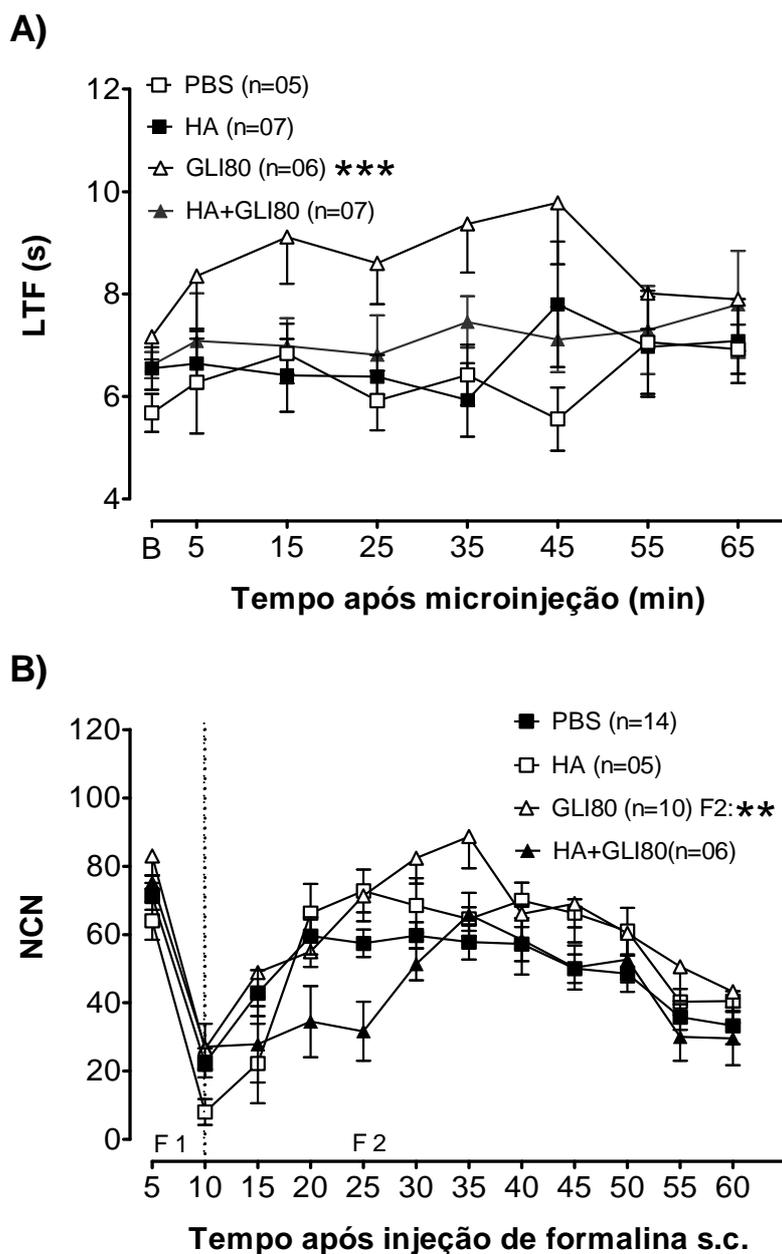


Figura 13. Efeito da microinjeção de glicina associada com HA966 (HA) na SCPd, no teste do *tail flick* e no teste de formalina na pata, em ratos. O grupo tratado com glicina (GLI= 80 nmoles), intra-SCPd, apresentou, de forma significativa, diminuição da latência *tail flick* (A: LTF) e aumento do número de comportamentos nociceptivos (B: NCN), em relação ao grupo injetado com PBS (controle) na SCPd. A co-administração de HA com glicina, não alterou de forma significativa as LTFs e os NCNs dos animais, comparado com os que receberam PBS (A e B, respectivamente). Os dados estão representados em forma de média \pm epm, a cada 5 min após as microinjeções, durante 60 min. Diferenças estatísticas foram mostradas pela ANOVA de uma via para medidas repetidas, seguida pelo teste de Dunnet em relação ao grupo PBS, onde ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

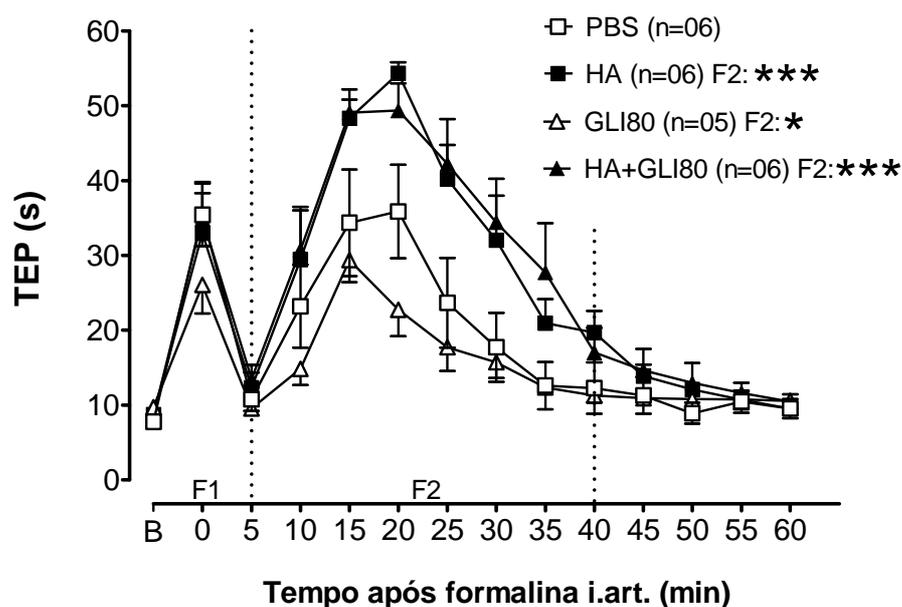


Figura 14. Efeito da microinjeção de glicina associada com HA966 (HA) na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos. HA, sozinho (10 nmoles) ou co-injetado com glicina (HA+GLI80) na SCPd, causou aumento significativo do TEP, em relação ao grupo PBS (controle), durante a segunda fase (F2) do teste. Glicina (GLI80 nmoles) causou diminuição significativa do TEP durante a F2. A letra **B** representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal; **F1** e **F2** significam fases 1 (0-5 min) e 2 (10-40 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% intra-articular e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm. Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao grupo PBS, onde * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.

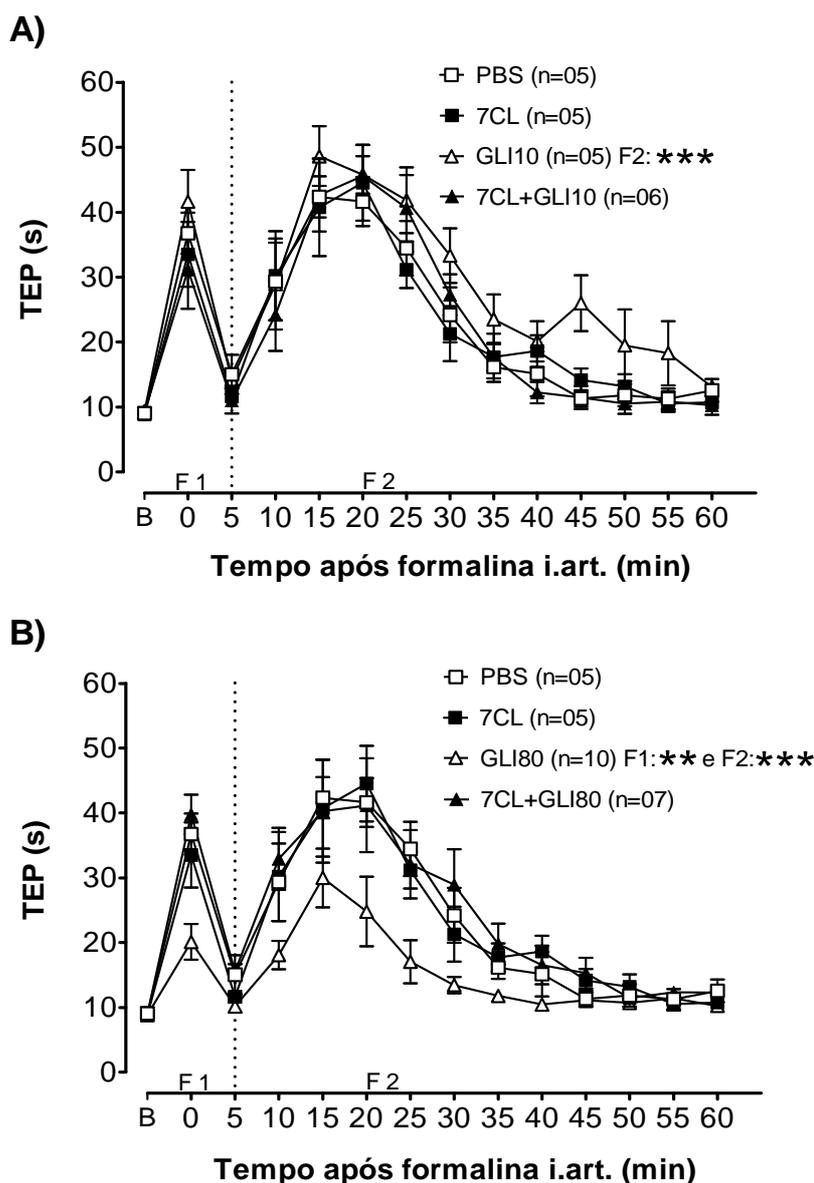


Figura 15. Efeito da microinjeção de glicina associada com o ácido 7 cloroquinurênico (7CL) na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos. Glicina intra-SCPd, na dose de 10 nmoles (**A**: GLI10), aumentou o TEP na segunda fase (F2), e na dose de 80 nmoles (**B**: GLI80), diminuiu o TEP na primeira e na segunda fase (F1 e F2), comparada com o grupo controle que recebeu PBS intra-SCPd. Os grupos que receberam 7CL com glicina (**A**: 7CL GLI10 e **B**: 7CL+GLI80) ou apenas 7CL, não apresentaram alteração significativa nos TEPs em relação ao grupo PBS. A letra **B**, no eixo das abcissas, representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal; **F1** e **F2** significam fases 1 (0-5 min) e 2 (10-60 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% intra-articular e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm, analisados pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao controle (PBS), onde ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,01$.

4.9 Efeito do tratamento sistêmico e intra-SCPd com naloxona no teste de incapacitação articular induzido por formalina.

Naloxona (Nx; 1,0 mg / kg) aplicada previamente pela via subcutânea (30 min) bloqueou tanto a hiper quanto a hiponocicepção induzidas pela glicina intra-SCPd, nas doses de 10 (**Fig.16A**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 5,65$) e 80 nmoles (**Fig.16B**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 10,95$), respectivamente, na segunda fase do teste. Aos 25 minutos, os grupos que receberam pré-tratamento com solução salina 30 min antes da glicina intra-SCPd, apresentaram $TEP_{Sal-GLI10} = 43,91 \pm 3,14$ s e $TEP_{Sal-GLI80} = 16,86 \pm 3,69$ s, enquanto os grupos que receberam naloxona s.c. antes da glicina intra-SCPd, $TEP_{Nx-GLI10} = 33,88 \pm 6,5$ s e $TEP_{Nx-GLI80} = 31,04 \pm 6,51$. Os registros dos TEPs dos grupos sal-PBS (controle) e Nx-PBS foram $35,02 \pm 3,12$ s e $37,11 \pm 6,22$ s, respectivamente. (**Fig. 16A e B**).

Naloxona intra-SCPd (Nx; 0,01 μ moles), diminuiu de forma significativa, o TEP nas fases 1 (**Fig.17A**: ANOVA; $F_{(3,21)} = 6,98$) e 2 (**Fig.17A**: $F_{(3,40)} = 27,75$ e **Fig.17B**: $F_{(3,36)} = 9,92$) de resposta à formalina intra-articular. A co-microinjeção de Nx com GLI bloqueou na F2, de forma significativa, os efeitos hiper (**Fig.17A**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 27,75$) e hiponociceptivo (**Fig.17B**: ANOVA; $F_{(3,36)} = 9,92$). No tempo de 25 min, os TEPs foram de $41,29 \pm 4,09$ s e $14,56 \pm 2,25$ s para os grupos injetados com GLI10 e GLI80, respectivamente, e de $29,92 \pm 6,85$ s e $23,50 \pm 5,01$ s para os grupos co-injetados com Nx+GLI10 e Nx+GLI80 (**Fig.17A e B**). Os grupos controles apresentaram nesse tempo, $TEP_{PBS} = 28,97 \pm 6,42$ s e $TEP_{Nx} = 28,97 \pm 6,42$ s.

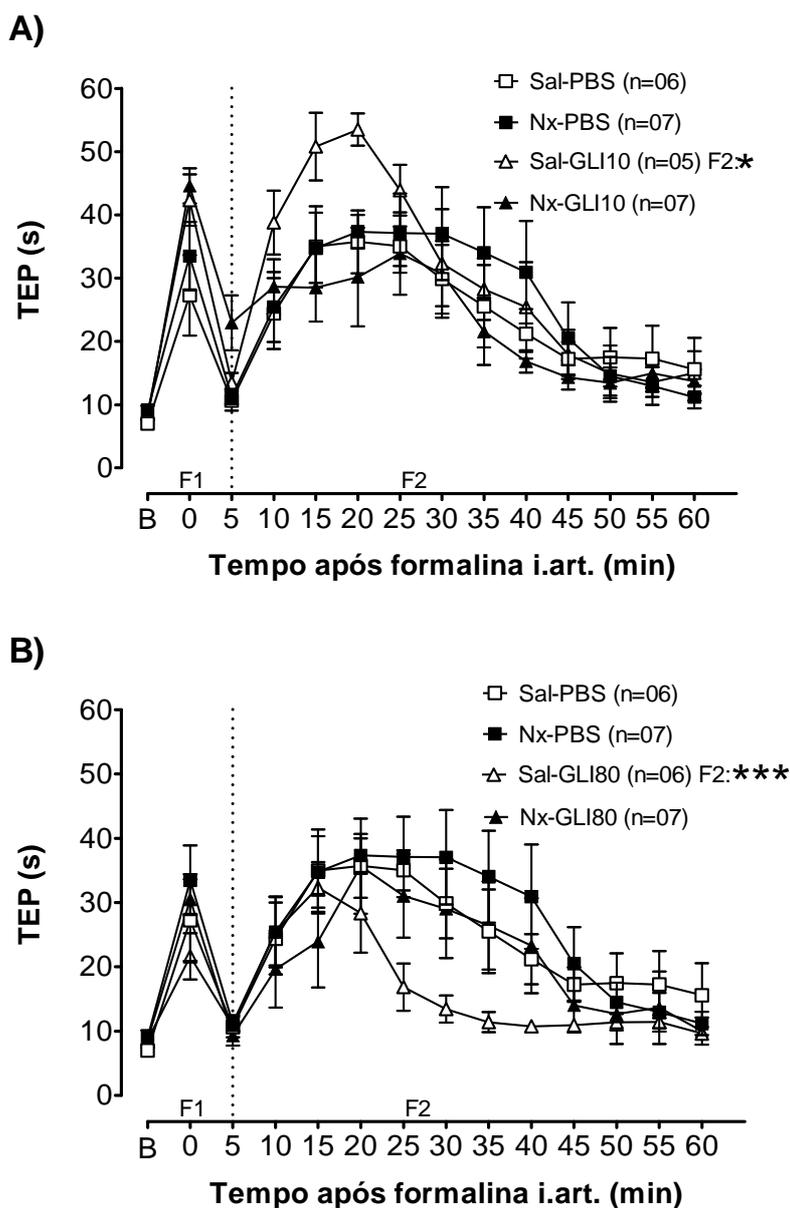


Figura 16. Efeito do tratamento sistêmico com naloxona (nx), nas ações hiper e hiponociceptivas da glicina na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos. Após tratamento prévio com salina (30 min, s.c.), glicina microinjetada na SCPd na dose de 10 nmoles (**A**: Sal-GLI10) aumentou, e na dose de 80 nmoles (**B**: Sal-GLI80) diminuiu o TEP na segunda fase (F2) de resposta à formalina, em relação ao grupo controle que recebeu PBS intra-SCPd após salina s.c. (Sal-PBS). Os grupos que receberam glicina após naloxona s.c. (**A**: Nx-GLI10 e **B**: Nx-GLI80) não apresentaram alteração significativa nos TEPs em relação ao grupo controle (Sal-PBS). A letra **B**, no eixo das abcissas, representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal; **F1** e **F2** significam fases 1 (0-5 min) e 2 (10-60 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% intra-articular e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm, analisados pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao controle (Sal-PBS), onde * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,01$.

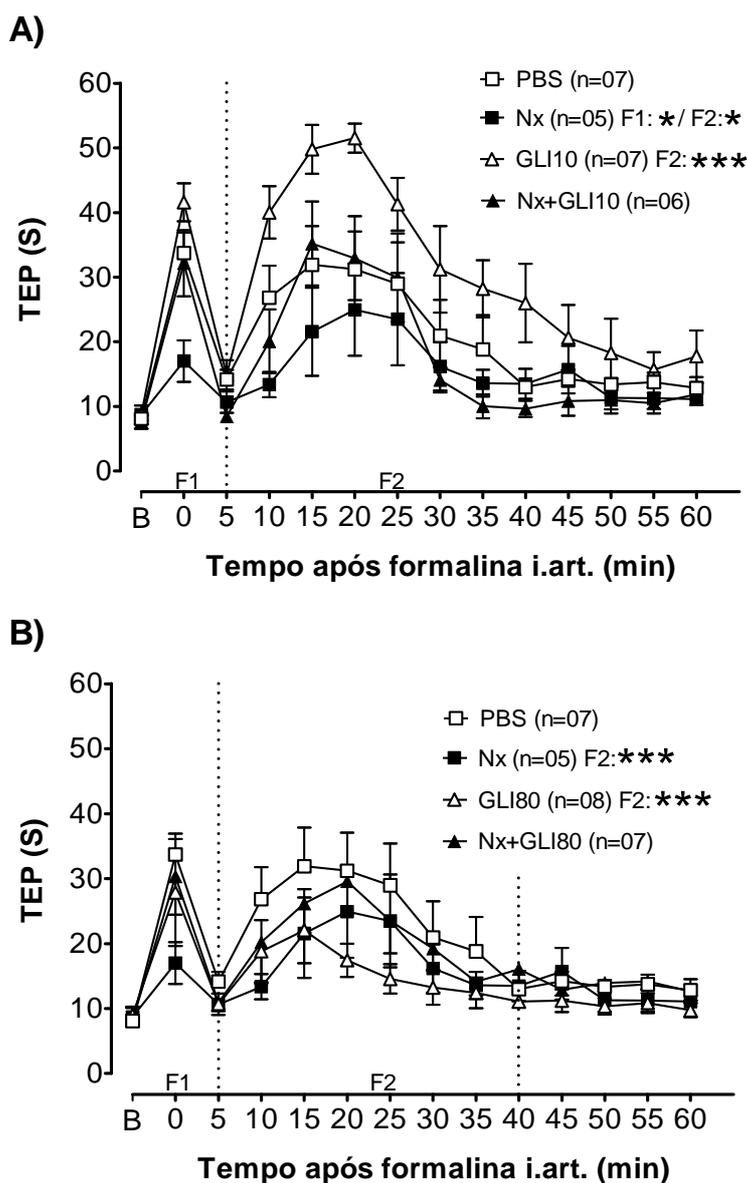


Figura 17. Efeito da microinjeção de glicina associada com naloxona na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina em ratos. Glicina intra- SCPd, na dose de 10 nmoles (A: GLI10), aumentou o TEP na segunda fase (F2), e na dose de 80 nmoles (B: GLI80), diminuiu o TEP na primeira e na segunda fases (F1 e F2), comparada com o grupo PBS (controle). Naloxona (A e B: Nx) intra-SCPd, diminuiu significativamente o TEP em ambas as fases do teste. Os grupos que receberam GLI10 ou GLI80 associada à naloxona (A: Nx+GLI10 e Nx+GLI80) não apresentaram alteração significativa no TEP em ambas as fases do teste. A letra B, no eixo das abcissas, representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal; F1 e F2 significam fases 1 (0-5 min) e 2 (10-60 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% intra-articular e n, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm, analisados pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao controle (PBS), onde * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.

4.10 Efeito do tratamento sistêmico e intra-SCPd com metisergida no teste de incapacitação articular induzida pela formalina.

Metisergida (Met; 1,0 mg / kg) aplicada previamente pela via subcutânea (30 min) bloqueou tanto o efeito hiper quanto o hiponociceptivo induzido pela glicina intra-SCPd, nas doses de 10 (**Fig.18A**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 16,51$) e 80 nmoles (**Fig.18B**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 10,91$), respectivamente, na segunda fase do teste. Os grupos, Sal-GLI10, Sal-GLI80, Met-GLI10 e Met-GLI80, que receberam solução salina ou metisergida (s.c), antes de glicina intra-SCPd, apresentaram $TEP_{20min} = 53,48 \pm 2,55$ s e $TEP_{25min} = 16,86 \pm 3,69$ s, $TEP_{20min} = 39,6 \pm 5,17$ s e $TEP_{25min} = 37,17 \pm 7,44$, respectivamente. O TEP do grupo controle (Sal-PBS) no tempo de 20 e 25 min foram $35,74 \pm 4,96$ s e $35,02 \pm 3,12$ s, respectivamente. O tratamento prévio com metisergida (s.c) antes de PBS intra-SCPd foi capaz de diminuir, de forma significativa, o TEP dos animais na segunda fase, em relação ao controle (**Fig.18A**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 16,51$ e **Fig.18B**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 10,91$).

A co-administração de metisergida (0,03 pmoles) com glicina (Met+GLI10 e Met+GLI80) foi capaz de prevenir, significativamente, tanto o aumento (**Fig.19A**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 38,23$) quanto à diminuição do TEP (**Fig.19B**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 17,08$) induzidos pela GLI10 e GLI80, respectivamente, na segunda fase de resposta da formalina. Aos 25 min de teste, os TEPs dos grupos Met+GLI10 e Met+GLI80 foram, respectivamente, $23,6 \pm 9,4$ s e $22,37 \pm 4,41$ s contra $41,29 \pm 4,09$ s e $14,56 \pm 2,26$ s para os grupos GLI10 e GLI80, respectivamente. Os grupos PBS (controle) e Met apresentaram nesse tempo, $TEP_{PBS} = 28,97 \pm 6,42$ s e $TEP_{Met} = 26,75 \pm 7,64$ s (**Fig.19A e B**). O tratamento prévio com metisergida (s.c.) antes de GLI10 intra-SCPd foi capaz de diminuir, de forma significativa, o TEP dos animais na primeira fase, em relação ao controle (**Fig.19A**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 38,23$ e **Fig.19B**: ANOVA; $F_{(3,40)} = 17,08$).

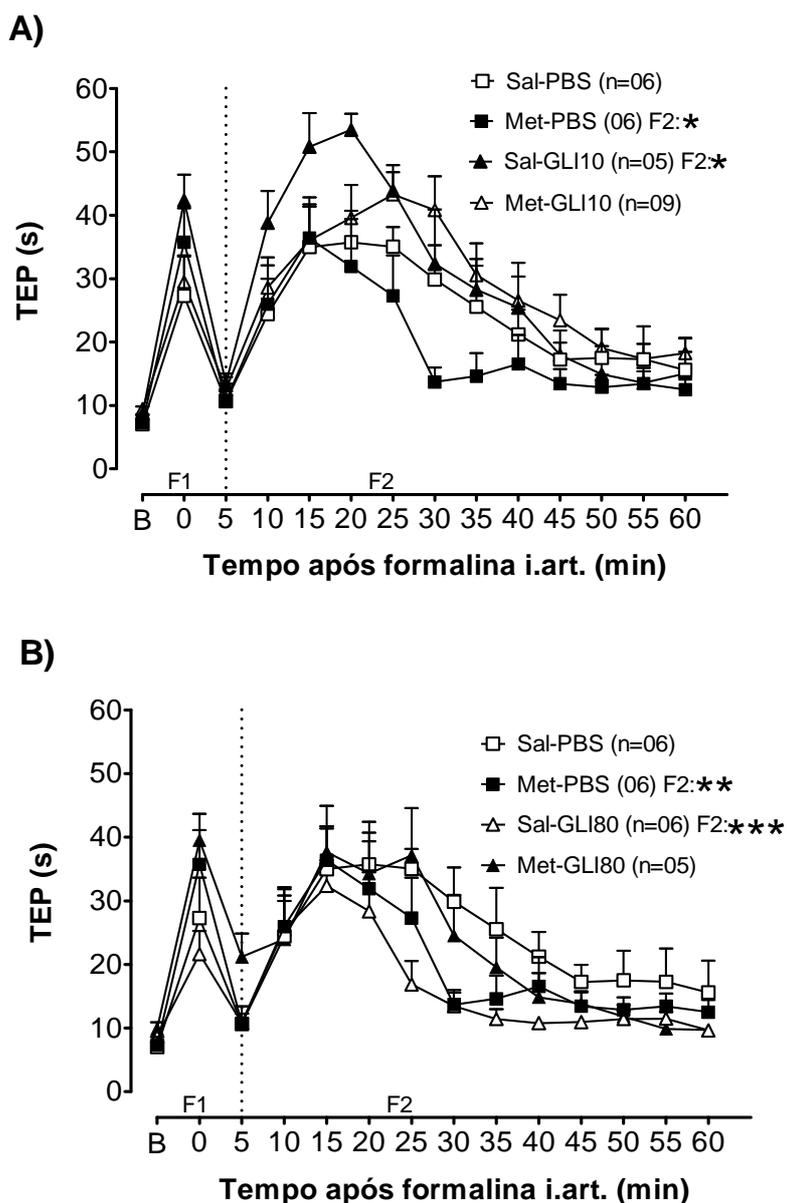


Figura 18. Efeito do tratamento sistêmico com metisergida nas ações hiper e hiponociceptivas da glicina na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos. Glicina intra-SCPd, 30 min após salina s.c., na dose de 10 nmoles (**A**: Sal-GLI10) aumentou e na dose de 80 nmoles (**B**: Sal-GLI80) diminuiu o TEP na segunda fase de resposta à formalina (F2), em relação ao grupo controle que recebeu PBS intra-SCPd após salina s.c. (Sal-PBS). O grupo que recebeu PBS intra-SCPd após metisergida s.c. (Met-PBS) apresentou diminuição significativa do TEP na F2, em relação ao controle. A letra **B**, no eixo das abcissas, representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal; **F1** e **F2** significam fases 1 (0-5 min) e 2 (10-60 min) de resposta nocifensiva da formalina 2 % intra-articular e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm, analisados pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao controle (Sal-PBS), onde * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,01$.

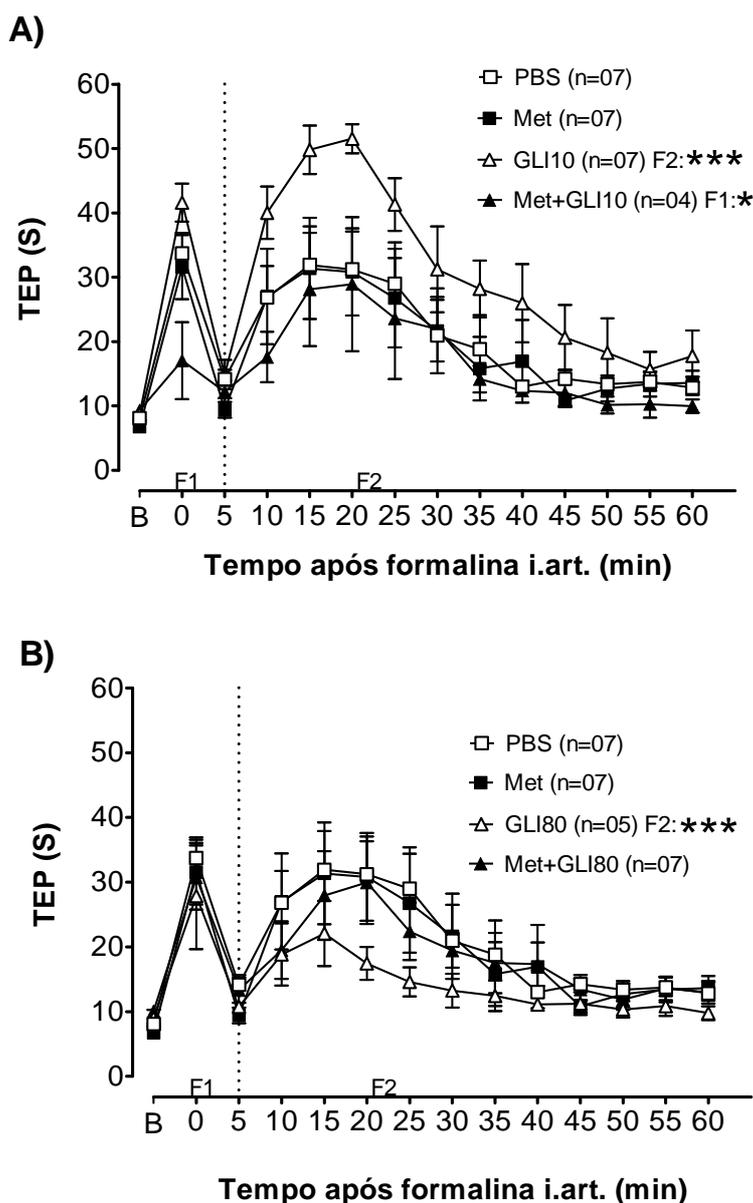


Figura 19. Efeito da microinjeção de glicina associada com metisergida na SCPd, no teste de incapacitação articular induzida por formalina, em ratos. Glicina intra-SCPd, 30 min após salina s.c., na dose de 10 nmoles (**A**: Sal-GLI10) aumentou e na dose de 80 nmoles (**B**: Sal-GLI80) diminuiu o TEP na segunda fase de resposta à formalina (F2), em relação ao grupo controle que recebeu PBS intra-SCPd após salina s.c. (Sal-PBS). GLI10 associada à metisergida (**A**: Met+GLI10) apresentou diminuição significativa do TEP na F1, em relação ao controle. A letra **B**, no eixo das abcissas, representa o tempo de elevação da pata (TEP) basal; **F1** e **F2** significam fases 1 (0-5 min) e 2 (10-60 min) de resposta nocifensiva da formalina 2% intra-articular e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representam a média \pm epm, analisados pela ANOVA de uma via (para medidas repetidas na F2) seguida do teste de Dunnet em relação ao controle (PBS), onde * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente trabalho encontram-se resumidos na **tabela 2** abaixo.

Tabela 2- Resumo dos principais efeitos dos tratamentos intra-SCPd nos testes de incapacitação articular induzida por formalina (2%), formalina na pata (FP), *tail flick* e labirinto em cruz elevado (LCE).

| Tratamento intra-SCPd | Efeito no testes utilizados | | | |
|-----------------------|-----------------------------|---------|---------|-------------|
| | IAF | FP | TF | LCE |
| GLI10 | hiper | 0* | 0 | |
| GLI80 | hipo | hiper | hipo | |
| STR | hiper** | hiper | hipo | ansiogênico |
| STR+GLI10 | não-reverte | | | |
| STR+GLI80 | reverte | hiper | hipo | |
| HÁ | hiper | 0 | 0 | |
| HA+GLI80 | hiper | reverte | reverte | |
| 7CL+GLI10 | reverte | | | |
| 7CL+GLI80 | reverte | | | |
| Nx (s.c.)-GLI10 | reverte | | | |
| Nx (s.c.)-GLI80 | reverte | | | |
| Nx | hipo | | | |
| Nx+GLI10 | reverte | | | |
| Nx+GLI80 | reverte | | | |
| Met (s.c.)-GLI10 | reverte | | | |
| Met (s.c.)-GLI80 | reverte | | | |
| Met+GLI10 | reverte | | | |
| Met+GLI80 | reverte | | | |

Tratamento intra-SCPd = GLI10: glicina 10 nmoles; GLI80: glicina 80 nmoles; STR: estriquina; STR+GLI10: estriquina com glicina 10 nmoles ; STR+GLI80: estriquina com glicina 80 nmoles, HA: HA966; HA+GLI80: HA966 com glicina 80 nmoles; 7CL+GL10: ácido 7 cloroquinurênico com glicina 10 nmoles; STR+GLI80: ácido 7 cloroquinurênico com glicina 80 nmoles; Nx (s.c.)-GLI10: naloxona subcutânea antes da glicina 10 nmoles na SCPd; Nx (s.c.)-GLI80: naloxona subcutânea antes da glicina 80 nmoles na SCPd; Nx+GLI10: naloxona com glicina 10 nmoles; Nx+GLI80: naloxona com glicina 80 nmoles; Met (s.c.)-GLI10: metisergida subcutânea antes da glicina 10 nmoles na SCPd; Met (s.c.)-GLI80: metisergida subcutânea antes da glicina 80 nmoles na SCPd; Met+GLI10: metisergida com glicina 10 nmoles; Met+GLI80: metisergida com glicina 80 nmoles.

Efeitos = hipo: hiponociceptivo; hiper: hipernociceptivo; 0: sem efeito; reverte: bloqueia o aparecimento do efeito da glicina na dose associada no respectivo teste.

*: sem efeito na dose de 20 nmoles; **: tendência de efeito.

Nossos resultados, de uma maneira geral, revelaram que a glicina microinjetada nas colunas dorsais (principalmente na DL caudal) da SCP facilita ou inibe a nocicepção, dependendo da dose microinjetada e do teste nociceptivo empregado. Ambos os efeitos facilitatório e inibitório foram bloqueados pelo 7CL e pelo HA, ambos antagonistas da glicina no receptor GLI_B -NMDA. A estriçnina, antagonista do receptor glicinérgico GLI_A , induziu efeito hipernociceptivo no teste da formalina na pata e efeito hiponociceptivo no teste do *tail flick*, e no teste do LCE evocou forte efeito tipo-ansioçênico. Mostramos também o envolvimento de vias opioidérgicas e serotoninérgicas nos efeitos hiper e hiponociceptivos da estimulação da SCPd com glicina.

A localização histológica dos sítios das injeções revelou que os efeitos facilitatórios e inibitórios da glicina na nocicepção não ocorreram fora da SCP, levando em consideração que todas as injeções realizadas no colículo superior, tanto no modelo da incapacitação articular quanto no teste do *tail flick* não provocaram tais efeitos. Alguns pesquisadores conseguiram inibir o reflexo do *tail flick* com a estimulação das camadas mais profundas do colículo superior (COIMBRA e BRANDÃO, 1997), no entanto, o estímulo utilizado para ativar esta estrutura foi a corrente elétrica, o que difere da estimulação química com glicina estudada neste trabalho. Ainda fazendo uso dos dados da histologia, é válido deduzir que o espraçamento dos 0,3 μ l de glicina não ultrapassou a região dorsal, tendo em vista que as injeções nas colunas laterais e no aqueduto de Sylvius (regiões limítrofes) bem como no colículo superior, não induziram alteração significativa no comportamento nociceptivo.

O papel inibitório da SCP na nocicepção e na dor já está bem definido e começou a ser estabelecido após trabalhos com estimulação elétrica em animais (REYNOLDS, 1969; MEYER et al., 1971; MEYER e PRICE, 1976; FARDIN et al., 1984) e humanos (MEYER, 1984; YOUNG e BRECHNER, 1986). Posteriormente, estudos com estimulação química da SCP com aminoácidos excitatórios (JENSEN e YAKSH, 1984; JACQUET, 1988; MORGAN e FRANKLIN, 1988; JENSEN e YAKSH, 1992) e com opióides (YEUNG et al., 1977; JENSEN e YAKSH, 1989) reforçaram o papel inibitório da SCP sobre a nocicepção. Nosso estudo mostrou que a microinjeção de glicina, em altas doses, na SCPd provocou diminuição significativa da nocicepção (hiponocicepção) da incapacitação articular (em ambas as fases) e do *tail flick*. Sugerindo que a estimulação da SCPd com glicina é capaz de ativar vias

descendentes inibitórias diminuindo o reflexo nociceptivo medular. No entanto, a estimulação da SCPd com glicina em baixas doses no teste da incapacitação articular e em altas doses no teste de formalina na pata induziu hipernocicepção, o que indica que a SCP também pode exercer um papel facilitatório da nocicepção. Estudos recentes reforçam esta idéia, pois injeção de capsaicina e prostaglandinas na SCP também foram capazes de facilitar a nocicepção (McGARAUGHTY et al., 2003; OLIVA et al., 2006).

Desde o início da década de 90, um número crescente de trabalhos tem mostrado que o sistema descendente de controle da dor, presumivelmente aquele proveniente da ponte e do bulbo, pode facilitar a transmissão medular dos impulsos nociceptivos (GEBHART, 1999; URBAN e GEBHART, 1999; PERTOVAARA, 2000; PORRECA et al., 2002; REN e DUBNER, 2002; SUZUKI et al., 2004; OSSIPOV et al., 2005). Estudos funcionais têm implicado o RVM em vários modelos de hipernocicepção e dor crônica. Assim, verificou-se que o RVM medeia processos de hipernocicepção em modelos de inflamação e neuropatias, como o teste de formalina, teste do óleo de mostarda e ligação de nervo periférico (HEINRICHER et al., 2003; PORRECA et al., 2002). Além dessas investigações com testes de dor persistente, Zhuo e Gebhart (1992) haviam demonstrado que a baixa intensidade de estimulação elétrica em alguns sítios no RVM facilitava o reflexo do *tail flick*. Nossos achados mostram influências facilitatórias provenientes da SCPd nos comportamentos nociceptivos gerados em testes de nocicepção aguda e tônica, como o teste de formalina, mas não no teste de nocicepção fásica, o *tail flick*. Provavelmente, porque, no presente estudo, a ativação da SCPd ocorreu de maneira menos intensa se comparada àquela vista com a estimulação elétrica, que também ativa fibras de passagem provenientes de outras regiões ou estruturas cerebrais (Ranck, 1975). Além disso, a anestesia utilizada nos experimentos de Zhuo e Gebhart (1992) pode ter interferido nos resultados encontrados. A literatura mostra ainda que o aumento da transmissão nociceptiva é seletivo para certos tipos de estímulos. Por exemplo, o RVM não é importante para os fenômenos de hipernocicepção em torno de lesões feitas por cortes incisionais (POGATZKI et al., 2002) ou após inflamação crônica (REN e DUBNER, 2002), o que sugere que o sistema SCP-RVM pode facilitar a nocicepção em alguns, mas não, em todos os modelos.

Assim como o efeito inibitório, a facilitação proveniente da estimulação da SCPd pode ter o envolvimento dos neurônios do RVM (URBAN e GEBHART, 1999; PORRECA et al., 2002). Porém, como vimos na introdução deste trabalho, a coluna dorsal da SCP projeta-se principalmente para o DLPT, e não para o RVM (CAMERON et al., 1995). Neste caso, projeções noradrenérgicas para o corno dorsal da medula espinhal (WESTLUND et al., 1983) podem explicar os efeitos inibitórios (MILLAN, 1997; PERTOVAARA, 2006) e os facilitatórios (MARTIN et al. 1999). Contudo, como citado anteriormente, a SCPd pode influenciar indiretamente o RVM, também via locus coeruleus (CAMERON et al., 1995).

Os circuitos neuronais que modulam a dor existem porque a habilidade de suprimir ou aumentar os reflexos nocifensivos e outras respostas normalmente desencadeadas pelo estímulo nocivo aumenta as chances de sobrevivência do indivíduo. Assim, por exemplo, a supressão do reflexo nocifensivo pode facilitar a fuga frente a uma ameaça, enquanto, o aumento da dor, na presença da lesão tecidual e da inflamação, poderia promover recuperação e cura (WATKINS et al., 1995). Devido à importância do controle descendente na definição da experiência da dor (LUMB, 2001) e os diferentes papéis das fibras aferentes primárias A e C na dor aguda e crônica, alguns autores (WATERS e LUMB, 1997; HEINRICHER et al., 2008) sugerem que o controle descendente da dor pode modular seletivamente a informação nociceptiva conduzida por essas fibras. Estudos anteriores já haviam mostrado que o RVM exerce influências opostas sobre os reflexos nociceptivos medulares (HUDSON e LUMB, 1996). Recentemente, através de registros eletrofisiológicos no corno dorsal da medula espinhal, foi demonstrado que as respostas nociceptivas mediadas por neurônios medulares C+ (positivo para os que recebem sinal das fibras aferentes primárias C) e C-, foram inibidas e facilitadas, respectivamente, após a estimulação com aminoácido excitatório da SCP (dorsal e ventral) (McMULLAN e LUMB, 2007; WATERS e LUMB, 2008). No entanto, nossos achados sugerem que a inibição e a facilitação induzida pela ativação da SCPd não depende do fenótipo da fibra aferente nociceptiva estimulada, pelo menos quimicamente. Nos testes de formalina, por exemplo, a SCPd tanto inibiu quanto facilitou as repostas à formalina intra-articular e facilitou as repostas à formalina subcutânea. Por outro lado, no teste com estímulo térmico quente (*tail flick*) a estimulação da SCPd inibiu fortemente a nocicepção. Evento que pode ter decorrido

da ativação de influências inibitórias da SCP sobre as respostas mediadas pelas fibras C mais seletivas nesse teste devido à emissão gradativa de calor (Le BARS et al., 2001).

Outra diferença observada no presente trabalho é referente à dose de glicina microinjetada na SCPd. Sabe-se que a liberação de glicina na SCP (principalmente na coluna ventro-lateral) está diminuída após estimulação periférica nociva (POURCHO et al., 1992; SHERMAN et al., 1997; MAIONE et al., 2000), o que sugere que a pouca quantidade de glicina na fenda sináptica favoreça os quadros hipernociceptivos. De fato, nossos achados mostraram que a glicina microinjetada na SCPd em dose baixa causou aumento no TEP (hipernocicepção) e, em dose alta, aumento da latência do *tail flick* (hiponocicepção) e diminuição no TEP (hiponocicepção). No entanto, a dose alta de glicina na SCP causou aumento do número de comportamentos nociceptivos (NCN) durante o teste da formalina na pata. Uma possibilidade para explicar os efeitos opostos induzidos pela glicina microinjetada na SCPd, em diferentes doses, seria a ativação dos diferentes receptores glicinérgicos presentes nessa região. Ambos os receptores de glicina sensíveis (GLI_A) e insensíveis à estricnina (GLI_B-NMDA) estão concentrados principalmente na região dorso-lateral da SCP (ALBIM et al., 1990; BETZ, 1991; FUJITA et al., 1991; FUJIWARA et al., 1998). Porém, nossos achados com os antagonistas 7CL e HA implicam principalmente os receptores GLI_B-NMDA nos efeitos hiper e hiponociceptivos da glicina na SCPd.

O envolvimento dos receptores NMDA no papel hiponociceptivo da SCP tem sido evidenciado em vários estudos com aminoácidos excitatórios (JENSEN e YAKSH, 1984; CARSTENS et al., 1990; JENSEN e YAKSH, 1992) e análogos do NMDA (JACQUET, 1988; SIEGFRIED et al., 1989; JENSEN E YAKSH, 1992). Outros achados complementam essa idéia, e mostram que a hiponocicepção, após ativação dos receptores NMDA na SCP, é consequência, de uma forma geral, da liberação de neurotransmissores hiponociceptivos (norepinefrina e serotonina) das vias bulbo-espinhais (FINK et al., 1992). Recentemente foi mostrado que os neurônios glutamatérgicos da SCP ativam diretamente as células *OFF* e inibem as células *ON* do RVM (TORTORICI e MORGAN, 2002).

Por outro lado, recentemente, Xu e colaboradores (2007), através de estudos eletrofisiológicos, mostraram que os receptores NMDA apresentam papéis opostos no RVM: produzem hiponocicepção quando recrutados para ativar as células *OFF*

na analgesia opióide e hipernocicepção quando contribuem para ativação das células ON após uma inflamação. Esse efeito dual dos receptores NMDA no bulbo também já foi visto em estudos usando estímulo elétrico ou outros estímulos químicos como glutamato e neurotensina. Baixas intensidades do estímulo elétrico, ou doses baixas da concentração da substância química, no mesmo sítio do RVM induziram facilitação da nocicepção medular, enquanto altas intensidade do estímulo elétrico e altas doses de glutamato e neurotensina inibiram a nocicepção (ZHUO e GEBHART, 1992; URBAN e SMITH, 1993; URBAN e GEBHART, 1997; ZHUO e GEBHART, 1997). Em relação à SCP, nosso estudo é um dos poucos que mostram o envolvimento receptor NMDA na facilitação da nocicepção (JENSEN e YAKSH, 1992; VACCARINO et al., 1997, SUMAN et al., 1998). Da mesma forma que no RVM, a dose baixa de glicina na SCPd facilitou e a dose alta inibiu a nocicepção no teste de incapacitação articular. No entanto, no teste do *tail flick* a glicina na SCPd induziu apenas hiponocicepção, até mesmo em doses mais baixas (20 e 50 nmoles) daquela observada na incapacitação (80 e 100 nmoles).

A nocicepção do teste de incapacitação articular induzida por formalina difere claramente do teste do *tail flick*. Na primeira, o estímulo é agudo, mas de longa duração (tônico) o que lhe confere um caráter inescapável e, portanto, mais estressante, ao contrário do *tail flick* que é fásico e escapável e assim menos estressante (Le BARS et al., 2001). Os dados iniciais de estimulação da SCP com aminoácidos excitatórios também foram obtidos, em sua maioria, em testes fásicos como o *tail flick* (JENSEN e YAKSH, 1984; JACQUET, 1988; SIEGFRIED et al., 1989; CARSTENS et al., 1990; JENSEN e YAKSH, 1992) e, da mesma forma, não evidenciaram o papel facilitatório dos receptores NMDA nessa estrutura. Sugerindo que a qualidade do estímulo nociceptivo determina se a estimulação da SCPd terá efeito hiper ou hiponociceptivo. Os testes com estimulação química persistentes são os que mais se aproximam da dor clínica (Le BARS et al., 2001).

Além disso, é importante ressaltar que na incapacitação articular, a nocicepção é oriunda de tecido somático profundo, e no *tail flick*, de tecido somático superficial. Da mesma forma, as principais dores clínicas originam-se de tecidos profundos como vísceras, articulações e músculos (Le BARS et al., 2001) e talvez, essa característica poderia ser reponsável pela diferença observada nos dois testes. No entanto, os resultados obtidos com o teste de formalina aplicada na pata (agora o

mesmo estímulo nociceptivo, porém em tecido superficial) mostram que a origem do tecido por si só, não determina a influência descendente da SCPd sobre a nocicepção, visto que na mesma dose (80 nmoles) a glicina na SCPd inibiu a LTF e aumentou o NCN.

Sabe-se que a nocicepção oriunda dos tecidos cutâneos e profundos ativa diferentemente a SCP e a amígdala. A SCPdl, por exemplo, parece apresentar aumento na expressão de *c-fos* após o teste de formalina na pata, enquanto a aplicação de formalina no músculo induz aumento na expressão desse proto-oncogene na SCPvl (KEAY et al., 2000). Por sua vez, a ativação do núcleo central da amígdala (CeA) inibe a nocicepção de tecidos cutâneos e facilita a nocicepção visceral (para revisão, ver NEUGEBAUER et al., 2004). O fato é que ambas as estruturas, SCP e amígdala, integram os comportamentos afetivo e nociceptivo, o que sugere que o estresse causado pelo contexto nociceptivo (isto é; a qualidade do estímulo nociceptivo, o local de origem da nocicepção e o ambiente) possa ser importante para definir quais vias descendentes atuarão no processamento nociceptivo medular.

É válido destacar que o receptor NMDA na SCP tem sido relacionado com os comportamentos de defesa coordenados por essa estrutura. Microinjeções de aminoácidos excitatórios na SCPd produzem respostas defensivas dose-dependente que vão desde uma redução na exploração dos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE) até reações de defesa mais intensas como comportamentos de congelamento e fuga (CAROBREZ et al., 2001). Por outro lado, microinjeções de glicina ou D-serina provocam apenas reações de defesa mais leves, como redução na exploração do LCE (SCHMITT et al., 1995; TEIXEIRA e CAROBREZ, 1999), denotando aumento nos níveis de ansiedade, e microinjeções dos antagonista, 7CL e HA têm efeito ansiolítico (MATHEUS et al., 1994; De-SOUZA et al., 1998).

Na faixa de doses usada em nosso estudo, a glicina provavelmente produz uma atenção progressiva para o ambiente ao redor, que é desconhecido e que pode parecer como potencialmente mais ameaçador, movimentando o animal para os braços fechados (SCHMITT et al., 1995; TEIXEIRA e CAROBREZ, 1999; SANTOS et al., 2006). Diferentes tipos de testes ansiogênicos têm mostrado produzir hipernocicepção em modelos de dor tônica (QUINTERO et al., 2000; ANDRÉ et al., 2005, GAMEIRO et al., 2006), mas também aumentar o limiar de resposta em testes

de nocicepção fásica (VIDAL e JACOB, 1982; JORUM, 1989, QUINTERO et al., 2000; GEERSE et al., 2006). Os três testes aqui utilizados representam diferentes níveis de estresse para o animal. O teste do *tail flick*, como um teste nociceptivo escapável, é provavelmente o menos estressante. Ao contrário, a nocicepção inescapável induzida pela formalina é mais estressante, uma vez que o animal não pode evitar o estímulo. No entanto, o teste de formalina na pata parece produzir uma situação mais estressante do que o teste de incapacitação articular. Após a injeção na pata os animais exibiram agitação intensa, micção, defecação e compulsivos episódios de lambida do assoalho, além dos comportamentos tradicionalmente contados como nociceptivos, isto é; chacoalhadas, lambidas, mordidas, retiradas e/ou erguidas da pata injetada. Por outro lado, os animais no teste de incapacitação articular não apresentaram esses ou outros comportamentos característicos de condições estressantes. Os comportamentos nociceptivos no teste de formalina na pata também foram mais persistentes (> 60 min) que aqueles observados no teste de incapacitação articular (\pm 45 min). Nossa teoria para justificar os achados com glicina na SCPd é que a ansiedade aumentaria a nocicepção quando esta fosse a maior fonte de estresse (BUSHNELL et al., 1985; MIRON et al., 1989; ARNTZ et al., 1994; RHUDY e MEAGHER 2000; PLOGHAUS et al., 2003). Isto explicaria o efeito hipernociceptivo da alta dose de glicina no teste de formalina na pata, em oposição à hiponocicepção no teste do *tail flick*. Nesse caso, a glicina injetada na SCPd aumentou a atenção do animal para aquilo que causa mais estresse, isto é; a nocicepção tônica inescapável, assim aumentando a nocicepção. Por outro lado, no teste fásico e escapável do *tail flick*, a nocicepção é eventual, o principal foco da atenção do animal não é diretamente a cauda, mas qualquer outro objeto potencialmente ameaçador, isto é; a mão do experimentador, o ambiente em volta, etc. A glicina, neste caso, estaria desviando o foco de atenção da cauda do animal, causando assim, hiponocicepção. A incapacitação induzida pela formalina, diferentemente de outros testes, apresentou ambos os efeitos da glicina, isto é; hiper e hiponocicepção. Como mencionado acima, o teste de incapacitação articular, não produziu sinais intensos de estresse, como os do teste de formalina na pata. Assim, é concebível que o teste de incapacitação demande menos atenção para o sítio da nocicepção do que no teste de formalina na pata. Talvez por isso, a glicina em doses baixas tenha causado hipernocicepção. O leve efeito tipo-ansiolítico devido a baixa dose de glicina (SANTOS et al., 2006) pode estar aumentando o principal foco de

estresse para o animal que é a nocicepção articular. O efeito desta dose baixa de glicina não aparece no teste de formalina na pata, provavelmente porque a SCPd já deve estar altamente ativada. Por outro lado, a alta dose de glicina pode ter aumentado a atenção para outras fontes de ameaça potencial do que para o joelho. Em dose alta, glicina provocou hiponocicepção no teste de incapacitação articular e hipernocicepção no teste de formalina na pata, sugerindo não ser seus efeitos devido a um déficit motor. No teste de formalina intra-articular observado na caixa, o fato dos animais não exibirem os comportamentos característicos de situações estressantes, nos sugere que a nocicepção articular, ainda que fora do teste de incapacitação, continua sendo menos aversiva que a nocicepção cutânea.

O aumento da incapacitação causado pelo HA no teste de incapacitação articular induzida por formalina pode ser devido à atividade agonista parcial (isto é; apresenta alguma atividade intrínseca nos receptores GLI_B -NMDA) exibida por esta substância em certas circunstâncias. Nesse caso, o aumento da incapacitação articular seria similar ao causado por doses baixas de glicina. O HA nos demais testes e o 7CL na incapacitação não causaram alteração na nocicepção dos animais.

Em humanos, a relação entre a intensidade da dor relatada e o estímulo periférico responsável pela sensação da dor, depende de alguns fatores psicológicos como, estado de alerta, atenção, estresse e estado de humor, o que demonstra que a percepção da dor é influenciada pelo contexto (MELZACK et al., 1982). Por exemplo, lesões traumáticas durante competições atléticas, ou mesmo durante um combate podem ser totalmente indolores. Por outro lado, em situações menos estressantes, essas mesmas lesões seriam extremamente dolorosas sob outras circunstâncias (BEECHER, 1959; MELZACK e WALL, 1982). Essa relação altamente variável entre dor relatada e intensidade do estímulo levou Head e Holmes (1911) a postularem que o estado psicológico do sujeito poderia modular a percepção da dor. Um elemento crítico do estado psicológico que pode modular a resposta subjetiva ao estímulo nocivo é a atenção. A diminuição da atenção ao estímulo nocivo diminui os índices de dor (MIRON et al., 1989), enquanto a intensidade da dor percebida é aumentada quando a atenção do indivíduo é direcionada ao estímulo doloroso (BUSHNELL et al., 1985). Além disso, a distração é usada como um auxiliar no tratamento da dor (GOOD et al., 1999).

Estudos neurofisiológicos e de imagem (fMRI) mostram que a modulação da nocicepção, pela atenção e pela distração, levam à ativação de muitas regiões do cérebro responsáveis pelo processamento da dor, com concomitantes alterações na sua percepção (PEYRON et al., 1999; PETROVIC et al., 2000; BANTICK et al., 2002; LEGRAIN et al., 2002; OHARA et al., 2004a, 2004b). Trabalhos recentes confirmam a existência de conexões anatômicas entre regiões corticais e tronco-encefálicas em humanos (HADJIPAVLOU et al., 2006), capacitando, desta maneira as influências corticais atencionais sobre o sistema tronco-encefálico modulatório descendente da dor (TRACEY et al., 2002; VALET et al., 2004).

Além disso, estudos farmacológicos sugerem que o sistema colecistocininérgico central pode fazer a mediação entre o estado de ansiedade e o aumento da dor (COLLOCA e BENEDETTI, 2007). Antagonistas dos receptores de colecistocinina (CCK) mostram-se efetivos na redução de hiperalgias causada pela ansiedade ou pela antecipação em humanos (BENEDETTI et al., 2007) e na hipernocicepção devido à exposição a modelos de estresse em animais (ANDRÉ et al., 2005). A CCK também produziu efeitos hiperalgésicos / hipernociceptivos e propriedades ansiogênicas em homens e em animais (para revisão, ver BERNA et al., 2007). Vários estudos apontam a SCP como o sítio para a expressão desses efeitos pelo peptídeo (LIU et al., 1994; BRACK e LOVICK, 2007). Os mecanismos pelo quais a CCK na SCP induz hipernocicepção e ansiedade parecem ser dependentes da liberação de glutamato (LIU et al., 1994; YANG et al., 2006) envolvendo os receptores NMDA. Em outras áreas cerebrais foi mostrado que a CCK facilita a liberação pré-sináptica de glutamato (MIGAUD et al., 1994; GABRIEL et al., 1996). Esses dados com o sistema CCKérgico corroboram a relação entre ansiedade e hipernocicepção e o possível envolvimento dos receptores NMDA na SCP.

Nossos resultados com o antagonista do receptor GLI_A , reforçam o envolvimento da glicina nas respostas relacionadas ao estresse e na modulação da nocicepção pela SCPd e que a glicina pode apresentar um papel tônico inibitório nessa estrutura. A estricnina no teste da formalina na pata causou hipernocicepção, no *tail flick*, hiponocicepção e no teste de incapacitação articular, hipernocicepção. Efeitos semelhantes aqueles vistos com a microinjeção de glicina na SCPd. Da mesma maneira, o teste do LCE revelou efeito tipo-ansiogênico da estricnina na SCPd, uma vez que diminuiu significativamente a exploração dos braços abertos.

Sendo assim, de acordo com a nossa hipótese, a ativação da SCPd devido ao bloqueio dos receptores GLI_A inibitórios, provocou o desvio da atenção do animal para o alvo potencialmente mais ameaçador, a pata ou o joelho, causando hipernocicepção. Em contraste, no teste do *tail flick*, o estresse induzido pela estricnina provavelmente provocou desvio da atenção para o ambiente ao redor, que nessa situação deve parecer mais perigoso do que a nocicepção na cauda.

Há poucos relatos sobre o papel dos receptores GLI_A supramedulares na nocicepção. Alguns estudos sugerem que medeiam ações hipernociceptivas, principalmente por inibirem neurônios que formam parte das vias que controlam a dor (MIN et al., 1996; ONAKA et al., 1996; MAIONE et al., 2000). Shin e colaboradores (2003), por exemplo, mostraram que a corrente inibitória de Cl^- para dentro do neurônio, através do receptor GLI_A , induzido pela injeção de lipopolissacarídeo (LPS) na SCP, causa hipernocicepção. Nossos achados, também sugerem que o GLI_A na SCPd pode estar inibindo as vias descendentes modulatórias da dor, uma vez que no teste de formalina na pata além de aumentar a nocicepção durante a segunda fase do teste, também reduziu o período de quiescência. Essa fase de quiescência, observada nos testes de formalina, sugere-se ser devida a uma forte influência inibitória das vias descendentes tronco-encefálicas (MATTHIES e FRANKLIN, 1992; KANEKO e HAMMOND, 1997).

Em relação ao efeito tipo-ansiolítico, também há poucos achados mostrando o efeito da ativação desses receptores GLI_A no cérebro. A microinjeção de estricnina na amígdala (núcleo basolateral) diminui o tempo de exploração nos braços fechados e aumenta o tempo nos braços abertos no LCE (MCCOOL e CHAPPELL, 2007), denotando efeito tipo-ansiolítico desse antagonista e uma função ansiogênica do receptor GLI_A . No entanto, nosso estudo mostrou que na SCP (dorsal) o receptor pode apresentar uma função ansiolítica, uma vez que o antagonista induziu efeitos contrários daqueles observados na amígdala. A microinjeção de estricnina na SCPd também diminuiu o número de entradas nos braços fechados, o que poderia ser indicativo de que, nessa dose, a estricnina estaria afetando a atividade motora basal (CRUZ et al., 1994). No entanto, na mesma dose (5 nmoles) no teste de formalina na pata, a estricnina aumentou os comportamentos nociceptivos e no teste de incapacitação articular (o qual exige coordenação motora, por se tratar de um cilindro em rotação), os animais além de conseguirem realizar o teste também mostraram aumento na nocicepção.

No teste de incapacitação articular a co-administração de glicina na maior dose (80 nmoles) com estriçnina reverteu o efeito hiponociceptivo da glicina. No entanto, como a estriçnina apresentou efeito hipernociceptivo *per se*, sugere-se que esse antagonismo seja funcional, isto é; quando efeitos opostos, por mecanismos diferentes, se anulam mutuamente. Adicionalmente, os dados do teste de formalina na pata e do *tail flick*, nos mostram que a estriçnina não antagonizou o efeito hipernociceptivo da glicina. Esse conjunto de resultados indica que os efeitos observados após a microinjeção de glicina na SCP não devem ser mediados pela ativação do receptor GLI_A , uma vez que co-administração de glicina com estriçnina, não preveniu os efeitos hiper ou hiponociceptivos mediados por esse aminoácido na SCPd. Não obstante, se analisarmos os comportamentos defensivos causados por algumas microinjeções com doses altas de glicina (100 nmoles) e de estriçnina (10 nmoles) observam-se características diferentes entre eles.

A estimulação elétrica ou com aminoácidos excitatórios das colunas dorsal e lateral da SCP produzem um conjunto de comportamentos incondicionados denominados de “reações de defesa”. Estes comportamentos compreendem: imobilidade, exoftalmia, trote, galope, pulos, micção e defecação (BITTENCOURT et al., 2004). Em contraste, no presente estudo, tanto a hiponocicepção quanto a hipernocicepção induzidas pela estimulação com glicina da SCPd foram observadas na ausência dessas reações, provavelmente porque a estimulação com esse co-agonista do receptor NMDA ocorra de maneira mais discreta daquela observada com estimulação elétrica ou agonistas totais desse receptor. Apenas eventualmente foram observadas tais reações de defesa, como por exemplo, em alguns animais que receberam glicina na dose de 100 nmoles e, principalmente, estriçnina nas doses 10 nmoles. Os efeitos comportamentais do agonista e do antagonista apresentaram curso temporal diferente. A glicina (100 nmoles) induziu exoftalmia, sobressaltos e corridas após 35-40 min de sua aplicação na SCPd e durava aproximadamente 50 min. Por outro lado, 5-10 min após a administração de estriçnina (10 nmoles) foram suficientes para evocar tais reações de defesa as quais permaneciam por até 15 min.

Os resultados do presente estudo indicam que os efeitos da glicina na SCPd são provenientes da sua ação no receptor GLI_B -NMDA. Então, qual seria o papel do GLI_A nessa região? Alguns estudos mostram que o GLI_A apresenta importante papel inibitório uma vez que controla a excitabilidade neuronal. Essa função homeostática

tem sido confirmada através de estudos eletrofisiológicos no hipocampo (ZHANG et al., 2008), córtex pré-frontal (CHEN et al., 2003) neurônios da lâmina X da medula espinhal (BRADAIA *et al.*, 2004) e em motoneurônios do hipoglosso (LIM et al., 2004). Esses estudos mostraram que manipulações que aumentem a glicina extracelular, como por exemplo, o uso de inibidores do GLIT1 (proteína glial que faz a re-captação de glicina na sinapse inibitória) facilitam as respostas excitatórias induzidas pelo receptor NMDA. De acordo com essa idéia, os resultados do nosso trabalho indicam que o GLI_A possa estar de alguma maneira modulando os receptores GLI_B-NMDA, uma vez que a estricnina não bloqueou o efeito da glicina, mas induziu os mesmos efeitos na nocicepção desse agonista, incluindo também os efeitos tipo-ansiológicos

Mas, como ocorreria essa modulação do GLI_A nos efeitos induzidos pelo receptor GLI_B-NMDA se ambos são ativados pela glicina? Como vimos, alguns autores sugerem que os receptores GLI_A possam estar inibindo as vias descendentes modulatórias da dor (MIN et al., 1996; ONAKA et al., 1996; MAIONE et al., 2000; SHIN et al., 2003). Desta maneira, sugerimos uma possibilidade, de acordo com o esquema abaixo (**Fig.20**). O receptor GLI_A poderia estar localizado em um interneurônio excitatório que por sua vez, ativaria as vias descendentes modulatórias da dor através do receptor GLI_B-NMDA. A microinjeção de glicina ativaria ambos os receptores e, em um primeiro momento, inibiria as vias descendentes da SCPd. No entanto, a complexa cinética do receptor GLI_A, que após a rápida ativação sofre desativação (para revisão, ver BETZ e LAUB, 2006) permitiria a expressão dos efeitos excitatórios provocados pelo receptor GLI_B-NMDA ativado. Essa proposta justificaria também os comportamentos defensivos induzidos pela estricnina iniciarem mais rápidos que os induzidos pela glicina. A estricnina inibe a ação da glicina na SCPd através do bloqueio do receptor GLI_A, provocando uma desinibição neuronal.

No entanto, não existe ainda um estudo mostrando que ocorra sinapse inibitória funcional da glicina na SCPd, mas existem várias evidências que apontam tanto a presença de células imunorreativas à glicina quanto à presença do receptor GLI_A funcional (detectado pelas subunidades α do receptor) nessa estrutura. Não obstante, também já foram encontradas altas concentrações de GLIT1 no tronco cerebral (para revisão, ver LEGENDRE et al., 2001).

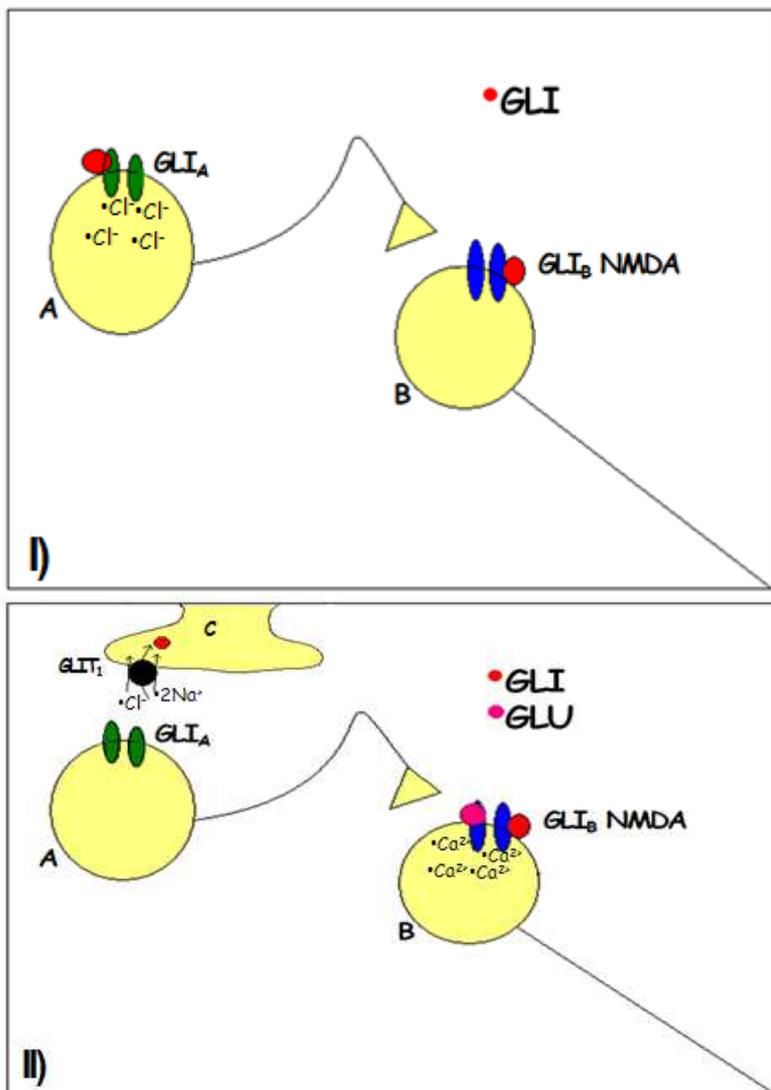


Figura 20. Proposta de modulação glicinérgica entre as células localizadas na SCPd. Painel I) o interneurônio excitatório (**A**) apresenta o receptor de glicina sensível à estricnina (GLI_A) que após ativação pela glicina (GLI) fica permeável aos íon Cl⁻, provocando hiperpolarização neuronal. O neurônio eferente (**B**) apresenta o receptor NMDA que possui um sítio para a glicina insensível à estricnina (GLI_B-NMDA). **Painel II)** O GLI_A é rapidamente desativado quando a GLI é recaptada pelo seu transportador específico tipo 1 (GLIT1) para dentro das células gliais satélites (**C**), simultaneamente com Cl⁻ e Na⁺. A desinibição do neurônio **A** induz a liberação de GLU (glutamato) que juntamente com GLI ativam o receptor NMDA provocando o influxo de Ca²⁺, conseqüentemente a despolarização neuronal.

Além dos antagonistas do receptor GLI_B -NMDA (7CL e HA), o antagonista dos receptores μ -opioides (naloxona) alterou significativamente o perfil dos efeitos provocados pela microinjeção de glicina na SCPd no teste de incapacitação articular induzida por formalina. Naloxona aplicada pela via sistêmica (s.c., 30 min antes) ou intra-SCPd antagonizou os efeitos hiper e hiponociceptivos da glicina no teste de incapacitação articular induzido por formalina.

Sugere-se que os neurônios opioidérgicos na SCP exerçam influência inibitória nos interneurônios GABAérgicos, os quais por sua vez, inibem tonicamente vias aferentes excitatórias da SCP. Nesse contexto, a desinibição dos neurônios excitatórios pelos antagonistas GABAérgicos ou pela morfina (agonista opióide) contribuiriam para a hiponocicepção (VAUGHAN e CHRISTIE, 1997; VAUGHAN et al., 1997). No nosso estudo, a naloxona (sistêmica e intra-SCPd) bloqueou o efeito hiponociceptivo da SCPd após estimulação com glicina. Em trabalhos anteriores utilizando formalina mais concentrada (5 %), a naloxona também bloqueou o efeito hiponociceptivo da estimulação da SCPd com glicina (MARTINS, 2005). O que nos sugere o envolvimento das vias opioidérgicas no efeito hiponociceptivo da estimulação da coluna dorsal da SCP. No entanto, os resultados da literatura são contrários aos nossos, pois mostram que a naloxona somente reverte a analgesia produzida pela estimulação da região ventral ou ventro-lateral da SCP (CANNON et al., 1982; FARDIN et al., 1984; CARSTENS e WATKINS, 1986; NICHOLS et al., 1989; THORN et al., 1989; VAN-PRAAG e FRENK, 1991). A eficácia da naloxona (sistêmica e intra-SCPd) em bloquear o efeito hiponociceptivo da estimulação da região dorsal com glicina, pode ter sido em decorrência de alguns fatores. Por exemplo, o estímulo nociceptivo periférico aplicado (JENSEN e YAKSH, 1984), uma vez que o estímulo fásico e o estímulo tônico podem utilizar vias diferentes tanto para produção quanto para supressão da nocicepção (RYAN et al., 1985). Em todos os trabalhos nos quais a naloxona não reverte a hiponocicepção provocada pela estimulação elétrica da SCPd, o estímulo utilizado foi de nocicepção fásica (CANNON et al., 1982; NICHOLS et al., 1989; THORN et al., 1989; COIMBRA e BRANDÃO, 1997). Outro critério que poderíamos sugerir para a reversão da naloxona é a intensidade pela qual a SCPd é ativada. A estimulação com corrente elétrica ou com aminoácidos excitatórios da SCPd pode excitar muitas vias antinociceptivas dessa região, entre elas vias opioidérgicas (FEDYNYSHYN et al., 1989) colinérgicas (GUIMARÃES e PRADO, 1994) serotoninérgicas (COIMBRA et

al., 1992; COIMBRA e BRANDÃO, 1997) e vias canabinóides (WALKER et al, 1998). Somada a essas, a estimulação elétrica ativa ainda as fibras de passagem provenientes de outras regiões ou estruturas cerebrais (RANCK, 1975). A estimulação, com corrente elétrica ou com aminoácidos excitatórios, apresenta intensidade mais potente que aquela vista apenas com o aminoácido glicina, provavelmente por isso, quando se retira o componente opioidérgico da hiponocicepção provocada pela corrente elétrica, esse não altera o efeito hiponociceptivo final da SCPd.

Dentro da SCP, os receptores μ -opióides estão distribuídos de maneira homogênea nas regiões dorsal e ventral (GOODMAN e PASTERNAK, 1985) e de acordo com Fields (1991) estão envolvidos nos efeitos hiponociceptivos dessa estrutura (FIELDS et al., 1991). No nosso estudo, a naloxona aplicada pela via sistêmica além de bloquear o efeito hiponociceptivo também bloqueou o efeito hipernociceptivo da glicina na SCPd no teste de incapacitação articular induzida pela formalina. O que sugere o envolvimento dos receptores opióides nos efeitos hipo e hipernociceptivos da estimulação da SPCd com glicina. Burdin e colaboradores (1992) mostraram que opióides na SCPd poderiam induzir hipernocicepção e que esta seria sensível à aplicação sistêmica de naloxona, o que corrobora com nossos achados. Por outro lado, o bloqueio do efeito hipernociceptivo da glicina na SCPd após naloxona intra-SCPd juntamente com glicina no nosso trabalho, pode ter sido em virtude do efeito *per se* da naloxona intra-SCPd no teste de incapacitação articular. Desta maneira, o efeito hiponociceptivo da naloxona pode ter anulado o efeito hipernociceptivo da glicina neste teste (antagonismo funcional).

Adicionalmente, ao seu papel na modulação da dor, os receptores μ -opióides também apresentam papel na modulação das funções comportamentais e autonômicas da SCP. Microinjeções de morfina em baixas doses na SCPd atenuam as consequências aversivas da estimulação elétrica do cérebro (CARDOSO et al., 1992; JENCK et al., 1986; JENCK et al., 1993) e produzem efeito tipo-ansiolítico no LCE. Em contrapartida, quando injetada em altas doses na SCPd causa ativação comportamental, similar às reações induzidas pela estimulação elétrica (MOTTA e BRANDÃO, 1993), além de produzir efeito tipo-ansio gênico no LCE (BURDIN et al., 1992). O efeito antiaversivo parece ser mediado pelos receptores μ - e o aversivo, pelos receptores κ -opióides (MOTTA e BRANDÃO, 1993; MOTTA et al., 1995). Esses achados nos sugere que o efeito hiponociceptivo do antagonista opióide intra-

SCPd observado no presente estudo, pode ter sido em decorrência do aumento dos comportamentos relacionados à ansiedade e conseqüentemente o desvio da atenção do animal para o ambiente potencialmente mais ameaçador. Uma vez que de acordo com a nossa hipótese, o estresse aumenta a nocicepção quando esta for o principal foco de atenção para o animal.

Alguns estudos mostram o envolvimento de vias serotoninérgicas no efeito hiponociceptivo que acompanha os comportamentos defensivos induzidos pela estimulação elétrica ou química da SCPd (JENSEN e YAKSH, 1984, NICHOLS et al., 1889; COIMBRA e BRANDÃO, 1997; BRANDÃO et al., 1999). A hiponocicepção induzida pelo medo gerado por estimulação do teto mesencefálico (SCPd e colículo inferior) foi inibida por microinjeções de bloqueadores serotoninérgicos (FANSELOW, 1991; COIMBRA et al., 1992; COIMBRA e BRANDÃO, 1997). No nosso trabalho, o estresse induzido pela nocicepção articular induzida pela formalina acrescido do estresse causado pela microinjeção de glicina na SCPd evocou hipo e hipernocicepção dependendo da dose de glicina. A metisergida pela via sistêmica e intra-SCPd bloqueou ambos os efeitos da glicina na SCPd. Os neurônios imunorreativos à 5-HT encontram-se distribuídos por toda SCP (CLEMENTS et al., 1985) e suas ações modulatórias na nocicepção, de acordo com nosso trabalho, envolve principalmente os receptores 5-HT_{1A} e 5-HT₂, na região dorsal. Na concentração utilizada (0,03 pmoles) a metisergida bloqueia os subtipos 5-HT_{1A,D,F} e 5-HT_{2A-C}. (5-HT ...2008). Estudos recentes reforçam o envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5HT_{1A} nas ações tipo-ansiógênicas dos receptores NMDA na SCPd (MORAES et al., 2008).

6 CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou que existem vias hipernociceptivas, além daquelas hiponociceptivas já evidenciadas dentro da coluna dorsal da SCP, as quais podem ser ativadas pelo aminoácido glicina. Os receptores glicinérgicos GLI_B -NMDA localizados na SCPd apresentam-se diretamente envolvidos nessa ativação. Os receptores GLI_A , por sua vez, tem papel tônico inibitório nas vias descendentes modulatórias da dor da SCPd. Neurônios opioidérgicos e serotoninérgicos, fazem parte dessas vias descendentes hiper e hiponociceptivas ativadas pela glicina na SCPd.

Estamos sugerindo que o estresse induzido pela glicina na SCPd juntamente com o estresse do teste nociceptivo, aumentam a nocicepção quando esta for o principal foco de atenção. Assim, a SCPd poderia ser um substrato neuronal responsável por modular a nocicepção de acordo com a demanda atencional gerada pelo foco estressor.

REFERÊNCIAS

- AGGLETON, J.P. A description of the amygdalo-hippocampal interconnections in the macaque monkey. **Exp. Brain. Res.**, v. 64, n. 3, p. 515-526, 1986.
- AIMONE, L.D.; GEBHART, G.F. Stimulation-produced spinal inhibition from the midbrain in the rat is mediated by an excitatory amino acid neurotransmitter in the medial medulla. **J. Neurosci.**, v. 6, n. 6, p. 1803-1813, 1986.
- ALBIN, R. L.; MAKOWIEC, R.L.; HOLLINGSWORTH, Z.; DURE, L. S. 4TH; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of rat. **Neurosci. Lett.**, v. 2, n. 118, p.112-115, 1990.
- ALMEIDA, A.; TJOLSEN, A.; LIMA, D.; COIMBRA, A.; HOLE, K. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 39, p. 7-15, 1996.
- ANDRE, J.; ZEAU, B.; POHL, M.; CESSÉLIN, F.; BENOLIEL, J.J.; BECKER, C. Involvement of cholecystokinergic systems in anxiety induced hyperalgesia in male rats: behavioral and biochemical studies. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 7896-7904, 2005.
- ASHBURN, M.A.; STAATS, P.S. Management of chronic pain. **Lancet**, v. 29, n. 353 (9167), p. 1865-1869, 1999.
- 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.; DEPAULIS, A. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter**. DEPAULIS, A.; BANDLER, R. Nova Yorque e Londres: Plenum, 1991, p. 1-8.
- BANDLER, R.; KEAY, K.A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and integration of emotional expression. In: HOLSTEGE, G.; BANDLER, R.; SAPER, C. **Prog. Brain Res.**, Amsterdam: Elsevier, 1996. p. 285-300.
- 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 MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends Neurosci.**, v. 17, p. 379-389, 1994.
- BANTICK, S.J.; WISE, R.G.; PLOGHAUS, A.; CLARE, S.; SMITH, S.M.; TRACEY, I. Imaging how attention modulates pain in humans using functional MRI. **Brain**, v. 125, p. 310-319, 2002.

- BASBAUM, A.L.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Ann. Neurol.**, v. 4, p. 451-446, 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.
- BASBAUM, A.E.; JESSEL, T.M. The perception of pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **The Principles of Neural Science**. 4 New York: McGraw-Hill, 2000. p. 472-791.
- BASKIN, D.S.; MEHLER, W.R.; HOSOBUCHI, Y.; RICHARDSON, D.E.; ADAMS, J.E.; FLITTER, M.A. Autopsy analysis of the safety, efficacy and cartography of electrical stimulation of the central gray in humans. **Brain Res.**, v. 23, n. 371 (2), p. 231-236, 1996.
- BEDERSON, J.B.; FIELDS, H.L.; BARBARO, N.M. Hyperalgesia during naloxone-precipitated withdrawal from morphine is associated with increased on-cell activity in the rostral ventromedial medulla. **Somatosens Mot. Res.**, v.7, n.2, p. 185-203, 1990.
- BEE, L.A.; DICKENSON, A.H. Rostral ventromedial medulla control of spinal sensory processing in normal and pathophysiological states. **Neuroscience**, v. 147, p. 786-793, 2007.
- BEECHER, H.K. Generalization from pain of various types and diverse origins. **Science**, v. 31, n.130 (3370), p. 267-268, 1959.
- BEHBEHANI, M.M.; FIELDS, H.L. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. **Brain Res.**, v. 170, p. 85-93, 1979.
- BEITZ, A.J. The nuclei of origin of brainstem serotonergic projections to the rodent spinal trigeminal nucleus. **Neurosci Lett.**, v. 32, n.3, p. 223-228, 1982.
- BETZ, H.; LAUBE, B.; Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. **J. Neurochem.**, v. 97, n.6, p. 1600-1610, 2006.
- BELGOWAN, P.S.; HELMSTETTER, F.J. Neural systems for the expression of hypoalgesia during non associative fear. **Behav. Neurosci.**, v. 110, n.4, p. 727-736, 1996.
- BENEDETTI, F. Placebo and endogenous mechanisms of analgesia. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 177, p. 393-413, 2007.
- BENNETT, G.J.; MAYER, D.J. Inhibition of spinal cord interneurons by narcotic microinjection and focal electrical stimulation in the periaqueductal central gray matter. **Brain Res.**, v. 24, n. 172 (2), p. 243-257, 1979.
- BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v.33, p. 87-107, 1988.

- BERNA, M.J.; TAPIA, J.A.; SANCHO, V.; JENSEN, R.T. Progress in developing cholecystokinin (CCK)/gastrin receptor ligands that have therapeutic potential. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.7, n.6. p. 583-592, 2007.
- BERRINO, L.; MAIONE, S.; LAMPA, E.; ROSSI, F. Modulation by glycine on vascular effects of NMDA: in vivo experimental research. **Amino Acids**, v. 5, p. 239-244, 1993.
- BESSOU, P.; PERL, E.R. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **J. Neurophysiol.**, v. 32, n. 6, p.1025-1043, 1969.
- BETZ, H. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. **Trends Neurosci.**, v.14, p. 458-461, 1991.
- BITTENCOURT, A.S.; CAROBREZ, A.P.; ZAMPROGNO, L.P.; TUFIK, S.; SCHENBERG, L.C. Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 71-89, 2004.
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annu. Rev. Psychol.**, v. 39, n. 1, p. 43-46, 1988.
- BOIVIE, J.; MEYERSON, B.A. A correlative anatomical and clinical study of pain suppression by deep brain stimulation. **Pain**, v. 13, n. 2, p. 113-126, 1982.
- BOURNE, H.R., NICOLL, R. Molecular machines integrate coincident synaptic-synaptic signals. **Neuron**, v.10, p.65-75, 1993.
- BRACK, K.E.; LOVICK, T.A. Neuronal excitability in the periaqueductal grey matter during the estrous cycle in female Wistar rats. **Neuroscience**, v. 5, n. 144 (1), p. 325-335, 2007.
- BRADAÏA, A.; SCHLICHTER, R.; TROUSLARD, J. Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. **J. Physiol.**, v. 559 (Pt 1), p. 169-186, 2004.
- BRANDÃO, M.L.; ANSELONI, V.Z.; PANDÓSSIO, J.E.; DE ARAÚJO, J.E.; CASTILHO, V.M. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, n. 6, p. 863-875, 1999.
- BURDIN, T.A.; GRAEFF, F.G.; PELÁ, I.R. Opioid mediation of the antiaversive and hyperalgesic actions of bradykinin injected into the dorsal periaqueductal gray of the rat. **Physiol. Behav.**, v. 52, n. 3, p. 405-410, 1992.
- 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, p. 1103-1110, 1985.

- CAMEROM, A.A.; KAHN, L.A.; WESTLUND, K.N.; WILLIS, W.D. The efferent projections of periaqueductal gray in the rat: a *Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin* study. II Descending projections. **J. Comp. Neurol.**, v.351, p. 585-601, 1995.
- CANNON, D.; PRIETO, G.J.; LEE, A.; LIEBSKIND, J.C. Evidence for opioid and non-opioid forms of stimulation-produced analgesia in the rat. **Brain Res.**, v. 243, p. 315-321, 1982.
- CARDOSO, S.H.; MELO, L.L.; COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Opposite effects of low and high doses of morphine on neural substrates of aversion in the inferior colliculus. **Behav. Pharmacol.**, v.3, p. 489-495, 1992.
- CARLSON, J.D.; MAIRE, J.J.; MARTENSON, M.E.; HEINRICHER, M.M. Sensitization of pain modulating neurons in the rostral ventromedial medulla after peripheral nerve injury. **J. Neurosci.**, v.27, p. 1322-1331, 2007.
- 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.
- CARPENTER, D.; ENGBERG, I.; LUNDBERG, A. Differential supraspinal control of inhibitory and excitatory action from the FRA to ascending spinal pathways. **Acta Physiol. Scand.**, v. 63, p. 103-110, 1965.
- CARSTENS, E.; HARTUNG, M.; STELZER, B.; ZIMMERMANN, M. Suppression of a hind limb flexion withdrawal reflex by microinjection of glutamate or morphine into the periaqueductal gray in the rat. **Pain**, v. 43, n. 1, p. 105-112, 1990.
- CARSTENS, E.; WALKINS, L.R. Inhibition of responses of neurons in the rat spinal cord to noxious skin heating by stimulation in the midbrain periaqueductal gray or lateral reticular formation. **Brain Res.**, v. 382, p. 266-277, 1986.
- CHEN, L.; MUHLHAUSER, M.; YANG, C.R. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. **J. Neurophysiol.**, v. 89, p. 691-703, 2003.
- CLEMENTES, J.R.; MADL, J.E.; JOHNSON, R.L.; LARSON, A.A.; BEITZ, A.J. Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. **Exp. Brain Res.**, v. 67, p. 594-602, 1987.
- CODD, E.E.; SHANK, R.P.; SCHUPSKY, J.J.; RAFFA, R.B. Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural determinants and role in antinociception. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 274, n. 3, p. 1263-1270, 1995.
- 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, p. 155-158, 1990.

- COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Effects of 5-HT₂ receptors blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical of deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behav. Brain Res.**, v. 87, p. 97-103, 1997.
- 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. **Curr. Opin. Anaesthesiol.**, v. 20, n. 5, p. 435-439, 2007.
- COOPER, B.Y.; VIERCK, C.J J.R.; YEOMANS, D.C. Selective reduction of second pain sensations by systemic morphine in humans. **Pain**, v. 24, p. 93-116, 1986.
- CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994.
- CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 11, p. 327-335, 2001.
- CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. Jr.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 72, p. 74-79, 1941.
- DAVIS, K.D.; MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N. Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey. **J. Neurophysiol.**, v. 69, n. 4, p. 1071-1081, 1993.
- 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.
- DERBYSHIRE, S.W.; WHALLEY, M.G.; STENGER, V.A.; OAKLEY, D. 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. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neurosci. Lett.**, v. 83, p. 207-211, 1987.

- DJOUHRI, L.; LAWSON, S.N. A beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Res. Rev.**, v. 46, n. 2, p. 131-145, 2004.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, n. 2, p. 125-131, 1995.
- 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. 161-174, 1977.
- DUGGAN, A.W.; DAVIES, J.; HALL, J.G. Effects of opiate agonists and antagonists on central neurons of the cat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 196, n. 1, p. 107-120, 1976.
- 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.
- FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The rat brain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum press, 1991. p.151-173.
- FARDIN, V.; OLIVERAS, J.L.; BESSON, J.M. A reinvestigation of the analgesic effects induced by stimulation of periaqueductal gray matter in the rat. II Differential characteristics of analgesia induced by ventral and dorsal PAG stimulation. **Brain Res.**, v. 306, p.125-139, 1984.
- FEDYNYSHYN, J.P.; KWIAT, G.; LEE, N.M. Characterization of high affinity opioid binding sites in periaqueductal gray P2 membrane. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 159, p. 83-88, 1989.
- FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Neuroscience**, v. 5, p. 565-575, 2004.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In MCMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. WALL AND MELZACK'S, **Textbook of Pain**. 5th China: Elsevier, 2006. p.125-142.
- FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 14, p. 219-245, 1991.
- FINK, K. SCHULTLEIB, R.; GÖHERT, M. Stimulation of noradrenaline release in human cerebral cortex by N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 106, p. 67-72, 1992.
- FOO, H.; MASON, P. Discharge of raphe magnus ON and OFF cells is predictive of the motor facilitation evoked by repeated laser stimulation. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 5, p. 1933-1940, 2003.

- FOREMAN, J.C. Peptides and neurogenic inflammation. **Br. Med. Bull.**, v. 43, p. 386-400, 1987.
- FORNAL, C.; AUERBACH, S.; JACOBS, B.L. Activity of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus in freely moving cats. **Exp. Neurol.**, v. 88, n. 3, p. 590-608, 1985.
- FUJITA, M.; SATO, K.; SATO, M.; INOUE, T.; KOZUKA, T.; TOHYAMA, M. Regional distribution of the cells expressing glycine receptor beta subunit mRNA in the rat brain. **Brain Res.**, v. 560, p. 23-37, 1991.
- FUJIWARA, K.; KAMINISHI, Y.; INOUE, Y.; YABUUCHI, M. Monoclonal antibody monospecific to glycine for brain immunocytochemistry. **Brain Res.**, v. 806, p. 210-218, 1998.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, v. 48, n. 2, p. 129-141, 1999.
- GABRIEL, S.; GRÜTZMANN, R.; LEMKE, M.; GABRIEL, H.J.; HENKLEIN, P.; DAVIDOWA, H. Interaction of cholecystinin and glutamate agonists within the dLGN, the dentate gyrus, and the hippocampus. **Brain Res. Bull.**, v. 39, n. 6, p. 381-389, 1996.
- GAMEIRO, G.H.; GAMEIRO, P.H.; ANDRADE, A. Da S.; PEREIRA, L.F.; ARTHURI, M.T.; MARCONDES, F.K.; VEIGA, M.C. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. **Physiol. Behav.**, v. 87, n. 4, p. 643-649, 2006.
- GAO, K.; CHEN, D.O.; GENZEN, J.R.; MASON, P. Activation of serotonergic neurons in the raphe magnus is not necessary for morphine analgesia. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 5, p. 1860-1868, 1998.
- GAO, K.; KIM, Y.H.; MASON, P. Serotonergic pontomedullary neurons are not activated by antinociceptive stimulation in the periaqueductal gray. **J. Neurosci.**, v. 17, n. 9, p. 3285-3292, 1997.
- GAO, K.; MASON, P. Serotonergic Raphe magnus cells that respond to noxious tail heat are not ON or OFF cells. **J. Neurophysiol.**, v. 84, n. 4, p. 1719-1725, 2000.
- GATCH, M.B. Effects of benzodiazepines on acute and chronic ethanol-induced nociception in rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 23, n. 11, p. 1736-1743, 1999.
- GAURIAU, C.; BERNARD, J.F. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. **Exp. Physiol.**, v. 87, n. 2, p. 251-258, 2002.
- GEAR, R.W.; ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. **J. Neurosci.**, v. 19, n. 16, p. 7175-7181, 1999.
- GEBHART GF. Peripheral contributions to visceral hyperalgesia. **Can. J. Gastroenterol.**, v. 13, Suppl A:37A-41A, 1999.

- GEBHART, G.F. Descending modulation of pain. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 27, p. 729-737, 2004.
- GEERSE, G.J.; VAN GURP, L.C.A.; WIEGANT, V.M.; STAM, R. Individual reactivity to the open-field predicts the expression of stress-induced behavioural and somatic pain sensitization. **Behav. Brain Res.**, v. 174, p. 112-118, 2006.
- GOOD, M.; STANTON, H.M.; GRASS, J.A.; CRANSTON, A.G.; CHOI, C.; SCHOOLMEESTERS, L.J.; SALMAN, A. Relief of postoperative pain with jaw relaxation, music and their combination. **Pain**, v. 81, p. 163-172, 1999.
- GOODMAN, R.R.; PASTERNAK, G.W. Visualization of mu1 opiate receptors in rat brain by using a computerized autoradiographic subtraction technique. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 82, n. 19, p. 6667-6671, 1985.
- GRAEFF, F.G. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 239-259, 2004.
- GUIMARÃES, A.P.C.; PRADO, W.A. Antinociceptive effects of carbachol microinjected into different portions of mesencephalic periaqueductal gray matter of the rat. **Brain Res.**, v. 647, p. 220-230, 1994.
- HADJIPAVLOU, G.; DUNCKLEY, P.; BEHRENS, T.E.; TRACEY, I. Determining anatomical connectivities between cortical and brainstem pain processing regions in humans: a diffusion tensor imaging study in healthy controls. **Pain**, v. 123, p. 169-178, 2006.
- HAGBARTH, K.E.; KERR, D.I.B. Central influences on spinal afferent conduction. **J. Neurophysiol.**, v. 17, p. 295-307, 1954.
- HANDLEY, S.L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch.**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.
- HAWS, C.M.; WILLIAMSON, A.M.; FIELDS, H.L. Putative nociceptive modulatory neurons in the dorsolateral pontomesencephalic reticular formation. **Brain Res.**, v. 483, n. 2, p. 2722-2782, 1989.
- HEAD, H.; HOLMES, G. Sensory disturbances from cerebral lesions. **Brain**, v. 34, p. 102-254, 1911.
- HEINRICHER, M.M.; BARBARO, N.M.; FIELDS, H.L. Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. **Somatosens Mot Res.**, v. 6, n. 4, p. 427-439, 1989.
- HEINRICHER, M.M.; MARTESON, M.E.; NEUBERT, M.J. Prostaglandin E2 in the midbrain periaqueductal gray produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla. **Pain**, v. 110, n. 1-2, p. 419-426, 2004.

- HEINRICHER, M.M.; MORGAN, M.M.; TORTORICI, V.; FIELDS, H.L. Disinhibition of off-cells and antinociception produced by an opioid action within the rostral ventromedial medulla. **Neuroscience**, v. 63, n. 1, p. 279-288, 1994.
- HEINRICHER, M.M.; PERTOVAARA, A.; OSSIPOV, M.H. Descending modulation after injury. In: DOSTROVSKY, J.O.; CARR, D.B.; KOLTZENBURG, M. **Progress in Pain Research and Management**. Seattle: IASP Press, 2003. p. 251-260.
- HEINRICHER, M.M.; TAVARES, I.; LEITH, J.L.; LUMB, B.M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res, Rev.**, 2008, doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.009 .
- HELMSTETTER, F.J. Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, n. 2, p. 433-438, 1993.
- HELMSTETTER, F.J.; TERSHNER, S.A.; POORE, L.H.; BELLGOWAN, P.S. Antinociception following opioid stimulation of the basolateral amygdala is expressed through the periaqueductal gray and rostral ventromedial medulla. **Brain Res.**, v. 779, n. 1-2, p. 104-118, 1998.
- HERBERT, H.; SAPER, C.B. Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 315, n. 1, p. 34-52, 1992.
- 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.
- HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 143-201, 1991.
- 5-HT receptor Disponível em: <<http://pdsp.med.unc.edu/pdsp.php>>. Acesso em: 01 fev. 2008
- HUDSON, P.M.; LUMB, B.M. Neurones in the midbrain periaqueductal grey send collateral projections to nucleus raphe magnus and the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Res.**, v. 733, n.1, p. 138-141, 1996.
- IASP. Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p. 09-110, 1995.
- JACQUET, Y.F. The NMDA receptor: central role in pain inhibition in rat periaqueductal grey. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 154, p. 271-276, 1988.
- JAMES, J.E.; HARDARDOTTIR, D. Influence of attention focus and trait anxiety on tolerance of acute pain. **Br. J. Health. Psych.**, v. 7, p.149-162, 2002.

- JANSSEN, S.A.; ARTNZ, A. Anxiety and pain: Attentional and endorphinergic influences. **Pain**, v. 66, p. 145-150, 1996.
- JENCK, F.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Morphine applied to the mesencephalic central gray suppresses brain stimulation escape. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 19, p. 301-308, 1983.
- JENCK, F. SCHMITT, P.; KARLI, P. Morphine injected into the periaqueductal gray attenuates brain stimulation-induced effects: an intensity discrimination study. **Brain Res.**, v. 378, p. 274-284, 1986.
- JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brainstem sites. **Brain Res.**, v. 12, n. 321 (2), p. 287-297, 1984.
- JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. Comparison of the antinociceptive effect of morphine and glutamate at coincidental sites in the periaqueductal gray and medial medulla in rats. **Brain Res.**, v. 2, n. 476 (1), p. 1-9, 1989.
- JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. The antinociceptive activity of excitatory amino acids in the rat brainstem: an anatomical and pharmacological analysis. **Brain Res.**, v. 13, n. 569 (2), p. 255-267, 1992.
- JIMÉNEZ-VELÁZQUEZ, G.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J. Influence of pharmacologically-induced experimental anxiety on nociception and antinociception in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 547, n. 1-3, p. 83-89, 2006.
- JOHNSON, J.W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, v. 325, p. 529-531, 1987.
- JORUM, E. Analgesia or hyperalgesia following stress correlates with emotional behavior in rats. **Pain**, v. 32, p. 341-348, 1988.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.
- JURGENS, U.; LU, C. L. The effects of periaqueductally injected transmitter antagonists on forebrain-elicited vocalization in the squirrel monkey. **Eur. J. Neurosci.**, v. 5, p. 735-741, 1993.
- JURNA, I. Effect of stimulation in the periaqueductal grey matter on activity in ascending axons of the rat spinal cord: selective inhibition of activity evoked by afferent A delta and C fibre stimulation and failure of naloxone to reduce inhibition. **Brain Res.**, v. 196, n. 1, p. 33-42, 1980.
- KANEKO, M.; HAMMOND, D.L. Role of spinal gamma-aminobutyric acid receptors in formalin-induced nociception in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 282, n. 2, p. 928-938, 1997.

- KAVALIERS, M, INNES DG. Novelty-induced opioid analgesia in deer mice (*Peromyscus maniculatus*): sex and population differences. **Behav. Neural. Biol.**, v. 49, n. 1, p. 54-60, 1988.
- KEAY, K.A.; LI, Q.F.; BANDLER, R. Muscle pain activates a direct projection from ventrolateral periaqueductal gray to rostral ventrolateral medulla in rats. **Neurosci. Lett.**, v. 1, n. 290 (3), p. 157-160, 2000.
- KEMP, J. A.; LEESON, P. D. The glycine site of the NMDA receptor-five years on. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 14, p. 20-25, 1993.
- KEMP, J.A.; MCKERNAN, R.M. NMDA receptor pathways as drug targets. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 1039-1042, 2002.
- KOVELOWSKI, C.J.; OSSIPOV, M.H.; SUN, H.; LAI, J.; MALAN, T.P.; PORRECA, F. Supraspinal cholecystinin may drive tone descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. **Pain**, v. 87, p. 265-273, 2000.
- KUTSUWADA, T.; KASHIWABUCHI, N.; MORI, H.; SAKIMURA, K.; KUSHIYA, E.; ARAKI, K.; MEGURO, H.; MASAKI, H.; KUMANISHI, T.; ARAKAWA, M.; MISHINA, M. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 36-41, 1992.
- Le BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.
- Le BARS, D. Neuronal serotonin. In: OSBORNE, M.N.; HAMON, M. **Serotonin and pain**. Nova Yorque: John Wiley, 1988. p. 171-226..
- LEE, C., RODGERS, R.J. Antinociceptive effects of elevated plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology**, v. 102, p. 507-513, 1992.
- 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.
- LEGENDRE, P. The glycinergic inhibitory synapse. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, p. 760-793, 2001.
- LEGRAIN, V.; GUERIT, J.M.; BRUYER, R.; PLAGHKI, L. Attentional modulation of the nociceptive processing into the human brain: selective spatial attention, probability of stimulus occurrence, and target detection effects on laser evoked potentials. **Pain**, v. 99, p. 21-39, 2002.
- LIGHT, A.R.; KAVOOKJIAN, A.M. Morphology and ultrastructure of physiologically identified substantia gelatinosa (lamina II) neurons with axons that terminate in deeper dorsal horn laminae (III-V). **J. Comp. Neurol.**, v. 267, n. 2, p. 172-189, 1988.

- LIM, R.; HOANG, P.; BERGER, A.J. Blockade of glycine transporter-1 (GLYT-1) potentiates NMDA receptor-mediated synaptic transmission in hypoglossal motoneurons. **J. Neurophysiol.**, v. 92, n. 4, p. 2530-2537, 2004.
- LIN, Q.; PENG, Y. B.; WILLIS, W. D. Role of GABA receptor subtypes in inhibition of primate spinothalamic tract neurons: difference between spinal and periaqueductal gray inhibition. **J. Neurophysiol.**, v. 75, p. 109-123, 1996.
- LIU, H., CHANDLER, S., BEITZ, A.J., SHIPLEY, M.T. BEHBEHANI, M.M. Characterization of the effect of cholecystokinin (CCK) on neurons in the periaqueductal gray of the rat: immunocytochemical and in vivo and in vitro electrophysiological studies. **Brain Res.**, v. 642, p. 83-94, 1994.
- LOESER, J.D. What's to be done? Comments on Grabow et al. **Clin. J. Pain**, v. 19, n. 6, p. 384, 2003.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Pain**, v. 353, n. 8, p. 1607-1609, 1999.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. Protocol of IASP Basic Pain Terminologia. **Pain**, v.137, p.473-477, 2008.
- LUMB, B.M. Inescapable and escapable pain is represented in distinct hypothalamic-midbrain circuits: specific roles for Ad- and C-nociceptors. In: **PHYSIOLOGICAL SOCIETY SYMPOSIUM NOCICEPTORS AS HOMEOSTATIC AFFERENTS: CENTRAL PROCESSING**, 2001, University of Bristol. **The Physiological Society**. England, 2002. v. 87.2, p. 281-286. Disponível em: <ep.physoc.org>. Acesso em: 15 fev. 2009.
- LYNN, B. Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential. **Pain**, v. 41, p. 61-69, 1990.
- LYNN, B. Neurogenic inflammation caused by cutaneous polymodal receptors. **Prog. Brain. Res.**, v. 113, n. 361-368, 1996.
- MAIONE, S.; MARABESE, I.; SCA ROSSI, F.; BERRINO, L.; PALAZZO, E.; TRABACE, L.; ROSSI, F. Effects of persistent nociception on periaqueductal gray glycine release. **Neuroscience**, v. 97, n. 2, p. 311-316, 2000.
- MELZACK, R.; WALL, P.D.; TY, T.C. Acute pain in an emergency clinic: latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. **Pain**, v. 14, p. 33-43, 1982.
- 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, n. 1, p. 289-294, 1994.
- MARINO. J.; GWYNN, M.I.; SPANOS, N.P. Cognitive mediators in the reduction of pain: The role of expectancy, strategy use, and self-presentation. **J. Abnorm. Psychol.**, v. 98, p. 256-262, 1989.

- 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, n.1-2, p. 57-65, 1999.
- MARTINS, Maria Alcina. **EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSO-LATERAL DE RATOS EM MODELO DE DOR SOMÁTICA PROFUNDA**. 2005. 82 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Farmacologia, Departamento de Farmacologia, UFSC, Florianópolis, 2005.
- 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, n. 3-4, p. 118-121, 2008.
- MARTINS, M.A.; DE CASTRO, L.C.; TONUSSI, C.R. Formalin Injection into Knee Joints of Rats: Pharmacologic Characterization of a Deep Somatic Nociceptive Model. *J. Pain*, v. 7, p. 100-107, 2006.
- MASON, P.; GAO, K. Raphe magnus serotonergic neurons tonically modulate nociceptive transmission. *Pain Forum*, v.7, p.143-150.
- MASON, P. Physiological identification of pontomedullary serotonergic neurons in the rat. *J Neurophysiol.*, v. 77, n. 3, p. 1087-1098, 1997.
- MASON, P. Descending pain modulation as a component of homeostasis. In CERVERO, F.; JENSEN, T.S. **Handbook of Clinical Neurology**. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 211-218.
- 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. *Psychopharmacology*, v. 113, p. 565-569, 1994.
- MATTHIES, B.K.; FRANKLIN, K.B. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain*, v. 51, n. 2, p. 199-206, 1992.
- MAYOR, F.; VALDIVIESO, F.; UGARTE, M.; BENAVIDES, J.; GARCIA, M. L.; LAHOYA, J. L.; MAYOR F. J.R. Some aspects of glycine neurochemistry. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, v. 29, p. 551-560, 1981.
- McCOOL, B.A.; CHAPPELL, A. Strychnine and taurine modulation of amygdala-associated anxiety-like behavior is 'state' dependent. *Behav. Brain Res.*, v. 178, n. 1, p. 70-81, 2007.
- McGARAUGHTY, S.; CHU, K.L.; BITNER, R.S.; MARTINO, B.; EL KOUHEN, R.; HAN, P.; NIKKEL,A.L.; BURGARD, E.C.; FALTYNEK, C.R.; JARVIS, M.F. Capsaicin infused into the PAG affects rat tail flick responses to noxious heat and alters neuronal firing in the RVM. *J. Neurophysiol.*, v. 90, n. 4, p. 2702-2710, 2003.

- McMULLAN, S.; LUMB, B.M. Midbrain control of spinal nociception discriminates between responses evoked by myelinated and unmyelinated heat nociceptors in the rat. **Pain**, v.124, p. 59-68, 2007.
- MELZACK, R.; WALL, P.D.; TY, T.C. Acute pain in an emergency clinic: latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. **Pain**, v. 14, p. 33-43, 1982.
- MERSKEY, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. **Pain**, v. 6, p. 249-252, 1979.
- MEYER, D.J. Analgesia produced by electrical stimulation of the brain. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, v. 8, n. 4-6, p. 557-564, 1984.
- MEYER, D.J.; WOLFE, T.L.; AKIL, H.; CARDER, B.; LIEBESKIND, J.C. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. **Science**, v. 174, p. 1351-1354, 1971.
- MEYER, D.P.; PRICE, D.D. Central nervous system mechanisms of analgesia. **Pain**, v. 2, p. 379-404, 1976.
- MIGAUD, M.; ROQUES, B.P.; DURIEUX, C. Effects of cholecystokinin octapeptide and BC 264, a potent and selective CCK-B agonist on aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. **Neuropharmacology**, v. 33, n. 6, p. 737-743, 1994.
- MILLAN, M.J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: Dickenson, A.; Besson, J.M. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer, 1997. p. 385-446.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-164, 1999.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol.**, v.66, n.6, p.355-474, 2002.
- MIN, B. I.; KIM, C. J.; RHEE, J. S.; AKAIKE, N. Modulation of glycine-induced chloride current in acutely dissociated rat periaqueductal gray neurons by mu-opioid agonist, DAGO. **Brain Res.**, v. 734, p. 72-78, 1996.
- 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.
- MORAES, C.L.; BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.*, v.12, n 194 (2), p.181-186, 2008.

- MOORE, R.Y. The anatomy of central serotonin neuron systems in the rat brain. In: JACOB, B. L.; GALPERIN, A. **Serotonin neurotransmission and behavior**. Cambridge: MIT Press, 1981. p. 35-71.
- MORGAN, M.J.; FRANKLIN, K.B. Stimulation-produced analgesia (SPA) from brain-stem and diencephalic sites in the rat: relationships between analgesia, aversion, seizures and catalepsy. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 109-121, 1988.
- MORGAN, M.M.; WHITTIER, K.L.; HEGARTY, D.M.; AICHER, S.A. Periaqueductal gray neurons project to spinally projecting GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. **Pain**, v. 140, n. 2, p. 376-386, 2008.
- MORROW, T.J.; PAULSON, P.E.; DANNEMAN, P.J. CASEY, K.L. Regional changes in forebrain activation during the early and late phase of formalin nociception: analysis using cerebral blood flow in the rat. **Pain**, v. 75, n. 2-3, p. 355-365.
- MOTTA, V.; BRANDÃO, M.L. Aversive and antiaversive effects of morphine in the periaqueductal gray of rats submitted to the elevated plus-maze test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p. 119-125, 1993.
- MOTTA, V.; PENHA, K.; BRANDÃO, M.L. Effects of microinjections of μ and κ receptors agonists in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze. **Psychopharmacology**, v. 120, p. 470-474, 1995.
- NAGY, J.I.; Van Der KOOY, D. Effects of neonatal capsaicin treatment on nociceptive thresholds in the rat. **J Neurosci.**, v. 3, n. 6, p. 1145-1150, 1983.
- NAHUM-LEVY, R.; LIPINSKI, D.; SHAVIT, S.; BENVENISTE, M. Desensitization of NMDA receptor channels is modulate by glutamate agonists. **Biophys. J.**, v. 80, p. 2152-2166, 2001.
- NEUBERT. M.J.; KINCAID, W.; HEINRICHER, M.M. Nociceptive facilitating neurons in the rostral ventromedial medulla. **Pain**, v. 110, n.1-2, p. 158-65, 2004.
- NEUGEBAUER, V.; LI, W.; BIRD, G.C.; HAN, J.S. The amygdala and persistent pain. **Neuroscientist**, v. 10, n. 3, p. 221-234, 2004.
- NICHOLS, D.S.; THORN, B.E.; BERNTSON, G.G. Opiate and serotonergic mechanisms of stimulation-produced analgesia within the periaqueductal gray. **Brain Res. Bull.**, v. 22, n. 4, p. 717-724, 1989.
- NONG, Y.; HUANG, Y.Q.; JU, W.; KALIA, L.V.; AHMADIAN, G.; WANG, Y.T.; SALTER, M.W. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. **Nature**, v. 20, n. 422 (6929), p. 302-307, 2003.
- NOVELLIS, V.; MARABESE, I.; ULIANO, R.; PALAZZO, E.; SCAFURO, A.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Type I and II metabotropic glutamate receptors modulate periaqueductal grey glycine release: interaction between mGlu2/3 and A1 adenosine receptors. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 1061-1069, 2002.

- NUNES-DE-SOUZA, R.L.; CANTO-DE-SOUZA, A.; DA-COSTA, M.; FORNARI, R.V.; GRAEFF, F.G.; PELA, I.R. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. **Psychopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 300-310, 2000.
- OHARA, S.; CRONE, N.E.; WEISS, N.; LENZ, F.A. Attention to a painful cutaneous laser stimulus modulates electrocorticographic event-related desynchronization in humans. **Clin. Neurophysiol.**, v. 115, p. 1641-1652, 2004.
- OHARA, S.; CRONE, N.E.; WEISS, N.; VOGEL, H.; TREEDE, R.D.; LENZ, F.A. Attention to pain is processed at multiple cortical sites in man. **Exp. Brain Res.**, v. 156, p. 513-517, 2004.
- OLIVA, P.; BERRINO, L.; DE NOVELLIS, V.; PALAZZO, E.; MARABESE, I.; SINISCALCO, D.; SCAFURO, M.; MARIANI, L.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Role of periaqueductal grey prostaglandin receptors in formalin-induced hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 13, n. 530 (1-2), p. 40-47, 2006.
- OLIVEIRA, M.A.; PRADO, W.A. Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats. **Brain Res. Bull.**, v. 54, n. 1, p. 55-63, 2001.
- ONAKA, M.; MINAMI, T.; NISHIHARA, I.; ITO, S. Involvement of glutamate receptors in strychnine- and bicuculine-induced allodynia in conscious mice. **Anesthesiology**, v. 84, p. 1215-1222, 1996.
- OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; KING, T.; VANDERAH, T.W.; PORRECA, F. Underlying mechanisms of pronociceptive consequences of prolonged morphine exposure. **Biopolymers**, v. 80, n. 2-3, p. 319-324, 2005.
- OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; PORRECA, F. Mechanisms of experimental neuropathic pain: integration from animal models. In: WALL AND MELZACK'S **Textbook of Pain**. Stephen B. McMahon, Martin Koltenburg 5th, China: Elsevier Location, 2006, p. 929-946.
- PALAOĞLU, O.; AYHAN, I.H. The possible role of benzodiazepine receptors in morphine analgesia. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 25, n. 1, p. 215-217, 1986.
- PANG, C.S.; TSANG, S.F.; YANG, J.C. Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice. **Life Sci.**, v. 68, n. 8, p. 943-951, 2001.
- PARADA, C.A.; VIVANCOS, G.G.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 5, p. 2923-2928, 2003.
- 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.

- PAVLOVIC, Z.W.; COOPER, M.L.; BODNAR, R.J. Opioid antagonists in the periaqueductal gray inhibit morphine and beta-endorphin analgesia elicited from the amygdala of rats. **Brain Res.**, v. 741, n. 1-2, p. 13-26, 1996.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods** , v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.
- PENG, Y.B.; LIN, Q.; WILLIS, W.D. The role of 5-HT₃ receptors in periaqueductal gray-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 276, n. 1, p. 116-24, 1996.
- 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. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 278, n. 1, p. 125-35, 1996.
- PERTOVAARA, A. Plasticity in descending pain modulatory systems. **Prog. Brain Res.**, v. 129, p. 231-242, 2000.
- PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Prog. Neurobiol.**, v. 80, p. 53-83, 2006.
- 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.
- PEYRON, R.; GARCIA-LARREA, L.; GREGOIRE, M.C.; COSTES, N.; CONVERS, P.; LAVENNE, F.; MAUGUIERE, F.; MICHEL, D.; LAURENT, B. Haemodynamic brain responses to acute pain in humans: sensory and attentional networks. **Brain**, v. 122, p. 1765-1780, 1999.
- PLOGHAUS, A.; BECERRA, L.; BORRAS, C.; BORSOOK, D. Neural circuitry underlying pain modulation: expectation, hypnosis, placebo. **Trends Cogn. Sci.**, v. 7, p. 197-200, 2003.
- PLOGHAUS, A.; NARAIN, C.; BECKMANN, C.F.; CLARE, S.; BANTICK, S.; WISE, R.; MATTHEWS, P.M.; RAWLINS, J.N.; TRACEY, I. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. **J. Neurosci.**, v. 21, p. 9896-9903, 2001.
- PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci.**, v. 25, p. 319-325, 2002.
- POTREBIC, S.B.; FIELDS, H.L.; MASON, P. Serotonin immunoreactivity is contained in one physiological cell class in the rat rostral ventromedial medulla. **J. Neurosci.**, v. 14, n. 3 (Pt 2), p. 1655-1665, 1994.

- POURCHO, R. G.; GOEBEL D. J.; JOJICH, L.; HAZLETT, J. C. Immunocytochemical evidence for the involvement of glycine in sensory centers of the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, p. 643-656, 1992.
- PRICE, D.D.; BARBER, J. An analysis of factors that contribute to the efficacy of hypnotic analgesia. **J. Abnorm. Psychol.**, v. 96, p. 46-51, 1987.
- PRICE, D.D.; Von der GRUEN, A.; MILLER, J.; RAFII, A.; PRICE, C. A psychophysical analysis of morphine analgesia. **Pain**, v. 22, p. 261-269, 1985.
- PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R.J. N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 9673-9676, 2004.
- PRIESTLEY, T.; LAUGHTON, P.; MEYERS, J.; LE BOURDELLES, B.; KERBY, J.; WHITING, P.H. 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.
- QUINTERO, L.; MORENA, M.; AVILA, C.; ARCAYA, J.; MAIXNER, W.; SUAREZ-ROCA, H. Long lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 67, n. 3, p. 449-458, 2000.
- RAIJ, T.T.; NUMMINEN, J.; NARVANEN, S.; HILTUNEN, J.; HARI, R. Brain correlates of subjective reality of physically and psychologically induced pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, p. 2147-2151, 2005.
- RAJA, S; MEYER, R.A.; RINCKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanism of nociception. In: WALL AND MELZACK'S **Textbook of Pain**. Stephen B. McMahon, Martin Koltenburg 5th, China: Elsevier Location, 2006, p. 929-946.
- RAMÍREZ, F.; VANEGAS, H. Tooth pulp stimulation advances both medullary off-cell pause and tail flick. **Neurosci. Lett.**, v. 22, n. 100 (1-3), p. 153-156, 1989.
- RANCK, J.B.Jr. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. **Brain Res.**, v. 98, n. 3, p. 417-440, 1975.
- REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v. 100, p. 1-6, 2002.
- REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, 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, n. 1, p. 65-75, 2000.

- RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z. Rheumatol.**, v. 60, n. 6, p. 404-415, 2001.
- RIZVI, T.A.; ENNIS, M.; BEHBEHANI, M.M.; SHIPLEY, M.T. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **J Comp Neurol.**, v. 303, n. 1, p. 121-131, 1991.
- RODGERS, R.J., LEE, C., SHEPHERD, J.K. Effects of diazepam on behavioral and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. **Psychopharmacology**, v. 106, p. 102-110, 1992.
- RODGERS, R.J., RANDALL, J.I. Benzodiazepines ligands, nociception and "defeat" analgesia in male mice. **Psychopharmacology**, v. 91, p. 305-315, 1987.
- RODGERS, R.J., SHEPHERD, J.K. 5-HT_{1A} agonist, 8-hydroxy-2-(DI-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT), inhibits non-opioid analgesia in defeated mice: influence of route of administration. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 163-165, 1989.
- RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu. Rev. Med.**, v. 49, p. 123-133, 1998.
- RYAN, S.M.; WATKINS, L.R.; MAYER, D.J.; MAIER, S.F. Spinal pain suppression mechanisms may differ for phasic and tonic pain. **Brain Res.**, v. 13, n. 334 (1), p. 172-175, 1985.
- 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 superior colliculus of rats. **Neuropharmacology**, v. 51, p. 203-212, 2006.
- 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.
- SHANNON, H.J., LUTZ, E.A. Yohimbine produces antinociception in the formalin test in rats: involvement of serotonin (1A) receptors. **Psychopharmacology**, v. 149, p. 93-97, 2000.
- SHERMAN, E.; LUO, L.; DOSTROVSKY, J. O. Spinal strychnine alters response properties of nociceptive-specific neurons in rat medial thalamus. **J. Neurophysiol.**, v. 78, p. 628-637, 1997.
- SHERRINGTON, C.S. **The integrative action of the nervous system**. New York: Scribner, 1906.

- SHIN, M.C.; JANG, M.H.; CHANG, H.K.; KIM, Y.J.; KIM, E.H.; KIM, C.J. Modulation of cyclooxygenase-2 on glycine- and glutamate-induced ion currents in rat periaqueductal gray neurons. **Brain Res. Bull.**, v. 59, n. 4, p. 251-256, 2003.
- SIEGFRIED, B.; DE SOUZA, R.L. NMDA receptor blockade in the periaqueductal grey prevents stress-induced analgesia in attacked mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.13, n. 168 (2), p. 239-242, 1989.
- 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.
- SKØTT, O. Pain: new insights, new treatments? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 285, n. 1, p. R30-1, 2003.
- SUMAN, P.; GUPTA, S.; TANDON, O. P.; SHARMA, K. K. Study of central gray NMDA receptors in nociceptive behavior in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 22, p. 1394-1410, 1998.
- 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, p. 613-617, 2004.
- TATSUO, M.A.; SALGADO, J.V.; YOKORO, C.M.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. Midazolam-induced hyperalgesia in rats: modulation via GABA(A) receptors at supraspinal level. **Eur. J. Pharmacol.**, v.1, n. 370 (1), p. 9-15, 1999.
- TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A.; BASBAUM, A.I. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 7575-7584, 1995.
- TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A.; RODERICK, R.E.; TATE, J.; GREEN, P.G.; LEVINE, J.O.; BASBAUM, A.I. Opioid inhibition of formalin-induced changes in plasma extravasation and local blood flow in rats. **Pain**, v. 84, p. 263-270, 2000.
- TEIXEIRA, K.V.; CAROBREZ, A.P.; Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hidroxy-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.
- TERSNER, S.A.; HELMSTETTER, F.J. Antinociception produced by mu opioid receptor activation in the amygdala is partly dependent on activation of mu opioid and neurotensin receptors in the ventral periaqueductal gray. **Brain Res.**, v. 865, p. 17-26, 2000.
- TESKEY, G.C.; KAVALIERS, M., HIRST, M. Social conflict activates opioid analgesic and ingestive behaviors in male mice. **Life Sci.**, v. 35, p. 303-315, 1984.

- THORN, B.E.; APPLGATE, L.; JOHNSON, S.W. Ability of periaqueductal gray subdivisions and adjacent loci to elicit analgesia and ability of naloxone to reverse analgesia. **Behav. Neurosci.**, v. 103, n. 6, p. 1335-1339, 1989.
- TILLU, D.V.; GEBHART, G.F.; SLUKA, K.A. Descending facilitatory pathways from the RVM initiate and maintain bilateral hyperalgesia after muscle insult. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 331-339, 2008.
- TJOLSEN, 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.
- TODD, A.J.; WATT, C.; SPIKE, R.C.; SIEGHART, W. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. **J. Neurosci.**, v. 16, n. 3, p. 974-982, 1996.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Rat knee-join carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 421-427, 1992.
- TORTORICI, V.; MORGAN, M.M. Comparison of morphine and kainic acid microinjections into identical PAG sites on the activity of RVM neurons. **J. Neurophysiol.**, v. 88, n. 4, p. 1707-1715, 2002.
- TRACEY, I.; DUNCKLEY, P. Importance of anti- and pro-nociceptive mechanisms in human disease. **Gut**, v. 53, n. 11, p. 1553-1555, 2004.
- TRACEY, I.; LANNETTI, G.D. Brainstem functional imaging in humans. **Suppl. Clin. Neurophysiol.**, v. 58, p. 52-67, 2006.
- TRACEY, I.; MANTYH, P, W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v.55, p.377-390, 2007.
- TRACEY, T.; 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.
- TREEDE, R.D.; KENSHALO, D.R.; GRACELY, R.H.; JONES, A.K.P. The cortical representation of pain. **Pain**, v. 79, p.105-111, 1999.
- TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; RAJA, S.N.; CAMPBELL, J.N. Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. **J. Physiol.**, v. 483 (Pt 3), p. 747-758, 1995.
- TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Anxiolytic properties of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid, a ligand at strychnine-insensitive glycine receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 34, n. 2, p. 313-316, 1989.
- URBAN, M.O.; GEBHART, G.F. Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. **J. Neurophysiol.**, v. 78, p. 1550-1562, 1997.

- URBAN, M.O.; GEBHART, G.F. Supraspinal contributions to hyperalgesia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 7687-7692, 1999.
- URBAN, M.O.; SMITH, D.J. Role of neurotensin in the nucleus raphe magnus in opioid-induced antinociception from the periaqueductal gray. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 265, n. 2, p. 580-586, 1993.
- URBAN, M.O.; SMITH, D.J.; GEBHART, G.F. Involvement of spinal cholecystokinin B receptors in mediating neurotensin hyperalgesia from the medullary nucleus raphe magnus in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 278, p. 90-96, 1996.
- VACCARINO, A.L.; CLEMMONS, H.R.; MADER JR. G.J.; MAGNUSSON, J.E. A role of periaqueductal grey NMDA receptors in mediating formalin-induced pain in the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 236, p.117-119, 1997.
- 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.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res. Rev.**, v. 46, p. 295-309, 2004.
- VAN PRAAG, H.; FRENK, H. The development of stimulation-produced analgesia (SPA) in the rat. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v.17, n. 64 (1-2), p. 71-76, 1991.
- VAUGHAN, C.W.; CHRISTIE, M.J. Presynaptic inhibitory of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. **J. Physiol.**, v.15, n. 498 (2), p. 463-472, 1997.
- VAUGHAN, C. W.; INGRAM, S.L.; CONNOR, M.A.; CHRISTIE, M.J. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. **Nature**, v. 390, p. 611-611, 1997.
- VENDRUSCOLO, L.F.; PAMPLONA, F.A.; TAKAHASHI, R.N. Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. **Brain Res.**, v. 1030, n. 2, p. 277-283, 2004.
- VIDAL, C.; JACOB, J.J. Stress hyperalgesia in rats: an experimental animal model of anxiogenic hyperalgesia in human. **Life Sci.**, v. 31, p. 1241-1244, 1982.
- WALKER, J.M.; HUANG, S.M.; STRANGMAN, N.M.; TSOU, K.; SAÑUDO-PEÑA, M.C. Pain modulation by release of endogenous cannabinoid anandamide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, n. 21, p. 12198-12203, 1998.
- WALTKINS, L.R.; MAIER, S.F GOEHLER, L.E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness response and pathological pain states. **Pain**, v. 63, p. 289-302.

- WATERS, A.J.; LUMB, B.M. Descending control of spinal nociception from the periaqueductal grey distinguishes between neurons with and without C-fiber inputs. **Pain**, v. 134, n. 1-2, p. 32-40, 2008.
- WESTLUND, K.N.; BOWKER, R.M.; ZIEGLER, M.G.; COULTER, J.D. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. **Brain Res.**, v. 263, p. 15-31, 1983.
- WESTLUND, K.N.; SORKIN, L.S.; FERRINGTON, D.G.; CARLTON, S.M.; WILLCOCKSON, H.H.; WILLIS, W.D. Serotonergic and noradrenergic projections to the ventral posterolateral nucleus of the monkey thalamus. **J. Comp. Neurol.**, v. 295, n. 2, p. 197-207, 1990.
- WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 35-41, 1991.
- WHITE, W.F. The glycine receptor in the mutant mouse spastic (spa): strychnine binding characteristics and pharmacology. **Brain Res.**, v. 329, n. 1-2, p. 1-6, 1985.
- WILLIS, W.D. COGGESHALL, R.E. Sensory mechanisms of spinal cord. 2nd Nova Yorque: Plenum Press, 1991.
- XU, M.; KIM, C.J.; NEUBERT, M.J.; HEINRICHER, M.M. NMDA receptor-mediated activation of medullary pro-nociceptive neurons is required for secondary thermal hyperalgesia. **Pain**, v. 127, p. 253-262, 2007.
- YAKSH, T.L. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: WALL AND MELZACK'S **Textbook of Pain**. Stephen B. McMahon, Martin Koltenburg 5th, China: Elsevier Location, 2006, p. 929-946.
- YANG, Y.M.; CHUNG, J.M.; RHIM, H. Cellular action of cholecystokinin-8S-mediated excitatory effects in the rat periaqueductal gray. **Life Sci.**, v. 79, n. 18, p. 1702-1711, 2006.
- YEOMANS, D.C.; PROUDFIT, H.K. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. **Pain**, v. 68, n. 1, p. 141-150, 1996.
- YEUNG, J.C.; YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Concurrent mapping of brain sites for sensitivity to the direct application of morphine and focal electrical stimulation in the production of antinociception in the rat. **Pain**, v. 4, n. 1, p. 23-40, 1977.
- YOUNG, R.F.; BRECHNER, T. Electrical stimulation of the brain for relief of intractable pain due to cancer. **Cancer**, v.15, n. 57 (6), p. 1266-1272, 1986.
- ZAMBOTTI, F.; ZONTA, N.; TAMMISO, R.; CONCI, F.; HAFNER, B.; ZECCA, L.; FERRARIO, P.; MANTEGAZZA, P. Effects of diazepam on nociception in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 344, n. 1, p. 84-89, 1991.

- ZHANG, L.H.; GONG, N.; FEI, D.; XU, L.; XU, T.L. Glycine uptake regulates hippocampal network activity via glycine receptor-mediated tonic inhibition. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 3, p. 701-711, 2008.
- ZHUO, M.; GEBHART, G.F. Spinal cholinergic and monoaminergic receptors mediate descending inhibition from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. **Brain Res.**, v. 535, p. 67-78, 1990.
- ZHUO, M.; GEBHART, G.F. Characterization of descending facilitation and inhibition of spinal nociceptive transmission from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. **J. Neurophysiol.**, v. 67, p. 1599-1614, 1992.
- ZHUO, M.; GEBHART, G.F. Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. **J. Neurophysiol.**, v.78, p. 746-758, 1997.

APÊNDICE A – Subunidades e mecanismo de ação dos receptores NMDA

Os receptores NMDA são complexos tetraméricos formados pela combinação de duas subunidades (KEMP e MCKERNAN, 2002; PRYBYLOWSKI e WENTHOLD, 2004). Foram clonadas três famílias de subunidades, designadas, NR1, NR2, e NR3 (CULL-CANDY et al., 2001). A maioria dos receptores funcionais no SNC dos mamíferos é formada pela combinação das subunidades NR1 e NR2, contendo os sítios de reconhecimento para o co-agonista glicina e para o glutamato, respectivamente. Estudos eletrofisiológicos mostraram a seguinte classificação para as afinidades relativas da glicina para o sítio GLI_B : NR1/NR2D > NR1/NR2C > NR1/NR2B > NR1/NR2A (KUTSUWADA et al., 1992; PRIESTLEY et al., 1995; NAHUN-LEVY et al., 2001). Durante o potencial de repouso da membrana o canal do receptor encontra-se bloqueado pelo Mg^{2+} ; a despolarização remove este bloqueio e permite o influxo de íons (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) quando o canal liga-se ao glutamato e ao co-agonista. Prótons e poliaminas (espermina e espermidina) ligam-se ao domínio N-terminal para aumentar a permeabilidade do complexo receptor aos cátions. Além disso, a maioria dos receptores NMDA é inibida pelo Zn^{2+} de maneira dependente de voltagem e é influenciada pelo estado de oxi-redução da subunidade NR1.

APÊNDICE B – Subunidades e mecanismo de ação dos receptores GLI_A

Os receptores inibitórios da glicina (GLI_A) pertencem a superfamília dos receptores de canais de natureza pentamérica composto por 4 subunidades α e 1 β . Nos neurônios de vertebrados, estes receptores são competitivamente inibidos por baixas concentrações (nanomolar) de estriçnina e potencializados por baixas concentrações de etanol e zinco. As ações inibitórias da glicina resultam de um aumento na condutância do íon cloreto pelo receptor GLI_A, causando hiperpolarização da membrana neuronal (para revisão, ver Legendre, 2001).

ANEXO A – Artigo publicado ou em edição

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.**, 83:118-121, 2008.

MARTINS, M.A.; DE CASTRO L.C.; TONUSSI, C.R. Opposite effects of the GLY_B/NMDA activation in the dorsal PAG on two models of persistent nociception (Manuscrito em fase de edição).