

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

Luis Felipe Souza da Silva

Envolvimento de circuitos opioidérgicos e GABAérgicos do núcleo magno da rafe e sua conexão com a área parabraquial ventral na modulação das respostas de imobilidade tônica e nociceptiva em cobaias.

Ribeirão Preto – SP
2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Luis Felipe Souza da Silva

Envolvimento de circuitos opioidérgicos e GABAérgicos do núcleo magno da rafe e sua conexão com a área parabraquial ventral na modulação das respostas de imobilidade tônica e nociceptiva em cobaias.

Tese apresentada à área de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Leda Menescal de Oliveira

**Ribeirão Preto – SP
2007**

Sumário

1 - Resumo	4
2 - Abstract	6
3 - Introdução	8
4 – Objetivos Gerais	17
5 - Objetivos específicos	18
6 - Materiais e Métodos	19
6.1 – Animais	19
6.2 - Procedimento Cirúrgico	19
6.3 - Cânula-Guia	20
6.4 - Microinjeção Intraencefálica das Drogas	20
6.5 - Teste de Imobilidade Tônica	20
6.6 - Teste de Vocalização	21
6.7 - Neurotraçamento	22
6.8 - Protocolos Experimentais	24
6.8.1 - Experimento 1.....	24
6.8.2 - Experimento 2.....	25
6.8.3 - Experimento 3.....	27
6.8.4 - Experimento 4.....	28
6.9 - Drogas Utilizadas	28
6.10 - Histologia	29
6.11 - Análise dos Resultados	30
6.12 - Aspectos Éticos	30
7 - Resultados	31
7.1 - Experimento 1	31
7.2 - Experimento 2	44
7.3 - Experimento 3	56
7.4 - Experimento 4	65
8 - Discussão	72
9 - Conclusões	91
10 - Referências Bibliográficas	92
11 – Apêndices	100
Tabelas	100
Artigo	114

1 - Resumo

A imobilidade tônica (IT) é uma resposta defensiva inata, caracterizada por um estado de profunda inatividade física e relativa falta de responsividade ao meio ambiente. Alguns estudos têm demonstrado que os animais submetidos à IT apresentam antinocicepção mediada pela liberação de opióides endógenos. O núcleo magno da rafe (NMR) tem sua função intimamente relacionada com a modulação de respostas antinociceptivas. Evidências apontam para a participação de circuitos GABAérgicos e opioidérgicos do NMR na coordenação de respostas nociceptivas. Além disso, foi demonstrado que a microinjeção de agonistas colinérgicos no NMR promoveram antinocicepção e redução na duração da IT. Alguns trabalhos sugerem que essas respostas mediadas pela estimulação colinérgica do NMR possivelmente dependem de suas conexões com a área parabraquial ventral (PBv). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da interação opioidérgica e GABAérgica no NMR na modulação das respostas de IT e da vocalização induzida pela aplicação de um estímulo elétrico, em cobaias. Além disso, verificar se as respostas comportamentais de IT e antinociceptivas observadas após a estimulação colinérgica do NMR dependem de suas conexões com a PBv.

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a microinjeção de morfina (4,4 nmol/ 0,2 µl) e de bicuculina (0,4 nmol/ 0,2 µl) no NMR, causaram um aumento na duração dos episódios de IT e antinocicepção em cobaias. Por outro lado, a microinjeção de muscimol (0,5 nmol) no mesmo sítio promoveu uma redução na duração da IT e hiperalgesia. Além disso, ambas as respostas produzidas pela administração de morfina no NMR foram bloqueadas pela microinjeção prévia de naloxone (2,7 nmol/0,2 µl) ou muscimol (0,25 nmol) no NMR. Os experimentos realizados com o objetivo de avaliar a conexão funcional entre o NMR e a PBv nas respostas de IT e vocalização demonstraram que a microinjeção de carbacol (CCh) no NMR produziu uma redução na resposta defensiva de IT e antinocicepção.

Além disso, a inativação funcional prévia da área PBv (com lidocaína) bloqueou ambas as respostas mediadas pela microinjeção de CCh no NMR. Esses dados foram reforçados pelos resultados do estudo neuroanatômico, o qual demonstrou a presença de projeções do NMR para a PBv.

Assim, os nossos resultados sugerem que a ativação de receptores opióides no NMR tem uma ação facilitatória na modulação da resposta de IT, enquanto que a neurotransmissão GABAérgica atua inibindo essa resposta. Além disso, a ação dos opióides possivelmente ocorre por meio da inibição de interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos. As alterações comportamentais observadas indicam que o NMR modula tanto respostas comportamentais defensivas quanto nociceptivas, e a existência de tipos celulares funcionalmente distintos fornece um substrato neural que permite um controle bi-direcional das respostas moduladas por essa estrutura. Além disso, verificamos que a antinocicepção e a redução da IT mediadas pela estimulação colinérgica do NMR dependem da conexão do NMR com a área PBv.

2 - Abstract

Tonic immobility (TI) is an inborn defensive response characterized by a state of profound inactivity and a relative lack of responsiveness to the environment. Some studies have demonstrated that animals submitted to the TI shown an opioidergic antinociception. The nucleus raphe magnus (NRM) has been related to the modulation of nociceptive responses and TI. Studies have demonstrated the participation of GABAergic and opioidergics circuits of the NRM in modulation of the nociceptive responses. Moreover, the microinjection of cholinergic agonists into the NRM promoted antinociception and reduced TI duration. Evidences support the idea that parabrachial ventral region (PBv) mediates the antinociception produced by cholinergic stimulation of NRM. The objective of the present study was to investigate the influence of opioidergic and GABAergic interaction of the NRM in the modulation of the TI and nociception in guinea pigs. In addition, we evaluated the participation of NRM-PBv connections in the modulation of nociception and TI during cholinergic stimulation of the NRM.

The results demonstrated that the microinjection of the of th morphine (4,4 nmol/ 0,2 μ l) and bicuculine (0,4 nmol/ 0,2 μ l) into the NRM produced an increase in the duration of TI and antinociception in guinea pigs. Nevertheless, muscimol (0,5 nmol) microinjection into the same site promoted a reduction in TI and pronociception. In addition, both responses promoted by opioid stimulation of the NRM were blocked by previous microinjection of naloxone (2,7 nmol/0,2 μ l) or muscimol (0,25 nmol) into the NMR. In the experiments of participation of the connection between NRM and PBv our results demonstrated that carbachol (CCh) microinjection into the NRM promoted antinociception and reduction of TI. Futhermore, these responses were blocked by previous exclusion (with lidocaine) of PBv. In agreement with our functional findings the neuroanatomical studies using neuronal tracer have shown projections of the NRM to the PBv.

In summary, our results point out toward a facilitatory role of opioidergic neurotransmission in the modulation of TI and nociception in NRM, whereas GABAergic activity plays an inhibitory role. Besides, the opioidergic effect might be due to inhibitory of tonically active GABAergic interneurons. In addition, the changes in the defensive TI behavior and nociception observed in the present study suggest that the NRM modulates both responses in a bidirectional manner, promoting an increase or decrease in the duration of TI and antinociception or pronociception. Moreover, we demonstrated that the antinociception and reduction of TI elicited by cholinergic stimulation of the NRM depend on connections with the PBv.

3 - Introdução

Na natureza, em diversos momentos, os animais deparam-se com situações que ameaçam sua integridade física e sobrevivência, como ocorre no confronto com um predador ou um co-específico. Nessas situações, a execução de respostas comportamentais defensivas adequadas é preponderante para aumentar as chances de sobrevivência do indivíduo durante o confronto. Assim, para lidar com os desafios ambientais, os animais adquiriram durante a história evolutiva meios anatômicos e comportamentais de defesa (GRAEFF, 1994).

As respostas comportamentais defensivas apresentadas podem variar de acordo com alguns fatores, tais como, da distância entre a presa e o predador (RATNER, 1967) e da avaliação do grau de ameaça que cada situação oferece (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Assim, o primeiro nível de defesa ocorre na vigência de um perigo incerto, seja porque a situação apresenta-se nova, ou porque o predador foi encontrado anteriormente no local. Nessas circunstâncias, a presa executa aproximações cautelosas, com o corpo abaixado e estirado, as orelhas levantadas e farejando continuamente. Esse tipo de resposta foi denominada de avaliação de risco (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Após a identificação do perigo (presença do predador) e este estando distante, a resposta apresentada pela presa freqüentemente é o congelamento. Com a redução da distância entre a presa e o predador, a presa normalmente inicia respostas de fuga e, com uma proximidade maior entre os dois, respostas de luta podem ser executadas. Finalmente, após ter sido capturada pelo predador algumas espécies emitirão a resposta de imobilidade tônica (RATNER, 1967; RODGERS; RANDALL, 1987).

A imobilidade tônica (IT) é uma resposta defensiva inata, caracterizada por um estado de profunda inatividade física e relativa falta de responsividade ao ambiente (KLEMM, 1971). A IT aparece como o último recurso utilizado pela presa num esforço extremo pela sobrevivência e tem por objetivo reduzir a probabilidade de manutenção do ataque, já que a

movimentação da presa estimula a sua continuidade. Dessa maneira, o valor adaptativo da IT foi comprovado por observações feitas na natureza por Sargeant e Eberhardt (1975), onde 58% dos patos que apresentaram IT quando atacados por raposas (*Vulpes fulva*) sobreviveram ao ataque inicial, aumentando, assim, suas chances de sobrevivência. Além disso, Thompson et al. (1981), em experimentos realizados em laboratório, também demonstraram o valor adaptativo dessa resposta comportamental, onde a permanência das codornas em IT reduziu o tempo em que os gatos permaneciam atacando. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram ainda que os gatos atacavam com maior frequência codornas que estavam em movimento às codornas que haviam emitido a resposta de IT.

Durante a execução dos comportamentos defensivos é fundamental que ocorra a ativação de sistemas analgésicos endógenos para permitir ao animal a realização dessas estratégias comportamentais de maneira adequada. Nesse sentido, Bolles e Fanselow (1980) sugeriram que a ativação dos mecanismos antinociceptivos representaria parte importante dos sistemas defensivos, já que a diminuição da sensibilidade nociceptiva permitiria que o animal ameaçado executasse as respostas defensivas, como congelamento, fuga, luta e IT, sem o impedimento causado pela motivação de atender a injúria e iniciar respostas recuperativas. Isso é particularmente importante, pois durante encontros com predadores ou co-específicos agressivos, é provável que ocorram lesões corporais. Nesse contexto, a ativação simultânea dos sistemas analgésicos e de defesa é discutida há algum tempo. Assim, alguns trabalhos demonstram a ocorrência de antinocicepção associada a situações que desencadeiam reações de defesa, tais como a detecção de odores de co-específicos estressados (JENSEN; SIMTH, 1982), a presença do predador natural (LESTER; FANSELOW, 1985) e o ato da predação (KROMER; DUM, 1980).

Segundo Rodgers e Randall (1987), apesar da ocorrência de antinocicepção durante as reações de defesa, é improvável que a analgesia associada à resposta de fuga ativa e a

associada à resposta de IT possam ser mediadas de modo semelhante, já que a forma (ativa/passiva) e a função (evitar a captura/reduzir o interesse do predador pela presa) dessas reações de defesa são obviamente muito diferentes. Sendo assim, o tipo de analgesia (opióide ou não-opióide) depende da natureza do estímulo e também da reação defensiva desencadeada. De fato, durante uma resposta de defesa ativa, como a fuga ou luta, a analgesia parece ser do tipo não-opióide, de duração rápida (± 10 min), e durante a IT, uma resposta defensiva passiva, a analgesia seria do tipo opióide, de duração mais prolongada (± 40 min) (RODGERS; RANDALL, 1987).

Nesse sentido, Leite-Panissi et al. (2001) demonstraram que cobaias após serem submetidas a IT apresentavam antinocicepção, que foi demonstrada por um aumento na latência no teste da placa quente e redução no número de lambidas e sacudidas da pata no teste da formalina. Essas respostas antinociceptivas foram bloqueadas pela aplicação prévia de naloxone, evidenciando assim, a participação de peptídeos opióides nesse tipo de analgesia.

O núcleo magno da rafe (NMR) participa intensamente da modulação de respostas nociceptivas, e junto com a formação reticular adjacente constitui o bulbo rostral ventromedial (RVM), uma das regiões constituintes do sistema antinociceptivo endógeno descrito por Basbaum e Fields (1984). A modulação das respostas nociceptivas pelo NMR ocorre por meio de projeções, via funículo dorsolateral, para o corno dorsal da medula espinhal (FIELDS; MALICK; BURSTEIN, 1995; NEWMAN, 1995). Além das projeções para regiões da medula espinhal, foram descritas projeções eferentes do NMR para estruturas do tronco encefálico, tais como a substância cinzenta periaqueductal, o *locus coeruleus*, núcleos noradrenérgicos A5 e A7, núcleo reticular pontino caudal, núcleo reticular parvocelular, núcleo reticular lateral e núcleo reticular bulbar (SIM; JOSEPH, 1992).

O NMR recebe projeções de diversas estruturas do sistema nervoso central, sendo que vale ressaltar as projeções oriundas da substância cinzenta periaquedutal, amígdala, hipotálamo e área para parabraquial (HERMANN et al., 1997), pois tais estruturas participam da modulação das respostas de IT e nociceptivas (BEHBEHANI; FIELDS, 1979; MENESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMANN, 1993; MONASSI; HOFFMANN; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1994, 1997; BASBAUM; FIELDS, 1984; OLIVEIRA; HOFFMANN; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1997).

Fields et al. (1983a) descreveram três classes distintas de neurônios no NMR baseados na correlação temporal entre as alterações na taxa de seus disparos e a execução de reflexos nociceptivos gerados pela estimulação nociva. Sendo assim, as células foram classificadas em células *ON*, *OFF* e neutras. Estudos conduzidos em ratos anestesiados mostram que as células do tipo *OFF* apresentavam pausa na taxa de disparos antes da iniciação do reflexo de retirada da cauda. Já as células do tipo *ON* aumentavam seus disparos pouco antes da ocorrência da retirada da cauda e as células neutras não apresentaram alterações nos seus disparos durante a resposta de retirada da cauda. Posteriormente, esses padrões de atividade das células *ON* e *OFF* do NMR foram relacionadas com a modulação de respostas nociceptivas, sendo que, as células *ON* teriam ação pró-nociceptiva e as células *OFF* ação antinociceptiva (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991).

Além da presença de neurônios funcionalmente distintos no NMR, diversos neurotransmissores participam na modulação da atividade dos neurônios do NMR, sendo responsáveis pelas respostas mediadas por esse núcleo (BASBAUM; FIELDS, 1984; FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991). Entre os neurotransmissores presentes no NMR, podemos destacar o GABA, os opióides endógenos, a serotonina, a neurotensina, entre outros.

A influência dos neurotransmissores GABAérgicos no NMR é amplamente descrita (DROWER; HAMMOND, 1988; HEINRICHER; BARBARO; FIELDS, 1989;

HEINRICHER; KAPLAN, 1991). Bowery, Hudson e Price (1987) demonstraram, por meio de procedimentos autorradiográficos, a presença de sítios de ligação GABAérgicos nessa região. Além disso, estudos demonstraram que a microinjeção no NMR de antagonistas GABAérgicos produziu uma ação antinociceptiva, enquanto que a aplicação de agonistas GABAérgicos facilitou as respostas nociceptivas avaliadas pelos testes de retirada da cauda, placa quente e pressão na pata em ratos (DROWER; HAMMOND, 1988; HEINRICHER; KAPLAN, 1991). Essas observações sugerem que a neurotransmissão GABAérgica possa atuar facilitando a emissão de respostas pró-nociceptivas, visto que a pausa na atividade das células OFF do NMR pela microinjeção de agonistas GABAérgicos remove a maior influência inibitória sobre a transmissão nociceptiva. Por outro lado, um aumento na atividade das células OFF do NMR é causada pela microinjeção de antagonistas GABAérgicos. De fato, Heinricher, Haws e Fields (1991) demonstraram que a aplicação iontoforética de antagonistas GABAérgicos no RVM aboliu a pausa das células OFF induzidas pelo aquecimento da cauda de ratos, produzindo antinocicepção.

Além do GABA, os peptídeos opióides também participam na modulação da atividade de neurônios do NMR, como foi evidenciado pela presença de receptores opióides do tipo μ no NMR, a partir de estudos autorradiográficos (BOWKER; DILTS, 1988). Além disso, a microinjeção de morfina no RVM é responsável pela produção de respostas antinociceptivas, avaliadas por meio de diferentes testes algométricos, demonstrando a participação dos opióides nessas respostas (JONES; GEBHART, 1988; ROSSI; PASTERNAK; BODNAR, 1993; MORGAN; WHITNEY, 2000). Somando-se a esses resultados, a lesão eletrolítica do NMR reduziu a analgesia causada pela aplicação sistêmica de morfina (PROUDFIT; ANDERSON, 1975; CHANCE; KRYNOCK; ROSECRANS, 1978) e a microinjeção de naloxone no NMR reverteu a antinocicepção causada pela administração sistêmica de morfina em ratos (DICKENSON; OLIVERAS; BESSON, 1979; AZAMI; LLEWELYN; ROBERTS,

1982). Como a ação celular dos agonistas opióides é geralmente inibitória (DUGGAN; NORTH, 1983), foi proposto por Fields, Heinricher e Mason (1991) que as respostas antinociceptivas mediadas pela microinjeção de morfina no NMR ocorreriam de maneira indireta, por meio da inibição de interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos, promovendo, assim, a desinibição das células *OFF* e, conseqüentemente, antinocicepção. Isto indica que a inibição das respostas nociceptivas pelo NMR depende da atividade integrada desses neurotransmissores.

A existência de um circuito neuronal semelhante a esse foi descrita por Basbaum e Fields (1984) na substância cinzenta periaquedutal (SCP) para explicar a antinocicepção causada pela microinjeção de opióides nessa estrutura. Da mesma forma, estudos conduzidos por Monassi, Leite-Panissi e Menescal-de-Oliveira (1999) demonstraram que tal circuito também poderia participar na modulação de respostas comportamentais defensivas de IT em cobaias. Sendo assim, a microinjeção de carbacol (agonista colinérgico) e de morfina na SCP ventrolateral promoveu o aumento na duração dos episódios de IT, e essas respostas foram bloqueadas pela aplicação prévia de naloxone (antagonista opióide), indicando que as respostas observadas após a estimulação colinérgica da SCP ventrolateral dependem da liberação de opióides. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram ainda que a microinjeção de muscimol (agonista GABAérgico), no mesmo sítio, numa dose sem efeito *per se*, foi capaz de bloquear o aumento na duração da IT causado pela microinjeção de morfina, enquanto que a microinjeção de bicuculina (antagonista GABAérgico) produziu aumento na duração da IT semelhantes à morfina. Esses resultados indicam que as respostas mediadas pela morfina provavelmente ocorrem por meio da inibição de interneurônios GABAérgicos, causando, assim, a desinibição de neurônios de projeção da SCP ventrolateral responsáveis pela modulação da IT em cobaias. Esses achados em conjunto demonstram que a modulação de IT pela SCP ventrolateral depende da atividade integrada de circuitos colinérgicos, opioidérgicos

e GABAérgicos, que atuam de maneira semelhante ao circuito proposto por Basbaum e Fields (1984) para modulação nociceptiva.

Além disso, a participação dos opióides modulando respostas comportamentais de IT também foi demonstrada no núcleo central da amígdala (LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002). Nesse estudo, verificou-se que a microinjeção de morfina no núcleo central da amígdala promoveu uma redução na duração dos episódios de IT em cobaias, sendo que esse efeito foi bloqueado pela microinjeção prévia de naloxone. Esses resultados apontam para a importância da liberação de opióides na produção das respostas de IT no núcleo central da amígdala.

Apesar da atividade dos neurônios do NMR estar intimamente relacionada com respostas nociceptivas, foi observado que essas células respondem a estímulos inócuos tão intensamente quanto a estímulos nocivos (LEUNG; MASON, 1999; OLIVERAS et al., 1989). Assim, em ratos não anestesiados, as células *ON* foram excitadas enquanto as *OFF* foram inibidas após estímulos auditivos e somáticos inócuos (LEUNG; MASON, 1999; OLIVERAS et al., 1989). Além disso, as células *ON* apresentam maior atividade durante o sono paradoxal e na vigília ativa e são silenciosas durante o sono de ondas lentas, enquanto que, as células *OFF* são mais ativas durante o sono de ondas lentas, apenas esporadicamente na vigília, e silenciosas no sono paradoxal (LEUNG; MASON, 1999). Tais resultados reforçam a idéia de que as células *ON* e *OFF* do NMR modulam outras respostas que não apenas aquelas envolvidas com modulação nociceptiva.

Com relação ao envolvimento do NMR nas repostas comportamentais defensivas, o trabalho de Oleson, Kirkpatrick e Goodman (1980) demonstrou que a estimulação elétrica do NMR de macacos (*Macaca mulatta*) produziu agitação geral, contrações faciais, tremores de membros e posturas agressivas de ameaça. Do mesmo modo, respostas defensivas de fuga e

antinociceção também foram observadas após a estimulação elétrica do NMR de ratos (PRADO; ROBERTS, 1985).

Recentemente, demonstramos que a microinjeção de carbacol no NMR promoveu a redução na duração dos episódios de IT em cobaias, indicando, assim, uma possível participação desse núcleo na modulação da resposta de IT (SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2006). Nesse mesmo trabalho, foi observada também a ocorrência de antinociceção mediada por microinjeção de CCh no NMR e avaliada pelo teste de vocalização em cobaias.

A produção de antinociceção causada pela microinjeção de CCh no NMR havia sido descrita anteriormente; porém, com a utilização de outros modelos experimentais e animais (BRODIE; PROUDFIT, 1984; BRODIE; PROUDFIT, 1986; NUSEIR; HEIDENREICH; PROUDFIT, 1999). Alguns estudos indicaram, ainda, que essa analgesia causada pela estimulação colinérgica do NMR era dependente da ativação de neurônios noradrenérgicos. De fato, Brodie e Proudift (1986) demonstraram que a hipalgesia provocada pela microinjeção de CCh no NMR era bloqueada pela aplicação no espaço sub-aracnóide da medula espinhal de antagonista α_2 -noradrenérgico. Como o NMR não possui neurônios noradrenérgicos, essas respostas provavelmente dependem de conexões deste com núcleos noradrenérgicos presentes no tronco encefálico. Nesse contexto, foi demonstrado que a analgesia provocada pela microinjeção de CCh no NMR poderia ser bloqueada pela microinjeção de tetracaína ou cloreto de cobalto no grupo de células catecolaminérgicas da região A7 (NUSEIR; HEIDENREICH; PROUDFIT, 1999). O grupo celular A7 consiste de um conjunto de neurônios que se localizam no terço caudal da ponte, ventralmente à extremidade ventral do pedúnculo cerebelar superior. Essa área, formada pelo grupo celular A7 e que inclui, ainda, um sub-núcleo da parabraquial, denominado de Kölliker-Fuse (KF), foi designado no presente trabalho de área parabraquial ventral (PBv).

Como descrito anteriormente, a antinocicepção causada pela microinjeção de CCh no NMR depende de projeções para a PBv. Contudo, a microinjeção de CCh no NMR também foi capaz de promover alterações na duração das respostas de IT (SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2006), de modo que podemos supor que essas modificações comportamentais também possam depender da ativação de neurônios noradrenérgicos presentes na área parabraquial ventral. Sabe-se que a ocorrência de IT está relacionada a uma inibição dos movimentos, o que envolve uma regulação na atividade dos motoneurônios do corno ventral da medula espinhal, e a modulação desses é de suma importância na manutenção dos episódios de IT. Neste sentido, alguns estudos demonstraram a presença de projeções da área A7 para os motoneurônios do corno ventral da medula espinhal (LYONS; GRZANNA, 1988; LYONS; FRITSCHY; GRZANNA, 1989), sugerindo um possível envolvimento dessa região no controle motor.

4 – Objetivos Gerais

Tendo em vista que os neurônios GABAérgicos e opioidérgicos podem atuar de maneira integrada na modulação das respostas comportamentais de IT e nociceptivas, e que esses neurônios estão amplamente envolvidos na modulação da atividade de neurônios do NMR, o presente estudo teve por objetivo avaliar a participação desses circuitos no NMR na modulação de respostas comportamentais defensivas de IT e nociceptivas. Além disso, com base na evidência de que a conexão entre o NMR e a área PBv é importante para as antinocicepção mediada pela estimulação colinérgica do NMR, avaliamos ainda se a conexão NMR-PBv poderia ser importante para as respostas comportamentais e antinociceptivas observadas após a estimulação colinérgica do NMR de cobaias.

5 - Objetivos específicos

- avaliar a influência da interação opioidérgica e GABAérgica no NMR na modulação das respostas de imobilidade tônica em cobaias;
- estudar a influência da interação opioidérgica e GABAérgica do NMR na modulação da nocicepção avaliada pela resposta de vocalização eliciada por um estímulo nocivo periférico em cobaias;
- verificar se as respostas comportamentais de IT e antinociceptivas observadas após a estimulação colinérgica do NMR dependem de suas conexões com a PBv.
- estudar em cobaias uma possível conexão neuroanatômica entre o NMR e a PBv, por meio da utilização de traçadores neuronais.

6 - Materiais e Métodos

6.1 – Animais

No presente estudo utilizaram-se cobaias machos (*Cavia porcellus*) pesando entre 400-500 g, fornecidas pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em grupos de cinco em caixas acrílicas (56 x 37 x 39 cm) forradas com maravalha e com livre acesso à água e comida. A temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclos de 12/12h de claro/escuro) foram controladas.

6.2 - Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de cetamina (40 mg/Kg) com xilazina (5 mg/kg), sendo feita, em seguida, a tricotomia da cabeça, que foi fixada no aparelho estereotáxico Davids-Kopff (Instruments, USA) para animais de pequeno porte. Posteriormente, injetou-se na região subcutânea dorsal da cabeça, 0,3 ml de lidocaína a 2 % com vasoconstritor (noradrenalina) para redução da sensibilidade dolorosa e do sangramento local. Na seqüência, fez-se assepsia da pele e foi retirado um escalpo de pele para exposição da calota craniana, e uma nova assepsia foi feita na calota exposta, com água oxigenada a 10 % e álcool iodado.

Após a exposição da calota craniana, foram feitos dois orifícios com o auxílio de uma pequena broca acoplada a um motor elétrico. Em um dos orifícios rosqueou-se um parafuso com a finalidade de fixar o capacete de acrílico e o outro orifício teve como finalidade permitir a introdução da cânula-guia. A extremidade inferior da cânula-guia foi posicionada a 2 mm acima da estrutura alvo, e sua fixação fez-se com auxílio de uma prótese de acrílico autopolimerizável que abarcou o parafuso rosqueado na superfície óssea. O período de recuperação dos animais foi de 6 a 7 dias no Biotério do Departamento de Fisiologia.

6.3 - Cânula-Guia

As cânulas-guias foram confeccionadas a partir de segmentos da agulhas hipodérmicas com 0,6 mm de diâmetro externo, 14 mm de comprimento para canulação da PBv e 18 mm de comprimento para a canulação do NMR. O implante foi realizado usando as respectivas coordenadas do Atlas de Rössner (1965) para cobaias:

Núcleo Magno da Rafe: AP = + 16,5 mm a partir do bregma; L = 0,0 mm a partir da linha média e P = -0,4 mm a partir da barra auricular.

Área Parabraquial Ventral: AP = + 9,8 mm a partir do bregma; L = 2,4 mm a partir da linha média e P = + 1,8 mm a partir da barra auricular.

6.4 - Microinjeção Intraencefálica das Drogas

A aplicação das drogas foi feita com o auxílio de uma seringa Hamilton (10,0 µl) conectada por meio de um segmento de polietileno de aproximadamente 45 cm (PE10), a uma agulha dental (Mizzi, USA) de 20 ou 15 mm de comprimento (dependendo da estrutura alvo) e 0,3 mm de diâmetro externo. Esse comprimento da agulha permitiu que a mesma ultrapassasse a cânula-guia e atingisse a área encefálica em estudo.

Para a realização da microinjeção, parte do polietileno foi preenchido com a solução contendo a droga utilizada e a outra parte, inclusive a microsseringa, com salina tendo uma bolha de ar intercalando as duas colunas líquidas. A microinjeção foi efetuada em um período de 60 segundos, e a agulha permaneceu no local por mais 40 segundos para evitar o refluxo da solução injetada durante a sua retirada.

6.5 - Teste de Imobilidade Tônica

Os episódios de IT foram realizados no período da manhã, em uma sala semi-escura, com ruído de fundo (ar condicionado ligado) e, antes do início das sessões de IT, o animal

permaneceu na sala por, pelo menos, 20 minutos para habituação e redução do estresse ambiental. Cada animal foi submetido a 5 episódios de IT, por sessão experimental.

Inicialmente, os animais foram submetidos ao teste de susceptibilidade à imobilidade tônica. Para a indução da resposta de IT, a cobaia foi apreendida pelo dorso e submetida à inversão postural (decúbito dorsal) seguida por contenção manual, a qual perdurou até o animal cessar os movimentos de resistência ao procedimento. Nesse momento, foram retiradas as mãos de cima da cobaia e cronometrou-se a duração do episódio de IT, onde o término do episódio foi determinado pelo retorno da cobaia à sua postura habitual sobre as quatro patas. Consideravam-se susceptíveis apenas os animais em que a duração média dos 5 episódios de IT foi superior ou igual a 40 segundos, sendo esses, os animais que foram operados. Após o período de recuperação do processo cirúrgico cada animal foi submetido a novas sessões de IT.

6.6 - Teste de Vocalização

O teste de vocalização vem sendo utilizado em nosso laboratório e tem se mostrado adequado à avaliação de respostas nociceptivas em cobaias (MENESCAL-DE-OLIVEIRA; LICO, 1977; MENESCAL-DE-OLIVEIRA; LICO, 1982; MENESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMANN; 1993). Nesse teste aplicou-se um estímulo agudo periférico nocivo (choque elétrico aplicado na região subcutânea da coxa do animal), que induziu a resposta de vocalização, a qual foi interpretada como manifestação de dor. Essa vocalização foi captada por um microfone conectado a um dos canais do polígrafo, que fez a conversão dessa resposta para um registro poligráfico.

Para realização do teste, implantamos na região subcutânea da coxa um par de eletrodos de aço-inox, não isolados, com 0,3 mm de diâmetro e 15 mm de comprimento. Em seguida, a cobaia foi contida numa caixa de acrílico preenchida com espuma de nylon, na qual

permaneceu sem nenhuma manipulação por um período de 20 minutos, para habituação à situação experimental.

Após o período da habituação, os animais foram submetidos à estimulação nociva periférica, que consistiu de pulsos elétricos com frequência de 100 Hz, 5 ms de duração e com intensidade variada de 0,5 a 4,0 V aplicados na região subcutânea da coxa. Os estímulos foram aplicados inicialmente numa intensidade de 0,5 volts, sendo esta aumentada progressivamente de 0,5 em 0,5 volts até ocorrer a resposta de vocalização (limiar). Tendo se estabelecido a menor intensidade de estímulo necessária para obtenção da resposta de vocalização, mais duas estimulações subseqüentes foram feitas para o registro da linha de base (registro controle). Após a obtenção da linha de base, microinjetaram-se as drogas na estrutura em estudo e registrou-se a amplitude da vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo nos intervalos de tempo de 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após a microinjeção.

O registro da vocalização decorrente do estímulo nocivo foi realizado com o auxílio de um microfone Aiwa DM-64. Este foi conectado a um pré-amplificador (Bioelectric Preamplifier RB-5) num dos canais do polígrafo (Nihon Kohden), que converteu a vocalização em um sinal elétrico para registro das respostas de vocalização. A amplitude dos picos do registro gráfico foi proporcional à intensidade da vocalização do animal. Desse modo, a média dos picos de cada resposta representou um índice confiável da magnitude da vocalização interpretada como manifestação de dor. Nos nossos registros poligráficos a velocidade do papel foi de 5 mm/seg.

6.7 - Neurotraçamento

Para realização do neurotraçamento, as cobaias receberam um implante de uma cânula-guia de aço inoxidável direcionada para o NMR. A cânula-guia foi introduzida verticalmente, usando-se as coordenadas descritas anteriormente, concernentes ao núcleo

magno da rafe. Após o implante da cânula-guia um volume de 0,2 µl do neurotraçador diluído em tampão fosfato foi microinjetado no tecido neural com o auxílio de uma seringa Hamilton (10,0 µl) conectada, por meio de um segmento de polietileno de aproximadamente 45 cm (PE10), a uma agulha dental (Mizzi, USA). A microinjeção foi realizada em um período de 60 segundos, e a agulha permaneceu no local por mais 120 segundos, para evitar o refluxo da solução injetada. Passados 4 dias de pós-operatório, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico e perfundidos por via intracárdica com salina tamponada, seguida de paraformaldeído a 4%, diluído em tampão fosfato a 0,1M com pH 7,4. Após a fixação, o encéfalo foi removido do crânio e armazenado por 4 horas na solução fixadora a uma temperatura de 4°C. Após esse período, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose a 30%, onde permaneceram por dois dias. Em seguida, os encéfalos foram congelados e secções frontais de 40-50 µm de espessura foram processadas com o auxílio de um criostato. Os cortes coletados foram depositados em placas de acrílico, confeccionadas para a técnica de “free floating”, preenchidas com solução de tampão fosfato a 0,1M, pH 7,4. Antes do processamento histoquímico para a marcação com biodextran, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por pré-incubação do material em soluções alcoólicas de concentrações variadas (50%, 70%, 50%) por 15, 20 e 15 min, respectivamente. Na seqüência, os cortes foram lavados três vezes em solução de tampão fosfato a 0,1M, pH 7,4 e incubados em solução ABC (Kit Elite Vectastain ABC, Vector Laboratories, Inc. 1997, Burlingame, Califórnia, USA), durante 2 horas sob agitação e a temperatura ambiente para proporcionar uma melhor visualização da marcação pelo BDA. Após esse período, os cortes foram lavados três vezes em tampão fosfato a 0,1M, pH 7,4 e incubados para visualização da peroxidase, usando como cromógeno o di-hidrocloreto diaminobenzidina (DAB). Os cortes foram incubados por 10 minutos sob agitação a 4°C, em local com pouca luminosidade, em uma solução contendo 50 mg de DAB, 2,5 ml de cloreto de cobalto (CoCl₂ . 6H₂O) e 2,0 ml

de sulfato de níquel amoniacal $[(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$ em 100 ml de tampão fosfato a 0,1M, pH 7,4. Após essa incubação, foi adicionada água oxigenada (H_2O_2) a 0,001% à solução contendo os cortes. Finalmente, as secções foram lavadas por no mínimo três vezes, em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, montadas entre lâminas e lamínulas de vidro, gelatinizadas, e coradas pelo método de Nissl.

6.8 - Protocolos Experimentais

6.8.1 - Experimento 1: Estudo da microinjeção de agonistas e antagonistas opioidérgicos e GABAérgicos no núcleo magno da rafe na modulação da resposta de IT.

Nesse protocolo experimental, verificou-se os efeitos dos agonistas e antagonistas opioidérgicos e GABAérgicos, quando microinjetados no NMR na modulação da resposta comportamental de IT. Assim, após o período de recuperação da cirurgia (5-7 dias), os animais dos diferentes grupos experimentais foram submetidos a novas sessões experimentais de IT em dias consecutivos. No primeiro dia, a agulha injetora foi introduzida na cânula-guia; porém, nenhuma droga foi microinjetada e, após a retirada da agulha, os animais foram submetidos a 5 episódios de IT. Esse procedimento teve por objetivo verificar o efeito da cirurgia “*per se*” na resposta de IT. No dia seguinte, os animais receberam microinjeções das drogas em estudo e, após 1 minuto, foram submetidos a 5 manobras para indução da IT. Os animais foram divididos em dez grupos experimentais, descritos na seqüência.

Grupos Experimentais

Grupo 1: animais pré-tratados com salina 0,9 % (0,2 µl), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 2: animais pré-tratados com morfina (2,2 nmol/ 0,2 µl), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 3: animais pré-tratados morfina (4,4 nmol/ 0,2 µl), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 4: animais pré-tratados com naloxone (2,7 nmol/ 0,2 µl) seguido por morfina 4,4 nmol (dez minutos após), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 5: animais pré-tratados com naloxone (2,7 nmol/ 0,2 µl) seguido por salina 0,9 % (dez minutos após), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 6: animais pré-tratados com bicuculina (antagonista GABAérgico, 0,2 nmol/ 0,2 µl), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 7: animais pré-tratados com bicuculina (antagonista GABAérgico, 0,4 nmol/ 0,2 µl), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 8: animais pré-tratados com muscimol (agonista GABAérgico, 0,25 nmol/ 0,2 µl), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 9: animais pré-tratados com muscimol (agonista GABAérgico, 0,5 nmol/ 0,2 µl), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

Grupo 10: animais pré-tratados com muscimol (agonista GABAérgico, 0,25 nmol/ 0,2 µl) previamente à morfina 4,4 nmol (dez minutos após), sendo em seguida submetidos aos episódios de IT.

6.8.2 - Experimento 2: Estudo do efeito da microinjeção de agonistas e antagonistas opioidérgicos e GABAérgicos no núcleo magno da rafe na modulação da resposta de vocalização produzida por um estímulo nocivo periférico em cobaias.

Nesse grupo experimental, verificou-se o efeito dos agonistas e antagonistas opioidérgicos e GABAérgicos, microinjetados no NMR na nocicepção, avaliado pelo teste de vocalização em cobaias. Apesar de alguns estudos terem avaliado a participação do NMR na modulação de respostas nociceptivas, nenhum deles utilizou como método algométrico o

teste de vocalização e nem mesmo cobaias como animal experimental. O teste de vocalização caracteriza-se pela aplicação de um estímulo nocivo periférico, o qual elicia uma resposta de vocalização no animal, que é interpretada como manifestação de dor. A resposta de vocalização denota a participação do componente afetivo-motivacional da sensação dolorosa e depende preponderantemente da ativação de estruturas supra-espinhais e do sistema límbico.

Grupos Experimentais

Nesses grupos experimentais os animais, após o período de recuperação da cirurgia (5-7 dias), receberam a microinjeção da droga em estudo e, em seguida, foram submetidos à realização do teste algesimétrico de vocalização (descrito anteriormente).

Grupo 1: animais receberam microinjeção de salina.

Grupo 2: animais receberam microinjeção de morfina (2,2 nmol/ 0,2 µl).

Grupo 3: animais receberam microinjeção de morfina (4,4 nmol/ 0,2 µl).

Grupo 4: animais receberam microinjeção de naloxone (2,7 nmol/ 0,2 µl) seguido de morfina (4,4 nmol/ 0,2 µl).

Grupo 5: animais receberam microinjeção de naloxone (2,7 nmol/ 0,2 µl) seguido de salina 0,9 % (0,2 µl).

Grupo 6: animais receberam microinjeção de bicuculina (0,2 nmol/ 0,2 µl).

Grupo 7: animais receberam microinjeção de bicuculina (0,4 nmol/ 0,2 µl).

Grupo 8: animais receberam microinjeção de muscimol (0,25 nmol/ 0,2 µl).

Grupo 9: animais receberam microinjeção de muscimol (0,50 nmol/ 0,2 µl).

Grupo 10: animais receberam microinjeção de muscimol (0,25 nmol/ 0,2 µl) seguido de morfina (4,4 nmol/ 0,2 µl).

6.8.3 - Experimento 3: Estudo funcional da conexão entre NMR e a área PBv modulando respostas comportamentais de IT e nociceptivas.

Esse experimento teve por objetivo verificar se as respostas comportamentais de IT e antinociceptivas, mediadas pela estimulação colinérgica do NMR, dependiam de conexões entre o NMR e a PBv. Para isso, utilizamos a lidocaína como ferramenta para a inativação funcional da PBv durante a estimulação colinérgica do NMR.

Nesses grupos experimentais, os animais foram operados para o implante da cânula-guia e, após o período de recuperação (5 – 7 dias), foram submetidos ao teste de IT ou ao teste de vocalização após a microinjeção das drogas em estudo. Os protocolos experimentais utilizados para o teste de IT e de vocalização foram descritos anteriormente. Sendo que, nesse protocolo, os animais eram portadores de uma cânula-guia localizada no NMR (parâmetros já descritos) e outras duas bilateralmente na área PBv. Os parâmetros para o a área PBv foram: AP = + 9,8 mm a partir do bregma, L = + 2,4 mm partindo da linha média e P = + 1,8 a partir da barra auricular.

Grupos Experimentais

Grupo 1: animais que receberam microinjeção de salina na PBv e, dez minutos após, salina no NMR e foram submetidos aos episódios de IT.

Grupo 2: animais que receberam microinjeção de salina na PBv e, dez minutos após, CCh no NMR e foram submetidos aos episódios de IT.

Grupo 3: animais que receberam microinjeção de lidocaína na PBv e, dez minutos após, CCh no NMR e foram submetidos aos episódios de IT.

Grupo 4: animais que receberam microinjeção de lidocaína na PBv e, dez minutos após, salina no NMR e foram submetidos aos episódios de IT.

Grupo 5: animais que receberam microinjeção de salina na PBv e, dez minutos após, salina no NMR e foram submetidos ao teste de vocalização.

Grupo 6: animais que receberam microinjeção de salina na PBv e, dez minutos após, CCh no NMR e foram submetidos ao teste de vocalização.

Grupo 7: animais que receberam microinjeção de lidocaína na PBv e, dez minutos após, CCh no NMR e foram submetidos ao teste de vocalização.

Grupo 8: animais que receberam microinjeção de lidocaína na PBv e, dez minutos após, salina no NMR e foram submetidos ao teste de vocalização.

6.8.4 - Experimento 4: Estudo neuroanatômico da conexão entre NMR e a área PBv.

Esse estudo teve por objetivo verificar a existência de uma possível conexão neuroanatômica entre o NMR e a PBv de cobaias. Para tanto, os animais receberam microinjeções do neurotraçador bi-direcional ou eminentemente anterógrado, dextran amina biotinizada de peso molecular 3.000 (BDA: 3.000) ou 10.000 (BDA: 10.000 P.M.; Molecular Probes), respectivamente, no núcleo magno da rafe.

Grupos Experimentais

Grupo 1: animais que receberam microinjeção de BDA 3.000 no NMR.

Grupo 2: animais que receberam microinjeção de BDA 10.000 no NMR.

6.9 - Drogas Utilizadas

Experimento 1 e 2: utilizaram-se o sulfato de morfina, (agonista opioidérico, Sigma), o hidrocloreto de naloxone (antagonista preferencial μ -opioide, Sigma), a metil-bicuculina (antagonista GABAérgico, Sigma) e o muscimol (agonista GABAérgico, Sigma) dissolvidos em salina a 0,9%, que foi utilizada como controle das drogas utilizadas.

Experimento 3: utilizaram-se o CCh (agonista colinérgico) dissolvido em salina a 0,9% e lidocaína a 2,0% (anestésico local).

Experimento 4: utilizaram-se neurotraçadores bi-direcional, não fluorescente, a dextran amina biotinizada de peso molecular 3.000 (BDA: 3.000 P.M.; Molecular Probes) e anterógrado, a dextran amina biotinizada de peso molecular 10.000 (BDA: 10.000 P.M.; Molecular Probes), na concentração de 10%, diluídos em de tampão fosfato a 0,01M com pH 7,4.

As doses utilizadas foram de 2,2 e 4,4 nmol para a morfina e de 2,7 nmol para o naloxone, de 0,2 e 0,4 nmol para a bicuculina, de 0,25 e 0,5 nmol para o muscimol e de 0,65 e 2,7 nmol para o CCh. Todas as drogas foram diluídas em salina a 0,9 %.

As doses utilizadas inicialmente nos experimentos acima referidos foram obtidas com base em dados da literatura (SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2006; MONASSI; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1999; MORGAN; WHITNEY, 2000).

6.10 - Histologia

Com o término dos experimentos, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/Kg, ip) e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução fisiológica, para remoção do sangue. Em seguida, fez-se a perfusão com formol a 10 % para fixação dos tecidos. Terminado este procedimento fez-se remoção do encéfalo e seu armazenamento em formol a 10 % por pelo menos 1 dia. Após o período de fixação, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose a 20 % por 2 dias. Em seguida, os encéfalos foram levados ao criostato para realização das secções frontais (40µm de espessura) da região do encéfalo, onde estava localizada a cânula-guia. Os cortes encefálicos foram montados em lâminas e corados pela técnica de Nissl, para posterior análise do local da microinjeção. Só foram analisados os resultados dos animais com histologia positiva para a área estudada.

6.11 - Análise dos Resultados

Os resultados dos grupos de imobilidade tônica foram expressos em valores médios das médias das durações dos 5 episódios de IT de cada animal e erro padrão da média (EPM). Para análise estatística os valores da duração da IT (em segundos), foram analisados por meio de uma análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo pós-teste de Duncan. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Nos experimentos de vocalização, a amplitude dos picos no registro poligráfico da vocalização foi medida em milímetros e a média de cada resposta foi interpretada como uma medida quantitativa da vocalização. Os resultados em milímetros foram transformados em Índice de Vocalização (Ivoc) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Ivoc} = \frac{\text{média de vocalização} - \text{valor da linha de base}}{\text{Valor da linha de base}}$$

Para estatística, realizou-se uma análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) para medidas repetidas, onde as variáveis foram tempo (fator repetido) e tratamento (fator independente), seguido do pós-teste de Duncan. Os dados foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

6.12 - Aspectos Éticos

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo N° 031/2004).

7 - Resultados

7.1 - Experimento 1: Efeito da microinjeção de agonistas e antagonistas, opioidérgicos e GABAérgicos no núcleo magno da rafe sobre a modulação da resposta de IT.

Nesses experimentos verificou-se o efeito dos diferentes tratamentos na modulação da resposta de IT em cobaias. No grupo 1, com o objetivo de se avaliar um possível efeito do veículo (salina) sobre a duração da IT, os animais foram pré-tratados com salina no NMR. A microinjeção de salina não alterou significativamente ($p > 0,05$) a duração dos episódios de IT quando comparados com o controle e o “sham” (Figura 1A). A figura 1B representa os sítios de microinjeção de salina no NMR.

Nos grupos seguintes avaliamos o efeito da microinjeção dos agonistas e antagonistas opióides no NMR sobre duração da resposta de IT. Para tanto, microinjetaram-se diferentes concentrações de morfina (2,2 e 4,4 nmol/0,2 μ l) no NMR. Nossos resultados demonstraram que a microinjeção de morfina na concentração de 2,2 nmol/0,2 μ l não alterou significativamente ($p > 0,05$) a duração da IT (Figura 2A). Por outro lado, a microinjeção morfina na concentração de 4,4 nmol induziu um aumento na duração da resposta de IT (Figuras 3A). A aplicação do ANOVA para medidas repetidas demonstrou haver uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F_{(2,18)} = 7,71$, $p = 0,004$), e a aplicação do pós-teste de Duncan indicou que o aumento na duração da IT causado pela microinjeção de morfina a 4,4 nmol foi diferente das respostas comportamentais de IT do controle e do “sham”. Contudo, os episódios controle e “sham” não foram estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$). Como demonstrado na Figura 4A o aumento na duração da resposta de IT causado pela microinjeção de morfina no NMR foi bloqueado pela microinjeção prévia de naloxone (2,7 nmol) no mesmo núcleo (Figura 4A). A aplicação do ANOVA para medidas repetidas indicou haver diferença estatisticamente significativa entre

os diferentes tratamentos ($F_{(2,18)} = 4,85; p = 0,021$) e o pós-teste de Duncan demonstrou que o tratamento com morfina foi diferente dos demais tratamentos (CONT e NAL + MS) os quais não foram considerados diferentes entre si ($p > 0,05$). Além disso, com o objetivo de verificarmos se o naloxone “per se” produziria algum efeito sobre a resposta de IT, avaliamos o efeito da microinjeção de naloxone seguido por salina (Figura 5A). A microinjeção do naloxone seguido por salina não alterou a duração média da resposta de IT, quando comparado com os grupos controle e “sham” ($p > 0,05$). Os sítios de microinjeção dos grupos descritos anteriormente foram representados nas figuras 1B, 2B, 3B, 4B e 5B.

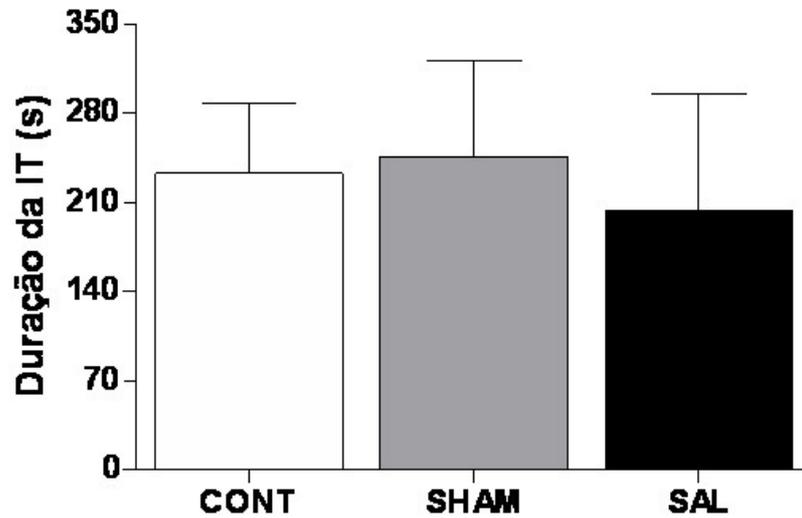
Nos experimentos onde o objetivo foi verificar a participação dos neurotransmissores GABAérgicos na modulação da resposta de IT, observou-se que a microinjeção de 0,2 nmol de bicuculina não alterou significativamente a duração da resposta de IT ($p > 0,05$; Figura 6A). Contudo, a microinjeção do antagonista GABAérgico (bicuculina) na concentração de 0,4 nmol/0,2µl causou um aumento significativo na duração da resposta de IT (ANOVA, $F_{(2,14)} = 25,67; p < 0,001$). A aplicação do pós-teste indicou que a duração da resposta de IT dos animais tratados com bicuculina a 0,4 nmol foi diferente dos demais tratamentos (Figura 7A). As figuras 6B e 7B representam os sítios de microinjeção de bicuculina nas concentrações de 0,2 e 0,4 nmol/0,2 µl no NMR, respectivamente.

Ainda com o objetivo de se verificar o efeito da neurotransmissão GABAérgica do NMR na duração da resposta de IT, novos grupos foram testados após a microinjeção do agonista GABAérgico (muscimol) nas concentrações de 0,25 e 0,5 nmol/0,2 µl na estrutura em estudo. Na Figura 8A, observa-se que a microinjeção de muscimol na dose de 0,25 nmol no NMR não alterou significativamente a duração da resposta de IT quando comparado com os episódios controle e “sham” (ANOVA, $p > 0,05$). Entretanto, a concentração de 0,5 nmol de muscimol foi capaz de causar uma redução significativa na duração da resposta de IT (Figura 9A). A aplicação do ANOVA para medidas repetidas indicou haver uma diferença

significativa entre os grupos ($F_{(2, 14)} = 5,77$; $p = 0,015$), e o pós-teste de Duncan indicou que a duração média da resposta de IT após o tratamento com muscimol na dose de 0,5 nmol foi diferente das médias observadas durante os episódios controle e “sham”. As figuras 8B e 9B representam os sítios de microinjeção de muscimol nas concentrações de 0,25 e 0,5 nmol/0,2 μ l no NMR, respectivamente.

Finalmente, um grupo foi realizado com o objetivo de testar se o aumento na duração da resposta de IT mediado pela microinjeção de morfina no NMR dependia de uma inibição na neurotransmissão GABAérgica, indicando uma relação entre os mecanismos opioidérgicos e GABAérgicos (Figura 10A). Para tal, microinjetou-se no NMR uma dose de muscimol (0,25 nmol) sem efeito “per se” previamente à morfina (4,4 nmol). A microinjeção prévia de muscimol promoveu o bloqueio do aumento na duração da resposta de IT produzida pela morfina. Nesse grupo observaram-se durações médias dos episódios de IT de $220,0 \pm 57,1$ s para o controle, de $217,9 \pm 57,2$ s para o “sham” e de $219,9 \pm 74,1$ s para o tratamento muscimol previamente a morfina, não havendo diferença estatisticamente significativa na duração da resposta de IT entre os diferentes tratamentos (ANOVA, $p > 0,05$). A figura 10B representa os sítios de microinjeção de muscimol previamente à morfina no NMR.

A



B

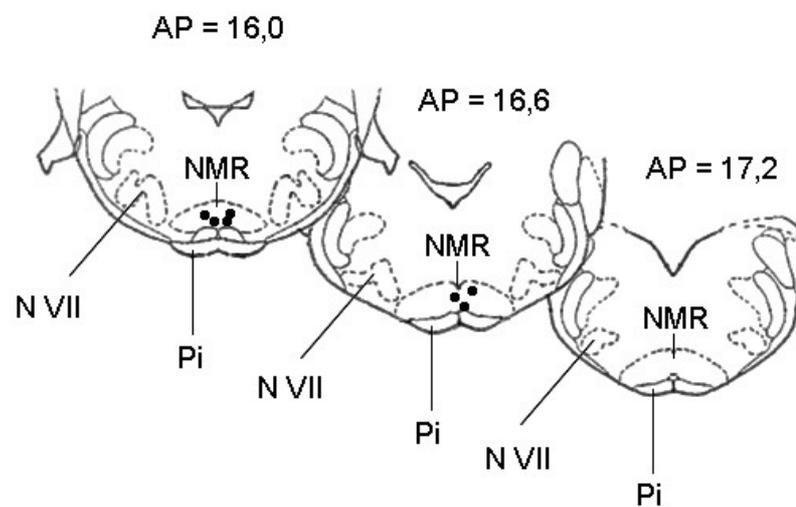
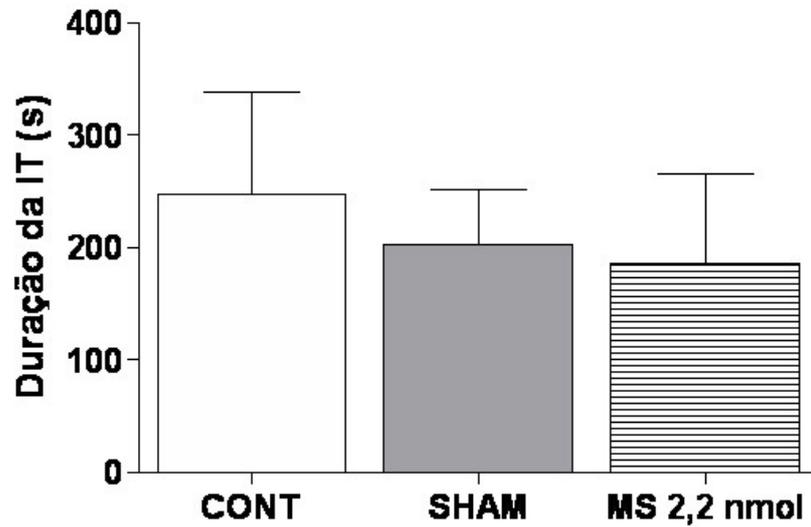


Figura 1: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de salina a 0,9 % (SAL; 0,2 μ l) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 7). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de salina. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

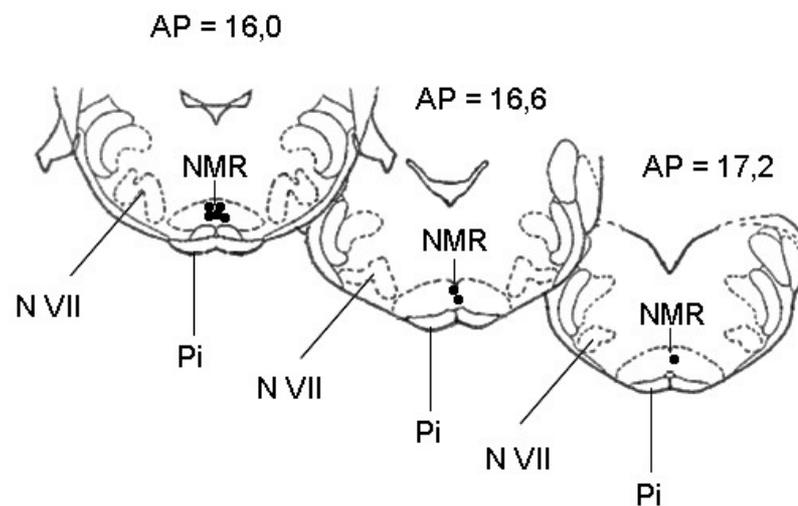


Figura 2: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de morfina (MS 2,2 nmol) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 8). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de morfina 2,2 nmol. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

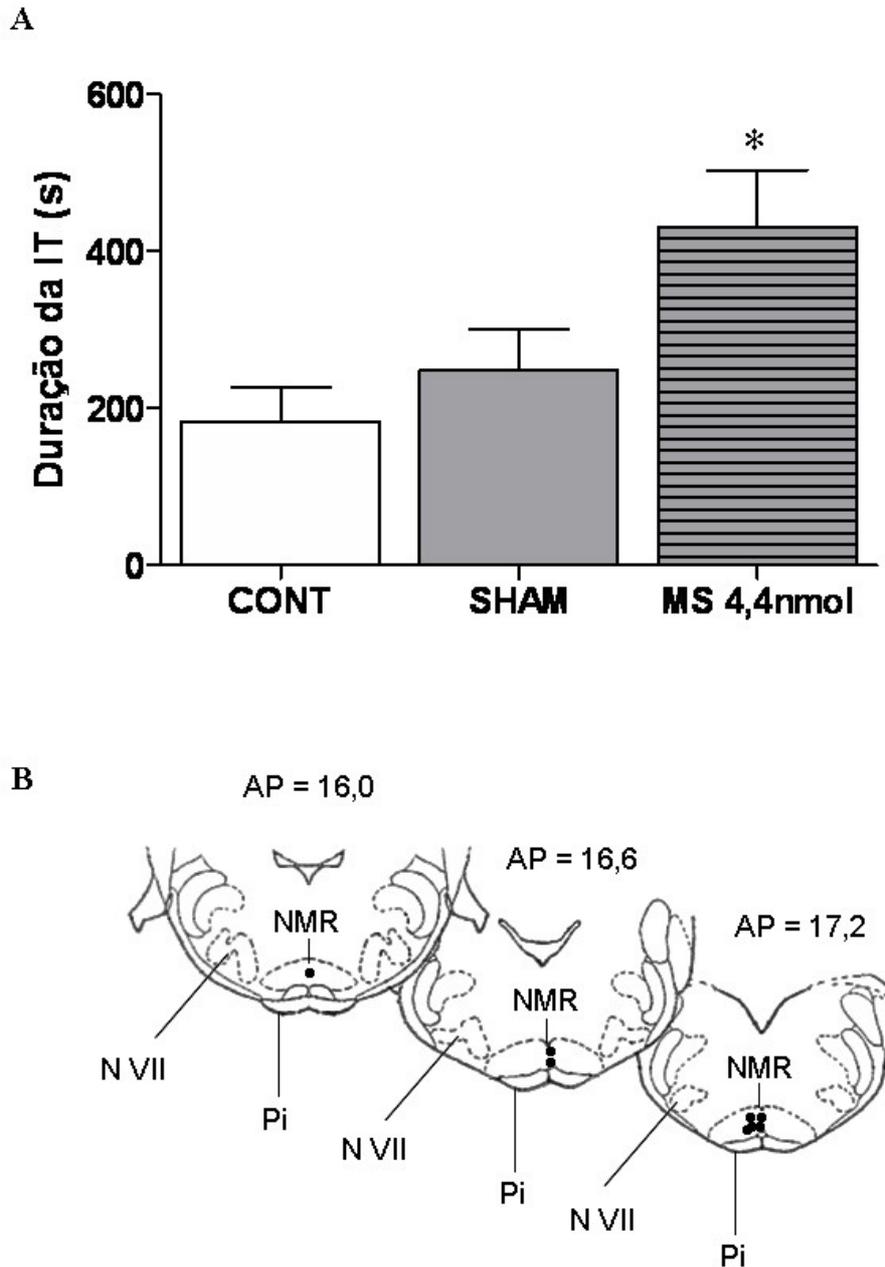
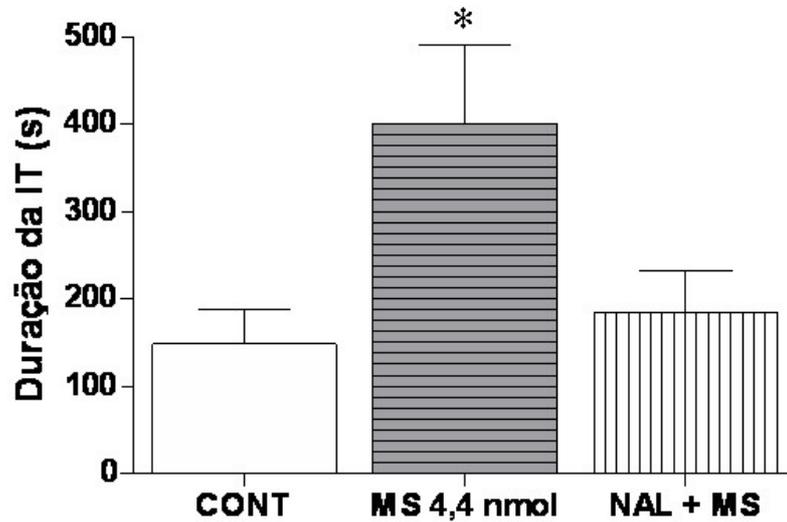


Figura 3: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de morfina (MS 4,4 nmol) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 10). * $p < 0,05$ quando comparado com os tratamentos CONT e SHAM. **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de morfina 4,4 nmol. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

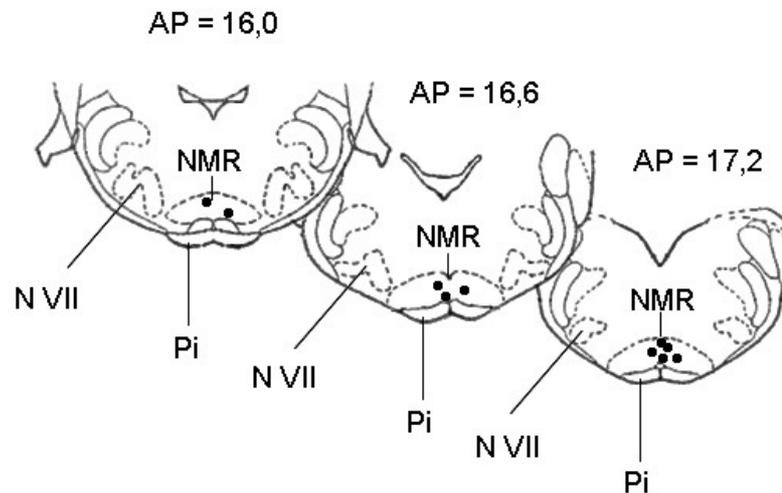
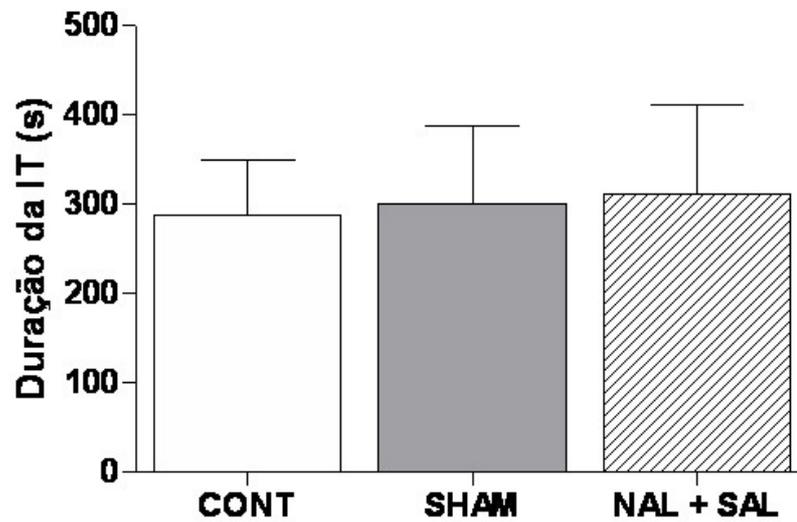


Figura 4: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a microinjeção de morfina (MS 4,4 nmol) e após a microinjeção de morfina (4,4 nmol/0,2 μ l) precedido por naloxone (2,7 nmol/ 0,2 μ l) no NMR (NAL + MS). As barras verticais representam o EPM (n = 10). * $p < 0,05$ quando comparado com os tratamentos CONT e NAL + MS. **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de após a microinjeção de MS 4,4 nmol e após a microinjeção de morfina (4,4 nmol/0,2 μ l) precedido por naloxone (2,7 nmol/ 0,2 μ l) no NMR (NAL + MS). NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

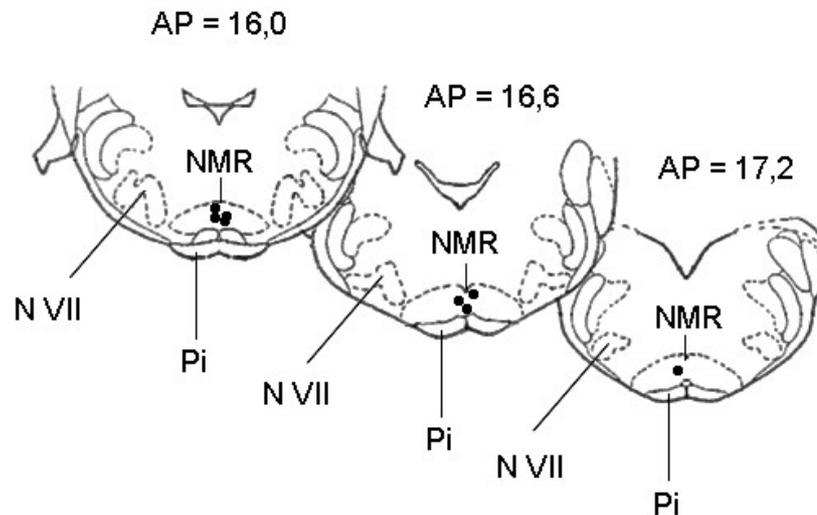
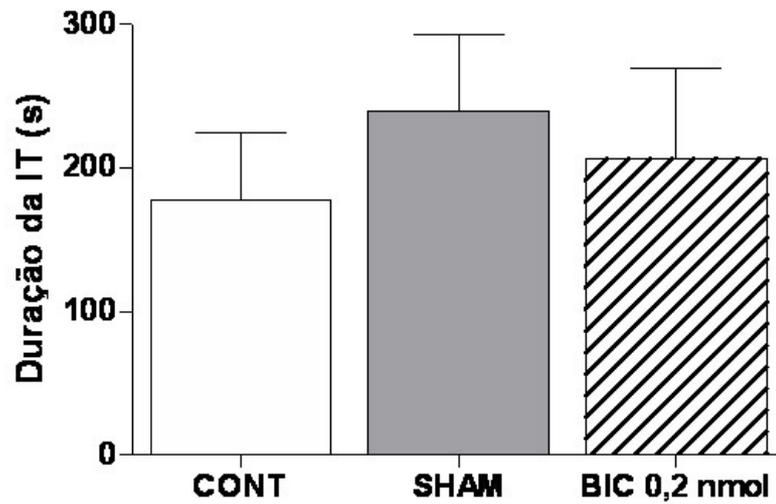


Figura 5: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM), após a microinjeção de naloxone (2,7 nmol/0,2 μ l) seguido por salina 0,9 % (NAL + SAL) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 10). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de NAL seguido por salina 0,9 % (NAL + SAL). NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

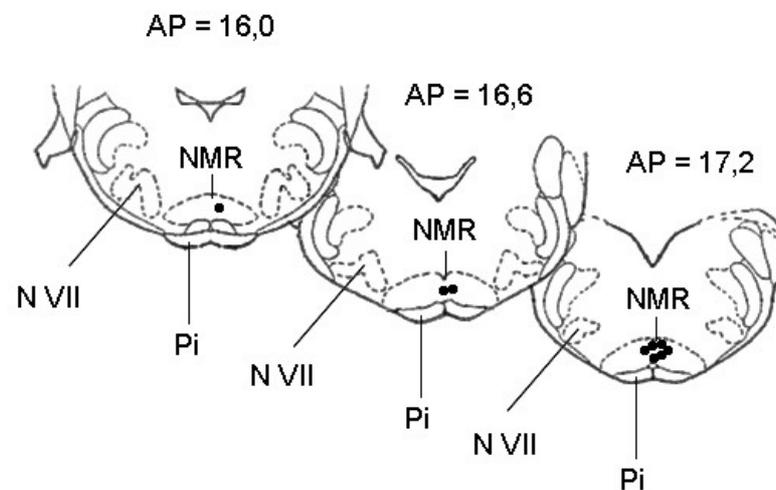
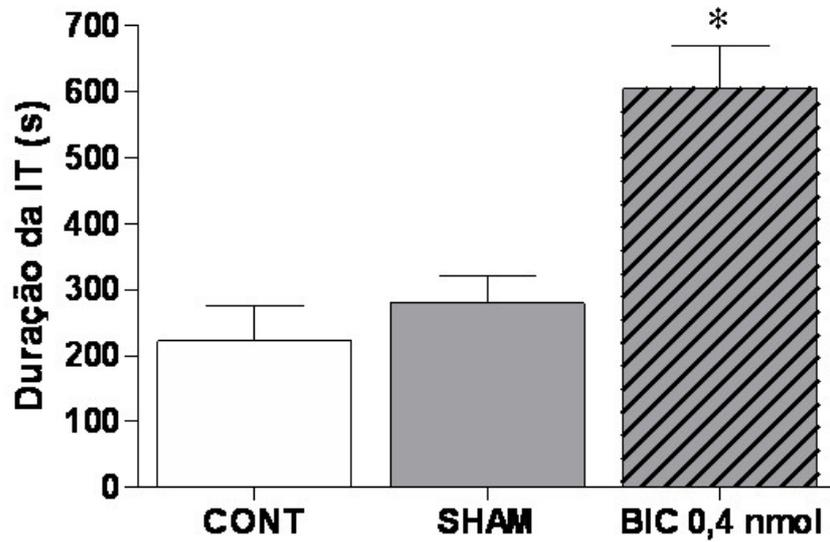


Figura 6: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de bicuculina (BIC 0,2 nmol) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 10). **B** - Desenho esquemático de seções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de BIC 0,2 nmol. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

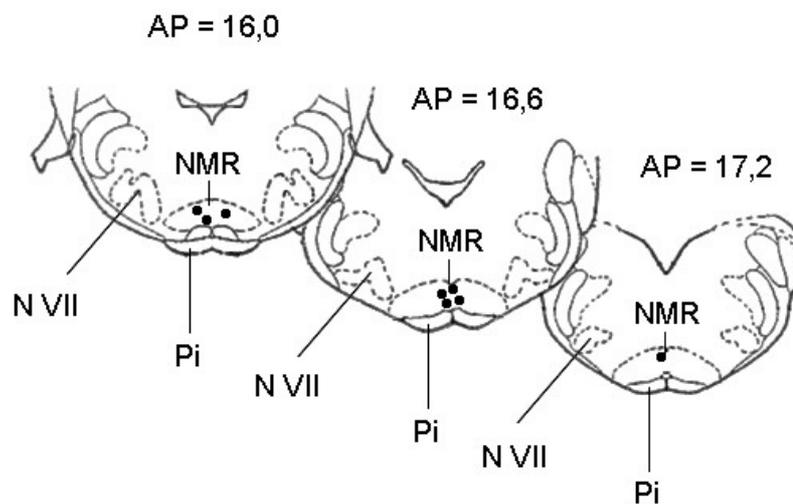
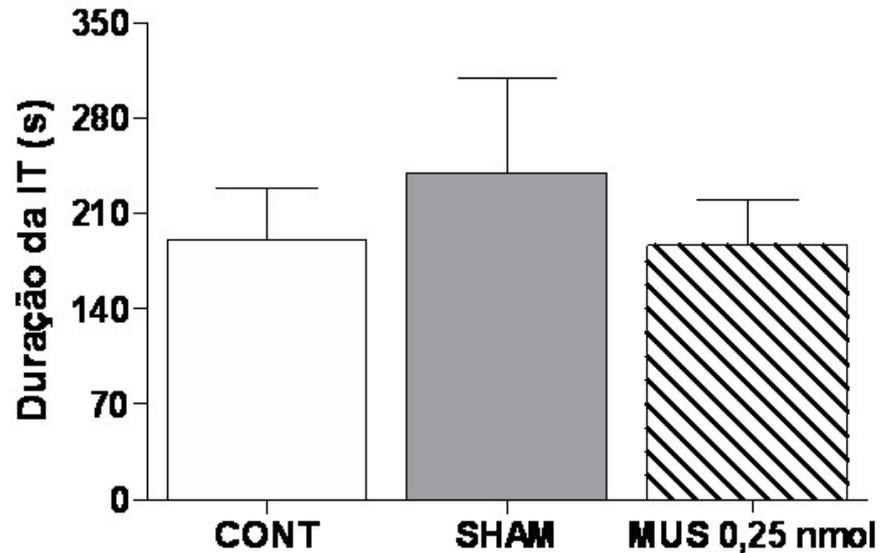


Figura 7: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de bicuculina (BIC 0,4 nmol) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 8). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de BIC 0,4 nmol. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

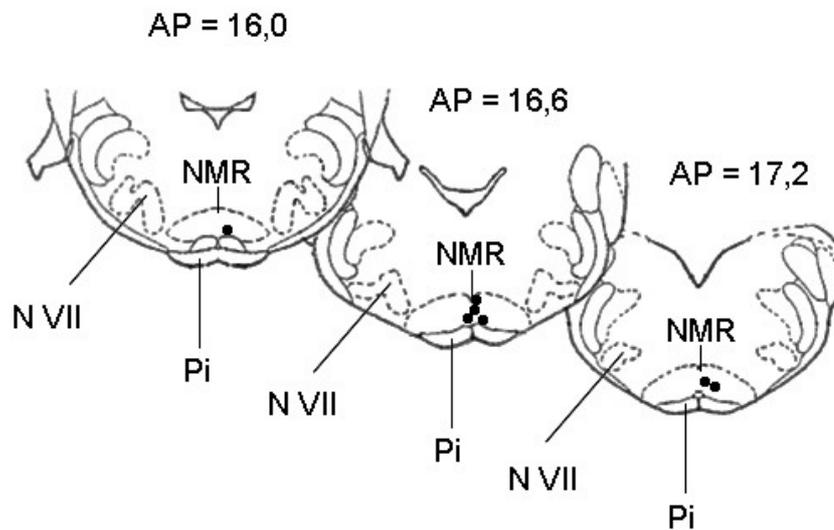
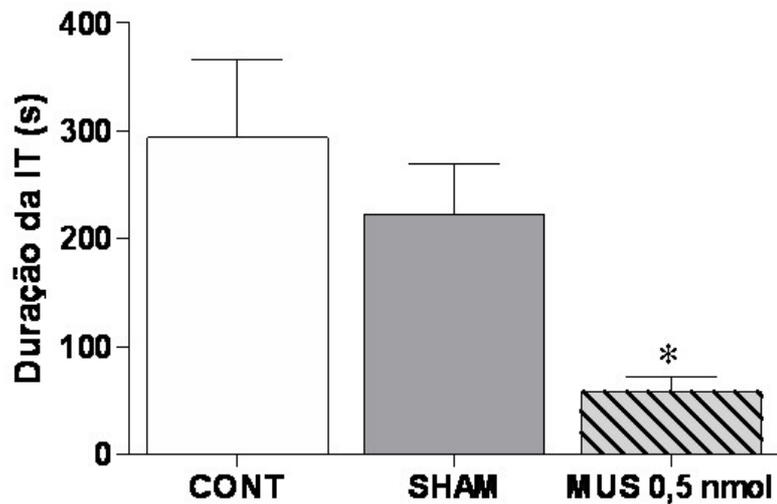


Figura 8: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de muscimol (MUS 0,25 nmol) no NMR. As barras verticais representam o EPM ($n = 7$). **B** – Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de MUS 0,25 nmol. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

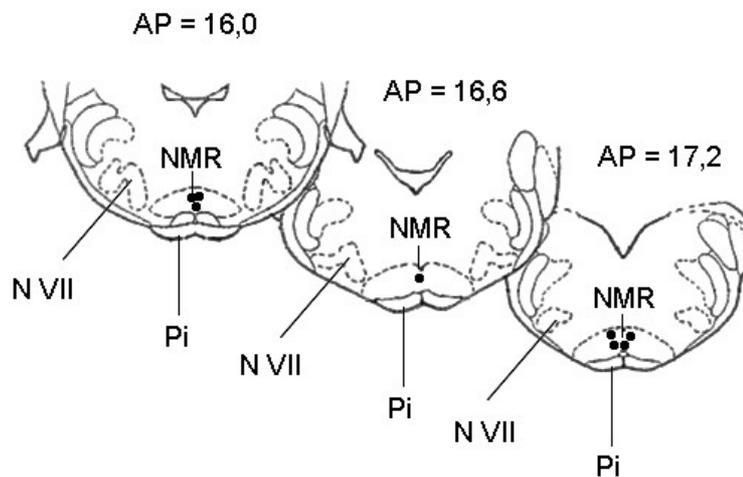
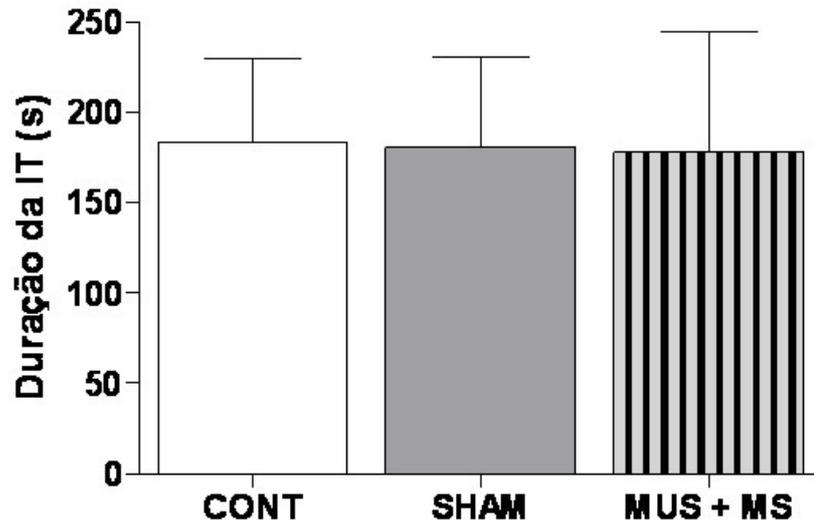


Figura 9: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de muscimol (MUS 0,5 nmol) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 8). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de MUS 0,5 nmol. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

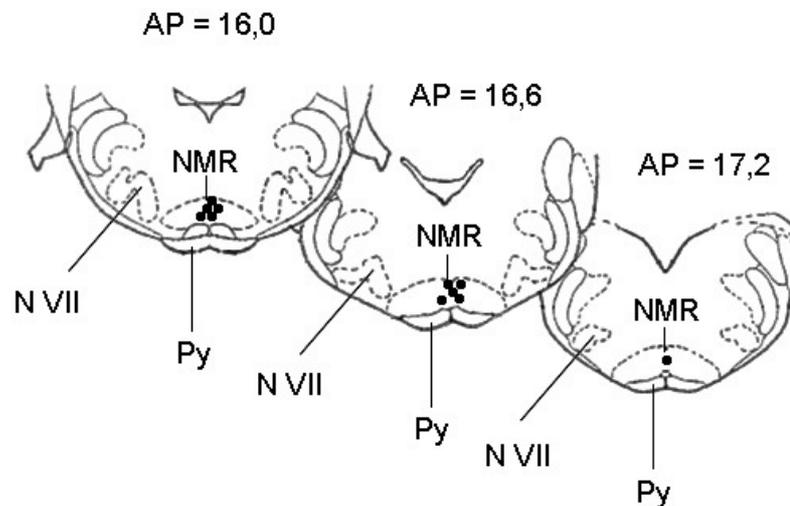


Figura 10: A - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de muscimol (0,25 nmol/ 0,2 μ l) seguido de morfina (4,4 nmol/0,2 μ l; MUS + MS) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 12). B - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de MUS (0,25 nmol/ 0,2 μ l) seguido de MS (4,4 nmol/0,2 μ l; MUS + MS). NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

7.2 - Experimento 2: Efeito da microinjeção de agonistas e antagonistas opioidérgicos e GABAérgicos no núcleo magno da rafe sobre a modulação da resposta de vocalização produzida por um estímulo nocivo periférico em cobaias.

Nesses experimentos, verificou-se o decurso temporal do efeito dos diferentes tratamentos farmacológicos no índice de vocalização. Inicialmente, observou-se que a microinjeção de morfina 4,4 nmol/0,2 µl no NMR promoveu uma redução no índice de vocalização avaliado durante a aplicação do estímulo elétrico nocivo periférico. Essa antinocicepção promovida pela microinjeção de morfina no NMR permaneceu por todo o período experimental e foi bloqueada pela administração prévia de naloxone 2,7 nmol/0,2 µl no mesmo sítio. Além disso, verificou-se que o naloxone, quando microinjetado isoladamente, não alterou a resposta de vocalização (Figura 11). Nesses grupos, a aplicação do two-way ANOVA para medidas repetidas demonstrou haver interação do tempo vs tratamento ($F_{(20, 160)} = 2,156$; $p = 0,005$). A aplicação do pós-teste de Duncan para cada intervalo de tempo indicou que aos 5 minutos o tratamento com morfina 4,4 nmol/0,2 µl foi estatisticamente diferente dos tratamentos salina, morfina a 2,2 nmol e naloxone seguido por salina ($p < 0,05$). Após quinze minutos, o tratamento com morfina a 4,4 nmol foi considerado estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,05$). Nos intervalos de 30 e 45 minutos, a aplicação do pós-teste demonstrou que o grupo tratado com morfina a 4,4nmol foi diferente dos grupos salina, naloxone seguido de morfina e naloxone seguido por salina ($p < 0,05$). No intervalo de tempo de 60, a aplicação do pós-teste de Duncan indicou que o grupo morfina a 4,4 nmol/0,2 µl foi diferente dos grupos salina, morfina a 2,2 nmol e naloxone seguido por salina ($p < 0,05$), mas não foi diferente do grupo onde o naloxone foi injetado previamente à morfina ($p > 0,05$). O grupo tratado com morfina a 2,2 nmol foi estatisticamente diferente do grupo salina no intervalo de 30 min ($p < 0,05$). Na Figura 12, observa-se um exemplo de

registros poligráficos da vocalização de animais representativos dos grupos experimentais acima citados nos intervalos de tempo onde se aplicou o estímulo nocivo periférico.

No segundo protocolo experimental, verificou-se o efeito antinociceptivo da microinjeção de bicuculina nas doses 0,2 e 0,4 nmol/0,2 µl no NMR. A microinjeção de bicuculina na dose de 0,2 nmol/0,2 µl promoveu uma redução no índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico apenas no primeiro intervalo de tempo avaliado (5 min), retornando os índices de vocalização a valores próximos ao controle nos intervalos subsequentes. Entretanto, a microinjeção de bicuculina na dose de 0,4 nmol/0,2 µl no NMR promoveu uma antinocicepção que perdurou por todo o período experimental (60 min; Figura 13). A aplicação do two-way ANOVA indicou haver interação tempo vs tratamento ($F_{(10, 115)} = 2,46; p = 0,010$). A aplicação do pós teste de Duncan demonstrou que aos 5 minutos a bicuculina nas duas concentrações testadas (0,2 e 0,4 nmol/0,2µl) produziu uma redução significativa do índice de vocalização em cobaias quando comparadas com o grupo salina ($p < 0,05$). Nos intervalos de 15 e 30 minutos, o pós-teste indicou que a maior concentração de bicuculina (0,4 nmol) produziu uma redução significativa no índice de vocalização quando comparado com o grupo salina ($p < 0,05$), mas não diferiu do grupo bicuculina a 0,2 nmol ($p > 0,05$). Finalmente, a aplicação do pós-teste de Duncan indicou que o tratamento com bicuculina a 0,4 nmol produziu uma redução significativa no índice de vocalização nos intervalos de 45 e 60 minutos quando comparado com a bicuculina a 0,2 nmol e com a salina ($p < 0,05$). Na Figura 14, observa-se um exemplo de registros poligráficos da vocalização de animais representativos dos grupos experimentais acima citados nos intervalos de tempo em que se aplicou o estímulo nocivo periférico.

No grupo em que foram feitas microinjeções de muscimol nas doses de 0,25 e 0,5 nmol/0,2 µl no NMR, verificamos que a dose de 0,25 nmol de muscimol não alterou o índice de vocalização. Entretanto, a administração do muscimol na dose de 0,5 nmol promoveu uma

hiperalgesia demonstrada pelo aumento do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo periférico (Figura 15). A aplicação do two-way ANOVA indicou haver efeito do tratamento ($F_{(2, 110)} = 4,407$; $p = 0,025$). A aplicação do pós-teste indicou haver diferença estatística dos tratamentos nos intervalos de tempo de 15 e 30 minutos ($p < 0,05$). A aplicação do pós-teste de Duncan nesses intervalos indicou que a microinjeção do muscimol a 0,5 nmol diferiu das demais no intervalo de 15 minutos, enquanto que no intervalo de 30 minutos, o muscimol 0,5 nmol foi diferente apenas dos animais tratados com salina. Nos intervalos de 45 e 60, não houve diferença estatística entre os grupos testados ($p > 0,05$). Na Figura 16, observa-se um exemplo de registros poligráficos da vocalização de animais representativos dos grupos experimentais acima citados nos intervalos de tempo em que se aplicou o estímulo nocivo periférico.

No último grupo, foi observado se a antinocicepção produzida pela morfina a 4,4 nmol/0,2 μ l ocorria por meio da inibição da neurotransmissão GABAérgica. Sendo assim, testamos nesse grupo o efeito da microinjeção no NMR de muscimol numa dose que “per se” não alterou a resposta de vocalização quando administrada previamente à morfina na dose de 4,4 nmol/0,2 μ l. Os nossos resultados demonstraram que a microinjeção prévia de muscimol na dose que não produziu efeito “per se” foi capaz de bloquear a antinocicepção promovida pela administração da morfina (Figura 17). A aplicação do two-way ANOVA indicou não haver interação tempo vs tratamento ($p > 0,05$), não havendo diferença significativa entre os grupos. Na figura 18, observa-se um exemplo de registros poligráficos da vocalização de animais representativos dos grupos experimentais acima citados nos intervalos de tempo em que se aplicou o estímulo nocivo periférico. A figura 19 representa os sítios de microinjeção das diferentes drogas no NMR.

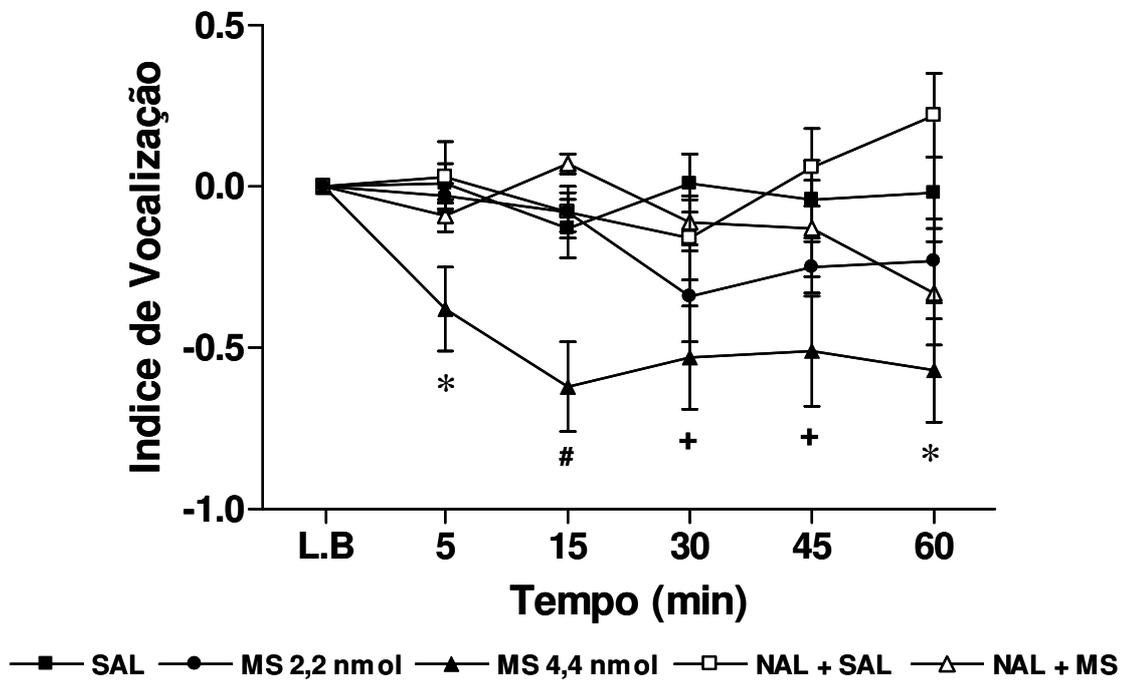


Figura 11: Decurso temporal da média do Índice de Vocalização no período controle e após o tratamento com salina a 0,9 % (SAL, n = 8), morfina a 4,4 nmol/0,2 µl (MS 4,4 nmol, n = 8), morfina a 4,4 nmol/0,2 µl precedida por naloxone a 2,7 nmol/0,2 µl (NAL + MS, n = 7) e naloxone a 2,7 nmol/0,2 µl previamente a salina (NAL + SAL, n = 8) no NMR. As barras verticais representam o EPM. L.B. (linha de base) representa o Índice de Vocalização no período controle. O * foi considerado como $p < 0,05$ quando comparado com os grupos SAL, MS 2,2 nmol e NAL + SAL, o # $p < 0,05$ quando comparado com os demais grupos e o + $p < 0,05$ quando comparado com os grupos SAL, NAL + SAL e NAL + MS.

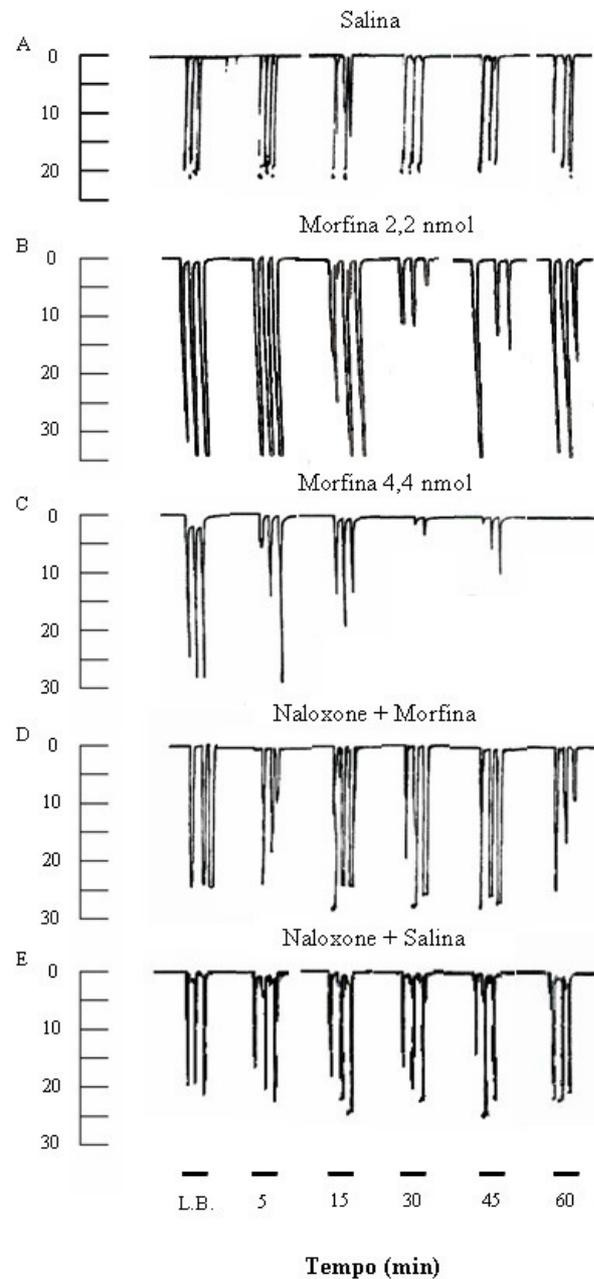


Figura 12: Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após as microinjeções no NMR de cobaias. (A) salina, (B) morfina a 2,2 nmol, (C) morfina a 4,4 nmol, (D) naloxone (2,7 nmol) seguido de morfina (4,4 nmol) e (E) naloxone seguido por salina. As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). A linha da base (L.B.) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

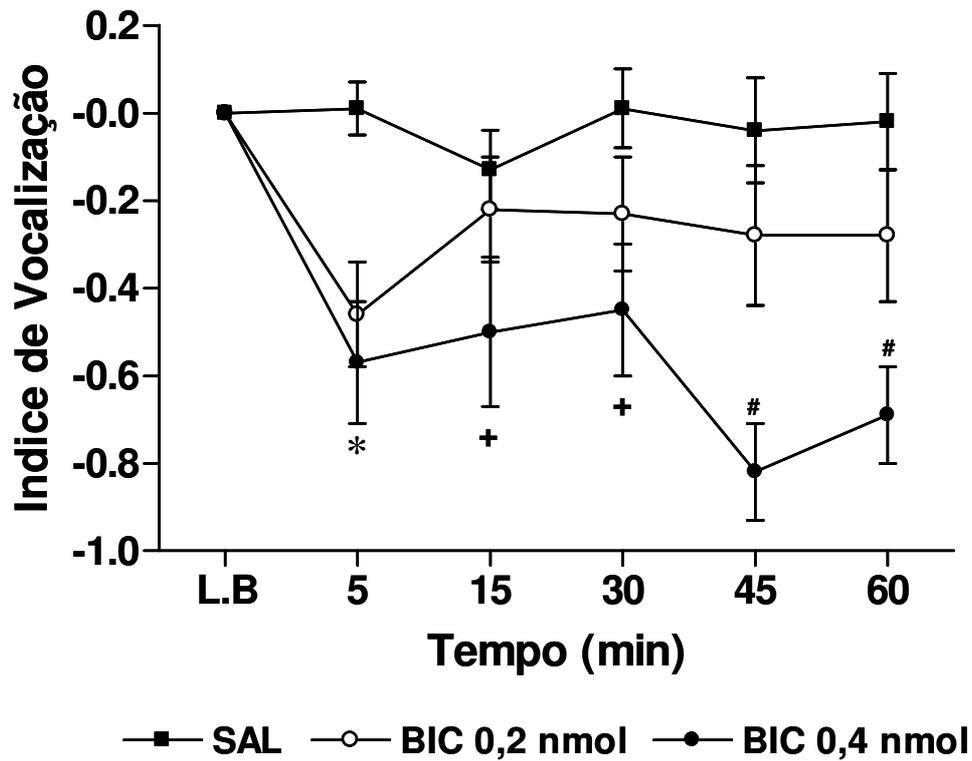


Figura 13: Decurso temporal da média do Índice de Vocalização no período controle e após o tratamento com salina a 0,9 % (SAL, $n = 8$), bicuculina a 0,2 nmol/0,2 μ l (BIC 0,2 nmol, $n = 10$) e bicuculina a 0,4 nmol/0,2 μ l (BIC 0,4 nmol, $n = 8$) no NMR. As barras verticais representam o EPM. L.B. (linha de base) representa o Índice de Vocalização no período controle. O * foi considerado como $p < 0,05$ sendo que os grupos BIC 0,2 nmol e BIC 0,4 nmol foram diferentes do grupo SAL, o + $p < 0,05$ quando comparado com o grupo SAL e o # $p < 0,05$ quando comparado com os grupos SAL e BIC 0,2 nmol.

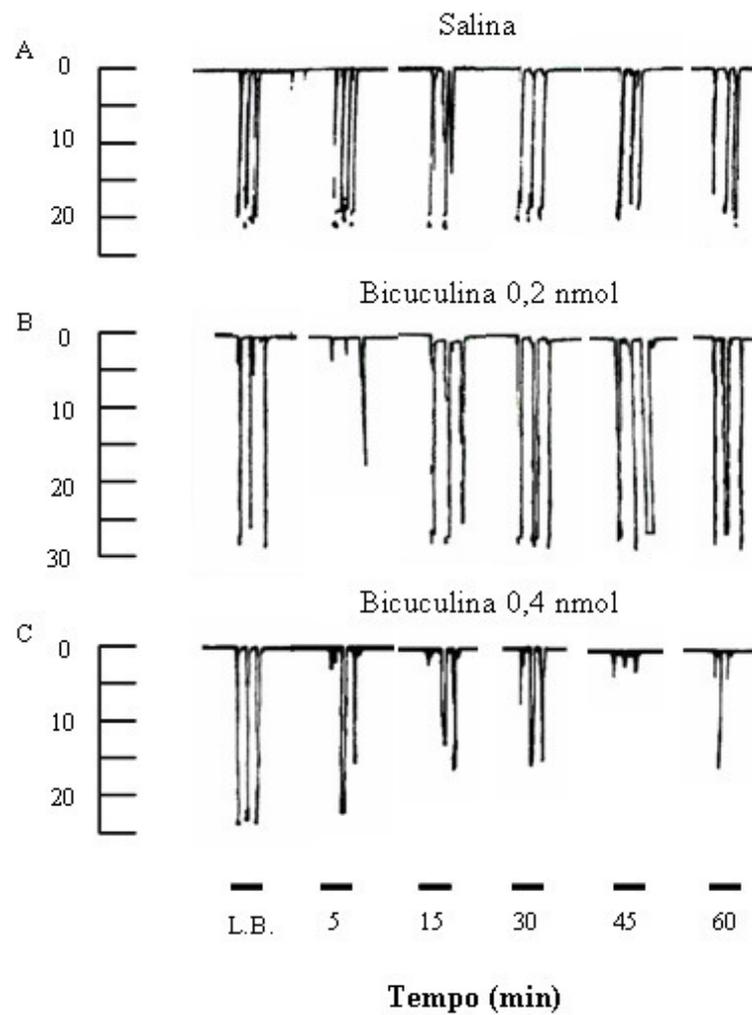


Figura 14: Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após microinjeções no NMR de cobaias. (A) salina, (B) bicuculina 0,2 nmol e (C) bicuculina 0,4 nmol. As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). A linha da base (L.B.) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

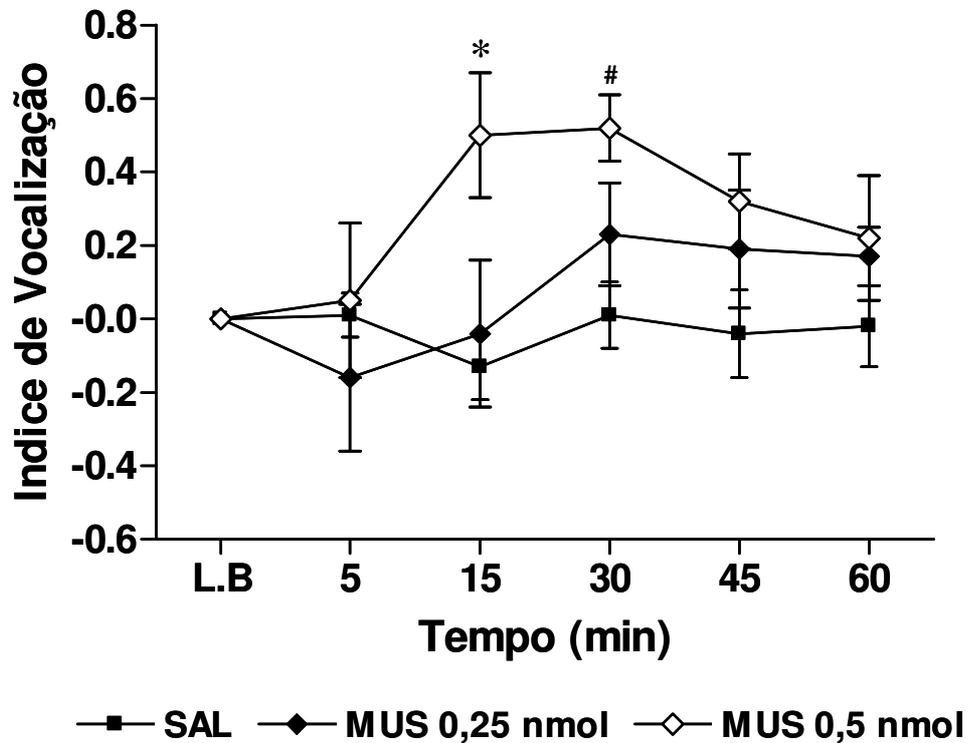


Figura 15: Decurso temporal da média do Índice de Vocalização no período controle e após o tratamento com salina a 0,9 % (SAL; $n = 8$), muscimol a 0,25 nmol/0,2 μ l (MUS 0,25nmol; $n = 7$) e muscimol a 0,5 nmol/0,2 μ l (MUS 0,5nmol; $n = 10$) no NMR. As barras verticais representam o EPM. L.B. (linha de base) representa o Índice de Vocalização no período controle. O * foi considerado como $p < 0,05$ quando comparado com os demais grupos e o # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo SAL.

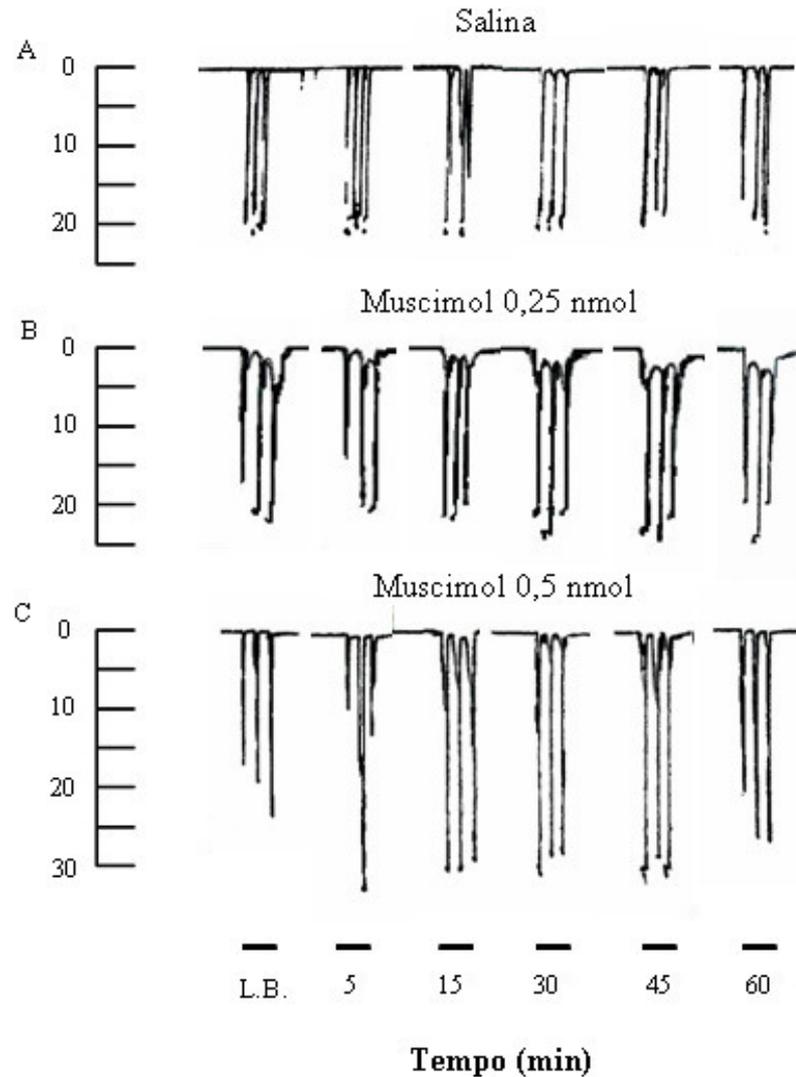


Figura 16: Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após microinjeções no NMR de cobaias. (A) salina, (B) muscimol a 0,25 nmol e (C) muscimol a 0,5 nmol. As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). A linha da base (L.B.) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

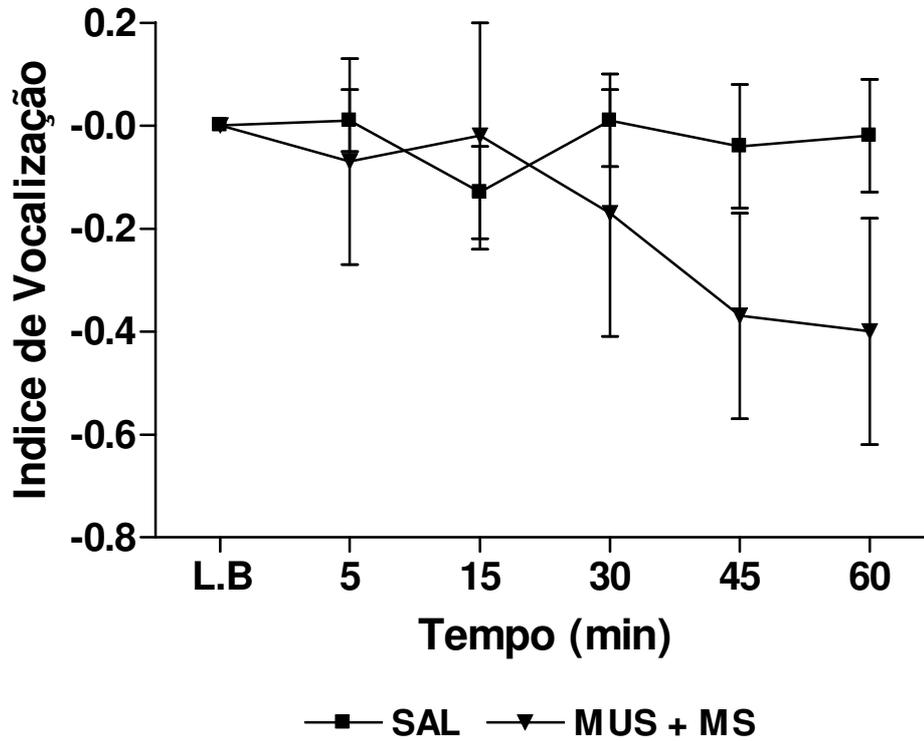


Figura 17: Decurso temporal da média do Índice de Vocalização no período controle e após o tratamento com salina a 0,9 % (SAL; n = 8) e morfina a 4,4 nmol/0,2 μ l precedido por muscimol a 0,25 nmol/0,2 μ l (MUS + MS; n = 9) no NMR. As barras verticais representam o EPM. L.B. (linha de base) representa o Índice de Vocalização no período controle.

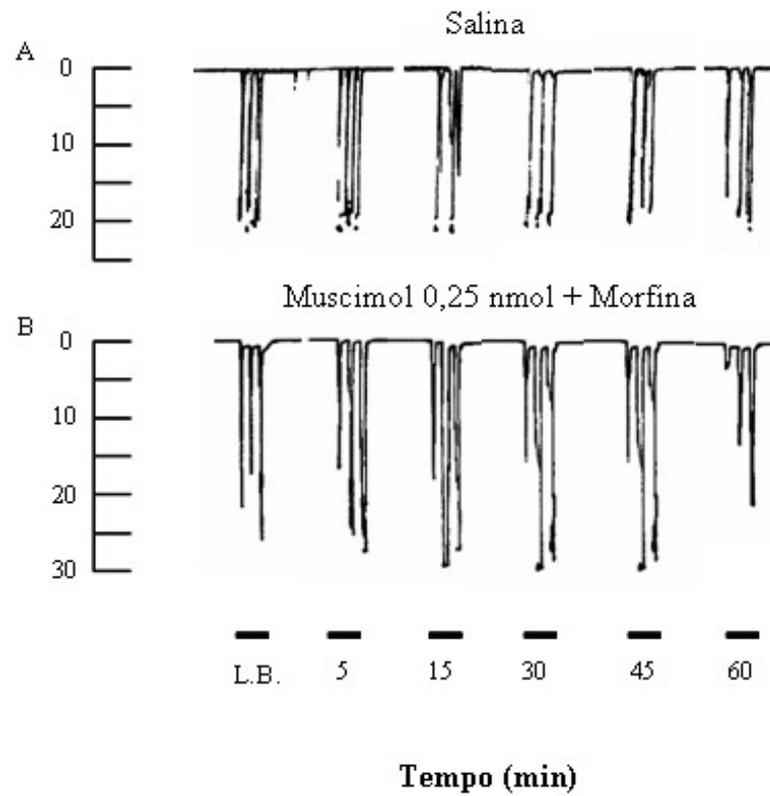


Figura 18: Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após microinjeções no núcleo magno da rafe de cobaias. (A) salina e (B) muscimol (0,25 nmol) seguido por morfina (4,4 nmol). As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). A linha da base (L.B.) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

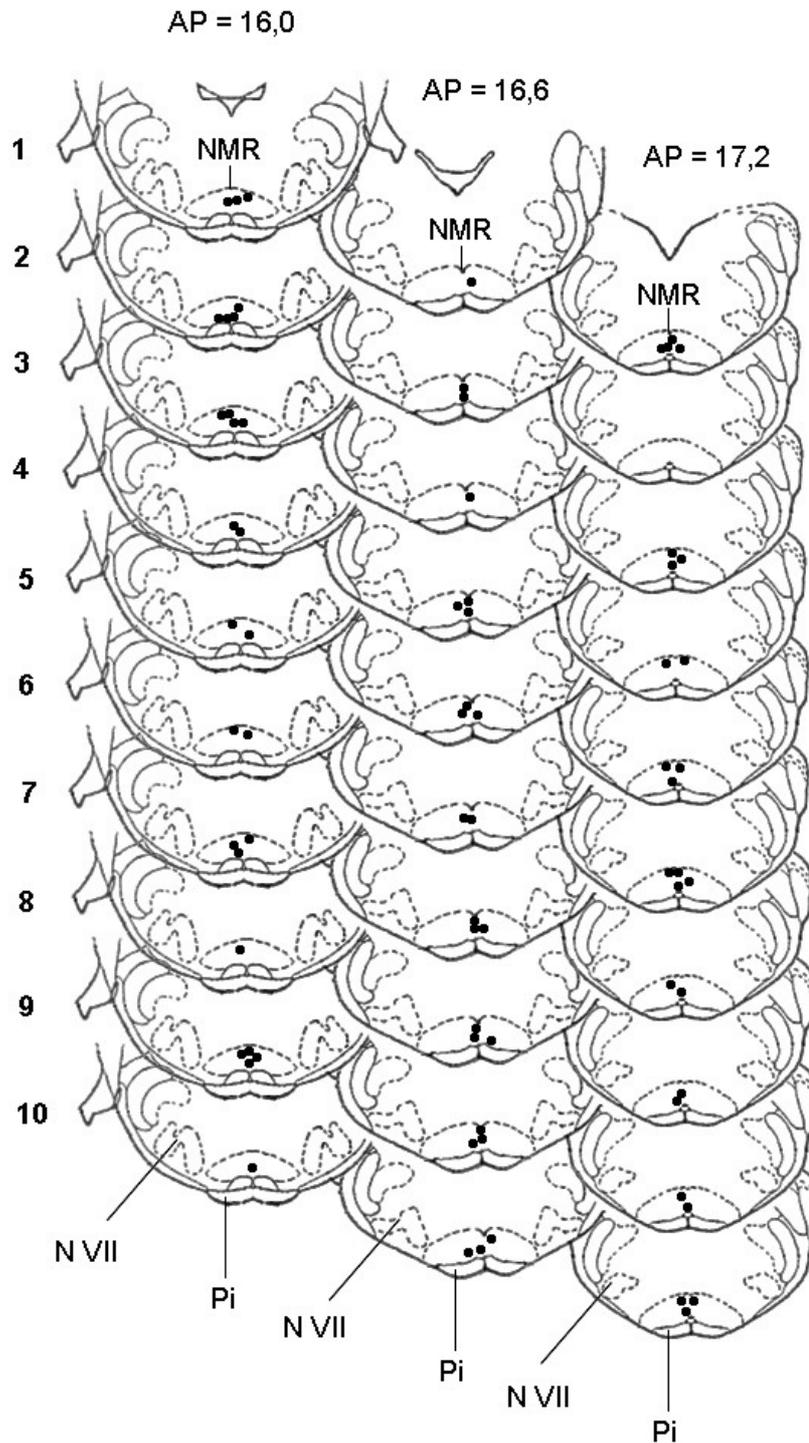


Figura 19: Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de salina a 0,9 % (1), morfina a 2,2 nmol (2), morfina a 4,4 nmol (3), naloxone a 2,7 nmol seguido de morfina a 4,4 nmol (4), naloxone a 2,7 nmol seguido de salina a 0,9 % (5) bicuculina a 0,2 nmol (6), bicuculina a 0,4 nmol (7), muscimol a 0,25 nmol (8), muscimol a 0,5 nmol (9) e muscimol a 0,25 nmol seguido de morfina a 4,4 nmol (10). NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial e Pi: pirâmides. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

7.3 - Experimento 3: Estudo funcional da conexão entre NMR e a área PBv modulando respostas comportamentais de IT e nociceptivas.

Os nossos resultados demonstram que a microinjeção de CCh (0,65 nmol/0,2 µl) no NMR promoveu uma redução na duração da resposta defensivo de IT que não foi alterada pela microinjeção prévia de salina a 0,9 % na área PBv (Figura 21A). Contudo, em outro grupo de animais essa redução na duração da resposta de IT pelo CCh no NMR foi bloqueada pela microinjeção prévia de lidocaína na área PBv (Figura 22A).

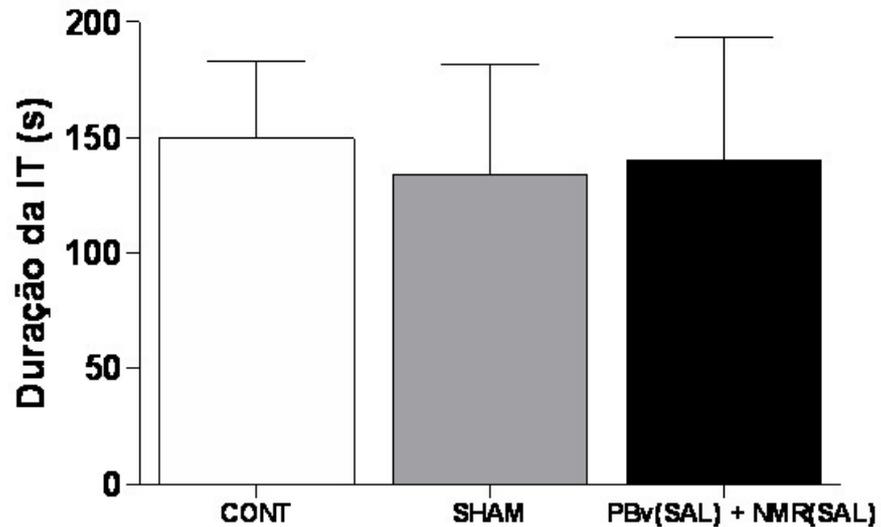
Na figura 20A, observamos que a microinjeção de salina a 0,9 % na área PBv seguida de salina no NMR não alteraram significativamente a resposta de IT ($p > 0,05$). No grupo seguinte, verificamos o efeito da microinjeção de CCh (0,65 nmol) no NMR posteriormente à aplicação de salina na área PBv (Figura 21A). A aplicação do ANOVA para medidas repetidas indicou haver diferença significativa entre os tratamentos ($F_{(2, 20)} = 13,91$; $p < 0,001$). O pós-teste de Duncan indicou ser o grupo pré-tratado com salina na área PBv seguido de CCh no NMR diferente dos demais grupos (CONT e SHAM). A microinjeção de lidocaína na área PBv bloqueou a redução da IT promovida pela administração de CCh (0,65 nmol) no NMR (Figura 22A). A aplicação do ANOVA para medidas repetidas indicou não haver diferença significativa na duração média da resposta de IT entre os tratamentos controle, “sham” e lidocaína na área PBv seguido de CCh no NMR ($p > 0,05$). Da mesma maneira, a microinjeção de lidocaína na área PBv seguido de salina a 0,9 % no NMR não alterou a duração da resposta de IT (Figura 23A). A aplicação do ANOVA para medidas repetidas indicou não haver diferença significativa na duração média da resposta de IT entre os tratamentos controle, “sham” e lidocaína na área PBv seguido de CCh no NMR.

Com relação à resposta nociceptiva de vocalização, decorrente da estimulação periférica, os nossos resultados demonstram que a microinjeção de CCh no NMR

posteriormente a microinjeção de salina a 0,9 % na área PBv promoveu uma antinocicepção, demonstrada pela redução no índice de vocalização (Figura 24). Entretanto, a microinjeção prévia de lidocaína na área PBv foi capaz de bloquear a redução no índice de vocalização causada pela microinjeção de CCh no NMR (Figura 24). A microinjeção de salina em ambas as estruturas não alterou o índice de vocalização (Figura 24). Além disso, a administração de lidocaína na área PBv previamente à salina no NMR não alterou a resposta de IT.

A aplicação do teste two-way ANOVA para medidas repetidas demonstrou haver interação do tratamento vs o tempo ($F_{(15, 130)} = 2,59$; $p = 0,002$) indicando diferença entre os tratamentos ao longo do tempo. A aplicação do pós-teste de Duncan indicou que o grupo tratado com salina na área PBv seguido de CCh no NMR diferiu dos demais grupos em todos os intervalos de tempo testados ($p < 0,05$). Na figura 25, observa-se um exemplo de registros poligráficos da vocalização de animais representativos dos grupos experimentais acima citados nos intervalos de tempo em que se aplicou o estímulo nocivo periférico. A Figura 26 apresenta um desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do NMR e da PBv de cobaias, indicando os sítios de microinjeção nos experimentos de vocalização.

A



B

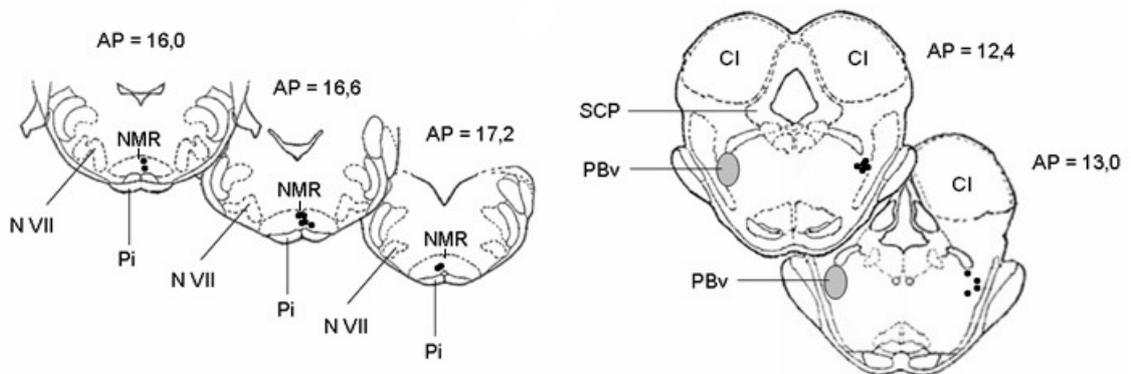
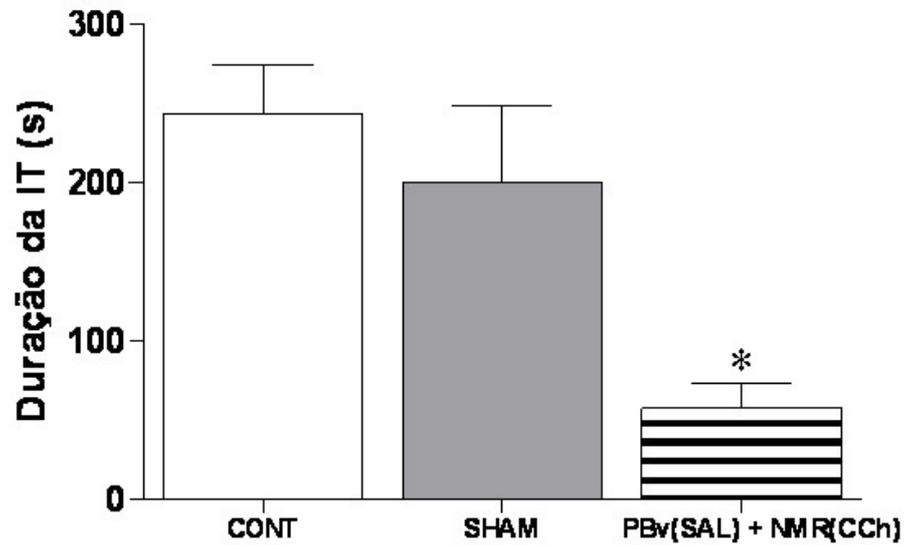


Figura 20: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de salina a 0,9 % na área PBv seguida de salina no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 11). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do tronco encefálico de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de salina no NMR e de salina na área PBv de cobaias. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial, Pi: pirâmides, PBv: área parabraquial ventral, CI: colículo inferior, SCP: substância cinzenta periaquedutal. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

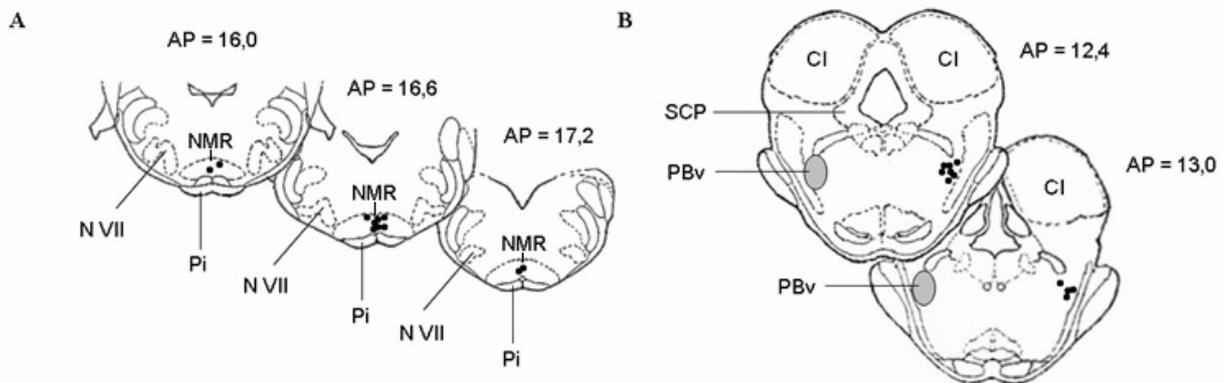
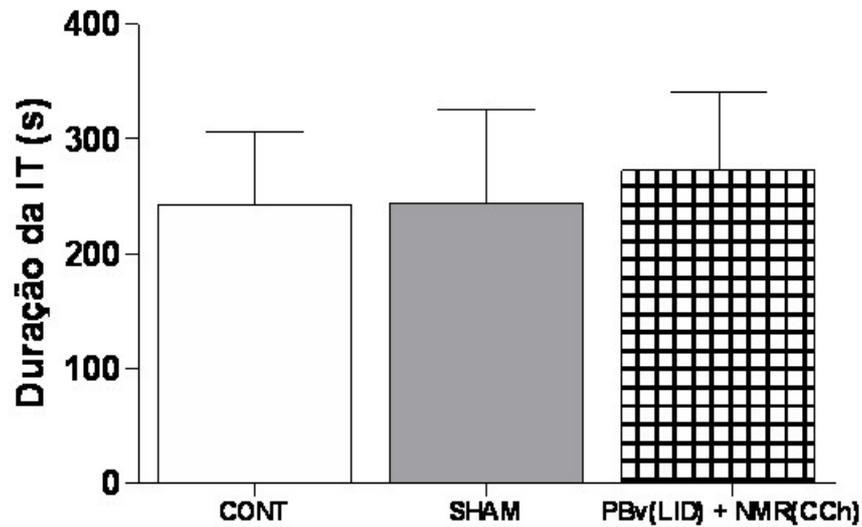


Figura 21: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de salina a 0,9 % na área PBv seguida de CCh (0,65 nmol/0,2 μ l) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 10). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do tronco encefálico de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de CCh no NMR e de salina na área PBv de cobaias. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial, Pi: pirâmides, PBv: área parabraquial ventral, CI: colículo inferior, SCP: substância cinzenta periaquedutal. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

A



B

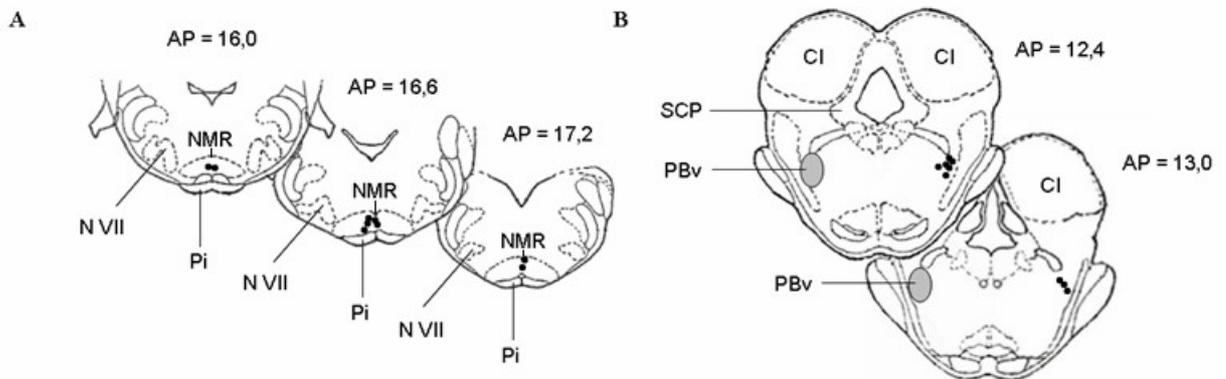


Figura 22: Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de lidocaína a 2,0% na área PBv seguida de CCh (0,65 nmol/0,2 μ l) no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 8). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do tronco encefálico de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de CCh no NMR e de lidocaína 2,0% na área PBv de cobaias. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial, Pi: pirâmides, PBv: área parabraquial ventral, CI: colículo inferior, SCP: substância cinzenta periaquedutal. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

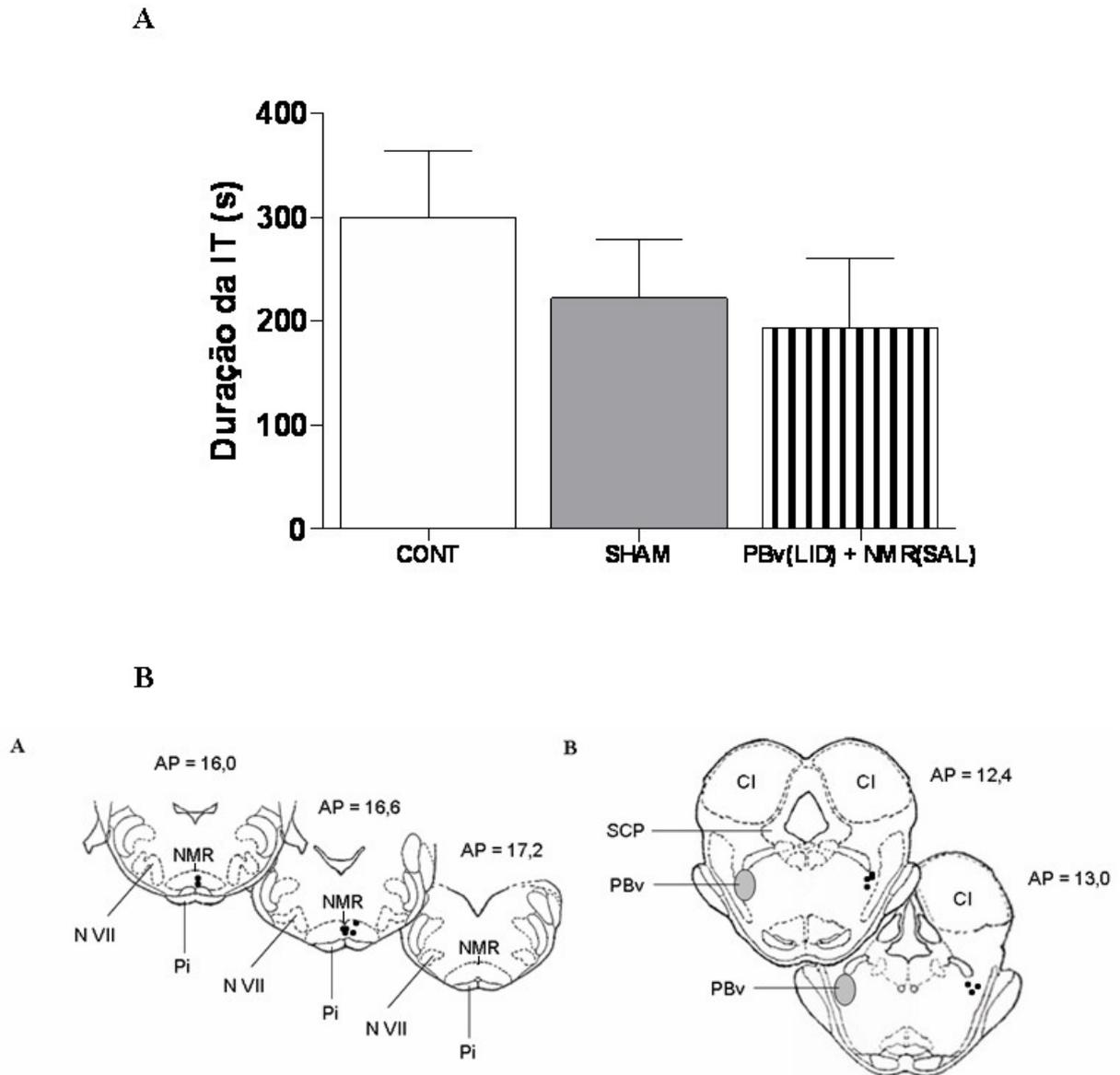


Figura 23: **A** - Duração média das médias dos cinco episódios de imobilidade tônica (IT) antes da cirurgia (CONT), após a cirurgia (SHAM) e após a microinjeção de lidocaína a 2,0 % na área PBv seguida de salina no NMR. As barras verticais representam o EPM (n = 7). **B** - Desenho esquemático de secções coronais de planos representativos do tronco encefálico de cobaias, indicando os sítios de microinjeção de salina no NMR e de lidocaína a 2,0% na área PBv de cobaias. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial, Pi: pirâmides, PBv: área parabraquial ventral, CI: colículo inferior, SCP: substância cinzenta periaquedual. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

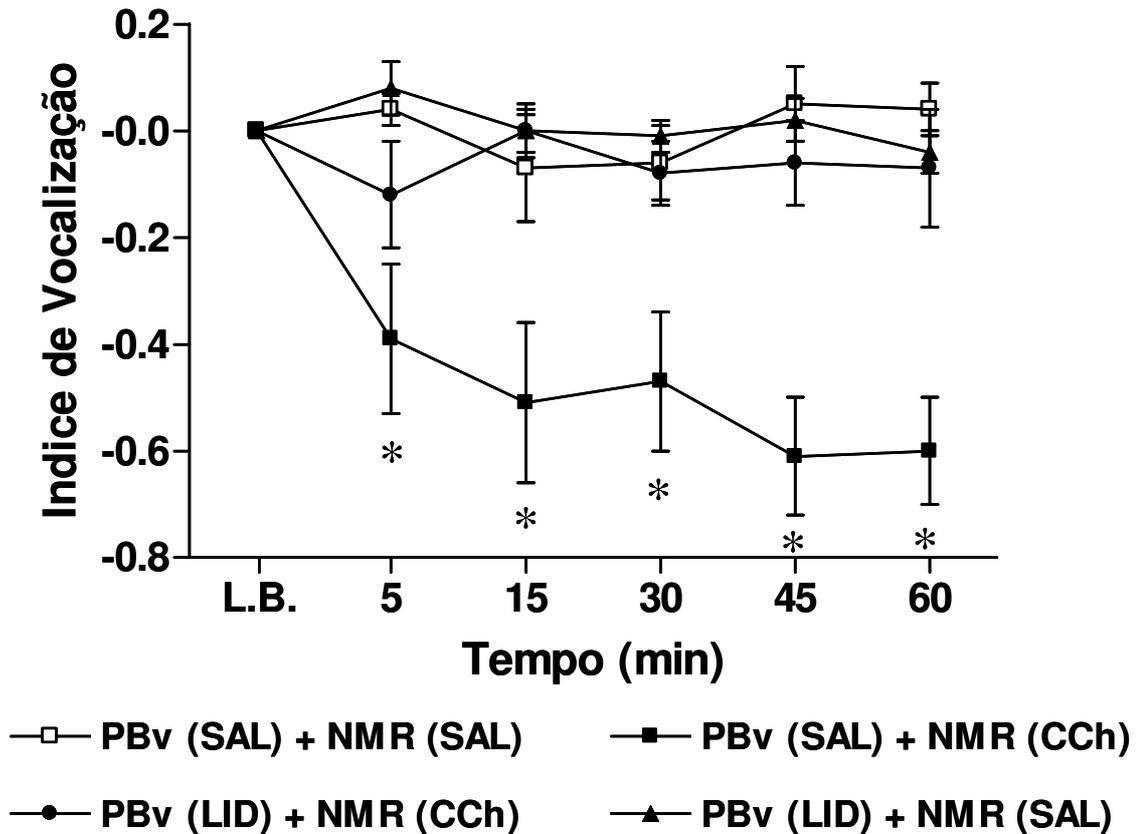


Figura 24: Decurso temporal da média do Índice de Vocalização no período controle e após os tratamentos com salina a 0,9 % na área PBv e salina no NMR (n = 11), salina na área PBV e CCh (2,7 nmol/0,2 µl) no NMR (n = 11), lidocaína 2,0 % na PBv e CCh (2,7 nmol/0,2 µl) no NMR (n = 8) e lidocaína a 2,0 % na PBv e salina no NMR (n = 8). As barras verticais representam o EPM. L.B. (linha de base) representa o Índice de Vocalização no período controle. O * foi considerado como $p < 0,05$ quando comparado com os demais grupos.

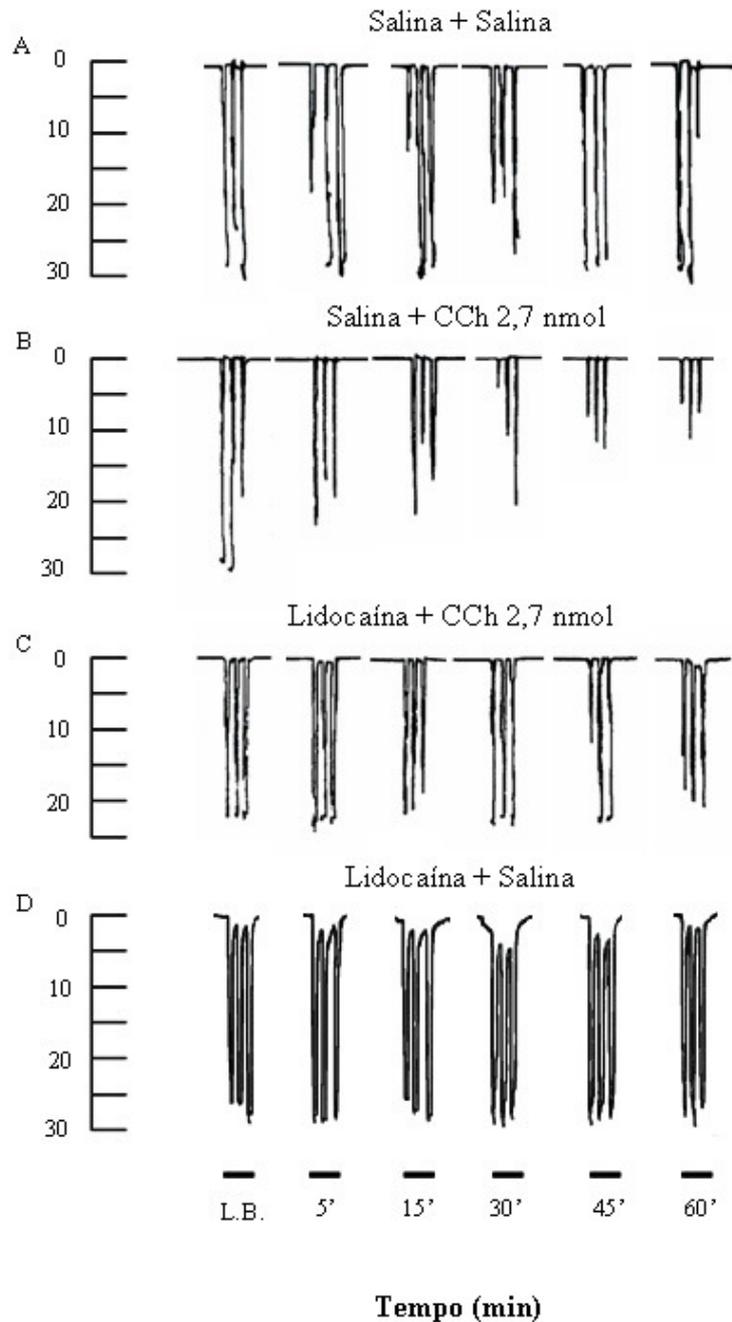


Figura 25: Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após microinjeções na área parabraqueal ventral e no núcleo magno da rafe de cobaias. (A) salina na PBv seguida por salina no NMR, (B) salina na PBv seguida por CCh (2,7 nmol) no NMR, (C) lidocaína a 2,0 % na PBv seguida por CCh (2,7 nmol) no NMR e (D) lidocaína a 2,0 % na PBv seguida por salina no NMR. As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). A linha da base (L.B.) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

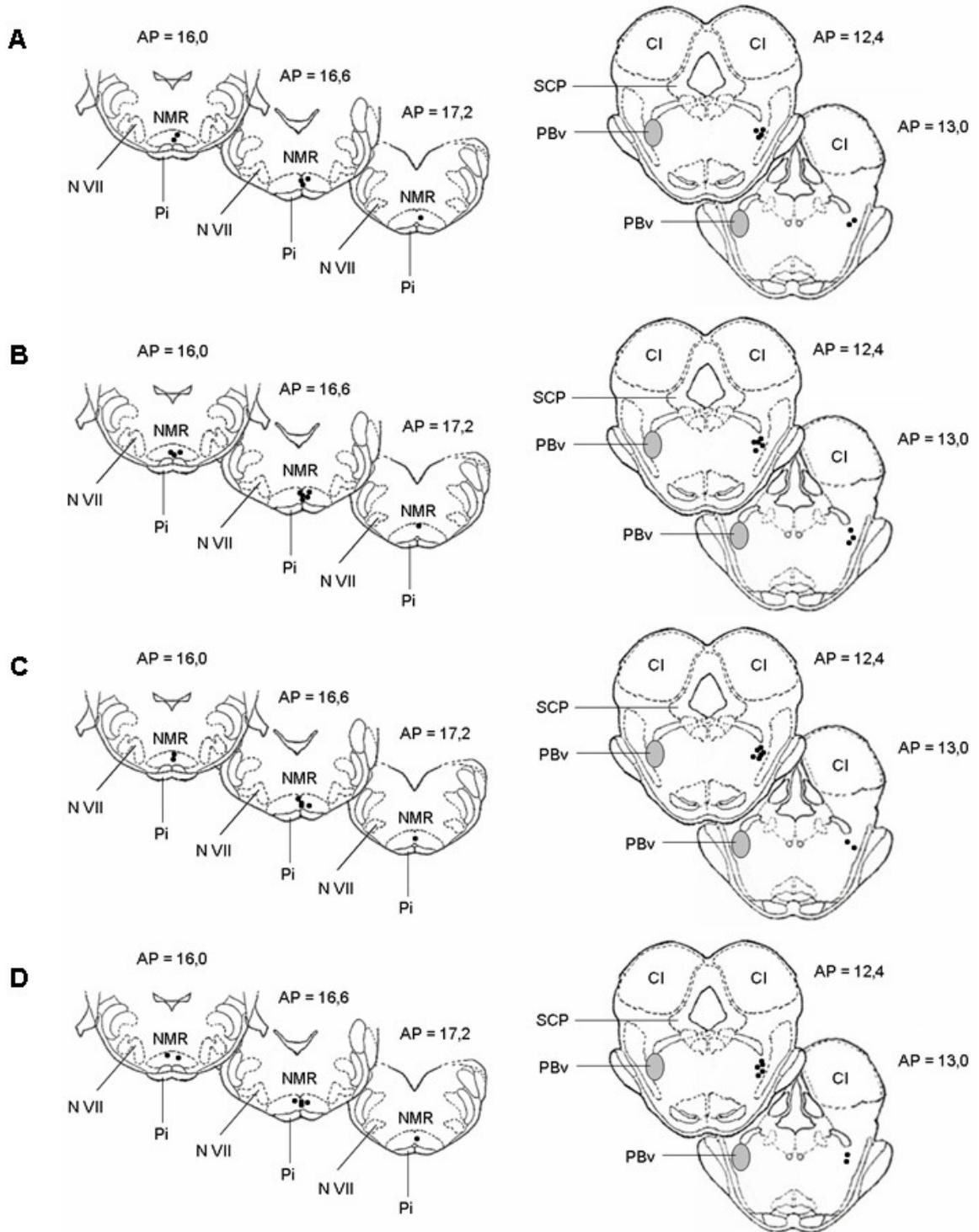


Figura 26: Desenho esquemático de seções coronais de planos representativos do NMR e da área parabraquial de cobaias, indicando os sítios de microinjeção nos experimentos de vocalização. **A** – Sítios de microinjeção de salina a 0,9 % na área PBv e de salina no NMR. **B** - Sítios de microinjeção de salina na área PBv e de CCh (2,7 nmol/0,2 μ l) no NMR. **C** - Sítios de microinjeção de lidocaína a 2,0 % na PBv e de CCh (2,7 nmol/0,2 μ l) no NMR. **D** - Sítios de microinjeção de lidocaína a 2,0 % na PBv e de salina no NMR. NMR: núcleo magno da rafe, N VII: núcleo facial, Pi: pirâmides, PBv: área parabraquial ventral, CI: colículo inferior, SCP: substância cinzenta periaqueductal. Desenho modificado a partir do atlas de Rössner (1965).

7.4 - Experimento 4: Estudo neuroanatômico da conexão entre NMR e a área PBv.

Nesse estudo utilizamos o neurotraçador bidirecional BDA com o objetivo de verificarmos a existência de projeções existentes do NMR para a PBv em cobaias. A microinjeção do neurotraçador dextran amina biotinizada (BDA) no NMR de cobaias (Figura 27A) mostrou a existência de projeções diretas para a PBv, promovendo a marcação de fibras neurônicas positivas nesta estrutura (Figura 27A, B e C). Além das fibras, observamos a presença de axônios apresentando botões terminais positivos sobre neurônios (Figura 27B-D) da PBv, sugerindo a existência de sinapses axosomáticas.

A utilização do neurotraçador BDA possibilitou, ainda, a avaliação de conexões do NMR com outras estruturas de interesse para o presente trabalho. Assim, a microinjeção do neurotraçador no NMR promoveu a marcação de fibras, botões terminais e corpos celulares em todas as colunas da SCP de cobaias (Figura 28). Na Figura 28A, observamos a presença de neurônios, fibras neurônicas e botões terminais marcados na coluna dorsomedial da SCP. O mesmo padrão de marcação (neurônios, fibras neurônicas e botões terminais) foi encontrado nas colunas dorsolateral (Figura 28B), lateral (Figuras 28C e D) e ventrolateral (Figuras 28E e F) da SCP. Esses resultados demonstram a existência de uma densidade considerável de conexões recíprocas entre a SCP e o NMR. A Figura 29 (A – C) mostra a presença de neurônios marcados positivamente no núcleo cuneiforme, indicando que o mesmo se projeta para o NMR.

Além das conexões com estruturas presentes no tronco encefálico, avaliamos, ainda, as projeções do NRM para a medula espinhal. A microinjeção do BDA no NRM (Figura 30A) marcou fibras na substância cinzenta da medula espinhal e permitiu a visualização do trato descendente (funículo dorsolateral; Figura 30B) por onde os neurônios do NRM se projetam para a medula espinhal. Nas Figuras 30C e D, observamos a presença de uma densidade de fibras neurônicas positivas no corno ventral da medula espinhal de cobaias após a

microinjeção do neurotraçador BDA no NRM. Além disso, no corno dorsal, observamos a presença de diversas fibras neurônicas, botões terminais e neurônios marcados (Figura 30E e F), sugerindo a existência de conexões recíprocas desta com o NMR. A porção intermédia da medula espinhal apresentou diversas fibras neurônicas e botões terminais positivos (Figuras 31A, B, C e D) após a microinjeção do neurotraçador no NMR de cobaias. Além disso, observamos a presença de neurônios marcados na porção intermédia da medula espinhal (Figuras 31C e D).

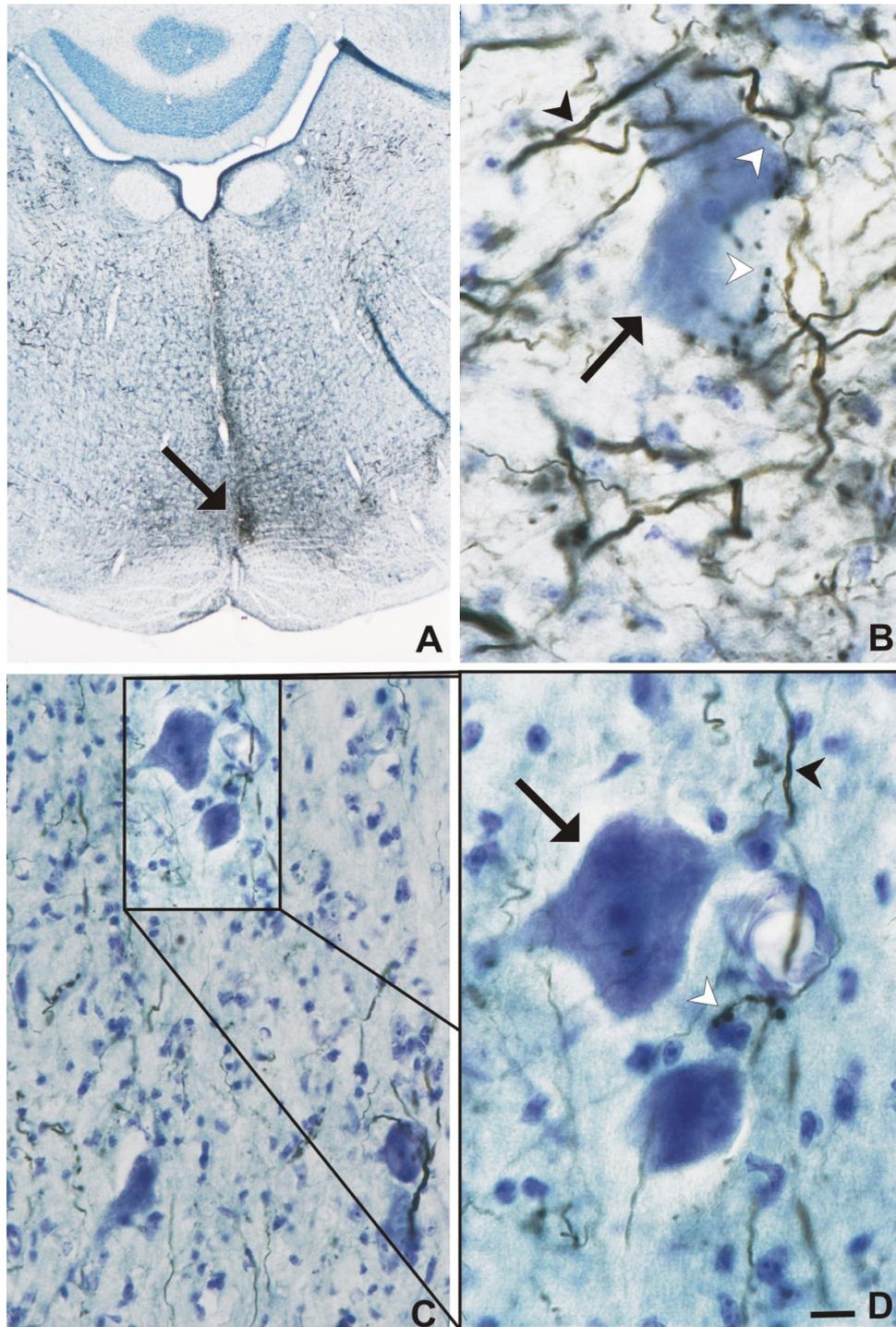


Figura 27: Fotomicrografias de cortes coronais efetuados na parte cranial do bulbo (A) e na parte caudal da ponte (B – D) de cobaia mostrando o sítio de microinjeção da dextrana amina biotinizada (BDA 3000) em A e a presença de fibras neurônicas (ponta de seta preta) e botões terminais (ponta de seta branca) positivos sobre neurônios (B e D) da PBv. A fotomicrografia em D é uma ampliação da área delimitada em C. Ampliação: A barra em D corresponde a 373 μm em A, 23 μm em C e 9,6 μm em B e D. Contracoloração: Nissl.

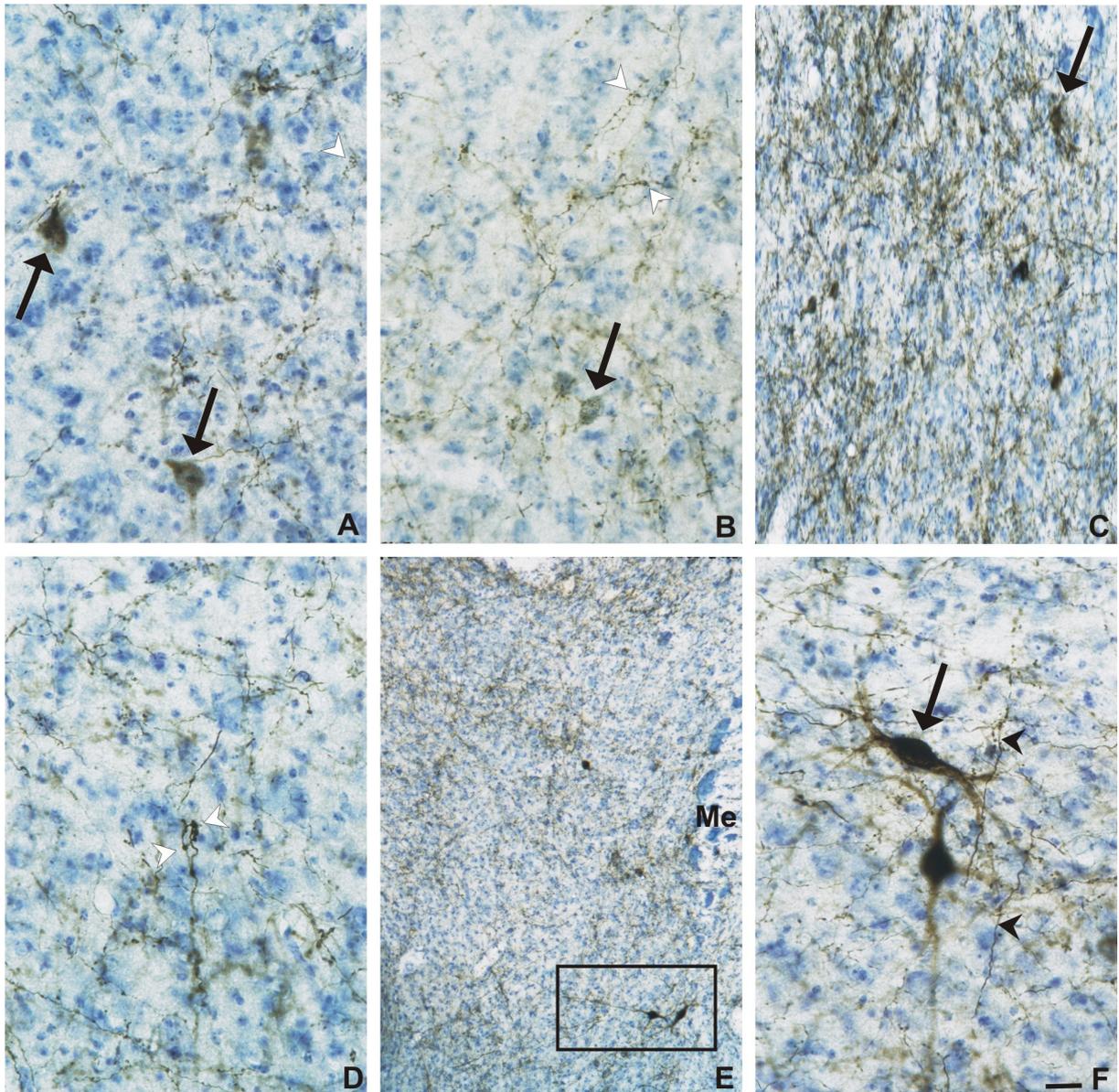


Figura 28: Fotomicrografias de cortes coronais efetuados no mesencéfalo (A – F) de cobaias após a microinjeção do neurotraçador dextran amina biotinizada (BDA) no NMR, mostrando a presença de neurônios (setas pretas), fibras neurônicas (pontas de setas pretas) e botões terminais (pontas de setas brancas) positivos nas colunas dorsomedial (A), dorsolateral (B), lateral (C e D) e ventrolateral (E e F) da substância cinzenta periaquedutal (SCP). A fotomicrografia em F é uma ampliação da área delimitada em E, que foi girada 90° no sentido anti-horário. Ampliação: A barra em F corresponde a 46,6 μm em C e D e a 23,3 μm em A, B, D e F. Me: Núcleo trigeminal mesencefálico. Contracoloração: Nissl.

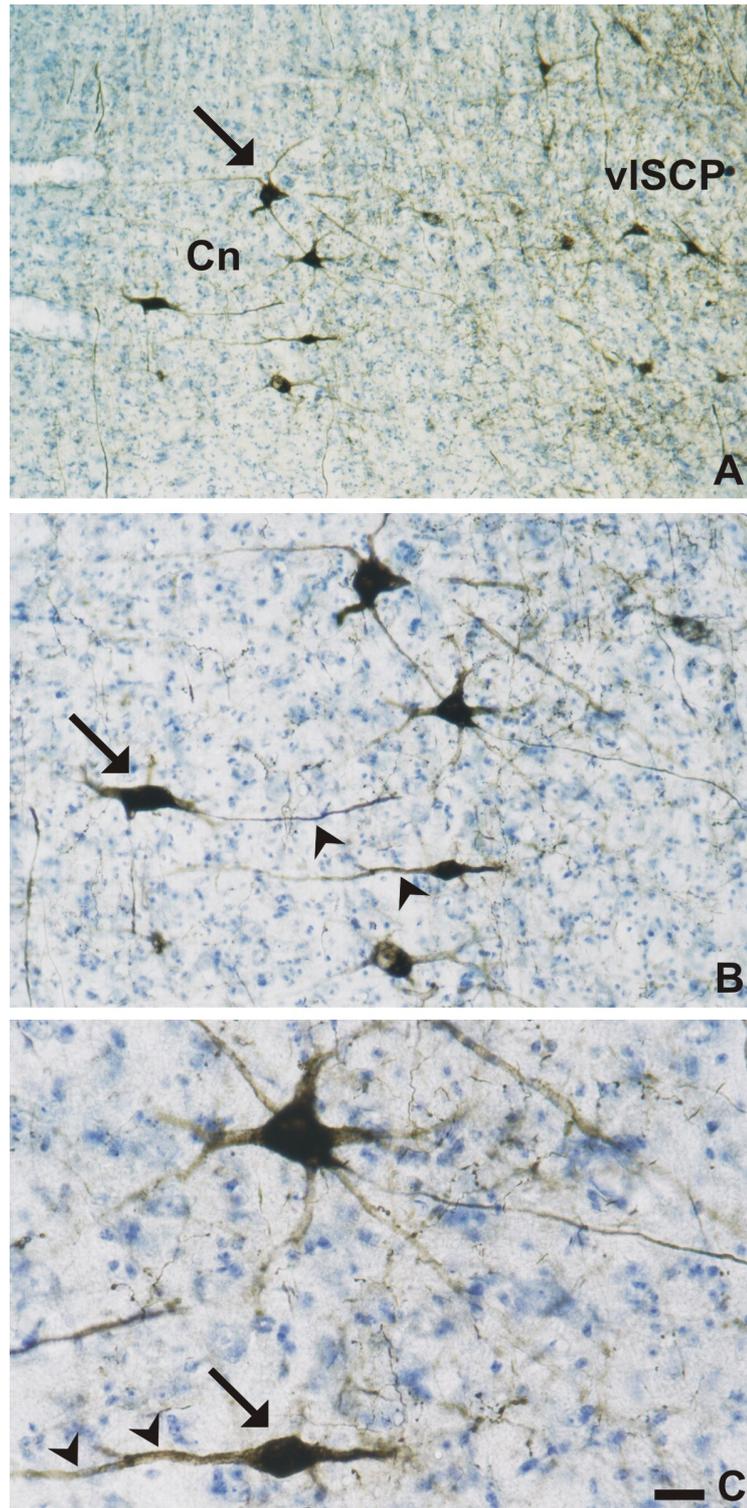


Figura 29: Fotomicrografias de cortes coronais efetuados no mesencéfalo (A – C) de cobaias após a microinjeção do neurotraçador dextran amina biotinizada (BDA) no NMR mostrando a presença de neurônios (setas pretas) e fibras neurônicas (pontas de setas pretas) positivos no núcleo cuneiforme (A – C). A fotomicrografia em B é uma ampliação de A, e a fotomicrografia em C é uma ampliação de B. Ampliação: A barra em C corresponde a 93,3 μm em A, a 46,6 μm em B e a 23,3 μm em C. Cn: Núcleo cuneiforme e vlSCP: substância cinzenta periaquedutal ventrolateral. Contracoloração: Nissl.

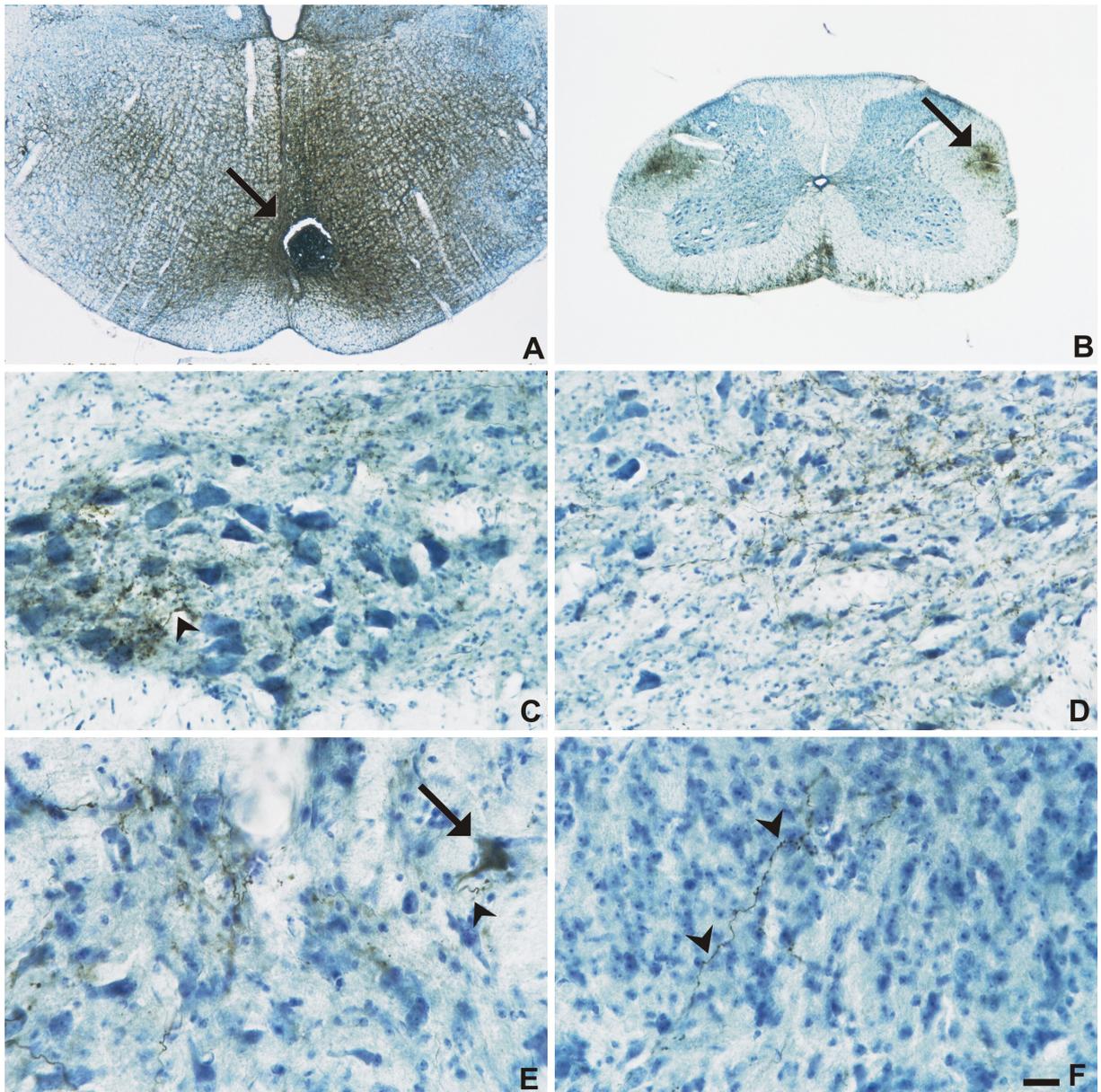


Figura 30: Fotomicrografias de cortes coronais efetuados na parte cranial do bulbo (A) e na medula espinhal (B – F) de cobaia, mostrando o sítio de microinjeção da dextrana amina biotinizada (BDA 10.000) em A, marcações bilaterais do trato descendente (B, seta preta), a presença de neurônios (seta preta em E), de fibras neurônicas (pontas de setas pretas) e botões terminais positivos nos cornos ventral (C e D) e dorsal (E e F) da medula. Ampliação: A barra em F corresponde a 373,0 μm em A e B, a 46,6 μm em C e a 23,3 μm em D, E e F. Contracoloração: Nissl.

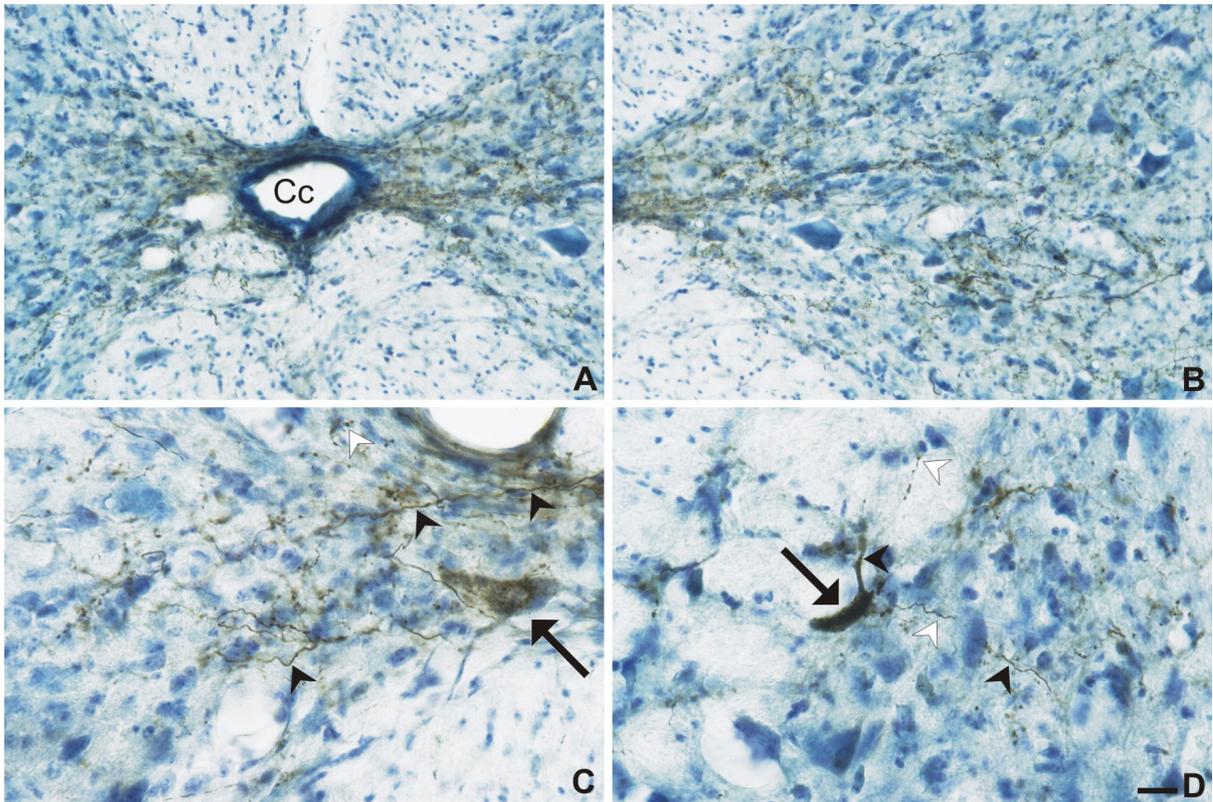


Figura 31: Fotomicrografias de cortes coronais da medula espinhal (A – D) de cobaia mostrando em A, B, C e D a presença de corpos celulares (setas pretas), fibras neurônicas (pontas de setas pretas) e botões terminais (pontas de setas brancas) positivos na substância cinzenta intermédia da medula espinhal. Ampliação: A barra em D corresponde a 46,6 μm em A e B e a 23,3 μm em C e D. Cc: canal central. Contracoloração: Nissl.

8 - Discussão

Os resultados do presente trabalho demonstram que microinjeções de morfina (4,4 nmol/ 0,2 µl) e de bicuculina (0,4 nmol/ 0,2 µl) no NMR produziram um aumento na duração dos episódios de IT e antinocicepção em cobaias. Por outro lado, a microinjeção de muscimol (0,5 nmol) no mesmo sítio promoveu uma redução na duração da IT e hiperalgesia. Ambas as respostas produzidas pela administração de morfina no NMR foram bloqueadas pela microinjeção prévia de naloxone (2,7 nmol/0,2 µl) ou muscimol (0,25 nmol) no mesmo sítio.

Vários trabalhos já descreveram a ocorrência de antinocicepção durante a emissão de respostas comportamentais defensivas desencadeadas por estímulos aversivos ambientais (RODGERS; RANDALL, 1987; HARRIS, 1996; LEITE-PANISSI et al., 2001). Em alguns desses trabalhos foi descrito que a antinocicepção juntamente com os ajustes neurovegetativos e motores fazem parte integrante da reação comportamental de defesa (BOLLES; FANSELOW, 1980; HARRIS, 1996; MORGAN; WHITNEY, 2000). Assim, pode-se supor que as estruturas do sistema nervoso central que estão envolvidas na modulação das reações de defesa, possivelmente também estejam envolvidas no controle de respostas nociceptivas, e vice-versa. Nesse sentido, já foi comprovado que diversas estruturas do SNC participam tanto na modulação de respostas comportamentais defensivas como na nocicepção. Por exemplo, a substância cinzenta periaquedutal (SCP) tem sido implicada tanto na modulação das respostas comportamentais defensivas, inclusive de IT (CARRIVE, 1993; GRAEFF, 1994; BEHBEHANI, 1995; MONASSI; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1999; MONASSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2004), bem como, na modulação da sensibilidade nociceptiva (BASBAUM; FIELDS, 1984; FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991; BEHBEHANI, 1995). Além da SCP, outras estruturas, tais como o complexo amigdalóide, hipotálamo e área parabraquial, também estão envolvidas com a modulação de respostas comportamentais de defesa e nociceptivas (MENESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMANN,

1993; DAFNY et al., 1996; OLIVEIRA; HOFFMANN; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1997; LEITE-PANISSI; COIMBRA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2003).

Durante as respostas de IT, tem sido observada a ocorrência de antinocicepção (RODGERS; RANDALL, 1987; LEITE-PANISSI et al., 2001). Nesse contexto, Leite-Panissi et al. (2001) demonstraram que cobaias, após terem sido submetidas à IT, apresentavam hipalgesia, avaliada pelos testes algesimétricos da formalina e placa quente. Além disso, nesse mesmo trabalho, foi demonstrado que essa hipalgesia foi bloqueada pela administração periférica de naloxone, um antagonista opióide do tipo μ . Isso indica que, durante a IT, possivelmente, ocorre liberação de opióides endógenos sendo estes os responsáveis pela antinocicepção decorrente da IT.

Tanto a hipalgesia, como a modulação da resposta de IT, parecem ser mediadas pela ativação de receptores opióides. Nesse contexto, foi demonstrado por Carli, Farabollini e Fontani (1981) que a injeção periférica de morfina causava o aumento na duração dos episódios de IT em coelhos e que a aplicação periférica de naloxone bloqueou esse efeito. Os referidos resultados apontam para uma possível participação dos peptídeos opióides endógenos na regulação da resposta de IT.

Somando-se a esses resultados, alguns trabalhos foram conduzidos com o objetivo de se verificar a ação da morfina em estruturas do SNC na modulação da resposta de IT. Monassi, Leite-Panissi e Menescal-de-Oliveira (1999) demonstraram que a microinjeção de morfina na SCP-ventrolateral aumentou a duração da resposta defensiva de IT; resposta essa, que foi bloqueada pela administração prévia da naloxone no mesmo sítio. Isto indica que a ação da morfina na SCP durante respostas de IT é provavelmente mediada pela ativação de receptores opioidérgicos do tipo μ . Resultados diferentes aos da SCP foram encontrados após a microinjeção de morfina no núcleo central da amígdala. Nesse núcleo, a aplicação de morfina reduziu a duração da resposta de IT; resposta essa bloqueada pela administração

prévia de naloxone (LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002). Esses resultados demonstram que os opióides, agindo principalmente em receptores do tipo μ , são importantes na modulação da resposta defensiva de IT, sendo que, dependendo da estrutura em questão, os opióides podem ter ação facilitatória ou inibitória na regulação dessa resposta defensiva.

De acordo com os nossos resultados, a microinjeção de morfina no NMR promoveu um aumento na duração dos episódios de IT, indicando uma influência facilitatória dos agonistas opióides na modulação da IT no NMR. Essa resposta foi bloqueada pela administração prévia de naloxone, sugerindo, assim, uma participação de receptores do tipo μ -opióides na modulação da resposta comportamental de IT. Contudo, a microinjeção de naloxone isoladamente no NMR não alterou a duração da resposta de IT, sugerindo a inexistência de uma atividade opioidérgica tônica nesse núcleo. Corroborando os nossos achados, estudos realizados em “slices” do NMR de ratos e cobaias demonstraram que a ação opioidérgica nesses neurônios ocorre por meio da ativação de receptores opióides do tipo μ (PAN; WILLIAMS; OSBORNE, 1990).

Os resultados comportamentais encontrados em nosso trabalho após a estimulação opióide do NMR assemelham-se aos observados após a microinjeção de morfina na SCP ventrolateral (MONASSI; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1999). Sabe-se que a SCP e o NMR fazem parte de um mesmo sistema descendente endógeno de controle nociceptivo (BASBAUM; FIELDS, 1984; FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991). Além disso, há uma estreita relação funcional entre estas duas estruturas, já que a SCP envia densa projeção para o NMR (BASBAUM; FIELDS, 1984). Assim, o NMR é a principal estação relé para as respostas antinociceptivas decorrentes da estimulação da SCP (BEHBEHANI; FIELDS, 1979; BASBAUM; FIELDS, 1984; GUIMARAES; PRADO, 1999). Estas evidências reforçam a estreita relação funcional existente entre a SCP e o NMR com relação à modulação das respostas nociceptivas. No que diz respeito à resposta de IT, foi demonstrado

que a microinjeção de morfina ou bicuculina na porção ventrolateral da SCP produziu um aumento na duração da resposta de IT (MONASSI; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1999). Pan e Fields (1996) demonstraram que a ativação de neurônios da SCP ventrolateral por meio da microinjeção de morfina ou bicuculina causou a liberação de peptídeos opióides no RVM de ratos.

Tendo em vista que a SCP participa na modulação da resposta defensiva de IT e que o NMR é uma importante estação relé para as respostas antinociceptivas mediadas pela SCP, podemos aventar a hipótese de que além de respostas antinociceptivas o NMR possa também participar na modulação das respostas comportamentais de IT mediadas pela SCP ventrolateral. Desta forma, durante a execução da resposta comportamental de IT, a ativação de neurônios da SCP ventrolateral, que se projetam para o NMR, promoveria uma liberação de peptídeos opióides no NMR contribuindo para a ocorrência da IT. A porção ventrolateral da SCP é uma das principais origens de aferências que chegam ao NMR (HERMANN et al., 1997). Além disso, a microinjeção do neurotraçador bidirecional BDA no NMR mostrou a presença de neurônios, fibras neurônicas e botões terminais na SCP ventrolateral, indicando a existência de conexões recíprocas entre a SCP ventrolateral e o NMR. Porém, apesar da existência de diversas evidências neuroanatômicas e fisiológicas que suportam tal hipótese, em nenhum dos trabalhos foi avaliado especificamente a participação conjunta dessas estruturas em modelos de comportamento defensivo. Dessa forma, para podermos confirmar tal suposição, experimentos devem ser realizados, relacionando as respostas comportamentais de IT mediadas pela microinjeção de morfina ou bicuculina na SCP ventrolateral antes e após o bloqueio do NMR.

Da mesma maneira que a morfina, a microinjeção de bicuculina (antagonista GABAérgico) no NMR produziu um aumento na duração da resposta de IT, indicando, assim, que a neurotransmissão GABAérgica do NMR tem um papel inibitório no desencadeamento

desta resposta. Tendo em vista que a bicuculina é um antagonista de receptores GABA_A, a alteração comportamental observada em nossos experimentos após a microinjeção da mesma, pode ser decorrente da inibição de uma provável atividade GABAérgica tônica no NMR.

O papel inibitório que a neurotransmissão GABAérgica exerce para a resposta de IT também ficou evidente quando testamos o efeito da microinjeção do agonista GABAérgico muscimol (0,50 nmol) no NMR. Nesse grupo, a administração do muscimol no NMR promoveu a redução na duração da resposta de IT. Além disso, foi demonstrado que a microinjeção de uma dose de muscimol (0,25 nmol) sem efeito “*per se*” foi capaz de bloquear o aumento na duração da resposta de IT mediado pela morfina no NMR. Esse resultado demonstra uma possível relação entre circuitos opioidérgicos e GABAérgicos do NMR na modulação da IT.

Trabalhos anteriores já apontavam para participação de circuitos GABAérgicos na modulação de respostas comportamentais defensivas em estruturas situadas principalmente no tronco encefálico (GRAEFF, 1994; MONASSI; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 1999). No que diz respeito às respostas defensivas de IT, Monassi, Leite-Panissi e Menescal-de-Oliveira (1999) demonstraram que a microinjeção de bicuculina na porção ventrolateral da SCP causou um aumento na duração da IT, enquanto que o muscimol injetado no mesmo sítio produziu efeito inverso. Contudo, o papel da neurotransmissão GABAérgica na modulação da resposta de IT parece estar relacionado com a estrutura do SNC onde esse neurotransmissor irá atuar. Assim, foi observado que a microinjeção de bicuculina no núcleo central da amígdala promoveu uma redução na duração da resposta de IT (LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002).

No presente trabalho, tanto a microinjeção de morfina como de bicuculina no NMR promoveram um aumento na duração da IT. Sabe-se que a ação dos opióides em neurônios do NMR é preponderantemente inibitória (PAN; WILLIAMS; OSBORNE, 1990) e que as

modificações comportamentais causadas pela bicuculina dependeram da inibição de uma atividade tônica GABAérgica no NMR. Assim, é provável que o aumento na duração da IT observado após a microinjeção de morfina no NMR ocorra de maneira indireta por meio da inibição de interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos e conseqüente liberação de neurônios efetores (Figura 32). Além disso, foi demonstrado por meio de técnicas de imunofluorescência a presença de receptores μ -opioides em neurônios GABAérgicos do RVM de ratos (KALYUZHNY; WESSENDORF, 1998).

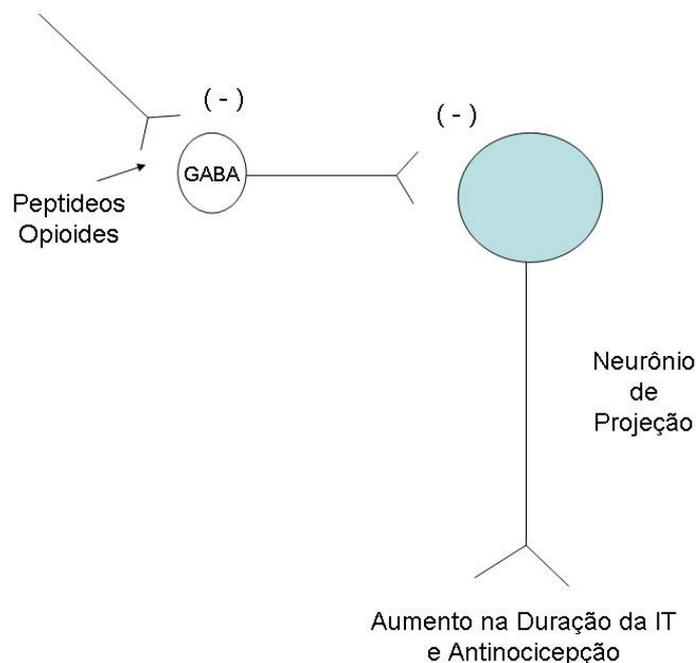


Figura 32: Desenho esquemático do possível circuito opioidérgico-GABAérgico presente no NMR responsável pela modulação das respostas de IT e nociceptiva.

A existência de um circuito inibitório tonicamente ativo modulando a resposta de IT é biologicamente importante, visto que a presença deste circuito inibitório impede que a resposta de IT, que se caracteriza por apresentar uma inibição motora intensa, possa ocorrer em momentos inapropriados. Assim, apenas em situações comportamentais muito específicas, como durante o confronto presa/predador onde há o contato físico, é que a presa emitirá a

resposta de IT. Nessa circunstância, então, provavelmente, ocorreria uma liberação de peptídeos opióides no NMR, os quais promoveriam a inibição da atividade GABAérgica tônica, propiciando, assim, as condições necessárias para a manutenção da resposta defensiva de IT.

Monassi, Leite-Panissi e Menescal-de-Oliveira (1999) demonstraram a existência de um circuito semelhante envolvendo opióides e GABA na SCP ventrolateral modulando respostas comportamentais de IT. Além disso, Basbaum e Fields (1984) e Fields Heinricher e Mason (1991) já haviam descrito a existência desse circuito na SCP e no NMR, respectivamente, porém a sua atividade havia sido relacionada à modulação apenas de respostas nociceptivas.

Apesar do NMR ter prioritariamente sua função relacionada à modulação da sensibilidade nociceptiva, alguns trabalhos demonstraram que essa estrutura também está envolvida na modulação de respostas comportamentais outras, que não apenas nociceptivas (OLESON; KIRKPATRICK; GOODMAN, 1980; PRADO; ROBERTS, 1985; PRADO; ROBERTS, 1985; HIRAKAWA et al., 2000; MORGAN; WHITNEY, 2000; MASON, 2001). Com relação ao envolvimento do NMR nas respostas comportamentais defensivas, Oleson, Kirkpatrick e Goodman (1980) verificaram que a estimulação elétrica do NMR de macacos (*Macaca mulatta*) produziu agitação geral, contrações faciais, tremores de membros e posturas agressivas de ameaça. Além disso, respostas aversivas de fuga e antinocicepção também foram observadas após a estimulação elétrica do NMR de ratos (PRADO; ROBERTS, 1985).

Morgan e Whitney (2000) verificaram, após a microinjeção de morfina ou kainato no RVM de ratos, a ocorrência de imobilidade associada à antinocicepção avaliadas pelo teste de campo aberto e placa quente, respectivamente. Com base nesses resultados, os autores concluíram que neurônios presentes no RVM participam na produção de uma resposta

comportamental integrada que tem a antinocicepção como um de seus componentes. Os resultados de Morgan e Whitney (2000) demonstram, assim, que a morfina, quando microinjetada no RVM, tem uma ação facilitatória para respostas onde prevaleça a inibição da atividade motora.

Corroborando o trabalho de Morgan e Whitney (2000), os nossos resultados demonstraram uma ação facilitatória da morfina para a resposta de IT. Sabe-se que na vigência da IT existe uma inibição da atividade motora, a qual impede a emissão do reflexo de endireitamento, permitindo que o animal permaneça em acinesia. Contudo, para que tal resposta ocorra, é necessário que projeções descendentes para motoneurônios do corno ventral da medula espinhal sejam ativadas. Assim, os nossos resultados demonstraram que a microinjeção de neurotraçador bidirecional BDA no NMR marcou positivamente fibras neurônicas e botões terminais no corno ventral da medula espinhal de cobaias, sugerindo a existência de projeções diretas, terminando em sinapses, do NMR para neurônios do corno ventral da medula espinhal (Figura 30A e B). A observação desta conexão entre o NMR e o corno ventral da medula espinhal de cobaias fornece um substrato neuroanatômico para uma possível modulação do NMR sobre os motoneurônios envolvidos com a expressão motora da resposta de IT. Corroborando nossos achados, alguns trabalhos demonstraram que neurônios do RVM se projetam para o corno ventral da medula espinhal ou para áreas do tronco encefálico relacionadas com o processamento motor (MASSON, JR.; SPARKES; RITZ, 1991; MILEYKOVSKIY; KIYASHCHENKO; SIEGEL, 2002). Adicionalmente, Foo e Mason (2005) sugeriram que neurônios do RVM modulam a atividade de neurônios da medula espinhal durante a atividade motora fásica.

Diferente da morfina, a microinjeção de carbacol (agonista colinérgico) no NMR causou a redução da duração da resposta defensiva de IT em cobaias (SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2006), indicando uma ação inibitória da neurotransmissão colinérgica no

NMR para esta resposta defensiva. Apesar do carbacol produzir uma resposta oposta à observada com a morfina no presente trabalho, provavelmente essa diferença é decorrente da ativação de receptores distintos (colinérgicos e opioidérgicos) no mesmo sítio. Isto indica que o NMR possui substrato neural para produzir tanto facilitação como inibição da resposta defensiva de IT.

Nesse sentido, Hirakawa et al. (2000) demonstraram que a manipulação do RVM foi capaz de produzir mudanças bidirecionais no estado comportamental afetivo de ratos, quando testados no modelo de condicionamento ao lugar. Nesse teste é aceito que, se o rato evitar ou preferir um dado ambiente associado a uma determinada manipulação (injeção de drogas) reflete diretamente propriedades aversivas ou de recompensa dessa manipulação. Assim, os autores verificaram que microinjeções simultâneas no RVM de um agonista alfa₁-adrenérgico (50,0 µg) e de um agonista opióide do tipo kapa (0,178 µg), fez com que os ratos evitassem o ambiente que havia sido pareado com a microinjeção dessas drogas (aversão), enquanto que apenas a microinjeção do agonista alfa₁-adrenérgico em dose mais baixa (12,5 µg) fez com que os ratos permanecessem mais tempo no ambiente que foi pareado com a microinjeção do alfa₁-adrenérgico (recompensa). Com base nesses resultados, os autores concluíram que o RVM é capaz de modificar respostas comportamentais influenciando bi-direcionalmente o estado afetivo do indivíduo.

Além disso, estudos demonstraram que a função do NMR na modulação nociceptiva também pode ser regulada de modo bidirecional, podendo o NMR exercer um efeito tanto facilitatório (pró-nocicepção) como inibitório (antinocicepção) (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991; MASON, 1991; ZHUO; GEBHART, 1997; ZHUO; SENGUPTA; GEBHART, 2002). Essas respostas facilitatórias ou inibitórias foram atribuídas à participação de diferentes tipos celulares presentes no NMR, sendo que as células classificadas como *ON* teriam ação pró-nociceptiva e as do tipo *OFF* ação antinociceptiva. Isso aponta para a

existência no NMR de um substrato neural que permite a ocorrência de uma modulação bidirecional evidenciada pela pró-nocicepção ou antinocicepção.

Atualmente, diversos trabalhos têm demonstrado que essas células possuem sua atividade relacionada à modulação de outras respostas que não apenas nociceptivas (LEUNG; MASON, 1999; FOO; MASON, 2003; FOO; MASON, 2005). Em um trabalho recente, Foo e Mason (2003) testaram a relação entre a atividade das células *ON* e *OFF* do NMR com respostas motoras evocadas por um estímulo nocivo. Os autores verificaram que o aumento na atividade das células *ON* e a redução na atividade das células *OFF* estavam associados com uma facilitação motora. Dessa forma, os autores sugeriram que essas respostas poderiam contribuir aumentando a reação do indivíduo a insultos repetidos ou sustentados, como os que ocorrem durante um confronto presa-predador, conferindo a essas células quando ativadas uma importante função protetora.

No presente trabalho, verificamos que a microinjeção de muscimol no NMR promoveu uma redução na duração da IT em cobaias. Como os “inputs” GABAérgicos são responsáveis pela pausa na atividade das células *OFF* nesse núcleo (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991; HEINRICHER; HAWS; FIELDS, 1991), provavelmente a redução da IT pelo muscimol ocorreu devido a uma inibição na atividade das células *OFF*, causando o aumento na atividade motora do animal e interferindo na resposta comportamental de IT. Tendo em vista que a redução na atividade das células *OFF* tem como consequência uma elevação da atividade motora, é possível que um aumento na atividade dessas células tenha efeito contrário, ou seja, cause uma redução na atividade motora. Isso explicaria os resultados comportamentais observados no presente trabalho após a microinjeção de morfina e bicuculina, já que a microinjeção de opióides no RVM promove o aumento na atividade das células *OFF* (FIELDS et al., 1983; HEINRICHER; MORGAN; FIELDS, 1992; HEINRICHER et al., 1994).

Com relação às respostas nociceptivas, os nossos resultados indicam que a microinjeção de morfina no NMR produziu antinocicepção, quando avaliada pelo teste de vocalização. Naturalmente, alguns trabalhos utilizando diferentes testes nociceptivos e animais experimentais demonstraram que a microinjeção de morfina no NMR é capaz de produzir antinocicepção (JONES; GEBHART, 1988; ROSSI; PASTERNAK; BODNAR, 1993). Apesar desses estudos já terem avaliado a participação do NMR na modulação de respostas nociceptivas, nenhum deles utilizou como método de avaliação algométrico o teste de vocalização e nem cobaias como animal experimental. A resposta de vocalização provocada pela aplicação de um estímulo nocivo periférico denota a participação de componentes afetivo-motivacionais da sensação dolorosa e dependem preponderantemente da ativação de estruturas supra-espinhais e do sistema límbico, o que torna esse teste diferente dos demais como o da placa quente e o de retirada de cauda.

Provavelmente, a antinocicepção observada em nossos resultados após a microinjeção de morfina no NMR, pode ser decorrente da ativação de neurônios rafe-espinhais, os quais enviam projeções via funículo dorso-lateral para o corno dorsal da medula espinhal (FIELDS et al., 1977), promovendo uma hiperpolarização dos neurônios de segunda ordem ali presentes e impedindo a propagação do impulso nocivo (BASBAUM; FIELDS, 1984). Reforçando essa hipótese, os nossos resultados obtidos com a utilização da técnica de traçamento neuronal evidenciaram a presença de fibras neurônicas e botões terminais positivamente marcados no corno dorsal da medula espinhal após a microinjeção de BDA no NMR (Figura 30C e D).

Possivelmente, o efeito antinociceptivo observado no presente trabalho seja decorrente da ativação destas projeções rafe espinhais com origem nas células do tipo OFF, pois como foi descrito, a microinjeção de morfina no RVM promove a ativação das células OFF e, conseqüentemente, induz antinocicepção (FIELDS et al., 1983b; HEINRICHER et al., 1994; FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991). Além disso, estudos de microestimulação

antidrômica demonstraram que as células do tipo *OFF* se projetam via funículo dorsolateral para medula espinhal, principalmente para o corno dorsal (FIELDS; MALICK; BURSTEIN, 1995). Como a ação da morfina em receptores opióides é principalmente inibitória (PAN; WILLIAMS; OSBORNE, 1990), a ativação das células *OFF* observada após a microinjeção de morfina no NMR ocorre por meio da inibição de interneurônios inibitórios tonicamente ativos, que estariam hiperpolarizando as células *OFF* (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991). Dados da literatura indicam que, provavelmente, esses interneurônios inibitórios são do tipo GABAérgico (HEINRICHER; CHENG; FIELDS, 1987; HEINRICHER et al., 1994; PAN; FIELDS, 1996) e a sua inibição libera circuitos neurais que desencadeiam a antinocicepção.

No presente trabalho, a microinjeção de bicuculina na concentração de 0,2 nmol/ 0,2 µl no NMR causou a redução da resposta de vocalização durante a aplicação de estímulo nocivo em cobaias, apenas na primeira medida realizada aos cinco minutos após a microinjeção, ocorrendo o retorno da resposta de vocalização a valores próximos ao do controle, nos intervalos subseqüentes (15, 30, 45 e 60 minutos). Porém, em outro grupo de animais, a microinjeção de uma concentração maior de bicuculina (0,4 nmol/ 0,2 µl) provocou uma antinocicepção que persistiu por todo o período experimental (60 min). Esses resultados reforçam a hipótese de que a inibição da atividade GABAérgica no NMR seria responsável pela desinibição de redes neurais envolvidas na ativação da via do sistema antinociceptivo descendente endógeno.

Trabalhos anteriores haviam demonstrado, também, a ação antinociceptiva da bicuculina quando microinjetada no NMR de ratos (DROWER; HAMMOND, 1988; GILBERT; FRANKLIN, 2001). Nesse contexto, foi observado que a microinjeção de bicuculina na dose de 0,1 µg no NMR produziu antinocicepção caracterizada por um aumento na latência no teste de retirada de cauda, embora essa mesma dose fosse incapaz de produzir

antinocicepção nos testes de placa quente e pinçamento (DROWER; HAMMOND, 1988). Isso demonstra que a observação dos efeitos antinociceptivos da bicuculina podem depender do teste nociceptivo utilizado e do nível de modulação do mesmo. Além disso, a antinocicepção causada pela microinjeção de bicuculina no RVM demonstrou ser também dependente da intensidade do estímulo aplicado (GILBERT; FRANKLIN, 2001). Desta forma, a microinjeção de bicuculina foi mais eficiente na produção de antinocicepção no teste de formalina quando concentrações maiores de formalina foram utilizadas.

Além disso, verificamos que a microinjeção do muscimol produziu um aumento na resposta de vocalização, possivelmente pelo aumento na atividade inibitória GABAérgica sobre os neurônios de projeção e, conseqüentemente, promovendo uma hiperalgesia evidenciada pelo aumento da vocalização. Nesse sentido, Drower e Hammond (1988) verificaram que a microinjeção do agonista de receptores GABA_A no RVM de ratos produziu hiperalgesia avaliada nos testes de pinçamento e de retirada de cauda. Essa hiperalgesia também poderia justificar a redução na duração da resposta de IT observada em nosso trabalho.

A administração do muscimol na concentração de 0,25 nmol no NMR não alterou “per se” a resposta de vocalização. Entretanto, essa mesma dose de muscimol microinjetada previamente à morfina no NMR foi capaz de inibir a ação antinociceptiva produzida pela mesma. Essa inibição perdurou apenas nos primeiros trinta minutos do experimento, o que provavelmente ocorreu devido à mais rápida metabolização do muscimol em relação à morfina. De fato, como observamos em nossos resultados, a antinocicepção produzida pela morfina permaneceu por todo o período experimental (60 min), enquanto que a hiperalgesia causada pelo muscimol na dose maior retornou a níveis próximos ao controle aos quarenta e cinco minutos do início do experimento.

Os nossos resultados corroboram a proposta de Fields, Heinricher e Mason (1991) para a modulação de resposta nociceptiva pelo NMR, onde os opióides atuam inibindo interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos, desinibindo as células *OFF* e, conseqüentemente, ativando o sistema descendente antinociceptivo endógeno produzindo analgesia, enquanto que a facilitação na atividade GABAérgica aumentaria a inibição sobre as células *OFF* e produziria pró-nocicepção.

Os outros experimentos realizados em nosso trabalho tiveram por objetivo verificar se as respostas comportamentais e nociceptivas decorrentes da estimulação colinérgica do NMR dependiam de projeções deste para o núcleo parabraquial ventral. Inicialmente, os nossos resultados demonstraram que a microinjeção de CCh no NMR produziu antinocicepção e uma redução na duração da resposta de IT. Entretanto, a microinjeção prévia de lidocaína na área PBv bloqueou ambas as respostas (antinocicepção e redução na duração da IT) mediadas pela estimulação colinérgica do NMR.

No que concerne à origem das projeções colinérgicas para o NMR, Behbehani e Zemlan (1986) demonstraram a presença de projeções excitatórias do núcleo cuneiforme para o NMR. Além disso, neste mesmo trabalho foi demonstrado que a microinjeção iontoforética de escopolamina no NMR bloqueou o efeito da estimulação do núcleo cuneiforme, sugerindo que as projeções colinérgicas possuem uma importante função no efeito do núcleo cuneiforme sobre o NRM. Corroborando a possibilidade do núcleo cuneiforme ser uma das origens de projeções colinérgicas que alcançam o NRM, a microinjeção de BDA no NMR marcou corpos celulares do núcleo cuneiforme.

Estudos anteriores, inclusive do nosso laboratório, apontavam para um efeito antinociceptivo da estimulação colinérgica do NMR (BRODIE; PROUDFIT, 1986; NUSEIR; HEIDENREICH; PROUDFIT, 1999; SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2006). Contudo, evidências neuroanatômicas e farmacológicas têm sugerido que a antinocicepção produzida

pela estimulação colinérgica de neurônios do NMR é mediada, em parte, por projeções para neurônios noradrenérgicos presentes na área PBv, os quais se projetam para o corno dorsal da medula espinhal (BRODIE; PROUDFIT, 1986; NUSEIR; HEIDENREICH; PROUDFIT, 1999). Os resultados encontrados no presente trabalho referentes à resposta nociceptiva apóiam esta sugestão, pois a inativação funcional da PBv pela lidocaína bloqueou o efeito antinociceptivo do CCh no NMR. Isto indica que a área PBv é provavelmente uma importante estação relé para essas respostas antinociceptivas mediadas pela estimulação colinérgica do NMR. Assim, corroborando os nossos resultados, Nuseir, Heidenreich e Proudfit (1999) verificaram que o grupo celular catecolaminérgico A7 mediava as respostas antinociceptivas produzidas pela microinjeção de agonistas colinérgicos no bulbo ventromedial (RVM). Pela observação dos pontos de microinjeção nesse trabalho (NUSEIR; HEIDENREICH; PROUDFIT, 1999) verificamos que os sítios das microinjeções localizaram-se em regiões equivalentes às do nosso trabalho.

Com base em evidências anatômicas, verificamos, ainda, que as projeções da PBv trafegam pelo funículo dorsolateral e alcançam o corno dorsal (laminae I – IV) da medula espinhal (CLARK; PROUDFIT, 1991b). Além disso, Hodge, Apkarian e Stevens (1986) verificaram que a estimulação elétrica do núcleo Kölliker-Fuse promoveu a inibição das respostas de células do corno dorsal a estímulos nocivos. Assim, devido à existência de projeções da PBv para o corno dorsal da medula espinhal (CLARK; PROUDFIT, 1991a) é provável que esta estrutura esteja envolvida na modulação das respostas nociceptivas. Alguns trabalhos têm demonstrado a participação dessa região na produção da antinocicepção (YEOMANS; PROUDFIT, 1992; YEOMANS et al., 1992).

Além do efeito antinociceptivo, a estimulação colinérgica do NMR também promoveu uma redução na duração da resposta de IT, sugerindo uma possível participação dessa estrutura na modulação da IT. Esses achados estão de acordo com os resultados recentes

do nosso laboratório, os quais demonstraram uma redução na duração da resposta de IT após a estimulação colinérgica do NMR (SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2006). Contudo, no presente trabalho verificamos, ainda, se a conexão entre o NMR e a área PBv poderia ser importante para a redução na duração da IT mediada pela estimulação colinérgica do NMR. Desta maneira, a inativação funcional da área PBv com lidocaína inibiu a redução na duração da IT causada pela microinjeção de CCh no NMR. Esse resultado sugere que, além das respostas antinociceptivas, a área PBv também é uma possível estação relé para as respostas comportamentais mediadas pela estimulação colinérgica do NMR.

Sabe-se que respostas comportamentais, como a IT, apresentam um componente motor muito evidente e têm sua modulação espinal localizada principalmente em regiões do corno ventral da medula espinal. Neste sentido, alguns estudos demonstraram projeções da região A7 para motoneurônios do corno ventral da medula espinal (LYONS; GRZANNA, 1988; LYONS; FRITSCHY; GRZANNA, 1989). Além disso, a região A7 é formada por neurônios noradrenérgicos, e foi demonstrado que a aplicação iontoforética de noradrenalina na medula espinal de ratos produziu um efeito facilitatório na excitabilidade dos motoneurônios (WHITE; NEUMAN, 1980). Assim, é possível que a redução na duração da resposta de IT mediado pela estimulação colinérgica do NMR ocorra por meio de projeções para neurônios noradrenérgicos da PBv, os quais se projetam para o corno ventral da medula espinal.

A microinjeção de lidocaína na PBv, seguida de salina no NMR, não alterou a resposta comportamental de IT nem a nocicepção, sugerindo que a PBv não apresenta uma atividade basal tônica responsável pela modulação dessas respostas. Contudo, a sua ativação demonstrou ser importante para redução da duração da IT e antinocicepção mediadas pela estimulação colinérgica do NMR. É interessante observar que a microinjeção de CCh na PBv também diminui a duração dos episódios de IT em cobaias (MENESCAL-DE-OLIVEIRA et al., 1994).

Finalmente, corroborando os nossos dados funcionais e fornecendo evidências neuroanatômicas para os mesmos, a microinjeção do neurotraçador bidirecional BDA no NMR demonstrou a presença de densas projeções bilaterais para a PBv. Além disso, diversas fibras neurônicas e botões terminais positivos sobre neurônios e interneurônios da PBv foram observados, sugerindo a existência de sinapses. A presença de sinapses do NMR com a PBv reforça a hipótese desta estrutura ser uma importante estação relé para algumas das respostas mediadas pela estimulação colinérgica do NMR. Sugere, ainda, que o bloqueio das respostas de redução da IT e antinociceptivas se devem à inibição de neurônios da PBv e não a um possível bloqueio de fibras de passagens.

Alguns estudos utilizando neurotraçadores demonstraram projeções do NMR para o grupo celular A7 de ratos (CLARK; PROUDFIT, 1991; HOLDEN; PROUDFIT, 1998). A injeção do traçador anterógrado *Phaseolus vulgaris*-leucoaglutinina no NMR promoveu uma densa marcação de terminais na região A7 (CLARK; PROUDFIT, 1991). Nesse mesmo estudo a injeção de um traçador retrógrado, o Fluoro-Gold, na região A7 produziu uma marcação em corpos neuroniais do NMR (CLARK; PROUDFIT, 1991). Além disso, estudos de Holden e Proudfit (1998), utilizando traçadores retrógrados e anterógrados, demonstraram a presença de neurônios do NMR que se projetavam para a região A7 pontina de ratos. A existência dessa intensa conexão entre o NMR e a PBv (região A7) sempre foi atribuída a existência de uma via NMR-PBv que estaria envolvida com a modulação de respostas nociceptivas (HOLDEN; PROUDFIT, 1998; NUSEIR; HEIDENREICH; PROUDFIT, 1999). Contudo, no presente trabalho, demonstramos que, além da modulação de respostas nociceptivas, a via NMR-PBv, possivelmente, pode estar envolvida na modulação da duração resposta defensiva de IT mediada pela estimulação colinérgica do NMR de cobaias (Figura 33).

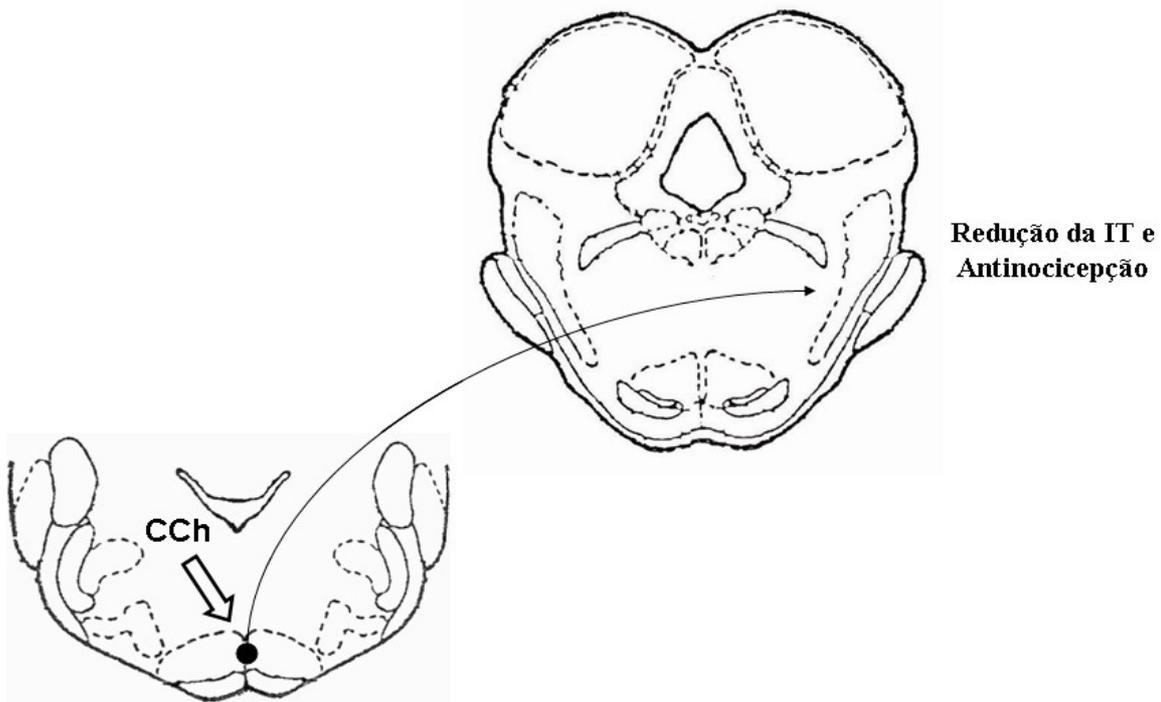


Figura 33: Desenho esquemático com base nos dados funcionais da possível via NMR-PBV envolvida na redução da duração das respostas de IT e antinociceptiva mediadas pela estimulação colinérgica do NMR.

Em suma, nossos resultados demonstram que a ativação de receptores opióides pela morfina no NMR produziu uma ação facilitatória na modulação da resposta de IT, enquanto que a neurotransmissão GABAérgica atua inibindo essa resposta. Além disso, a ação dos opióides provavelmente ocorre por meio da inibição de interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos. As alterações comportamentais observadas em nossos resultados fornecem um indicativo de que o NMR modula tanto respostas comportamentais quanto nociceptivas e que a existência de diferentes tipos celulares nessa estrutura fornece um substrato neural que permite um controle bi-direcional dessas respostas. Nesse sentido, possivelmente, as células *ON* têm uma ação pró-nociceptiva e inibitória para a resposta de IT, enquanto que as células *OFF* possuem ação facilitatória para a resposta de IT e antinociceptiva. Além disso, verificamos que a antinocicepção e a redução na resposta de IT mediados pela estimulação colinérgica do NMR dependem da conexão do NMR com a área

PBv, pois a inativação funcional desta última inibiu o efeito antinociceptivo e comportamental da estimulação colinérgica do NMR. Estes dados foram corroborados pelos estudos com tracejamento neuronal que evidenciaram projeções do NMR para a área PBv.

9 - Conclusões

A microinjeção de morfina no núcleo magno da rafe promoveu um aumento na duração da imobilidade tônica e antinocicepção. Estas respostas foram bloqueadas pela administração prévia de naloxone. Isto indica uma participação de receptores opióides do núcleo magno da rafe na modulações dessas respostas.

A microinjeção de bicuculina produziu um aumento na duração da imobilidade tônica e antinocicepção, indicando que essas respostas estão sob uma inibição GABAérgica tônica no núcleo magno da rafe.

O efeito da estimulação opioidérgica do núcleo magno da rafe é mediado por meio de uma inibição de interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos, visto que o efeito da microinjeção de morfina foi bloqueado pela administração muscimol numa dose sem efeito “*per se*”.

Corroborando resultados prévios, a estimulação colinérgica do núcleo magno da rafe promoveu uma antinocicepção e redução na duração da imobilidade tônica.

A antinocicepção e a redução da IT causadas pela da estimulação colinérgica do NMR dependem de projeções diretas do núcleo magno da rafe para a área parabraquial ventral, que foram comprovadas pela inativação funcional da área parabraquial ventral e posteriormente pelo neurotraçamento.

10 - Referências Bibliográficas

Azami J, Llewelyn MB, Roberts MH. The contribution of nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus to the analgesia produced by systemically administered morphine, investigated with the microinjection technique. *Pain* 1982; 12: 229-246.

Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7: 309-338.

Behbehani MM, Fields HL. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. *Brain Res* 1979; 170: 85-93.

Behbehani MM, Zelman FP. Response of nucleus raphe magnus neurons to electrical stimulation of nucleus cuneiformis: role of acetylcholine. *Brain Res* 1986; 369: 110-118.

Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 1995; 46: 575-605.

Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 1988; 39: 43-68.

Bolles RC, Fanselow MS. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci* 1980; 3: 291-323.

Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1987; 20: 365-383.

Bowker RM, Dilts RP. Distribution of mu-opioid receptors in the nucleus raphe magnus and nucleus gigantocellularis: a quantitative autoradiographic study. *Neurosci Lett* 1988; 88: 247-252.

Brandão ML, Anseloni VZ, Pandóssio JE, De Araújo JE, Castilho VM. Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Bibehav Rev* 1999; 23: 863-875.

Brodie MS, Proudfit HK. Hypoalgesia induced by the local injection of carbachol into the nucleus raphe magnus. *Brain Res* 1984; 291: 337-342.

Brodie MS, Proudfit HK. Antinociception induced by local injections of carbachol into the nucleus raphe magnus in rats: alteration by intrathecal injection of monoaminergic antagonists. *Brain Res* 1986; 371: 70-79.

Carli G, Farabollini F, Fontani G. Effects of pain, morphine and naloxone on the duration of animal hypnosis. *Behav Brain Res* 1981; 2: 373-385.

Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 1993; 58: 27-47.

Chance WT, Krynock GM, Rosecrans JA. Effects of medial raphe and raphe magnus lesions on the analgesic activity of morphine and methadone. *Psychopharmacology (Berl)* 1978; 56: 133-137.

Clark FM, Proudfit HK. Projections of neurons in the ventromedial medulla to pontine catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *Brain Res* 1991a; 540: 105-115.

Clark FM, Proudfit HK. The projection of noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat demonstrated by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Res* 1991b; 547: 279-288.

Dafny N, Dong WQ, Prieto-Gomez C, Reyes-Vazquez C, Stanford J, Qiao JT. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience* 1996; 70: 449-460.

Dickenson AH, Oliveras JL, Besson JM. Role of the nucleus raphe magnus in opiate analgesia as studied by the microinjection technique in the rat. *Brain Res* 1979; 170: 95-111.

Drower EJ, Hammond DL. GABAergic modulation of nociceptive threshold: effects of THIP and bicuculline microinjected in the ventral medulla of the rat. *Brain Res* 1988; 450: 316-324.

Duggan AW, North RA. Electrophysiology of opioids. *Pharmacol Rev* 1983; 35: 219-281.

Fields HL, Basbaum AI, Clanton CH, Anderson SD. Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Res* 1977; 126: 441-453.

Fields HL, Bry J, Hentall I, Zorman G. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J Neurosci* 1983a; 3: 2545-2552.

Fields HL, Vanegas H, Hentall ID, Zorman G. Evidence that disinhibition of brain stem neurones contributes to morphine analgesia. *Nature* 1983b; 306: 684-686.

Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 219-245.

Fields HL, Malick A, Burstein R. Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. *J Neurophysiol* 1995; 74: 1742-1759.

Foo H, Mason P. Discharge of raphe magnus ON and OFF cells is predictive of the motor facilitation evoked by repeated laser stimulation. *J Neurosci* 2003; 23: 1933-1940.

Foo H, Mason P. Movement-related discharge of ventromedial medullary neurons. *J Neurophysiol* 2005; 93: 873-883.

Gilbert AK, Franklin KB. GABAergic modulation of descending inhibitory systems from the rostral ventromedial medulla (RVM). Dose-response analysis of nociception and neurological deficits. *Pain* 2001; 90: 25-36.

Graeff FG. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 811-829.

Guimaraes AP, Prado WA. Pharmacological evidence for a periaqueductal gray-nucleus raphe magnus connection mediating the antinociception induced by microinjecting carbachol into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Brain Res* 1999; 827: 152-159.

Harris JA. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. *J Physiol Paris* 1996; 90: 15-25.

Heinricher MM, Cheng ZF, Fields HL. Evidence for two classes of nociceptive modulating neurons in the periaqueductal gray. *J Neurosci* 1987; 7: 271-278.

Heinricher MM, Barbaro NM, Fields HL. Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. *Somatosens Mot Res* 1989; 6: 427-439.

Heinricher MM, Haws CM, Fields HL. Evidence for GABA-mediated control of putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla: iontophoresis of bicuculline eliminates the off-cell pause. *Somatosens Mot Res* 1991; 8: 215-225.

Heinricher MM, Kaplan HJ. GABA-mediated inhibition in rostral ventromedial medulla: role in nociceptive modulation in the lightly anesthetized rat. *Pain* 1991; 47: 105-113.

Heinricher MM, Morgan MM, Fields HL. Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neuroscience* 1992; 48: 533-543.

Heinricher MM, Morgan MM, Tortorici V, Fields HL. Disinhibition of off-cells and antinociception produced by an opioid action within the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 1994; 63: 279-288.

Heinricher MM, Tortorici V. Interference with GABA transmission in the rostral ventromedial medulla: disinhibition of OFF-cells as a central mechanism in nociceptive modulation. *Neuroscience* 1994; 63: 533-546.

Hermann DM, Luppi PH, Peyron C, Hinckel P, Jouvet M. Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars alpha demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b). *J Chem Neuroanat* 1997; 13: 1-21.

Hirakawa N, Tershner SA, Fields HL, Manning BH. Bi-directional changes in affective state elicited by manipulation of medullary pain-modulatory circuitry. *Neuroscience* 2000; 100: 861-871.

Hodge CJ, Jr., Apkarian AV, Stevens RT. Inhibition of dorsal-horn cell responses by stimulation of the Kolliker-Fuse nucleus. *J Neurosurg* 1986; 65: 825-833.

Holden JE, Proudfit HK. Enkephalin neurons that project to the A7 catecholamine cell group are located in nuclei that modulate nociception: ventromedial medulla. *Neuroscience* 1998; 83: 929-947.

Jensen TS, Smith DF. Effect of emotions on nociceptive threshold in rats. *Physiol Behav* 1982; 28: 597-599.

Jones SL, Gebhart GF. Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. *Brain Res* 1988; 460: 281-296

Kalyuzhny AE, Wessendorf MW. Relationship of mu- and delta-opioid receptors to GABAergic neurons in the central nervous system, including antinociceptive brainstem circuits. *J Comp Neurol* 1998; 392: 528-547.

Klemm WR. Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("animal hypnosis"). *Neurosci Res* 1971; 4: 165-212

Kromer W, Dum JE. Mouse-killing in rats induces a naloxone-blockable increase in nociceptive threshold. *Eur J Pharmacol* 1980; 63: 195-198.

Leite-Panissi CR, Rodrigues CL, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L. Endogenous opiate analgesia induced by tonic immobility in guinea pigs. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 245-250.

Leite-Panissi CR, Menescal-de-Oliveira L. Central nucleus of the amygdala and the control of tonic immobility in guinea pigs. *Brain Res Bull* 2002; 58: 13-19.

Leite-Panissi CR, Coimbra NC, Menescal-de-Oliveira L. The cholinergic stimulation of the central amygdala modifying the tonic immobility response and antinociception in guinea pigs depends on the ventrolateral periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 2003; 60: 167-178.

Lester LS, Fanselow MS. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. *Behav Neurosci* 1985; 99: 756-759.

Leung CG, Mason P. Physiological properties of raphe magnus neurons during sleep and waking. *J Neurophysiol* 1999; 81: 584-595.

Lyons WE, Grzanna R. Noradrenergic neurons with divergent projections to the motor trigeminal nucleus and the spinal cord: a double retrograde neuronal labeling study. *Neuroscience* 1988; 26: 681-693.

Lyons WE, Fritschy JM, Grzanna R. The noradrenergic neurotoxin DSP-4 eliminates the coeruleospinal projection but spares projections of the A5 and A7 groups to the ventral horn of the rat spinal cord. *J Neurosci* 1989; 9: 1481-1489.

Mason P. The nociceptive modulatory effects of periaqueductal gray activation are mediated by two neuronal classes in the rostral ventromedial medulla. In: *The midbrain periaqueductal gray matter*, Plenum Press, New York: 287-303, 1991.

Mason P. Contributions of the medullary raphe and ventromedial reticular region to pain modulation and other homeostatic functions. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 737-777.

Masson RL Jr., Sparkes ML, Ritz LA. Descending projections to the rat sacrocaudal spinal cord. *J Comp Neurol* 1991; 307: 120-130.

Menescal-de-Oliveira L, Lico MC. Pain modulation in the adrenergically stimulated area postrema in the guinea pig. *Physiol Behav* 1977; 19: 359-364.

Menescal-de-Oliveira L, Lico MC. Pain reaction after topical NA and lesions of the obex region in the alert guinea pig. *Physiol Behav* 1982; 28: 413-416.

Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A. The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. *Behav Brain Res* 1993; 56: 127-132.

Menescal-de-Oliveira L, Brentegani MR, Pereira AF, Hoffmann A. A região parabraqueal como moduladora da imobilidade tônica em cobaias. In: XVIII Congresso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas; 1994; Montevideo, Uruguay, 232.

Mileykovskiy BY, Kiyashchenko LI, Siegel JM. Muscle tone facilitation and inhibition after orexin-a (hypocretin-1) microinjections into the medial medulla. *J Neurophysiol* 2002; 87: 2480-2489.

Monassi CR, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Participation of the periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27: 1243-1248.

Monassi CR, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Involvement of the cholinergic system and periaqueductal gray matter in the modulation of tonic immobility in the guinea pig. *Physiol Behav* 1997; 62: 53-59.

Monassi CR, Leite-Panissi CR, Menescal-de-Oliveira L. Ventrolateral periaqueductal gray matter and the control of tonic immobility. *Brain Res Bull* 1999; 50: 201-208.

Monassi CR, Menescal-de-Oliveira L. Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors in the periaqueductal gray matter differentially modulate tonic immobility in guinea pig. *Brain Res* 2004; 1009: 169-180.

Morgan MM, Whitney PK. Immobility accompanies the antinociception mediated by the rostral ventromedial medulla of the rat. *Brain Res* 2000; 872: 276-281.

Newman DB. Anatomy and neurotransmitters of brainstem motor systems. *Adv Neurol* 1995; 67: 219-244.

Nuseir K, Heidenreich BA, Proudfit HK. The antinociception produced by microinjection of a cholinergic agonist in the ventromedial medulla is mediated by noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group. *Brain Res* 1999; 822: 1-7.

Oleson TD, Kirkpatrick DB, Goodman SJ. Elevation of pain threshold to tooth shock by brain stimulation in primates. *Brain Res* 1980; 194: 79-95.

Oliveira L, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Participation of the medial and anterior hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Physiol Behav* 1997; 62: 1171-1178.

Oliveras JL, Vos B, Martin G, Montagne J. Electrophysiological properties of ventromedial medulla neurons in response to noxious and non-noxious stimuli in the awake, freely moving rat: a single-unit study. *Brain Res* 1989; 486: 1-14.

Pan ZZ, Williams JT, Osborne PB. Opioid actions on single nucleus raphe magnus neurons from rat and guinea-pig in vitro. *J Physiol* 1990; 427: 519-532.

Pan ZZ, Fields HL. Endogenous opioid-mediated inhibition of putative pain-modulating neurons in rat rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* 1996; 74: 855-862.

Prado WA, Roberts MH. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. *Brain Res* 1985; 340: 219-228.

Proudfit HK, Anderson EG. Morphine analgesia: blockade by raphe magnus lesions. *Brain Res* 1975; 98: 612-618.

Ratner SC. Comparative aspects of hypnosis. In: Gordon JE (Eds.). *Handbook of clinical and experimental hypnosis*. New York: Macmillan; 1967; 550-587.

Rodgers RJ, Randall JJ. Defensive analgesia in rats and mice. *Psychol Rec* 1987; 37: 335-347.

Rössner. W. *Stereotaktischen hirntees vom meerchwlinchen*. Palla velag, Munich, 1965.

Rossi GC, Pasternak GW, Bodnar RJ. Synergistic brainstem interactions for morphine analgesia. *Brain Res* 1993; 624: 171-180.

Sargeant AB, Eberhardt LT. Death feigning by ducks in response to predation by red foxes (*Vulpes fulva*). *Am Midland Nat* 1975; 94: 108-119.

Silva LFS, Menescal-de-Oliveira L. Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception in the NRM of guinea pig. *Physiol Behav* 2006; 87: 821-827.

Sim LJ, Joseph SA. Efferent projections of the nucleus raphe magnus. *Brain Res Bull* 1992; 28: 679-682.

Thompson RKR, Foltin RW, Boylan RJ, Sweet A, Graves CA, Lowitz CE. Tonic immobility in japanese quail can reduce the probability of sustained attack by cats. *Anim Learn Behav* 1981; 9: 145-149.

White SR, Neuman RS. Facilitation of spinal motoneurone excitability by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Brain Res* 1980; 188: 119-127.

Yeomans DC, Clark FM, Paice JA, Proudfit HK. Antinociception induced by electrical stimulation of spinally projecting noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group of the rat. *Pain* 1992; 48: 449-461.

Yeomans DC, Proudfit HK. Antinociception induced by microinjection of substance P into the A7 catecholamine cell group in the rat. *Neuroscience* 1992; 49: 681-691.

Zhuo M, Gebhart GF. Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J Neurophysiol* 1997; 78: 746-758.

Zhuo M, Sengupta JN, Gebhart GF. Biphasic modulation of spinal visceral nociceptive transmission from the rostroventral medial medulla in the rat. *J Neurophysiol* 2002; 87: 2225-2236.

11 – Apêndices

Tabelas

Tabela – 1: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de salina 0,9 % (SAL) no NMR.

Animal	Duração da IT (seg)		
	CONT	SHAM	SAL
1	385,3	367,1	611,0
2	169,1	80,4	59,4
3	160,0	439,4	87,7
4	424,2	131,9	93,9
5	327,6	545,6	494,6
6	43,2	52,2	40,0
7	119,6	102,6	38,0
Média	232,7	245,6	203,5
DP	145,5	200,2	241,9
EPM	55,0	75,7	91,4

Tabela – 2: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de 2,2 nmol de morfina (MS 2,2 nmol) no NMR.

Animal	Duração da IT (s)		
	CONT	SHAM	MS 2,2 nmol
1	81,6	82,8	256,4
2	78,6	121,2	48,4
3	209,0	383,0	220,7
4	823,9	262,8	46,0
5	168,8	90,6	127,0
6	114,8	77,6	25,6
7	96,6	199,2	703,8
8	407,4	411,6	57,0
Média	247,6	203,6	185,6
DP	256,9	135,8	226,4
EPM	90,8	48,0	80,0

Tabela – 3: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de 4,4 nmol de morfina (MS 4,4 nmol) no NMR.

Animal	Duração da IT (seg)		
	CONT	SHAM	MS 4,4 nmol
1	66,2	66,2	148,6
2	58,2	139,0	250,0
3	49,2	433,4	631,2
4	401,0	178,6	315,4
5	324,2	541,8	889,8
6	349,8	227,4	429,8
7	272,0	430,7	171,2
8	73,8	71,6	428,6
9	166,6	168,4	552,8
10	73,2	233,2	500,0
Média	183,4	249,0	431,7
DP	139,3	163,9	226,9
EPM	44,0	51,8	71,8

Tabela – 4: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), após a microinjeção de 4,4 nmol de morfina (MS 4,4 nmol) e após a microinjeção de naloxone seguido de morfina (NAL + MS) no NMR.

Animal	Duração da IT		
	CONT	MS 4,4 nmol	NAL+MS
1	48,5	500,0	500,0
2	45,4	234,0	71,8
3	401,6	777,6	12,8
4	90,2	123,0	124,8
5	59,0	936,8	308,4
6	319,2	130,6	92,8
7	211,2	227,0	334,8
8	51,8	250,0	151,0
9	119,8	245,8	113,8
10	136,2	575,4	139,8
Média	148,3	400,0	185,0
DP	124,5	283,7	149,0
EPM	39,4	89,7	47,1

Tabela – 5: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de naloxone seguido por salina 0,9 % (NAL + SAL) no NMR.

Animal	Duração da IT (seg)		
	CONT	SHAM	NAL+SAL
1	201,8	82,6	287,2
2	488,8	426,8	687,4
3	623,8	766,3	727,0
4	208,1	305,8	393,1
5	169,2	328,0	39,8
6	144,2	23,6	31,2
7	184,8	65,4	38,0
8	291,4	416,4	297,8
Média	289,0	301,9	312,7
DP	174,2	246,9	279,9
EPM	61,6	87,3	99,0

Tabela – 6: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de 0,2 nmol de bicuculina (BIC 0,2 nmol) no NMR.

Animal	Duração da IT (seg)		
	CONT	SHAM	BIC 0,2 nmol
1	407,8	540,0	565,8
2	468,4	376,6	344,8
3	95,2	322,0	94,2
4	82,4	364,8	53,8
5	100,6	248,0	65,8
6	45,4	269,6	454,4
7	94,8	69,8	1,0
8	224,8	57,8	335,2
9	191,2	108,0	63,4
10	63,2	41,4	87,6
Média	177,4	239,8	206,6
DP	148,8	167,0	199,7
EPM	47,0	52,8	63,1

Tabela – 7: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de 0,4 nmol de bicuculina (BIC 0,4 nmol) no NMR.

Animal	Duração da IT (seg)		
	CONT	SHAM	BIC 0,4 nmol
1	247,5	276,5	500,0
2	76,8	442,8	658,4
3	114,0	108,0	753,4
4	208,6	174,3	500,0
5	437,5	384,2	772,2
6	462,0	397,6	830,6
7	143,6	176,0	268,8
8	88,8	273,0	547,4
Média	222,4	279,1	603,9
DP	151,9	121,2	186,0
EPM	53,7	42,8	65,8

Tabela – 8: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de 0,25 nmol de muscimol (MUS 0,25 nmol) no NMR.

Animal	Duração da IT (seg)		
	CONT	SHAM	MUS 0,25 nmol
1	142,6	321,6	110,2
2	80,4	25,4	203,0
3	309,2	46,0	199,0
4	184,6	87,4	306,8
5	168,3	500,0	58,7
6	97,8	329,0	151,2
7	348,6	371,6	279,2
Média	190,2	240,1	186,9
DP	102,2	185,5	88,4
EPM	38,6	70,1	33,4

Tabela – 9: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de 0,5 nmol de muscimol (MUS 0,5 nmol) no NMR.

Animal	Duração da IT (seg)		
	CONT	SHAM	MUS 0,5 nmol
1	339,2	278,6	32,2
2	139,3	240,3	82,7
3	547,4	70,6	23,2
4	131,6	131,2	26,2
5	62,4	72,0	116,4
6	374,0	468,2	32,0
7	605,6	286,6	39,2
8	150,2	238,2	112,8
Média	293,7	223,2	58,1
DP	205,1	132,1	39,5
EPM	72,5	46,7	14,0

Tabela – 10: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de 0,5 nmol de muscimol seguido por 4,4 nmol de morfina (MUS + MS) no NMR.

Animal	Duração da IT (seg)		
	CONT	SHAM	MUS + MS
1	99,8	80,4	97,6
2	179,0	55,2	338,6
3	78,0	67,6	15,0
4	111,0	83,8	56,6
5	182,8	529,4	630,2
6	64,4	63,0	28,0
7	610,4	449,0	135,2
8	105,6	199,4	163,0
9	382,8	250,8	105,6
10	385,8	400,0	629,4
Média	220,0	217,9	219,9
DP	180,5	181,0	234,3
EPM	57,1	57,2	74,1

Tabela – 11: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de salina 0,9 % no NMR.

Animal	Salina					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,01	-0,08	-0,01	-0,07	-0,07
2	0,00	-0,14	0,03	-0,15	-0,37	-0,37
3	0,00	0,01	0,11	0,04	-0,10	0,05
4	0,00	0,24	-0,66	0,17	0,13	0,34
5	0,00	-0,14	-0,27	-0,34	-0,10	-0,28
6	0,00	0,22	-0,12	0,55	0,69	0,47
7	0,00	0,06	-0,07	-0,09	-0,39	0,08
8	0,00	-0,19	0,02	-0,06	-0,15	-0,37
Média	0,00	0,01	-0,13	0,01	-0,04	-0,02
DP	0,00	0,16	0,24	0,26	0,34	0,31
EPM	0,00	0,06	0,09	0,09	0,12	0,11

Tabela – 12: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de 2,2 nmol de morfina no NMR.

Animal	Morfina 2,2 nmol					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,09	0,10	-0,16	-0,44	-0,18
3	0,00	-0,16	-0,05	-0,71	-0,30	-0,79
4	0,00	-0,01	-0,01	0,01	0,01	-0,30
5	0,00	-0,14	-0,43	-0,47	-0,25	0,07
6	0,00	0,01	-0,08	-0,74	-0,39	-0,17
Média	0,00	-0,03	-0,08	-0,34	-0,23	-0,23
DP	0,00	0,10	0,18	0,34	0,19	0,31
EPM	0,00	0,04	0,08	0,14	0,08	0,13

Tabela – 13: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de 4,4 nmol de morfina no NMR.

Animal	Morfina 4,4 nmol					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	-0,07	-0,43	-0,95	-0,79	-1,00
2	0,00	-0,05	-0,39	-0,90	-0,90	-1,00
3	0,00	0,05	0,07	0,07	0,09	0,09
4	0,00	-0,77	-1,00	-0,10	0,26	-0,97
5	0,00	-1,00	-1,00	-0,62	-0,50	-0,47
6	0,00	-0,31	-1,00	-0,89	-1,00	-1,00
7	0,00	-0,25	-0,23	0,15	-0,23	-0,01
8	0,00	-0,62	-1,00	-1,00	-1,00	-0,23
Média	0,00	-0,38	-0,62	-0,53	-0,51	-0,57
DP	0,00	0,38	0,43	0,49	0,50	0,48
EPM	0,00	0,13	0,15	0,17	0,18	0,17

Tabela – 14: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção 2,7 nmol de naloxone seguido por 4,4 nmol de morfina no NMR.

Animal	Naloxone + Morfina					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,10	0,16	0,00	0,08	-0,89
2	0,00	-0,24	0,15	0,09	0,18	-0,27
3	0,00	-0,12	0,10	0,07	0,04	0,03
4	0,00	0,00	-0,06	-0,08	-0,12	-0,06
5	0,00	0,02	0,08	-0,47	-1,00	-1,00
6	0,00	-0,09	0,06	-0,20	0,06	0,03
7	0,00	-0,27	-0,02	-0,18	-0,18	-0,18
Média	0,00	-0,09	0,07	-0,11	-0,13	-0,33
DP	0,00	0,14	0,08	0,19	0,40	0,43
EPM	0,00	0,05	0,03	0,07	0,15	0,16

Tabela – 15: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção 2,7 nmol de naloxone seguido por salina 0,9 % no NMR.

Animal	Naloxone + Salina					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,57	-0,02	-0,38	0,74	0,54
2	0,00	-0,30	-0,16	0,11	-0,08	-0,05
3	0,00	0,02	-0,44	-0,71	-0,31	0,60
4	0,00	-0,25	-0,06	0,04	-0,09	0,06
5	0,00	-0,05	0,02	0,12	0,06	0,12
6	0,00	0,19	-0,06	-0,20	0,07	0,55
7	0,00	-0,26	0,02	-0,61	-0,24	-0,41
8	0,00	0,30	0,08	0,32	0,32	0,34
Média	0,00	0,03	-0,08	-0,16	0,06	0,22
DP	0,00	0,31	0,16	0,37	0,34	0,35
EPM	0,00	0,11	0,06	0,13	0,12	0,13

Tabela – 16: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção 0,2 nmol de bicuculina no NMR.

Animal	Bicuculina 0,2 nmol					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,00	-0,13	-0,28	-0,29	-0,50
2	0,00	-1,00	0,36	0,43	0,38	0,39
3	0,00	-0,03	-0,01	0,02	0,02	-0,02
4	0,00	-0,06	0,06	0,09	-0,16	-0,12
5	0,00	-0,72	-0,17	-1,00	-1,00	-1,00
6	0,00	-0,59	-0,72	-0,43	-0,85	-0,57
7	0,00	-0,26	0,10	-0,35	-0,08	0,03
8	0,00	-0,68	-0,74	-0,63	-0,04	-0,23
9	0,00	-0,21	-0,19	0,21	0,26	0,18
10	0,00	-1,00	-0,73	-0,36	-1,00	-1,00
Média	0,00	-0,46	-0,22	-0,23	-0,28	-0,28
DP	0,00	0,39	0,39	0,42	0,50	0,47
EPM	0,00	0,12	0,12	0,13	0,16	0,15

Tabela – 17: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção 0,4 nmol de bicuculina no NMR.

Animal	Bicuculina 0,4 nmol					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	-0,03	0,03	0,00	-1,00	-0,48
2	0,00	-0,55	-0,75	-1,00	-0,92	-1,00
3	0,00	-0,25	-0,01	0,02	-0,09	-0,69
4	0,00	-1,00	-0,08	-0,34	-0,81	-0,93
5	0,00	-1,00	-1,00	-0,69	-0,93	-0,37
6	0,00	-0,38	-0,23	-0,61	-1,00	-0,18
7	0,00	-1,00	-1,00	0,01	-0,83	-0,89
8	0,00	-0,31	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
Média	0,00	-0,57	-0,50	-0,45	-0,82	-0,69
DP	0,00	0,39	0,48	0,44	0,31	0,32
EPM	0,00	0,14	0,17	0,15	0,11	0,11

Tabela – 18: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção 0,25 nmol de muscimol no NMR.

Animal	Muscimol 0,25 nmol					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	-0,07	0,08	0,13	0,20	0,10
2	0,00	0,16	-0,02	-0,15	-0,02	0,03
3	0,00	0,36	0,76	1,00	1,00	0,44
4	0,00	-0,13	-0,30	-0,02	-0,32	0,02
5	0,00	-0,79	0,01	0,01	0,11	-0,02
6	0,00	0,35	0,16	0,33	0,42	0,48
7	0,00	-1,00	-1,00	0,34	-0,03	0,14
Média	0,00	-0,16	-0,04	0,23	0,19	0,17
DP	0,00	0,54	0,53	0,38	0,42	0,21
EPM	0,00	0,20	0,20	0,14	0,16	0,08

Tabela – 19: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção 0,5 nmol de muscimol no NMR.

Animal	Muscimol 0,5 nmol					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,03	0,01	-0,02	0,47	0,01
2	0,00	-0,01	-0,01	0,19	0,00	0,04
3	0,00	1,39	0,64	0,82	0,20	-1,00
4	0,00	-1,00	-0,38	0,56	0,16	0,36
5	0,00	0,31	1,53	0,63	0,58	-0,03
6	0,00	0,55	0,40	0,37	-0,45	0,37
7	0,00	-0,28	0,55	0,45	0,47	0,47
8	0,00	0,37	0,54	0,57	0,12	0,26
9	0,00	-0,75	1,00	1,00	1,00	1,00
10	0,00	-0,08	0,67	0,61	0,65	0,67
Média	0,00	0,05	0,50	0,52	0,32	0,22
DP	0,00	0,67	0,54	0,29	0,40	0,53
EPM	0,00	0,21	0,17	0,09	0,13	0,17

Tabela – 20: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção 0,25 nmol de muscimol seguido de 4,4 nmol por morfina no NMR.

Animal	Muscimol + Morfina					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	-0,03	0,09	0,11	-0,30	-0,45
2	0,00	-0,64	-0,28	-0,69	-0,34	-1,00
3	0,00	-0,61	-0,61	-1,00	-1,00	-1,00
4	0,00	0,23	-0,06	-0,48	-0,14	-0,04
5	0,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
6	0,00	0,47	0,89	0,72	-0,50	0,08
7	0,00	-0,01	0,01	-0,07	-0,58	-0,62
8	0,00	-0,11	-0,33	-0,23	-0,51	-0,59
9	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Média	0,00	-0,08	-0,03	-0,18	-0,37	-0,40
DP	0,00	0,61	0,65	0,71	0,59	0,66
EPM	0,00	0,20	0,22	0,24	0,20	0,22

Tabela – 21: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de salina 0,9% na área PBv seguido por salina 0,9% no NMR.

PBv (Salina) + NMR (Salina)			
Duração da IT (s)			
Animal	CONT	SHAM	SAL + SAL
1	123,4	115,0	132,6
2	358,0	100,8	39,6
3	70,4	23,2	37,0
4	223,6	67,8	77,4
5	99,8	60,6	98,0
6	101,8	128,6	194,0
7	75,2	227,8	121,2
8	64,8	7,3	21,0
9	231,3	475,4	540,6
Média	149,8	134,1	140,2
DP	100,0	143,6	159,8
EPM	33,3	47,9	53,3

Tabela – 22: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de salina 0,9% na área PBv seguido por carbacol (0,65 nmol/0,2µl) no NMR.

PBv (Salina) + NMR (CCh 0,65 nmol)			
Duração da IT (seg)			
Animal	CONT	SHAM	SAL + CCh
1	299,0	157,4	184,6
2	193,2	25,2	3,8
3	71,4	105,0	19,6
4	417,8	583,8	89,0
5	292,6	209,8	42,0
6	98,4	53,0	26,0
7	237,2	109,0	66,8
8	350,6	113,8	14,4
9	217,1	238,1	48,2
10	274,1	292,9	61,5
11	228,9	316,8	81,9
Média	243,7	200,4	58,0
DP	101,2	158,1	50,3
EPM	30,5	47,7	15,2

Tabela – 23: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de lidocaína 2,0% na área PBv seguido por carbacol (0,65 nmol/0,2µl) no NMR.

PBv (Lidocaína) + NMR (CCh 0,65 nmol)			
Duração da IT (seg)			
Animal	CONT	SHAM	LID + CCh
1	46,0	42,4	19,8
2	86,9	138,1	355,1
3	253,4	200,4	285,8
4	214,6	96,0	52,2
5	163,8	84,6	226,0
6	642,0	443,6	361,6
7	280,6	224,6	245,2
8	253,8	724,2	634,6
Média	242,6	244,2	272,5
DP	181,7	230,5	193,2
EPM	64,2	81,5	68,3

Tabela – 24: Durações médias, em segundos, da resposta de imobilidade tônica nos diferentes animais durante os episódios controle (CONT), pós-cirúrgico (SHAM) e após a microinjeção de lidocaína 2,0% na área PBv seguido por salina 0,9% no NMR.

PBv (Lidocaína) + NMR (Salina)			
Duração da IT (s)			
Animal	CONT	SHAM	LID + SAL
1	288,8	80,0	68,4
2	113,0	65,2	24,8
3	178,2	398,6	153,2
4	424,6	449,0	481,8
5	232,4	165,0	85,4
6	248,6	191,6	145,6
7	613,2	205,2	397,7
Média	299,8	222,1	193,8
DP	168,7	148,3	175,4
EPM	63,8	56,0	66,3

Tabela – 25: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de salina 0,9% na área PBv seguido por salina 0,9% no NMR.

Animal	PBv (Salina) + NMR (Salina)					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,18	0,07	0,00	0,30	0,09
2	0,00	0,03	0,01	0,02	-0,08	0,02
3	0,00	-0,02	0,00	-0,02	-0,09	0,05
4	0,00	0,07	0,07	0,08	0,07	0,05
5	0,00	-0,06	-0,56	-0,42	0,17	0,20
6	0,00	0,03	0,00	-0,01	-0,08	-0,16
Média	0,00	0,04	-0,07	-0,06	0,05	0,04
DP	0,00	0,08	0,24	0,18	0,16	0,12
EPM	0,00	0,03	0,10	0,07	0,07	0,05

Tabela – 26: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de salina 0,9% na área PBv seguido por carbacol (2,7 nmol/0,2µl) no NMR.

Animal	PBv (Salina) + NMR (CCh 2,7 nmol)					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	-0,20	-0,30	-0,26	-0,54	-0,60
2	0,00	0,02	-0,08	-0,22	-0,42	-0,58
3	0,00	-0,12	-0,04	-0,56	-0,66	-0,61
4	0,00	-1,00	-1,00	0,29	-0,34	-0,57
5	0,00	-0,32	-1,00	-0,91	-0,91	-0,47
6	0,00	-1,00	-0,87	-0,44	-1,00	-1,00
7	0,00	0,24	-0,01	-0,60	-0,63	-0,57
8	0,00	-0,53	-0,32	-0,56	-0,03	-0,02
9	0,00	-0,64	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
Média	0,00	-0,39	-0,51	-0,47	-0,61	-0,60
DP	0,00	0,43	0,45	0,39	0,33	0,29
EPM	0,00	0,14	0,15	0,13	0,11	0,10

Tabela – 27: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de lidocaína 2,0% na área PBv seguido por carbacol (2,7 nmol/0,2µl) no NMR.

Animal	PBv (Lidocaína) + NMR (CCh 2,7 nmol)					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,02	-0,05	-0,48	-0,58	-0,86
2	0,00	-0,79	0,12	0,05	0,11	0,11
3	0,00	0,12	0,13	0,00	-0,03	0,06
4	0,00	-0,19	-0,14	-0,19	-0,02	0,08
5	0,00	-0,05	0,06	-0,02	-0,02	-0,02
6	0,00	0,00	0,00	-0,04	-0,02	-0,01
7	0,00	-0,08	-0,16	0,04	0,09	0,11
8	0,00	0,04	0,04	0,04	0,02	-0,02
Média	0,00	-0,12	0,00	-0,08	-0,06	-0,07
DP	0,00	0,29	0,11	0,18	0,22	0,32
EPM	0,00	0,10	0,04	0,06	0,08	0,11

Tabela – 28: Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação de um estímulo nocivo nos diferentes tempos (em minutos) após a microinjeção de lidocaína 2,0% na área PBv seguido por salina 0,9% no NMR.

Animal	PBv (Lidocaína) + NMR (Salina)					
	Índice de Vocalização (tempo em minutos)					
	0	5	15	30	45	60
1	0,00	0,37	0,17	0,01	0,08	0,05
2	0,00	0,06	0,01	0,03	0,08	-0,18
3	0,00	0,16	-0,23	-0,15	-0,16	-0,02
4	0,00	-0,05	-0,04	-0,07	-0,02	-0,02
5	0,00	0,02	-0,04	0,02	0,02	0,02
6	0,00	0,03	0,06	0,03	-0,01	-0,17
7	0,00	-0,01	0,08	0,03	0,12	0,03
Média	0,00	0,08	0,00	-0,01	0,02	-0,04
DP	0,00	0,14	0,13	0,07	0,09	0,09
EPM	0,00	0,05	0,05	0,03	0,04	0,04

ARTIGO

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](#)