

MARIA ALCINA MARTINS

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSO-LATERAL DE RATOS
EM MODELO DE DOR SOMÁTICA PROFUNDA**

Florianópolis, SC

2005

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

**EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE GLICINA NA SUBSTÂNCIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSO-LATERAL DE RATOS
EM MODELO DE DOR SOMÁTICA PROFUNDA**

MARIA ALCINA MARTINS

Dissertação 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 mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Florianópolis, SC

2005

***Os ideais que iluminaram o meu
caminho e que inúmeras vezes me
deram novo alento para enfrentar
com ânimo a vida, tem sido a
generosidade, a beleza e a verdade.
Albert Eistein***

***Á minha mãe,
pois sem ela eu não teria conseguido***

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Carlos Rogério Tonussi pela valiosa orientação, paciência e amizade.

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez pela dedicada co-orientação.

Aos professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia, pela compreensão e contribuição à minha formação científica.

Aos funcionários e amigos da Coordenadoria Especial de Farmacologia, em especial ao Pedro, que sempre foi mais que um.

As colegas de laboratório, Elisângela, Lúcia e Sara, pela paciência e ajuda.

Aos colegas do curso, em especial à Claudinha e ao Leandro, pela colaboração e amizade.

Minha gratidão a minha família, em especial aos meus pais e a minha avó, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me.

Ao Alécio, que mais que namorado foi um incansável companheiro.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra, ajudaram na realização de mais essa etapa da minha carreira profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1.INTRODUÇÃO	01
1.1 Dor	01
1.1.1 Classificação da dor.....	01
1.1.2 Nociceção.....	02
1.1.2.1 Nociceptores e fibras aferentes primárias.....	02
1.1.2.2 Corno dorsal da medula espinhal e fibras aferentes secundárias.....	04
1.1.2.3 Vias Descendentes.....	05
1.1.2.4 Modulação do processo nociceptivo.....	06
1.2 Substância Cinzenta Periaquedutal	07
1.2.1 Conexões da SCP.....	08
1.2.2 Funções da SCP.....	10
1.2.3 Farmacologia da antinociceção mediada pela SCP.....	11
1.2.3.1 Opióides.....	11
1.2.3.2 Aminoácidos Excitatórios.....	12
1.2.3.3 Glicina.....	13
1.3 Dor e Humor	15
2 HIPÓTESE	16
3.OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Animais.....	18

4.2 Cirurgia Estereotáxica.....	18
4.3 Cânulas.....	20
4.4 Microinjeção Intra-SCP.....	20
4.5 Testes Nociceptivos.....	21
4.5.1 Incapacitação articular induzida por formalina.....	21
4.5.2 <i>Tail Flick</i>	22
4.6 Protocolo Experimental.....	22
4.7 Confirmação do sítio da microinjeção.....	24
4.8 Drogas e Soluções.....	26
4.9 Análise Estatística.....	26
5 RESULTADOS	28
5.1 Efeito antinociceptivo da morfina e do diclofenaco no modelo de incapacitação articular.....	28
5.2 Efeito do midazolam e do pentilenotetrazol no modelo de incapacitação articular.....	32
5.3 Efeitos dos compostos glicinérgicos microinjetados na SCPdl no modelo de incapacitação articular	34
5.4 Efeitos dos compostos glicinérgicos microinjetados na SCPdl no teste do <i>tail flick</i>	42
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
ATP	Adenosina trifosfato
BZD	Benzodiazepínico
7-CLKYN	Ácido 7-Cloroquirênico
COXs	Cicloxigenases
CGRP	Peptídeo relacionado ao gen de calcitonina
<i>IASP</i>	<i>International Association of the Study of Pain</i>
DIC	Diclofenaco
DLF	Funículo dorso-lateral
DLPT	Região dorso-lateral da ponte
GABA	Ácido gama amino-butírico
Gli	Glicina
GNDF	Fator neurotrófico derivado das células gliais
GRD	Gânglio da raiz dorsal
LA	Líquor Artificial
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MDZ	Midazolam
MOR	Morfina
NGF	Fator de crescimento do nervo
NMDA	n-metil-D-aspartato
NN	Neurônio não nociceptivo
NO	Óxido Nítrico
NO/GMPc	Via óxido nítrico / monofosfato de guanisina cíclico
NS	Neurônio nociceptivo específico
NRM	Núcleo magno da Rafe
Nx	Naloxona
PAG	<i>Periaqueductal gray matter</i>
PAGdl	<i>Periaqueductal gray matter dorso-lateral</i>

LISTA DE ABREVIATURAS (continuação)

PET	<i>Paw elevation time</i>
PGs	Prostaglandinas
PTZ	Pentilenotetrazol
RVM	Porção rostral ventro-medial do Bulbo
r.p.m	Rotações por minuto
SAL	Salina
SCP	Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPdl	Região dorso-lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal
SCPvl	Região ventro-lateral da Substância Cinzenta Periaquedutal
TEP	Tempo de elevação da pata
Trka	Receptor tirosina quinase A
TRC	Tempo de retirada da cauda
WDR	Neurônio de espectro dinâmico e amplo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama da maior via modulatória da dor com as principais ligações na substância cinzenta periaquedutal e na região ventro-medial do bulbo.....	09
Figura 2. Efeito antinociceptivo da morfina no modelo de incapacitação articular.....	30
Figura 3. Efeito antinociceptivo do diclofenaco no modelo de incapacitação articular.....	31
Figura 4. Efeito do midazolam e do pentilenotetrazol no modelo de incapacitação articular.....	33
Figura 5. Cortes coronais do mesencéfalo de rato.....	36
Figura 6. Efeito antinociceptivo da microinjeção de glicina na SCPdl no modelo de incapacitação articular induzida por formalina	37
Figura 7. Efeito antinociceptivo da microinjeção de glicina na SCPvl no modelo de incapacitação articular induzida por formalina.....	38
Figura 8. Efeito das microinjeções de glicina na SCPdm e no colículo superior no modelo de incapacitação articular induzida por formalina.....	39
Figura 9. Bloqueio da antinocicepção da glicina pelo 7-cloroquinurênico microinjetados na SCPdl, no modelo de incapacitação articular induzida por formalina.....	40
Figura10. Naloxona bloqueia o efeito antinociceptivo da glicina microinjetada na SCPdl no modelo de incapacitação articular induzida por formalina.....	41
Figura 11. Naloxona potencializa o efeito antinociceptivo da microinjeção de glicina na SCPdl de ratos submetidos ao teste do <i>tail flick</i>	43
Figura 12. Efeito das microinjeções de glicina no colículo superior e no aqueduto de Sylvius em ratos submetidos ao teste do <i>tail flick</i>	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais conexões entre diversas estruturas do sistema nervoso central e as regiões dorsolateral e ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal.....	09
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Coordenadas de microinjeção para a SCPdl.....	19
--	----

RESUMO

A substância cinzenta periaquedutal (SCP), além de ser um importante sítio para o processamento do medo e da ansiedade, é o principal componente do sistema descendente inibitório da dor. A SCP pode ser dividida em quatro colunas longitudinais ao longo do seu eixo rostro-caudal, que são elas: dorso-lateral, dorso-medial, lateral e ventro-lateral. A ativação em muitas espécies da região dorsal da SCP através de estímulos elétricos ou químicos provoca reações aversivas e antinocicepção. O objetivo geral desse estudo foi avaliar o efeito da estimulação com glicina da região dorso-lateral da SCP (SCPdl) num teste de nocicepção profunda, o modelo de incapacitação articular induzida por formalina. A incapacitação articular foi provocada pela formalina (5 %, 50 μ l) aplicada no joelho direito de ratos machos Wistar (250-350 g). O modelo consiste basicamente de um cilindro rotatório (sobre o qual os animais são colocados a caminhar) e um computador, o qual auxilia no registro do tempo total em que pata estudada se eleva durante um período de 60 s (tempo de elevação da pata: TEP). Registrou-se o TEP a cada 5 min durante um período de teste de 60 min. A injeção intra-articular da solução de formalina induziu duas fases de respostas nocifensivas: as fases 1 (0-5 min) e 2 (10-45 min), separadas por um período de deambulação praticamente normal (fase quiescente, 5-10 min). As fases 1 e 2 foram inibidas pela morfina (4,0 mg / kg, s.c.), agonista opióide, enquanto o diclofenaco (5,0 mg / kg, i.p.), inibidor das cicloxigenases, inibiu apenas a fase 2 da resposta nocifensiva. O midazolam (0,25 e 1,0 mg / kg, i.p.), agonista benzodiazepínico, inibiu a fase 2 da resposta com a menor dose, porém não teve efeito na dose maior. Contudo, a maior dose de midazolam e o pentilenotetrazol (30,0 mg / kg), antagonista GABAérgico, demonstraram tendência em inibir a fase de quiescência. A injeção intra-SCPdl de glicina (100 nmoles / sítio), agonista Gli-B/NMDA, 5 min antes da formalina, inibiu a incapacitação. Efeito que foi totalmente revertido pelo ácido 7-cloroquinurênico (10 nmoles / sítio), antagonista Gli-B/NMDA, e parcialmente pela naloxona (1,0 mg / kg, s.c., 50 min antes), antagonista opióide. No teste de retirada da cauda por estímulo térmico (*tail-flick*) a injeção de glicina na SCPdl aumentou a latência para retirada da cauda, porém este efeito não foi revertido pela naloxona. Nossos resultados mostraram

que o modelo de incapacitação articular induzida por formalina, apesar de responder aos analgésicos clássicos como outros modelos de dor cutânea, difere destes por demonstrar potente efeito antinociceptivo para a droga ansiolítica e um aparente efeito hiperalgésico para a droga ansiogênica. Além disso, foi demonstrado que circuitos antinociceptivos ativados pela injeção de glicina na SCPdl podem ser mediado por vias opióides se a estimulação nociceptiva tiver origem em tecido somático profundo.

ABSTRACT

The periaqueductal gray (PAG), besides to be an important site for processing of fear and anxiety, is the major component of a descending pain inhibitory system. The PAG can be subdivided in four longitudinal columns along the rostrocaudal axis and the subdivision are dorsolateral, dorsomedial, lateral e ventrolateral. In different animal species, the activation of dorsal portion of PAG, by electrical or chemical stimuli, elicits aversives reactions and antinociception. Our study has as a general objective to evaluate the effect of glycine microinjection into the dorsolateral portion of the PAG (PAGdl) in a deep-somatic nociception model, the knee-joint incapacitation test induced by formalin. The joint incapacitation was induced by formalin injection (5 %, 50 μ l) into right knee of the male Wistar rats (250-350 g). The model consists basically a revolving cylinder on which the animals are placed to walk for 1 min periods each 5 min intervals after formalin injection, and a computer-assisted device registrates the total time that the specific hind paw loses the contact with the surface of the cylinder (i.e: paw elevation time; PET). The injection of formalin into one knee-joint of rats induced two phases of the nocifensive responses characterized by a guarding behavior of the affected limb: phases 1 (0-5min) and 2 (10-45 min). Both phases were interposed by period of almost normal gait (quiescent phase, 5-10 min). The phases 1 and 2 were inhibited by morphine (4.0 mg / kg, s.c.) an opioid agonist, while diclofenaco (5.0 mg / kg, i.p.) a cyclooxygenase inhibitor, inhibited only phase 2 of the nocifensive response. Midazolam (0.25 and 1.0 mg / kg, i.p.) benzodiazepine agonist, inhibited the phase 2 of the response at lower dose but it did not have effect at higher dose. For other hand, midazolam at higher dose and pentylenetetrazol (30,0 mg / kg, i.p.) a GABA antagonist, tended to enhance incapacitation in the quiescent period. The injection Intra-PAGdl (100 nmol / site) of glycine, a Gli-B/NMDA agonist, 5 min before formalin inhibited the incapacitation. This effect was totally antagonized by 7-clorokynurenic acid (10 nmol / site) a Gli-B/NMDA antagonist, and partially by naloxone (1.0 mg / kg, s.c, 50 min. before) an opioid antagonist. In the tail flick test, the PAGdl glycine injection increased the latency of the test, however this effect was not reversed by naloxone. Our results have shown that despite responding to the classical analgesics as other cutaneous pain

models, the knee-joint incapacitation test induced by formalin differs of these by demonstrating an intense antinociceptive effect for the anxiolytic drug and an apparent hyperalgesic effect for the anxiogenic drug. It was demonstrated that the antinociceptive circuits activated by the PAGdl glycine injection can be mediated through opioid pathway if the nociceptive stimulation originates in a deep somatic tissue.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

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

A nocicepção é um termo neurofisiológico que se refere aos mecanismos neurológicos através dos quais se detecta um estímulo lesivo. Dor e nocicepção não são termos sinônimos, uma vez que a dor é um estado subjetivo. Assim, quando ativadas as vias nociceptivas que originarão a dor, outros fatores, tais como: os sistemas endógenos de analgesia, o contexto no qual se produz a nocicepção e o estado afetivo prévio do indivíduo, influenciam poderosamente na forma de sentir dor.

1.1.1 Classificação de dor

Apesar de freqüentemente utilizada, a palavra dor não tem definição ideal, sendo que a proposta pela IASP (*International Association of the Study of Pain*) é a que melhor se aproxima. Essa associação descreve a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada com uma lesão real ou potencial, ou descrita nestes termos” (Merskey, 1979).

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. Na transitória, a ativação dos receptores da dor acontece na ausência de qualquer dano tecidual. A dor aguda, por sua vez, é uma resposta normal causada por uma lesão do tecido com conseqüente ativação dos receptores no local da lesão, sendo

que essa dor desaparece, até mesmo antes da restabilização fisiológica do local lesionado. Ao contrário das anteriores, a dor crônica é provocada por uma lesão ou doença que geralmente supera a capacidade de recuperação do organismo (Loeser e Melzack, 1999).

No que tange o conceito de localização, a dor pode ser classificada em **somática** ou **visceral** dependendo da fonte emissora da dor. A dor somática ocorre quando os estímulos que vão produzir a sensação de dor provêm da periferia do corpo. De acordo com a estrutura envolvida na lesão pode ser dividida em **superficial cutânea** (pele e tecido conjuntivo) e **profunda** (ossos, articulações e músculos). A dor visceral, por sua vez, ocorre quando os estímulos que vão produzir a sensação de dor provêm de vísceras (para revisão, ver Raja *et al.*, 1999).

1.1.2 Nocicepção

A dor, como a visão, a audição e o tato, é uma sensação específica, com estruturas específicas identificadas. O complexo processo da dor conta com a participação de nociceptores bem como suas fibras nervosas aferentes associadas, com o corno dorsal da medula espinhal, com as vias ascendentes e descendentes, com a formação reticular no mesencéfalo e no bulbo, com o tálamo, sistema límbico e córtex cerebral.

1.1.2.1 Nociceptores e suas fibras aferentes primárias

Sherrington (1906) propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário que é ativado por um estímulo capaz de causar lesão tecidual. De acordo com esta proposta, os nociceptores apresentam características de limiar ou sensibilidade as quais os distinguem daquelas outras fibras nervosas sensoriais.

Os nociceptores são terminações nervosas livres de fibras que inervam as

regiões da cabeça e do corpo e cujos corpos celulares localizam-se no trigêmio e no gânglio da raiz dorsal, respectivamente, e podem ser categorizados em três principais grupos com base em seus diâmetros, estruturas e velocidades de condução (Julius e Basbaum, 2001). As **fibras C** , que por serem amielinizadas além de serem as mais finas (0,4-1,2 μm de diâmetro), são as de condução mais lenta (0,5-2,0 m/s), as **fibras A δ** , mielinizadas (2-6 μm) e de velocidade intermediária (12-30 m/s) e as fibras mielinizadas de largo calibre e rápida condução, as **fibras A β** (10 μm , 100 m/s). A maioria das fibras C é chamada de polimodal devido a sua habilidade de responder a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. No entanto, sua ativação depende das substâncias químicas liberadas como resultado da lesão tecidual (Davis *et al.*, 1993) Os nociceptores polimodais podem ser divididos em dois grupos: 1) os que sintetizam peptídeos como substância P e o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) e expressam o receptor tirosina quinase A (trkA) de alta afinidade para o fator de crescimento do nervo (NGF); 2) os que expressam receptores para as purinas ($\text{P}_{2\text{x}3}$), sítio de ligação para lecitina IB_4 , e os receptores para o fator neurotrófico derivado das células gliais (GDNF) (Hunt e Mantyh, 2001). 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 β , numa proporção substancial nos aferentes sensoriais da pele, músculos, articulações e tendões, geralmente são unimodais e respondem tanto aos estímulos de baixo (Julius e Basbaum, 2001), quanto aos de alto limiar (Djouhri e Lawson, 2004).

Os potenciais de ação dos nociceptores 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, provocando a liberação dos neurotransmissores e neuromoduladores nociceptivos. Os transmissores são aquelas moléculas cuja atuação sobre seus respectivos receptores, promovem a ativação dos neurônios de projeção da medula espinhal. Estes incluem os aminoácidos excitatórios como o glutamato e os neuropeptídeos como a substância P. Como exemplos de moduladores dos aferentes primários, estão o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), adenosina trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas, neurotrofinas, várias enzimas, muitas lecitinas e uma miscelânea de outras moléculas (para revisão, ver Millan, 1999

1.1.2.2 Corno dorsal da medula espinhal e fibras aferentes secundárias

A substância cinzenta da medula espinhal pode ser dividida citoarquiteticamente em 10 lâminas. As lâminas I-VI no corno dorsal, VII-IX no corno ventral e a lâmina X ao redor do canal central da medula espinhal (Rexed, 1952). As fibras nociceptivas cutâneas C e A δ projetam-se principalmente para a lâmina I, bem como, em menor intensidade para a lâmina II. As fibras amielinizadas nociceptivas aferentes de vísceras, articulações e tendões terminam primariamente nas lâminas I e V/VI. As fibras aferentes primárias no corno dorsal realizam a primeira sinapse e ativam as fibras aferentes secundárias, também denominadas de neurônios de projeção (Millan, 1999). Dentro do corno dorsal, três tipos básicos de neurônios de projeção podem ser identificados, conforme a natureza de suas repostas ao eferente primário (Cervero, 1995). Os primeiros são os nociceptivos específicos (NS), apresentam maior concentração na lâmina I e são ativados exclusivamente por alta intensidade de estímulo nocivo mediado pelas fibras C e A δ . Em seguida, têm-se os neurônios de espectro dinâmico e amplo (WDR) ou multirreceptorial, encontrados predominantemente na lâmina V (bem como nas lâminas IV e VI), que são excitados por estímulos térmicos, mecânicos e químicos conduzidos tanto pelas fibras C e A δ como pelas fibras A β . A terceira classe de neurônios de projeção são os não-nociceptivos (NN) encontrados nas lâminas II, III e IV.

Além dos neurônios de projeção, o corno dorsal, mais especificamente a lâmina II (também denominada de substância gelatinosa), é formado por uma população de interneurônios excitatórios e inibitórios (GABAérgicos e encefalinérgicos), os quais estão envolvidos na transferência inter e intralaminar, na integração e na modulação da informação das fibras aferentes primárias (Todd *et al.*, 1992). Esses interneurônios da substância gelatinosa se projetam para as lâminas I e V, e regulam a primeira sinapse na via nociceptiva, entre as fibras aferentes primárias e as fibras aferentes secundárias. Essa função de “porteiro” deu origem à expressão “**teoria de controle do portão**” da dor, proposta por Melzack e Wall (1965). De acordo com a teoria, estes interneurônios poderiam inibir ou facilitar os fluxos dos aferentes dentro do corno dorsal antes deles

evocarem a resposta e a percepção da dor.

Os neurônios de projeção, depois de ativados, conduzem a informação nociceptiva para as estruturas superiores encefálicas (Millan, 1999). A informação nociceptiva é transmitida por vários tratos, cada qual com sua própria terminação no encéfalo e os de maior importância são:

- 1) **Trato espinotalâmico**: trato que se estende da medula diretamente para o tálamo;
- 2) **Tratos espinoreticular e espinomesencefálico**: projetam-se para a formação reticular e para os centros homeostáticos no tronco cerebral;
- 3) **Trato espinohipotálamico**: cujos neurônios seguem para o hipotálamo e para a região ventral do prosencéfalo.

Esses seriam os alvos supraespinhais para o processamento da informação nociceptiva ou da sensação da dor. Por exemplo, os neurônios NS projetam-se, via trato espinotalâmico principalmente para o núcleo talâmico dorsal, responsável pelos aspectos cognitivos-emocionais da dor (relação entre dor e humor, memória e tolerância da dor). Através da mesma via, os neurônios WDR alcançam o núcleo talâmico ventral, envolvido com os aspectos discriminativos-sensoriais da dor (intensidade, localização, duração), (Craig e Dostrovsky, 1999).

1.1.2.3 Vias Descendentes

As vias descendentes originam-se no tronco cerebral e em outras estruturas cerebrais e apresentam um papel muito importante na modulação e integração das mensagens nociceptivas no corno dorsal da medula espinhal. As vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e, em menor extensão, as dopaminérgicas, compreendem os maiores componentes deste mecanismo descendente (Willis, 1988; Millan, 1997; Fields e Basbaum, 1999). As vias descendentes modulam (geralmente reduzem) a liberação de neurotransmissores dos terminais nociceptivos das fibras aferentes primárias. A ativação das vias descendentes inibe os neurônios de projeção, tanto direta quanto

indiretamente através ou da inibição dos interneurônios excitatórios ou da excitação dos interneurônios inibitórios (Fields e Basbaum, 1999).

As vias descendentes não exercem funções exclusivamente inibitórias no corno dorsal. As vias descendentes inibitórias e facilitatórias podem ser derivadas da mesma estrutura. 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 (Almeida *et al.*, 1996).

1.1.2.4 Modulação do processamento nociceptivo

Em 1911, Head e Holmes postularam influências modulatórias da dor e propuseram que o neocórtex modularia a resposta do tálamo aos estímulos nocivos. Mais tarde, em 1954, Hagbarth e Kerr apresentaram as primeiras evidências diretas que os sítios supraespinhais controlariam as vias ascendentes e Carpenter e colaboradores (1965), propuseram o controle descendente dos eferentes sensoriais. No entanto, a existência de um sistema modulatório específico da dor só foi claramente exposto em 1965, na teoria de controle do “portão” da dor, proposta por Wall e Melzack. Posteriormente, Wall (1967) demonstrou que as estruturas do tronco cerebral inibiam tonicamente os neurônios nociceptivos no cordão espinhal. As evidências que o sistema descendente poderia seletivamente modular a dor foram primeiramente colocadas após a descoberta da analgesia produzida por estimulação elétrica focal do cérebro (Reynolds, 1969; Mayer *et al.*, 1971; Mayer e Price, 1976).

As vias inibitórias descendentes são provenientes de muitas estruturas supraespinhais, incluindo hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal (SCP), região dorso-lateral da ponte (DLPT) e pela porção rostral da região ventro-medial do bulbo (RVM). A estimulação elétrica ou administração estereotáxica de aminoácidos excitatórios nessas regiões produzem analgesia ou antinocicepção (Jensen e Yaksh, 1992). A SCP desempenha o principal papel na inibição descendente (Stamford, 1995). A sua estimulação produz antinocicepção, no entanto, poucas fibras da SCP projetam-se diretamente para o corno dorsal (Besson, 1987). A SCP projeta-se para o bulbo

rostral ventromedial (RVM), o qual inclui, o núcleo magno da rafe (NRM; rico em neurônio serotoninérgicos) bem como os núcleos gigantocelulares reticulares pars alfa e paragigantocelular lateral (Fields *et al.*, 1991). Os neurônios no RVM por sua vez, projetam-se ao longo do funículo dorsolateral (DLF) e terminam no corno dorsal nas lâminas I, II e V (Basbaum *et al.*, 1978).

No RVM estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células-*on* e células-*off*, as quais estão envolvidas na modulação nociceptiva (Fields e Basbaum 1999). Ambas as células projetam-se para o corno dorsal através do DLF (Vanegas *et al.*, 1984). Postulou-se que as células-*off* exercem inibição da nocicepção nas vias descendentes uma vez que quando sua atividade está aumentada há uma inibição da transmissão nociceptiva. Além disso, quando se detecta uma diminuição dos disparos dessas células, correlaciona-se com um aumento na transmissão nociceptiva. Por outro lado, as propriedades das células-*on* tornam-se incompatíveis com o conceito de sistema inibitório descendente, uma vez que parecem facilitar os mecanismos nociceptivos no corno dorsal. Quando estão ativas, a transmissão nociceptiva está aumentada e vice-versa (Fields e Basbaum, 1999). De maneira geral, a SCP deve excitar as células-*off* e inibir as células-*on* no RVM (Fields *et al.*, 1991).

1.2 Substância Cinzenta Periaquedutal

A substância cinzenta periaquedutal de ratos foi a primeira área na qual a estimulação elétrica produziu analgesia. Reynolds (1969) mostrou que a estimulação elétrica da SCP produzia profunda analgesia e que uma laparotomia exploratória poderia ser realizada, sem o uso de anestésicos químicos. Estes estudos foram repetidos por Meyer e colaboradores (1971), os quais reafirmaram que durante a estimulação elétrica os animais ficaram alertas, ativos e as respostas ao estímulo nocivo, como fuga ou vocalização, estavam ausentes. Desde então, pesquisas subseqüentes têm mostrado que a SCP é parte de um circuito do sistema nervoso central o qual controla a transmissão nociceptiva na medula espinhal (Mayer e Price, 1976; Basbaum e Fields, 1978).

A maioria dos estudos com analgesia produzida pela estimulação elétrica usou a inibição do reflexo evocado pelo estímulo nociceptivo, como o *tail flick*. No entanto, alguns dos efeitos adversos motores da estimulação elétrica da SCP foram perdidos. Em adição, muitos autores ignoraram que além da analgesia, a estimulação elétrica de muitas regiões da SCP produzia respostas aversivas. Passado uma década do início dos estudos com estimulação elétrica, um número considerável de estudos tem focado esse assunto (Bandler et al., 1985; Bandler e Carrive, 1988; Bandler e Depaulis, 1988; Depaulis et al., 1989).

1.2.1 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). A SCP recebe aferentes do córtex insular e pré-frontal medial, do hipotálamo, da amígdala, dos núcleos cuneiformes, formação reticular do bulbo, *locus coeruleus* e de outro núcleo catecolaminérgico do tronco cerebral do RVM e finalmente dos neurônios nociceptivos da lâmina I (para revisão, ver Wall e Melzack, 1999).

A SCP pode ser dividida em quatro colunas longitudinais que variam ao longo do seu eixo rostro-caudal. As quatro colunas seriam: dorso-lateral, dorso-medial, lateral e ventro-lateral, as quais se diferem em características imunoistoquímicas, densidade de receptores, conexões e funções (Bandler e Shipley, 1994; Bandler e Keay, 1996). Por exemplo, o maior eferente da coluna ventro-lateral SCP (SCPvl) projeta-se para o núcleo magno da rafe (NRM), no entanto, a coluna dorso-lateral SCP (SCPdl) projeta axônios para a região dorso-lateral da ponte (DLPT) e para região ventro-lateral do bulbo (grupo de células noradrenérgicas -A5) (Cameron et al., 1995), áreas implicadas no controle autônomo (**Fig.1**).

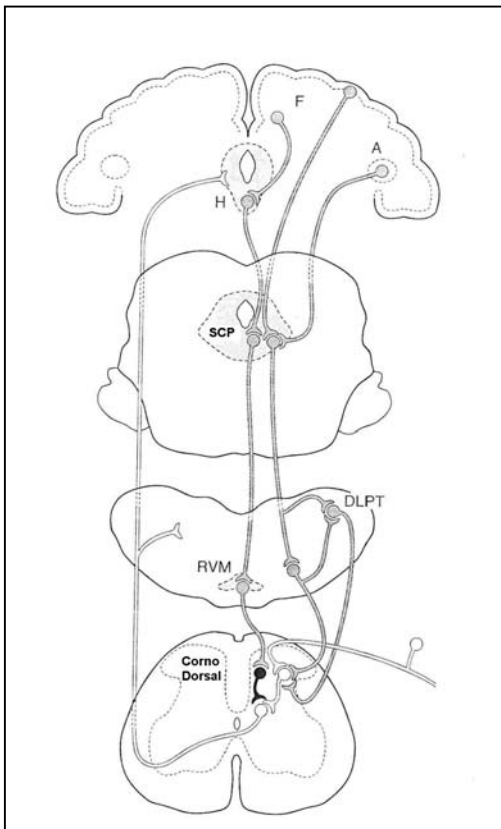


Figura 1. Diagrama da maior via modulatória da dor com as principais ligações na substância cinzenta periaquedutal (SCP) e na região rostral ventro-medial do bulbo (RVM). Regiões do lobo frontal (F) e amígdala (A) projetam-se diretamente ou via hipotálamo (H) para a SCP. A SCP controla os neurônios nociceptivos espinhais através de relés no RVM e na região dorso-lateral da ponte (DLPT). O RVM o qual projeta-se diretamente ou via DLPT para o corno dorsal, exibe controle bidirecional sobre a transmissão nociceptiva. O controle pela RVM e DLPT envolve os dois tipos de interneurônios da substância gelatinosa: inibitórios (preto) excitatórios (branco) (Modificado de Fields e Basbaum, 1999).

Outras diferenças em relação com as conexões das subdivisões dorso-lateral e ventro-lateral da SCP estão listadas no quadro abaixo.

Quadro 1. Principais conexões entre as estruturas do sistema nervoso central e as regiões dorso-lateral e ventro-lateral da substância cinzenta periaquedutal.

	Eferentes para SCP	Aferentes da SCP	Conexões nos dois sentidos
	Córtex Sensorial	Núcleo Cuneiforme	Hipotálamo
SCPdl	Córtex Pré-frontal	Tálamo	
	Córtex Cingular		
	Rafe dorsal		
	Córtex Motor	Tálamo	Amígdala
SCPvl	Córtex Pré-frontal	Rafe caudal	Rafe dorsal
	Córtex insular	Corno ventral da medula	

Fonte: Viana e Brandão, 2003.

É interessante destacar que SCP também se projeta rostralmente para o tálamo e córtex frontal orbital, envolvendo a possibilidade de controle ascendente da nocicepção (Coffield *et al.*, 1992). Além dessas conexões com as outras estruturas do sistema nervoso central, cada coluna da SCP projeta-se bilateralmente para todas as outras colunas (Jansen *et al.*, 1998).

A SCP é um sítio importante na transmissão ascendente da dor (Nashold *et al.*, 1969), contudo, o volume maior de pesquisas está voltado para o seu papel no sistema modulatório descendente da dor.

1.2.2 Funções da SCP

Além da dor e da analgesia, medo, ansiedade, vocalização, lordose e controle cardiovascular são considerados como as principais funções da SCP. A estimulação elétrica da SCPdorsal e dorso-lateral produz aversão em animais (Bandler e Carrive, 1988) e medo e ansiedade em humanos (Nashold *et al.*, 1969). Ela interage com a amígdala e a este respeito, lesões na SCP alteram o medo e a ansiedade produzidos pela ativação da amígdala. Fanselow (1991) sugeriu que um estímulo de ameaça ativa a amígdala que, por sua vez, ativa a SCP, a qual é responsável por comandar as reações de defesa, analgesia e respostas autonômicas.

A estimulação da SCP também produz vocalização e uma lesão nessa região provoca mutismo (Melzack *et al.*, 1958; Jürgens, 1991). A SCP é o maior sítio para lordose e este papel da SCP é mediado via uma conexão com a área pré-óptica medial (Hennessey *et al.*, 1990). O trabalho de controle cardiovascular na SCP é organizado em colunas. As colunas dorsal e lateral estão envolvidas na resposta pressora enquanto a ventro-lateral medeia as respostas depressoras (Bandler *et al.*, 2000).

Estudos mais recentes têm mostrado que a SCP também está envolvida no comportamento agressivo predatório e no comportamento maternal (Miranda-Paiva *et al.*, 2003; Comoli *et al.* 2003).

1.2.3 Farmacologia da antinocicepção mediada pela SCP

Muitos neurotransmissores na SCP estão envolvidos com a nocicepção. Entre eles, opióides endógenos, GABA (ácido gama-amino-butírico), aminoácidos excitatórios e a glicina, parecem ter o papel mais importante no processamento da dor dentro desta região.

1.3.2.1 Opióides

Os opióides exógenos imitam os opióides endógenos e induzem uma analgesia por atuarem além da SCP, no RVM e no corno dorsal da medula espinhal. Os opióides regulam a transmissão nociceptiva, em parte, pela inibição da liberação dos transmissores. Essa inibição é devido à ativação dos canais de potássio e a inibição dos canais de cálcio (para revisão, ver Millan, 1999). O efeito dos opióides se deve pela atividade agonista nos receptores δ , κ , μ e o grau de analgesia depende da afinidade intrínseca de cada um. Por exemplo, a analgesia mais previsível é obtida pelos agonistas dos receptores do tipo μ (morfina) (Twycross, 1994).

O envolvimento dos opióides na inibição da dor mediada pela SCP foi mostrado por Yaksh e Rudy (1978), os quais conseguiram através da injeção de morfina intra-SCP, uma antinocicepção duradoura sensível à naloxona (antagonista dos receptores opióides). É válido destacar que a antinocicepção obtida com a estimulação da região dorsal da SCP é de natureza não-opióide, enquanto a antinocicepção opióide é obtida com a estimulação da região ventro-lateral da SCP (Cannon *et al.*, 1982; Fardin *et al.*, 1984; Carsten e Walkins 1986; Morgam e Liebeskind, 1987; Blander e Shipley, 1994).

Além disso, injeções de morfina na SCP causam aumento dos disparos basais das células-*off* e inibem as células-*on* (Bárbaro *et al.*, 1986). Agonistas opióides interagem com neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos dentro da SCP. Alguns autores sugerem que o efeito antinociceptivo dos opióides deve-se a uma inibição dos neurônios excitatórios (Chieng e Christie, 1994). Em contrapartida, outros autores

suportam a hipótese de que é o processo de desinibição da SCP (uma vez que os neurônios GABAérgicos estão tonicamente ativos) que medeia esse efeito (Moreau e Fields, 1986; Osborne *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 1997). De acordo com essa teoria, os neurônios da SCP, os quais se projetam para o RVM, encontram-se sob inibição tônica dos interneurônios GABAérgicos, os agonistas opióides inibem estes interneurônios e excitam os neurônios aferentes da SCP, causando a ativação da células-*off* e inibição da células-*on* (para revisão, ver Behbehani, 1995).

1.2.3.2 Aminoácidos Excitatórios

O glutamato, bem como o aspartato, desempenha um importante papel na ativação da SCP. A SCP apresenta todos os subtipos de receptores para o glutamato: os ionotrópicos (acoplados diretamente a canais iônicos permeáveis aos cátions): NMDA (n-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e cainato e os metabotrópicos (acoplados através de uma proteína-G a segundo mensageiros solúveis). No entanto, o NMDA parece ser o principal receptor envolvido nas ações do glutamato da SCP. Estudos mostram que microinjeções do glutamato na SCP produzem antinocicepção (Behbehani e Fields, 1979; Carstens *et al.*, 1988; Jones e Gebhart, 1988; Carstens *et al.*, 1990; Jensen e Yaksh, 1992) e que apenas as injeções de antagonista NMDA no mesmo sítio, reduziram essa resposta ao estímulo nocivo (Jensen e Yaksh, 1992). Além disso, experimentos fisiológicos mostraram que microinjeções de glutamato na SCP alteram a atividade basal dos neurônios do RVM (Behbehani e Fields, 1979). Existem evidências que os neurônios glutamatérgicos da SCP projetam-se para o RVM e excitam diretamente suas células (Aimone e Gebhart, 1986).

A SCP recebe muitos aferentes glutamatérgicos como os oriundos da amígdala (Bernard *et al.*, 1996), córtex cingular (Pastoriza *et al.*, 1996) e hipotálamo (Tasker *et al.*, 1987). Dentro da SCP, os neurônios glutamatérgicos estão distribuídos heterogeneamente (Clementes *et al.*, 1987) e a maioria desses está localizada nas colunas dorsal e ventro-lateral da SCP. Injeções 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 antinocicepção não mediada por opióides (Bandler *et al*, 2000). Por outro lado, injeções de aminoácidos excitatórios na coluna ventro-lateral da SCP evocam respostas depressoras do tipo: bradicardia, hipotensão, quiescência, hipoatividade, juntamente com antinocicepção opióide dependente (Bandler *et al*, 2000).

A distribuição dos receptores NMDA dentro da SCP é heterogênea, ocorrendo maior concentração na coluna dorso-lateral (Albim *et al.*, 1990). O NMDA, quando ativado, controla a abertura de um canal iônico que permite a entrada de cátions monovalentes (principalmente Na^+) e divalentes (principalmente Ca^{++}) nas células alvos. Uma característica pouco comum que este receptor possui é que em estado de repouso, seu canal iônico associado está completamente bloqueado por íons Mg^{++} . No entanto, este bloqueio é dependente de voltagem, se a célula for parcialmente despolarizada por ativação dos receptores não-NMDA ou por outras intervenções excitatórias, o canal fica desbloqueado (Leeson e Iversen, 1994).

Outra característica interessante é que esse receptor possui diversos sítios ligantes regulatórios, os quais são tidos como alvos potenciais para a ação das drogas. Além do sítio de ligação para agonistas, que também é alvo de diversos antagonistas, há um sítio de reconhecimento para o magnésio, outro sítio de reconhecimento para o zinco, um sítio ligante para as poliaminas e outro sítio que reconhece concentrações submicromolares do aminoácido glicina (Leeson e Iversen, 1994). Esse sítio de ligação para a glicina (glicina-B) é insensível à estricnina (Thomson, 1990). É interessante salientar que a ativação do receptor NMDA requer a ligação concomitante do glutamato e da glicina nos seus respectivos sítios.

1.2.3.3 Glicina

Como o glutamato e o GABA, a glicina desempenha importante função na modulação da nocicepção na medula e nas estruturas supramedulares (Betz, 1991). A glicina atua inibindo a transmissão nociceptiva em regiões específicas do encéfalo, por

exemplo; medula espinhal, núcleo talâmico e SCP (Betz, 1992; Pourcho *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1992; Sherman, 1997.). Estudos com imunistoquímica, hibridização *in situ*, *binding* de receptores (Fujita *et al.*, 1991; Palácios *et al.*, 1991; Fujiwara *et al.*, 1998), bem como os estudos *in vivo* (Renno *et al.*, 1992), mostraram que a glicina desempenha função importante nas ações analgésicas na SCP. Além disso, a glicina parece participar na modulação de muitas funções (cardiovascular, respiratório, comportamentos de defesa, vocalização), as quais a SCP controla (Berrino *et al.*, 1993; Jurguens e Lu, 1993; Carobrez *et al.*, 2001). Existem evidências que o efeito dos opióides na SCP deve-se pela supressão dos efeitos inibitórios da glicina sobre os neurônios que formam parte das vias de controle descendente (Min *et al.*, 1996; Onaka *et al.*, 1996), uma vez que, na medula espinhal e na SCP a glicina inibe a despolarização induzida pelo glutamato (Onaka *et al.*, 1996). Alguns autores afirmam que a glicina e o GABA são co-liberados pelos mesmos interneurônios na medula espinhal (Jonas *et al.*, 1998). Contudo, na SCP (mais especificamente na região ventrolateral) existe a possibilidade desses aminoácidos serem liberados por neurônios diferentes (Maione *et al.*, 2000).

A glicina foi primeiramente proposta como um neurotransmissor em 1965 e posteriormente ela foi qualificada como sendo um neurotransmissor inibitório por mais de 25 anos (Aprison, 1990). Inicialmente foi descrita ser restrita na medula espinhal de mamíferos, onde teria um efeito inibidor sob os disparos dos motoneurônios quando aplicada ionoforeticamente. As ações inibitórias da glicina resultam de um aumento na condutância do íon cloreto pelo seu receptor, causando hiperpolarização da membrana neuronal. Os receptores da glicina 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 estriquina e potencializados por baixas concentrações de etanol e zinco (para revisão, ver Legendre, 2001).

No entanto, de acordo com alguns autores, a maior parte da glicina liberada na SCP deve estar atuando em receptores glutamatérgicos NMDA, mais do que nos receptores sensíveis à estriquina (Berrino *et al.*, 1993; Viu *et al.*, 1998). A ação estimulatória da glicina, no receptor NMDA, foi somente descoberta em 1987, quando

foi demonstrado que a amplitude da resposta eletrofisiológica de células de cultura de neurônios estimulados por NMDA exibia sua magnitude reduzida ou nula se a glicina fosse rigorosamente excluída do meio externo. Concentrações pequenas de glicina são suficientes para restaurar a resposta normal do NMDA. O efeito da glicina é tão fundamental que alguns autores a descrevem, não somente como um regulador, mas como “co-agonista” do receptor NMDA (Johnson e Ascher, 1987).

Alguns pesquisadores têm sugerido que o nível endógeno de glicina é suficiente para saturar completamente seu sítio no receptor NMDA (Schell *et al.*, 1997). Porém, um número bem relevante de autores tem sugerido que os sítios da glicina não estão sempre saturados (Czepita *et al.*, 1996; Wilcox *et al.*, 1996) isto porque a glicina exógena, ou ainda a d-serina exógena (também agonista deste sítio), potencializa as respostas do NMDA *in vivo* (Salt, 1989; Thiels *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 1989). Recentemente foi demonstrado que o sítio para a glicina no receptor NMDA na medula espinhal não se encontra saturado (Whitehead *et al.*, 2004).

Além disso, a glicina é capaz de induzir respostas aversivas quando microinjetada na SCP (Schimitt *et al.*, 1995). Por exemplo, a glicina e a d-serina quando microinjetadas na região dorsal da SCP produzem efeitos do tipo ansiogênicos e os antagonistas do sítio da glicina no NMDA (ácido 7-cloquinurênico, bem como o 3-amino-1-hidroxi-2-pirrolidona) causam efeitos do tipo ansiolíticos (Matheus *et al.*, 1994; Teixeira e Carobrez, 1999). Os resultados da literatura mostram que o sítio da glicina no receptor NMDA na região dorsal da SCP participam da mediação do comportamento de defesa animal (para revisão, ver Carobrez *et al.*, 2001).

1.3 Dor e Humor

Como vimos no início deste trabalho, muitas estruturas do sistema límbico e cortical, alvos das informações nociceptivas ascendentes, desempenham um importante papel na regulação do humor e especificamente na indução de estados de

ansiedade (amígdala, hipocampo e SCP) e depressão (núcleo accumbens, septo, córtex cingular e córtex frontal). Desta forma, a dor e o humor podem interagir e também mostrar efeitos coletivos. Por exemplo, a ansiedade geralmente acompanha as sensações de dor em resposta a um estímulo nocivo agudo. No entanto, estados de dor crônica são freqüentemente exacerbados pela depressão. Intervenções que diminuem a ansiedade podem reduzir dramaticamente a dor nos indivíduos, em que sua manifestação é amplificada pela ansiedade (Jänig, 2003). Por outro lado, em modelos experimentais com medo condicionado, a antecipação do estímulo nocivo pode ser suficiente para ativar mecanismos opioidérgicos de nocicepção que cumprem um papel adaptativo na preparação e na proteção do organismo numa situação de conflito (para revisão, ver Millan, 1999).

2 HIPÓTESE

Diante do exposto acima, surge a seguinte hipótese de pesquisa:

-Uma vez que a SCP está envolvida nas reações de defesa e antinocicepção e que a microinjeção intra-SCP de glicina provoca efeitos ansiogênicos, seria a antinocicepção também desencadeada pela ação da glicina nesta estrutura mesencefálica?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito da glicina microinjetada na região dorsolateral da SCP de ratos submetidos ao modelo de incapacitação articular induzido por formalina.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar farmacologicamente o modelo de incapacitação articular induzida por formalina, através da aplicação sistêmica de drogas analgésicas clássicas como morfina e diclofenaco, e drogas que interferem no estado de ansiedade como o midazolam e o pentilenotetrazol;
- Comparar o efeito da glicina microinjetada na SCPdl em dois modelos algosimétricos: o modelo de nocicepção tônica e profunda avaliado pelo teste de incapacitação articular induzida por formalina e o modelo de nocicepção transitória e superficial avaliado pelo teste de retirada da cauda (*tail flick*);
- Analisar se o efeito da glicina microinjetada na SCPdl se dá através dos receptores NMDA, microinjetando no mesmo sítio, o antagonista específico, o ácido 7-cloquinurênico;
- Verificar se o sítio para a glicina no receptor NMDA localizado na SCPdl é passível de modulação ou se este se encontra saturado;
- Comparar os efeitos conseguidos com os compostos glicinérgicos na coluna dorso-lateral da SCP com aqueles decorrentes da ativação da coluna ventrolateral e de estruturas adjacentes;
- Avaliar se o efeito induzido pela glicina na SCPdl apresenta componentes opióides, através da aplicação sistêmica do antagonista dos receptores opióides, a naloxona.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia ético da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1995), e aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (Proc. N°: 23080.032820/2003-74).

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso variando de 250–350 g. Os animais foram criados pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). No biotério do Departamento de Farmacologia da UFSC, eles permaneceram alojados em gaiolas plásticas com livre acesso à água e à comida. Além disso, temperatura ($22 \pm 1^\circ \text{C}$), umidade (69 a 80 %) e ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acessas às 7:00 h) foram controlados.

4.2 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.

O aparelho estereotáxico é composto por uma base para fixação do animal com duas barras auriculares graduadas e móveis e uma presilha nasal que se fixa nos incisivos e no osso nasal; trilhos graduados para a inserção de torres de manipulação, que permitem o deslocamento antero-posterior das torres; torres de manipulação graduadas com movimentos laterais dorso-ventral e angular; suporte para cânulas, eletrodos, “probes” (sondas), entre outros.

Os ratos foram primeiramente anestesiados intraperitonealmente com 87 mg / kg de cetamina 10 % (Dopalem[®], Vetbrands, São Paulo, Brasil) associada na mesma seringa com 15 mg / kg de xilazina (Rompum[®], Bayer, Alemanha). Após a perda do reflexo álgico (“pedal withdrawal reflex”), verificada pela pressão da pata do animal, os

ratos tiveram a região superior da cabeça tricotomizada e, em seguida, foram imobilizados individualmente no aparelho estereotáxico, sendo fixados pelas barras auriculares e pela presilha nasal. Após assepsia, injetou-se lidocaína (com 2% de vasoconstritor) na região dorsal da cabeça, por via subcutânea, para anestesia local e redução do extravasamento sanguíneo durante o procedimento cirúrgico. Realizou-se uma pequena incisão e após a remoção da pele seccionada, foi feita a raspagem do periósteo com o objetivo de se expor a superfície óssea. Em seguida, a calota craniana foi limpa com algodão embebido em água oxigenada para se visualizar nitidamente o bregma e o lâmbda, pontos estes que foram utilizados como referências na cirurgia estereotáxica. O crânio deve ficar alinhado adequadamente no aparelho estereotáxico de forma que o bregma e o lâmbda fiquem em um mesmo plano horizontal. Depois de corrigida a inclinação, identificou-se o bregma e, a partir dele, localizou-se a coordenada da substância cinzenta periaquedutal dorso-lateral (SCPdl), de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1998), conforme o quadro que se segue:

Tabela 1. Coordenadas de microinjeção para a SCPdl

Local	A.P. (mm)	M.L. (mm)	D.V. (mm)
SCPdl	-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. Fez-se ainda mais duas perfurações do crânio numa posição mais rostral à cânula, uma em cada osso parietal, para a fixação de dois parafusos. Estes têm por finalidade formarem uma base para sustentar o acrílico auto-polimerizável introduzido ao final da cirurgia. O acrílico solidifica rapidamente, agregando todas as peças e impedindo o deslocamento da cânula guia. Em seguida, um mandril foi introduzido na cânula-guia, para evitar a oclusão da mesma, sendo retirado no momento imediatamente anterior à infusão das drogas.

Ao término da cirurgia, os animais foram colocados em grupos de 3, em gaiolas plásticas com serragem e, após completa recuperação da consciência, foram transferidos para o biotério do laboratório. O período de recuperação cirúrgica dos animais foi de sete dias e neste período os mesmos foram observados quanto à manifestação de dor (redução do consumo de ração e água), além de sinais de sangramento no local da cirurgia, infecção, distensão abdominal, entre outros parâmetros.

4.3 Cânulas

As cânulas-guias implantadas a fim de viabilizar as microinjeções na SCPdl foram confeccionadas no laboratório a partir de agulhas hipodérmicas descartáveis 25 x 7 mm. Com auxílio do paquímetro (Mitutoyo® - Brasil) as cânulas foram cortadas no comprimento de 13 mm. Os mandris foram feitos com fio de aço inoxidável (nº 30), com aproximadamente 26 mm de comprimento, dobrados centralmente e ajustados nas cânulas de forma a não ultrapassar a extremidade em contato com a estrutura encefálica.

4.4 Microinjeção Intra-SCP

Foram utilizadas agulhas de 16,20 mm e 0,3 mm de diâmetro (confeccionadas a partir de agulhas gengivais), conectadas por um tubo de polietileno (10 mm de diâmetro) à microseringa (Hamilton®, 5 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 3,2 mm a mais da cânula-guia de maneira que as drogas fossem realmente microinjetadas da SCPdl.

Para a microinjeção, o animal foi imobilizado com auxílio de um pano e, com um alicate, retirou-se o mandril adaptado à cânula durante a cirurgia. Através de limas

odontológicas (13 mm), a cânula-guia foi desobstruída. Posteriormente, a agulha foi introduzida através da cânula e injetaram-se 0,3 µl da solução, durante 60 s. Em seguida o animal permaneceu em sua caixa, por 5 min ou 30 min, até ser submetido ao teste nociceptivo.

4.5 Testes Nociceptivos

Foram utilizados dois testes nociceptivos: o teste de incapacitação articular induzido por formalina (utilizado na grande maioria dos experimentos) e o teste do *tail flick*.

4.5.1 Incapacitação articular induzida por formalina.

O modelo de incapacitação articular foi desenvolvido por Tonussi e Ferreira (1992). O equipamento consiste de: 1) um cilindro (30 cm de diâmetro) revestido por malha de aço inox (2 mm), com separadores para formarem 3 trilhas de 10 cm sobre ele e 2) sapatilhas metálicas (confeccionadas em folha de flandres), as quais são adaptadas às patas traseiras dos animais e conectadas, por fios de aço, à porta paralela de um microcomputador PC compatível.

Com o cilindro em rotação (3 rpm), ao se colocar os animais, esses são forçados a caminhar para se manterem no topo. Através do eletrodo conectado à sapatilha da pata estudada, o computador registra o tempo total que esta pata perde o contato com a superfície do cilindro, dentro de um período de registro 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, enquanto a administração de substâncias algogênicas dentro dos joelhos desses animais provoca um aumento desse parâmetro.

4.5.2 Tail Flick

O teste do *tail flick* foi descrito há mais de 60 anos (D'Amour e Smith, 1941) sendo ainda amplamente utilizado como teste de nocicepção em ratos e camundongos. É um teste simples, não invasivo, que é constituído por um aparelho que aplica um feixe de luz radiante o qual provoca o aquecimento e retirada da cauda através de um movimento breve e vigoroso. É o tempo de reação deste movimento que registramos e que denominamos de Tempo de Retirada da Cauda (TRC).

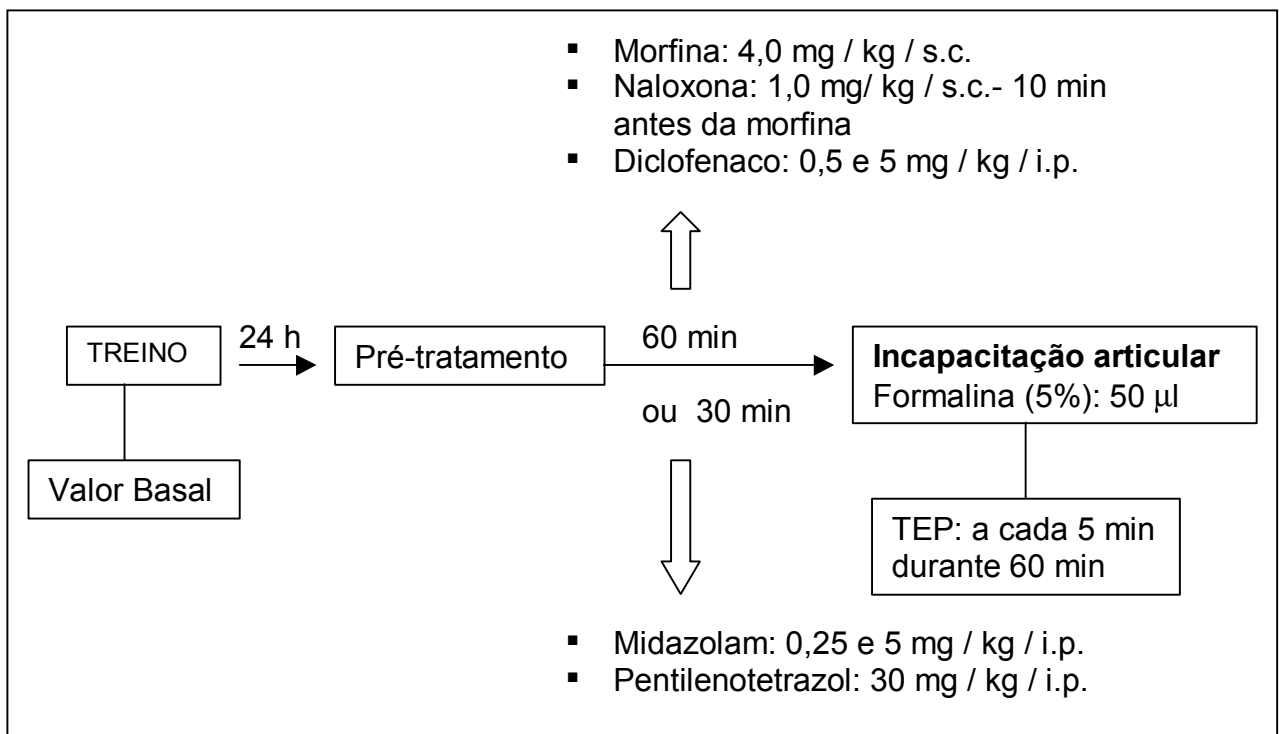
4.6 Protocolo Experimental

O trabalho teve duas etapas, a primeira foi direcionada para a caracterização farmacológica do modelo de incapacitação articular induzido por formalina, e na segunda, estudou-se os possíveis efeitos da glicina, microinjetada na SCPdl sobre os animais submetidos a esse modelo de dor somática profunda.

No dia que antecede o teste de incapacitação articular, 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), registrou-se os valores basais (TEP sem a formalina intra-articular) (**Esquema 1**).

No dia do teste, os animais foram transferidos para a sala de experimentos e nesta, permaneceram novamente por 1 h. Os tratamentos com morfina (4,0 mg/ kg) e diclofenaco (0,5 e 5,0 mg / kg) foram efetuados 60 min antes do teste de incapacitação articular induzido por formalina, e para o midazolam (0,25 e 1,0 mg / kg e pentilenotetrazol (30,0 mg / ml) o tempo de pré-tratamento foi de apenas 30 min. Além disso, um grupo recebeu naloxona (1,0 mg / kg), 50 min antes da injeção de morfina, ambas aplicadas subcutaneamente. O diclofenaco, o midazolam e o pentilenotetrazol foram injetados por via intraperitoneal. Todas as drogas acima citadas foram administradas num volume de 0,1 ml / kg de peso animal. Os animais controle receberam solução fisiológica num mesmo volume e pela mesma via da droga testada.

Passado o tempo de pré-tratamento, foram aplicados 50 µl de formalina (5%) no joelho direito dos animais. No local da injeção, primeiramente, foram feitas tricotomia e assepsia com solução de álcool iodado. Os animais foram imobilizados com auxílio de um pano e posicionados em decúbito dorsal de tal forma que o joelho direito ficasse flexionado para a injeção da solução de formalina. Em seguida, colocavam-se as duas sapatilhas e levava-se ao cilindro rotatório, programado para girar 3 r.p.m. durante 1 min. O teste foi realizado a cada 5 min após aplicação da formalina intra-articular, durante um tempo total de 60 min.



Esquema 1: Protocolo experimental para a caracterização farmacológica do modelo de incapacitação articular induzida por formalina. TEP: tempo de elevação da pata; s.c.: via subcutânea; i.p.: via intraperitoneal.

Para a realização da segunda etapa deste trabalho, antes do teste de incapacitação articular induzido por formalina, foram efetuadas as microinjeções intracerebrais das seguintes soluções: Líqüor Artificial ; Glicina (50 e 100 nmoles / sitio), ácido 7-Cloroquinurênico (10 nmoles / sitio) ou Glicina (100 nmoles) associada ao ácido 7- Cloroquinurênico (10 nmoles).

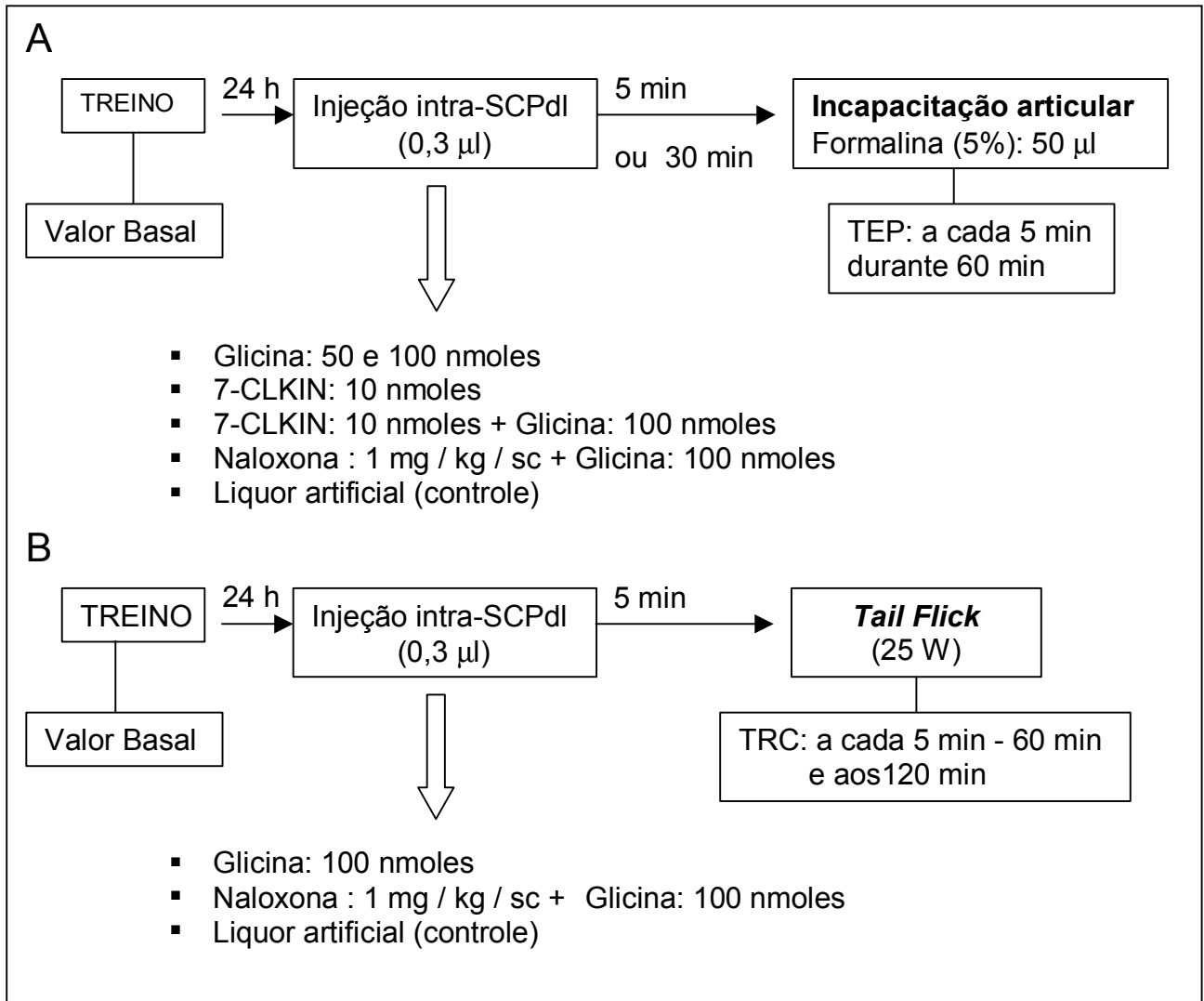
Além das microinjeções intracerebrais, alguns grupos de animais foram pré-tratados com naloxona (0,1%) na dose de 1,0 mg / kg; por via subcutânea 50 min antes. Submeteram-se os animais ao teste após 5 min da microinjeção para a maioria dos grupos, sendo que em um grupo o teste foi realizado aos 30 min da microinjeção de Glicina 100 nmoles (**Esquema 2A**).

Os tratamentos com líquido artificial e glicina (100 nmoles), sozinhos ou associados à injeção de naloxona, foram repetidos no teste de dor fásica somática superficial, o *tail flick*, seguindo ao mesmo protocolo utilizado no modelo de incapacitação articular induzido por formalina (**Esquema 2B**). No teste do *tail flick*, após 5 min da microinjeção, com auxílio de um pano, os animais foram colocados sobre a plataforma do aparelho de maneira que a cauda (aproximadamente a 1 cm da ponta no sentido proximal) ficasse posicionada sobre o foco de luz (25 W). O aparelho estava programado para cessar a emissão de luz aos 20 s (“cut-off”), evitando assim qualquer dano tecidual. Os TRCs (em segundos) foram registrados a cada 5 min durante 60 min e também aos 120 min. No dia que antecedeu os testes, os animais foram treinados no modelo e os valores basais anotados, obtendo-se com a média de três TRCs de cada animal. A sala de experimento teve temperatura controlada em 23 ± 1 °C durante a ambientação, o treino e a realização do teste.

4.7 Confirmação do sítio da microinjeção

Após os experimentos, os animais submetidos as microinjeções esterotáxicas, foram profundamente anestesiados com solução 1:1 de cetamina e xilazina (0,8 -1 ml / por rato) e perfundidos intracardialmente com solução de salina (NaCL 0,9%), seguida por solução de formaldeído (10%). Percebida a rigidez de toda a musculatura dos ratos, estes foram decapitados e microinjetados com uma solução de Azul de Evans (0,5% - 0,3 µl) com auxílio da cânula-guia a fim de se identificar o sítio da microinjeção. Seguiu-se a remoção dos cérebros, que foram acondicionados em solução de formaldeído (10%) por um período mínimo de 72 h. Os cérebros foram fatiados em um micrótomo de congelamento (Cryocut 1800, USA). Os cortes histológicos foram levados ao microscópio (Studar, Polônia) e os sítios das injeções foram identificados através da

comparação do corte com o diagrama do Atlas do cérebro de ratos de Paxinos e Watson (1998). As microinjeções cujos sítios estavam exatamente localizados na SCPdl, como também aquelas localizadas em outras regiões da SCP ou em outras estruturas cerebrais, estão ilustradas na figura 5.



Esquema 2: Protocolo experimental para o estudo dos efeitos da glicina na SCP.

A) Protocolo dos animais submetidos ao modelo de incapacitação articular induzida por formalina. TEP: tempo de elevação da pata; 7 CLKIN: ácido 7-cloroquinurênico; s.c.: via subcutânea. **B)** Protocolo dos animais submetidos ao modelo de retirada da cauda, o *tail flick*; TRC: tempo de retirada da cauda; s.c.: via subcutânea.

4.8 Drogas e soluções

Para a realização dos experimentos desse trabalho, as seguintes drogas foram utilizadas, sendo que os controles receberam os veículos respectivos de cada droga teste.

- a) Por via sistêmica: 1) Morfina (Cristália, Brasil); 2) Naloxone (Sigma, USA); 3) Diclofenaco (Novartis, Brasil); 4) Midazolam (Cristália, Brasil), 5) Pentilenotetrazol (Sigma, USA), dissolvidos em solução fisiológica (0,9%)
- b) Por via intracerebral: 1) Líqüor artificial com a seguinte constituição: KCl 2,5 mM, NaCl 125 mM, MgCl₂ 1,18 mM e CaCl₂ 1,26 mM (Richards *et al.*, 1995); 2) Glicina (Sigma, EUA) dissolvida em líqüor artificial; 3) Ácido 7 Cloroquinurênico (RBI, EUA), dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO), não excedendo 5% do volume total em líqüor artificial; 4) Azul de Evans (Vetec, Brasil) dissolvido em água destilada.

No teste de incapacitação articular foi utilizado Formalina (Formaldehyde 37% - Merck AG, Germany) diluída em 5% (Martins *et al.*, artigo submetido) com solução fisiológica (0,9%), considerando concentração inicial como 100%.

4.9 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa Graphpad Prism version 3 (<http://www.graphpad.com>). Os dados brutos dos experimentos foram reunidos e estão ilustrados nos gráficos na forma de média \pm os erros-padrão da média (e.p.m.).

Inicialmente verificou-se a homogeneidade das variâncias através do teste univariado de Bartlett e todos os valores foram considerados homogêneos. Na análise das curvas experimentais, foram aplicados o teste t de *Student* para comparar 2 curvas e a análise de variância (ANOVA) de uma via, para 3 ou mais curvas.

Na fase 1 do modelo de incapacitação articular induzido por formalina utilizou-se o teste t de *Student* não pareado ou ANOVA de uma via. Na segunda fase do modelo formalina, bem como no teste do *tail flick*, foram utilizados o teste t de *Student* pareado ou ANOVA de uma via para medidas repetidas. As diferenças entre as curvas foram consideradas significativas quando os resultados dos testes estatísticos apresentavam um nível de significância de $p < 0,05$. Na comparação de 3 ou mais grupos, foi efetuado também o teste de Tukey como *post hoc*, com a finalidade de se identificar os grupos diferentes.

5 RESULTADOS

A injeção intra-articular da solução de formalina 5% induziu uma resposta nocifensiva, a qual foi identificada pela incapacidade do rato em articular o joelho afetado, e registrada como o aumento no tempo de elevação da pata (TEP).

Essa resposta nocifensiva induzida pela formalina ocorreu em duas fases distintas do teste. Se observarmos a curva dos animais controle (**Fig. 2**: Sal), na primeira (Fase 1 = 0-5 min), o aumento do TEP ($TEP_C = 10,8 \pm 0,5$ s e $TEP_{0min} = 42,6 \pm 1,2$ s) foi imediatamente após a injeção de formalina. Na segunda (Fase 2 = 10-45 min), o aumento do TEP deu-se de maneira mais lenta, alcançando efeito máximo por volta dos 25 min ($TEP_{25min} = 40,4 \pm 5,5$ s) durando 45 min ($TEP_{45min} = 15,8 \pm 1,3$ s) depois da aplicação da formalina. Essas duas fases foram interpostas por um período denominado de quiescência, no qual o animal voltava a articular o joelho normalmente. Na quiescência, o valor do TEP declina e alcança o índice basal ($TEP_{5min} = 15,5 \pm 1,3$ s). Sessenta minutos após à injeção de formalina os animais já caminhavam normalmente sem sinais de nocicepção.

A resposta nocifensiva induzida pela injeção intra-articular de formalina apresentou importantes variações no modelo de incapacitação articular, devido aos tratamentos sistêmicos e intracerebrais efetuados.

5.1 Efeito antinociceptivo da morfina e do diclofenaco no modelo de incapacitação articular.

A morfina (4,0 mg /kg) inibiu a resposta nocifensiva da formalina 5% em ambas as fases do modelo ($p < 0,01$; **Fig. 2**). Os TEPs registrados imediatamente após a injeção de formalina foram $42,6 \pm 1,2$ s para o grupo controle que recebeu apenas salina e $23,5 \pm 2,5$ s, para aquele tratado com morfina. Os TEPs registrados no pico da segunda fase foram de $40,4 \pm 5,5$ s para o grupo controle e $22,7 \pm 3,7$ s para os tratados com morfina. Este efeito inibitório produzido pela morfina foi totalmente bloqueado ($p < 0,01$; **Fig. 2**) pela administração prévia (60 min) de naloxona. O grupo que recebeu naloxona (1,0 mg / kg) apresentou uma antecipação do pico de resposta

da segunda fase, uma vez que, ela deslocou a curva de formalina para a esquerda. Na dose utilizada (4,0 mg / kg; s.c.) a morfina não provocou incoordenação motora nos animais. Experimentos conduzidos com fentanil (outro agonista opióide), 50 µg / kg, s.c., impossibilitou os animais de se locomoverem espontaneamente, além de causar freqüentemente a queda deles do cilindro. Os resultados obtidos com esses animais não foram submetidos à avaliação estatística.

O inibidor da ciclooxigenase diclofenaco (5,0 mg / kg, i.p.) também induziu significativo efeito antinociceptivo, mas apenas na segunda fase. Foram registrados TEPs de $40,4 \pm 5,5$ s e $19,5 \pm 2,6$ s para o grupo controle (Salina) e para o grupo que recebeu o diclofenaco, respectivamente ($p < 0,001$; **Fig. 3**). Na menor dose (0,5 mg / kg), o diclofenaco não afetou a resposta nocifensiva induzida pela formalina. O tratamento com diclofenaco não afetou nem o primeiro pico de resposta ($TEP_{sal} = 42,6 \pm 1,2$ s , $TEP_{0,5 \text{ mg}} = 39,4 \pm 3,8$ s e $TEP_{5,0 \text{ mg}} = 37,1 \pm 3,8$ s), nem o período de quiescência ($TEP_{sal} = 15,5 \pm 1,3$ s, $TEP_{0,5 \text{ mg}} = 13,8 \pm 0,8$ e $TEP_{5,0 \text{ mg}} = 10,7 \pm 1,8$ s) (**Fig. 3**).

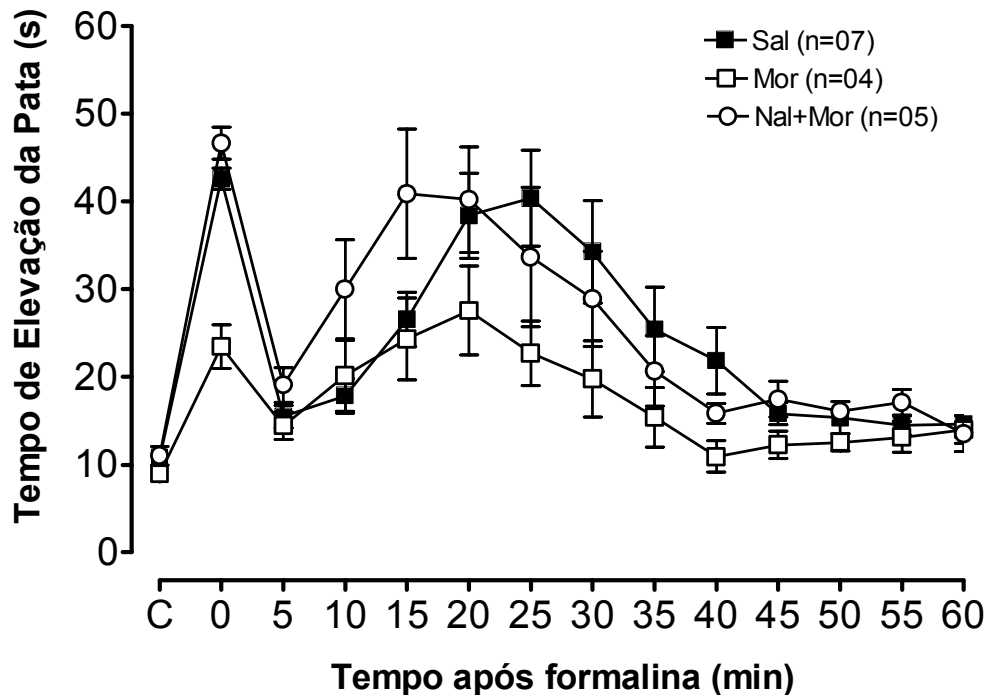


Figura 2. Efeito antinociceptivo da morfina no modelo de incapacitação articular induzida por formalina. O grupo que recebeu Morfina (Mor) na dose de 4,0 mg / kg, s.c., 60 min antes da formalina, apresentou inibição significativa no tempo de elevação da pata (TEP) nas duas fases do modelo, comparado com o grupo controle que recebeu apenas solução fisiológica pela mesma via (Sal, $p < 0,01$). Naloxona (1,0 mg / kg, s.c.) aplicada 10 min antes da morfina (Nx+Mor), bloqueou totalmente o efeito antinociceptivo da morfina ($p < 0,01$). A letra **C** representa o TEP antes da injeção de formalina 5% (50 μ l) no joelho direito dos animais (0 min); **n**, indica o número de animais de cada grupo. Os dados estão representados na forma de média \pm epm. Diferenças estatísticas significativas foram reveladas pela ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

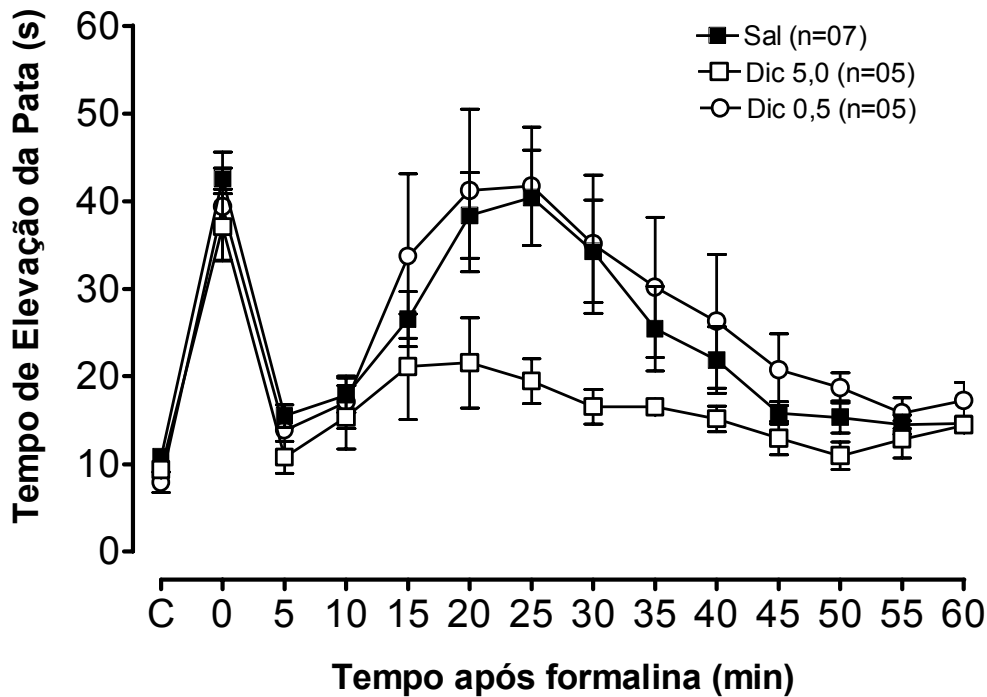


Figura 3. Efeito antinociceptivo do diclofenaco no modelo de incapacitação articular induzida por formalina. O tratamento prévio com diclofenaco (Dic=5,0 mg / kg, i.p., 60 min antes da formalina), reduziu significativamente o tempo de elevação da pata (TEP) na segunda fase do modelo, comparado com o grupo controle tratado com solução fisiológica pela mesma via (Sal, $p < 0,001$). A menor dose de diclofenaco (Dic=0,5 mg / kg, i.p.) não alterou de maneira significativa o TEP. A letra **C** representa o TEP antes da injeção de formalina 5% (50 μ l) no joelho direito dos animais (0 min); **n**, indica o número de animais de cada grupo. Os dados agrupados em forma de média \pm epm, foram submetidos à ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Tukey.

5.2 Efeito do midazolam e do pentilenotetrazol no modelo de incapacitação articular.

O tratamento prévio com o agonista benzodiazepínico midazolam (0,25 mg / kg, i.p.; **Fig. 4A**) causou uma intensa inibição da 2ª fase da formalina ($TEP_{sal} = 53,0 \pm 3,8$ s, $TEP_{mdz} = 30,0 \pm 6,8$ s; $p < 0,001$) mas apenas uma tendência em inibir a 1ª fase ($TEP_{sal} = 52,3 \pm 3,4$ s, $TEP_{mdz} = 40,6 \pm 4,7$ s), e não afetou o período de quiescência ($TEP_{sal} = 20,7 \pm 2,3$ s, $TEP_{mdz} = 18,4 \pm 2,3$ s). A maior dose de midazolam (1,0 mg / kg, i.p.; **Fig. 4B**), no entanto, não afetou as fases 1 ($TEP_{sal} = 45,0 \pm 4,8$ s, $TEP_{mdz} = 45,2 \pm 2,1$ s) e 2 ($TEP_{sal} = 39,6 \pm 2,3$ s, $TEP_{mdz} = 37,5 \pm 6,3$ s), mas mostrou uma tendência em inibir o período de quiescência ($TEP_{sal} = 18,4 \pm 3,6$ s, $TEP_{mdz} = 26,8 \pm 1,6$ s).

De maneira similar, o bloqueador do receptor $GABA_A$ pentilenotetrazol (30 mg / kg, i.p.; **Fig. 4B**) não induziu mudanças significativas nas duas fases do modelo ($TEP_{0min} = 42,4 \pm 3,4$ s, $TEP_{25min} = 40,0 \pm 4,4$ s), porém também mostrou tendência em inibir o período de quiescência ($TEP_{sal} = 18,4 \pm 3,6$ s, $TEP_{ptz} = 28,7 \pm 4,3$ s).

Os animais tratados com essas duas últimas drogas não apresentaram durante a realização do teste de incapacitação articular, qualquer sinal de incoordenação motora, hiperexcitabilidade ou convulsão.

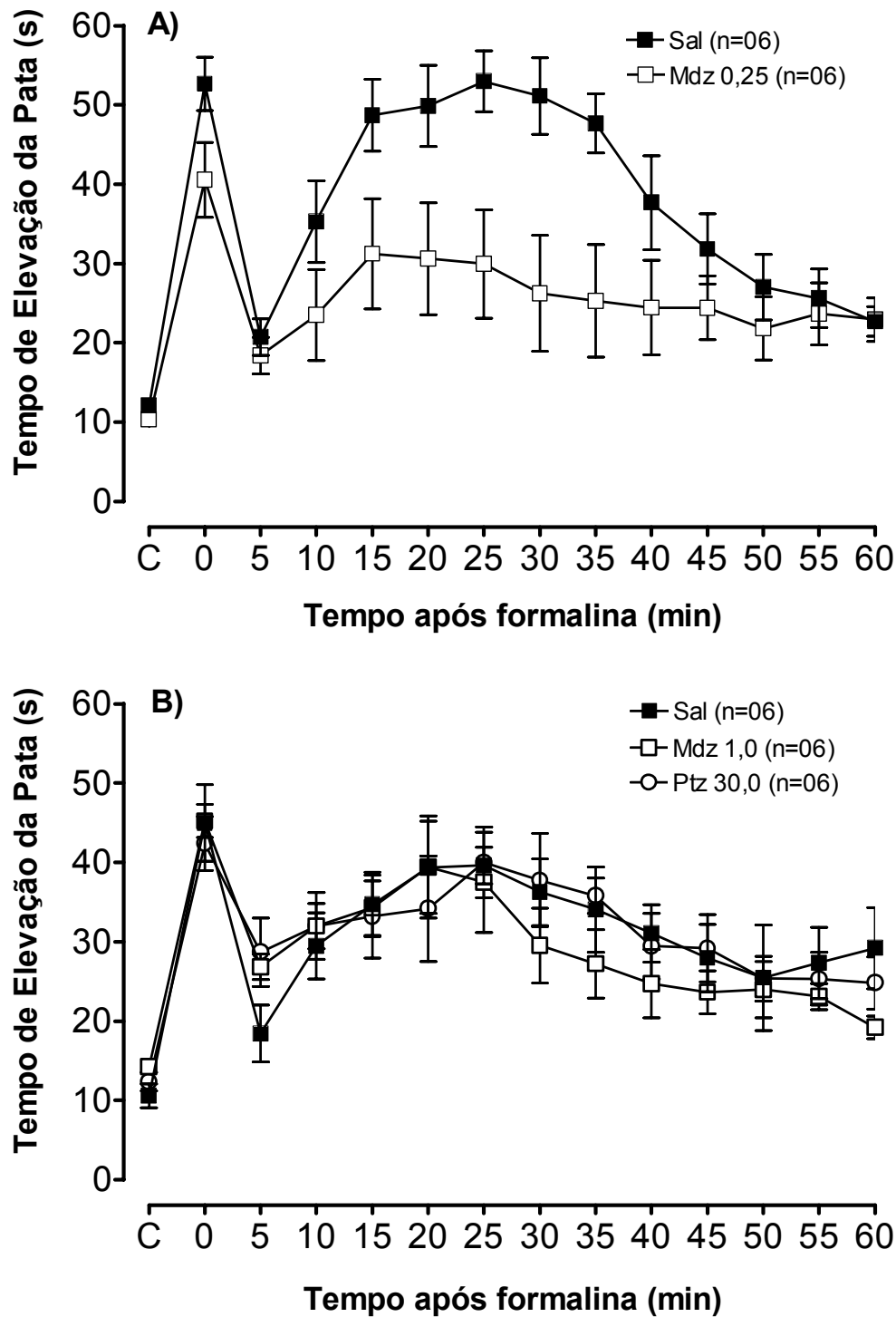


Figura 4. Efeito do midazolam e do pentilenotetrazol no modelo de incapacitação articular induzida por formalina. A) Midazolam (Mdz = 0,25 mg / kg, i.p., 30 min antes da formalina) reduziu significativamente o tempo de elevação da pata (TEP) na segunda fase da resposta induzida pela formalina, comparado com o grupo que recebeu apenas solução fisiológica pela mesma via (Sal, $p < 0,001$). **B)** Midazolam (1,0 mg / kg, i.p.) e pentilenotetrazol (Ptz = 30 mg / kg, i.p.) não causaram efeito significativo no TEP, porém apresentaram uma tendência em aumentar o TEP no período de quiescência. A letra **C** representa o TEP antes da injeção de formalina 5% (50 μ l) no joelho direito dos animais (0 min); **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representados em forma de média \pm epm foram analisados estatisticamente através do teste t de *Student*.

5.3 Efeitos dos compostos glicinérgicos microinjetados na SCPdl no modelo de incapacitação articular induzida por formalina.

A glicina na dose 100 nmoles, microinjetada em 0,3 μ l tanto aos cinco (**Fig. 6A**) quanto aos trinta minutos (**Fig. 6B**) antes da injeção de formalina intra-articular, inibiu a resposta nocifensiva na 2ª fase do teste (**Fig. 6A**= $p<0,001$ e **Fig. 6B**= $p<0,05$). No entanto, a glicina aplicada aos cinco minutos mostrou efeito antinociceptivo mais prolongado do que quando aplicada aos 30 min antes da injeção de formalina. Os TEPs registrados no pico da segunda fase foram de $42,6 \pm 1,2$ s para o grupo tratado com líquido artificial; $24,0 \pm 3,2$ s e $31,9 \pm 6,8$ s para o grupo tratado com glicina, 5 e 30 min antes da formalina, respectivamente.

A menor dose de glicina (50 nmoles), aplicada 5 min antes da injeção intra-plantar de formalina, não mostrou efeito na fase 1 ($TEP_{LA} = 42,7 \pm 2,6$ s, $TEP_{Gli50} = 46,9 \pm 4,1$ s) e na fase 2 ($TEP_{LA} = 40,5 \pm 2,9$ s, $TEP_{Gli50} = 43,7 \pm 5,6$ s). Porém esta dose mostrou um efeito inibitório significativo ($p<0,001$ **Fig. 6A**) sobre o período de quiescência ($TEP_{LA} = 11,6 \pm 0,7$ s, $TEP_{Gli50} = 24,08 \pm 5,8$ s). Além disso, a mesma glicina (50 nmoles) microinjetada em outra região da SCP, a região ventro-lateral, provocou forte inibição da segunda fase do modelo ($p<0,001$; **Fig. 7**). O grupo controle que recebeu líquido artificial e o grupo tratado com glicina (50 nmoles) tiveram registrados os seguintes TEPs respectivamente: $46,1 \pm 5,1$ s e $22,9 \pm 5,1$ s.

A microinjeção de glicina (100 nmoles) na coluna dorso-medial da SCP (SCPdm) 5 min antes da aplicação de formalina intra-articular, também conseguiu provocar inibição significativa ($P<0,001$) da resposta nocifensiva da formalina durante a segunda fase do modelo. Por outro lado, a microinjeção de glicina no colículo superior não alterou o TEP dos ratos. Durante o pico da segunda fase da formalina, as microinjeções na SCPdm provocaram um TEP_{LA} de $44,1 \pm 9,3$ s e um TEP_{Gli} de $26,4 \pm 8,8$ s (**Fig. 8A**). As microinjeções no colículo superior os TEPs registrados foram de $48,8 \pm 3,2$ s e $40,9 \pm 6,9$ s para o grupo controle e glicina respectivamente (**Fig. 8B**).

O efeito inibitório produzido pela glicina (100 nmoles, 5 min antes da formalina intra-articular) foi totalmente revertido com o uso do antagonista do sítio para a glicina no receptor NMDA, o ácido 7-cloroquinurênico ($p<0,001$, **Fig. 9**). Durante o pico da

segunda fase de formalina o TEP registrado para o grupo glicina foi de $36,01 \pm 4,0$ s, enquanto aqueles que receberam concomitantemente o ácido 7-cloroquinurênico (10 nmoles), tiveram um aumento desse TEP para $46,13 \pm 4,1$ s. Nesse experimento (**Fig.9**), os 0,3 μ l de glicina (100 nmoles) foram capazes de bloquear de forma significativa, a resposta nocifensiva induzida pela formalina nas duas fases do modelo ($p < 0,001$). Os TEPs registrados imediatamente após a injeção de formalina e durante o pico da segunda fase, foram respectivamente de: $43,4 \pm 5,1$ s e $51,6 \pm 3,8$ s para o grupo tratado com líquido artificial; $35,7 \pm 5,8$ s e $36,01 \pm 4,0$ s para o grupo tratado com glicina. Alguns animais que receberam as microinjeções de 100 nmoles de glicina (5 animais) e do ácido 7-cloroquinurênico mais glicina (2 animais) mostraram um comportamento do tipo hiperexcitabilidade e convulsão (audiogênica) durante (45-60 min) ou após o teste. Os resultados obtidos com esses animais não foram submetidos à avaliação estatística.

Antagonista dos receptores opióides também bloqueou o efeito antinociceptivo da glicina. Naloxona (1,0 mg / kg, s.c.), aplicada previamente (50 min) por via sistêmica, impediu pelo menos parcialmente, os efeitos inibitórios sobre o TEP induzidos pela microinjeção de glicina na dose de 100 nmoles ($P < 0,05$; **Fig. 10**). Esse bloqueio pode ser melhor observado aos 20 minutos de ação da formalina, onde os animais que receberam apenas glicina apresentavam um TEP de $22,24 \pm 3,14$ s, enquanto aqueles que receberam a naloxona antes da glicina; TEP de $39,5 \pm 4,4$ s. Os registros dos TEPs dos grupos controles nesse mesmo tempo, foram de $42,6 \pm 1,2$ s e $42,6 \pm 1,2$ s, respectivamente.

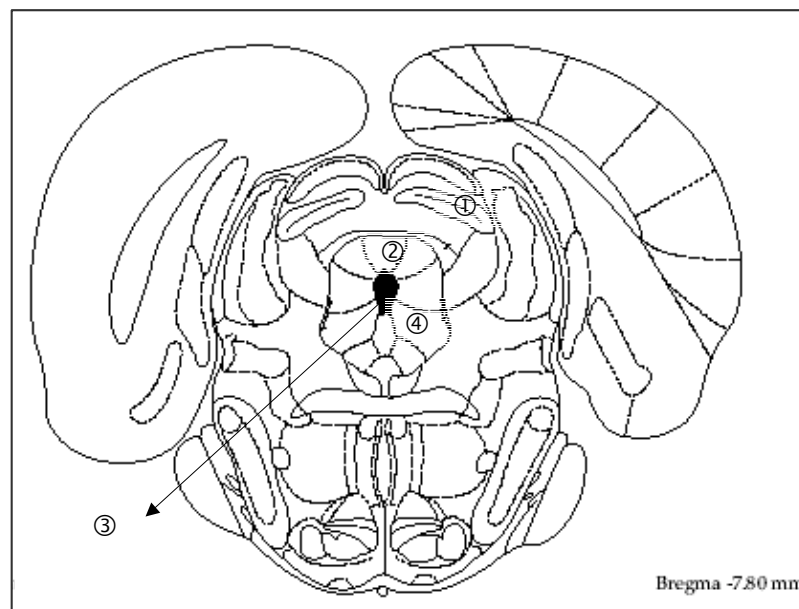
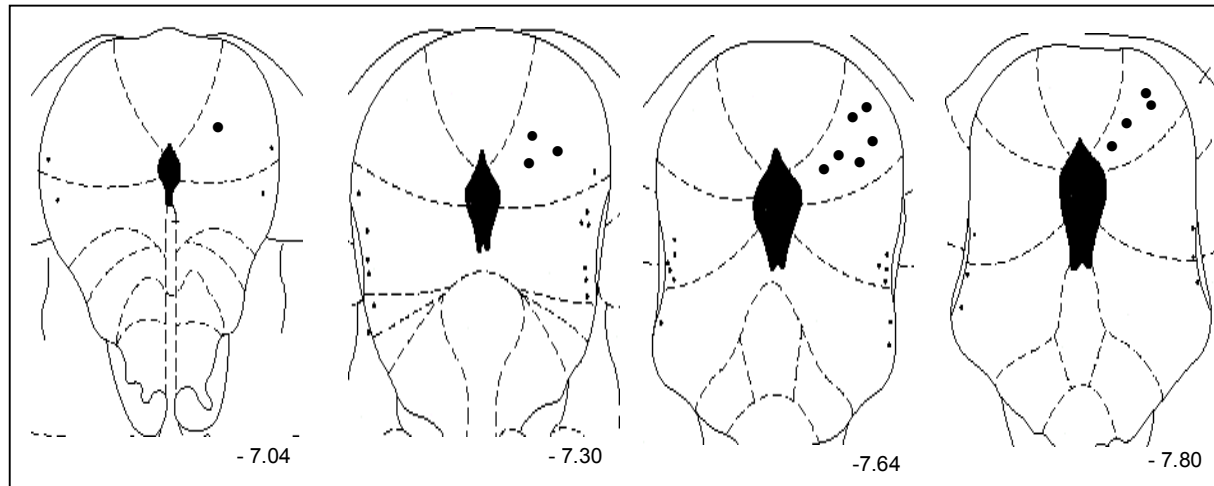


Figura 5. Cortes coronais do mesencéfalo de rato (Paxinos e Watson, 1998).

Painel superior: Sítios das microinjeções dos compostos glicinérgicos, nas porções rostral, intermediária e caudal da região dorsolateral da Substância Cinzenta Periaquedutal (SCPdl). Com predomínio das microinjeções nas porções mais caudais da SCPdl (-7,6 e -7,8). O número de círculos é menor que o número de animais utilizados, devido a sobreposição de sítios. Os valores representam as distâncias em “mm” a partir do bregma.

Painel Inferior: Sítios das microinjeções dos compostos glicinérgicos localizados fora SCPdl. 1) colículo superior; 2) SCP dorso-medial (SCPdm); 3) aqueduto de Sylvius 4) SCP ventro-lateral (SCPvl).

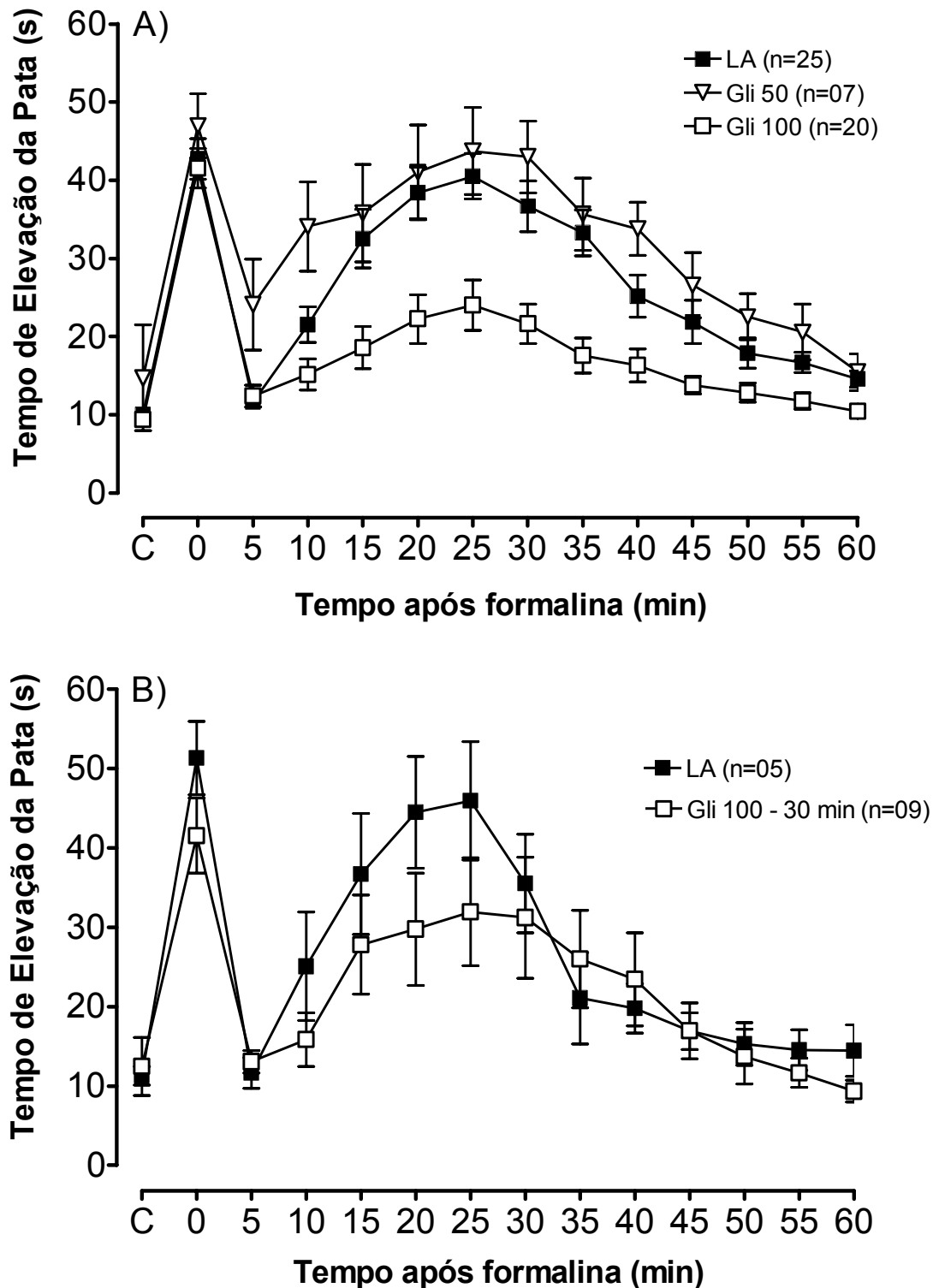


Figura 6. Efeito antinociceptivo da microinjeção de glicina na SCPdl no modelo de incapacitação articular induzida por formalina. A glicina na dose 100 nmoles (Gli 100) microinjetada aos 5 e aos 30 minutos antes da formalina inibiu de forma significativa (**A**= $p < 0,001$ e **B**= $p < 0,05$; respectivamente) o TEP durante a 2ª fase de resposta nocifensiva, comparada com a microinjeção controle de líquido artificial (LA). A glicina (Gli 50 nmoles) aumentou de maneira significativa ($p < 0,001$) somente o período de quiescência, comparada com grupo LA (**A**). A letra **C** representa o tempo de elevação da pata (TEP) antes da injeção de formalina 5% (50 μ l) no joelho direito dos animais (0 min) 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 seguida do teste de Tukey.

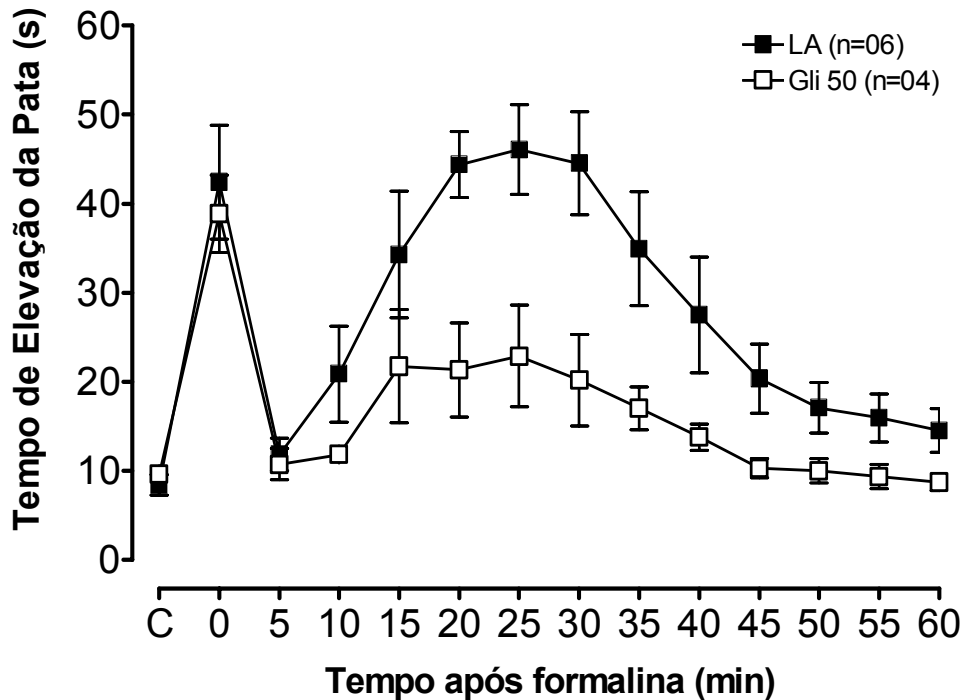


Figura 7. Efeito antinociceptivo da microinjeção de glicina na SCPvl no modelo de incapacitação articular induzida por formalina. A microinjeção de 50 nmoles de glicina (Gli 50) na SCPvl inibiu de forma significativa o tempo de elevação da pata (TEP) durante a fase 2 do modelo, comparada com a microinjeção controle de líquido artificial (LA, $p < 0,001$). As microinjeções foram realizadas 5 min antes da injeção formalina 5% (50 μ l) no joelho direito dos animais (0 min). A letra **C** representa o TEP antes da injeção de formalina e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representados em forma de média \pm epm foram submetidos ao teste t de *Student*.

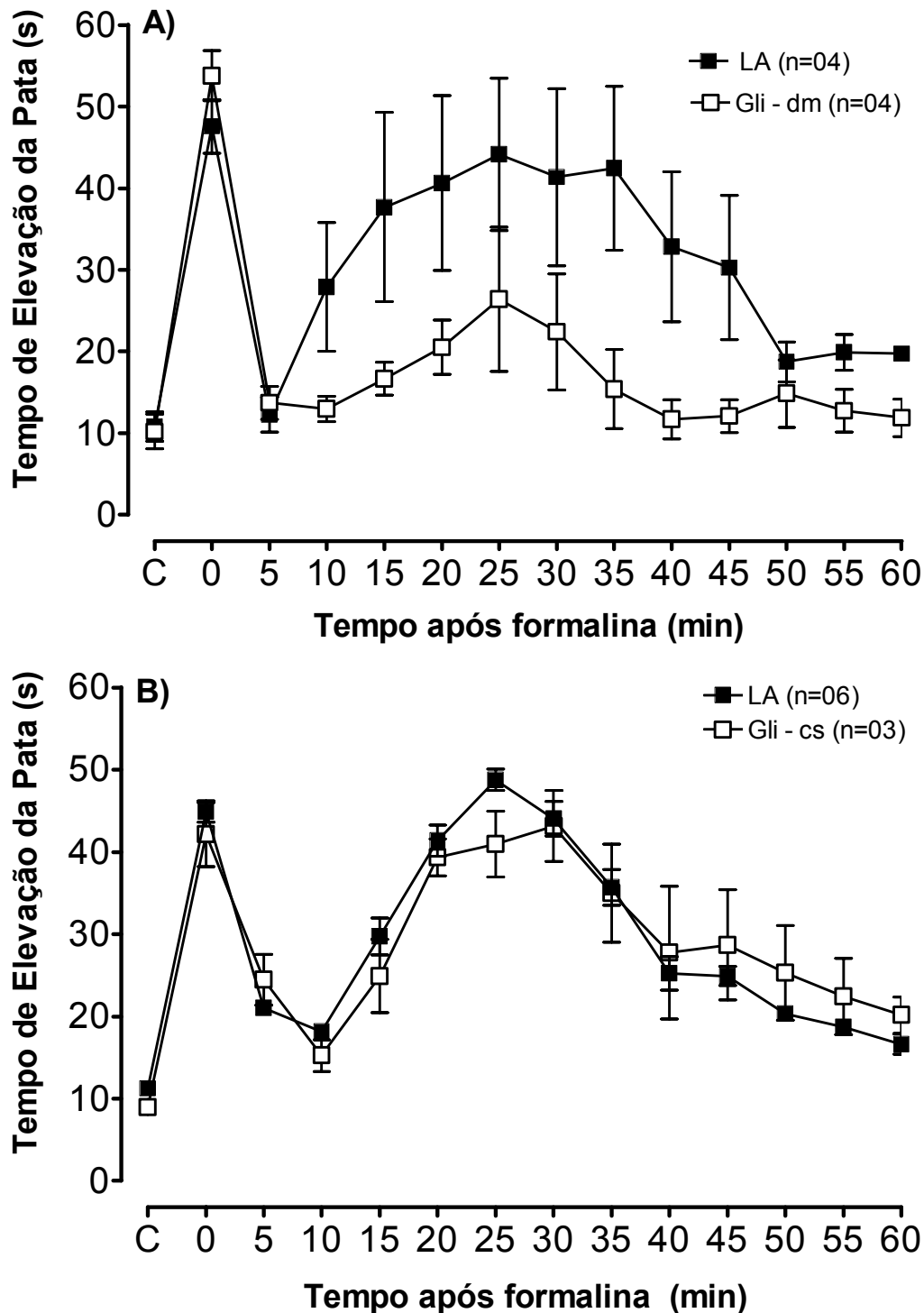


Figura 8. Efeito das microinjeções de glicina na SCPdm e no colículo superior no modelo de incapacitação articular induzida por formalina. A) A microinjeção de glicina na SCPdm (Gli-dm: 100 nmoles) 5 min antes da formalina intra-articular (5%, 50 μ l) diminuiu de forma significativa o TEP dos animais em relação ao grupo controle que recebeu líquido artificial intra-SCPdm (LA). **B)** A glicina microinjetada no colículo superior (Gli-cs: 100 nmoles) 5 min antes da formalina intra-articular, não alterou de maneira significativa o TEP dos ratos. A letra **C** representa o tempo de elevação da pata (TEP) antes da injeção de formalina (0 min) e **n**, o número de animais de cada grupo. Os dados representados pelas médias \pm epm foram analisados pelo teste de t de *Student*.

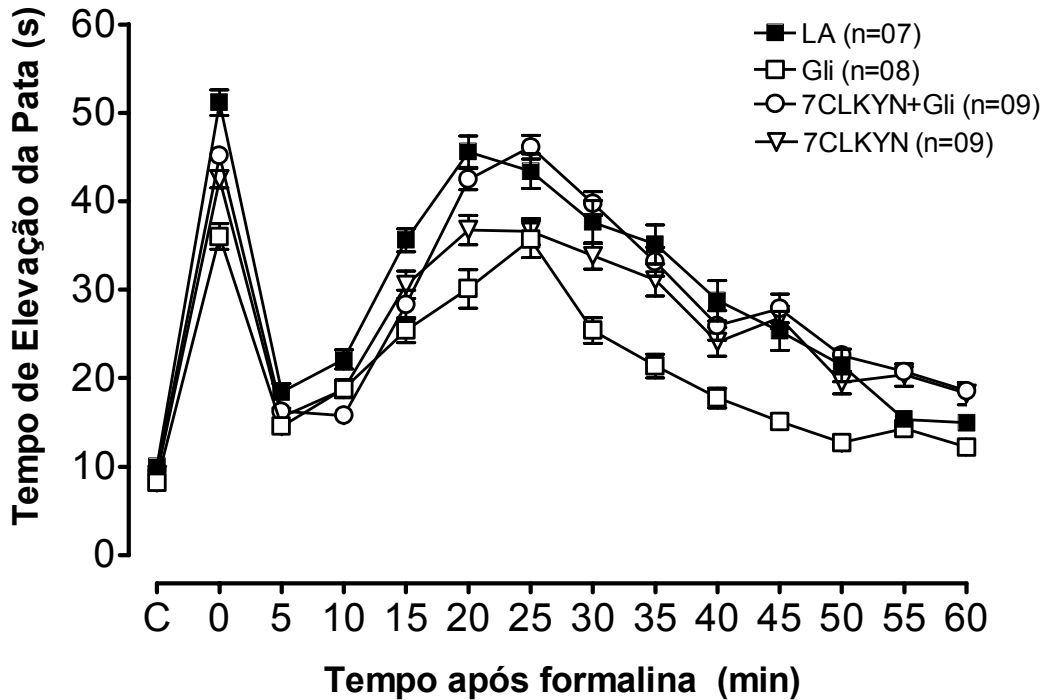


Figura 9. Bloqueio da antinocicepção da glicina pelo 7-cloroquinurênico microinjetados na SCPdl, no modelo de incapacitação articular induzida por formalina. O tratamento associado do ácido 7-cloroquinurênico com glicina (7CLKYN+GLI) inibiu de forma significativa a diminuição do TEP provocada pela glicina, em relação ao grupo tratado apenas com glicina (Gli, $p < 0,001$). A glicina (100 nmoles), o ácido 7-cloroquinurênico (7CLKYN, 10 nmoles) e a associação do ácido 7-cloroquinurênico (10 nmoles) com glicina (100 nmoles) foram microinjetados na SCPdl, 5 minutos antes da injeção de formalina 5% (50 μ l) no joelho direito dos animais (0 min). A letra **C** representa o TEP antes da injeção de formalina e **n**, o número de animais de cada grupo. O grupo controle recebeu DMSO dissolvido numa proporção inferior a 5 % de liquor artificial (LA). Os dados estão representados em forma de média \pm epm. A análise estatística foi realizada com auxílio da ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey.

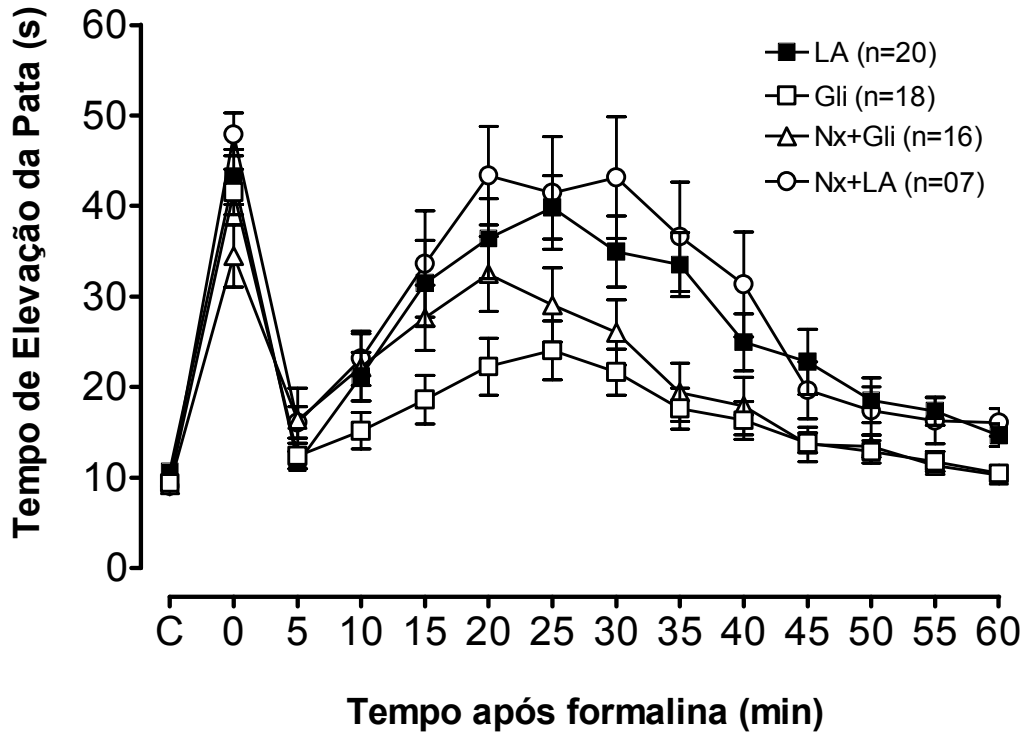


Figura 10. Naloxona bloqueia o efeito antinociceptivo da glicina microinjetada na SCPdl no modelo de incapacitação articular induzida por formalina. O grupo tratado com glicina (Gli, 100 nmoles) intra-SCPdl apresentou diminuição significativa do tempo de elevação da pata (TEP, $p < 0,001$) em relação ao grupo tratado com líquido artificial pela mesma via (LA). A aplicação de naloxona (1,0 mg / kg, s.c.), 50 min antes da glicina (Nx+Gli), bloqueou parcialmente a ação inibitória da glicina sobre TEP de ratos, comparado com o grupo que recebeu somente glicina (Gli, $p < 0,05$). A glicina foi microinjetada 5 minutos antes da injeção de formalina 5% (50 μ l) no joelho direito dos animais (0 min). A letra **C** representa o TEP antes da injeção de formalina (0 min) e **n**, o número de animais de cada grupo. Os controles receberam solução fisiológica ou naloxona (s.c.), 50 minutos antes da injeção de líquido artificial na SCPdl (Sal+LA, Nx+LA, respectivamente). Os dados estão representados em forma de média \pm epm. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida pelo Tukey.

5.4 Efeitos dos compostos glicinérgicos microinjetados na SCPdl no teste do *tail flick*.

Repetiu-se o protocolo experimental descrito no parágrafo anterior no teste do *tail flick* e, ao contrário dos resultados com o teste de incapacitação articular induzida pela formalina, a naloxona não foi capaz de bloquear de forma significativa o efeito antinociceptivo da glicina observado no tempo de retirada da cauda (TRC) (**Fig. 11**). Os resultados aos 30 minutos de teste foram: $TRC_{LA} = 4,5 \pm 0,4$ s, $TRC_{Nx+LA} = 5,0 \pm 0,4$ s, $TRC_{Gli} = 7,3 \pm 0,7$ s, $TRC_{Nx+gli} = 10,1 \pm 0,6$. Aqueles animais tratados previamente com a naloxone mostraram um comportamento antinociceptivo mais significativo ($p < 0,001$) daqueles tratados apenas com glicina ($p < 0,01$), em relação aos animais controle (**Fig. 11**).

Não foram observadas mudanças significativas nos TRCs dos animais os quais tiveram os sítios das microinjeções de glicina (100 nmoles) diferentes da SCPdl. No colículo superior, os TRCs registrados aos 30 min de teste foram de $6,7 \pm 0,9$ s para o grupo tratado com líquido artificial (controle); $6,2 \pm 0,7$ s para o grupo tratado com glicina; $6,8 \pm 0,4$ s para o grupo tratado com naloxona mais glicina. Os grupos nos quais o sítio identificado foi o aqueduto de Sylvius tiveram uma variação maior dos seus TRCs ao longo do tempo de teste e apresentaram os seguintes resultados também aos 30 minutos; $TRC_{LA} = 7,8 \pm 1,1$ s, $TRC_{Gli} = 7,3 \pm 1,8$ s, $TRC_{Nx+gli} = 9,0 \pm 0,8$ (**Fig. 12A e 12B**). Na SCPdm, os TRC_{30min} foram de 6,1 s (n=01); para o grupo controle; 5,8 s (n=02) para o grupo glicina e 6,6 s (n=01) para o grupo naloxone mais glicina.

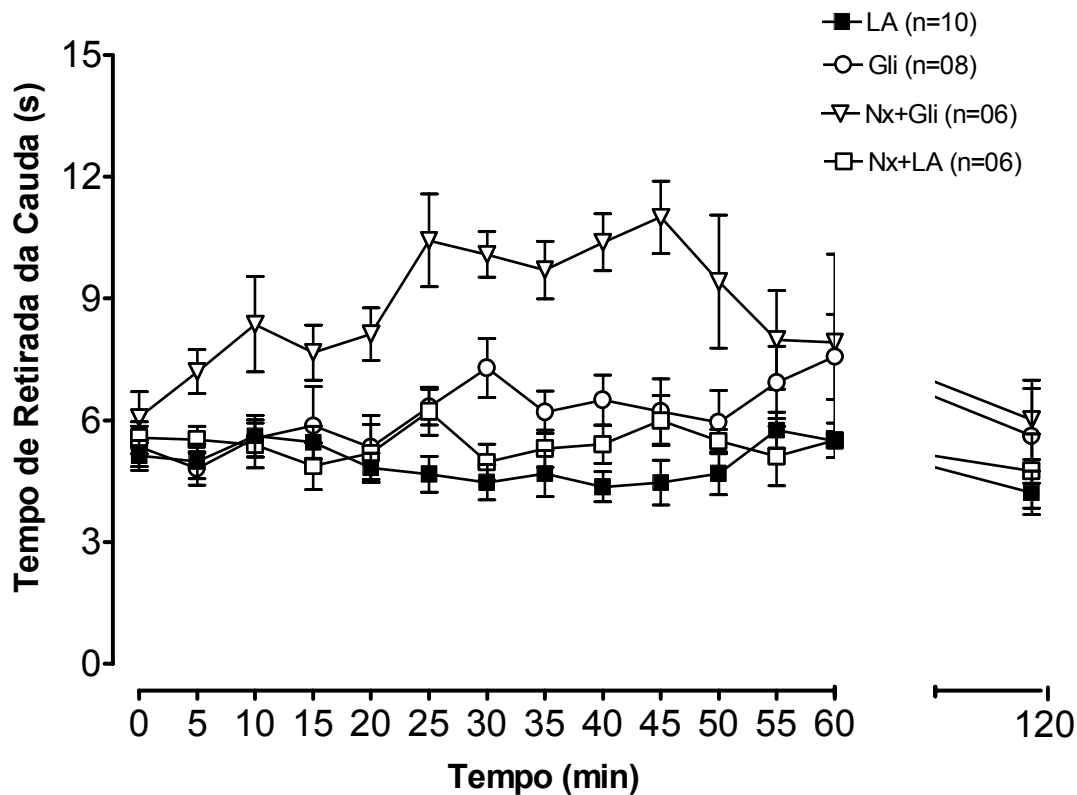


Figura 11. Naloxona potencializa o efeito antinociceptivo da microinjeção de glicina na SCPdl de ratos submetidos ao teste do *tail flick*. Glicina (Gli=100 nmoles), 5 min antes do estímulo térmico, aumentou significativamente ($p < 0,01$) o TRC de ratos submetidos ao *tail flick*, em relação ao grupo controle que recebeu líquido intra-SCPdl (LA). A naloxona (1,0 mg / kg, s.c.) aplicada 50 min antes da microinjeção de glicina (Nx+Gli) aumentou o TRC de forma mais significativa ($p < 0,001$), comparado com os grupos controles (Nx+LA e Sal+LA). Os dados estão representados em forma de média \pm epm dos TRCs, a cada 5 min após as microinjeções, durante 60 e aos 120 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 Tukey.

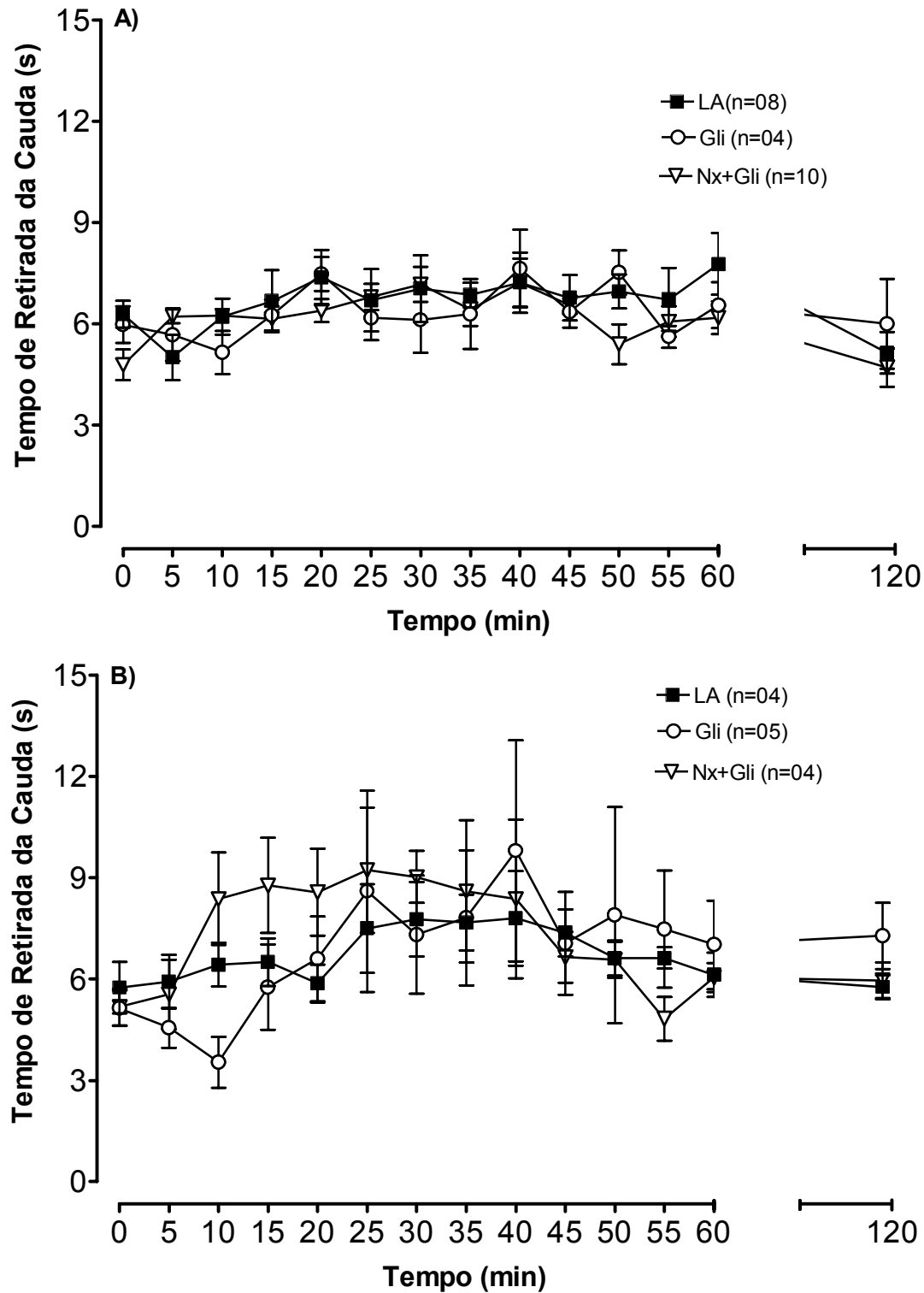


Figura 12. Efeito das microinjeções de glicina no colículo superior e no aqueduto de Sylvius em ratos submetidos ao teste do *tail flick*. A microinjeção de glicina (Gli, 100 nmoles) no colículo superior (A) ou no aqueduto de Sylvius (B) 5 min antes do estímulo térmico, não alterou de forma significativa o tempo de retirada da cauda (TRC) dos animais submetidos ao teste do *tail flick*, comparada com a microinjeção controle de líquido artificial (LA). Da mesma forma, naloxona (1,0 mg / kg, s.c.) aplicada 50 min antes da microinjeção de glicina (Nx+Gli), também não provocou mudanças significativas no TRC em ambas estruturas (A e B). Os dados estão representados em forma de média \pm epm dos TRCs, a cada 5 minutos após as microinjeções, durante 60 e aos 120 minutos. No tempo=0 min estão ilustrados os valores basais. Os resultados foram analisados estatisticamente através da ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

No modelo de incapacitação articular induzida por formalina utilizado neste trabalho, diferentes fármacos provocaram antinocicepção, entre eles, a morfina, o diclofenaco e o midazolam. Além desses, a glicina aplicada na SCPdl também mostrou potente antinocicepção, a qual foi totalmente revertida pelo 7-cloroquinurênico e parcialmente bloqueada pela naloxona.

O modelo nociceptivo deste estudo teve como base o modelo de nocicepção articular inicialmente proposto por Tonussi e Ferreira (1992), com a finalidade de medir a incapacitação articular induzida por formalina. Nos últimos anos, a articulação do joelho de ratos tornou-se um modelo importante para o estudo da nocicepção de tecido profundo (Heppelmann e Pawlak, 1997; Heppelmann *et al.*, 2000).

Como foi mostrado no presente trabalho, a injeção de formalina na articulação do joelho dos animais provocou reação de proteção ao membro afetado, a qual foi registrada através do aumento do tempo de elevação da pata durante a marcha forçada no cilindro rotatório. Como geralmente observado nos modelos subcutâneos usando formalina como estímulo nociceptivo, os animais exibiram duas fases de resposta nocifensiva interpostas por um período de quiescência. Essa comparação é importante uma vez que sugere que os mecanismos neurofisiológicos nociceptivos da articulação são os mesmos daqueles encontrados no tecido subcutâneo na sua capacidade de responder a formalina.

O teste de formalina é um importante modelo de dor persistente, no qual a duração dos comportamentos nociceptivos é de aproximadamente 1 hora (Dubuisson e Dennis, 1977; Abbot *et al.*, 1995). A primeira fase de resposta nocifensiva da formalina (dor aguda) está relacionada à ativação direta dos nociceptores, devido à estimulação química periférica (Wheeler-Aceto e Cowan, 1991; Taylor *et al.*, 2000). Na segunda fase (dor tônica), os comportamentos nociceptivos são gerados pela contínua estimulação dos nociceptores por mediadores inflamatórios e/ou por uma hiperexcitabilidade da medula espinhal induzida pela primeira fase (sensibilização central) (Dickenson e Sullivan, 1987;Coderre *et al.*, 1990; Tjolsen *et al.*, 1992 e Taylor *et al.*, 1995). O período de quiescência se deve a inibição da transmissão nociceptiva através dos circuitos

supraespinhais (Matthies e Franklin, 1992) bem, como dos circuitos espinhais (Kaneko e Hammond, 1997).

Neste trabalho, as duas fases de resposta nocifensiva da formalina intra-articular foram completamente bloqueadas pela morfina aplicada subcutaneamente 60 minutos antes do teste. Utilizou-se 4 mg / Kg de morfina uma vez que essa dose foi observada produzindo efeito antinociceptivo máximo no modelo inflamatório de artrite induzida por carragenina (Tonussi e Ferreira, 1992). No presente estudo, a eficácia do efeito da morfina e o seu antagonismo pela naloxona revelaram a sensibilidade deste modelo em relação aos analgésicos opióides.

A morfina é um protótipo agonista dos receptores opióides do tipo μ os quais medeiam a analgesia (por mecanismos pré e pós-sinápticos) em múltiplos sítios do sistema nervoso central. No corno dorsal da medula espinhal, os agonistas dos receptores opióides do tipo μ podem bloquear a transmissão da dor, através da inibição direta da liberação de neurotransmissores dos nociceptores juntamente com a diminuição da despolarização sináptica. Ao nível supra-espinhal, os agonistas opióides do tipo μ atuam nas estruturas que formam o circuito modulatório da dor: córtex insular, amígdala, hipotálamo, SCP, DLPT e RVM (para revisão, ver Fields, 2004). Além disso, está bem estabelecido que os agonistas opióides endógenos e exógenos também causam antinocicepção periférica (Ferreira e Nakamura, 1979; Levine e Taiwo, 1989) através de seus receptores expressos nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais em condições inflamatórias (Stein *et al*, 1988; 1989). Sendo assim, poderíamos sugerir que os mecanismos opióides endógenos (central e periférico) apresentam importante papel na modulação das duas fases do modelo de incapacitação articular induzido por formalina.

Além da sensibilidade aos analgésicos opióides, o fato dos animais terem que obrigatoriamente caminhar no cilindro permite que o modelo de incapacitação articular induzida por formalina discrimine o efeito analgésico puro daqueles outros efeitos dos opióides na atividade locomotora (sedação, incoordenação, catalepsia e etc). Essa característica foi observada no tratamento com fentanil (outro agonista opióide do tipo μ), o qual causou queda recorrente dos animais do cilindro, na dose de 50 μ g / kg,

geralmente usada como analgésica (Abram *et al.*, 1997).

Ao contrário, o inibidor das cicloxigenases, o diclofenaco (Oliw *et al.*, 1978), produziu antinocicepção somente na segunda fase de resposta induzida pela formalina. A cicloxigenase é uma enzima chave na conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (PGs). Duas isoformas de cicloxigenases (COXs) são conhecidas: COX-1, enzima expressa constitutivamente, responsável pela produção de PGs as quais medeiam funções homeostáticas e a COX-2, enzima induzida, responsável pela produção de PGs durante a inflamação (Vane *et al.*, 1998). Na dor inflamatória produzida pela formalina existem evidências que a COX-1 periférica tenha uma participação mais importante do que a COX-2 (Torres-Lopez *et al.*, 2002). As PGs produzidas podem contribuir com mecanismos excitatórios através da supressão da condutância de K^+ e aumento na condutância de Na^{++} (e Ca^{++}) pelos nociceptores (para revisão, ver Millan, 1999). A intensidade dos efeitos inibitórios do diclofenaco obtidos aqui nesse trabalho sugere que, como no tecido subcutâneo, a produção de prostaglandinas é um componente importante da nocicepção articular na segunda fase de resposta nocifensiva da formalina (Tjolsen *et al.*, 1992), e que este modelo pode ser usado como um teste sensível para detecção de antiinflamatórios não-esteroidais.

Duas doses de diclofenaco foram usadas no presente estudo. A menor dose foi observada produzindo efeito antinociceptivo máximo no modelo inflamatório de artrite induzida por carragenina (Tonussi e Ferreira, 1994) e LPS (Motta *et al.*, 2003), enquanto que a maior dose foi observada produzindo máximo efeito anti-edematogênico no modelo de artrite induzida por LPS (Bressan, artigo em edição). A alta eficácia da menor dose de diclofenaco foi previamente vista ser mediada por mecanismo dependente da via óxido nítrico/monofosfato de guanosina cíclico (NO/GMPc), e pela abertura de vários tipos de canais de potássio no neurônio aferente primário (Tonussi e Ferreira, 1994; Ortiz *et al.*, 2002), enquanto a maior dose parece ser mediada pela inibição da síntese de prostaglandinas, como sugerido pelo efeito anti-edematogênico. Os resultados desse estudo com o diclofenaco sugerem que provavelmente a ativação da via do óxido nítrico não foi suficiente para produzir efeito antinociceptivo no presente modelo. Talvez o uso combinado do diclofenaco com os promotores da via do óxido nítrico como o inibidor da fosfodiesterase do GMPc (Asomoza-Espinosa *et al.*, 2001;

Patil *et al.*, 2003), pudesse mostrar o efeito antinociceptivo do diclofenaco em baixas doses.

Desta maneira, o efeito observado das drogas opióides e dos antiinflamatórios não-esteroidais segue a mesma linha dos testes de formalina clássicos (Tjolsen *et al.*, 1992), e reforça a confiabilidade deste método como uma ferramenta segura para estudos de nocicepção.

O efeito do benzodiazepínico (BZD) midazolam no teste de incapacitação articular induzido por formalina foi inconsistente. A dose de 0,25 mg / kg que havia mostrado efeito ansiolítico no teste do *pluz maze* (Bertoglio e Carobrez, 2002) provocou neste trabalho, potente antinocicepção. Por outro lado, a dose de 1,0 mg / kg a qual Tatsuo e colaboradores (1997) haviam mostrado efeito pró-nociceptivo, não produziu efeito na resposta nocifensiva no presente estudo.

Os BZDs modulam alostericamente o complexo receptor tipo A para o ácido gama-aminobutírico (GABA), o receptor GABA_A. Este receptor está amplamente distribuído no sistema nervoso central dos mamíferos e é caracterizado por uma estrutura heteropentamérica ligada a um canal aniônico (Sigel *et al.*, 1983). A ativação deste complexo receptor produz aumento na condutância de Cl⁻ na membrana e inibição neuronal (para revisão, ver Korpi *et al.*, 2002).

Os efeitos sedativos, hipnóticos e ansiolíticos dos BZDs estão bem estabelecidos. Entretanto, os efeitos dos BZDs na nocicepção ainda permanecem obscuros. Estas drogas foram encontradas produzindo moderada antinocicepção (Pang *et al.*, 2001; Zambotti *et al.*, 1991), nenhum efeito (Palaoglu e Ayhan, 1986; Tonussi e Ferreira, 1992; Gatch, 1999) e até mesmo efeito pró-nociceptivo (Tatsuo *et al.*, 1999). Somado a isso, muitos autores mostraram um bloqueio da antinocicepção induzida pela morfina (Palaoglu e Ayhan, 1986; Daghero *et al.*, 1987) bem como da antinocicepção não narcótica (Pukulaska e Czarnecka, 2001) pelos benzodiazepínicos, enquanto outros mostraram uma potencialização de um analgésico não narcótico como alprazolam (Dolezal e Krsiak, 2002).

Sabe-se que a nocicepção oriunda dos tecidos cutâneos e profundos ativa diferentes regiões da SCP (Keay *et al.*, 2000) e amígdala (Neugebauer *et al.*, 2004), ambas as estruturas que integram os comportamentos afetivo e nociceptivo, e

envolvidas na ativação das projeções modulatórias descendentes para o corno dorsal da medula espinhal. O medo e a ansiedade podem alterar a nocicepção humana e animal em ambas as direções dependendo da sua origem. Por exemplo, o medo e a ansiedade mostraram atenuar a nocicepção cutânea (Fanselow e Helmstetter, 1988; Conceição *et al.*, 1992; Helmstetter, 1993; Rhudy *et al.*, 2004) e aumentar ou não afetar a nocicepção de origem profunda (Conceição *et al.*, 1992; Gunter *et al.*, 2000; Norton e Asmundson, 2004). Os BZDs podem reverter a antinocicepção induzida pelo estresse, provavelmente atenuando a excitação dos circuitos antinociceptivos endógenos ativados pelo medo e pela ansiedade (Fanselow and Helmstetter, 1988; Helmstetter, 1993), o que também pode explicar o efeito hiperalgésico dessas drogas nos modelos de dor cutânea. Por outro lado, a ansiedade facilita a nocicepção persistente dos tecidos profundos (Neugebauer *et al.*, 2004) e o uso de BDZ poderia resultar em uma antinocicepção. Essa idéia poderia explicar a antinocicepção do midazolam em camundongos em um modelo de nocicepção visceral (Nunes-de-Souza *et al.*, 2000). Isto pode ser um dos fatores responsáveis pelo marcante efeito antinociceptivo obtido neste trabalho com o midazolam e os encontrados na literatura, porém não explica a ausência de efeito antinociceptivo com a maior dose de midazolam.

Injeções de agonista do receptor GABA_A na porção rostral ventromedial do bulbo RVM (Gilbert e Franklin, 2001) ou injeções intra-cerebroventricular de BZDs (Tatsuo *et al.*, 1999) aumentaram fortemente a nocicepção. De uma maneira oposta, os BZDs injetados na medula, produzem antinocicepção em muitos modelos (Niv *et al.*, 1988; Zambotti *et al.*, 1991). Analisando esses dados, não é difícil argumentar que muito dos resultados contraditórios sobre o efeito na nocicepção dos BZDs administrados por via sistêmica relatado na literatura podem ser conseqüência das diferentes ações dessa classe de drogas nos circuitos espinhais e supraespinhais. Com isso, poderia se sugerir que a menor dose de midazolam utilizada neste estudo (0,25 mg / kg) estaria facilitando o mecanismo inibitório GABAérgico no corno dorsal, enquanto a maior dose (1,0 mg / kg) estaria inibindo as projeções supraespinhais descendentes inibitórias, como proposto por Gilbert e Franklin (2001). Essa inibição do sistema inibitório descendente é consistente com a tendência de um aumento da

nocicepção observada no período de quiescência daqueles animais tratados com a maior dose de midazolam.

O pentilenotetrazol é uma droga ansiogênica que vem sendo cada vez mais utilizada nos estudos de comportamento animal (para revisão, ver Jung *et al.*, 2002). Também atua no receptor GABA_A, no entanto de maneira antagônica aos BZDs. Os dados do presente trabalho mostram que similarmente aos BZDs na maior dose, o pentilenotetrazol não apresentou efeito sobre a resposta nocifensiva da formalina, mas mostrou tendência em aumentar a nocicepção do período de quiescência. Esses resultados diferem-se da literatura a qual mostra que na mesma dose subconvulsivante e ansiogênica de 30 mg / kg (De-Souza *et al.*, 1998) utilizada neste estudo, o pentilenotetrazol mostrou-se antinociceptivo em modelos cutâneos de nocicepção térmica e mecânica (Conceição *et al.*, 1992; Rocha *et al.*, 1999). No entanto, como foi discutido anteriormente, no modelo articular aqui utilizado, o medo e/ou a ansiedade poderiam estar aumentando a sensibilidade da nocicepção persistente induzida pela formalina.

Existem evidências sugestivas que a SCP, parte da área límbica mesencefálica, é um local de integração importante do sistema nervoso central, capaz de controlar os estados motivacionais dos animais. Além de ser um importante sítio para o processamento de medo e ansiedade, a SCP é o principal componente do sistema descendente inibitório da dor (para revisão, ver Behbehani, 1995). A SCP pode ser dividida em quatro colunas longitudinais (dorso-lateral, dorso-medial, lateral e ventro-lateral) em virtude das suas características imunoistoquímicas, densidade de receptores, conexões e funções (Bandler e Shipley, 1994; Bandler e Keay, 1996) A ativação, em muitas espécies, da região dorsal da SCP através de estímulos elétricos ou químicos provoca reações aversivas e antinocicepção (Bandler e Carrive, 1988). Em nosso estudo, a estimulação química da região dorso-lateral da SCP (SCPdl) também causou antinocicepção nos dois modelos de dor utilizados.

A microinjeção na SCPdl de glicina (100 nmoles) teve efeito antinociceptivo, tanto na incapacitação articular, quanto no *tail flick*. Os dados da literatura mostram a importância da glicina, além do glutamato e do GABA, na modulação da nocicepção pela SCP (Betz *et al.*, 1991) e através dos resultados desse trabalho, mostramos o

envolvimento deste aminoácido na antinocicepção mediada através da região dorso-lateral da SCP.

A localização histológica dos sítios das injeções revelou que o efeito antinociceptivo da glicina, nos dois modelos algesimétricos não ocorreu 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 tal efeito. 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 espraio de 0,3 µl de glicina não ultrapassou a região dorsal, tendo em vista que as injeções no colículo superior e no aqueduto de Silvius (regiões limítrofes) não induziram alteração significativa no comportamento nociceptivo.

Está bem reconhecido que juntamente com a antinocicepção, a ativação elétrica ou química das regiões dorsal e dorso-lateral da SCP, produzem em ratos, comportamentos aversivos caracterizados por reações de “luta ou fuga” (corridas, pulos) e ativação de respostas autonômicas (hipertensão arterial, taquicardia e redistribuição de sangue para a musculatura esquelética) (Bandler e Carrive, 1988; Bandler *et al.*, 2000). De forma que, para alguns autores, esses achados sugerem que a antinocicepção da região dorso-lateral da SCP é apenas secundária à estimulação aversiva do cérebro, uma forma de analgesia induzida por estresse (Fardin *et al.*, 1984, Prado e Roberts, 1985; Sandner *et al.*, 1987; Jensen e Yaksh, 1992), porém para outros, a antinocicepção mediada pela SCPdl é um componente integrado das respostas de defesa (Morgan *et al.*, 1987; Fanselow, 1991; Bandler e Shipley, 1994; Behbehani, 1995; Morgan *et al.*, 1998). Apesar da glicina ter mostrado efeito do tipo ansiogênico quando injetada na SCPdl (Schmitt *et al.*, 1995; De-Souza *et al.*, 1998; Teixeira e Carobrez, 1999), este achado não sugere que o efeito antinociceptivo da glicina revelado neste estudo seja secundário a estimulação aversiva da SCPdl, uma vez que, como já foi discutido, no modelo de incapacitação articular, o medo e/ou a ansiedade poderiam aumentar a nocicepção persistente induzida pela formalina (Neugebauer *et*

al., 2004). Desta forma, poderíamos atribuir que o efeito antinociceptivo da estimulação química com glicina da SCPdl faz parte das reações de defesa coordenadas por essa região .

De acordo com os resultados no modelo de incapacitação articular, o efeito antinociceptivo da glicina foi mediado pelos receptores NMDA na SCPdl. O antagonista seletivo dos receptores glicina-B, o ácido 7-cloroquinurênico, aplicado juntamente com a glicina, bloqueou totalmente a antinocicepção. Esses resultados corroboram a grande maioria dos trabalhos os quais exaltam a ação antinociceptiva através do receptor NMDA na SCP, como os aminoácidos excitatórios (Jensen e Yaksh, 1984; Carstens *et al.*, 1990; Jensen e Yaksh, 1992) os análogos do NMDA (Jacquet, 1988; Siegfried *et al.*, 1989; Jensen e Yaksh, 1992). O efeito antinociceptivo oriundo da ativação dos receptores NMDA é conseqüência, de uma forma geral, da liberação de neurotransmissores antinociceptivos (dopamina, norepinefrina e serotonina) dos neurônios das vias bulbo-espinhais (Fink *et al.*, 1992). Em adição, trabalhos recentes mostraram que os neurônios glutamatérgicos da SCP ativam diretamente as células-*off* e inibem as células-*on* do RVM (Tortorici e Morgam, 2002).

Não obstante, a ação da glicina microinjetada na SCPdl observada nesse trabalho e o seu antagonismo pelo ácido 7-cloroquinurênico, confirma que o sítio da glicina no receptor NMDA não estava saturado e foi passível de modulação. Essa evidência está de acordo com outros autores os quais mostraram que os receptores glicina-B (tanto os não ocupados quanto os de baixa afinidade) foram ativados pela injeção de glicina na SCPd e SCPdl (De-Souza *et al.*, 1998; Teixeira e Carobrez, 1999). A glicina, assim como o glutamato é mantida em baixas concentrações extracelulares por meios específicos de recaptção (Legendre, 2001). Esse deve ser o motivo pelo qual o efeito antinociceptivo da injeção prévia de glicina aos trinta minutos foi menos prolongado que aquele observado quando da injeção cinco minutos antes do teste de incapacitação articular.

Analisando os dados com as duas doses de glicina utilizadas neste trabalho, pode ser observado que a estimulação da SCP induziu diferentes comportamentos nociceptivos. Na menor dose (50 nmoles), apenas a região ventro-lateral foi capaz de

mediar os efeitos antinociceptivos desse aminoácido. Estudos prévios mostraram que ocorre uma diminuição da concentração de glicina extracelular na SCPvl durante a resposta bifásica nociceptiva da formalina subcutânea (Maione *et al.*, 2000), bem como durante as respostas a outros estímulos nociceptivos periféricos (Pourcho *et al.*, 1992; Sherman *et al.*, 1997). Além disso, a maior parte da glicina liberada deve estar atuando principalmente nos receptores NMDA (Viu *et al.*, 1998). As colunas da SCP são diferentemente ativadas conforme a resposta afetiva da dor (Keay e Bandler, 2002). Por exemplo, através do uso do proto-oncogene *c-fos*, a dor considerada escapável (fásica e oriunda de tecidos cutâneos) promoveu a ativação principalmente das regiões dorsolateral e lateral; por outro lado, a dor inescapável (persistente e geralmente oriunda tecidos profundos) ativou principalmente a região ventrolateral da SCP (Rodella *et al.*, 1998; Lumb *et al.* 2002). Esse fato poderia explicar a potência da analgesia da glicina mediada pela região ventro-lateral da SCP.

De maneira contrária, os mesmos 50 nmoles de glicina microinjetados na SCPdl provocaram forte inibição do período de quiescência. Tanto na SCP quanto no corno dorsal da medula espinhal, a glicina inibe a despolarização evocada pelo glutamato e reprime os disparos neuronais (Min *et al.*, 1996). Além disso, algumas pesquisas vêm sugerindo que a analgesia dos opióides na SCP se deve, pelo menos em parte, pela supressão das influências inibitórias da glicina sobre os neurônios que formam parte das vias descendentes que controlam a dor (Min *et al.*, 1996; Onaka *et al.*, 1996). Desta forma, é possível sugerir que a ação pró-nociceptiva da glicina revelada nessa dose, seja conseqüência da ativação dos receptores para a glicina ligados a canais de Cl⁻ localizados em maior concentração na região dorsolateral da SCP (Fujita *et al.*, 1991 e Fujiwara *et al.*, 1998). Embora alguns trabalhos também sugiram a participação dos receptores NMDA da SCP em sistemas pró-nociceptivos (Jensen e Yaksh, 1992; Vaccarino *et al.*, 1997, Suman *et al.*, 1998).

O efeito antinociceptivo que decorre da estimulação elétrica ou química da SCP está bem estabelecido (Reynolds 1969; Mayer *et al.*, 1971; Mayer e Price, 1976; Jensen e Yaksh, 1992). No entanto, o que se tem evidenciado é que existe mais de um sistema antinociceptivo dentro da SCP com substratos neuroquímicos diferentes. A grande maioria dos autores mostrou que a naloxona somente reverte analgesia produzida pela

estimulação da região ventral ou ventro-lateral (Cannon *et al.*, 1982; Fardin *et al.*, 1984; Carstens e Watkins, 1986; Thorn *et al.*, 1989; Nichols *et al.*, 1989; Van-Praag e Frenk, 1991) e a partir desses dados sugeriram um sistema opioidérgico ventral e um sistema não-opioidérgico dorsal. Além disso, a analgesia da região ventral apresentou ter tolerância mais pronunciada e mais aguda (Morgan e Liebeskind, 1987; Tortorici *et al.*, 1999). Os resultados com a naloxona no modelo de incapacitação articular induzida por formalina no presente trabalho, não são totalmente contrários a idéia de dois sistemas antinociceptivos dentro da SCP. Entretanto, o fato desse antagonista opióide ter revertido, pelo menos em parte, o efeito antinociceptivo da glicina na SCPdl, sugere também uma via opioidérgica na antinocicepção da coluna dorso-lateral da SCP.

Antes das possíveis explicações da reversão da naloxona, é válido destacar que, no modelo de incapacitação articular estudado neste trabalho, a naloxona (1,0 mg/ kg) sozinha não foi capaz de alterar o efeito nociceptivo da formalina. Nos modelos de aplicação subcutânea da formalina, a naloxona também mostrou não ter efeito sobre a resposta nocifensiva (North, 1978; Kocher, 1988; Pertovaara *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1997).

A reversão da analgesia pela naloxona pode depender de alguns critérios, por exemplo, do estímulo nociceptivo periférico aplicado (Jensen e Yaksh, 1984), uma vez que o estímulo fásico e o estímulo tônico podem tanto utilizar vias diferentes para produção quanto para supressão dor (Ryan *et al.*, 1985). Em todos os trabalhos nos quais a naloxona não reverte a analgesia provocada pela estimulação elétrica da SCPd, o estímulo utilizado foi de nocicepção fásica (Cannon *et al.*, 1982; Fardin *et al.*, 1984; Thorn *et al.*, 1989; Nichols *et al.*, 1989; Van-Praag e Frenk, 1991), incluindo os nossos resultados com o teste do *tail flick*. Ao contrário, o uso de um estímulo tônico (formalina intra-articular) neste trabalho evidenciou, pelo menos em parte, um componente opióide nos efeitos antinociceptivos mediados pela SCPdl.

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.*, 1999). 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 analgesia provocada pelo estímulo de alta intensidade, esse não altera o efeito antinociceptivo final da SCPd.

O fato é que, além dos critérios expostos acima, as regiões dorso-lateral e ventro-lateral da SCP se intercomunicam (Nichols e Thorn, 1990; Jansen *et al.*, 1998). E, seguindo essa linha de raciocínio, pode-se sugerir que de alguma forma a ativação com glicina da SCPdl e/ou o modelo de nocicepção tônica e profunda, estudados nesse trabalho, podem também estar ativando indiretamente vias opioidérgicas envolvidas na antinocicepção mediada pela região ventro-lateral da SCP.

Outros resultados com a naloxona que também são de relevância, foram os revelados no teste do *tail flick*. Neste teste, o reflexo de retirada da cauda exposto a um estímulo térmico como todos os reflexos medulares, está sujeito a ser controlado por estruturas supraespinhais (Mitchell e Hellon, 1977). A literatura mostra que tanto a estimulação elétrica (Cannon *et al.*, 1982; Aimone e Gehart, 1986; Morgam e Franklin, 1988) quanto a química (Van-Praag e Frenk, 1990; Jensen e Yaksh, 1992) da SCP provoca aumento da latência do *tail flick*, isto é, antinocicepção. A ativação da SCPdl com glicina utilizada no presente estudo também provocou antinocicepção neste modelo, contudo de uma maneira surpreendente a injeção subcutânea de naloxona (1,0 mg / kg, 50 min antes) potencializou a ação da glicina. Efeito similar foi observado em um trabalho publicado 1980, por Urca e seus colaboradores, no qual a naloxona numa dose maior (10 mg / kg) potencializou o efeito antinociceptivo no *tail flick* do glutamato microinjetado na SCP. A literatura mostra que os opióides têm potencial para modular os receptores NMDA na SCP. Estudos *in vitro* revelaram uma freqüente co-localização dos receptores opióides do tipo μ e receptores glutamatérgicos do tipo NMDA nas membranas pós-sinápticas dos neurônios da SCP (Commons *et al.*, 1999). Além disso, através de técnicas de *patch clamp*, mostrou-se que os opióides inibem tanto as

transmissões sinápticas GABAérgicas quanto as glutamatérgicas (Vaughan e Christie, 1997). Desta maneira, poderíamos sugerir que neste trabalho o efeito potencializador da naloxona sobre a antinocicepção da glicina no teste do *tail flick*, foi consequência da desinibição dos neurônios glutamatérgicos através do bloqueio dos receptores opióides do tipo.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o sítio para glicina no receptor NMDA localizados na SCPdl é passível de modulação. Além disso, foi mostrado pela primeira vez o efeito antinociceptivo da glicina microinjetada na SCPdl de ratos, o que mostra uma das funções desse aminoácido nessa estrutura. A glicina deve estar ativando as vias modulatórias que se projetam para o corno dorsal da medula espinhal, com a finalidade de inibir o estímulo nocivo. Provavelmente, esse efeito antinociceptivo da SCPdl deve fazer parte do sistema de defesa integrado gerado por essa região, do qual os efeitos aversivos também fazem parte.

Os resultados deste estudo sugerem ainda que esta antinocicepção provocada pela estimulação da SCPdl apresenta componentes opióides, mas que estes para serem observados dependem da intensidade do estímulo usado para ativar a região e/ou do modelo nociceptivo empregado.

Em relação ao modelo de incapacitação articular induzida por formalina, podemos sugerir que, além de uma ferramenta com sensibilidade e especificidade confiáveis para o estudo de analgésicos clássicos, pode ajudar a predizer outros fatores dos quais a analgesia precisa para ser revelada ou mantida. Desta forma, poderíamos sugerir ainda o emprego deste modelo nos estudos de dor profunda, uma vez que a dor de origem somática profunda e visceral é o tipo de maior relevância clínica não apenas devido suas características patológicas intrínsecas, mas também pelo fato de mostrarem com maior intensidade respostas emocionais e comportamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, 60: 91-102, 1995.
- ABRAM, S.E.; MAMPILY, G.A.; MILOSAVLJEVIC, D. Assessment of the potency and intrinsic activity of systemic versus intrathecal opioids in rats. *Anesthesiology*, 87: 127-134, 1997.
- 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. **Journal of Neuroscience**, 6 (6): 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. **Neuroscience Letters**, 2; 118(1): 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 Research Bulletin**, 39: 7-15, 1996.
- APRISON, M.H. The discovery of neurotransmitter role of glycine. In: OTTERSEN, O.; STORM-MATHISEN, J. **Neurotransmission**, John Wiley, Chichester, p.1-13, 1990.
- ASOMOZA-ESPINOSA, R.; ALONSO-LOPEZ, R.; MIXCOATL-ZECUATL, T.; AGUIRRE-BANUELOS, P.; TORRES-LOPEZ, J.E.; GRANADOS-SOTO, V. Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. **European Journal Pharmacology**, 27; 418 (3): 195-200, 2001.

- BANDLER, R.; CARRIVE, P. Integrated defense reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal gray region of restrained cat. **Brain Research**, 439: 95-106, 1988.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A. Elicitation of intraspecific defense reactions in the rat from midbrain periaqueductal gray by microinjection of kainic acid, without neurotoxic effects. **Neuroscience Letters**, 88: 281-296, 1988.
- BANDLER, R.; DEPAULIS, A.; VERGNES, M. Identification of midbrain neurones mediating defensive behavior in the rat by microinjection of excitatory amino acid. **Behavioural. Brain Research**, 15: 107-119, 1985.
- BANDLER, R.; KEAY, K.A. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and integration of emotional expression. In: HOLSTEGE , G.; BANDLER, R.; SAPER, C. **Progress in Brain Research**, vol 107, Elsevier, Amsterdam, p.285-300,1996.
- BANDLER, R.; KEAY, K.A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Research Bulletin**, 53: 95-104, 2000.
- BANDLER, R.; SHIPLEY MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends in Neuroscience**, 17: 379-389, 1994.
- BARBARO, N.M.; HEINRICHER, M.M.Z.; FIELDS, H.L. Putative pain modulating neurons in rostral ventral medulla: reflex-related activity predicts effects of morphine. **Brain Research**, 366: 203-210, 1986.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS H.L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Annals of Neurology**, 4: 451-162, 1978.

- BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Prior maze experience required to alter midazolam effects in rats submitted to the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, 72 (1-2): 449-455, 2002.
- BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, 46: 575-605, 1995.
- BEHBEHANI, M.M.; FIELDS, H.L. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. **Brain Research**, 170: 85-93, 1979.
- BERNARD, J.F.; BESTER, H.; BESSON, J.M. Involvement of the spino-parabrachio - amygdaloid and -hypothalamic pathways in the autonomic and affective emotional aspects of pain. **Progress in Brain Research**, 107: 243-255, 1996.
- BERRINO, L.; MAIONE, S.; LAMPA, E.; ROSSI, F. Modulation by glycine on vascular effects of NMDA: in vivo experimental research. **Amino Acids**, 5: 239-244, 1993.
- BESSON, J.M. Anatomical and biochemical strategy of pain suppressing systems. **Cephalalgia**, 7 (6):19-22, 1987.
- BETZ, H. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. **Trends in Neurosciences**, 14: 458-461, 1991.
- 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. **The Journal of Comparative Neurology**, 351: 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 Research**, 243: 315-321, 1982.
- CAROBREZ, A.P.; TEIXEIRA, K.V.; GRAEFF, F.G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, 25: 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 Physiologica Scandinavica**, 63: 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**, 43 (1): 105-12, 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 Research**, 382: 266-277, 1986.
- CERVERO, F. What is a nociceptor-specific (class 3) cell? **Pain**, 62(1): 123-125, 1995.
- CHIENG, B.; CHRISTIE, M.J. Inhibition by opioids acting on μ -receptors of GABAergic and glutamatergic postsynaptic potentials in single rate PPX neurons *in vitro*. **British Journal of Pharmacology**, 113: 303-309, 1994.
- 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. **Experimental. Brain Research**, 67: 594-602, 1987.

- CODERRE, T.J.; VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Research**, 535: 155-158, 1990.
- COFFIELD, J.A.; BOWEN, K.K.; MILETIC V. Retrograde tracing of projections between the nucleus submedius, the ventrolateral orbital cortex, and the midbrain the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 321: 488-499, 1992.
- 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. **Behavioural Brain Research**, 87: 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. **Behavioural Brain Research**, 50: 77-83, 1992.
- COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**, 6;138(1):17-28, 2003
- COMMONS, K.G.; VAN-BOCKSTAELE, E.J.; PFAFF, D.W. Frequent colocalization of μ opioid and NMDA-type glutamate receptors at post-synaptic sites in periaqueductal gray neurons. **Journal of Comparative Neurology**, 408: 549-559, 1999.
- CONCEIÇÃO; I.M.; MAIOLINI Jr, M.; MATTIA, N.; VITAL, M.A; SANTOS, B.R.; SMAILI, S.; FRUSSA-FILHO, R. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, 25 (8): 831-834, 1992.
- CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (eds) **Textbook of pain**. 4 th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, p.183-214. 1999.

- CZEPITA, D.; DAW, N.W.; REID, S.N. Glycine at the NMDA receptor in cat visual cortex: saturation and changes with ages. **Journal of Neurophysiology**, 75 (1): 311-317, 1996.
- DAGHERO, A.M.; BRADLEY, E.L.J.R.; KISSIN, I. Midazolam antagonizes the analgesic effect of morphine in rats. **Anesthesia & Analgesia**, 66 (10): 944-947, 1987.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 72: 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. **Journal of Neurophysiology**, 69 (4): 1071-1081, 1993.
- DEPAULIS, A.; BANDLER, R.; VERGNES. Characterization of pretentorial periaqueductal gray matter neurons mediating intraspecific defensive behaviors in the rat by microinjection of kainic acid. **Brain Research**, 486: 121-132, 1989.
- DE-SOUZA, M.M.; SCHENBERG, L.C.; CAROBREZ, A.P. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. **Behavioural Brain Research**, 90: 157-165, 1998.
- DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neuroscience Letters**, 83: 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 Research Reviews**, 46 (2): 131-145, 2004.

- DOLEZAL, T.; KRSLAK, M. Augmentation of analgesic effect of ibuprofen by alprazolam in experimental model of pain. **Physiological Research**, 51 (2): 179-184, 2004.
- 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**, 4 (2): 161-174, 1977.
- 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**. Plenum press, New York, p.1-8, 1991.
- FANSELOW, M.S.; HELMSTETTER, F.J. Conditional analgesia, defensive freezing, and benzodiazepines. **Behavioural Neuroscience**, 102 (2): 233-243, 1988.
- FARDIN, V.; OLIVERAS, J.L.; BESSON, J.M. A reinvestigation of the analgesics effects induced by stimulation of periaqueductal gray matter in the rat. II Differential characteristics of analgesia induced by ventral and dorsal PAG stimulation. **Brain Research**, 306:125-139, 1984.
- FEDYNYSHYN, J.P.; KWIAT, G.; LEE, N.M. Characterization of high affinity opioid binding sites in periaqueductal gray P2 membrane. **Journal of Pharmacology**, 159: 83-88, 1989.
- FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. III-Prostaglandin hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for analgesic action of opioid-antagonist. **Prostaglandins**, 18: 201-208, 1979.
- FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Neuroscience**, 5: 565-575, 2004.

- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanism of pain modulation. In: WALL, P.D.; MELZACK, R.(eds). **Textbook of pain**. 4 th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, p.243-257, 1999.
- FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review of Neuroscience**, 14: 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. **British Journal of Pharmacology**, 106: 67-72, 1992.
- 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 Research**, 560: 23-37,1991.
- FUJIWARA, K.; KAMINISHI, Y.; INOUE, Y.; YABUUCHI, M. Monoclonal antibody monospecific to glycine for brain immunocytochemistry. **Brain Research**, 806: 210-218, 1998.
- GATCH, M.B. Effects of benzodiazepines on acute and chronic ethanol-induced nociception in rats. **Alcoholism: Clinical & Experimental Research**, 23 (11): 1736-1743, 1999.
- GILBERT, A.K.; FRANKLIN, K.B. GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. **Pain**, 1; 90 (1-2): 25-36, 2001.
- GUIMARÃES, A.P.C.; PRADO, W.A. Antinociceptive effects of carbachol microinjected into different portions of mesencephalic periaqueductal gray matter of the rat. **Brain Research**, 647: 220-230, 1994.

- GUNTER, W.D.; SHEPARD, J.D.; FOREMAN, R.D.; MYERS, D.A.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. Evidence for visceral hypersensitivity in high-anxiety rats. **Physiology Behavior**, 69 (3): 379-382, 2000.
- HAGBARTH, K.E.; KERR, D.I.B. Central influences on spinal afferent conduction. **Journal of Neurophysiology**, 17: 295-307, 1954.
- HEAD, H.; HOLMES, G. Sensory disturbances from cerebral lesions. **Brain**, 34: 102-254, 1911.
- HELMSTETTER, F.J. Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**; 44 (2): 433-438, 1993.
- HENNESSEY, A.C.; CAMAK, L.; GORDON, F.; EDWARDS, D.A. Connections between the pontine central gray and the ventromedial hypothalamus are essential for lordosis in female rats. **Behavioral Neuroscience**, 104: 477-488, 1990.
- HEPPELMANN, B.; PAWLAK, M. Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed joints of the rat. **Pain**, 73: 377-382, 1997.
- HEPPELMANN, B.; JUST, S.; PAWLAK, M. Galanin influences the mechanosensitivity of sensory endings in the rat knee joint. **European Journal of Neuroscience**, 12: 1567-1572, 2000.
- HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Neuroscience**, 2: 83-91, 2001.
- IASP (International Association for Study of Pain). Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16: 09-110, 1995.

JACQUET, Y.F. The NMDA receptor: central role in pain inhibition in rat periaqueductal gray. **European Journal of Pharmacology**, 23; 154 (3): 271-276, 1988.

JÄNIG W, Relationship between pain and autonomic phenomena in headache and other pain conditions. **Cephalalgia**, 23 (1): 43-48, 2003.

JANSEN, A.S.P.; FARKAS, E.; SAMS, J.M; LOWEY, A.D. Local connections between the columns of the periaqueductal gray matter: a case for intrinsic neuromodulation. **Brain Research**, 784: 329-336, 1998.

JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brainstem sites. **Brain Research**, 12; 321 (2): 287-297, 1984.

JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. The antinociceptive activity of excitatory amino acids in the rat brainstem: an anatomical and pharmacological analysis. **Brain Research**, 13; 569 (2): 255-267, 1992.

JOHNSON, J.W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, 325: 529-531, 1987.

JONAS, P.; BISCHOFBERGER, J.; SANDKÜHLER, J. Co-release of two fast neurotransmitters at a central synapse. **Science**, 281: 419-424, 1998.

JONES, S.L.; GEBHART, G.F. Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. **Brain Research**, 20; 460 (2): 281-296, 1988.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413 (6852): 203-210, 2001.

- JUNG, M.E.; LAL, H.; GATCH, M.B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazol as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioural Reviews**, 26: 429-439, 2002.
- JURGUENS, U. Neurochemical study of PAG control of vocal behavior. In: **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical and Neurochemical Organization**. DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (eds). Plennun Press, New York: 11-21, 1991.
- JURGENS, U.; LU, C. L. The effects of periaqueductally injected transmitter antagonists on forebrain-elicited vocalization in the squirrel monkey. **European Journal of Neuroscience**, 5: 735-741, 1993.
- KANEKO, M.; HAMMOND, D.L. Role of spinal gamma-aminobutyric acid receptors in formalin-induced nociception in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 282 (2): 928-938, 1997.
- KEAY, K.A.; BANDLER, R. Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculations. **Experimental Physiology**, 87: 275-279, 2002.
- KEAY, K.A.; LI, Q.F.; BANDLER, R. Muscle pain activates a direct projection from ventrolateral periaqueductal gray to rostral ventrolateral medulla in rats. **Neuroscience Letters**, 1; 290 (3): 157-160, 2000.
- KOCHER, L. Systemic naloxone does not affect pain related behavior in the formalin test in rat. **Physiology Behavior**, 43: 265-268, 1988.
- KORPI, E.R.; GRUNDER, G.; LUDDENS, H. Drug interactions at GABA(A) receptors. **Progress in Neurobiology**, 67(2): 113-159, 2002.

- LEESON, P.D.; IVERSEN, L.L. The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potencial. **Journal of Medicinal Chemistry**, 37 (24), 1994.
- LEGENDRE, P. The glycinergic inhibitory synapse. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 58: 760-793, 2001.
- LEVINE, J.D. TAIWO, Y.O. Involvement of mu-opiate receptor in peripheral analgesia. **Neuroscience**, 32: 571-575, 1989.
- 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. **Journal of Neurophysiology**, 75: 109-123, 1996.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Pain**, 353 (8): 1607-1609, 1999.
- LUMB, B.M. Inescapable and escapable pain is represent in distinct hypothalamic-midbrain circuits: specific roles for A δ - and C-nociceptors. **Experimental Physiology**, 87: 281-286, 2002.
- 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**, 97 (2): 311-316, 2000.
- MARTINS, M.A.; BASTOS, L.C.; TONUSSI, C.R. Formalin injection into Knee-joints of rats: pharmacological characterization of o deep somatic nociceptive model. **The Journal of Pain**, (artigo submetido), 2005.

- 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**, 113: 565-569, 1994.
- MATTHIES, B.K.; FRANKLIN, K.B. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. **Pain**, 51 (2): 199-206, 1992.
- MELZACK, R.; STOLTER, W.A.; LIVINGSTON, W.K. Effects of discrete brainstem lesions in cats on perception of noxious stimulations. **Journal of Neurophysiology**, 21: 353,1958.
- MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**. 19; 150 (699): 971-979, 1965.
- MERSKEY, H. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. **Pain**, 6: 249-252, 1979.
- MEYER, D.J.; WOLFE, T.L.; AKIL, H.; CARDER, B.; LIEBESKIND, J.C. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. **Science**, 174:1351-1354, 1971.
- MEYER, D.P.; PRICE, D.D. Central nervous system mechanisms of analgesia. **Pain**, 2: 379-404, 1976.
- MILLAN, M.J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: **The pharmacology of pain. Handbook of experimental Pharmacology**. vol 130. Eds. A. Dickenson and J-M. Besson, Springer-Verlag, Berlin, p.385-446. 1997.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, 57: 1-164, 1999.

- 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 Research**, 734: 72-78, 1996.
- MIRANDA-PAIVA, C.M; RIBEIRO-BARBOSA, E.R. CANTERAS, N.S., FELICIO, L.F. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition on maternal behaviour. **European Journal of Neuroscience**, 18 (3): 667-674, 2003.
- MITCHELL, D., HELLLON, R.F. Neuronal and behavioral responses in rats during noxious stimulation of the tail. **Proceedings Biological Sciences**, 197: 169-194, 1977.
- MOREAU, J.L.; FIELDS, H.L. Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. **Brain Research**, 397: 37-46, 1986.
- 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**, 33(1): 109-121,1988.
- MORGAN, M.M.; LIEBESKIND, J.C. Site specificity in the development of tolerance to stimulation-produced analgesia from the periaqueductal gray matter of the rat. **Brain Research**, 10; 425 (2): 356-359,1987.
- MORGAN, M.M.; WHITNEY, P.K.; GOLD, M.S. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. **Brain Research**, 804: 159-166, 1998.
- MOTTA, A.F.; BORGES Jr, N.G.; DA FONSECA, J.C.; TONUSSI, C.R. The antinociceptive effect of iontophoretic direct application of diclofenac to arthritic knee-joints of rats. **Life Sciences**, 29; 73 (15): 1995-2004, 2003.

- NASHOLD, B.S.; WILSON, W.P.; SLAUGHTER, D.G. Sensations evoked by stimulation in midbrain of man. **Journal of Neurosurgery**, 30: 14-24, 1969.
- NEUGEBAUER, V.; LI, W.; BIRD, G.C.; HAN, J.S. The amygdala and persistent pain. **The Neuroscientist**, 10 (3): 221-234, 2004.
- NICHOLS, D.S.; THORN, B.E. Stimulation-produced analgesia and its cross-tolerance between dorsal and ventral PAG loci. **Pain**, 41(3): 347-352, 1990.
- NICHOLS, D.S.; THORN, B.E.; BERNTSON, G.G. Opiate and serotonergic mechanisms of stimulation-produced analgesia within the periaqueductal gray. **Brain Research Bulletin**, 22 (4): 717-724, 1989.
- NIV, D.; DAVIDOVICH, S.; GELLER, E.; URCA, G. Analgesic and hyperalgesic effects of midazolam: dependence on route of administration. **Anesthesia & Analgesia**, 67 (12): 1169-1173, 1988.
- NORTH, M.A. Naloxone reversal of morphine analgesia but failure to alter reactivity to pain formalin test. **Life Sciences**, 22: 295-302, 1978.
- NORTON, P.J.; ASMUNDSON, G.J. Anxiety sensitivity, fear, and avoidance behavior in headache pain. **Pain**, 111 (1-2): 218-223, 2004.
- 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**, 150 (3): 300-310, 2000.
- OLIW, E.; LUDEN, I.; ANGGARD, E. In vivo inhibition of prostaglandin synthesis in rabbit kidney by non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Acta Pharmacology**, 42: 179-184, 1978.

- ONAKA, M.; MINAMI, T.; NISHIHARA, I.; ITO, S. Involvement of glutamate receptors in strychnine- and bicuculine-induced allodynia in conscious mice. **Anesthesiology**, 84: 1215-1222, 1996.
- OSBORNE, P.B.; VAUGHAN, C.W.; WILSON, H.I.; CHRISTIE, M.J. Opioid inhibition of rat periaqueductal grey neurons with identified projections to rostral ventromedial medulla *in vitro*. **Journal of Physiology**, 490:383-389, 1996.
- ORTIZ, M.I.; TORRES-LÓPES, J.E.; CASTAÑEDA-HERNANDEZ, G.; ROSAS, R.; VIDAL-CANTÚ, G.C.; GRANADOS-SOTO, V. Pharmacological evidence for the activation of K⁺ channels by diclofenaco. **European Journal of Pharmacology**, 438: 85-91, 2002.
- PAKULSKA, W.; CZARNECKA, E. Effect of diazepam and midazolam on the antinociceptive effect of morphine, metamizol and indomethacin in mice. **Pharmazie**, 56 (1): 89-91, 2001.
- PALACIOS, J. M.; MENGOD, G.; SARASA, M.; VILARO, M. T.; POMPEIANO, M.; MARTINEZ-MIR, M. I. The use of in situ hybridization histochemistry for the analysis of neurotransmitter receptor expression at the microscopic level. **The Journal of Receptor Research**, 11: 459-472, 1991.
- PALAOGLU, O.; AYHAN, I.H. The possible role of benzodiazepine receptors in morphine analgesia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 25(1): 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 Sciences**, 12; 68(8): 943-951, 2001.

- PASTORIZA, L.N.; MORROW, T.J.; CASEY, K.L. Medial frontal cortex lesions selectively attenuate the hot plate response: possible nocifensive apraxia in the rat. **Pain**, 64 (1): 11-17,1996.
- PATIL, C.S.; JAIN, N.K.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Modulatory effect of cyclooxygenase inhibitors on sildenafil-induced antinociception. **Pharmacology**, 69 (4):183-189, 2003.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press, San Diego, 1998.
- PERTOVAARA, A.; MECKE, E.; CARLSON, S. Attempted reversal of cocaine-induced antinociceptive effects with naloxone, an opioid antagonist. **European Journal of Pharmacology**, 192: 349-353, 1996.
- 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**, 46: 643-656, 1992.
- PRADO, W.A.; ROBERTS, M.H. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. **Brain Research**, 345: 219-228, 1985.
- RAJA, S; MEYER, R.A.; RINCKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanism of nociception. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (eds). **Textbook of pain**. 4 th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, p.11-57, 1999.
- RANCK, Jr.; J.B. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. **Brain Research**, 98 (3): 417-440, 1975.

- RENNO, W. M.; MULLET, M. A.; BEITZ, A. J. Systemic morphine reduces GABA release in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. **Brain Research**, 594: 221-232, 1992.
- REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. **The Journal of Comparative Neurology**, 96 (3): 414-495, 1952.
- REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. **Science**, 164: 444-445, 1969.
- RHUDY, J.L.; GRIMES, J.S.; MEAGHER, M.W. Fear-induced hypoalgesia in humans: effects on low intensity thermal stimulation and finger temperature. **Journal of Pain**, 5 (8): 458-468, 2004.
- RICHARDS, D.A.; LEMOS, T.; WHITTON, P.S.; BOWERY, N.G. Extracellular GABA in the ventrolateral thalamus of rats exhibiting spontaneous absence epilepsy: a microdialysis study. **Journal of Neurochemistry**, 65 (4), 1995.
- ROCHA, L.; CANO, A.; CRUZ, C.; OMANA-ZAPATA, I.; VILLALOBOS, R.; MAIDMENT, N.T. Opioid peptide systems following a subconvulsant dose of pentylentetrazol in rats. **Epilepsy Research**, 37 (2): 141-150, 1999.
- RODELLA, L.; REZZANI, R.; GIOIA, M.; TREDICI, G.; BIANCHI, R.; Expression of Fos immunoreactivity in the rat supraspinal regions following noxious visceral stimulation. **Brain Research Bulletin**, 47: 357-366, 1998.
- RODRIGUEZ, R.; PARDO, E.G. Reversal by acetylsalicylic acid of pain induced functional impairment. **Life Sciences**, 5:775-781, 1966.

- RYAN, S.M.; WATKINS, L.R.; MAYER, D.J.; MAIER, S.F. Spinal pain suppression mechanisms may differ for phasic and tonic pain. **Brain Research**, 13; 334 (1): 172-175, 1985.
- SADNER, G.; SCHMITT, P.; KARLI, P. Mapping of jumping, rearing, squealing and switch-off behaviors elicited by periaqueductal gray stimulation in the rat. **Physiology & Behavior**, 39: 333-339, 1987.
- SALT, T.E. Modulation of NMDA receptor-mediated responses by glycine and d-serine in the rat thalamus *in vivo*. **Brain Research**, 481: 403-406, 1989.
- SHELL, M.J.; BRADY Jr, R.O.; MOLLIVER, M.E.; SNYDER, S.H. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. **The Journal of Neuroscience**, 17: 1604-1615, 1997.
- 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. **Neuroscience Letters**, 189: 93-96, 1995.
- SHERMAN, E.; LUO, L.; DOSTROVSKY, J. O. Spinal strychnine alters response properties of nociceptive-specific neurons in rat medial thalamus. **Journal of Neurophysiology**, 78: 628-637, 1997.
- SHERRINGTON, C.S. **The integrative action of the nervous system**. Scribner, New York, 1906.
- SIEGFRIED, B.; DE SOUZA, R.L. NMDA receptor blockade in the periaqueductal grey prevents stress-induced analgesia in attacked mice. **European Journal of Pharmacology**, 13; 168 (2): 239-242, 1989.

- SIGEL, E.; STEPHENSON, F.A.; MAMALAKI, C.; BARNARD, E.A. A gamma-aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex of bovine cerebral cortex. **Journal of Biological Chemistry**, 10; 258 (11): 6965-6971,1983.
- STAMFORD, J.A. Descending control of pain. **British Journal of Anaesthesia**, 75: 217-227, 1995.
- STEIN, C.; MILLAN, M.J.; SHIPPENBERG, T.S.; PETER, K.; HERZ, A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 248 (3): 1269-1275, 1989.
- STEIN, C.; MILLAN, M.J.; YASSOURIDIS, A.; HERZ, A. Antinociceptive effects of mu- and kappa-agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid receptor-specific mechanism. **European Journal of Pharmacology**, 18; 155 (3): 255-264, 1988.
- SUMAN, P.; GUPTA, S.; TANDON, O. P.; SHARMA, K. K. Study of central gray NMDA receptors in nociceptive behavior in rats. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 22: 1394-1410, 1998.
- TASKER, R.A.; CHOINIERE, M.; LIBMAN, S.M; MELZACK, R. Analgesia produced by injection of lidocaine into the lateral hypothalamus. **Pain**, 31 (2): 237-248,1987.
- 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. **European Journal Pharmacology**, 1; 370 (1): 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. **Journal of Neuroscience**, 15: 7575-7584, 1995.

- TAYLOR, B.K.; PETERSON, M.A.; BASBAUM, A.I. Continuous intravenous infusion of naloxone does not change behavioral, cardiovascular, or inflammatory response to subcutaneous formalin in the rat. **Pain**, 69: 171-177, 1997.
- 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**, 84: 263-270, 2000.
- TEIXEIRA, K.V.; CAROBREZ, A.P.; Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxy-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis the dorsal periaqueductal gray matter on rats's performance in the elevated plus-maze task. **Behavioral Neuroscience**, 113 (1): 196-203, 1999.
- THIELS, E.; WEISZ, D.J.; BERGER, T.W. In vivo modulation of N-methyl-D-aspartate receptor-dependent long term potentiation by the glycine modulatory site. **Neuroscience**, 46: 501-509, 1992.
- THOMSON, A.M. Glycine is a coagonist at the NMDA receptor/channel complex. **Progress in Neurobiology**, 35: 53-74, 1990.
- 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. **Behavioral Neuroscience**, 103 (6): 1335-1339, 1989.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, 51 (1): 5-17, 1992.
- TODD AJ, SPIKE RC, RUSSELL G, JOHNSTON HM. Immunohistochemical evidence that Met-enkephalin and GABA coexist in some neurones in rat dorsal horn. **Brain Research**, 3; 584 (1-2): 149-156, 1992.

- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, 48: 421-427, 1992.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **European Journal Pharmacology**, 14; 251(2-3): 173-179, 1994.
- TORRES-LÓPEZ, J.E.; ORTIZ, M.I.; GILBERTO CASTAÑEDA-HERNANDEZ, G.; ALONSO-LÓPEZ, R.; ASOMOZA-ESPINOSA, R.; GRANADOS-SOTO, V. Comparison of the antinociceptive effect of celecoxib, diclofenac and resveratrol in the formalin test. **Life Sciences**, 70: 1669-1676, 2002.
- TORTORICI, V.; MORGAN, M.M. Comparison of morphine and kainic acid microinjections into identical PAG sites on the activity of RVM neurons. **Journal of Neurophysiology**, 88 (4): 1707-1715, 2002.
- TORTORICI, V.; ROBBINS, C.S.; MORGAN, M.M. Tolerance to the antinociceptive effect of morphine microinjections into the ventral but not lateral-dorsal periaqueductal gray of the rat. **Behavioral Neuroscience**, 113 (4): 833-839, 1999.
- TWYXCROSS, R. G. Opioids. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (eds). **Textbook of pain**. 3th ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, p.1187-1214, 1994.
- URCA, G.; NAHIN, R.L.; LIEBESKIND, J.C. Glutamate-induced analgesia: blockade and potentiation by naloxone. **Brain Research**, 23; 192 (2): 523-530, 1980.
- 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. **Neuroscience Letters**, 236:117-119, 1997.

- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation Research**, 47(2): 78-87, 1998.
- VANEGAS, H.; BARBARO, N.M.; FIELDS, H.L. Tail flick related activity in medullospinal neurons. **Brain Research**, 321: 135-141, 1984.
- VAN PRAAG, H.; FRENK, H. The role of glutamate in opiate descending inhibition of nociceptive spinal reflexes. **Brain Research**, 30; 524(1): 101-105,1990.
- VAN PRAAG, H.; FRENK, H. The development of stimulation-produced analgesia (SPA) in the rat. **Developmental Brain Research**, 17; 64 (1-2): 71-76, 1991.
- VAUGHAN, C.W.; CHRISTIE, M.J. Presynaptic inhibitory of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. **Journal of Physiology**, 15; 498 (2): 463-472, 1997.
- VAUGHAN, C. W.; INGRAM, S.L.; CONNOR, M.A.; CHRISTIE, M.J. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. **Nature**, 390: 611-611, 1997.
- VIANNA, D.M.L.; BRANDÃO, M.L. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 36: 557-566, 2003.
- VIU, E.; ZAPATA, A.; CAPDEVILA, J. L.; FOSSOM, L. H.; SKOLNICK, P.; TRULLAS, R. Glycine site antagonists and partial agonists inhibit *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated 3H-arachidonic acid release in cerebellar granule cells. The **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 285: 527-532,1998.

- WALKER, J.M.; HUANG, S.M.; STRANGMAN, N.M.; TSOU, K.; SAÑUDO-PEÑA, M.C. Pain modulation by release of endogenous cannabinoid anandamide. **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America**, 96 (21): 12198-12203, 1998.
- WALL, P.D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **Journal of Physiology**, 188: 403-423, 1967.
- WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. 4 th ed., Ediburgh, Churchill Livingstone 1585 p., 1999.
- WHEELER-ACETO, H.; COWAN, A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. **Psychopharmacology**, 104: 35-41, 1991.
- WHITEHEAD, K. J.; PEARCE, S. M.; WALKER, G.; SUNDARAM, H.; HILL D.; BOWERY, N. G. Positive n- methyl-d-aspartate receptor modulation by selective glycine transporter-1 inhibition in the rat dorsal spinal cord in vivo. **Neuroscience**, 126: 381-390, 2004.
- WILCOX, K.S.; FITZSIMONDS, R.M.; JOHSON, B.; DITCHER, M.A. Glycine regulation of synaptic NMDA receptors in hippocampal neurons. **Journal of Neurophysiology**, 76 (5): 3415-3424, 1996.
- WILLIS, WD. The pain system: the neural basis of nociceptive transmission in the mammalian nervous system. **Pain Headache**, 8:1-346, 1985.
- WOOD, P.L.; EMMETT, M.R.; RAO, T.S.; MICK, S.; CLER, J.; IYENGAR, S. In vivo modulation of N-methyl-D-aspartate receptor complex by D-serine: potentiation of ongoing neuronal activity as evidence by increased cerebellar cyclic GMP. **Journal of Neurochemistry**, 53: 979-981,1989.

YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Narcotic analgesic: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. **Pain**, 4: 299-359.

ZAMBOTTI, F.; ZONTA, N.; TAMMISO, R.; CONCI, F.; HAFNER, B.; ZECCA, L.; FERRARIO, P.; MANTEGAZZA, P. Effects of diazepam on nociception in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 344 (1): 84-89, 1991.