

JANICE KOEPP

**FUNÇÕES DO NÚCLEO PARATRIGEMINAL NAS RESPOSTAS
CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS À ESTIMULAÇÃO NOCICEPTIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como pré-requisito à obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

FLORIANÓPOLIS – SC

OUTUBRO DE 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Giles Alexander Rae

CO-ORIENTADOR

Prof. Dr. Charles Julian Lindsey

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Pesquisa e desenvolvimento Científico-CNPq

*“Quem, de três milênios
Não é capaz de se dar conta
Vive na ignorância, na sombra
À mercê dos dias, do tempo.”*

(Johann Wolfgang Von Goethe)

Este trabalho é dedicado especialmente:

Ao meu esposo, Fábio, por dividirmos cada minuto de nossa vida com Amor e Respeito e aos nossos filhos queridos, Ubirajara e Hanna, pela paciência e compreensão, e mais do que tudo o Amor que dedicaram a mim em todos os momentos.

Aos meus pais adorados, Raimundo e Nilva, pelo exemplo de coragem e força, sempre presentes, amparando e incentivando a continuidade da jornada com dedicação e amor incansáveis.

Ao meu Sogro, Sr. Nivaldo e minha sogra, Sra Dilce, meus pais do coração, pela ajuda constante.

Aos meus irmãos, Marcelo, Cristiane e Viviane, e cunhadas, Andréia e Daniela, por formarmos uma família.

Agradecimentos

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pelos ensinamentos valiosos, pela paciência, seriedade, profissionalismo e amizade.

Ao meu co-Orientador, Prof. Dr. Charles Julian Lindsey pelas horas de conversa científica e pessoal, confiança e amizade.

Ao Emerson, Fernanda, kathryn, Juliana, Marcília e Patrícia, meus irmãos do coração, pelo apoio em todos os momentos e a torcida para que tudo desse certo.

A todos os colegas da equipe “Lindsey” pelo excelente convívio e aprendizado, em especial aos amigos Cristofer, Balan, Raquel, Yu, Luana e Verônica.

À Alcíbia, Josélia, Ana Paula e Cláudio, por me ensinarem os primeiros passos na pesquisa.

A todos os estudantes do curso de Pós-Graduação em farmacologia da UFSC, que de uma forma direta ou indireta participaram desta etapa na minha vida,

Às amigas da equipe “Rosa” pelo companheirismo.

A todos os professores e funcionários dos Departamentos de Farmacologia (UFSC) e de Biofísica (EPM), pela ajuda constante.

À “Taty” pelo carinho e amor dedicado aos meus filhos.

À natureza, por tornar meus dias mais leves.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	I
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Justificativa.....	1
1.2. O Controle autonômico.....	1
1.2.1. Participação dos núcleos bulbares.....	3
1.2.2. O mecanismo do baroreflexo arterial.....	5
1.3. O mecanismo cardiovascular reflexo à estimulação nociceptiva.....	6
1.4. O núcleo paratrigeminal.....	8
1.4.1. Funções do núcleo paratrigeminal.....	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Animais.....	16
3.2. Alterações cardiovasculares induzida pela estimulação do nervo ciático.....	16
3.2.1. Procedimentos gerais.....	16
3.2.2. Estimulação elétrica do nervo ciático.....	17
3.2.3. Secção da medula espinhal.....	18
3.2.4. Fibras sensíveis à capsaicina.....	18
3.3. Participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial.....	19
3.3.1. Lesão do núcleo paratrigeminal.....	19
3.3.2. Microinjeção de antagonistas no núcleo paratrigeminal.....	20
3.3.3. Verificação do posicionamento das injeções.....	21
3.4. Análise da expressão de produtos gênicos.....	21
3.4.1. Reação de PCR.....	22

3.4.2. Eletroforese em gel de agarose.....	23
3.5. Participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial em animal consciente.....	24
3.5.1. Respostas cardiovasculares reflexas à injeção de formalina.....	24
3.5.2. Análise histológica.....	26
3.6. Lesão do núcleo paratrigeminal e a percepção dolorosa da pata posterior de ratos.....	26
3.6.1. Estimulação química.....	26
3.6.2. Estimulação térmica.....	27
3.6.3. Estimulação mecânica.....	28
3.6.4. Análise histológica.....	30
3.7. Lesão do núcleo paratrigeminal e a percepção dolorosa orofacial.....	30
3.7.1. Estimulação química.....	30
3.7.2. Estimulação térmica.....	30
3.7.3. Estimulação mecânica.....	31
3.8. Substâncias empregadas.....	31
3.9. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. O reflexo somatosensorial em animal anestesiado.....	33
4.2. Influência da secção total da medula espinhal.....	33
4.3. Participação das fibras sensíveis a capsaicina.....	33
4.4. Participação do núcleo paratrigeminal.....	34
4.5. Mediadores envolvidos no reflexo somatosensorial.....	41
4.5.1. Taquicinas.....	41
4.5.2. Opióides.....	41
4.5.3. Cininas.....	41
4.5.3.1. Análise dos produtos gênicos no núcleo paratrigeminal.....	47
4.5.4. Localização dos receptores para opióides e cininas no núcleo paratrigeminal.....	47
4.6. Participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial evocado em animal consciente.....	50
4.7. Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a nocicepção química, mecânica e térmica.....	53

4.7.1. Estimulação química	54
4.7.2. Estimulação mecânica.....	54
4.7.3. Estimulação térmica.....	54
4.7.4. Análise histológica.....	55
5. DISCUSSÃO.....	61
5.1. O reflexo somatosensorial em ratos.....	61
5.2. Substrato neuroanatômico do reflexo somatosensorial.....	63
5.3. Mediadores envolvidos no reflexo somatosensorial.....	68
5.4. O reflexo somatosensorial em animal consciente.....	74
5.5. Participação do núcleo paratrigeminal na percepção dolorosa da pata posterior.....	75
5.6. Participação do núcleo paratrigeminal na percepção dolorosa orofacial.....	79
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7. CONCLUSÕES.....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE ABREVIÇÕES

Amb	Núcleo ambíguo
BK	Bradicinina
CVLM	Área caudal ventral lateral do bulbo
DNA	Ácido desoxirribonuclêico
DePC	Dietil pirocarboneto
FC	Frequência cardíaca
ION	Núcleo olivar inferior
IML	Coluna de células intermédio lateral
IVLM	Área ventral lateral intermediária do bulbo
IX	Nervo glossofaríngeo
KF	Núcleo Kölliker-Fuse
LC	Loco cerúleo
LRt	Núcleo reticular lateral
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
Pa5	Núcleo Paratrigeminal
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PAP	Pressão arterial pulsátil
PB	Núcleo parabraquial
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PGSMN	Neurônios motores simpáticos pré-ganglionares
PT	Feixe adrenérgico tegmental principal
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RNA	Ácido ribonuclêico
RVL	Núcleo reticular rostroventrolateral
RVLM	Área rostral ventral lateral do bulbo
Sol	Trato solitário
SON	Núcleo supraóptico
Sp5	Núcleo espinhal do trigêmeo
Sp5I	Núcleo espinhal do trigêmeo <i>pars interpolaris</i>
VPM	Núcleo ventroposteromedial do tálamo

V Nervo trigêmeo
X Nervo vago

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Representação esquemática do controle autonômico central.....	4
Figura 2: Representação esquemática do circuito bulbar envolvido no mecanismo baroreflexo.....	6
Figura 3: Topografia das conexões do núcleo paratrigeminal.....	9
Figura 4: Localização do núcleo paratrigeminal.....	20
Tabela 1: Seqüência de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR.....	23
Figura 5: Ilustração do aparato experimental utilizado para monitorar a pressão arterial.....	26
Figura 6: Influência da intensidade e do estímulo elétrico aplicado ao nervo ciático.....	35
Figura 7: Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre o reflexo somatosensorial.....	36
Figura 8: Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial.....	37
Figura 9: Registro típico das alterações na pressão arterial induzidas pela estimulação elétrica do nervo ciático.....	38
Figura 10: Influência do bloqueio da transmissão sináptica do núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial.....	39
Figura 11: Análise histológica do sítio de injeção do ácido ibotênico.....	40
Figura 12: Participação das taquicininas no reflexo somatosensorial mediado pelo núcleo paratrigeminal.....	43
Figura 13: Efeito da microinjeção de antagonistas opióides no núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial.....	44
Figura 14: Efeito da microinjeção de HOE140 no núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial.....	45
Figura 15: Efeito da microinjeção de Des-Arg ¹⁰ HOE140 no núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial.....	46
Figura 16: Detecção dos produtos gênicos codificadores dos receptores para as cininas no núcleo paratrigeminal.....	48
Figura 17: Influência do tratamento neonatal com capsaicina sobre o efeito modulatório das cininas e dos opióides no reflexo somatosensorial mediado pelo núcleo paratrigeminal.....	49

Figura 18: Decurso temporal das respostas comportamentais e cardiovasculares induzidas pela injeção i.pl. de formalina.....	51
Figura 19: Decurso temporal das respostas comportamentais e cardiovasculares induzidas pela injeção i.pl. de formalina e a influência da lesão do núcleo paratrigeminal.....	52
Figura 20: Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a resposta nociceptiva induzida por injeção intraplantar de formalina.....	56
Figura 21: Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a resposta nociceptiva induzida por injeção de formalina no lábio.....	57
Figura 22: Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a resposta nociceptiva evocada pela estimulação mecânica da pata ou da face.....	58
Figura 23: Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a resposta nociceptiva evocada pela estimulação térmica da pata ou da face.....	59
Figura 24: Ilustração esquemática de uma secção transversal do bulbo de um rato sacrificado 10 dias após a microinjeção de ácido ibotênico no núcleo paratrigeminal esquerdo.....	60
Figura 25: Representação das possíveis vias neuronais que medeiam o reflexo somatosensorial em ratos.....	67
Figura 26: Representação da possível localização dos receptores cininérgicos e opioidérgicos ativos no arco somatosensorial reflexo.....	73
Figura 27: Esquema ilustrativo dos possíveis mecanismos envolvidos na ação pronociceptiva e antinociceptiva do núcleo paratrigeminal.....	83

RESUMO

Empregando abordagens funcionais fisiológicas e farmacológicas, investigamos a participação do núcleo paratrigeminal (Pa5) na reatividade cardiovascular e comportamental à estimulação nociceptiva em ratos. Em animais anestesiados, a estimulação elétrica do nervo ciático causa um aumento da pressão arterial dependente da intensidade do estímulo, do tipo de fibra sensorial estimulada e da integridade da medula espinhal. A resposta pressora a estímulos de alta (mas não baixa) intensidade foi potencializada pela degeneração seletiva de fibras sensíveis à capsaicina e abolida por transecção completa da medula espinhal em T8. A lesão química do Pa5 contralateral ao nervo estimulado com ácido ibotênico reduziu o reflexo pressórico à estimulação do ciático. Reduções semelhantes do reflexo foram obtidas após microinjeções no Pa5 contralateral de antagonistas B₂ para bradicinina HOE 140 ou LF 160682 ou antagonistas de receptores opióides do tipo mu ou kappa, já o antagonista de receptores opióides do tipo delta potencializou o reflexo. O tratamento neonatal com capsaicina não afetou a magnitude do efeito inibitório induzido por microinjeção no Pa5 de HOE-140, mas aboliu a modulação do reflexo somatosensorial exercida pelos antagonistas dos receptores opióides. Embora a lesão do Pa5 não tenha afetado respostas nocifensivas evocadas por estimulação nociceptiva térmica da pata posterior ou da face, reduziu o limiar nociceptivo à estimulação mecânica de ambas as regiões. Por outro lado, a lesão do Pa5 contralateral ao estímulo diminuiu a resposta comportamental à formalina injetada na pata posterior, mas aumentou àquela causada por injeção deste agente álgico no lábio superior. Estes resultados caracterizam o Pa5 como um novo membro integrante do sistema supraespinhal de controle da dor, capaz de modular tanto o

processamento da informação nociceptiva quanto os ajustes cardiovasculares reflexos à dor. A capacidade deste núcleo em modular respostas nocifensivas parece depender da modalidade do estímulo nociceptivo e da área estimulada.

ABSTRACT

Using functional pharmacological and physiological approaches, we investigated the participation of the paratrigeminal nucleus (Pa5) in modulation of behavioral and cardiovascular responsiveness to nociceptive stimulation in rats. In anesthetized animals, sciatic nerve stimulation (SNS) induced an increase in arterial pressure that depended on the intensity of the noxious stimulus, type of sensory fibers stimulated and spinal cord integrity. The pressor response to high (but not low) intensity SNS was enhanced by degeneration of primary afferent nociceptive fibers with capsaicin and abolished by spinal cord transection at T8 level. Chemical lesion with ibotenic acid of the Pa5 contralateral to the nerve stimulated reduces the SNS-induced pressor response. Similar reductions were obtained after microinjection into the contralateral Pa5 of a kinin B₂ receptor antagonist (HOE140) or selective antagonists of μ or κ opioid receptors, but selective δ receptor blockade enhanced the reflex. Neonatal capsaicin treatment did not change the magnitude of the inhibitory effect induced by HOE140 microinjected into the contralateral Pa5, but abolished the modulatory effects of all opioid receptor antagonists on the somatosensory reflex. Although, unilateral Pa5 lesion did not change the responsiveness to thermal stimuli applied to both hindpaw and orofacial regions, it reduced the nociceptive threshold to mechanical stimulation of either body regions. On the other hand, unilateral Pa5 lesion diminished the nocifensive responsiveness to formalin injected into the hindpaw, but enhanced it when formalin was injected into the upper lip. These results reveal the Pa5 as a new member of the supraspinal nociceptive control system, capable of modulating nociceptive input processing and reflex cardiovascular adjustments

to pain. The capacity of this nucleus to modulate nocifensive responses seems to be dependent on the modality of the noxious stimulus and the body region stimulated.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

A microinjeção de doses extremamente baixas de bradicinina no núcleo paratrigeminal (Pa5), um pequeno grupo de neurônios localizado na região dorso lateral do bulbo, mas não em estruturas adjacentes, produz um aumento pronunciado da pressão arterial (Fior et al., 1993; Lindsey et al., 1995; Lindsey et al., 1997). Na tentativa de entender os mecanismos implicados nesta ação da bradicinina, bem como dos papéis fisiológicos desempenhados pelo núcleo paratrigeminal, nosso orientador prof. Dr. Giles Alexander Rae foi convidado pelo prof. Dr. Charles Julian Lindsey para integrar a equipe executora do Projeto Temático da FAPESP *Neuropeptídeos nas Respostas de Defesa e Homeostase: Receptores e Vias Neurais* (99/12466-5), juntamente com a Prof^a Dr^a. Glória E. P. Souza. O projeto tinha por objetivos principais examinar, através da coleta de dados comportamentais, fisiológicos e moleculares, a participação do núcleo paratrigeminal, bem como das áreas cerebrais a ele relacionadas, na integração do conjunto de respostas cardiovasculares e comportamentais vinculadas ao processamento de informações sensoriais de origem periférica. Nosso projeto de tese de Doutorado teve por meta específica elucidar a influência do núcleo paratrigeminal nas respostas cardiovasculares e comportamentais a estímulos nociceptivos.

1.2 . O Controle Autonômico.

A manutenção da pressão arterial e do volume sangüíneo em níveis adequados à perfusão tecidual é um requisito essencial ao bom funcionamento do organismo e à sobrevivência. Este processo é operado por mecanismos de

controle a longo prazo ou através de ajustes rápidos da pressão arterial, ambos governados pela regulação autonômica e neuroendócrina do sistema cardiovascular. O controle a longo prazo da pressão arterial é realizado principalmente pelo sistema rins-líquidos corporais, onde em termos simples, o aumento da pressão arterial provoca diretamente o aumento da excreção renal de água e de sal, que por sua vez, resulta em volume diminuído do líquido extracelular e redução da volemia. A redução do volume sanguíneo diminui o bombeamento cardíaco, o que faz com que a pressão arterial retorne ao normal. O contrário ocorre no caso de hipotensão. Já o controle contínuo do sistema cardiovascular é realizado através de reflexos arteriais e não arteriais que detectam e corrigem mudanças na pressão arterial (baroreflexo), volume sanguíneo ou composição química (reflexos cardiopulmonares) e mudanças na tensão de O₂, CO₂ ou no pH (quimiorreflexo) (Spyer, 1990; Sleight, 1991; Chalmers et al., 1992; Marshall, 1994).

A ativação do baroreflexo arterial ou do reflexo cardiopulmonar (reflexo de Bezold-Jarisch) aumenta o tono parassimpático sobre o coração e reduz o controle simpático sobre o coração e vasos. No caso do baroreflexo, trazendo a pressão arterial para os níveis normais, enquanto que no reflexo cardiopulmonar, promovendo simultânea bradicardia e hipotensão. Por outro lado, a ativação do quimiorreflexo, em adição aos ajustes na frequência respiratória, produz alterações cardiovasculares caracterizadas pelo aumento da atividade simpática e parassimpática (Marshall, 1994; Haibara et al., 1995). Concomitante à regulação autonômica, estes reflexos também recrutam o sistema neuroendócrino, aonde, dependendo do sinal proveniente da periferia (baroreflexo, reflexo cardiopulmonar, quimiorreflexo), ocorre a liberação reflexa de vasopressina pela

hipófise posterior (Thrasher et al., 2000), a qual irá afetar o sistema cardiovascular.

1.2.1. Participação dos núcleos bulbares.

Os principais núcleos cerebrais envolvidos na regulação autonômica e neuroendócrina do sistema cardiovascular estão representados na Figura 1. De particular importância está o núcleo do trato solitário (NTS), o qual é considerado o sítio de terminação para uma variedade de receptores periféricos (baroreceptores, quimiorreceptores, receptores cardiopulmonar), os quais podem afetar reflexamente o sistema cardiovascular (Spyer, 1990). Além do NTS, também estão representados o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), a área A5, a rafe bulbar e a área rostral ventrolateral do bulbo (RVLM). O PVN é importante na regulação neuroendócrina, devido à presença de neurônios sintetizadores de vasopressina. A área A5 é composta de neurônios noradrenérgicos. O RVLM é considerado a região vasomotora bulbar relacionada diretamente ao controle da pressão arterial, sendo conhecido também como região pressora (Feldberg e Guerzestein, 1976). Em comum, todas estas regiões cerebrais compartilham conexões eferentes diretas para neurônios pré-ganglionares simpáticos presentes na coluna de células intermédio lateral (IML), disposta entre os segmentos torácicos e lombares da medula espinhal, representando assim a eferência neural para o sistema cardiovascular.

Nesta figura também estão representadas as eferências parassimpáticas vagais para o coração, as quais se originam predominantemente no núcleo ambíguo (NA) (Massari et al., 1995; Panneton et al., 1996). Tendo conexões recíprocas com o bulbo caudal e ventral (McKittrick e Calaresu, 1997), o núcleo

ambíguo regula seletivamente a frequência cardíaca (Gatti et al., 1996). Já os núcleos sub-corticais e corticais importantes no processamento das alterações autonômicas e neuroendócrinas evocadas por outros estímulos, tais como alerta ou respostas emocionais, não estão representados na Figura 1.

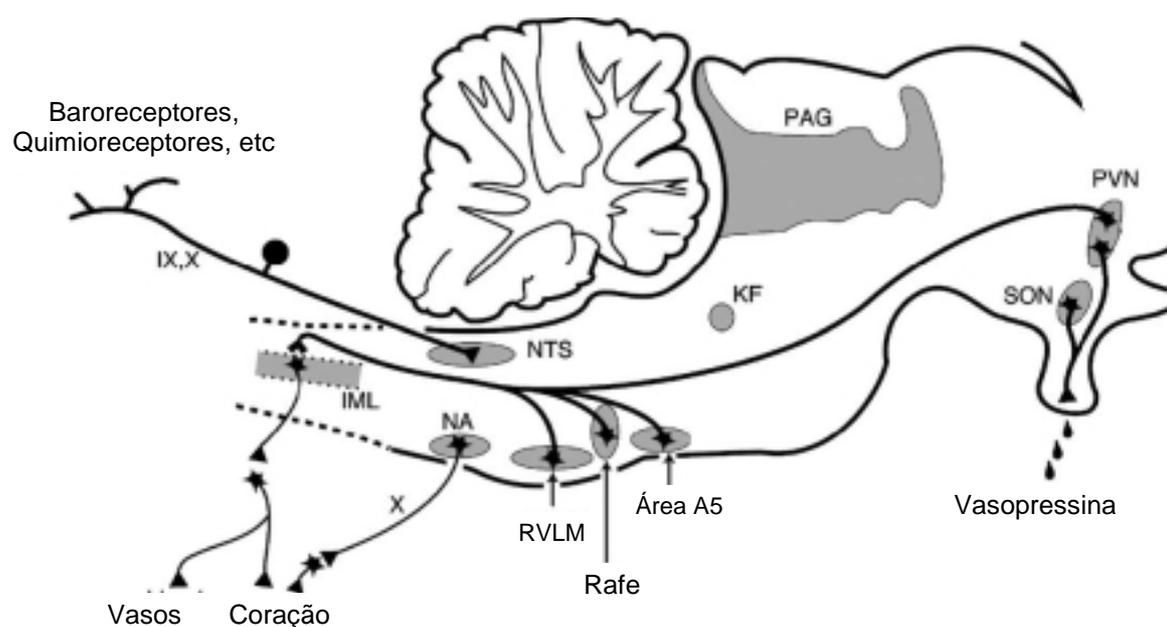


Figura 1 – Representação esquemática demonstrando os principais núcleos bulbopontinos e hipotalâmicos que regulam a atividade simpática, parassimpática e neuroendócrina no rato. Abreviações: nervo glossofaríngeo (IX), nervo vago (X); coluna de células intermediolateral (IML); Núcleo Fuse-Kolliker (KF); Núcleo Ambíguo (NA); Núcleo do Trato Solitário (NTS); Substância cinzenta periaquedutal (PAG); Núcleo Paraventricular (PVN); Bulbo Ventrolateral Rostral (RVLM); Núcleo Supraótico (SON). Figura adaptada de Dampney et al., 2003.

1.2.2. O Mecanismo do baroreflexo arterial.

De forma simplista, cumpre aqui descrever brevemente o mecanismo de ajuste rápido decorrente de alteração na pressão arterial, i.e., o baroreflexo. A função principal do baroreflexo é prover um ajuste rápido e eficiente da pressão arterial através de baroreceptores sensíveis ao aumento da pressão arterial. Os terminais destes receptores estão localizados estrategicamente na camada adventícia do seio carotídeo e arco aórtico, com os seus somas localizados nos gânglios petroso e nodoso, respectivamente. Estes sensores são distendidos, a cada sístole arterial, ocorrendo uma despolarização e desencadeando um potencial de ação. Este impulso ascende pelos nervos vago e glossofaríngeo (Panneton e loewy, 1980), terminando em neurônios nos subnúcleos lateral e medial do NTS (Panneton e Loewy, 1980; Ciriello et al., 1981; Ciriello, 1983), no bulbo dorso-medial. A estimulação destes neurônios no NTS gera sinais excitatórios ao CVLM, que ao ser estimulado promove uma inibição sobre o RVLM (Figura 2), acarretando em uma acentuada hipotensão, bradicardia e bradipnéia (Guerzestein e Silver, 1974; Urbanski e Sapru, 1988, Dampney e Horiuchi, 2003). No caso de ocorrência de uma hipotensão, os baroreceptores deixam de ser estimulados diminuindo o estímulo do NTS, que deixará de estimular o CVLM, o qual deixará de inibir o RVLM.

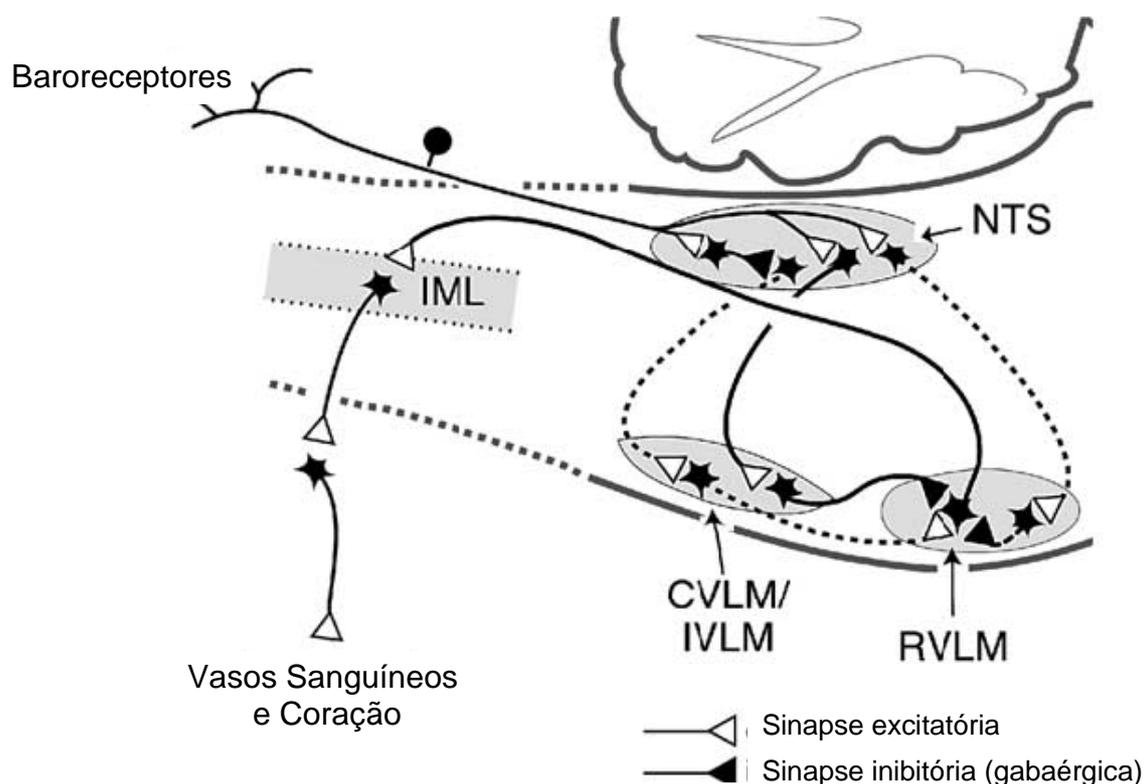


Figura 2 – Representação esquemática do circuito bulbar envolvido no mecanismo baroreflexo que, ao ser evocado, promove uma inibição da atividade simpática, acompanhada de uma queda na pressão arterial. NTS, núcleo do trato solitário; RVLM, área rostral ventral lateral do bulbo; CVLM, área caudal ventral lateral do bulbo; IVLM, área intermediária ventral lateral do bulbo; IML, coluna de células intermediolateral. Figura adaptada de Dampney et al., 2003.

1.3. O mecanismo cardiovascular reflexo à estimulação nociceptiva

Em adição aos ajustes cardiorespiratórios e neuroendócrinos decorrentes de sinais provenientes de receptores que detectam e corrigem mudanças na pressão arterial, volume sanguíneo ou nível de O_2 no sangue, a ativação de receptores viscerais e somáticos, ou ainda exercícios físicos, estresse ou alerta, também desencadeiam uma resposta cardiovascular importante. No contexto do

presente trabalho, iremos nos ater às respostas cardiovasculares reflexas à ativação de receptores viscerais e somáticos denominados nociceptores. Os nociceptores, terminações nervosas livres presentes em nervos aferentes nociceptivos constituídos de fibras pouco mielinizadas (Grupo III ou fibras A δ) e não-mielinizadas (Grupo IV ou Fibras C), detectam e codificam uma variedade de estímulos dolorosos capazes de causar um dano tecidual potencial ou real (para revisão ver Julius e Basbaum, 2001). Há décadas sabe-se que a estimulação destes nociceptores pode evocar respostas autonômicas significantes, incluindo ajustes funcionais na taxa de ventilação e no fluxo sanguíneo em diferentes leitos vasculares (para revisão ver Le Bars et al., 2001). Em mamíferos, estas respostas são integradas através da estimulação de redes neuronais capazes de alterar a reatividade nociceptiva frente a situações de perigo iminente e em situações patológicas podem ser letais, como na hipereflexia autonômica resultante de lesão da medula espinhal (para revisão ver Godim et al., 2004). Esta resposta reflexa rápida, é, na maior parte das vezes, mediada por comunicação interneuronal através de sinapses espinhais e bulbares. Contudo, os estudos destinados a identificar as estruturas bulbares que compõem o arco reflexo, bem como o nível de correlação anatomofuncional existente entre a nocicepção e o ajuste autonômico, são escassos. Acredita-se que as vias aferentes e eferentes que medeiam estes ajustes, também conhecidos como reflexos somatosensoriais ou somatosimpáticos (Sato e Schmidt, 1973) sejam as mesmas vias responsáveis pela neurotransmissão de informações nociceptivas (Kozelka et al, 1981, Stornetta et al., 1989). Neste sentido, vários estudos apontam o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo reticular rostroventrolateral (RVL) como componentes essenciais à integração do reflexo somatosensorial. De fato, a lesão do RVL abole

completamente o aumento pressor induzido pela estimulação do nervo ciático (Stornetta et al., 1989; Verberne & Guyenet, 1992; McCulloch et al., 1999). É importante lembrar que o RVL constitui a origem das eferências simpáticas excitatórias do cérebro. Embora a inativação do NTS reduza sutilmente a taquicardia, não afeta a hipertensão reflexa à estimulação nociceptiva da córnea ou da pata dianteira de ratos (Boscan et al., 2001, 2002). Assim, aonde estaria localizada a primeira sinapse no cérebro que intermediaria essas respostas autonômicas que integram o reflexo somatosensorial? Dados neuroanatômicos e funcionais sugerem que o núcleo paratrigeminal talvez seja um dos integrantes mais proeminentes do circuito responsável pelo reflexo somatosensorial (Caous et al., 2001; Yu et al., 2002; Koeppe et al., 2005; Caous et al., submetido; Koeppe et al., submetido).

1.4. O Núcleo Paratrigeminal

O núcleo paratrigeminal, um integrante do complexo trigeminal espinhal, é constituído de uma coleção difusa de neurônios e neurópila (Phelan e Falls, 1989) e está localizado na porção dorsolateral do bulbo (Chan-Palay, 1978). Até recentemente a literatura informava apenas que esta área recebia aferências de ramos dos nervos vago, glossofaríngeo e trigeminal e da medula espinhal (Panneton e Burton, 1985; Hamilton e Norgren, 1984; Altschuler et al., 1989) e emitiria projeções ao NTS e ao complexo parabraquial (PB) (Amstrong e Hopkins, 1998; Saxon e Hopkins, 1998). Estes conhecimentos sugeriam que o núcleo desempenhasse um papel na regulação das funções orgânicas vegetativas (Menetrey et al., 1987). Investigações neuroanatômicas mais recentes revelaram que o núcleo paratrigeminal também emite projeções para os núcleos reticular

rostromedial (RVL), ambíguo (Amb), reticular lateral (LRt), e o núcleo talâmico ventroposteromedial (VPM) (Buck et al., 2001, Caous et al., 2001) (Figura 1)

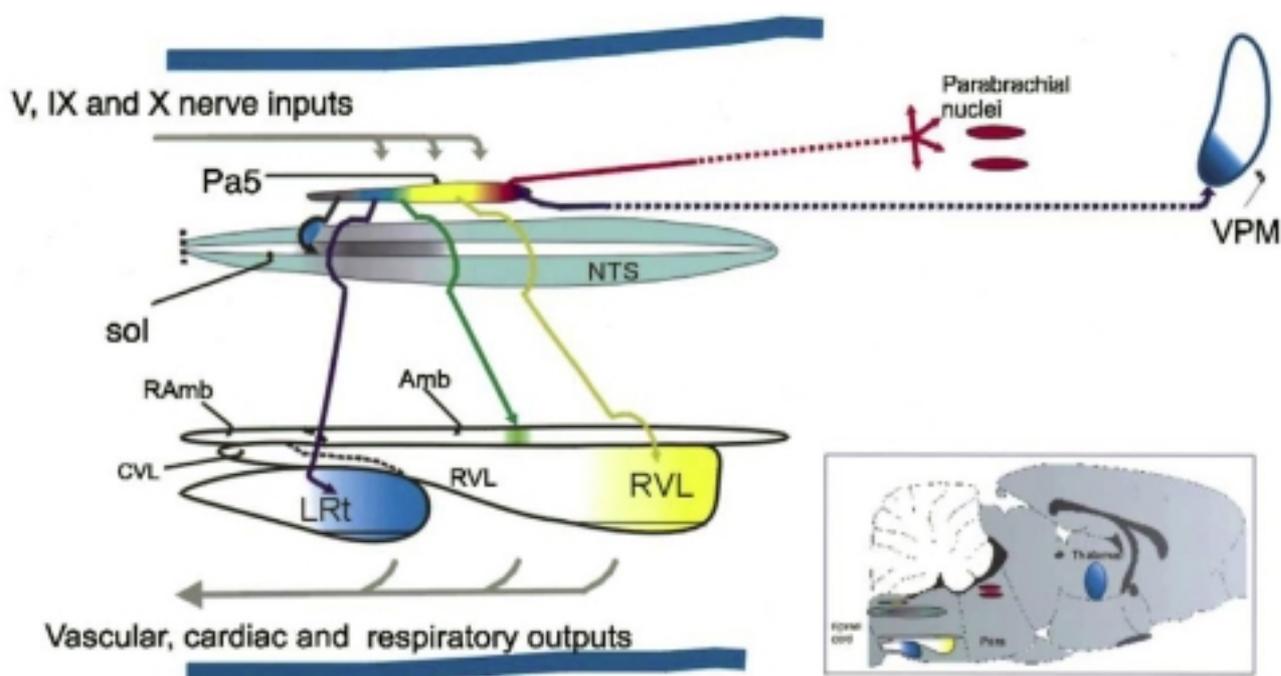


Figura 3 – Topografia das conexões aferentes e eferentes do núcleo paratrigeminal de acordo com Caous e cols. (2001). O painel inferior em menor aumento demonstra a posição relativa das estruturas cerebrais no encéfalo de rato. Abreviações: nervos trigêmeo (V), glossofaríngeo (IX) e vago (X); núcleo paratrigeminal (Pa5); núcleo reticular rostromedial (RVL); núcleo ambíguo (Amb); núcleo reticular lateral (LRt); núcleo ventroposteromedial do tálamo (VPM); núcleo parabraquial (PB).

Conforme descrito acima, o RVL é essencial para homeostase circulatória e pressão arterial devido a presença de neurônios tanto adrenérgicos C1 como não-adrenérgicos que projetam, diretamente, aos segmentos torácicos e lombares da medula espinhal, constituindo assim as eferências simpáticas excitatórias do cérebro. A mesma região tem projeções rostrais para a região antero ventral do terceiro ventrículo (Saper et al., 1983), hipotálamo, área peribraquial e amígdala (Ruggiero et al., 1985). Por outro lado, o núcleo ambíguo representa as eferências parassimpáticas vagais para o coração uma vez que os neurônios viscerais vagais originam-se neste núcleo (Chan et al., 1986; Massari et al., 1995; Panneton et al., 1996). Tendo conexões recíprocas ao bulbo caudal e ventral (McKittrick e Calaresu, 1997), o núcleo ambíguo regula seletivamente a frequência cardíaca (Gatti et al., 1996). O núcleo reticular lateral parece estar envolvido na mediação de estímulos nociceptivos (Liu et al., 1989; Sotgiu, 1990; Janss e Gebhart 1988), controle motor, respiratório (Tian, 1995) e reflexos cardiovasculares à hemorragia (Thomas et al., 1977). Já as projeções do núcleo paratrigeminal para os núcleos parabraquiais e VPM sugerem funções na termoregulação, respiração (Panneton et al., 1985) e principalmente no processamento da informação nociceptiva. Portanto, as aferências e eferências do núcleo paratrigeminal habilitam o mesmo a ter funções associadas à nocicepção, respiração, termoregulação, controle cardiovascular central e possivelmente nos mecanismos que modulam os reflexos cardiovasculares a estímulos nociceptivos.

1.4.1. Funções do núcleo paratrigeminal

Vários estudos apontam ativação do núcleo paratrigeminal na dor orofacial, visceral e na inflamação. Neste sentido, foram detectados aumentos acentuados da expressão do proto-oncogene *c-fos* no núcleo paratrigeminal de rato em resposta à aplicação de capsaicina (que causa dor por ativação de receptores vanilóides 1; TRPV1, expressos quase que exclusivamente em fibras sensitivas C; Caterina et al., 1997), nicotina, histamina, piperina ou acetilcolina à superfície lingual (Carstens et al., 1995), à mucosa laringofaríngea (Boucher, 2003), bem como após a injeção de adjuvante completo de Freund na articulação temporomandibular (Zhou et al., 1999). A injeção de óleo de mostarda nesta mesma articulação evoca um aumento mais modesto de *c-fos* no núcleo paratrigeminal (Hathaway et al., 1995). É importante ressaltar, porém, que a indução de inflamação na articulação temporomandibular com adjuvante completo de Freund também causa aumentos bilaterais (ainda que assimétricos) da expressão de RNAm para pré-pró-dinorfina em áreas do complexo do trigêmeo, incluindo o núcleo paratrigeminal (Imbe & Ren, 1999). Evidenciou-se também, através da microscopia eletrônica, terminações de nervos da polpa dentária (fibras C e Aδ nociceptivas) no núcleo paratrigeminal (Lapa et al., 1996). De maneira interessante, o aumento do proto-oncogene *c-fos* no núcleo paratrigeminal não se restringe somente a região orofacial uma vez que estes aumentos também foram detectados após a indução de cistite por injeção de ciclofosfamida (Bon et al., 1997, 1998), um modelo de dor visceral.

Achados empíricos sugerem que o núcleo possivelmente tenha função na regulação da respiração, pois a lesão bilateral do mesmo leva à parada respiratória em ratos anestesiados (dados não publicados). Além disso, a inalação

de vapores de amônia determina, em nútria (“musk rat”), respostas cardiovasculares imediatas (bradicardia e hipertensão acentuadas) associadas à apnéia expiratória sustentada (McCulloch e Panneton, 1997). A exposição prolongada a amônia causa ainda aumento da expressão do proto-oncogene *c-fos* nos núcleos do trigêmeo e paratrigeminal. Por outro lado, há a sugestão de que o núcleo paratrigeminal desempenhe um papel na mediação de estímulos exteroceptivos durante a hibernação de esquilos (Kilduff et al., 1983). No processo de hibernação, as informações mais importantes seriam as relacionadas à temperatura corpórea e ambiental.

Porém, ainda não há na literatura informações objetivas, de natureza comportamental ou eletrofisiológica, que comprovem a real função do núcleo paratrigeminal no processamento central de informações nociceptivas. A presença de peptídeos opióides no núcleo, bem como a plasticidade deste sistema em resposta a estímulos nociceptivos poderia sugerir que, em quadros dolorosos, a atividade do núcleo seja deprimida, enquanto o aumento de *c-fos* constitui um argumento contrário a essa possibilidade. Por outro lado, é sabido que a indução de dor por injeção intraplantar de formalina na pata (Culman et al., 1997; Taylor et al., 1997), pela ativação de fibras sensitivas do ducto biliar com capsaicina ou estimulação elétrica (Griesbacher, 1994), ou ainda por estimulação da polpa dentária (Allen et al., 1996) está associada com alterações cardiovasculares significativas, como hipertensão arterial e taquicardia. Além disso, as respostas nociceptivas comportamentais e cardiovasculares induzidas por injeção de formalina, apresentam-se exageradas em ratos espontaneamente hipertensos (Taylor et al., 1995). Neste sentido, resultados prévios demonstrando que a bradicinina administrada no núcleo paratrigeminal é capaz de evocar

alterações cardiovasculares pronunciadas, que tais ações são potencializadas em ratos hipertensos (Lindsey et al., 1995; 1997), e que o núcleo paratrigeminal participa na regulação do baroreflexo (Yu e Lindsey, 2003) parecem reforçar a possibilidade de esta estrutura estar implicada de modo importante na integração das respostas cardiovasculares à dor. Em vista do exposto, a presente tese tem por propósito fornecer uma visão acerca da possível relevância fisiológica e farmacológica do núcleo paratrigeminal nas respostas cardiovasculares e comportamentais à estimulação nociceptiva.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo geral:

- Avaliar a participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial e no processamento central da informação nociceptiva.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos a serem alcançados com os experimentos durante o estudo foram:

- Analisar as alterações autonômicas cardiovasculares induzidas pela estimulação elétrica do nervo ciático (reflexo somatosensorial);
- Mapear a via ascendente do reflexo somatosensorial;
- Avaliar a influência das fibras aferentes primárias sensíveis à capsaicina sobre o reflexo somatosensorial;
- Avaliar a influência da lesão unilateral do núcleo paratrigeminal sobre as alterações da pressão arterial e da frequência cardíaca induzidas por estimulação elétrica do nervo ciático de ratos;
- Caracterizar os efeitos da microinjeção, no núcleo paratrigeminal, de antagonistas de receptores para peptídeos centrais implicados no controle

dos reflexos cardiovasculares evocados por estimulação do nervo ciático.

Os sistemas investigados incluíram cininas, taquicininas e opióides;

- Investigar a influência da estimulação elétrica do nervo ciático sobre a expressão dos produtos gênicos que codificam os receptores B₁ e B₂ para bradicinina em neurônios do núcleo paratrigeminal de ratos;
- Determinar a possível localização dos receptores peptidérgicos em neurônios do núcleo paratrigeminal através do tratamento neonatal de ratos com capsaicina;
- Avaliar a participação do núcleo paratrigeminal na alteração cardiovascular reflexa à estimulação nociceptiva de fibras aferentes em animal consciente;
- Comparar a influência da lesão unilateral do núcleo paratrigeminal sobre a responsividade nociceptiva à aplicação de estímulos químico, mecânico e térmico na pata posterior ou na região orofacial de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 280 e 350 g, criados pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e pelo Biotério Central da Escola Paulista de Medicina. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12 hs, sendo o ciclo claro a partir das 06:00 hs. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, protocolos número 257/CEUA e 23080.031362/2003-56/UFSC) e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983)

3.2. Alterações cardiovasculares induzidas pela estimulação do nervo ciático.

3.2.1 Procedimentos gerais

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p.) e um catéter, constituído por um tubo de polietileno de 15 cm de comprimento (PE60) soldado a outro tubo de 5 cm de comprimento (PE10), foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral esquerda. A extremidade do catéter composta pelo PE60 foi conectada a um transdutor de pressão (TP-1, Ampère Eletro-Eletrônica, São Paulo, SP, Brasil) acoplado a um sistema CED (Cambridge Electronics Design, UK) para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e da frequência cardíaca (FC). O sistema CED consiste de um programa de aquisição de dados Spike 2 (CED) e um amplificador CyberAmp 380 (Axon Instruments,

Foster City, CA, USA). A traquéia foi canulada e os animais foram colocados no estereotáxico (David Kopf Instruments, Tucanja, CA, USA). Em seguida, os animais foram mantidos sob anestesia constante através de um sistema de ventilação artificial (Inspira-ASV, Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA) com 70 % de oxigênio e vaporização com isofluorano (1.5 – 3.0 %). Para a indução de bloqueio neuromuscular os ratos receberam injeção de d-tubocurarina (0,15 mg/kg, i.p., repetida a intervalos de 90 minutos). A temperatura corpórea foi mantida em 36.5 °C através de uma placa homeotérmica auto-ajustável, (thermopad, Harvard Apparatus) acoplada a uma sonda retal. A completa anestesia após a paralisia foi pela estabilidade da PAM (\cong 80 mmHg) e da FC.

3.2.2. Estimulação elétrica do nervo ciático

O nervo ciático foi exposto no aspecto lateral da perna e isolado com película Parafilm interposta entre a camada muscular e o nervo. Para garantir o isolamento elétrico, o nervo foi ainda coberto com óleo mineral no momento do estímulo. Em seguida, o nervo ciático foi cuidadosamente suspenso sobre um eletrodo bipolar de platina conectado a uma unidade de estímulo isolada (PSIU7) acoplada a um estimulador Grass S88. Inicialmente, a fim de otimizar os parâmetros de estimulação, foram testadas as alterações cardiovasculares evocadas por pulsos de 100 μ s, 0,05 a 0,8 mA de corrente em frequências entre 1 e 50 Hz. Os resultados levaram-nos a optar por trens de pulsos quadrados de 100 μ s de duração, 100 ou 600 μ A de corrente, aplicados por 10 s à uma frequência de 2, 10 ou 20 Hz em intervalos de 15 min.

Em alguns experimentos o nervo ciático recebeu somente estímulos de alta intensidade, constituídos de 3 trens de pulsos quadrados de 100 μ s e 600 μ A,

aplicados a 20 Hz por 10 s, em intervalos de 15 min. Nestes animais, a resposta eliciada pelo primeiro estímulo foi considerada como controle. O segundo e o terceiro estímulos foram aplicados 10 e 40 min após a microinjeção ipsi-, contra- ou bilateral de um dos agentes farmacológicos no núcleo paratrigeminal respectivamente.

3.2.3. Secção da medula espinhal

A medula espinhal de ratos anestesiados e paralisados foi cuidadosamente exposta pela remoção da lâmina vertebral e então seccionada bilateral ou unilateralmente em relação ao nervo estimulado, no aspecto transversal ao nível da oitava vértebra torácica.

3.2.4. Fibras sensíveis à capsaicina

Para verificar a participação das fibras aferentes primárias nociceptivas no reflexo somatosensorial fizemos uso do tratamento neonatal com capsaicina. A capsaicina, um agonista seletivo de receptores TRPV1 (Caterina et al., 1997) quando aplicada em doses adequadas (50 mg/kg em ratos neonatos), causa a morte de aproximadamente 80% das fibras não mielinizadas (fibras C) e uma pequena proporção de fibras pouco mielinizadas (fibras A δ) (Ren et al., 1994). Assim, os animais receberam injeção subcutânea de capsaicina (50 mg/kg, s.c) ou veículo (PBS com 10 % de etanol e 10 % de Tween 80) em um volume de 10 μ l/g de peso corpóreo no segundo dia de vida pós-natal (Ren et al., 1994) e, 4 semanas após o nascimento foram isolados da mãe e separados por sexo. Ao atingirem a idade adulta (280 – 350 g), os animais foram anestesiados,

cateterizados e o nervo ciático foi exposto, isolado e estimulado conforme descrito acima.

Para confirmar a destruição das fibras aferentes primárias sensíveis a capsaicina foi verificada a reatividade nociceptiva à injeção intraplantar de capsaicina (0,08 µg/µl em 100 µl). Em animais adultos, que receberam capsaicina no segundo dia de vida, ocorreu uma inibição de 82 % no tempo de reação ao estímulo, quando comparado com os animais que receberam somente veículo.

3.3. Participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial.

3.3.1. Lesão do núcleo paratrigeminal

Para se ter acesso ao núcleo paratrigeminal, ratos anestesiados e artificialmente ventilados foram submetidos a craniotomia occipital. A craniotomia consiste em expor a porção caudal do IV ventrículo e o vermis posterior do cerebelo, permitindo assim a visualização do *calamus scriptorium* (CS; Figura 4), a partir do qual foram determinadas as coordenadas estereotáticas (+1,3 mm anteroposterior, + 2,4 mm lateral e 0,3 mm vertical) através de uma agulha gengival (30G; conectada a um tubo de polietileno PE10) fixada ao braço do estereotáxico (ângulo de 15 graus). Após o posicionamento da agulha seguindo as coordenadas acima, fez-se a microinjeção uni- ou bilateral de ácido ibotênico (0,15 µl; 1 µg/0,1 µl), um agonista glutamatérgico não seletivo (Krogsgaard-Lasen e Hansen, 1992; Hermit et al., 2004) ou cloreto de cobalto (0,1 µl de uma solução de 40 mM), um bloqueador de transmissão sináptica (Malpeli e Burch, 1982). O ácido ibotênico produz uma lesão seletiva e irreversível de corpos celulares, deixando as fibras de passagem intactas, enquanto que o cloreto de cobalto bloqueia temporariamente a transmissão sináptica (Malpeli e Burch, 1982). Os

animais falso-operados receberam uma única injeção de salina em um volume de 0,15 µl seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

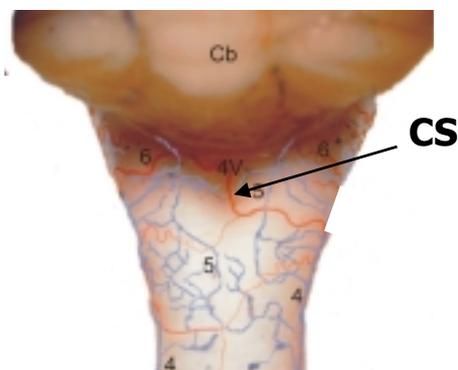


Figura 4. Ilustração esquemática do demonstrando a localização aproximada do *calamus scriptorium* no bulbo de um rato. Abreviações: CS, *calamus scriptorium*; 4V, quarto ventrículo; Cb, cerebelo.

3.3.2. *Microinjeção de antagonistas no núcleo paratrigeminal*

Utilizando a técnica da craniotomia occipital descrita acima, foram utilizados os seguintes antagonistas: antagonistas seletivos de receptores B₁ (Des-Arg¹⁰-HOE140; Des-Arg⁹Leu⁸-BK; 20 pmol/0,2 µl) e de receptores B₂ (HOE140 e LF 160687; 20 e 100 pmol/0,1 µl) para a bradicinina; antagonistas seletivos de receptores NK1 (LY306740; RP67580), NK2 (SR48968) e NK3 (R-486) para taquicininas na dose de 100 pmol/0,1 µl; antagonistas seletivos de receptores µ (Cys²-Tyr³-Orn⁵-Pen⁷-amide, CTOP; 1 µg/0,1 µl) κ, (nor-binaltorfimina, nBNI, 1,8 µg/0,1 µl) e δ (naltrindole, 1 µg/0,1 µl) opióides.

3.3.3. *Verificação do posicionamento das injeções*

A posição das microinjeções no núcleo paratrigeminal foi verificada através da injeção de biocitina ou azul de Evans (0,1 µl) imediatamente após a aplicação de ácido ibotênico ou um dos antagonistas citados acima. Após o término dos experimentos, foi realizada uma perfusão transcardíaca com paraformaldeído 4%. Em seguida, os cérebros foram retirados e deixados em uma solução de paraformaldeído 4% e sacarose 30% por um período de 12 horas. Foram então obtidos cortes seriados de 30 µm, que foram montados em lâmina de vidro e ampliados fotograficamente para identificação histológica do sítio de injeção (Figura 11).

3.4. Análise da expressão de produtos gênicos

Para analisar a influência da estimulação elétrica do nervo ciático sobre os produtos gênicos codificadores de receptores B₁ e B₂ para bradicinina no núcleo paratrigeminal de ratos, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral. Em seguida o nervo ciático foi exposto e estimulado eletricamente com três trens de pulsos de 100 µs e 600 µA, aplicados a 20 Hz por 10 s em intervalos de 15 min. Animais cujo nervo ciático não foi estimulado, mas sim apenas exposto, constituíram o grupo controle.

Em outra série de experimentos, avaliamos a influência da degeneração seletiva de fibras sensíveis a capsaicina sobre a expressão de produtos gênicos codificadores de receptores B₁ e B₂ para bradicinina no núcleo paratrigeminal de ratos. Para tal, o nervo ciático de animais adultos, tratados previamente com capsaicina ou veículo no segundo dia de vida pós-natal, foi estimulado conforme descrito acima.

Ao final dos experimentos, todos os animais foram sacrificados por decapitação. O cérebro foi removido, o bloco de tecido contendo o núcleo paratrigeminal foi rapidamente congelado com nitrogênio líquido, o núcleo paratrigeminal foi retirado e armazenado em um tubo tratado com água DePC contendo 1 ml de trizol para extração do RNA total. O RNA total foi utilizado para realização da reação de transcriptase reversa (RT) do RNA mensageiro para obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit ThermoScript™ RT-PCR System da invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Alíquotas das amostras de cDNA foram utilizadas para a reação de PCR.

3.4.1. Reação de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Com o intuito de estabelecer condições ótimas para as reações de PCR foi utilizado como substrato o plasmídeo pSK/BRA-2 (100 ng/μl) contendo a sequência do cDNA do receptor B₂ da Bradicinina. Para o receptor B₁, utilizamos o plasmídeo pcRB1 RAT (100ng/μl). Para as reações de PCR foram utilizadas várias diluições do plasmídeo, de 10⁹ a 10¹ cópias/μl. A amplificação das amostras foi realizada pela técnica do PCR (Saiki et al., 1985), onde utilizamos para o receptor B₂ da bradicinina em ratos, 2 μl de cDNA com 5 μl de tampão sem cloreto de magnésio (Tris-HCl 200mM, pH 8.4; KCl 500mM); 2μl de cloreto de magnésio (MgCl₂ 50mM) ; 1 μl de dNTP Mix (10mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1 μl de cada “primer” na concentração inicial de 10 μM (iniciador 5' e 3') e 0,5 μl de Taq DNA polimerase (Invitrogen-Life) 5 U / μl completando a reação para 50 μl com água milli-Q tratada com DEPC. Para o receptor B₁ de bradicinina, foi utilizado 2 μl de cDNA com 5 μl de tampão sem cloreto de magnésio (Tris-HCl 200mM (pH 8.4); KCl 500mM); 1.5 μl de cloreto de magnésio (MgCl₂ 50mM) ; 1μl

de dNTP Mix (10mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 1.5 µl de cada “primer” na concentração inicial de 10 µM (iniciador 5' e 3') e 0,5 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen-Life) 5 U /µl completando a reação para 50 µl com água milli-Q tratada com DEPC. Após a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos em termociclador (Gene Techne, Cambrigde, UK), a amplificação para B₂ foi realizada com 34 ciclos e a amplificação para B₁ em 35 ciclos. As sequências dos *primers* utilizados em nossos experimentos, foram direcionados para o exon 1 ao exon 3 do receptor B₁ e para o exon 1 ao exon 4 do receptor B₂ de cininas (Tabela 1).

Tabela 1. Sequência de *primers* dos receptores B₂ e B₁ para bradicinina e da β-actina utilizados nas reações de PCR.

PRIMERS	SEQUÊNCIA	LOCALIZAÇÃO *
Receptor B ₂	RB ₂ S 5' GAC TCC CTA CAA CAC AGA ACC 3'	Exon 1 74 a 95 ¹
	RBK ₂ R 5' GAC GTT GTG GCC CTC TTC CC 3'	Exon 4 908 a 928 ¹
Receptor B ₁	BK ₁ S 5' CTG TGG ATG GCG TCC GAG GT 3'	Exon 1 685 a 705 ²
	BK ₁ R 5' GCT ACC AGT GTG AGG AT 3'	Exon 3 1474 a 1491 ²
β-actina	B ₃ S 5' GCT CAG GAG GAG CAA TGA GCT GAA 3'	Exon 1 518 a 539 ³
	B ₅ R 5' CGT GAC ATC AAA GAG AAG CTG 3'	Exon 2 2422 a 2443 ³

* De acordo com a seqüência genômica publicada para o receptor B₁ (Ni et al., 1998), B₂ (Pesquero et al., 1994) e da β-actina (Nudel et al., 1983).

3.4.2. Eletroforese em gel de agarose

O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1.5% com tampão composto por tris-base, acetato de sódio anidro, ácido etilenodinitretacético dissódico e ácido acético glacial. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal (Horizon 58, Gibco, New York, EUA) e foi aplicada uma voltagem de 100 V durante 30 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídeo 10 mg/ml, visualizados em um transiluminador de ultra violeta (Mighty

Bright-Hoefer Scientific, San Francisco, CA, EUA) e fotografados (Polaroid-Hoefer's-Photo Man, San Francisco, CA, EUA).

3.5. Participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial em animal consciente

3.5.1. Respostas cardiovasculares reflexas à injeção de formalina

Para avaliar o reflexo somatosensorial em animal consciente, utilizamos uma modificação da técnica descrita por Culman e col. (1997), no qual foram medidos tanto as alterações cardiovasculares quanto as respostas nociceptivas comportamentais induzidas pela injeção intraplantar de formalina. A resposta nociceptiva à formalina é constituída de duas fases características. A primeira fase, que é de origem neurogênica (i.e. decorrente da estimulação direta dos nociceptores), ocorre nos primeiros 10 min após injeção. Já a segunda fase, também chamada de fase inflamatória ou tônica (pois depende da liberação de múltiplos mediadores inflamatórios), se manifesta somente a partir de 15-20 min após a injeção (Dubuisson e Dennis, 1977). Já o período entre 10-20 min, também chamado de interfase decorre de inibição ativa (Henry et al, 1999).

Após anestesia com hidrato de cloral (300 mg/kg, i.p.), procedeu-se à canulação da artéria femoral esquerda do rato conforme descrito no item 3.2.1.. Em seguida, a extremidade oposta do catéter foi passada por debaixo da pele, emergindo na nuca do animal onde foi fixada e temporariamente ocluída. Em um grupo paralelo, para avaliar a participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial em ratos conscientes, procedeu-se à lesão do núcleo paratrigeminal com ácido ibotênico através da craniotomia occipital descrita no item 3.3.1. Finalizados os procedimentos cirúrgicos, todos os animais receberam

terramicina (300 mg/kg; i.m.), um antibiótico de amplo espectro e permaneceram em gaiolas individuais por 3 dias para a total recuperação. Neste período todos os animais foram ambientalizados ao aparato experimental, que consistiu de uma caixa de acrílico transparente, onde cada animal permaneceu por um período de 1 h por dia durante 2 dias consecutivos. No dia do experimento, o animal foi novamente introduzido no aparato experimental e uma das extremidades do catéter foi conectada a um transdutor de pressão (Narco Biosystems, EUA) acoplado a um fisiógrafo (Narco Biosystems ou Powerlab) para medida da PA e da FC (Figura 4). Um período de trinta minutos foi esperado para estabilização da PA, e em seguida, um volume de 50 μ l da solução de formalina (0,625 – 5%) foi injetado na pata posterior traseira do rato. A resposta nociceptiva comportamental do animal foi quantificada analisando o número de vezes que o animal lambeu, sacudiu e/ou elevou a pata injetada em intervalos de 5 min, durante os 60 min subsequentes à injeção. A resposta comportamental à formalina foi correlacionada com alterações dos parâmetros cardiovasculares, registrados simultaneamente (PA e FC).

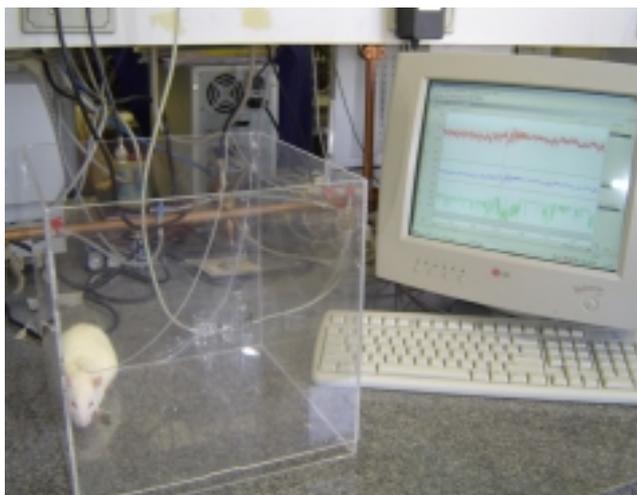


Figura 5 – Fotografia do aparato experimental utilizado para monitorar o reflexo somatosensorial em animal acordado.

3.5.2. Análise histológica

Dez dias após o término dos experimentos, os animais foram anestesiados, perfundidos com solução salina seguida de solução de formaldeído 10% e os cérebros foram retirados e novamente mantidos em formaldeído 10% para fixação e melhor visualização. Cortes seriados de 30 μ m foram obtidos e montados em lâmina de vidro, corados através da coloração de cresil e ampliados fotograficamente para identificação de células gliais e lesão de corpos celulares do núcleo paratrigeminal.

3.6. Lesão do núcleo paratrigeminal e a percepção dolorosa periférica.

3.6.1. Estimulação química

Para avaliar a influência do núcleo paratrigeminal sobre o comportamento nociceptivo evocado pela estimulação química da pata de ratos, foram utilizados os testes da capsaicina e da formalina. O último encontra-se descrito no item

anterior. Já o teste da capsaicina consistiu em administrar uma injeção intraplantar (i.pl.) de capsaicina (1 µg / 50 µl) ou veículo (salina; 50 µl), em uma das patas posteriores do animal e o tempo que o animal despendeu lambendo, sacudindo ou mantendo a pata injetada elevada foi registrado, através de um cronômetro, a intervalos de 5 min durante os 10 min subseqüentes à injeção.

Com o intuito de reduzir a variabilidade nas respostas nocifensivas evocadas pelos agentes álgicos e descartar a possibilidade de ocorrência de analgesia induzida por estresse, os animais foram habituados ao aparato experimental diariamente por 1 h durante 3 dias consecutivos (Tjølsen et al., 1992). Após a adaptação, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (300 mg/kg) e através da técnica da craniotomia descrita anteriormente, receberam injeção de salina ou ácido ibotênico no núcleo paratrigeminal esquerdo. Três dias após o procedimento cirúrgico, cada animal recebeu uma injeção intraplantar de formalina (2,5 % em 50 µl) ou capsaicina (1 µg em 50 µl) na pata esquerda (ipsilateral ao núcleo) ou direita (contralateral ao núcleo) e o comportamento nocifensivo evocado por cada um dos agentes foi quantificado.

3.6.2. Estimulação térmica

A influência do núcleo paratrigeminal sobre a responsividade nociceptiva a um estímulo térmico (calor) aplicado na pata posterior de ratos foi avaliada através do método proposto por Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). Brevemente, através do emprego de um aparelho de teste plantar da Ugo Basile (modelo 7370, Milão, Itália) aplicou-se um feixe luminoso (potência de 50 W) diretamente à superfície plantar da pata traseira do rato e o tempo transcorrido (em s) até que o animal eleve a pata irradiada foi registrado e chamado de

latência de resposta. Então, um dia antes dos experimentos, cada animal permaneceu por 30 min no aparato experimental, o qual consiste de uma plataforma plana de acrílico transparente dividida em três compartimentos menores (dimensões: 22 x 19 x 15 cm). Após habituação, a medida da latência de retirada da pata foi avaliada antes e 3 dias após a injeção de salina ou ácido ibotênico no núcleo paratrigeminal. Em cada ocasião, foram realizadas 3 avaliações consecutivas da latência de retirada da pata em intervalos de 5 min. A média dos 3 registros obtidos a partir de cada animal foi utilizado como estimativa do limiar nociceptivo em segundos (s). Para descartar a possibilidade de dano tecidual, foi adotado um tempo de corte de 30 s. Em outra série de experimentos, foi testada a influência do cloridrato de morfina (5 mg/kg; i.p.) sobre este modelo experimental, como controle positivo.

3.6.3. Estimulação mecânica

A aplicação de um estímulo mecânico de alta ou de baixa intensidade na pata posterior de ratos foi realizada através do emprego de um analgesímetro (Teste de Randall-Selitto) ou através de um estesiômetro plantar dinâmico (Eletronic von-Frey, modelo 37400) ambos da Ugo Basile (Milão, Itália), respectivamente. Nos experimentos utilizando o teste de Randall-Selitto, cada animal foi removido de sua caixa e suspenso pelo experimentador com auxílio de um tecido de algodão. Cada uma de suas patas traseiras foi alternadamente posicionada entre uma plataforma circular e um cone de acrílico. Uma vez no lugar, foi aplicado uma força progressiva na pata, que aumentava a uma taxa constante de 16 g/s até que o animal retirasse a pata do local. Em cada ocasião, foram realizadas 3 avaliações consecutivas a intervalos de 15 min. A média dos 3

registros obtidos a partir de cada animal foi utilizado como estimativa do limiar nociceptivo em (g). Para descartar a possibilidade de lesão tecidual, o peso máximo aplicado em cada pata do animal foi de 200 g.

O segundo aparelho consiste de dois compartimentos com paredes de acrílico transparente (22 x 19 x 15 cm) com fundo de tela de arame. Um estimulador de toque móvel, localizado logo abaixo da plataforma, é posicionado manualmente pelo experimentador, de modo a direcionar o seu filamento de aço à superfície plantar da pata desejada. O estimulador de toque está conectado a um controlador que permite aplicar à pata, através do filamento de aço, uma força de intensidade crescente (0,04 g/s até uma força máxima de 30 g). O aparelho registra automaticamente tanto o tempo transcorrido desde o início da estimulação até que o animal retire a pata estimulada (i.e. até que a pata perca contato com o filamento de estimulação), bem como a intensidade de força aplicada (em g) que acarretou a resposta de retirada da pata. No dia do experimento em si, e novamente 3 dias após a injeção de salina ou ácido ibotênico no núcleo paratrigeminal, cada animal foi introduzido individualmente em um dos compartimentos, por 15 min, antes de proceder-se as 3 avaliações consecutivas a intervalos de 5 min da latência de resposta basal à estimulação mecânica. A média dos 3 registros obtidos a partir de cada animal foi utilizada como estimativa do limiar nociceptivo em (g).

3.6.4. Análise histológica

Conforme descrito no item 3.5.2.

3.7. Lesão do núcleo paratrigeminal e a percepção dolorosa orofacial

3.7.1. Estimulação química

A influência da lesão unilateral do núcleo paratrigeminal sobre a responsividade nociceptiva à estimulação química da face foi avaliada através do método descrito inicialmente por Clavelou e col. (1989) aonde através da injeção subcutânea de formalina (1%; 50 µl) no lábio superior esquerdo (ipsilateral à lesão) ou direito (contralateral à lesão) faz-se o registro do comportamento de *grooming* facial bilateral durante 30 minutos a intervalos de 3 min. Novamente, antes de proceder a injeção de formalina em si, os animais foram habituados ao aparato experimental conforme descrito no item 3.6.1. Após habituação, o núcleo paratrigeminal esquerdo recebeu microinjeção de salina ou ácido ibotênico.

3.7.2. Estimulação térmica

A responsividade nociceptiva à estimulação térmica da face foi avaliada através da aplicação de uma fonte de calor (pirógrafo, 45 °C) na região orofacial. Brevemente, os animais foram contidos e uma fonte de calor foi direcionada à região próxima às vibrissas nos lados ipsilateral e contralateral da face. O tempo de latência para que os animais afastassem vigorosamente a cabeça da fonte ou apresentassem movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas foi registrado através de um cronômetro manual. O tempo de corte para a aplicação deste estímulo foi de 20 segundos. A reatividade à estimulação térmica foi avaliada antes e 3 dias após a lesão unilateral do Pa5.

3.7.3. Estimulação mecânica

A reatividade do rato à estimulação mecânica da face foi avaliada através da aplicação de uma série de filamentos de von Frey que produzem forças de 0,02; 0,04; 0,07; 0,16; 0,4; 1; 2; 4; 8 e 10 g. Para a realização deste procedimento os animais foram colocados individualmente em caixas de acrílico e habituados tanto ao aparato experimental quanto aos filamentos de von Frey durante um período de aproximadamente 60 minutos por 4 dias consecutivos. Os filamentos foram aplicados na área de inserção das vibrissas com pressão suficiente para proporcionar a curvatura do filamento. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas com um intervalo de 3 segundos entre cada aplicação. O último filamento utilizado foi aquele que induziu por duas vezes respostas nociceptivas que incluem retirada rápida da cabeça, reações de ataque/escape ou pelo menos três reações de grooming facial consecutivas. A reatividade à estimulação mecânica foi avaliada antes e 3 dias após a lesão unilateral do Pa5.

3.8. Substâncias Empregadas

Este estudo foi conduzido utilizando-se as seguintes substâncias: ácido ibotênico, capsaicina, Des-Arg⁹Leu⁸-BK, HOE-140 e isoflurano da Sigma Chemical Co; Des-Arg¹⁰ HOE140 (Península Chemicals), D-tubocurarina, formaldeído, hidrato de cloral e cloridrato de morfina da Merck Indústria Química S/A, Darmstadt, Alemanha; LY306740 ((R)-1-[N-(2-methoxibenzil)acetilamino]-3-(1H-indol-3-y1)-2-[N-(2-(4-cyclohexilpiperazina-1-y1)acetil)amino]propano) da Eli Lilly, Indianópolis, IN, USA; RP 67580 (antagonistas NK1) SR 48968 ((S)-N-metil-N-[4-(4-acetilamino-4-fenilpiperidina)-2-(3,4-diclorofenil)-butil]-benzamida) da Sanofi recherche, Montpellier, França; R486 (H-Asp-Ser-Phe-Trp-beta-Ala-Leu-

Met-NH₂) e LF16-0680 foram doações do Prof. Dr. Rejean Couture, Montreal, Canadá); CTOP (Cys² –Tyr³ –Orn⁵ –Pen⁷–amide), Naltrindole e nor-binaltorfimina da Tocris, Ellisville, USA.

3.9. Análise estatística

A pressão arterial média basal (PA), as alterações deste parâmetro produzidas pela estimulação do nervo ciático ou pelo tratamento neonatal com capsaicina, foram estatisticamente comparadas através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste “*t*” bicaudal de Student para amostras não pareadas (Snedecor e Cochran, 1967). Os limiares nociceptivos térmicos ou mecânicos antes e após a lesão do núcleo paratrigeminal foram estatisticamente comparado através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Newman-Keuls. As respostas autonômicas (PA e FC) e comportamentais deflagradas por injeção intraplantar de formalina foram comparadas com os de animais falso operados utilizando ANOVA de duas vias para medidas repetidas. Todos os resultados são apresentados como média ± E.P.M. e o nível mínimo de significância foi considerado $P < 0,05$ para todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1. O reflexo somatosensorial em animal anestesiado

A estimulação elétrica do nervo ciático com trens de pulsos quadrados de 0,1 ms de duração, 100 ou 600 μ A de corrente, aplicados por 10 s a uma frequência de 2, 10 ou 20 Hz causou aumentos da PA de maneira dependente da intensidade e da frequência do estímulo (Figura 6A). Já as alterações observadas na FC não foram significantes (≤ 5 bpm). A resposta pressora acompanhou o tempo de aplicação do estímulo, retornando ao valor basal ($86 \pm 2,5$ mmHg, n = 18) imediatamente após cessar o estímulo elétrico.

4.2. Influência da secção total da medula espinhal

A secção transversal da medula espinhal ao nível da oitava vértebra torácica, aboliu completamente o aumento da PA induzido por estímulos de alta intensidade (20 Hz/0,6 mA) aplicados ao nervo ciático (Figura 6B).

4.3. Participação das fibras sensíveis à capsaicina no reflexo somatosensorial

Conforme demonstra a Figura 7, o tratamento neonatal de ratos com capsaicina aboliu a resposta pressora induzida por estímulos de baixa intensidade (0,1 mA; painel A) aplicados ao nervo ciático de ratos anestesiados. Em contraste, o aumento pressor induzido por estímulos de alta intensidade (0,6 mA; painel B) foi potencializado em 101, 65 ou 72 % quando a frequência de estimulação foi de 2, 10 ou 20 Hz, respectivamente, em ratos tratados com capsaicina.

4.4. Participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial

A Figura 8 demonstra a influência da lesão ipsilateral, contralateral ou bilateral do núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial. A microinjeção de ácido ibotênico no núcleo paratrigeminal contralateral ao nervo estimulado, acarretou uma inibição de 80% da resposta pressora a estímulos de alta (0,6 mA; painel A) mas não de baixa intensidade (0,1 mA; painel B). Resultados semelhantes foram obtidos após a lesão bilateral do núcleo (55% de inibição do reflexo somatosensorial), embora em menor magnitude (painel A e B). Por outro lado, a lesão do núcleo paratrigeminal ipsilateral ao nervo estimulado não induziu qualquer alteração do reflexo somatosensorial em resposta a quaisquer dos parâmetros de estimulação utilizados, exceto, quando aplicou-se pulsos de 0,1 mA a 20 Hz (painel A), em que observou-se uma redução de 55% da resposta pressora. Os registros típicos destes resultados estão ilustrados na Figura 9.

O bloqueio da transmissão sináptica no núcleo paratrigeminal também causou uma redução da resposta pressora somente quando o cloreto de cobalto foi microinjetado contralateral mas não ipsilateralmente ao nervo estimulado (Figura 10A e B)

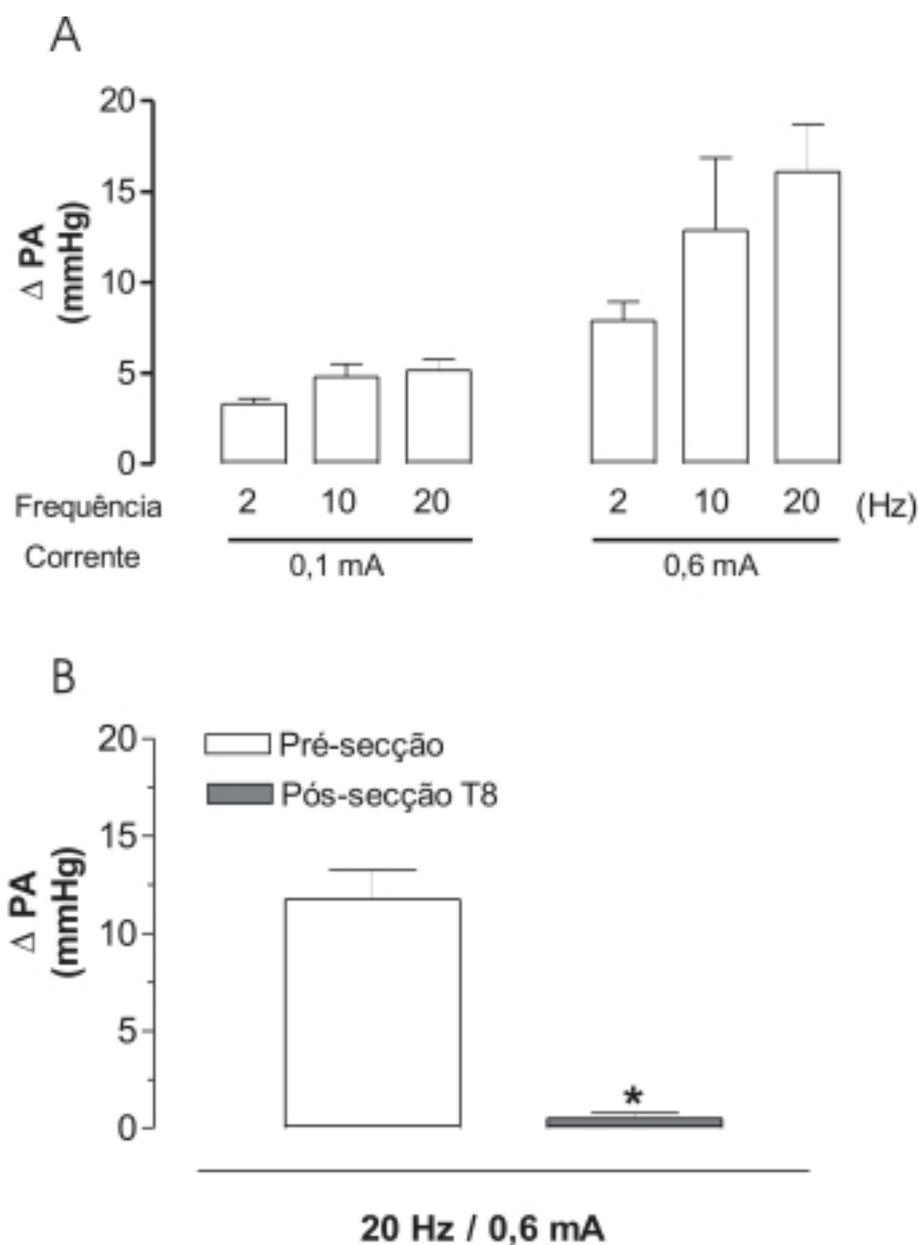


Figura 6 – Influência da intensidade e da frequência do estímulo elétrico aplicado ao nervo ciático sobre o aumento da pressão arterial média (PA) em ratos com a medula espinhal intacta (A) ou seccionada ao nível da oitava vértebra torácica (B). Em A todos os estímulos consistem de trens de pulsos quadrados de 1 ms aplicados a uma frequência de 2, 10 ou 20 Hz por 10 s. Em B, aplicou-se somente estímulos de 20 Hz em frequência e 0.6 mA de corrente. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 9 animais. * $P < 0,05$ (ANOVA seguido de teste t de Student) em relação ao grupo controle (Pré-seccção).

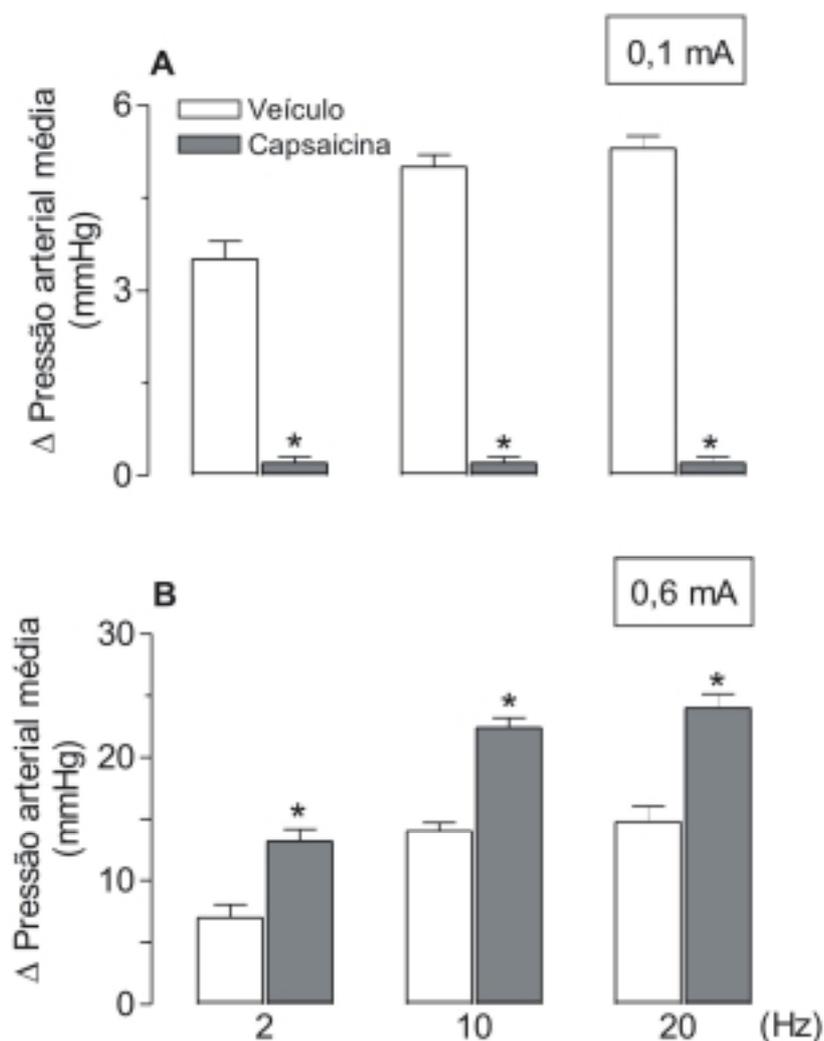


Figura 7 – Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre o reflexo pressor (AP) induzido pela estimulação do nervo ciático. Os estímulos consistiram de trens de pulsos quadrados de 0,1 ms de duração, 0,6 mA de intensidade e 2, 10 ou 20 Hz de frequência, aplicados por 10 segundos. As barras representam as respostas evocadas pelos animais tratados dois dias após o nascimento com veículo (branca) ou capsaicina (cinza). Cada valor representa a média \pm EPM de 8 experimentos. * $P < 0,05$ (ANOVA seguido de teste-t de Student) em relação ao grupo controle (veículo).

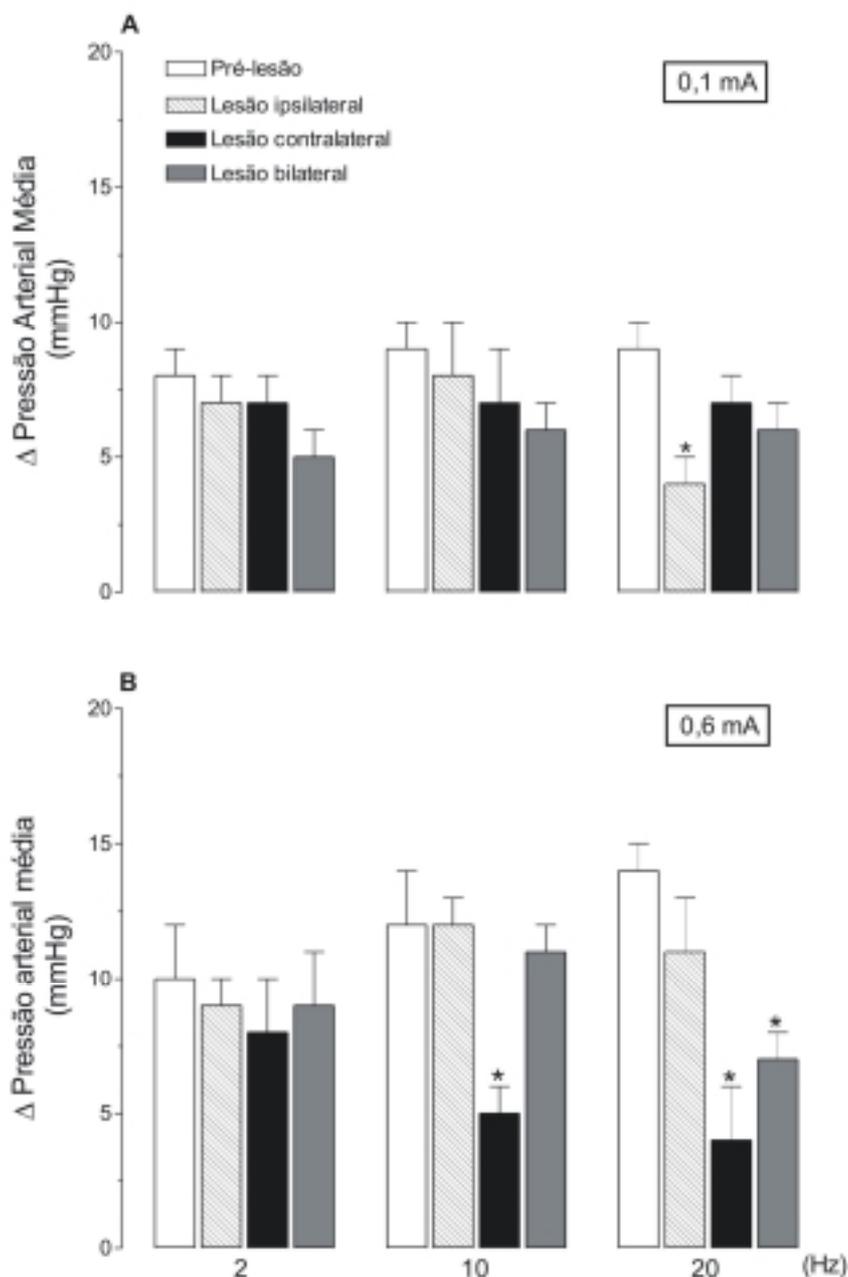


Figura 8 – Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial. Os painéis representam as alterações na pressão arterial média quando o nervo ciático é estimulado com trens de pulsos de 0,1 mA (**A**) ou 0,6 mA (**B**) a uma freqüência de 2, 10 e 20 Hz. As barras representam os estímulos aplicados antes ou após a lesão ipsi-, contra- ou bilateral do núcleo paratrigeminal. * $P < 0.05$ (ANOVA seguido de teste t de Student) em relação ao grupo controle (Pré-lesão).

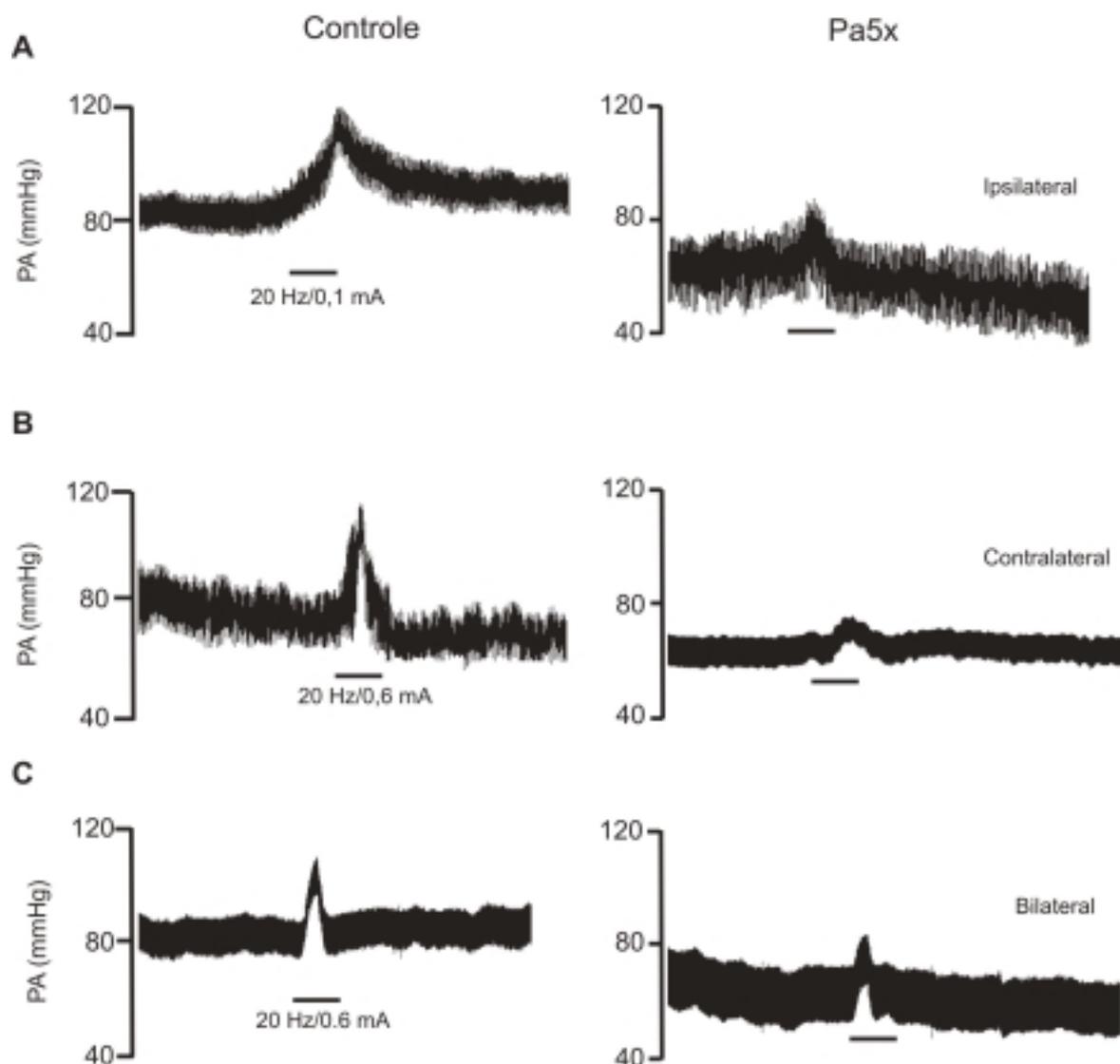


Figura 9 - Registros típicos das alterações na pressão arterial (PA) induzidas pela estimulação elétrica do nervo ciático de ratos antes (controle) e após a lesão do núcleo paratrigeminal (Pa5x) contralateral (A), ipsilateral (B) e bilateral (C). Os estímulos aplicados ao nervo foram trens de pulsos quadrados de 0,6 mA (A e C) ou 0,1 mA (B) a uma frequência de 20 Hz por 10 s.

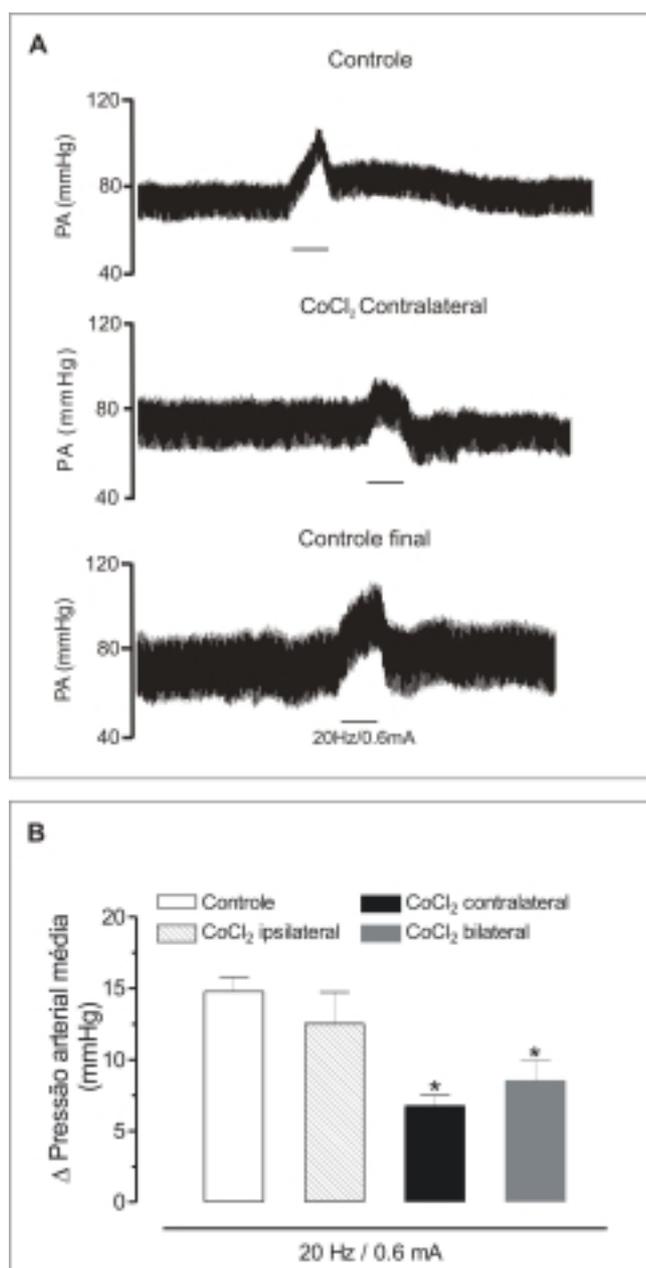


Figura 10 – Influência do bloqueio da transmissão sináptica do núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial. O painel A representa o registro típico das alterações na pressão arterial (PA) induzidas por estímulos de alta intensidade (20 Hz/ 0,6 mA) antes e após a microinjeção de CoCl₂ no Pa5 contralateral ao nervo estimulado. No painel B estão representadas as respostas pressoras antes ou após a microinjeção de CoCl₂ no núcleo paratrigeminal ipsi-, contra- ou bilateral do núcleo paratrigeminal. * P < 0.05 (ANOVA seguido de teste t de Student) em relação ao grupo controle.

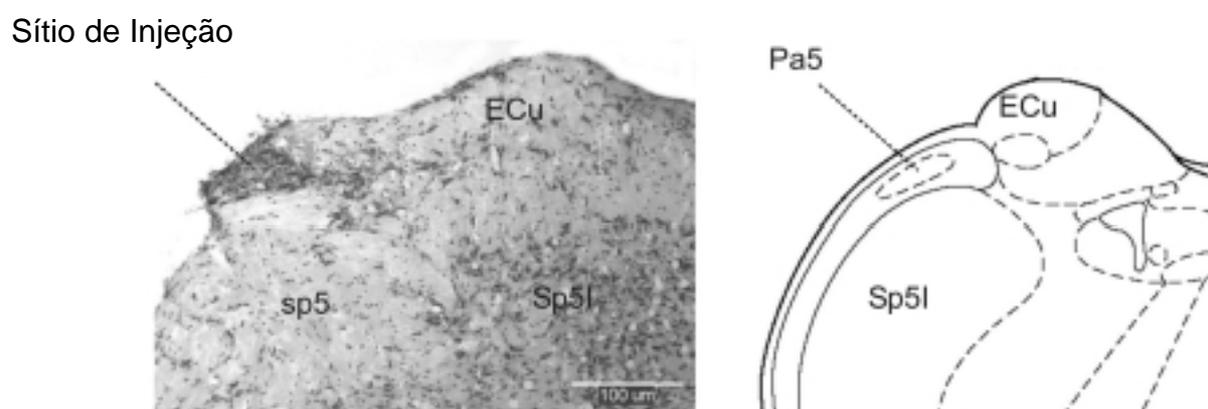


Figura 11 – Imagem de uma secção transversal do bulbo de um rato corada por cresil violeta demonstrando o sítio de injeção para o ácido ibotênico no núcleo paratrigeminal. O nível antero-posterior aproximado em referência ao zero estereotáxico é -4,24 mm. Abreviações: sp5, trato espinhal do trigêmeo; Sp5I, núcleo do trigêmeo *pars interpolaris*; ECu, núcleo cuneato externo. Barra de escala, 100 μm.

4.5. Mediadores envolvidos no reflexo somatosensorial.

4.5.1. Taquicininas

Conforme demonstra a Figura 12, a microinjeção no núcleo paratrigeminal ipsilateral ou contralateral ao nervo estimulado dos antagonistas seletivos de receptores NK1 (LY306740, RP 67580), NK2 (SR48968) ou NK3 (R-486) (100 pmol em 0,1µl) para taquicininas não foram capazes de alterar a resposta pressora induzida pela estimulação elétrica do nervo ciático.

4.5.2. Opióides

A microinjeção no núcleo paratrigeminal contralateral, mas não ipsilateral ao estímulo, do antagonista seletivo de receptores opióides do tipo kappa, norbinaltorfimina (1,8 µg em 0,1µl) ou do tipo mu opióide, CTOP (1µg em 0,1µl), reduziu a resposta pressora em 57 e 50% respectivamente, enquanto que o antagonista de receptores delta opióide, naltrindole (1µg em 0,1µl) potencializou a resposta pressora em 38% (Figura 13).

4.5.3. Cininas

A microinjeção contra- ou bilateral, mas não ipsilateral, de HOE-140 (20 pmol/0,1 µl; um antagonista seletivo de receptores B₂ para bradicinina) no núcleo paratrigeminal, foi capaz de inibir o reflexo somatosensorial em 48% e 44%, respectivamente (Figura 14). De modo semelhante, um outro antagonista de receptores B₂ da bradicinina, o LF 16-0687 (100 pmol em 0,1 µl; D), também reduziu a resposta pressora (41% de inibição) quando microinjetado no Pa5 contralateral, mas não no Pa5 ipsilateral (Resultados não demonstrados). A microinjeção contralateral ou bilateral, mas não ipsilateral, de Des-Arg¹⁰HOE140

(20 pmol em 0,2 μ l; um antagonista seletivo de receptores B₁ para bradicinina) no núcleo paratrigeminal, também foi capaz de inibir o reflexo somatosensorial em 40 e 60%, respectivamente (Figura 15). Por outro lado, a microinjeção no Pa5 contralateral ao estímulo de Des-Arg⁹Leu⁸-BK (100 pmol em 0,1 μ l; Figura 15D), um outro antagonista seletivo de receptores B₁ da bradicinina, não foi capaz de alterar a resposta pressora induzida pela estimulação do nervo ciático.

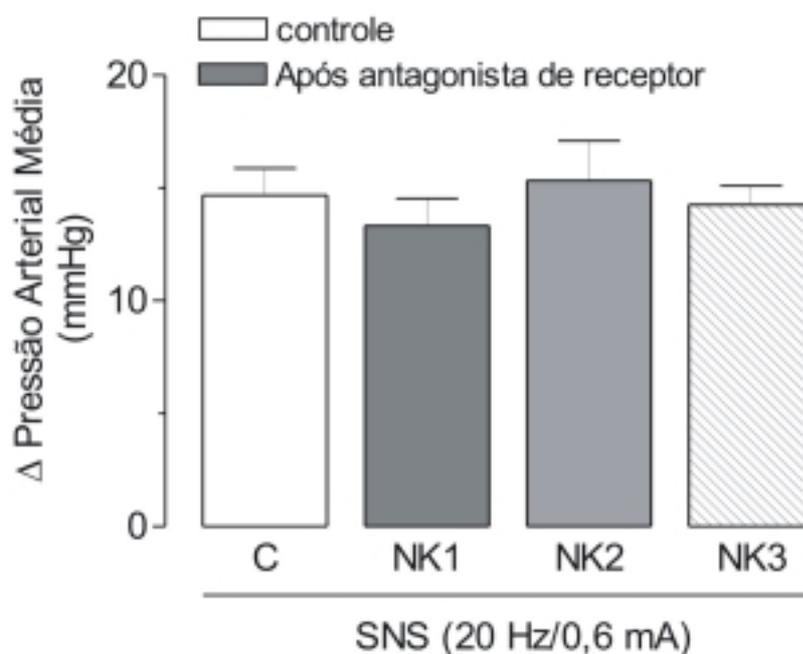


Figura 12 – Participação das taquicinininas no reflexo somatosensorial mediado pelo núcleo paratrigeminal contralateral ao nervo estimulado. Os estímulos consistiram de trens de pulsos quadrados de 0,1 ms de duração, 0,6 mA de intensidade e 20 Hz de frequência, por 10 segundos. As barras representam o estímulo controle (barra vazia), o estímulo 10 min após a microinjeção do antagonista seletivo de receptores NK1 (LY306740; barra cinza) ou NK2 (SR48968; barra cinza clara) ou NK3 (R-486; barra achurada) (100 pmol em 0,1 μ l) no núcleo paratrigeminal. Cada valor representa a média \pm EPM de 5 experimentos.

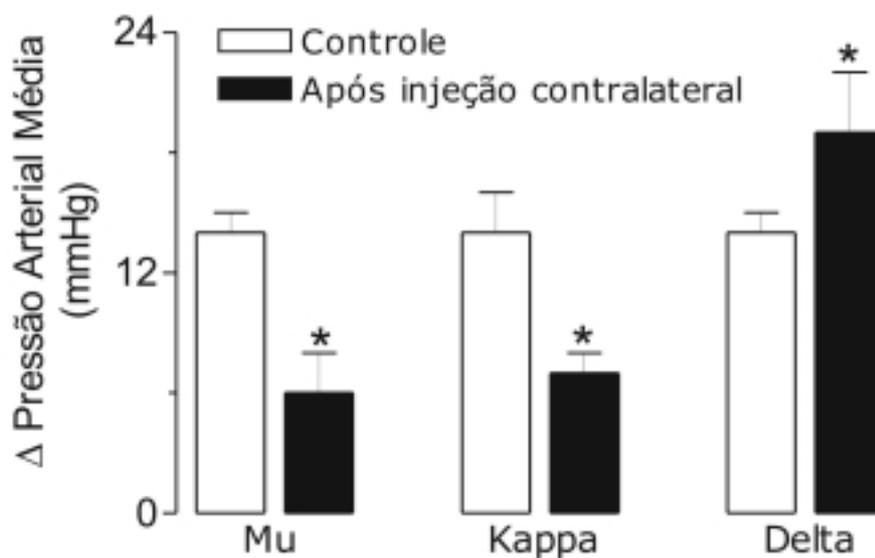


Figura 13 – Efeito da microinjeção de antagonistas opióides no núcleo paratrigeminal (Pa5) contralateral ao nervo estimulado sobre o reflexo somatosensorial. Os estímulos consistiram de trens de pulsos quadrados de 0,1 ms de duração, 0,6 mA de intensidade e 20 Hz de frequência, por 10 segundos. As barras representam o estímulo controle (barra aberta) e o estímulo 10 min após injeção do antagonista seletivo de receptores opióides do tipo Mu (CTOP; 1,0 $\mu\text{g}/0,1\mu\text{l}$) Kappa (nor-binaltorfimina; 1,8 $\mu\text{g}/0,1\mu\text{l}$) ou Delta (Naltrindole; 1,0 $\mu\text{g}/0,1\mu\text{l}$) (barras pretas). Cada valor representa a média \pm EPM de 6 experimentos. * $P < 0,05$ (ANOVA seguido de teste-t de Student).

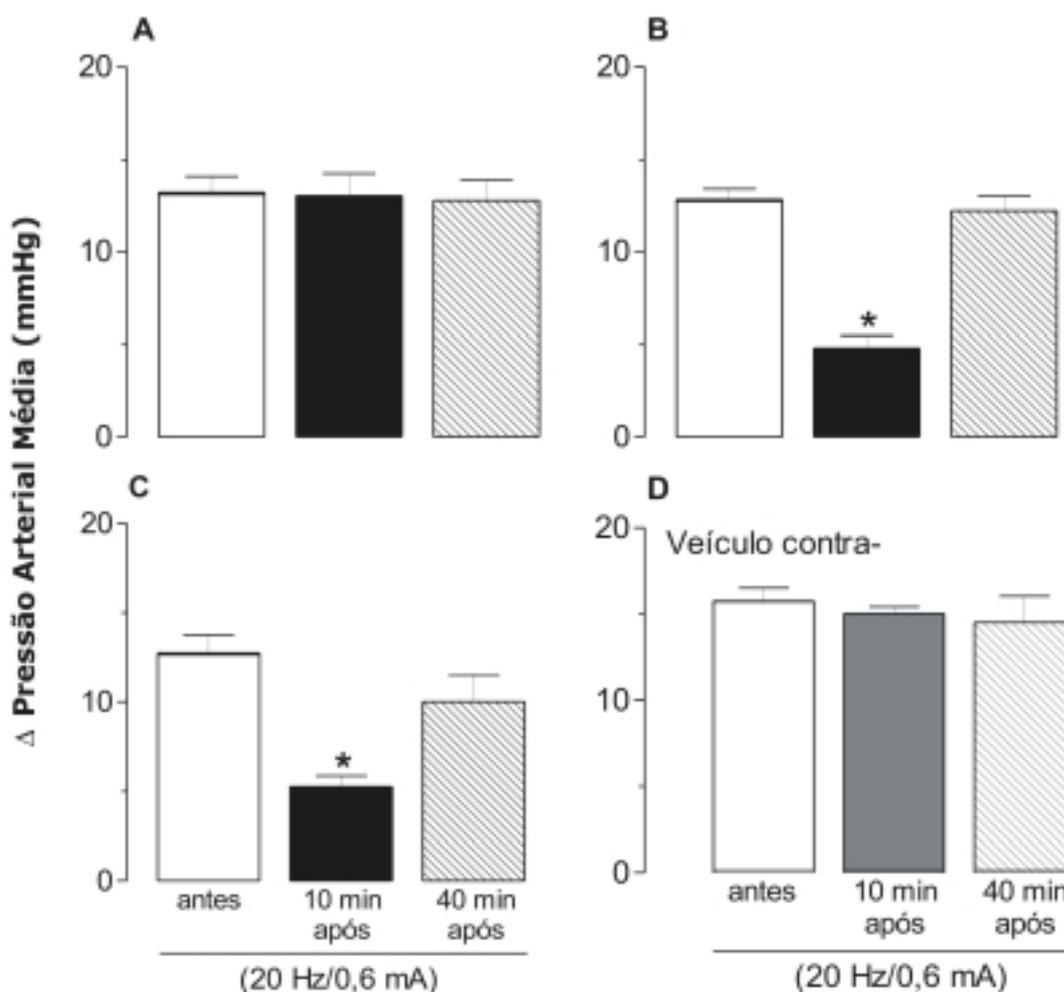


Figura 14 – Efeito da microinjeção de HOE140 (20 pmol em 0,2 μ l) no núcleo paratrigeminal (Pa5) ipsilateral (**A**) contralateral (**B**) bilateral (**C**) ou veículo contralateral (**D**) sobre o reflexo pressor induzido pela estimulação do nervo ciático. Os estímulos consistiram de trens de pulsos quadrados de 0,1 ms de duração, 0,6 mA de intensidade e 20 Hz de frequência, por 10 segundos. As barras representam o estímulo controle (barra aberta), o estímulo 10 min após injeção do antagonista (barra preta) ou veículo (barra cinza) e o estímulo 40 min após a injeção do antagonista (barra achurada). Cada valor representa a média \pm EPM de 6 experimentos. * $P < 0,05$ (ANOVA seguido de teste “t” de Student).

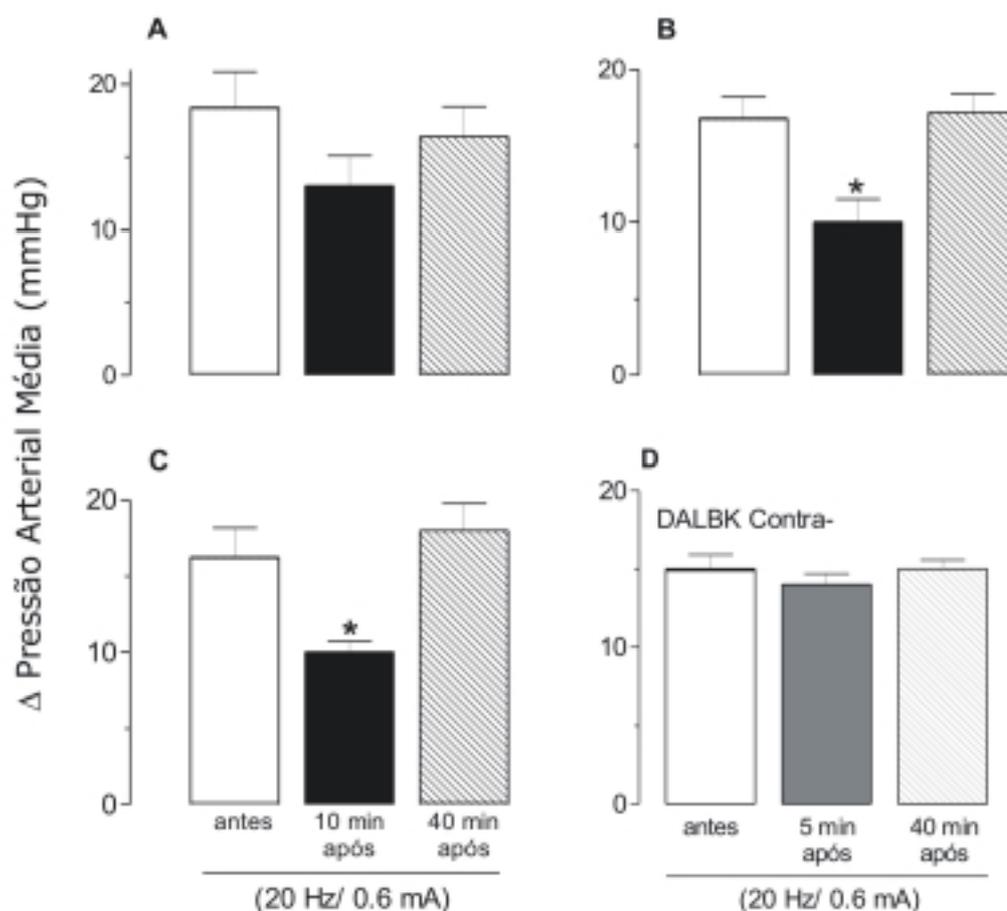


Figura 15 – Efeito da microinjeção de Des-Arg¹⁰Hoe140 (antagonista seletivo de receptores B₁ para bradicinina; 20pmol em 0,2 μl) no núcleo paratrigeminal (Pa5) ipsilateral (**A**) contralateral (**B**) bilateral (**C**) ou DALBK (antagonista seletivo de receptores B₁ para bradicinina; 100 pmol em 0,2μl no núcleo contralateral (**D**) sobre o reflexo pressor induzido pela estimulação do nervo ciático. Os estímulos consistiram de trens de pulsos quadrados de 0,1 ms de duração, 0,6 mA de intensidade e 20 Hz de frequência, por 10 segundos. As barras representam o estímulo controle (barra vazia), 10 ou 5 min após injeção do antagonista (barras pretas ou cinza, respectivamente) e 40 min após a injeção do antagonista (barra achurada). Cada valor representa a média ± EPM de 6 experimentos. * P < 0,05 (ANOVA seguido de teste “t” de Student).

4.5.3.1. Análise dos produtos gênicos codificadores para os receptores de bradicinina no núcleo paratrigeminal.

A Figura 16 representa os resultados da amplificação dos fragmentos obtidos, por eletroforese, em gel de agarose. Em animais, cujo nervo ciático não foi estimulado, foi detectado somente um fragmento de 700 pb correspondente ao segmento codificador do receptor B₂. Não há evidência da expressão do receptor B₁ nestes animais. Por outro lado, em animais os quais o nervo ciático foi estimulado, foram obtidos produtos de aproximadamente 700 e 918 pb correspondente aos fragmentos codificadores dos receptores B₂ e B₁, respectivamente (painel A).

O tratamento neonatal com capsaicina ou veículo não afetou a expressão dos produtos gênicos codificadores dos receptores B₂ e B₁ detectados após a estimulação elétrica do nervo ciático (painel B).

4.5.4 - Localização dos receptores para as cininas e para os opióides em neurônios do núcleo paratrigeminal.

Para investigar esse aspecto, optamos por verificar a influência do tratamento neonatal de ratos com capsaicina sobre as respostas de animais adultos à microinjeção de antagonistas cininérgicos e opioidérgicos no Pa5.

Conforme ilustra a Figura 17, o tratamento neonatal com capsaicina não afetou a magnitude do efeito inibitório induzido por microinjeção no Pa5 de HOE-140 (Figura 15B) ou LF 16-0687 (resultados não demonstrados), mas aboliu a modulação do reflexo somatosensorial exercida por quaisquer dos 3 antagonistas seletivos dos receptores opióides neste núcleo.

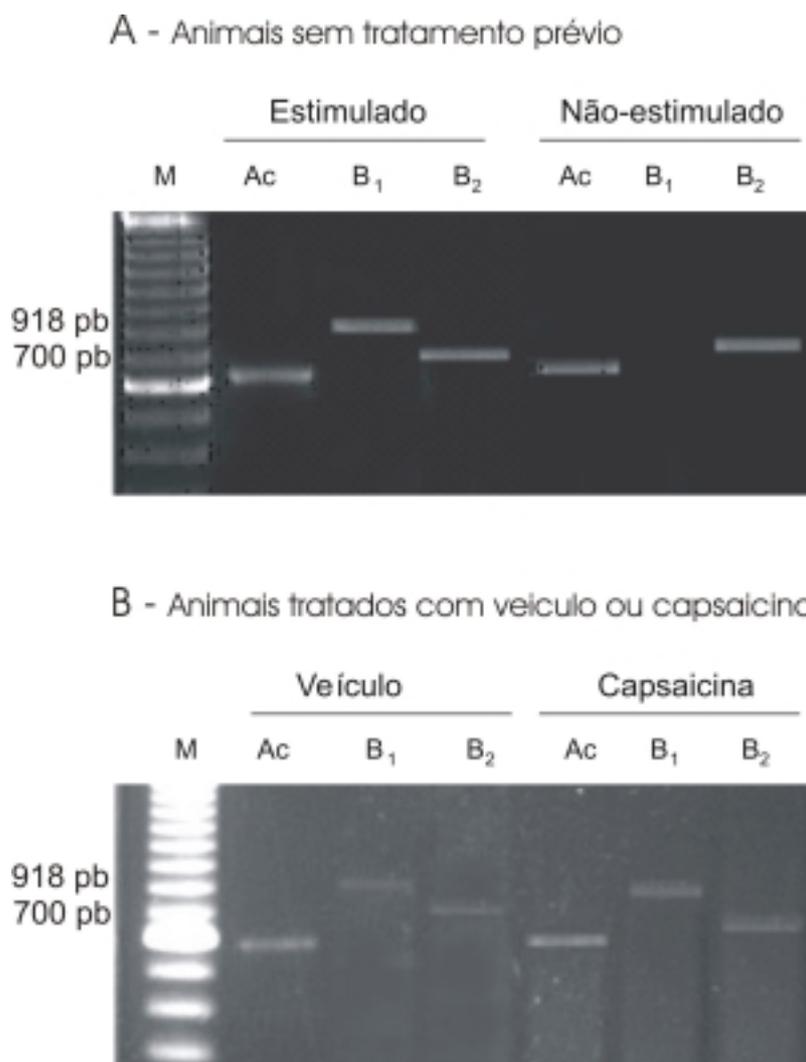


Figura 16 – Detecção em gel de agarose dos produtos gênicos codificadores de receptores B₁ e B₂ em amostras de núcleo paratrigeminal de ratos. No painel A estão representados amostras de animais controle cujo nervo ciático foi estimulado eletricamente ou não. No painel B estão representados os fragmentos obtidos após a estimulação elétrica do nervo ciático de animais tratados com capsaicina ou veículo. M, marcador de peso molecular, bp, pares de base. B₁-fragmento correspondente ao receptor B₁; B₂ - fragmento correspondente ao receptor B₂; Ac - fragmento correspondente a actina. Cada amostra representa o RNAm de 5 núcleos paratrigeminais de 5 animais. Resultados representativos de 3 avaliações independentes.

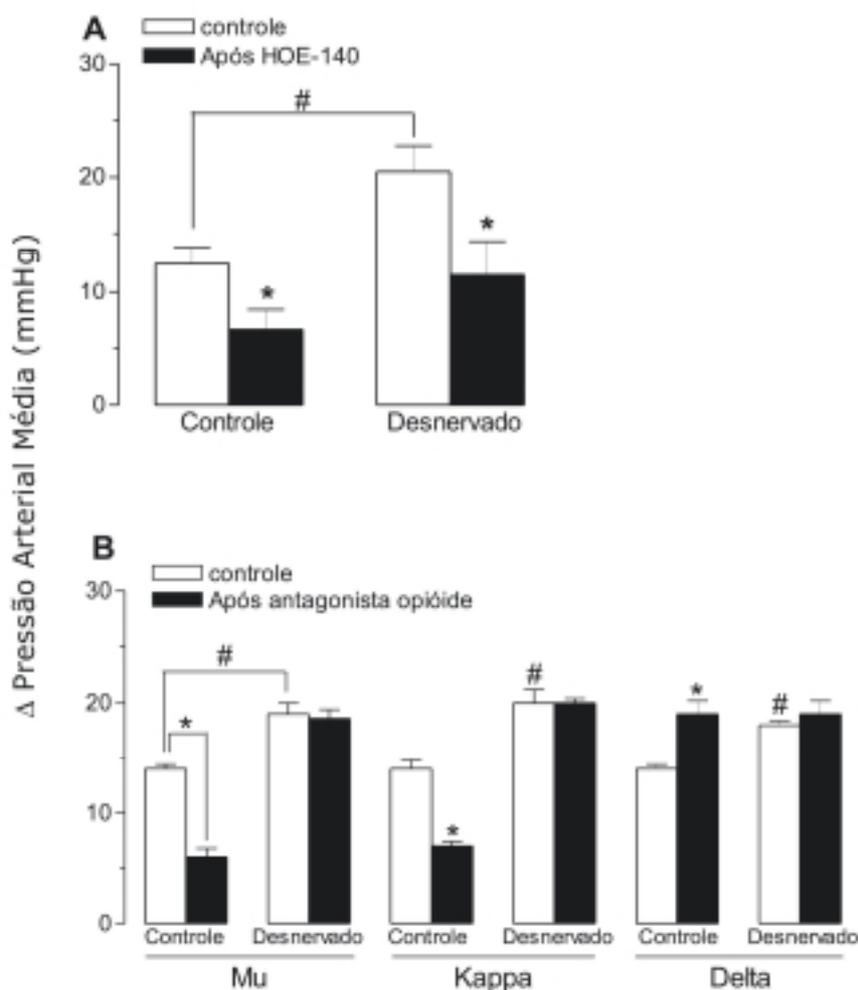


Figura 17 – Efeito da injeção do antagonista do receptor B_2 para bradicinina HOE-140 (A) e dos antagonistas dos receptores opióides dos tipos mu, kappa ou delta (B) no núcleo paratrigeminal (Pa5) contralateral ao nervo estimulado (20 Hz/ 0.6 mA) de ratos tratados com veículo (controle) ou capsaicina (desnervados). As barras representam o estímulo antes (barra branca) e após a microinjeção de um dos antagonistas (barra preta) no Pa5. Cada valor representa a média \pm EPM de 5 experimentos. Asteriscos e serquilhas denotam diferenças estatísticas entre as respostas pressoras obtidas antes e após a microinjeção de um dos antagonistas no Pa5 e as respostas obtidas em animais controle e animais tratados com capsaicina, respectivamente. $P < 0,05$ (ANOVA seguido de teste “t” de Student).

4.6. Participação do núcleo paratrigeminal no reflexo somatosensorial em animal consciente

A injeção de formalina na dose de 2,5% (em 50 μ l) em ratos falso-operados induziu respostas nociceptivas características deste agente álgico, compostas das 2 fases descritas no ítem 3.5.1. Estas respostas mostraram-se acompanhadas de aumentos também bifásicos tanto da PA quanto da FC. Embora doses mais baixas de formalina (0,625 e 1,25%) também evocassem comportamento nociceptivo bifásico, as alterações de PA e de FC limitaram-se apenas ao período em que se manifestava a primeira fase da resposta nociceptiva (Figura 18).

Ao avaliarmos a participação do núcleo paratrigeminal sobre o reflexo somatosensorial (Figura 19), observamos que a lesão do núcleo contralateral à pata estimulada atenuou tanto o aumento pressor (40% de inibição; A) quanto as alterações na FC (38% de inibição em relação ao grupo falso-operado; B) evocadas pela formalina. No entanto, a atenuação da resposta pressora foi significativa somente na primeira fase do teste. Além disso, ambas as fases da resposta nocifensiva à formalina 2,5% foram reduzidas pela lesão do Pa5 contralateral (C).

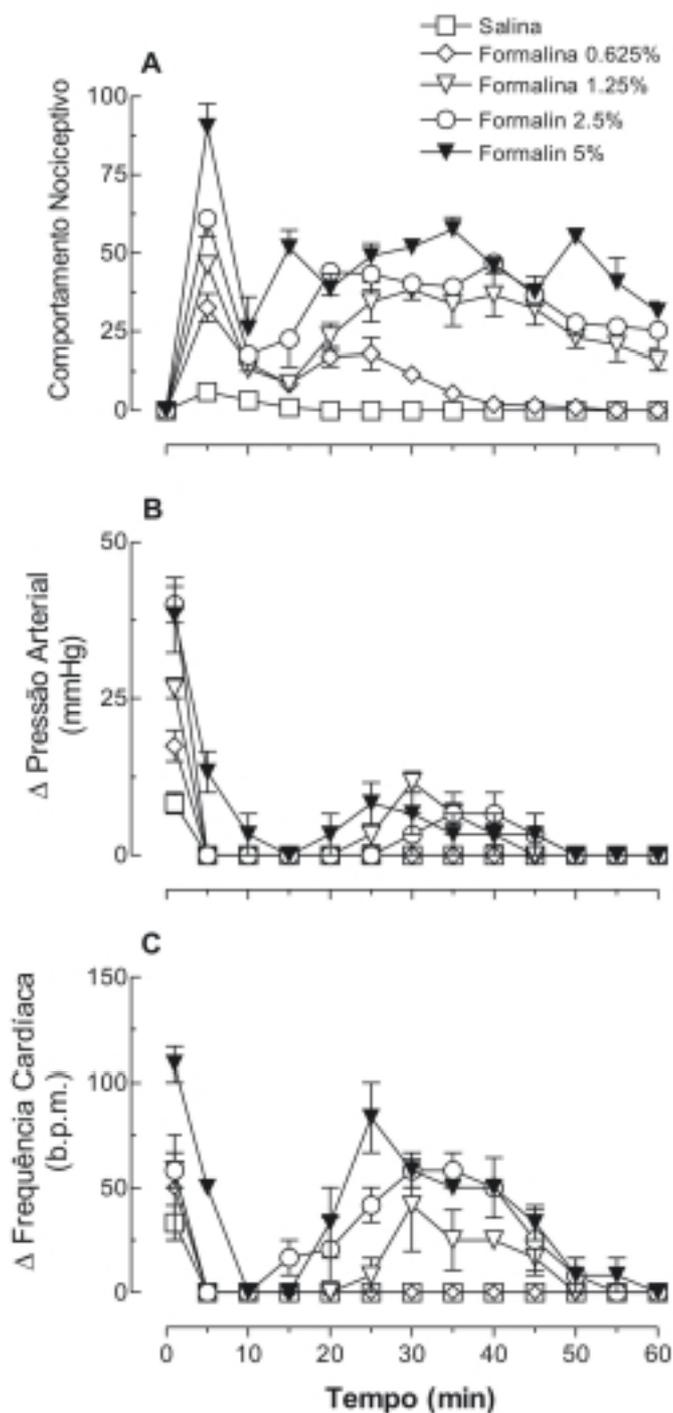


Figura 18 – Decurso temporal das alterações no comportamento nociceptivo (A) na pressão arterial (PA; B) e na frequência cardíaca (FC; C) induzidas pela injeção i.pl. de diferentes doses de formalina (0,625 – 5 %; 50 μ l) em ratos. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 5 animais.

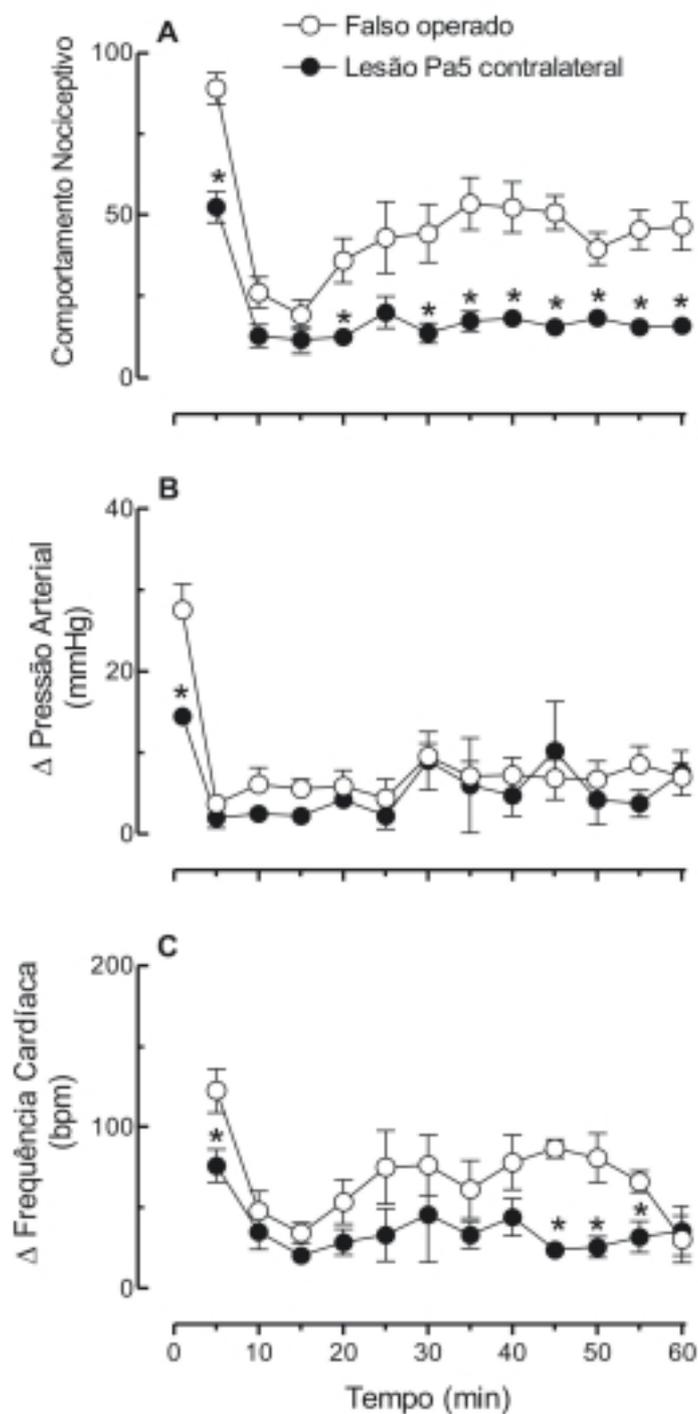


Figura 19 – Decurso temporal das alterações no comportamento nociceptivo (A), na pressão arterial (B) e na frequência cardíaca (C) induzidas pela injeção i.pl. de formalina (50 μ l, 2,5 %) em animal falso operado (círculo aberto) e com lesão do Pa5 contralateral à pata injetada (círculo fechado). Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. * $P < 0,05$ (ANOVA seguido de teste “t” de Student).

4.7. Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a nocicepção térmica, mecânica e química.

4.7.1. Estimulação Química

A Figura 20 ilustra a influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a resposta nociceptiva química induzida por injeção intraplantar de formalina 2,5 % na pata direita (contralateral) ou esquerda (ipsilateral) do rato. Neste sentido, ambos os componentes (Fase 1 e Fase 2) da resposta nociceptiva à formalina foram reduzidos em 45 e 49 % na pata contralateral à lesão do núcleo paratrigeminal, respectivamente. De maneira semelhante, a resposta nociceptiva evocada pela injeção intraplantar de capsaicina foi reduzida em aproximadamente 35% após a lesão do núcleo paratrigeminal contralateral à pata injetada (resultados não mostrados). Por outro lado, em ambos os testes (formalina ou capsaicina), as respostas eliciadas na pata ipsilateral a lesão, assim como em ambas as patas dos animais falso operados não foram alteradas em relação aos grupos controles. Em contraste, diferentemente do observado na pata, a lesão do núcleo paratrigeminal acarretou em uma potencialização da segunda fase (12-30 min) de 77 ± 12 para 273 ± 35 s e de 142 ± 17 para 303 ± 35 s quando a formalina foi injetada tanto no lábio ipsi- quanto no lábio contralateral, respectivamente (Figura 21). Em um grupo paralelo, avaliamos a sensibilidade nociceptiva à estimulação química (formalina) da pata em animais submetidos à lesão da porção rostral medial do núcleo trigeminal espinhal *pars interpolaris* (Sp5l). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos falso operado e lesado (Resultados não mostrados)

4.7.2. Estimulação Mecânica

A Figura 22 ilustra a influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a sensibilidade da pata ou da face do rato à aplicações sucessivas de um estímulo mecânico de baixa intensidade. No painel A, a lesão do núcleo paratrigeminal acarretou em uma redução de aproximadamente 30 % no limiar nociceptivo mecânico da pata direita (contralateral à lesão). Este efeito se manteve até o quinto dia, porém em menor grau (resultados não apresentados). Por outro lado, nenhuma alteração no limiar nociceptivo mecânico foi observado na pata esquerda (ipsilateral à lesão) ou em ambas as patas dos animais falso operados. Resultados semelhantes foram obtidos após a aplicação de um estímulo mecânico de alta intensidade (Randall-Selitto; Resultados não apresentados). No painel B, a lesão do núcleo paratrigeminal acarretou em uma redução de aproximadamente 85% no limiar nociceptivo mecânico da região facial esquerda (ipsilateral à lesão do núcleo paratrigeminal) ou direita (contralateral à lesão do núcleo paratrigeminal). Em animais falso operados, não foi observada qualquer alteração no limiar nociceptivo mecânico da face.

4.7.3. Estimulação Térmica

O painel A da Figura 23 demonstra a responsividade da pata esquerda (ipsilateral a lesão) e da pata direita (contralateral a lesão) a aplicações sucessivas de um estímulo térmico antes e após a lesão esquerda do núcleo paratrigeminal. Como podemos observar, a latência de resposta (retirada da pata) em ambas as patas não diferiu entre os grupos controle, falso operado ou lesado ($10,3 \pm 0,5$; $10,9 \pm 0,6$ ou $10,3 \pm 0,3$ s respectivamente) antes ou 3 e 5 dias após a lesão. Em um grupo controle paralelo, a administração i.p. de morfina (5mg/kg;

1 ml) causou um aumento de 36% no limiar nociceptivo térmico. No painel B podemos observar que a responsividade nociceptiva da face à estimulação térmica (calor) também não foi afetada após a lesão do núcleo paratrigeminal.

4.7.4. Análise histológica

A Figura 24 ilustra um corte transversal do bulbo de um rato sacrificado 10 dias após a microinjeção de ácido ibotênico no núcleo paratrigeminal esquerdo. No painel superior direito pode-se observar corpos neuronais intactos embebidos em intensa neurópila. Em contraste, no painel superior esquerdo observa-se intensa gliose e ausência de corpos celulares restritos ao núcleo paratrigeminal, deixando o núcleo trigeminal espinhal *pars interpolaris* (Sp5l) e o núcleo cuneato externo (ECu) intactos.

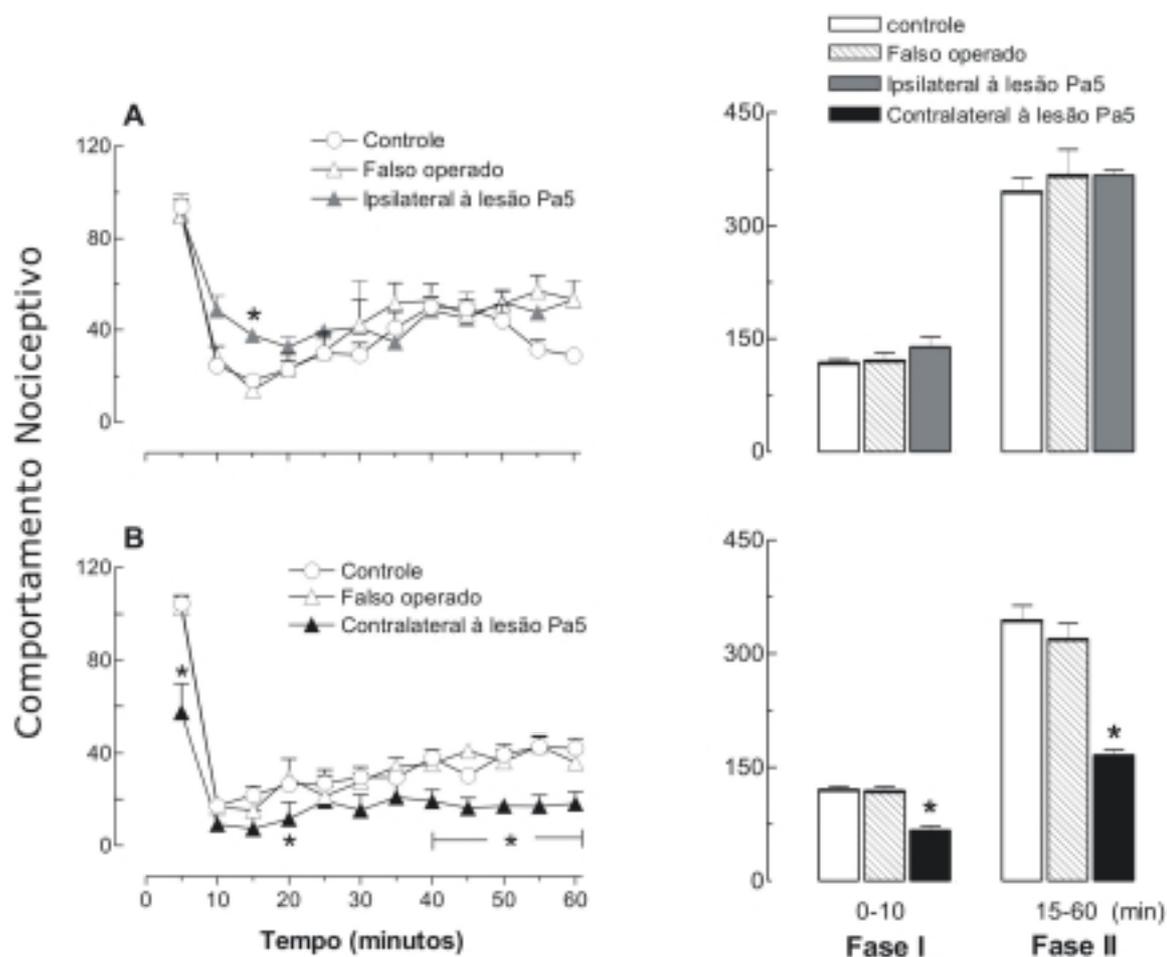


Figura 20 – Influência da lesão do núcleo paratrigeminal (Pa5) sobre a resposta nociceptiva induzida por injeção intraplantar de formalina 2,5%, em ratos conscientes. O painel A representa o decurso temporal da resposta e indica o número de *flinches* somados a intervalos de 5 min por um período de 60 min. Os círculos abertos, fechados e triângulos representam respectivamente os grupos controle, falso operado e lesado. O painel B representa a média dos resultados obtidos no período de 0-10; 15-20 e 25-60 minutos para os grupos controle (barra aberta), falso operado (barra achurada) e lesado (barra fechada). Cada valor representa a média \pm EPM de 6 experimentos. * $P < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls).

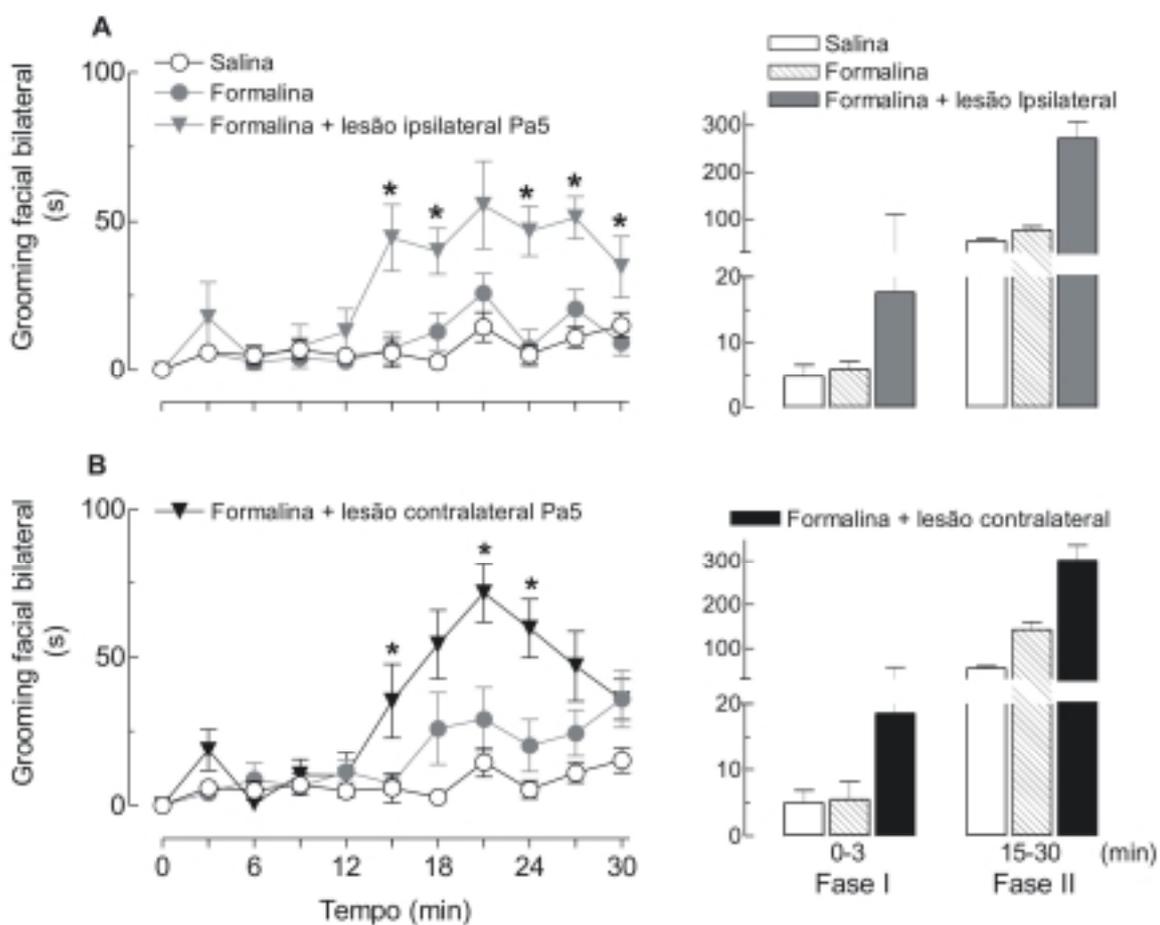


Figura 21. Influência da lesão do núcleo paratrigeminal (Pa5) sobre a resposta nociceptiva induzida por injeção subcutânea de formalina (1%, 50 μ l) no lábio superior de ratos conscientes. O painel A representa o decurso temporal da resposta e indica o tempo de *grooming* facial somados a intervalos de 3 min por um período de 30 min. Os círculos abertos, fechados e triângulos representam respectivamente os grupos controle, falso operado e lesado. O painel B representa a média dos resultados obtidos no período de 0-3 e 15-30 minutos para os grupos controle (barra aberta), falso operado (barra achurada) e lesado (barra fechada). Cada valor representa a média \pm EPM de 6 experimentos. * $P < 0,05$ (ANOVA de duas vias seguido do teste de Newman-Keuls).

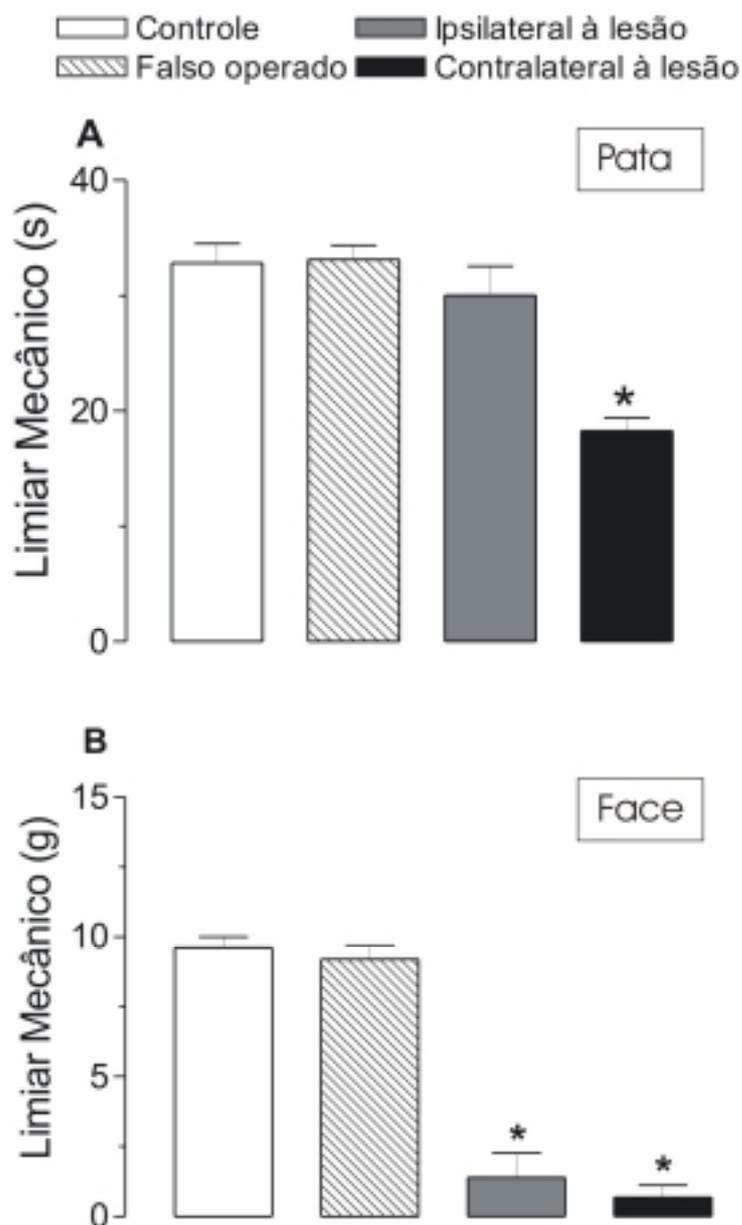


Figura 22 - Influência da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a resposta nociceptiva evocada pela estimulação mecânica da pata (A, von frey eletrônico) ou da face (B, Filamentos de von Frey) esquerda (ipsilateral) e direita (contralateral) do rato. As barras representam o limiar de retirada da pata ou da face em animais controle (barra vazia), falso operados (achurada) e com lesão do núcleo paratrigeminal (barra cinza e preta). Cada valor representa a média \pm EPM de 8 experimentos. * $P < 0,05$ (ANOVA seguido de teste de Newman-Keuls).

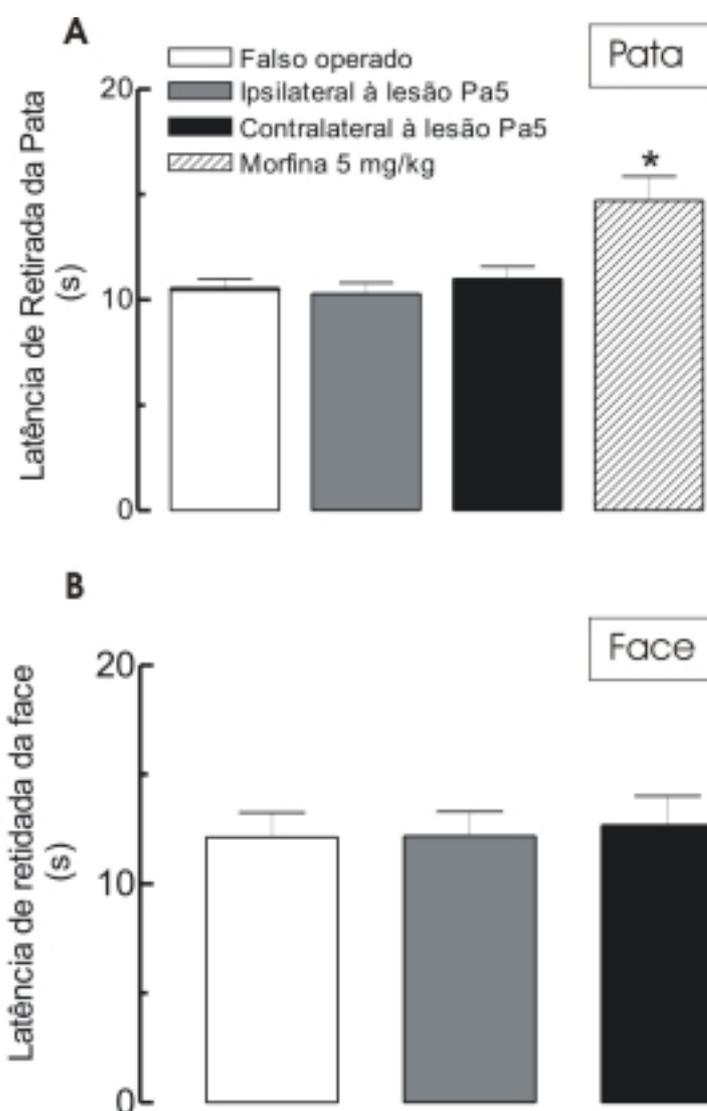


Figura 23 – Efeito da lesão do núcleo paratrigeminal sobre a resposta nociceptiva evocada pela estimulação térmica da pata (A; modelo de Hargreaves) ou da região facial (B; pirógrafo) esquerda (ipsilateral) ou direita (contralateral) do rato. As barras representam a latência de resposta dos animais falso operado na ausência (barra branca) ou presença de morfina (barra achurada). As barras cinza e preta representam a latência de resposta dos animais com lesão do núcleo paratrigeminal. Cada valor representa a média \pm EPM de 8 experimentos. * $P < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls).

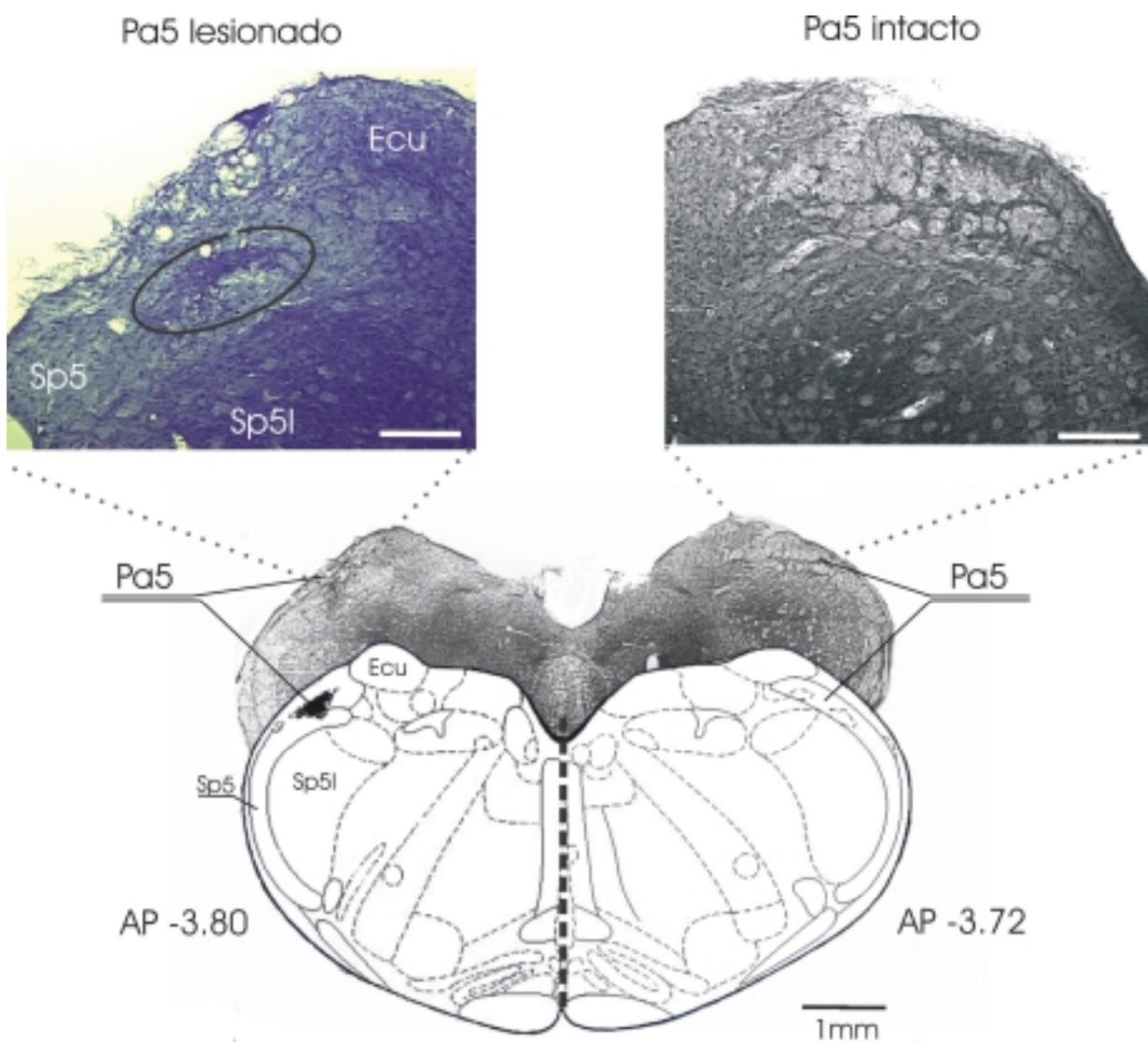


Figura 24 – Ilustração esquemática de uma secção transversal do bulbo de um rato (J03L03C19) sacrificado 10 dias após a microinjeção de ácido ibotênico no núcleo paratrigeminal esquerdo. Os painéis superiores ilustram a extensão da lesão, a qual se restringiu ao núcleo paratrigeminal deixando o núcleo trigeminal espinal *pars interpolaris* (Sp5l) e o núcleo cuneato externo (ECu) intactos. No painel inferior, uma imagem em menor aumento sobreposta com uma secção de bulbo adaptada de Paxinos e Watson (1986). AP -3.8 e -3.72 representam o nível antero-posterior aproximado em referência ao zero estereotáxico. Abreviações: Sp5l, núcleo trigeminal espinal *pars interpolaris*; Sp5, trato trigeminal espinal; Ecu, núcleo cuneato. Barra de escala: 250 μ m

5. DISCUSSÃO

5.1. O reflexo somatosensorial em ratos

Os resultados do presente estudo demonstram que a estimulação elétrica do nervo ciático causa uma elevação consistente na pressão arterial e uma modesta aceleração na frequência cardíaca. A resposta reflexa máxima foi obtida aplicando-se um estímulo de alta intensidade capaz de ativar todos os tipos de fibras contidas no nervo, incluindo fibras C. Este perfil de resposta corrobora estudos prévios em ratos (Stornetta et al., 1989; Possas et al., 2001), gatos e cães (Johansson, 1962; Kozelka et al., 1981; Sato e Schmidt, 1981). Outros estudos demonstram um padrão diferencial de respostas cardiorespiratórias à estimulação nociceptiva (Blessing, 1997; Nagasaka e Yaksh, 1990; Ness e Gebhart, 1990). Segundo tais achados, este padrão é dependente do tipo e/ou do nível de anestesia, sendo que em um nível de anestesia mais profundo, a estimulação nociceptiva causa uma diminuição da pressão arterial, enquanto que o contrário acontece quando a profundidade da anestesia é diminuída.

Por outro lado, o tipo de fibra aferente nociceptiva que está sendo estimulada também interfere no perfil de resposta cardiovascular. A estimulação elétrica de fibras aferentes musculares ou cutâneas dos grupos III ou IV (fibras A δ e C) resulta em hipertensão, taquicardia e aumento do fluxo sanguíneo e da condutância vascular (Cravo et al., 1995; Iwamoto et al., 1985; Morrison e Reis, 1989). Em adição, a estimulação elétrica em frequências baixas e com pulsos de intensidade suficiente para estimular fibras aferentes dos grupos II e III, produz queda na pressão arterial, enquanto que aumentando a frequência e a

intensidade do estímulo, para incluir as fibras do grupo IV (fibras C), resulta em respostas pressoras (Katz e Perryman, 1965).

Em nossos experimentos, uma vez padronizada a profundidade da anestesia, diferentes intensidades e frequências de estímulos aplicados ao nervo ciático de ratos resultou sempre em aumento da pressão arterial, a qual retornava aos níveis basais imediatamente após a interrupção do estímulo. Neste contexto, avaliamos a contribuição das fibras aferentes primárias nociceptivas contidas no nervo ciático para o reflexo somatosensorial. Sendo um nervo misto, o nervo ciático é composto por uma variedade de fibras motoras e sensoriais com diâmetros e velocidades de condução característicos (Zagon, 2001). Desta forma, a degeneração seletiva irreversível de grande parte das fibras C e de uma pequena população de fibras A δ com capsaicina potencializou o efeito pressor induzido pela estimulação elétrica de alta intensidade (0,6 mA). Já a resposta pressora a estímulos elétricos de baixa intensidade (0,1 mA) foi completamente abolida após este tratamento, sugerindo que as fibras C e A δ parecem exercer influências inibitórias ou excitatórias dependentes da intensidade do estímulo. Estes resultados sugerem a possibilidade de ocorrência de uma sensibilização de neurônios do corno dorsal e/ou o recrutamento do controle descendente inibitório da dor (LeDoux e Wilson, 2001). A sensibilização estaria deslocando a curva estímulo resposta para esquerda, enquanto que o recrutamento do controle inibitório descendente de dor deslocaria a curva para direita. Devido a estes arranjos, um estímulo no topo da curva ou próximo a ele acarretaria uma resposta aumentada, enquanto que um estímulo na base da curva ou próximo a ela, irá produzir inibição. Então, um estímulo de alta intensidade capaz de causar sensibilização dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal, resultará em

potencialização do reflexo somatosensorial, enquanto que um estímulo de baixa intensidade, incapaz de causar sensibilização, acarreta abolição do reflexo somatosensorial, provavelmente através do recrutamento do controle inibitório descendente de dor, o qual estaria inibindo também o aumento da pressão arterial.

Concomitante à hipótese acima, um outro aspecto importante refere-se ao fato destes aferentes primários sensíveis à capsaicina não estarem envolvidos somente na percepção dolorosa, mas também na regulação cardiovascular devido à liberação de potentes vasodilatadores periféricos, tais como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Além disso, estes neuropeptídeos possuem ações natriuréticas e diuréticas (Vaishnava e Wang, 2003). Então, a ausência destes mediadores pode estar contribuindo para a potencialização do reflexo somatosensorial observado após o tratamento de ratos neonatos com capsaicina, através de um desequilíbrio nos ajustes rápidos da pressão arterial, embora a pressão arterial basal destes animais, não diferiu da de animais normais tratados com veículo. Ao que parece, faz-se necessário estudos adicionais acerca da influência destas fibras no componente cardiovascular do reflexo somatosensorial.

5.2. Substrato neuroanatômico do reflexo somatosensorial

O presente estudo também fornece informações sobre as vias espinobulbares envolvidas no reflexo somatosensorial em ratos. Neste sentido, sabe-se que as fibras aferentes do nervo ciático, algumas das quais podem mediar o reflexo somatosensorial evocado eletricamente, terminam nas lâminas I a V do corno dorsal (Molander e Grant, 1986; Stornetta et al., 1989) e em

neurônios motores do corno ventral (Stornetta et al., 1989) da medula espinhal ao nível dos segmentos lombosacrais (L3-S2). A eliminação do reflexo somatosensorial após secção parcial (contralateral, mas não ipsilateral ao nervo estimulado) da medula espinhal a nível da oitava vértebra torácica indica que tais lesões interrompem a via ascendente sem afetar as eferências supraespinhais para neurônios preganglionares simpáticos. O mesmo resultado foi relatado após hemiseção da medula espinhal cervical contralateral (mas não ipsilateral) ao nervo estimulado, sugerindo que a via ascendente necessária para evocar o reflexo somatosensorial cursa através do lado oposto da medula espinhal (Stornetta et al., 1989; Caous et al., submetido). Além disso, a secção transversal da coluna dorsal da medula espinhal cervical envolvendo o aspecto mais dorsal do funículo lateral não afeta o reflexo somatosensorial, indicando que a via aferente ascende primariamente através do funículo lateral ou anterior (Stornetta et al., 1989). Estes achados sugerem que as aferências somatosensoriais reflexas relembram a via espinotalâmica clássica (Granum, 1986) e podem derivar de células em áreas do corno dorsal espinhal envolvidas na neurotransmissão da dor (Kerr, 1975).

A participação das fibras C no reflexo somatosensorial, bem como na nocicepção, suportam um papel importante para o trato espinotalâmico na via ascendente do reflexo somatosensorial. No entanto, esta via parece envolver somente estruturas espinobulbares, pois a transecção do tronco cerebral ao nível da ponte medial não afeta o reflexo somatosensorial (Stornetta et al., 1989). Resultados de lesões de estruturas importantes na regulação cardiovascular, tais como o NTS, LRt (núcleo reticular lateral), rafe bulbar, núcleo olivar inferior (ION), loco cerúleo (LC), área A5, feixe adrenérgico tegmental principal (PT), complexo

parabraquial, ponte caudal e oral, também não afetaram a resposta pressora à estimulação do nervo ciático. Por outro lado, o reflexo somatosensorial foi completamente abolido após a lesão do RVL. Estes autores sugerem a existência de uma via bisináptica para o reflexo somatosensorial, ou seja, uma sinapse na medula e outra no RVL. No entanto, parece ser muito simplista a hipótese deste circuito. Desta forma, nossos resultados de lesão apontam o núcleo paratrigeminal como um importante elo na integração do reflexo somatosensorial proveniente do campo de inervação do ciático. Em adição, nossos resultados também demonstram que o núcleo paratrigeminal aparentemente não é a única via de entrada de impulsos aferentes somatosensórios, uma vez que a lesão bilateral do núcleo não abole o reflexo somatosensorial. Sugerem ainda que o núcleo ipsilateral ao nervo estimulado talvez receba aferências que exercem influência inibitória sobre o reflexo somatosensorial, enquanto as que chegam ao núcleo paratrigeminal contralateral parecem exercer influência predominantemente excitatória. Isso talvez justifique porque a lesão bilateral do núcleo tem um efeito menor em atenuar a resposta pressora à estimulação do nervo ciático do que a lesão contralateral somente. Os resultados obtidos com o bloqueador de transmissão sináptica CoCl_2 reforçam estes achados. A presença de aferências inibitórias ao Pa5 ipsilateral parece confirmar a existência de uma conexão recíproca entre o núcleo paratrigeminal esquerdo e o direito, sugerida por Saxon e Hopkins, 1998, ainda que em Caous e col. (2001) tal conectividade não tenha sido observada.

Então, conforme representado abaixo na Figura 26, vias neuronais excitatórias e inibitórias, provavelmente polisinápticas, provenientes do campo de inervação do nervo ciático alcançam o núcleo paratrigeminal através da medula

espinhal. O componente inibitório, sensível ao bloqueio por capsaicina, envolve principalmente o núcleo paratrigeminal ipsilateral, enquanto o componente excitatório, insensível à capsaicina envolve o núcleo contralateral. No núcleo paratrigeminal a informação é integrada e enviada diretamente ou indiretamente via NTS para o RVL, o qual recruta neurônios eferentes simpáticos preganglionares presentes na coluna de células intermédialateral. Como resultado deste circuito ocorre aumento da PA e da FC. A hipótese deste circuito baseia-se em achados recentes que demonstram uma conexão funcional entre os núcleos paratrigeminal e RVL (Caous et al., 2004). Considerando o RVL, a via eferente do arco reflexo somatosensorial (Storretta et al., 1989), estariam assim providas, parte dos substratos neuroanatômicos dos reflexos homeostáticos e de defesa em questão, no qual o Pa5 teria influência excitatória sobre o RVL.

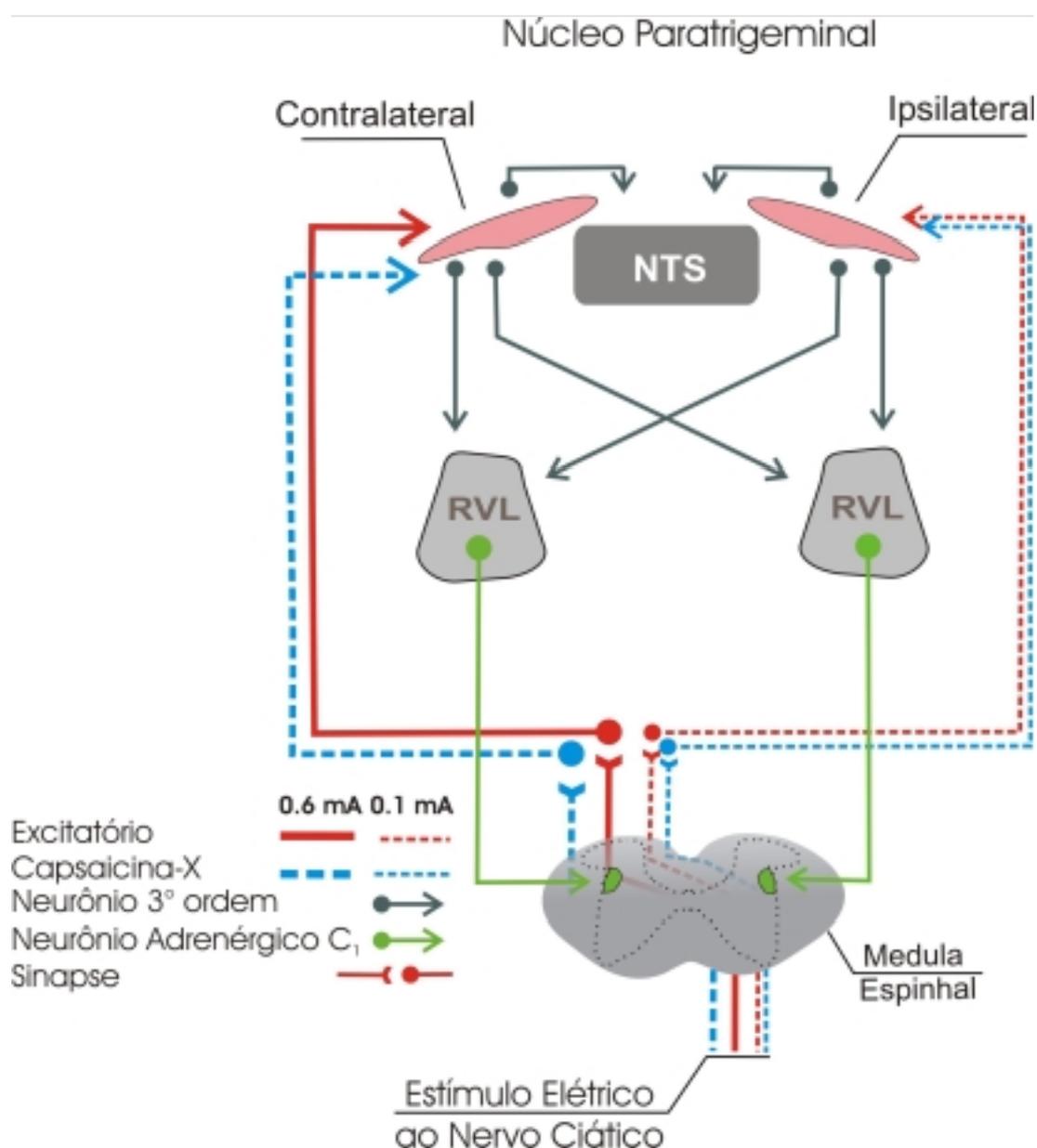


Figura 25. Representação das possíveis vias neuronais que medeiam o reflexo somatosensorial em ratos. Linhas vermelhas cheias ou pontilhadas representam neurônios excitatórios ativados em resposta a estímulos de alta (0,6 mA) ou de baixa (0,1 mA) intensidade, respectivamente. As setas representam neurônios de 3º ordem (Cinza) e neurônios pré-motores adrenérgicos C₁ (Verde). Abreviações: Capsaicin-X, fibras aferentes sensíveis à capsaicina; NTS, núcleo do trato solitário; RVL, núcleo reticular rostroventrolateral

5.3. Mediadores envolvidos no reflexo somatosensorial

Parte do presente estudo procurou caracterizar alguns dos possíveis mediadores envolvidos no reflexo somatosensorial. Neste sentido, o componente cardiovascular do reflexo somatosensorial mediado pelo núcleo paratrigeminal não depende da ativação de receptores NK1, NK2 ou NK3 para as taquicininas, mas parece depender da ativação de receptores opióides e de receptores B₂ para bradicinina localizados no próprio núcleo.

A ausência de efeito dos antagonistas taquicininérgicos no reflexo somatosensorial pareceu-nos surpreendente, em vista de que esta área apresenta níveis significativos de RNAm codificador para receptores NK1 (Pereira, 2003). Além disso, a microinjeção de substância P no núcleo paratrigeminal de animais conscientes produz um efeito bifásico dependente da dose, ou seja, um efeito depressor seguido de efeito pressor (Koepp et al., em preparação). Uma provável explicação para a inexistência de efeito seria a presença de substância P em neurônios paratrigeminais não-nociceptivos ou ainda a presença de agentes anestésicos. Em relação ao último aspecto, alguns agentes voláteis agem em neurônios taquicininérgicos modulando seu conteúdo (Kotani et al., 1986). Neste sentido, SP injetada no NTS de ratos conscientes induz aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (Abdala et al., 2003) enquanto que em animais anestesiados, os resultados são contraditórios. Alguns estudos relatam hipotensão e bradicardia (Feldman, 1995; Kubo and Kihara, 1987), enquanto outros estudos têm demonstrado um aumento na pressão arterial e taquicardia (Granata and Woodruff, 1980) ou nenhum efeito (Talman and Reis, 1981).

Em contraste, os opióides endógenos parecem ter um papel modulatório seletivo, enquanto antagonistas de receptores mu e kappa atenuam a resposta pressora, o antagonista seletivo de receptores delta a potencializa. Níveis elevados de preprodinorfina, um precursor do ligante endógeno do receptor kappa opióide, dinorfina, estão presentes no núcleo paratrigeminal e estes níveis são aumentados após estimulação nociva (Li et al., 1999). Aparentemente, os opióides exercem um efeito analgésico quando administrado em áreas do complexo trigeminal (Duale et al., 1996). No entanto, faz-se necessário estudos adicionais acerca da influência destes peptídeos no componente cardiovascular do reflexo somatosensorial.

A microinjeção de dois antagonistas seletivos de receptores B₂ da bradicinina, reduziu igualmente a resposta pressora quando microinjetado no Pa5 contralateral, mas não ipsilateral, ao nervo estimulado. De modo semelhante, a microinjeção contralateral ou bilateral, mas não ipsilateral, de um antagonista seletivo de receptores B₁ para bradicinina (Des-Arg¹⁰HOE140) no núcleo paratrigeminal, também foi capaz de inibir em 40% a 60% o reflexo somatosensorial, respectivamente. Por outro lado, a microinjeção no Pa5 contralateral ao estímulo de Des-Arg⁹Leu⁸-BK, um outro antagonista seletivo de receptores B₁ da bradicinina, não foi capaz de alterar a resposta pressora induzida pela estimulação do nervo ciático.

De maneira similar aos antagonistas de receptores opióides, os antagonistas cininérgicos foram efetivos somente quando aplicados no Pa5 contralateral ao nervo estimulado. O fato do bloqueio do receptor B₂ da bradicinina no Pa5 reduzir a resposta pressora à estimulação do nervo ciático na mesma magnitude observada após a lesão bilateral deste núcleo, sugere que as

cininas sejam muito relevantes na mediação do reflexo somatosensorial. O efeito pressor pronunciado da microinjeção de bradicinina no Pa5 (Lindsey et al., 1997), em conjunto com o aumento concomitante da frequência de disparos de neurônios barossensíveis presentes no RVL que ocorre nesta situação (Caous et al., 2004), reforçam estes achados. Conforme mencionado anteriormente, o RVL é um componente importante do arco somatosensorial reflexo (Stornetta et al., 1989).

Por outro lado, o receptor B₁, tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central, não é comumente expresso sob condições fisiológicas normais, mas sua expressão manifesta-se rapidamente após lesão tecidual (Regoli et al., 2001; Calixto et al., 2004) ou durante alguns estados patológicos crônicos, tais como, inflamação, hipertermia, epilepsia e diabetes (para revisão ver Couture e Lindsey., 2000). Neste sentido, os resultados obtidos com o antagonista seletivo de receptores B₁ Des-Arg¹⁰Hoe140, em princípio, foram inesperados e parecem sugerir uma ação não seletiva deste antagonista, ou ainda, a ocorrência de lesão tecidual (Marceau et al., 1983), a qual é capaz de induzir a expressão de receptores B₁ e/ou liberação de agonistas endógenos deste receptor (Schanstra et al., 1998). Nossos resultados de expressão gênica demonstram a presença de RNAm codificador do receptor B₁ em animais estimulados eletricamente. Em adição, a expressão deste produto gênico não está vinculada à lesão tecidual decorrente da exposição do nervo, pois em animais cujo nervo ciático foi apenas exposto e não recebeu qualquer estímulo elétrico, tal fragmento não foi detectado. A presença do RNAm para receptores B₁ pode então ter sido consequência do primeiro trem de pulsos (controle), que foi aplicado 30 min antes da injeção do antagonista B₁ (40 min antes da aplicação do

segundo trem de pulsos). Além disso, os resultados de expressão gênica parecem sugerir ausência de co-localização entre os receptores cininérgicos e os receptores vanilóides 1 (TRPV1) no núcleo paratrigeminal, uma vez que o tratamento neonatal com capsaicina não afetou a expressão de RNAm codificador de receptores cininérgicos. Os resultados obtidos com a microinjeção de antagonista cininérgicos no núcleo paratrigeminal de animais tratados com capsaicina reforçam estes achados. Nestes animais, o tratamento neonatal com capsaicina não afetou a magnitude do efeito inibitório induzido por microinjeção no Pa5 de HOE-140 ou LF 16-0687. Por outro lado, a modulação do reflexo somatosensorial exercida por quaisquer dos 3 antagonistas seletivos dos receptores opióides no núcleo paratrigeminal foi abolida completamente pelo tratamento neonatal com capsaicina.

A persistência do efeito dos antagonistas B₂ para bradicinina no Pa5, sobre o reflexo somatosensorial de ratos tratados com capsaicina, sugere que os receptores B₂ parecem estar presentes em neurônios paratrigeminais pós-sinápticos, como proposto anteriormente por Couture e Lindsey (2000), mas o mesmo não é observado em relação aos mecanismos modulatórios dependentes de receptores opióides, bloqueados por completo após tratamento neonatal com capsaicina. Estes resultados alinham-se à hipótese de que neurônios opioidérgicos, modulariam, indiretamente, a atividade de neurônios paratrigeminais reativos às cininas (Koepp et al., 2005). Assim, conforme ilustra a Figura 27, a estimulação aferente nociceptiva acarretaria liberação de bradicinina e de opióides no núcleo paratrigeminal. A bradicinina atuaria em receptores B₂ pós-sinápticos. Já os receptores opióides, co-localizados com receptores TRPV1 presentes em fibras aferentes sensíveis à capsaicina poderiam modular a

excitabilidade de neurônios paratrigeminais através de duas vias: a) através da ativação de receptores delta opióides pré-sinápticos e consequente inibição da liberação de bradicinina e b) através de uma ação inibitória via receptores mu e kappa opióides sobre neurônios inibitórios (gabaérgicos ou de outra natureza). Em conjunto, estes mecanismos ativariam neurônios presentes no RVL e/ou NTS, os quais poderiam então recrutar neurônios simpáticos pré-ganglionares presentes na coluna de células intermédialateral, resultando em aumento da PA e um pequeno aumento da FC.

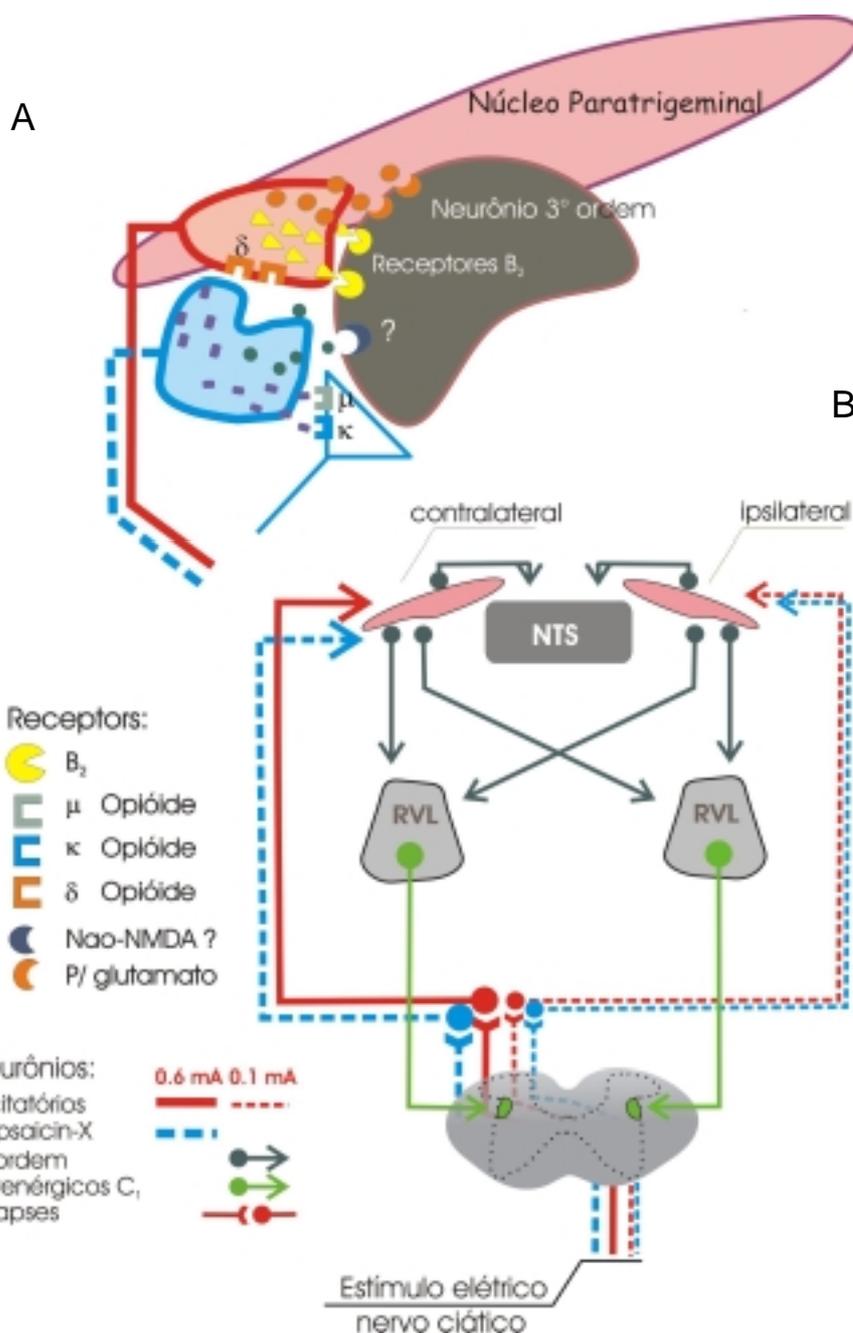


Figura 26 – Representação da possível localização dos receptores cininérgicos e opioidérgicos (A) ativos no arco somatosensorial reflexo e as vias neuronais que medeiam esta resposta (B). A participação de receptores NMDA e não-NMDA é especulativa (Buck et al., 2002). As linhas vermelhas cheias ou pontilhadas representam neurônios excitatórios ativados em resposta à estímulos de alta (0,6 mA) ou de baixa (0,1 mA) intensidade, respectivamente. As setas representam neurônios de 3º ordem (cinza) e neurônios premotores adrenérgicos C_1 (Verde). Abreviações: Capsaicin-X, fibras aferentes sensíveis a capsaicina; NTS, núcleo do trato solitário; RVL, núcleo reticular rostroventrolateral.

5.4. O reflexo somatosensorial em animal consciente.

O conhecimento da organização funcional das vias centrais implicadas no reflexo somatosensorial está baseado, quase que exclusivamente, em estudos conduzidos em sistemas isolados de animais anestesiados. Neste sentido, sabe-se muito pouco sobre a maneira pela qual diferentes sistemas coordenam as respostas a um estressor e operam coletivamente em um organismo intacto. Além disso, a estimulação nociceptiva de rato anestesiado normotérmico evoca aumentos da pressão arterial, mas o oposto é verificado em animais hipotérmicos (Sato et al., 1976), ou nos quais induziu-se um plano mais profundo de anestesia (Gibbs et al., 1989). No transcorrer dos nossos experimentos com estimulação do nervo ciático, também notamos que a magnitude do reflexo somatosensorial é extremamente susceptível ao nível de anestesia e à temperatura corpórea. Este fato levou-nos a investigar qual a real importância do núcleo paratrigeminal no processamento da resposta somatosensória em animal acordado. Os resultados obtidos demonstraram que a lesão do núcleo paratrigeminal contralateral à pata estimulada atenuou tanto o aumento pressor quanto as alterações na FC evocadas pela formalina. No entanto, este efeito foi significativo somente na primeira fase do teste. Por outro lado, ambas as fases da resposta nocifensiva à formalina 2.5% foram reduzidas pela lesão do Pa5 contralateral. Portanto, a injeção de um estímulo álgico como a formalina na pata traseira de ratos conscientes induz alterações cardiovasculares semelhantes às aquelas evocadas por estimulação do nervo ciático em ratos anestesiados. Além disso, a redução das respostas cardiovasculares à formalina induzidas pela lesão do Pa5 contralateral foram similares às aquelas relacionadas ao reflexo somatosensorial. Este paralelismo constitui forte argumento de que o reflexo somatosensorial

evocado por estimulação do nervo ciático é dependente da estimulação das fibras nociceptivas aferentes primárias contidas no nervo. Uma vez que além de estimular fibras C, a formalina excita também fibras A β e A δ durante a fase I e fibras A δ durante a fase II do teste (Mccall et al., 1996; Puig e Sorkin, 1996) . Então, o conjunto dos resultados obtidos até o momento permite sugerir que o reflexo somatosensorial é mediado através de aferentes espinobulbares que transitam na medula espinhal contralateral e que o Pa5 é uma região crítica para a integração do reflexo somatosensorial. Por outro lado, este último conjunto de resultados também aponta para uma participação significativa do Pa5 no delineamento das próprias respostas comportamentais evocadas por estímulos álgicos aplicados à pata posterior do rato.

5.5. Participação do núcleo paratrigeminal no processamento da informação nociceptiva proveniente da pata posterior

Estudos neuroanatômicos e imunohistoquímicos sugerem que o núcleo paratrigeminal participa do processamento nociceptivo, uma vez que este núcleo recebe aferências provenientes dos nervos trigêmio, vago e glossofaríngeo (Hamilton e Norgren, 1984; Altschuler et al., 1989), além de aferências espinhais (Panneton e Burton, 1985). Além disso, a aplicação de estímulos químicos nocivos em diferentes áreas corporais induz a expressão de c-fos no núcleo paratrigeminal, indicando que tais estímulos ativam neurônios desta estrutura. Então, a expressão deste proto-oncogene no núcleo paratrigeminal é aumentada pela estimulação elétrica do nervo hipoglosso (Bereiter et al., 2000) ou pela exposição da língua à capsaicina, nicotina, histamina, acetilcolina ou piperina (Carstens et al., 1995), a mucosa faríngeal à capsaicina ou nicotina (Boucher et

al., 2003), o músculo masseter ao óleo de mostarda (Hathaway et al., 1995; Ro et al., 2003), a glândula salivar parótida ao adjuvante completo de Freund (Ogawa et al., 2003), o trato alimentar superior ou lábios à formalina (Ma et al., 2005). Este fenômeno não é restrito à estimulação nociceptiva orofacial, uma vez que a infusão de ciclofosfamida na vesícula biliar, um modelo experimental de dor visceral, também aumenta a expressão de c-fos no núcleo paratrigeminal (Bon et al., 1997, 1998). Nestes estudos, as mudanças observadas foram bilaterais, embora a marcação de c-fos após a injeção unilateral de óleo de mostarda no músculo masseter foi limitada ao núcleo paratrigeminal ipsilateral (Ro et al., 2003).

Apesar de alguma discrepância com os estudos acima, o presente trabalho implica o núcleo paratrigeminal no processamento da informação nociceptiva proveniente da estimulação nociva da pata contralateral, mas não ipsilateral. Deste modo, a lesão do núcleo paratrigeminal não altera a responsividade à estimulação térmica radiante, mas aumenta a sensibilidade (i.e. reduz o limiar mecânico) à estimulação mecânica em ambos os testes, von Frey e Randall-Selitto, e diminui o comportamento nociceptivo evocado pela injeção de formalina ou capsaicina na pata contralateral, mas não ipsilateral.

Embora o núcleo paratrigeminal não seja o principal alvo de aferências espinhais, este núcleo tem um papel importante na regulação do componente cardiovascular do reflexo somatosensorial, cuja via ascendente cursa através do lado oposto da medula espinhal e é modulado diferencialmente dependendo da intensidade do estímulo nocivo aplicado (Koepp et al., 2005; Caous et al., submetido). Além disso, o aumento do tono simpático também altera a percepção dolorosa através do recrutamento da via descendente de dor (Millan, 2002).

Outras estruturas supraespinhais, tais como a área ventromedial rostral do bulbo (RVM), o núcleo reticular dorsal (DRt) e o núcleo do trato solitário também podem modular diferentemente a transmissão nociceptiva espinhal. Neste sentido, estímulos de baixa intensidade aplicados no RVM, desencadeia uma influência excitatória sobre a capacidade de resposta nociceptiva espinhal, enquanto que estímulos de alta intensidade causam um efeito oposto (Zhuo e Gebhart, 1990, 1997; Urban e Gebhart, 1997; para revisão ver Fields e Basbaum, 1999). Por outro lado, o DRt medeia o controle inibitório nocivo difuso (DNIC; *diffuse noxious inhibitory control*), no qual a estimulação periférica de uma área particular ativa o DRt para exercer uma inibição heterosegmental das aferências nociceptivas provenientes de outras regiões do corpo (Lima e Almeida, 2002). O NTS, considerado a interface homeostásica entre o sistema sensorial e o autônomo, exerce ações antinociceptivas (Aicher e Randich, 1990), mas também exibe ações pronociceptivas quando aferentes vagais são estimulados por citocinas durante infecção sistêmica (Wiertelak et al., 1997).

Neste contexto, a contribuição mais significativa do presente trabalho é prover evidências de que o núcleo paratrigeminal pode modular diferentemente a resposta nociceptiva comportamental, dependendo da natureza do estímulo nocivo aplicado em uma única região do corpo, a pata traseira de ratos. Este tipo de influência, dependente da natureza do estímulo nocivo, nunca foi demonstrado para qualquer outra área cerebral pertencente ao sistema supraespinhal de controle da dor. Desta forma, o núcleo paratrigeminal difere do NTS, o qual está envolvido na indução de hiperalgesia térmica da cauda induzida pela injeção sistêmica de LPS (uma endotoxina bacteriana), mas não àquela induzida pela injeção de formalina na pata (Wiertelak et al., 1997). Difere também do DRt, o

qual facilita a resposta nociceptiva à estimulação térmica (teste da placa quente e de retirada da cauda) ou química (formalina intraplantar) nociva (Almeida et al., 1996, 1999).

Diferentemente do observado para o DRt, a influência inibitória ou excitatória do núcleo paratrigeminal sobre a resposta nociceptiva pode depender das características tônica (formalina) versus fásica (mecânico) do estímulo nocivo, da diversidade de fibras aferentes primárias ativadas por cada tipo de estímulo, e/ou das vias ascendentes centrais envolvidas no processamento dos sinais nociceptivos no cérebro (Para revisão ver, Julius e Basbaum, 2001). É importante salientar novamente que o núcleo paratrigeminal, diferentemente do DRt, participa do controle autonômico e do mecanismo baroreflexo (Lindsey et al., 1997; Yu e Lindsey, 2003), bem como dos mecanismos cardiovasculares reflexos à estimulação nociva da pata com formalina (Resultados apresentados na presente tese).

Como projeções eferentes diretas do núcleo paratrigeminal para a medula espinhal ainda não tenham sido demonstradas, o papel modulatório deste núcleo sobre o comportamento ou a sensibilidade nociceptiva parece ser mediado através de conexões neuronais para outras estruturas relacionadas ao processamento da informação nociceptiva e o controle cardiovascular. Tais alvos eferentes incluem, o NTS, LRt, Amb, e o VPM (Saxon e Hopkins, 1998; Buck et al., 2001; Caous et al, 2001). Todavia, serão necessários estudos adicionais para caracterizar a contribuição do NTS e destas outras áreas cerebrais sobre a influência modulatória do núcleo paratrigeminal.

5.6. Participação do núcleo paratrigeminal no processamento da informação nociceptiva proveniente da região orofacial

Por fim, examinamos se a participação do núcleo no processamento da informação nociceptiva proveniente da região orofacial seria semelhante àquela verificada com relação aos experimentos envolvendo a pata posterior do rato. De fato, evidências anatômicas e imunohistoquímicas acumuladas até o momento, apontam o Pa5 como uma importante estrutura no processamento da informação nociceptiva orofacial (Carstens et al., 1995; Hathaway et al., 1995; Bereiter et al., 2000; Boucher et al., 2003; Ogawa et al., 2003; Ro et al., 2003).

A lesão do núcleo paratrigeminal não afetou a reatividade à estimulação térmica (calor) da face, mas diminuiu o limiar nociceptivo à estimulação mecânica e potencializou substancialmente a segunda fase (15-30 min) da resposta evocada pela formalina. Estes resultados sugerem que o núcleo paratrigeminal não está implicado no processamento da informação nociceptiva térmica, mas parece exercer uma influência inibitória sobre o processamento da informação nociceptiva mecânica ou química. Este efeito inibitório foi observado tanto em animais que receberam estímulos no lado esquerdo (contralateral à lesão do núcleo paratrigeminal), quanto no lado direito da face (ipsilateral à lesão do núcleo paratrigeminal). Além disso, a influência inibitória do núcleo paratrigeminal no processamento da informação nociceptiva química proveniente da face, difere daquele observado quando a formalina foi aplicada na pata. Este fato pode ser decorrente de projeções diretas de aferentes trigeminais para o núcleo paratrigeminal ipsilateral e contralateral (Altschuler et al., 1989) bem como das características compartilhadas entre o núcleo paratrigeminal e a lamina I do subnúcleo caudal do núcleo trigeminal espinhal (Sp5c), tais como a intensa

marcação para a fosfatase ácida resistente ao flúor (Altschuler et al., 1989) e para isolectina B4 (Sugimoto et al., 1997), marcadores de fibras C não peptidérgicas. Além disso, além de aferências trigeminais, a região do núcleo paratrigeminal e a lamina I do Sp5c recebem aferências viscerais e somáticas da cabeça e do pescoço supridos pelos nervos cervicais superiores, vagais e glossofaríngeos (Jacquin et al., 1983; Altschuler et al., 1989; Panneton, 1991). Então, embora o núcleo paratrigeminal envie projeções eferentes principalmente para estruturas associadas com o controle de funções autonômicas, as evidências de que o núcleo emite projeções para a porção dorsal do Pa5 contralateral, para a lamina I do Sp5c (Saxon e Hopkins, 1998), bem como para a região de transição do subnúcleo caudal e interpolar do núcleo trigeminal (Sp5i/Sp5c-vi), sugerem que o núcleo paratrigeminal serve como um relê intratrigeminal para a integração autonômica somática da nocicepção trigeminal ou ainda como uma estrutura importante no recrutamento da via descendente de controle da dor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados do presente trabalho, em conjunto com os dados da literatura, permitem hipotetizar acerca das possíveis vias e mediadores envolvidos nas alterações cardiovasculares induzidas pela estimulação de fibras aferentes nociceptivas. Neste sentido, vias neuronais excitatórias e inibitórias, provavelmente polisinápticas e provenientes do campo de inervação do nervo ciático, alcançariam o núcleo paratrigeminal através da medula espinhal. O componente inibitório, sensível ao bloqueio por capsaicina, envolveria principalmente o núcleo paratrigeminal ipsilateral, enquanto o componente excitatório, insensível à capsaicina envolveria o núcleo contralateral. Os

receptores para as cininas estariam localizados em vias neuronais excitatórias resistentes à capsaicina, enquanto os mecanismos regulatórios operados por receptores opióides seriam parte da via inibitória sensível à capsaicina. Então, a estimulação aferente nociceptiva acarretaria liberação de bradicinina e de opióides. A bradicinina atuaria em receptores B₂ pós-sinápticos. Já os opióides presentes em fibras aferentes sensíveis à capsaicina poderiam modular a excitabilidade de neurônios paratrigeminais através de duas vias: Primeiro, através da ativação de receptores delta opióides pré-sinápticos e conseqüente inibição da liberação de bradicinina. Segundo através de uma ação inibitória via receptores mu e kappa opióides sobre neurônios inibitórios (gabaérgicos ou de outra natureza). Em conjunto, estes mecanismos ativariam neurônios presentes no RVL e/ou NTS os quais poderiam então recrutar neurônios simpáticos preganglionares presentes na coluna de células intermédio lateral. Como resultado deste circuito teríamos aumento da PA e da FC.

Em paralelo a este circuito, o núcleo paratrigeminal parece desempenhar um papel tanto pró- como antinociceptivo dependendo da modalidade e do local do estímulo nociceptivo (Figura 28). Este efeito antagônico talvez decorra do componente cardiovascular envolvido em cada modalidade de estímulo aplicado. Assim, um estímulo nocivo tônico (formalina), cujo componente cardiovascular é extremamente importante, ao ser aplicado na pata posterior de ratos causaria a ativação de neurônios do núcleo paratrigeminal contralateral ao estímulo. O núcleo paratrigeminal, por sua vez poderia exercer uma influência inibitória sobre estruturas centrais conhecidamente antinociceptivas, tais como o PB, VPM, LRt e NTS, acarretando em inibição do recrutamento do controle descendente de dor e conseqüentemente uma ação pronociceptiva. Uma outra hipótese seria uma

interação direta com vários elementos neuronais presentes no corno dorsal da medula espinhal causando uma facilitação da via ascendente de dor. Estes ajustes, em conjunto com a modulação da resposta cardiovascular reflexa à estimulação nociceptiva química da pata posterior acarretaria em ação pronociceptiva mediada pelo núcleo paratrigeminal (Figura 28A). Em contraste, este mesmo estímulo químico, formalina, quando aplicado na face, estaria ativando diretamente grupos neuronais distintos no núcleo paratrigeminal ipsilateral e contralateral através de aferentes trigeminais. Esta ativação direta, poderia exercer uma influência excitatória sobre as estruturas antinociceptivas descritas acima, resultando em ativação do controle descendente de dor e conseqüentemente uma ação antinociceptiva. Este mesmo mecanismo poderia explicar a influência inibitória do núcleo paratrigeminal sobre o processamento da informação nociceptiva mecânica proveniente tanto da pata quanto da região orofacial, uma vez que, um estímulo mecânico, agudo, não envolveria um aumento da pressão arterial sustentado e significativo como é aquele decorrente de um estímulo químico, formalina (Figura 28 B).

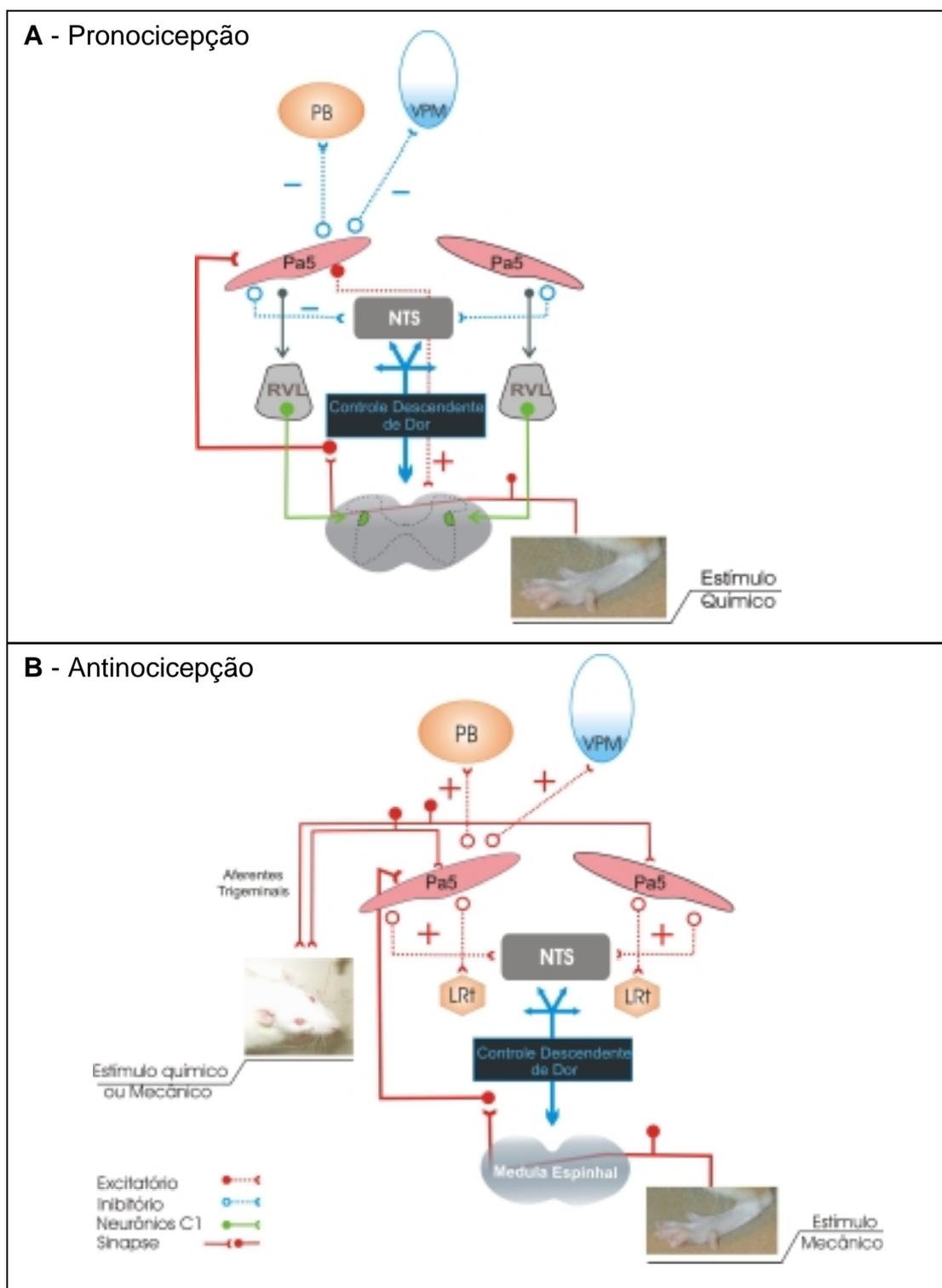


Figura 27 – Esquema ilustrativo dos possíveis mecanismos envolvidos na ação pronociceptiva (A) e antinociceptiva (B) do núcleo paratrigeminal (Pa5). Abreviações: PB, núcleo parabraquial; VPM, núcleo talâmico ventroposteromedial, NTS, núcleo do trato solitário; LRt, núcleo reticular lateral.

Em conjunto, este trabalho apresenta o núcleo paratrigeminal como um novo membro do sistema de controle nociceptivo supraespinal, capaz de exercer influências excitatórias e inibitórias dependendo da natureza do estímulo nocivo e ainda modular as respostas cardiovasculares reflexas à estimulação nociceptiva. Em adição, nossos resultados talvez possam vir a contribuir ao desenvolvimento de formas adequadas de tratamento da dor e da prevenção da hiperreflexia autonômica em pacientes paraplégicos. Nestes pacientes, um estímulo capaz de ativar fibras nociceptivas, entre eles, distensão da bexiga ou do cólon, acarreta em um surto hipertensivo acompanhado de bradicardia compensatória denominado hiperreflexia autonômica (para revisão ver Godim et al., 2004) capaz de levar a óbito pacientes paraplégicos não hospitalizados.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- ✓ A estimulação elétrica do nervo ciático em animais anestesiados induz um aumento pronunciado da pressão arterial e um pequeno aumento na frequência cardíaca.
- ✓ A estimulação química da pata de ratos conscientes com formalina, acarreta alterações cardiovasculares qualitativamente similares às evocadas pela estimulação do nervo ciático em ratos anestesiados.
- ✓ A resposta cardiovascular reflexa à estimulação nociceptiva (Reflexo somatosensorial) parece ser mediada exclusivamente por fibras aferentes primárias;
- ✓ As fibras aferentes primárias sensíveis à capsaicina exercem influências inibitórias sobre a resposta pressora à estímulos nociceptivos de alta intensidade, mas abole a resposta reflexa à estímulos de baixa intensidade.
- ✓ O reflexo somatosensorial depende da integridade da medula espinhal e do núcleo paratrigeminal;

- ✓ No núcleo paratrigeminal, a modulação do reflexo envolve a ativação de receptores opióides e de receptores B₂ para bradicinina, mas não de receptores NK1, NK2 e NK3 para as taquicininas.

- ✓ Os receptores B₂ parecem estar localizados em neurônios paratrigeminais pós-sinápticos, enquanto que os receptores opióides, co-localizados com receptores TRPV1, parecem estar presentes em neurônios pré-sinápticos;

- ✓ O núcleo paratrigeminal exerce um papel diferencial sobre o processamento da informação nociceptiva química e mecânica, mas parece não está implicado no processamento da informação nociceptiva térmica;

7. Referências Bibliográficas

- ABDALA AP, HAIBARA AS, COLOMBARI. Cardiovascular responses to substance P in the nucleus tractus solitarii: microinjection study in conscious rats, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 285: 891-898, 2003.
- AICHER SA, RANDICH A. Antinociception and cardiovascular responses produced by electrical stimulation in the nucleus tractus solitarius, nucleus reticularis ventralis and the caudal medulla. *Pain*, 42:103–119, 1990.
- ALLEN GV, BARBRICK B, ESSER MJ.. Trigeminal-parabrachial connections: possible pathway for nociception-induced cardiovascular reflex responses. *Brain Res.*, 715: 125-135, 1996.
- ALMEIDA A, TJÖLSEN A, LIMA D, COIMBRA A, HOLE K. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Res. Bull.*, 39:7–15, 1996.
- ALMEIDA A., STORKSON R., LIMA D., HOLE K., TJOLSEN A. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *Eur. J. Neurosci.*,11:110-122, 1999
- ALMEIDA A., COBOS A., TAVARES I., LIMA D. Brain afferents to the medullary dorsal reticular nucleus: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Eur. J. Neurosci.*,16: 81-95, 2002
- ALTSCHULER SM., BAO XM., BIEGER D., HOPKINS DA., MISELIS RR. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the rat: sensory ganglia and nuclei of the solitary and spinal trigeminal tracts. *J. Comp. Neurol.*, 283: 248-268, 1989.

- ARMSTRONG CL., HOPKINS DA. Neurochemical organization of paratrigeminal nucleus projections to the dorsal vagal complex in the rat. *Brain. Res.*, 785: 49-57, 1998.
- BEREITER DA., BEREITER DF., HIRATA H., HU JW. c-fos expression in trigeminal spinal nucleus after electrical stimulation of the hypoglossal nerve in the rat. *Somatosens. Mot. Res.*, 17:229-237, 2000.
- BLESSING WW. Inadequate frameworks for understanding bodily homeostasis. *Trends Neurosci.*, 20:235-239, 1997.
- BON, K., LANTERI-MINET, M., MENETREY, D. Involvement of the dorsal paratrigeminal nucleus in visceral pain-related phenomena. *C. R. Acad. Sci. III*, 320:607-13, 1997.
- BON K, LANTÉRI-MINET M, MICHIELS JF, MENÈTREY D. Cyclophosphamide cystitis as a model of visceral pain in rats: a c-fos and krox-24 study at telencephalic levels, with a note on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Exp. Brain Res.*, 122:165-174, 1998.
- BOSCAN, P., PATON, JF. Role of the solitary tract nucleus in mediating nociceptive evoked cardiorespiratory responses. *Auton Neurosci.* 86:170-82, 2001.
- BOSCAN, P., PATON, JF. Integration of cornea and cardiorespiratory afferents in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 282:1278-87, 2002.
- BOUCHER Y., SIMONS CT., CUELLAR JM., JUNG SW., CARSTENS MI., CARSTENS E. Activation of brain stem neurons by irritant chemical stimulation of the throat assessed by c-fos immunohistochemistry. *Exp. Brain Res.* 8:211-218, 2003.

- BUCK, HS., CAOUS, CA., LINDSEY, CJ. Projections of the paratrigeminal nucleus to the ambiguous, rostroventrolateral and lateral reticular nuclei, and the solitary tract. *Autonomic Neuroscience*, 87: 187-200, 2001.
- BUCK H, OGNALI B, THIBAUT G, LINDSEY CJ, COUTURE R. Autoradiographic detection of kinin receptors in human medulla of control, hypertensive and diabetic donors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 80:249-257, 2002.
- BUHLER AV., PROUDFIT HK, GEBHART GF. Separate populations of neurons in the rostral ventromedial medulla project to the spinal cord and to the dorsolateral pons in the rat. *Brain Res.*, 1016:12-9, 2004.
- CALIXTO, JB.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, ES.; FERREIRA, J.; CABRINI DA.; CAMPOS, MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br. J. Pharmacol.*, 143: 803-818, 2004.
- CAOUS CA., BUCK HS., LINDSEY CJ. Neuronal connections of the paratrigeminal nucleus: a topographic analysis of neurons projecting to bulbar, pontine and thalamic nuclei related to cardiovascular, respiratory and sensory functions. *Auton. Neurosci. Basic Clin.*, 94: 14-24, 2001.
- CAOUS CA., BALAN AC., LINDSEY CJ.. Bradykinin microinjection in the paratrigeminal nucleus triggers neuronal discharge in the rat rostroventrolateral reticular nucleus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82: 485-492, 2004.
- CARSTENS E. Neural mechanisms of hyperalgesia: peripheral or central sensitization? *News Physiol. Sci.*, 77:2499-2514, 1995.
- CATERINA MJ, SCHUMACHER MA, TOMINAGA M, ROSEN TA, LEVINE JD, JULIUS D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-24, 1997.

- CHALMERS JP, CAPOOR V, LLEWELLYN-SMITH IJ, MINSON JB, PLOWSKI PM, Central control of blood pressure. *European Heart Journal* 13: 2-9, 1992.
- CHAN-PALAY, V. The paratrigeminal nucleus. II. Identification and inter-relations of catecholamine axons, indoleamine axons, and substance P immunoreactive cells in the neuropil. *J. Neurocytol.*, 7: 419-442, 1978.
- CIRIELO J, HRYCYSHYN AW, CARALESU FR. Glossopharyngeal and vagal afferents to the brainstem of the cat: a horseradish-peroxidase study. *The Journal of Autonomic Nervous System*, 4: 63-79, 1981
- CIRIELO J, Brainstem projections of aortic baroreceptor afferent fibers in the rat. *Neuroscience Letters*, 36: 37,1983.
- CLAVELOU P, PAJOT J, DALLEL R, RABOISSON P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in rat. *Neurosci Lett.*, 103: 349-353, 1989.
- COUTURE, R.; LINDSEY, C. J. Brain Kallikrein-Kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: Quirion, R., Bjorklund, A. Hokfelt, T. (Eds). *Handbook of chemical Neuroanatomy*, Vol. 16, pp. 241-299, 2000.
- COWLEY Jr AW, Long-term control of arterial blood pressure. *Physiological Reviews* 72: 231-300, 1992.
- CRAVO SL, LOPES OU, FRAGA CAB, TIMO-IARIA C., Cardiovascular adjustments in limb retraction provoked by noxious stimulation in decerebrate and spinal cats. Evidence for a somatotopic organization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 385-396, 1995.
- CULMAN, J.; RITTER, S.; OHLENDORF, C.; HAASS, M.; MASER-GLUTH, C.; SPITZNAGEL, H.; UNGER, T. A new formalin test allowing simultaneous

- evaluation of cardiovascular and nociceptive responses. *Can J Physiol Pharmacol*, 75:1203-11, 1997.
- DAMPNEY RAL, HORIUCHI J., Functional organization of central cardiovascular pathways: studies using *c-fos* gene expression, *Progress in Neurobiology*, 71: 359–384, 2003.
- DUALE, C., LUCCARINI, P. CADET, R., WODA, A. Effects of Morphine microinjections into the Trigeminal Sensory Complex on the Formalin Test in the Rat. *Exp. Neurology*, 142: 331-339, 1996.
- 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*, 4:161-174, 1957.
- FELDBERG W, GUERZENSTEIN PG. Vasodepressor effects obtained by drugs acting on the ventral surface of the brain. *J. Physiol.* 258: 337-355, 1976.
- FELDMAN PD. Neurokinin 1 receptor mediation of the vasodepressor effects of substance P in the nucleus of the tractus solitarius. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273: 617-623, 1995.
- FIELDS HL, BASBAUM AI. Central nervous system mechanisms of pain modulation, In: Wall PD, Melzack R (Eds), *Textbook of Pain*, 4th edition. Churchill Livingstone, London, pp. 206-217, 1999.
- FIELDS H.L, BRY J., HENTALL I., ZORMAN G. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J. Neurosci.*, 3:2545-52, 1983.
- FIOR, D.R.; MARTINS, D.T.O. e LINDSEY, C.J. - Localization of the pressor effect of bradykinin in the medulla oblongata of rats. *Am. J. Physiol.* 265: H100-H1006, 1993.

- GATTI PJ, JOHNSTON TA, MASSARI VJ., Can neurons in the nucleus ambiguus selectively regulate cardiac rate and atrio-ventricular conduction. *Journal autonomic Nervous System*, 57: 123-127, 1996.
- GIBBS, N. M., LARACH, D. R., SKEEHAN, T. M., SCHULER, H. G. Halothane induces depressor responses to noxious stimuli in the rat. *Anesthesiology* 70 : 503-510, 1989.
- GODIM FA, LOPES AC JR, OLIVEIRA GR, RODRIGUES CL, LEAL PR, SANTOS AA. Cardiovascular control after spinal cord injury. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, 2: 71-79, 2004
- GRANATA AR, WOODRUFF GN. A central hypertensive action of substance P in rats. *IRCS Med. Sci.* 8: 205, 1980.
- GRANUM SL. The spinothalamic system of the rat. I. Localization of cells of origin. *J. comp. neurol.* 347: 159-180, 1986.
- GRIESBACHER T. Blood pressure reflexes following activation of capsaicin-sensitive afferent neurones in the biliopancreatic duct of rats. *Br. J. Pharmacol.* 111: 547-554, 1994.
- GUERTZENSTEIN PG, SILVER RA., Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *the journal of physiology*, 242: 489-503, 1974.
- HAIBARA AS, COLUMBARI E, CHIANCA JR DA, BONAGAMBA LGH, MACHADO BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressure response of chemoreflex. *Am. J. Physiol.*, 269: 1421-1427, 1995.
- HAMILTON R.B., NORGREN R. Central projections of gustatory nerves in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 222:560-577, 1984.

- HARGREAVES K., DUBNER R., BROWN F., FLORES C., JORIS J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32:77-78, 1988.
- HATHAWAY C.B., HU J.W., BEREITER D.A. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the caudal brainstem of the rat following noxious chemical stimulation of the temporomandibular joint. *J. Comp. Neurol.* , 356: 444-456, 1995.
- HENRY JL, YASHPAL K, PITCHER GM, CODERRE TJ, Physiological evidence that the 'interphase' in the formalin test is due to active inhibition. *Pain*, 82:57-63, 1999.
- IMBE, H.; REN. K.. Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation differentially upregulates preprodynorphin mRNA in the trigeminal and paratrigeminal nuclei of the rat. *Brain Res Mol Brain Res.*, 67(1):87-97, 1999.
- IWAMOTO GA, WALDROP TG, KAUFMAN MP, BOTTERMAN BR, RYBICKI KJ, MITCHELL JH. Pressor reflex evoked by muscular contraction: contributions by neuraxis levels. *J. Appl. Physiol.*, 59:459-67, 1985.
- JACQUIN, M.F., RHOADES, R.W., ENFIEJIAN, H.L., EGGER, M. D. Organization and morphology of masticatory neurons in the rat: a retrograde HRP study. *J Comp Neurol.*; 218:239-56, 1983.
- JANS AJ, GEBHART GF., Quantitative characterization and spinal pathway mediating inhibition of spinal nociceptive transmission from the lateral reticular nucleus in the rat. *Journal Neurophysiology*, 59: 226-247, 1988.
- JOHANSSON B. Circulatory responses to stimulation of somatic afferents. *Acta Physiol. Scand.* 198: 1-91, 1962

- JULIUS D., BASBAUM A.L. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-210, 2001.
- KOEPP J, CAOUS CA, RAE GA, BALAN, A, LINDSEY, CJ. Kinin and opioid receptors in the paratrigeminal nucleus modulate the somatosensory reflex to rat sciatic nerve stimulation. *Peptides*, 26:1339-1345, 2005.
- KATZ S, PERRYMAN JH. Respiratory and blood pressure responses to stimulation of peripheral afferent nerves. *Am. J. Physiol.* 208: 993-999, 1965.
- KERR FWL. Neuroanatomical substrates of nociception in the spinal cord. *Pain*, 1: 325-356, 1975.
- KILDUFF TS, SHARP FR, HELLER HC. Progressive activation of partrigeminal nucleus during entrance to hibernation. *Am. J. Physiol.*, 255:178-81, 1988.
- KOTANI S, MUROFUSHI H, MAEKAWA S, AIZAWA H, SAKAI H. Isolation of rat liver microtubule-associated proteins. Evidence for a family of microtubule-associated proteins with molecular mass of around 200,000 which distribute widely among mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 263: 5385-5389, 1988.
- KOZELKA, J. W., CHUNG, J. M., WURSTER, R. D., Ascending spinal pathways mediating somato-cardiovascular reflexes. *J. Auton. Nerv. Syst.*3:171-5, 1981.
- KROGSGAARD-LARSEN P., HANSEN, J.J. Naturally-occurring excitatory amino acids as neurotoxins and leads in drug design., *Toxicol Lett.* 64-65:409-16, 1992.
- KUBO T, KIHARA M. Blood pressure modulation by substance P in the rat nucleus tractus solitari. *Brain Res.* 413: 379-383, 1987.
- LAPA, R.C.R.S.; BAUER, J.A.; LINDSEY, C. J. Synaptic contacts established by primary sensory fibers in the rat paratrigeminal nucleus. *Acta Microscopica* 4: 106, 1996.

- LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53: 597-652, 2001
- LEDOUX JF, WILSON LB. Neuronal application of capsaicin modulates somatic pressor reflexes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281: 868-877, 2001.
- LI JL, LI YQ, KANEKO T, MIZUNO N. Preprodynorphin-like immunoreactivity in medullary dorsal horn neurons projecting to the thalamic regions in the rat. *Neurosci Lett.* 264: 13-6, 1999.
- LIMA D, ALMEIDA A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Prog. Neurobiol.*, 66:81-108, 2002.
- LINDSEY, CJ. Central bradykinin receptors in the SHR and blood pressure. In: Satio, H.; Yamori, Y.; Minami, M.; Parvez, S. H. (Eds.), *Progress in Hypertension*, 3: 109-125, 1995.
- LINDSEY, CJ.; BUCK, HS.; FIOR-CHADI, DR.; LAPA, RCRS. Pressor effect mediated by bradykinin in the paratrigeminal nucleus of the rat. *J. Physiol.*, 502: 219-229, 1997.
- LIU RH, TANG JS, HOU ZL. Electrophysiological identification of spinally projecting neurons in the lateral reticular nucleus of the rat. *Brain Research*, 481: 350-355, 1989.
- MA WL, ZHANG WB, FENG G, CAI YL. Calbindin D28K-containing neurons in the paratrigeminal nucleus receive convergent nociceptive information and project to nucleus of the solitary tract in rat. *Brain Res.*, 1038:132-140, 2005.
- MALPELI, JG.; BURCH, BD. Cobalt destroys neurons without destroying fibers of passage in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Neurosci Lett.*, 32: 29-34, 1982.

- MARSHALL, JM. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiological Reviews*, 74: 543-593, 1994.
- MASSARI VJ, JOHNSON TA, GATTI PJ. Cardiotropic organization of the nucleus ambiguous: An anatomical and physiological analysis of neurons regulating atrioventricular conduction. *Brain Research* 679: 227-240, 1995.
- McCALL WD, TANNER KD, LEVINE JD, Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat, *Neurosci. Lett.*, 208: 45-58, 1996.
- MCCULLOCH, PF., PANNETON, WM., GUYENET, PG. The rostral ventrolateral medulla mediates the sympathoactivation produced by chemical stimulation of the rat nasal mucosa. *J. Physiol.* 516:471-84, 1999.
- McCULLOCH, PF., PANNETON, WM. Fos immunohistochemical determination of brainstem neuronal activation in the muskrat after nasal stimulation *Neuroscience*. 78:913-25, 1997.
- MCKITRICK DJ, CALARESU FR. Reciprocal connection between nucleus ambiguous and caudal ventrolateral medulla. *Brain Research*, 770: 213-220, 1997.
- MARCEAU, F.; LUSSIER, A.; REGOLI, D.; GIROUD, JP. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury on inflammation. *Gen. Pharmacol*, 14: 209-229, 1983.
- MENETREY D, GANNON A, LEVINE JD, BASBAUM AI. Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. *J. Comp. Neurol.*, 285:177-195, 1987.
- MILLAN MJ. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.*, 66: 355-474, 2002.

- MOLANDER C, GRANT G., Laminar distribution of and somatotopic organization of primary afferent fibers from hindlimb nerves in the dorsal horn. A study by transganglionic transport of horseradish peroxidase in the rat. *Neuroscience*, 19: 297-312, 1986.
- MORRISON SF, MILNER TA, REIS J., Reticulospinal vasomotor neurons of the rat rostral ventrolateral medulla: relationship to sympathetic nerve activity and the C1 adrenergic cell group. *J. Neurosci.* 8: 1286-1302, 1989.
- NAGASAKA H, YAKSH TL. Pharmacology of intrathecal adrenergic agonists: cardiovascular and nociceptive reflexes in halothane-anesthetized rats. *Anesthesiology*, 73:1198-207, 1990.
- NESS TJ, GEBHART GF. Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain* 41: 167-234, 1990.
- NI A, CHAI KX, CHAO J. Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Bioch. Et. Biophys. Acta.*, 1442: 177-185, 1998.
- NUDEL U, ZAKUT R, SHANI M, NEUMAN S, LEVY Z, YAFFE D. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 11: 1957-1771, 1983.
- OGAWA A, REN K, TSUBOI Y, MORIMOTO T, SATO T, IWATA K. A new model of experimental parotitis in rats and its implication for trigeminal nociception. *Exp. Brain Res.*, 152: 307-316, 2003.
- PANNETON WM, MCCULLOCH PF, TAN Y, YAVARI P. Brainstem origins of preganglionic cardiac motoneurons in the muskrat. *Brain Research* 738: 342-346, 1996.
- PANNETON, WM. Primary afferent projections from the upper respiratory tract in the muskrat. *J. Comp. Neurol.* 308: 51-65, 1991

- PANNETON WM, BURTON H. Projections from the paratrigeminal nucleus and the medullary and spinal dorsal horns to the peribrachial area in the cat. *Neuroscience*, 15:779-797, 1985
- PANNETON WM, LOEWY AD, Projection of the carotid sinus nerve to the nucleus of the tract in the cat. *Brain research*, 191: 239-244, 1980.
- PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Academic Press, New York 1986.
- PEREIRA, HB. As alterações cardiovasculares em ratos produzidas pelas taquicininas e cininas no núcleo paratrigeminal. Dissertação de mestrado, 2003.
- PESQUERO JB, LINDSEY CJ, ZEH K, PAIVA AC, GANTEN D, BADER M, Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, 269: 26920-5, 1994.
- PHELAN, KD.; FALLS, WM. The interstitial system of the spinal trigeminal tract in the rat: anatomical evidence for morphological and functional heterogeneity. *Somatosens. Motor Res.*, 6: 367-399, 1989
- POSSAS, OS., LOPES, OU., CRAVO, SL. Glutamatergic and GABAergic inputs to the RVL mediate cardiovascular adjustments to noxious stimulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280:R434-40, 2001.
- PUIG S, SORKIN LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity, *pain*, 64: 345-355, 1996.
- RANDALL LO, SELITTO JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 4:409-421, 1957.
- REGOLI, D., RIZZI, A., PERRON, SI., GOBEIL, F. Classification of kinin receptors. *Biol. Chem.* 382: 31-35, 2001.

- REN K, WILLIAMS GM, RUDA MA, DUBNER R. Inflammation and hyperalgesia in rats neonatally treated with capsaicin: effects on two classes of nociceptive neurons in the superficial dorsal horn. *Pain*, 59: 287-300, 1994.
- RO JY, HARRIOT A, CROUSE U, CAPRA NF. Innocuous jaw movements increase c-fos expression in trigeminal sensory nuclei produced by masseter muscle inflammation. *Pain*, 104: 539-548, 2003.
- RUGGIERO DA, ANWAR M, PARK DH, REIS DJ. Autonomic projections of adrenaline synthesizing in the medulla. *Soc. Neurosci. Abs.* 11: 491, 1985
- SAPER HN, KRIEGER AJ, Carotid and aortic chemoreceptor function in the rat. *Journal of Applied Physiology*, 42: 344-348, 1983.
- SATO, A., SCHMIDT, RF. Somatosympathetic reflexes: afferent fibers, central pathways, discharge characteristics. *Physiol Rev.* 53:916-47,1973.
- SATO A, SCHMIDT RF. Heart rate changes reflecting modifications of afferent cardiac sympathetic outflow by cutaneous and muscle efferent volleys. *J. Auton. Nerv. Syst.* 4: 231-247, 1981.
- SATO, A., SATO, Y., SHIMADA, F., TORIGATA, Y. Varying changes in heart rate produced by nociceptive stimulation of the skin in rats at different temperatures. *Brain Res.*, 110: 301-311, 1976.
- SAXON DW, HOPKINS DA. Efferent and collateral organization of paratrigeminal nucleus projections: an anterograde and retrograde fluorescent tracer study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 402: 93-110, 1998.
- SHANSTRA JP.; BATOILLE E; CASTALA, MEM; BARASCUO, Y.; HIRTZ C.; PESQUERO, JB.; PECHER, C.; GAUTHIER, F.; GIROLAMI, JP.; BASCONDS, JL. The B₁-agonist [desArg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-κB and

- uinduces homologous upregulation of the bradykinin B_1 -receptor in cultured human lung fibroblast. *J. Clin. Invest.* 101: 2080-2091, 1998.
- SLEIGHT, P. Role of the baroreceptor reflexes in circulatory control, with particular reference to hypertension. *Hypertension* 18 (Suppl. III): 31-34, 1991.
- SOTGIU ML, Bulbar influences on the periaqueductal gray. Potential role in nociception, *Neuroreport*, 1: 5-8, 1990.
- SPYER, KM, The central nervous organization of reflex circulation control. In: Lowey, AD & Spyer, KM (Ed). *Central Regulation of Autonomic Functions*. Oxford University Press, New York, 168-188, 1990.
- STORNETTA RL, MORRISON SF, RUGGIERO DA, REIS DJ. Neurons of the ventrolateral medulla mediate somatic pressor reflex. *Am. J. Physiol.*, 256:448-462, 1989.
- SUGIMOTO, T., FUJIYOSHI, Y., XIAO, C., HE, Y.F., ICHIKAWA, H. Central projection of calcitonin gene-related peptide (CGRP)- and substance P (SP)-immunoreactive trigeminal primary neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 378: 425-42, 1997.
- TALMAN WT, REIS DJ. Baroreflex action of substance P microinjected into the nucleus tractus solitarii in rat: a consequence of local distortion. *Brain Res.* 220: 402-407, 1981.
- TAYLOR BK, PETERSON MA, BASBAUM AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input, *J. Neurosci.*, 15: 7575-7584, 1995.
- TAYLOR BK, PETERSON MA, BASBAUM AI. Early nociceptive events contribute to the temporal profile, but not the magnitude, of the tonic response to subcutaneous formalin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 280: 876-883, 1997

- THOMAS MR, ULRICHSEN RF, CALARESU FR. Function of lateral reticular nucleus in central cardiovascular regulation in the cat. *American Journal of Physiology*, 232: 157-166, 1977.
- THRASHER TN, CHEN HG, KEIL LC., Arterial baroreceptors control plasma vasopressin responses to graded hypotension in conscious dogs. *Am. J. Physiol.* 278: 469-475, 2000.
- TIAN GF, On the chemoreception mechanism of the ventrolateral medullary surface in rats. *Sheng Li Ko Hsueh Chin Chan*, 26: 145-148, 1995.
- TJÖLSEN A, BERGE OG, HUNSKAAR S, ROSLAND JH, HOLE K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51:5-17, 1992.
- URBAN MO, GEBHART GF. Characterization of biphasic modulation of spinal nociceptive transmission by neurotensin in the rat rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol.*, 78:1550-1562, 1997.
- URBANSKI RW, SAPRU HN, Putative neurotransmitters involved in medullary cardiovascular regulation. *The journal of Autonomic Nervous System*, 25: 181-193, 1988.
- VAISHNAVA P, WANG DH. Capsaicin sensitive-sensory nerves and blood pressure regulation. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents*, 2: 177-188, 2003.
- VERBERNE, AJ., Guyenet, P. G. Midbrain central gray: influence on medullary sympathoexcitatory neurons and the baroreflex in rats. *Am. J. Physiol.* 263: 24-33, 1992.
- WIERTELAK EP, ROEMER B, MAIER SF, WATKINS LR. Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on

- illness-induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesia. *Brain Res.*, 748:143–150, 1997.
- YU YG, CAOUS CA, BALAN AC, RAE G A, LINDSEY CJ. Cardiovascular responses to sciatic nerve stimulation are blocked by paratrigeminal nucleus lesion. *Auton. Neurosci. Basic Clin.*, 98:70-74, 2002.
- YU Y, LINDSEY CJ. Baroreceptor sensitive neurons in the rat paratrigeminal nucleus. *Auton. Neurosci. Basic Clin.*, 98:70-74, 2003.
- ZAGON A. Sciatic and vagal sensory inputs converge onto non-baroreceptive neurons of the rostral ventrolateral medulla. *Brain Research*, 896: 64-68, 2001.
- ZHOU, Q.; IMBE, H.; DUBNER, R.; REN, K. Persistent Fos protein expression after orofacial deep or cutaneous tissue inflammation in rats: implications for persistent orofacial pain. *J Comp Neurol* 412, 276-91, 1999.
- ZHUO M, GEBHART GF. Characterization of descending inhibition and facilitation of spinal nociceptive transmission from the nuclei reticularis gigantocelularis and gigantocellularis pars alpha in rat. *Pain*, 42:337–350, 1990.
- ZHUO, M., GEBHART, G.F. Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J. Neurophysiol.*, 78:746–758, 1997.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)