

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

LYS ANGELA FAVARONI MENDES

**Envolvimento da formação hipocampal dorsal na modulação
da imobilidade tônica e na nocicepção em cobaias (*Cavia porcellus*)
e a interação funcional com a área septal medial**

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LYS ANGELA FAVARONI MENDES

**Envolvimento da formação hipocampal dorsal na modulação
da imobilidade tônica e na nocicepção em cobaias (*Cavia porcellus*)
e a interação funcional com a área septal medial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Leda Menescal de Oliveira

Ribeirão Preto
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Favaroni Mendes, Lys Angela.

Envolvimento da formação hipocampal dorsal na modulação da imobilidade tônica e na nocicepção em cobaias (*Cavia porcellus*) e a interação funcional com a área septal medial / Lys Angela Favaroni Mendes; orientadora Leda Menescal de Oliveira.

-- Ribeirão Preto, 2008.

150 f. : il., 30cm.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Fisiologia) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

1. Imobilidade tônica. 2. Nocicepção. 3. Formação hipocampal dorsal. 4. Cobaia 5. Carbacol. 6. GABA. 7. Morfina 8. Área septal medial.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lys Angela Favaroni Mendes

Envolvimento da formação hipocampal dorsal na modulação da imobilidade tônica e na nocicepção em cobaias (*Cavia porcellus*) e a interação funcional com a área septal medial

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Anette Hoffmann

FFCLRP/USP

Assinatura:

Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães

FFCLRP/USP

Assinatura:

Prof. Dr. Marcus Lira Brandão

FMRP/USP

Assinatura:

Profa. Dra. Elisabeth Spinelli de Oliveira

FMRP/USP

Assinatura:

Profa. Dra. Leda Menescal-de-Oliveira

FMRP/USP

Assinatura:

À minha Família,

Sem ela nenhum sonho seria possível
ou valeria a pena...

À minha mãe, Sonia Maria Favaroni Mendes
por ser sinônimo de bondade e amor

Ao meu pai José Vasco Mendes
por ser muito mais que um exemplo a ser seguido

À minha irmã Katia Regina Favaroni Mendes
por me fazer por os pés-no-chão

Aos meus avós Lourenço Favaroni (*in memoriam*) e Antonieta
por mesmo de longe torcerem muito por mim...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre tomar conta de mim.

À minha orientadora, profa. Leda Menescal-de-Oliveira, por me abrir as portas do laboratório, por acreditar no meu trabalho, pela amizade e pelo exemplo de competência.

A Profa. Dra. Elisabeth Spinelli de Oliveira, ou simplesmente e carinhosamente Beth, pelo seu exemplo, pela sua disponibilidade infinita, por eu sempre saber que posso contar com você e principalmente, por você ser, acima de tudo, minha amiga.

Ao Prof. Dr. Marcus Lira Brandão, Prof. Dr. Francisco Silveira Guimarães, Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra e a Profa. Dra. Anette Hoffmann pelas valiosas contribuições e por aceitarem participar da minha banca.

À Mariulzinha pelo seu trabalho como técnica, por compartilhar suas experiências, por ser nossa mãezona e por suas infundáveis histórias; à Cidinha por “dar uma mão” sempre que precisei e pela sua paciência e calma eternas e ao Rubinho por seus trabalhos de histologia, por seu bom-humor contagiante e por ser um churrasqueiro de mão cheia.

Ao Ruy, por todo o amor, carinho, paciência, por segurar na minha mão e me compreender em todos os momentos difíceis, por me apoiar sempre e por ser capaz de deixar minha vida mais leve e alegre. Agradeço também a toda a sua família pela torcida constante por mim.

Ao Mateus e ao Márcio pelo constante clima de paz e harmonia no laboratório e pelas nossas inúmeras, interessantes e diversificadas conversas.

Ao Felipe, “filho único” quando cheguei, me acolheu de braços abertos no laboratório. Valeu Fluminense !

Ao pessoal muito querido do laboratório vizinho, Fabiana e Ana Catarina, pelas muitas conversas, desabafos, choros e risos e principalmente ao meu amigo queridíssimo “bendito é o fruto”... Augusto.

Às pessoas muito especiais com as quais tive a grande sorte de me unir, uma galera animada e companheira com as quais compartilho momentos inesquecíveis.... a carinhosamente chamada “Trupe do Cursão”: Ernane, Augusto, André, Fabi, Fabíola, Wagner, Lígia, Daniel, Renata, Lilian, Marina, Talita, Sabrina.

Às amigas mais do que queridas, pessoas com as quais os assuntos não terminam nunca.... por eu poder contar sempre e poder contar tudo... Fabíola, minha irmã mais velha; Evelyn, minha irmãzinha de todas as horas, Fabi, minha irmã psicóloga, Dézão minha irmã “das cadeiras” e do Rio Grande, e finalmente minha irmã gêmea univitelina Fernanda Méo.

Aos meus amigos eternos... Thiago, Claudinha, Alessandra, André, Ronalds, Thaís e Léo.

Ao Rildo, à Joice, e a Cleyde pela amizade e pela disponibilidade no auxílio das dúvidas de inglês.

Aos meus amigos queridos da fisiologia, Miriam, Danúbia, Fernandinha, os Ricardos, Jão, Paulinha, Cármen, Leandro (e Paty), Berél, Marcelão.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia Léo, Eduardo, Clóvis, Maria Luisa (Lô), Elisa, Cláudia, Carlos e Fernandinho pela competência com que realizam suas funções, por serem sempre prestativos e por criar um ambiente de trabalho bastante agradável.

Aos muitos animais utilizados no aprendizado das técnicas e no experimento em si, meus mais sinceros respeito e agradecimento.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Se quisermos progredir, não devemos repetir a história, mas fazer uma história nova.

Gandhi

RESUMO

FAVARONI MENDES, L. A. **Envolvimento da formação hipocampal dorsal na modulação da imobilidade tônica e na nocicepção em cobaias (*Cavia porcellus*) e a interação funcional com a área septal medial.** 2008. 150 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A imobilidade tônica (IT) é uma resposta comportamental defensiva inata, na qual ocorre perda do reflexo de endireitamento, depressão dos reflexos polissinápticos extensores e flexores e relativa redução na reatividade a estímulos ambientais. Estudos prévios do laboratório mostraram que a formação hipocampal dorsal (FHD) e o sistema colinérgico estão envolvidos na modulação da IT em cobaias. A estimulação colinérgica da FHD diminui a duração dos episódios de IT e este efeito, provavelmente, é mediado por receptores muscarínicos. Numerosas evidências fisiológicas, farmacológicas e comportamentais sugerem o envolvimento da FHD em respostas nociceptivas. Além disso, acredita-se que parte das funções desempenhadas pela FHD ocorre por meio de aferentes provenientes da área septal medial (ASM). Dessa maneira, os objetivos do presente estudo foram: 1) investigar a possibilidade da FHD de cobaias modular a duração dos episódios de IT e a resposta nociceptiva, por meio da interação de mecanismos colinérgicos, opioidérgicos e GABAérgicos e 2) investigar a participação de uma possível conexão funcional entre FHD e ASM na regulação da resposta comportamental de IT. Os resultados mostram que a microinjeção de morfina diminuiu a duração do comportamento defensivo de IT e o índice de vocalização que indica antinocicepção, efeitos esses bloqueados pela administração prévia de naloxone, um antagonista preferencial μ -opióide. A administração de bicuculina no mesmo sítio produziu diminuição da duração dos episódios de IT e antinocicepção. Ao contrário, o tratamento com o muscimol na FHD promoveu hiperalgesia e um aumento na duração da resposta comportamental de IT. A microinjeção do agonista colinérgico carbacol na FHD promoveu uma redução na nocicepção, medida pelo teste de vocalização em cobaias e esse efeito foi bloqueado pela microinjeção prévia da atropina, indicando a participação de

receptores muscarínicos na modulação dessa resposta. Além disso, o efeito da administração do carbacol e da morfina na FHD foi revertido pelo pré-tratamento com naloxone microinjetado no mesmo local, sugerindo uma interação colinérgica-opioidérgica nesse substrato neural modulando o comportamento defensivo de IT e antinocicepção. A microinjeção de muscimol, por sua vez, preveniu o efeito antinociceptivo e a redução da IT provocada pela morfina. Juntos, esses resultados sugerem que a transmissão colinérgica pode ativar a liberação de endorfinas/enkefalinas de interneurônios da FHD, que, por sua vez inibiria neurônios GABAérgicos, resultando assim em antinocicepção e no término do comportamento de IT. Nossos resultados nos permitem sugerir, portanto, que na FHD os mesmos sistemas neurotransmissores, colinérgico, opioidérgico e GABAérgico podem modular os sistemas defensivo e antinociceptivo de maneira independente. Dessa maneira, a ativação hipocampal produz diminuição da duração da IT e antinocicepção, como promovido pelas microinjeções de carbacol, morfina e bicuculina nesse sítio. Por outro lado, a inativação da FHD produz aumento da duração da IT e hiperalgesia como visto pela microinjeção de muscimol nesse local. Em relação a conexão ASM-FHD, nossos resultados mostraram que a participação da ASM na modulação da IT parece depender de sua eferência colinérgica para a FHD, enquanto que o contrário não é verdadeiro. Isso sugere que a FHD pode modular a IT possivelmente via conexões com outras estruturas encefálicas.

Palavras-chave: Imobilidade Tônica. Nocicepção Formação hipocampal dorsal. Cobaia. Carbacol. GABA. Morfina. Área septal medial.

ABSTRACT

FAVARONI MENDES, L. A. **Role of the dorsal hippocampus in modulation of nociception and tonic immobility and the functional interaction of dorsal hippocampus with septal medial area in guinea pigs.** 2008. 150 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Tonic immobility (TI), also known as death feigning or animal hypnosis, is an innate defensive behavior, characterized by a state of physical inactivity and relative irresponsiveness to environmental stimuli. Our group has previously reported that dorsal hippocampus (DH) and the cholinergic system are involved in the modulation of TI in guinea pigs. The cholinergic stimulation of the DH decreases the duration of TI episodes and it has been postulated that this effect is mediated by muscarinic receptors. Several physiological, pharmacological and behavioral lines of evidence suggest that the hippocampal formation is involved in nociception. Furthermore, some works suggests that the DH performs part of its functions by means of afferents from medial septal area (MSA). On this basis, the objectives of the present study were: 1) to investigate in guinea pigs the possibility that the DH modulates TI episodes and nociception by an interaction of cholinergic, opioidergic and GABAergic mechanisms and 2) to investigate the participation of a possible functional MSA-DH connection in guinea pigs in the regulation of the TI response. Microinjection of morphine decreased TI behavior and vocalization index, effects blocked by previous administration of naloxone, an opioid antagonist. We also observed that the administration of bicuculline into the DH produces antinociception and diminution of the duration of TI episodes. On the contrary, the treatment with muscimol into the DH promoted an increase in TI duration and hyperalgesia. Microinjection of the cholinergic agonist carbachol into the DH promoted a reduction in nociception, measured by the vocalization test in guinea pigs and this effect was blocked by the previous microinjection of the cholinergic antagonist atropine, demonstrating the participation of muscarinic receptors also in the modulation of this response. Furthermore, the effect of the administration of carbachol and morphine into the DH

was reversed by pre-treatment with naloxone microinjected into the same site, suggesting cholinergic-opioidergic interaction in this neural substratum modulating the defensive behavior of TI and antinociception. In addition, the muscimol microinjection prevented the antinociceptive effect and it also reduced the TI promoted by morphine. Taken together, these results suggest that cholinergic transmission may activate the release of endorphins/enkephalin from interneurons of the DH, which would inhibit GABAergic neurons, resulting in antinociception and ending of TI behavior. Our results suggest that in the DH the same neurotransmitter system, the cholinergic, opioidergic and GABAergic modulate the defensive and antinociceptive systems independently. Importantly, the hippocampal activation frequently produces diminution of the duration of TI episodes and antinociception, like the one promoted by microinjections of carbachol, morphine and bicuculline in this region. Furthermore, the hippocampal inactivation produces hyperalgesia and produces an increase in TI duration. The same results were observed after muscimol administration. The participation of MSA on TI modulation seems to depend on its cholinergic efference to DH, while the participation of DH on TI modulation seems not depend on its efference to MSA.

Keywords: Tonic Immobility. Nociception. Dorsal Hippocampus. Guinea pig. Carbachol. GABA. Morphine. Septal medial area.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASL	área septal lateral
ASM	área septal medial
ATR	sulfato de atropina
BIC	bicuculina (bicuculline methiodide)
CA	corno de Amon
CCh	carbacol (cloridrato de carbamilcolina)
CGM	corpo geniculado medial
cm	centímetro
EPM	erro padrão da média
FH	formação hipocampal
FHD	formação hipocampal dorsal
FHV	formação hipocampal ventral
GABA	ácido γ -aminobutírico
h	hora
Hz	hertz
ip	intraperitoneal
IT	imobilidade tônica
IV	índice de vocalização
kg	quilograma
LID	cloridrato de lidocaína
mA	miliampere
min	minuto
mg	miligrama
μ l	microlitro
mm	milímetro
MOR	sulfato de morfina
MUS	muscimol
NAL	cloridrato de naloxone
nmol	nanomol
NPT	núcleo posterior do tálamo
s	segundo
SAL	salina
SCP vl	substância cinzenta periaquedutal ventrolateral
V	volt

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	01
2- OBJETIVOS.....	14
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1- Animais.....	15
3.2- Delineamento Experimental.....	15
3.3- Imobilidade Tônica.....	17
3.4- Teste Algesimétrico de Vocalização.....	17
3.5- Procedimento Cirúrgico.....	18
3.6- Experimento “Sham” e Microinjeção Intracerebral de Drogas.....	19
3.7- Perfusão e Histologia	20
3.8- Drogas.....	20
3.9- Grupos Experimentais.....	21
3.10- Análise dos Resultados.....	25
4- RESULTADOS.....	27
4.1- Experimento 1.....	27
4.2- Experimento 2.....	42
4.3- Experimento 3.....	66
5- DISCUSSÃO.....	75
6- CONCLUSÕES.....	88
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
8 -APÊNDICE.....	101

1) INTRODUÇÃO

Dentre as funções básicas animais, certamente, as que mais os expõe a situações de perigo iminente são aquelas relacionadas ao forrageamento e a reprodução. A procura por alimento e por parceiros aumenta potencialmente as chances de um animal se deparar com estímulos ameaçadores, como predadores, competidores e co-específicos. Em seu ambiente natural ou em situações experimentais, o animal faz uso de mecanismos específicos de defesa ao se sentir ameaçado ou ser inequivocamente atacado. Estes mecanismos de defesa podem ser morfológicos (como espinhos, couraça e coloração de advertência), fisiológicos (como toxinas) ou comportamentais (como a evitação do predador e a emissão de comportamentos anti-predatórios) e atuam reduzindo a probabilidade do encontro com o predador ou aumentando suas chances de sobrevivência da presa (ver RODGERS; RANDALL, 1987; KAVALIERS; CHOLERIS, 2001).

Segundo RATNER (1967), os comportamentos defensivos obedecem a uma hierarquia distância-dependente, em que a presa executaria uma estratégia de defesa de acordo com a distância em relação ao predador. Em situações em que o perigo é incerto ou potencial, como ocorre quando o animal se encontra em um ambiente novo ou em determinado local em que já houve um encontro com o predador, a presa apresenta um comportamento denominado avaliação de risco, ou “risk assessment” (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Em ratos, esse comportamento consiste em um farejar contínuo do ambiente, acompanhado de uma postura abaixada, com o tronco estirado, abertura máxima dos olhos e estiramento das orelhas (BLANCHARD; BLANCHARD, 1988).

Uma vez que a presa já detectou fisicamente o predador, porém este pode ainda não tê-la identificado, a resposta defensiva mais frequentemente apresentada pela presa é o congelamento. Nessa fase, a presa permanece de olhos bem abertos, há inibição da atividade

locomotora, a respiração se torna irregular e ocorre aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca (FANSELOW, 1980; BLANCHARD; BLANCHARD, 1988). Na medida em que o predador se aproxima, a presa passa a emitir comportamentos de defesa ativos. Primeiramente, a presa inicia o comportamento de fuga e posteriormente, no momento em que é alcançada, passa a apresentar o comportamento de luta. Finalmente, quando o contato físico já foi estabelecido, a presa emite a resposta comportamental de imobilidade tônica (IT) como último recurso defensivo a ser utilizado para a manutenção de sua vida (RATNER, 1967; GALLUP, 1974; PRESTRUDE; JOHNSTONE, 1977; RODGERS; RANDALL, 1987).

A IT também conhecida por “hipnose animal”, catalepsia ou “fingir de morto”, caracteriza-se por ser uma resposta comportamental defensiva inata, na qual ocorre redução na reatividade a estímulos externos, perda do reflexo de endireitamento e depressão dos reflexos polissinápticos extensores e flexores (KLEMM, 1971). No estado de acinesia em que o animal permanece durante a IT o tônus muscular encontra-se aumentado bem como o limiar sensorial para estímulos externos. Entretanto, durante a IT o animal é capaz de monitorar o ambiente em que se encontra sendo capaz de detectar o melhor momento para interromper ou sair do estado de imobilidade (KLEMM, 1971).

Uma vez que a IT aumenta as chances de sobrevivência do animal, pode-se dizer que ela apresenta um alto valor adaptativo, o qual pode ser exemplificado pelos achados de Sargeant e Eberhardt (1975), que observando raposas em seu ambiente natural, relataram que os ataques a patos selvagens cessavam quando esses exibiam a resposta de IT, o que aumentou as suas chances de sobrevivência em mais de 50%. Dessa forma, a sobrevivência do animal dependeria de sua capacidade de parecer imóvel, desestimulando assim o predador a dar continuidade ao ataque (RODGERS; RANDALL, 1987).

O valor adaptativo da IT é ainda reforçado pelo fato de que, para alguns predadores, o movimento da presa é um estímulo necessário para desencadear (HERZOG; BURGHARDT, 1974) ou continuar um ataque predatório (SARGEANT; EBERHARDT, 1975; THOMPSON et al., 1981). Adicionando-se ao fato de que vários predadores atacam preferencialmente presas vivas, (GALLUP, 1974; HERZOG; BURGHARDT, 1974; SARGEANT; EBERHARDT, 1975), a adoção reflexa de uma postura imóvel pode minimizar ou pelo menos reduzir a probabilidade de um novo ataque e ainda permitir o escape da presa.

A IT está presente no repertório comportamental de uma grande variedade de espécies, tanto de invertebrados (CRAWFORD, 1977) como de vertebrados (THOMPSON, 1977) e pode ser desencadeada por diferentes tipos de estímulos sensoriais. Segundo Klemm (1971), pelo menos em mamíferos, as estimulações tátil e proprioceptiva são críticas para a indução dessa resposta (KLEMM, 1971), enquanto que, a intensa experiência de medo gerada no confronto presa/predador contribuiria para seu desencadeamento e duração (GALLUP, 1974).

No laboratório, a IT pode ser induzida manualmente por meio da inversão postural do animal seguida pela contenção de seus movimentos. Essa resposta é bastante variável, tanto em relação à susceptibilidade individual quanto a duração de cada episódio. Acredita-se que a susceptibilidade seja dependente de aspectos genéticos (MCGRAW; KLEMM, 1973) e filogenéticos (VÖLGYESI, 1966 apud MCGRAW; KLEMM, 1973), bem como de desenvolvimento neural (SVORAD, 1957; MCGRAW; KLEMM, 1969) e experiência prévia adquirida (RATNER; THOMPSON, 1960).

Durante a emissão de comportamentos defensivos, incluindo a resposta de IT, ocorre simultaneamente a ativação de um sistema analgésico endógeno (CARLI et al., 1976). A ativação desse sistema de analgesia, na vigência de uma situação ameaçadora, como no confronto presa-predador, é de extrema importância, pois permite que a presa efetue de maneira adequada a estratégia comportamental mais compatível com a situação que se

apresenta (BOLLES; FANSELOW, 1980). Na ausência da ativação desse sistema analgésico endógeno, a resposta natural do animal, após sofrer uma injúria no confronto com o predador, seria a de iniciar comportamentos recuperativos, que consistem no repouso e em cuidados com o corpo, os quais não seriam condizentes com a preservação da vida do animal. O tipo do sistema analgésico endógeno ativado dependeria da natureza do estímulo e também da reação defensiva que este desencadeia (RODGERS; RANDALL, 1987). Nas respostas de defesa ativa como fuga ou luta, a analgesia endógena associada parece ser a do tipo não-opiídeo, de dissipação rápida que dura em torno de 10 min, enquanto que durante a IT uma resposta que pode durar de segundos a horas, a analgesia associada seria a do tipo opiídeo, de dissipação mais lenta e de duração de aproximadamente 40 min (RODGERS; RANDALL, 1987).

Dentro desse contexto, Leite-Panissi et al. (2001) encontraram uma diminuição nas respostas a testes algosimétricos (teste da formalina e teste da placa quente) após a indução de episódios de IT, indicando que houve uma possível ativação de mecanismos analgésicos endógenos. A hipoalgesia encontrada foi bloqueada pelo pré-tratamento com o antagonista preferencial μ -opiídeo, o naloxone. Esses resultados sugerem, portanto, que durante a resposta comportamental defensiva de IT ocorre à ativação de mecanismos analgésicos endógenos e que estes envolvem sinapses do tipo opiídeo.

Vários estudos têm correlacionado estruturas encefálicas envolvidas tanto na modulação da resposta comportamental de IT quanto na antinocicepção, incluindo a área parabraqueal (MENESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMANN, 1993; KATAYAMA et al., 1984), a substância cinzenta periaquedutal (BASBAUM; FIELDS, 1984; MONASSI et al., 1997; 1999), o hipotálamo lateral (DAFNY et al., 1996; DE OLIVEIRA et al., 1997), a amígdala (LEITE-PANISSI et al., 1999; OLIVEIRA; PRADO, 2001) e a formação hipocampal dorsal (McKENNA E MELZAC, 1992; BAPTISTA, 2000).

Sabe-se há muito tempo que a formação hipocampal dorsal (FHD) é uma região relacionada, principalmente, a aspectos do aprendizado e memória (ver JARRARD, 1993; COLOMBO et al., 1998; WITTENBERG; TSIEN, 2002; KRYUKOV, 2005; WHITLOCK et al., 2006; SILHOL et al., 2007). Entretanto, trabalhos com diferentes abordagens, têm demonstrado que essa estrutura pode também estar envolvida na modulação de diferentes tipos de comportamentos, como defensivo (BAPTISTA, 2000; PENTKOWSKI et al., 2006), social (GARRITANO et al., 1996), exploratório (ALVAREZ; BANZAN, 1985), maternal (LEUNER et al., 2007) e de alerta (MIYASHITA; WILLIAMS, 2004). Além disso, estados emocionais como medo condicionado e estresse podem provocar alterações na atividade da FH (JOSEPH, 1998; PAVLIDES et al., 2002; MCECHRON et al., 2003; MURAKAMI et al., 2005; TRIVEDI; COOVER, 2006).

Vale destacar que estudos da literatura mais antigos (LICO et al., 1974), já haviam demonstrado a existência da modulação límbica, com participação do hipocampo, nas mensagens dolorosas.

Mais recentemente, estudos neuroanatômicos e de neuroimagem também demonstraram a participação do hipocampo no processamento central e na modulação da nocicepção (LATHE, 2001; PLOGHAUS et al., 2001). Prado e Roberts (1985) e Brandão et al. (1991) verificaram que a estimulação do hipocampo dorsal de ratos produziu uma antinocicepção que não foi acompanhada por respostas aversivas. Também, McKenna e Melzack (1992) relataram que a injeção de lidocaína (anestésico local) no giro denteado reduziu os escores de dor, enquanto que estímulos dolorosos produziram mudanças na atividade neuronal hipocampal. Wei et al. (2000) demonstraram que 35% das células piramidais de CA1 não só respondem a estimulação nociva periférica, como também são capazes de codificar a intensidade da estimulação.

A formação hipocampal (FH) é uma estrutura bilateral de origem prosencefálica que compõe o sistema límbico, o qual é formado por estruturas cerebrais filogeneticamente mais antigas que o neocórtex (ver DOUGLAS, 1967). A FH é composta pelo giro denteado, subiculum e hipocampo (regiões CA1, CA2 e CA3) e juntamente com a formação retrohipocampal (área retrosplenial, pré-subiculum, parasubiculum e córtex entorrinal) compreendem uma região denominada área hipocampal (OJIKI et al., 2000).

A área hipocampal apresenta uma citoarquitetura com características relativamente incomuns no sistema nervoso central, uma vez que grande parte de suas projeções intrínsecas são únicas e unidirecionais. Nesse sentido, do córtex entorrinal origina-se a via perforante, a qual é a principal eferência para o giro denteado. Os axônios das células granulares do giro denteado, por sua vez, projetam-se para a área CA3 do hipocampo, através das distintas fibras musgosas. Um padrão similar unidirecional ocorre também em outras importantes conexões intrínsecas hipocampais, como as existentes entre as regiões CA3 e CA1, e desta para o subiculum (AMARAL; WITTER, 1995).

Tanto o giro denteado quanto o hipocampo apresentam uma organização laminar e são formados por três camadas celulares. No giro denteado as células granulares são chamadas de células principais, e seus axônios formam as fibras musgosas, as quais expressam de maneira importante ambos os aminoácidos excitatório e inibitório, glutamato e GABA respectivamente (STORM-MATHISEN; FONNUM, 1972; SLOVITER et al., 1996), além de algumas fibras também apresentarem peptídeos opióides como a dinorfina. No hipocampo, o elemento celular principal são as grandes células piramidais que variam consideravelmente em relação a seu comprimento e organização. Além dessas células, uma grande quantidade e variedade de outros tipos celulares estão presentes nessas estruturas e são chamados de células não-principais sendo, em sua maioria, imunoreativas ao GABA (RIBAK et al., 1978). Dentre

essas células, devemos destacar, em particular, as células em cesto (basket cells), que formam plexos (pericelulares) ao redor das células principais (ver AMARAL; WITTER, 1995).

Complexas interações entre mediadores químicos são encontradas em todas as sub-áreas da FH, como demonstram estudos imunohistoquímicos e eletrofisiológicos. Blasco-Ibanez et al. (1998) encontraram, em todas as sub-áreas do hipocampo, vários interneurônios imunoreativos a metil-encefalina que foram co-localizados com GABA, VIP (peptídeo intestinal vasoativo) e calretinina. Por meio de marcadores neuronais foi demonstrado que todos os botões imunoreativos a encefalina analisados, efetuam contatos sinápticos com estruturas GABAérgicas. Baseado nessas características, células que contém encefalina no hipocampo são classificadas como interneurônios especializados em inervar outros interneurônios (BLASCO-IBANEZ et al., 1998). Esses mesmos autores mostraram que a encefalina pode exercer uma importante função na sincronização e regulação de tempo de inibição envolvido na rede de atividades rítmicas do hipocampo.

Racz et al. (1998) sugeriram que a ativação de diferentes subtipos de receptores opioidérgicos em alguns sítios hipocampais, poderia promover ações antagônicas, assim como estariam envolvidos na liberação de L-glutamato e dinorfina em fibras musgosas de cobaias (GANNON; TERRIAN, 1992; SALIN et al., 1995).

Na região CA3 hipocampal são encontrados receptores muscarínicos e nicotínicos em ambas as células principais e interneurônios (LEVEY et al., 1995; ALBUQUERQUE et al., 1997; McQUISTON; MADISON, 1999), enquanto que receptores μ -opiídes são encontrados quase que exclusivamente em neurônios inibitórios na região CA1 (ARVIDSSON et al., 1995; DRAKE; MILNER, 1999, 2002), embora nem todos os subtipos de interneurônios possuam esses receptores (DRAKE; MILNER, 2002).

Sabe-se que o processamento de informações no hipocampo ocorre, muitas vezes, por meio de desinibições neurais. Assim, interneurônios encefálinérgicos (BLASCO-IBANEZ et

al., 1998), GABAérgicos (MISGELD; FROTSCHER, 1986) ou mesmo outros neurônios opioidérgicos (ZIEGLGÄNSBERGER et al., 1979) poderiam promover desinibições por inibirem botões GABAérgicos.

Também no hipocampo, as células não-principais, que podem participar tanto dos circuitos inibitórios de feedback ou de inibição recíproca, podem estar sob controle inibitório GABAérgico septal (FREUND; ANTAL, 1988). Além disso, Misgeld e Frotscher (1986) observaram que as células GABAérgicas não-piramidais são inibidas pela bicuculina de maneira significativa (GULYÁS et al., 1990), evidenciando assim a participação de receptores GABA_A na FH.

A FH conecta-se com um número relativamente pequeno de estruturas subcorticais de maneira recíproca (AMARAL; WITTER, 1995) e entre essas estruturas pode-se destacar uma em especial que também integra o sistema límbico e é responsável pela principal via aferente subcortical hipocampal, a área septal.

A via septo-hipocampal origina-se no complexo ASM/BDB (área septal medial/banda diagonal de Broca) e apresenta como seu principal neurotransmissor a acetilcolina, seguido pelo GABA (ácido γ -aminobutírico) e glutamato (AMARAL; KURZ, 1985; WAINER et al., 1985; BRASHEAR et al., 1986; SOTTY et al., 2003; COLOM et al., 2005).

Fibras septais dirigem-se para a FH e terminam, essencialmente, em todos os campos do giro denteado (AMARAL; WITTER, 1995). A ASM também recebe aferências hipocampais, mais especificamente de determinadas subpopulações de neurônios não-principais (ALONSO e KÖHLER, 1982; SCHWERDTFEGER E BUHL, 1986). Entretanto, neurônios piramidais do hipocampo projetam-se principalmente para a área septal lateral (ALONSO; KÖHLER, 1982; LERANTH; FROTSCHER, 1989). Tóth e Freund (1992) mostraram que, pelo menos parte dos neurônios hipocampais que se projetam para a ASM são GABAérgicos e que a maioria dos terminais hipocampo-septais efetuam contatos sinápticos

também com neurônios GABAérgicos (LERANTH; FROTSCHER, 1989). Esses neurônios GABAérgicos da ASM projetam-se de volta para o hipocampo, e inervam preferencialmente os neurônios hipocampais não-principais (FREUND; ANTAL, 1988; GULYÁS et al., 1991). Além disso, Amaral e Witter (1995) mostraram que também neurônios glutamatérgicos integram a via hipocampo-septal.

A integridade das aferências da ASM para o hipocampo é responsável pela geração, assim como pela manutenção do ritmo teta hipocampal (FARIS; SAINSBURY, 1990; BUZSAKI, 2002), um potencial de campo periódico implicado na atenção e memória. Acredita-se que o componente colinérgico seja responsável pela modulação da amplitude enquanto que o componente GABAérgico regularia sua frequência (LEE et al., 1994; APARTIS et al., 1998). Além disso, a conexão recíproca entre ASM e hipocampo seria também responsável pelas oscilações teta hipocampais (BUZSAKI et al., 1983; DRAGOI et al., 1999).

O ritmo teta apresenta uma frequência de 4-12 Hz, é também chamado de atividade rítmica lenta (ARL), e coincide com a atividade muscular fásica, a qual ocorre durante a locomoção ou alteração postural. Por outro lado, durante a manutenção da postura estática, mesmo que um esforço muscular considerável seja requerido, como o que se observa na IT, predomina a atividade irregular lenta de grande amplitude (AIL) (VANDERWOLF, 1988).

Klemm (1970) demonstrou que, durante episódios de IT em coelhos, o ritmo teta hipocampal foi reduzido, e que a estimulação sensorial evocou ritmo teta transitório. Os coelhos apresentam ritmo teta hipocampal distinto durante a recuperação do reflexo de endireitamento, o que caracteriza o fim do episódio de IT. Harper (1971) e Hatton et al. (1975) verificaram que não houve mudança imediata no registro do eletroencefalograma (EEG) coincidente com a indução da IT. Segundo Klemm (1971), o aparecimento da AIL no hipocampo e no neocórtex de coelhos após um longo período de IT poderia corresponder à

redução da inibição exercida por essas estruturas sobre regiões reticulares bulbares. Acredita-se ainda, que a ocorrência do ritmo teta relacionado com eventos sensoriais, indique que os animais apresentam a mesma habilidade de processar informações sensoriais que os animais que não estejam em IT (WHISHAW et al., 1982). Isso parece ser vantajoso, pois desta maneira o animal mantém a capacidade de perceber e aproveitar as possíveis oportunidades de fuga.

Monmaur e Breton (1991) e Monmaur et al. (1997) demonstraram que, a injeção de carbacol no complexo septal, em uma dose que facilita o ritmo teta hipocampal, resulta em um aumento na atividade de levantar do animal, enquanto que a atropina bloqueou esse comportamento. Da mesma maneira, resultados encontrados no laboratório mostraram que o pré-tratamento da ASM com o agonista muscarínico carbacol promove uma redução na duração dos episódios de IT, enquanto que a microinjeção prévia com atropina reverte esse efeito.

Resultados semelhantes foram relatados por Dudar et al. (1979) que observaram um aumento significativo da liberação de acetilcolina do hipocampo durante estimulação sensorial e a movimentação em ratos. Já Flicker e Geyer (1982) demonstraram que microinjeções contínuas do agonista colinérgico, carbacol, aplicadas bilateralmente no hipocampo dorsal de ratos, provocam um aumento dose-dependente na atividade locomotora e no comportamento de levantar desses animais. Além disso, esse efeito foi antagonizado pela co-injeção de uma dose inefetiva de atropina, sugerindo que o controle da atividade locomotora poderia, em alguns casos, depender da ativação dos receptores muscarínicos hipocampais (FLICKER; GEYER, 1982).

Esses dados estão em concordância com os resultados encontrados por Baptista (2000), o qual mostrou que a microinjeção de carbacol na FHD de cobaias promoveu uma diminuição na duração dos episódios de IT, comportamento este contrário a atividade

locomotora do animal. Também neste caso, a prévia microinjeção de atropina, numa dose que “per se” não promoveu alteração nesse comportamento, foi capaz de prevenir essa resposta. Em uma dose maior, entretanto, a atropina promoveu um aumento no tempo de permanência em IT, indicando a efetiva participação de receptores muscarínicos. Esses resultados sugerem que a estimulação do sistema colinérgico da FHD estaria inibindo a resposta comportamental defensiva de IT, enquanto que o bloqueio colinérgico seria responsável pelo aumento na duração dessa resposta comportamental.

A ablação bilateral do hipocampo dorsal (WOODRUFF et al., 1975) e a administração do agente anticolinérgico escopolamina via sistêmica (WOODRUFF et al., 1976) aumentaram a susceptibilidade e a duração da IT em coelhos. O hipocampo poderia então, funcionar não somente de maneira a inibir o movimento, mas também como parte de um sistema que atenuaria a IT, permitindo ao animal iniciar outro comportamento (WOODRUFF et al., 1975). Além das evidências da participação do sistema colinérgico na modulação da resposta de IT (WOODRUFF et al., 1976; MENESCAL-DE-OLIVEIRA; HOFFMANN, 1993; BAPTISTA, 2000), também fazem parte da modulação desse comportamento, vários outros sistemas de neurotransmissores, tais como serotoninérgico (HISAMITSU et al., 1992; MONASSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2004; LEITE-PANISSI et al., 2006), adrenérgico (THOMPSON; JOSEPH, 1978), GABAérgico (MONASSI et al., 1999; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002), dopaminérgico (ETTINGER; THOMPSON, 1978), e encefalinérgico (FARABOLLINI et al., 1990).

Uma interação entre três desses sistemas neurotransmissores (colinérgico, opioidérgico e GABAérgico) já foi descrito na modulação do comportamento de IT em pelo menos duas estruturas encefálicas, a substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCP vl) e o núcleo central da amígdala (MONASSI et al., 1999; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002). Monassi et al. (1999) sugerem que na SCP vl existe um mesmo circuito

de neurotransmissores responsável tanto pela modulação da IT em cobaias, quanto pela regulação da antinocicepção. Acredita-se que na SCP vl a microinjeção de carbacol ativaria neurônios opioidérgicos, os quais por sua vez, inibiriam neurônios GABAérgicos. Estes últimos desinibiriam neurônios de eferência da SCP vl e promoveriam a ativação de uma via descendente que possivelmente modula a resposta de IT.

No núcleo central da amígdala as estimulações colinérgica, opioidérgica e GABAérgica teriam ações inibitórias sobre os episódios de imobilidade em cobaias, diferentemente do que ocorre na SCP vl. No núcleo central da amígdala, sugeriu-se haver uma interação colinérgica-opioidérgica que seria responsável pela modulação da resposta defensiva de IT e que o circuito GABAérgico nessa estrutura participaria de maneira tônica e inibitória da modulação desse comportamento em cobaias. Finalmente, foi proposto que no núcleo central da amígdala a administração de morfina ou muscimol ativariam o mesmo circuito neuronal envolvido na modulação da resposta de IT. Assim, é possível que a ação opióide na modulação da IT no núcleo central da amígdala não ocorra por inibição do sistema GABAérgico como proposto para a SCP vl, pois tanto a estimulação opioidérgica como a GABAérgica do núcleo central da amígdala promoveram diminuição da duração da IT.

Dentre as poucas estruturas subcorticais que apresentam conexões recíprocas com a FH (AMARAL; WITTER, 1995), a amígdala e a área septal também estão relacionados a modulação da resposta comportamental de IT (KINA et al., 1994; LEITE-PANISSI et al., 1999), a modulação da nocicepção (SCHVARCZ, 1993; HOSOI et al., 1997; OLIVEIRA; PRADO, 2001; LEITE-PANISSI et al., 2004), assim como a FHD.

Dessa forma, o intuito do presente trabalho foi averiguar a hipótese da interação na FHD dos sistemas neurotransmissores (colinérgico, opioidérgico e GABAérgico) na modulação da IT e nocicepção, semelhante ao que ocorre em outras estruturas do sistema

nervoso central. Além disso, outro aspecto abordado foi a possível interação funcional entre a FHD e a ASM na modulação da IT em cobaias.

2) OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram avaliar, na formação hipocampal dorsal (FHD) de cobaias:

- a participação do sistema GABAérgico e opioidérgico na modulação da resposta defensiva de IT;
- a participação dos sistemas opioidérgico, GABAérgico e colinérgico na resposta nociceptiva avaliada pela resposta de vocalização induzida por um estímulo nocivo periférico;
- a interação entre os sistemas colinérgico, opioidérgico e GABAérgico na modulação do comportamento de IT e na nocicepção;
- um possível envolvimento da conexão funcional com a ASM na modulação da resposta comportamental de IT.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Animais

Foram utilizadas 242 cobaias (*Cavia porcellus*) machos adultos de 400-500 g provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto/USP. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (56 x 37 x 39 cm) forradas com maravalha e em grupos de cinco. Os animais receberam água e alimento (ração para cobaia e capim fresco) *ad libitum* e permaneceram em condições controladas de fotoperíodo (12/12 h) e temperatura (24 ± 1 °C). Esse trabalho foi submetido e aprovado (proc. nº 032/2004) pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) desta faculdade.

3.2) Delineamento Experimental

As representações esquemáticas referentes aos procedimentos realizados em cada um dos experimentos estão ilustrados nos diagramas 1 e 2.

Nos experimentos referentes ao teste comportamental de IT (experimentos 1 e 3) foram utilizados 138 animais, enquanto que, para o experimento referente ao teste algesimétrico de vocalização (experimento 2) foram utilizados 104 animais. Todos os animais utilizados neste trabalho foram submetidos à cirurgia para a implantação bilateral de cânulas-guia na FHD por procedimento estereotáxico. Nos animais do experimento 3 foram implantadas também cânulas-guia na ASM.

Diagrama 1: Representação esquemática dos procedimentos realizados para a medida da duração da resposta comportamental de IT (experimentos 1 e 3). No primeiro dia foi realizado o experimento controle, no qual os animais foram submetidos a cinco manobras de inversão postural e contenção para a determinação da duração da resposta de IT. No dia seguinte, esses

animais foram submetidos ao procedimento estereotáxico para implante de cânulas-guia na(s) estrutura(s) em estudo. Nos dias que se seguiram à cirurgia (5-6 dias) os animais passaram por um período de recuperação no biotério do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP. Após esse período foi realizado o procedimento “sham” e no dia seguinte, a microinjeção da droga. Em alguns grupos foi realizada uma segunda microinjeção após 24 horas. Ao término do experimento foi realizada a perfusão intracardíaca e remoção do encéfalo.

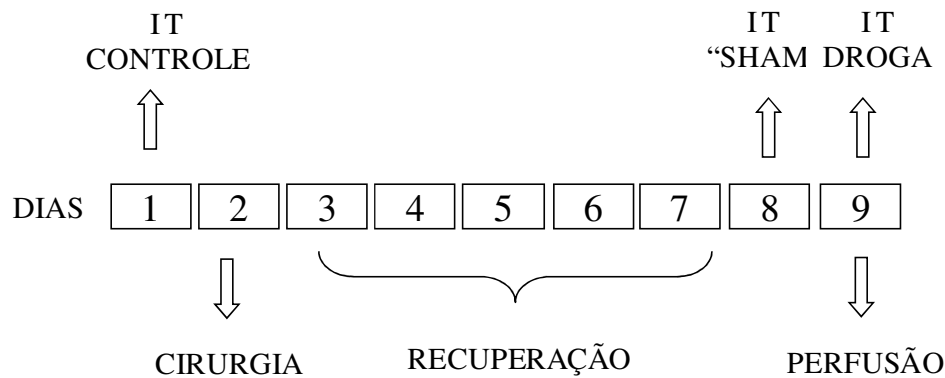
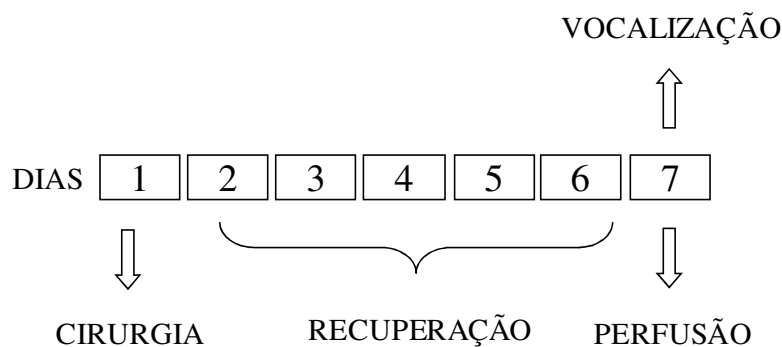


Diagrama 2: Representação esquemática dos procedimentos realizados no teste algesimétrico de vocalização (experimento 2). Os animais foram submetidos ao procedimento estereotáxico no primeiro dia, passaram por um período de recuperação (5-6 dias) e foram então submetidos ao teste algesimétrico de vocalização. Ao término do experimento foi realizada a perfusão intracardíaca e remoção do encéfalo.



3.3) Imobilidade Tônica

O procedimento de IT foi realizado somente pela manhã para evitar interferência de flutuações circadianas na sensibilidade do animal. Em uma sala experimental, os animais foram colocados em uma calha em forma de “V” acolchoada com espuma onde permaneceram de 15 a 20 min para habituação. Durante o procedimento experimental, a sala permaneceu na penumbra e com o condicionador de ar ligado para que houvesse um ruído constante. A indução da IT consistiu na inversão postural e contenção manual do animal até que este não mais apresentasse resistência à postura invertida (decúbito dorsal). As mãos que estavam sobre o animal foram removidas e a duração do episódio de IT foi cronometrado até o momento em que o animal retornasse à sua postura habitual. A manobra da IT foi realizada cinco vezes em cada animal e entre o término de um episódio e nova manobra de indução houve um intervalo aleatório de 40-90 s. Somente foram utilizados nos experimentos 1 e 3 aqueles animais que foram considerados susceptíveis, ou seja, aqueles animais que permaneceram, em média, pelo menos 45 s na postura de IT no primeiro dia de experimento (controle).

3.4) Teste Algesimétrico de Vocalização

Um par de eletrodos de aço-inox não isolados (0,3 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento) foi implantado na região subcutânea da coxa do animal para a emissão do estímulo periférico nocivo. Em seguida, a cobaia foi semi-contida numa caixa de acrílico preenchida com espumas de nylon. Após o tempo de habituação (10 a 15 min), os animais foram submetidos à estimulação periférica nociva (choque liberado por um gerador de corrente na região subcutânea da coxa) proferido por um estimulador de ondas quadradas (confeccionado na FMRP/USP). A estimulação nociva de duração de três segundos apresentava as seguintes características: frequência de 100 Hz, duração de 5 ms e intensidade

de 0,5 a 4 V, o que corresponde aproximadamente a uma corrente de 0,6 a 4 mA. Inicialmente, os estímulos eram de 0,5 V e a intensidade aumentava progressivamente (de 0,5 em 0,5 V) até que se determinasse o limiar de vocalização do animal. O limiar de vocalização foi estabelecido como sendo a menor intensidade capaz de induzir uma resposta de vocalização após três estimulações consecutivas. Estabelecido este limiar, duas estimulações subseqüentes foram aplicadas para a obtenção da linha de base (registro controle). As drogas foram então microinjetadas na FHD e a amplitude da vocalização foi registrada em um polígrafo nos intervalos de tempo de 2, 5, 15, 30, 45 e 60 minutos. 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) em um dos canais do polígrafo (Nihon Kohden), que converteu a vocalização em um sinal elétrico. O registro das repostas de vocalização foi feito numa velocidade de 5 mm/s. A amplitude dos picos do registro gráfico é proporcional à intensidade da vocalização do animal, desse modo, a média dos picos de cada resposta representa um índice confiável da magnitude da vocalização. A vocalização do animal induzida por um estímulo nocivo periférico é interpretada como um índice de dor.

3.5) Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de cetamina (40 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por via intramuscular. Após a tricotomia e a injeção subcutânea de lidocaína com vasoconstritor no dorso da cabeça, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico para animais de pequeno porte (David-Kopff Instruments, EUA). Posteriormente, foi realizada uma incisão média no escalpo seguida da exposição da calota craniana, na qual foram feitos orifícios com auxílio de uma broca odontológica acoplada a um motor elétrico. Em um dos orifícios foi rosqueado um parafuso para a fixação do capacete de

acrílico. Nos demais orifícios foram implantadas cânulas-guia confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (0,6 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento). As cânulas-guia foram posicionadas na FHD (AP: 6,4 mm a partir do Bregma; L: 2,8 e - 2,8 mm a partir da linha média e P: 7,6 mm a partir da barra auricular) e no experimento 3 também na ASM (AP: - 1,1 mm a partir do Bregma; L: 0,2 mm a partir da linha média e P: - 6,0 mm a partir da calota craniana) segundo as coordenadas estereotáticas do Atlas de Rössner para cobaias (RÖSSNER, 1965). A extremidade inferior da cânula-guia foi mantida um mm acima da região em estudo e foi fixada comacrílico polimerisável.

3.6) Experimento “Sham” e Microinjeção Intraencefálica de Drogas

Após a recuperação cirúrgica (5-6 dias), os animais dos experimentos 1 e 3 foram submetidos ao teste de IT precedido pelo procedimento “sham” (controle pós-cirúrgico) e nos dias que se seguiram à microinjeção de drogas, respectivamente. O procedimento “sham” consistiu em inserir a agulha injetora na cânula-guia sem que fosse feita a microinjeção de droga alguma.

A microinjeção foi realizada por meio de uma agulha dental (Mizzi, EUA) de 15 mm de comprimento por 0,3 mm de diâmetro externo conectada a uma microseringa Hamilton (10 µl) por meio de um segmento de polietileno de aproximadamente 45 cm. A microinjeção foi efetuada durante 60 s e a agulha permaneceu acoplada à cânula-guia por mais 40 s, para evitar o refluxo da solução. A medida da duração da IT foi realizada dois minutos após a administração da droga, ou no caso do bloqueio, após a administração da segunda droga (agonista).

3.7) Perfusão e Histologia

Após o término do experimento, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, ip) e foi realizada a perfusão intracardíaca com solução fisiológica (0,9%) seguida de formol (10%). Os encéfalos foram removidos e embebidos primeiramente em paraformaldeído, por pelo menos 48 h, e posteriormente em sacarose, por pelo menos 24 h. Foram realizados cortes coronais de 40 µm de espessura e as lâminas foram coradas pela técnica de Nissl.

3.8) Drogas

As drogas que foram microinjetadas, morfina (sulfato de morfina; MOR), naloxone (hidrocloreto de naloxone; NAL), muscimol (MUS), bicuculina (bicuculline methiodide; BIC), lidocaína (cloridrato de lidocaína; LID) e carbacol (cloridrato de carbamilcolina; CCh) foram obtidas da Sigma (St. Louis, MO, EUA), e a atropina (sulfato de atropina; ATR) foi obtida da Merck Sharp and Dohme (Darmstadt, Alemanha). Todas as drogas foram dissolvidas em veículo (NaCl 0,9%, SAL) proveniente da Samtec Bioecnologia (Ribeirão Preto, SP) e o volume aplicado foi o de 0,2 µl em todos os experimentos. As doses utilizadas foram baseadas em estudos anteriores (KINA et al., 1994, BAPTISTA, 2000; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002; LEITE-PANISSI et al., 2004).

As drogas utilizadas no procedimento cirúrgico foram o cloridrato de cetamina (Agener União, Embu-Guaçu, SP), a xilazina da (Laboratórios Calier SA, Barcelona, Espanha) e a lidocaína (cloridrato de lidocaína + epinefrina) (DFL Indústria e Comércio SA, Rio de Janeiro, RJ).

3.9) Grupos experimentais

EXPERIMENTO 1: EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS OPIOIDÉRGICOS, GABAÉRGICOS E COLINÉRGICOS NA FHD SOBRE A RESPOSTA COMPORTAMENTAL DEFENSIVA DE IMOBILIDADE TÔNICA EM COBAIAS

Todos os grupos experimentais foram submetidos ao teste de susceptibilidade (experimento controle) e “sham” (procedimento fictício) anteriormente às microinjeções das drogas.

Para avaliar a participação opioidérgica da FHD sobre a modulação da resposta comportamental de IT em cobaias, foi realizada a microinjeção do agonista opioidérgico morfina, nas doses de 1,1 e 2,2 nmol e do antagonista opioidérgico naloxone na dose de 1,3 nmol. Além disso, também realizamos o bloqueio opioidérgico por meio da administração do antagonista, seguida da microinjeção do agonista.

Grupo 1: os animais receberam microinjeção de solução salina (NaCl 0,9%) na FHD (n=8).

Grupo 2: os animais receberam microinjeção de morfina (1,1 nmol) na FHD (n=8) .

Grupo 3: os animais receberam microinjeção de morfina (2,2 nmol) na FHD (n=9).

Grupo 4: os animais receberam microinjeção de naloxone (1,3 nmol) na FHD (n=6).

Grupo 5: os animais receberam microinjeção de morfina (2,2 nmol) na FHD no primeiro dia após o experimento “sham”. No segundo dia, os animais receberam microinjeção de naloxone (1,3 nmol) na FHD, seguido da microinjeção de morfina (2,2 nmol) após 10 minutos (n=9).

Para avaliar a participação GABAérgica da FHD sobre a modulação do comportamento de IT em cobaias, foi realizada a microinjeção do antagonista GABAérgico bicuculina nas doses de 0,2 e 1 nmol e do agonista GABAérgico muscimol nas doses de 0,5 e 1,0 nmol.

Grupo 6: os animais receberam microinjeção de bicuculina nas doses de 0,2 e 1 nmol na FHD em dias consecutivos (n=13).

Grupo 7: os animais receberam microinjeção de muscimol (0,5 nmol) na FHD (n=9).

Grupo 8: os animais receberam microinjeção de muscimol (1,0 nmol) na FHD (n=7).

Para o estudo da interação entre os sistemas colinérgico e opioidérgico da FHD sobre a modulação do comportamento de IT, foi realizado o bloqueio opioidérgico por meio da administração do antagonista naloxone, seguida da microinjeção do agonista colinérgico muscarínico carbacol.

Grupo 9: os animais receberam microinjeção de carbacol (2,7 nmol) na FHD no primeiro dia após o experimento “sham”. No segundo dia, os animais receberam microinjeção de naloxone (1,3 nmol) na FHD, seguido da microinjeção de carbacol (2,7 nmol) após 10 minutos (n=10).

Para avaliar a interação entre os sistemas opioidérgico e GABAérgico da FHD sobre a modulação do comportamento de IT foi realizada a microinjeção do agonista GABAérgico muscimol, seguida da microinjeção do agonista opioidérgico morfina.

Grupo 10: os animais receberam microinjeção de morfina (2,2 nmol) na FHD no dia seguinte ao experimento “sham”. No dia posterior, os animais receberam microinjeção de muscimol (0,5 nmol) na FHD, seguido da microinjeção de morfina (2,2 nmol) após 10 minutos (n=9).

EXPERIMENTO 2: EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS OPIOIDÉRGICOS, GABAÉRGICOS E COLINÉRGICOS NA FHD SOBRE A NOCICEPÇÃO AVALIADA PELA RESPOSTA DE VOCALIZAÇÃO INDUZIDA POR UM ESTÍMULO NOCIVO PERIFÉRICO EM COBAIAS

Para verificar a participação do sistema opióide da FHD na modulação da nocicepção induzida pela estimulação nociva periférica, os animais receberam microinjeções do agonista

opioidérgico morfina (1,1 e 2,2 nmol), do antagonista opioidérgico naloxone (1,3 nmol) e do bloqueio opióide (NAL+MOR).

Grupo 1: os animais receberam microinjeção de solução salina (NaCl 0,9%) na FHD (n=6).

Grupo 2: os animais receberam microinjeção de morfina (1,1 nmol) na FHD (n=6).

Grupo 3: os animais receberam microinjeção morfina (2,2 nmol) na FHD (n=7).

Grupo 4: os animais receberam microinjeção de naloxone (1,3 nmol) na FHD (n=7).

Grupo 5: os animais receberam microinjeção de naloxone (1,3 nmol) seguido pela microinjeção de morfina (2,2 nmol) na FHD (n=7).

Para verificar a participação do sistema GABAérgico da FHD na modulação da nocicepção induzida pela estimulação nociva periférica, foram utilizados o antagonista GABAérgico bicuculina em duas doses diferentes (0,2 e 1 nmol) e o agonista GABAérgico muscimol nas doses de 0,5 e 1,0 nmol.

Grupo 6: os animais receberam microinjeção de bicuculina (0,2 nmol) na FHD (n=7).

Grupo 7: os animais receberam microinjeção de bicuculina (1,0 nmol) na FHD (n=8).

Grupo 8: os animais receberam microinjeção de muscimol (0,5 nmol) na FHD (n=9).

Grupo 9: os animais receberam microinjeção de muscimol (1,0 nmol) na FHD (n=7).

Para verificar a participação do sistema colinérgico da FHD na modulação da nocicepção induzida pela estimulação nociva periférica, os animais receberam microinjeções do agonista colinérgico carbacol (2,7 nmol), do antagonista colinérgico atropina (0,7 nmol) e foi também realizado o bloqueio colinérgico por meio da administração do antagonista seguido da microinjeção do agonista.

Grupo 10: os animais receberam microinjeção de carbacol (2,7 nmol) na FHD (n=8).

Grupo 11: os animais receberam microinjeção de atropina (0,7 nmol) na FHD (n=7).

Grupo 12: os animais receberam microinjeção de atropina (0,7 nmol) seguida após 10 minutos de carbacol (2,7 nmol) na FHD (n=7).

Para verificar a interação entre os sistemas colinérgico e opioide da FHD na modulação da nocicepção induzida pela estimulação nociva periférica, os animais receberam a microinjeção do antagonista opioide naloxone, seguida pela microinjeção do agonista muscarínico carbachol.

Grupo 13: os animais receberam microinjeção de naloxone (1,3 nmol) e após 10 minutos receberam a microinjeção de carbachol (2,7 nmol) na FHD (n=9).

Para verificar a interação entre os sistemas opioide e GABAérgico da FHD na modulação da nocicepção induzida pela estimulação nociva periférica, os animais receberam a microinjeção do agonista GABAérgico muscimol, seguida pela microinjeção do agonista opioide morfina.

Grupo 14: os animais receberam microinjeção de muscimol (0,5 nmol) seguido pela microinjeção de morfina (2,2 nmol) na FHD (n=9).

EXPERIMENTO 3: ESTUDO DA CONEXÃO FUNCIONAL ENTRE FHD E ASM NA MODULAÇÃO DA IMOBILIDADE TÔNICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE

Nesse experimento foi avaliada uma possível interação funcional entre FHD e ASM sobre a modulação do comportamento de IT. Inicialmente foram realizados os seguintes grupos controles:

Grupo 1: os animais receberam microinjeção de salina (NaCl 0,9%) na FHD e após 10 minutos receberam a microinjeção de salina (NaCl 0,9%) na ASM (n=5).

Grupo 2: os animais receberam microinjeção de salina (NaCl 0,9%) na FHD seguida após 10 minutos de carbachol (5,4 nmol) na ASM (n=6).

Grupo 3: os animais receberam microinjeção de salina (NaCl 0,9%) na FHD e após 10 minutos receberam a microinjeção de muscimol (1,0 nmol) na ASM (n=6).

Posteriormente, foram realizados dois grupos experimentais nos quais a FHD foi inibida pela microinjeção de lidocaína ou atropina e a ASM foi estimulada pelo carbacol.

Grupo 4: os animais receberam microinjeção de lidocaína (2%) na FHD e após 10 minutos receberam a microinjeção de carbacol (5,4 nmol) na ASM (n=7).

Grupo 5: os animais receberam microinjeção de atropina (0,7 nmol) na FHD seguida após 10 minutos de carbacol (5,4 nmol) na ASM (n=6).

Na última parte do experimento, foi realizado o bloqueio (com lidocaína ou muscimol) da ASM seguido da estimulação colinérgica da FHD.

Grupo 6: os animais receberam microinjeção de lidocaína (2%) na ASM e após 10 minutos receberam a microinjeção de carbacol (2,7 nmol) na FHD (n=13).

Grupo 7: os animais receberam microinjeção de muscimol (1,0 nmol) na ASM seguida após 10 minutos de carbacol (2,7 nmol) na FHD (n=7).

3.10) Análise dos resultados

Os resultados dos experimentos referentes IT foram expressos como média (referente aos valores médios das durações dos cinco episódios de IT) e erro padrão da média (EPM). A duração da IT (em segundos), foi analisada por meio da Análise de Variância para Medidas Repetidas (ANOVA RM) e as diferenças encontradas foram identificadas pelo pós-teste de Duncan.

Nos experimentos referentes ao teste de vocalização, mediu-se a amplitude dos picos do registro poligráfico e a média de cada resposta foi interpretada como sendo uma medida quantitativa de nocicepção. Os resultados (em milímetros) foram transformados em índice de vocalização (Ivoc) utilizando-se a fórmula: $Ivoc = (\text{média de vocalização} - \text{valor da linha de base}) / \text{valor da linha de base}$. Para a comparação dos grupos experimentais, foi realizada a análise de variância de duas vias para medidas repetidas (Two Way RM ANOVA), nas quais

as variáveis foram tempo (fator repetido) e tratamento (fator independente), seguido, quando necessário pelo pós-teste de Duncan.

Para todos os experimentos, os dados foram considerados estatisticamente significantes para $p < 0,05$. O programa estatístico utilizado foi o Sigma Stat versão 3.1.

4) RESULTADOS

4.1) Experimento 1

EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS OPIOIDÉRGICOS, GABAÉRGICOS E COLINÉRGICOS NA FHD SOBRE A RESPOSTA COMPORTAMENTAL DEFENSIVA DE IMOBILIDADE TÔNICA EM COBAIAS

A média dos episódios de IT dos animais (grupo 1) que receberam o pré-tratamento do veículo (SAL, $170 \pm 25,0$ s) na FHD não diferiu significativamente ($p > 0,05$) dos experimentos controle ($191 \pm 32,2$ s) e “sham” ($162 \pm 26,1$ s). Os dados estão representados na figura 1A.

Nossos resultados mostraram que após receberem a microinjeção de 1,1 nmol de morfina (grupo 2), o tempo de permanência em IT foi reduzido significativamente ($F_{(2,14)}=4,610$, $p=0,029$). Os valores encontrados foram: controle $120 \pm 36,6$ s, “sham” $122 \pm 45,3$ s e morfina $76 \pm 28,1$ s (figura 2A).

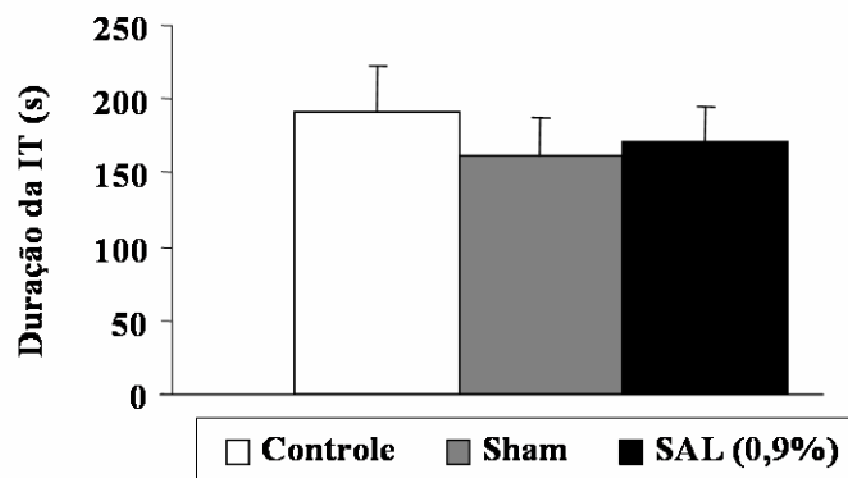
Uma diferença ainda maior ($F_{(2,16)}=12,178$, $p < 0,001$) foi encontrada no grupo que recebeu a dose de 2,2 nmol de morfina (grupo 3). Após a aplicação de morfina a duração da IT diminuiu para $40 \pm 9,7$ s (figura 3A), comparado com seu controle ($134 \pm 19,9$ s) e “sham” ($125 \pm 30,9$ s).

A microinjeção de 1,3 nmol do antagonista opioide naloxone (grupo 4), por sua vez, não alterou os resultados obtidos anteriormente à sua aplicação ($p > 0,05$). As durações dos episódios de IT encontradas foram: controle $74 \pm 15,2$ s, “sham” $93 \pm 18,2$ s e naloxone $128 \pm 33,9$ s (figura 4A).

Para a realização do bloqueio opioide, os animais foram pré-tratados com morfina no primeiro dia de experimento e no segundo dia receberam a microinjeção de

naloxone seguido pela morfina (grupo 5). A análise estatística ($F_{(3,24)}=12,303$, $p<0,001$) mostrou que após receberem microinjeções bilaterais de 2,2 nmol de morfina, os animais diminuíram o tempo de permanência em IT (figura 5A), assim como observado no grupo 3. O bloqueio realizado com o naloxone preveniu os efeitos da morfina, mantendo a duração da IT semelhante aos dos procedimentos controle e “sham”. Os valores encontrados foram: controle $178 \pm 37,4$ s, “sham” $157 \pm 38,1$ s, morfina (2,2 nmol) $81 \pm 15,8$ s e naloxone (1,3 nmol) + morfina (2,2 nmol) $171 \pm 36,3$ s.

A



B

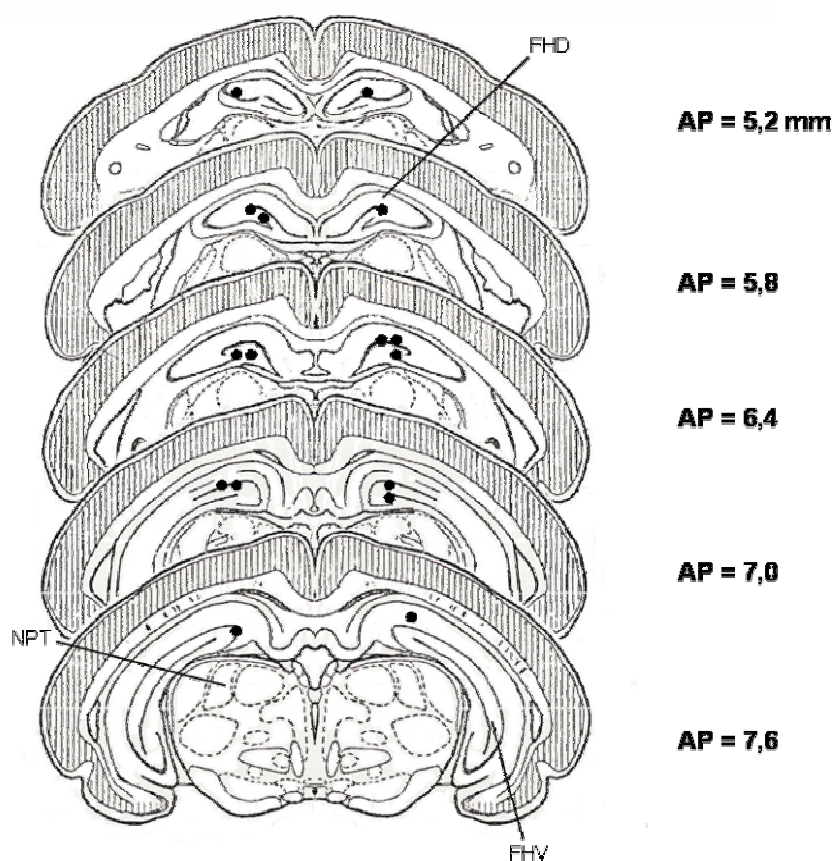
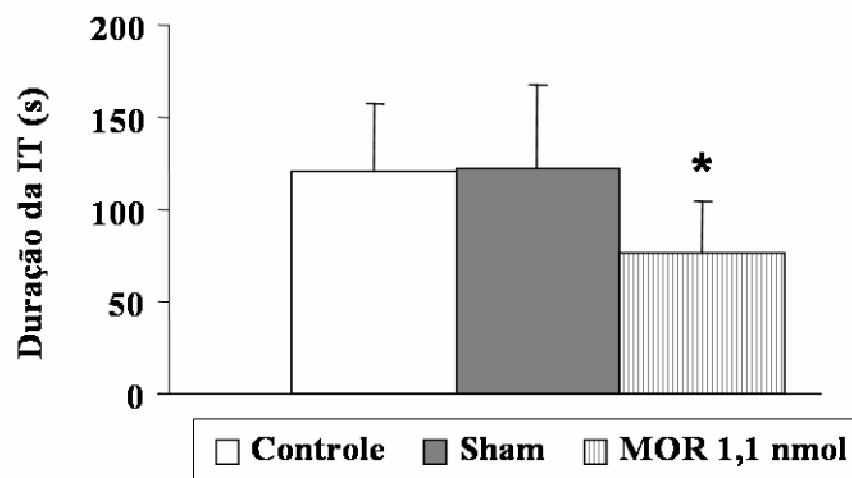


Figura 1: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=8) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de SAL (0,9%) na FHD (grupo I). As barras verticais representam o EPM. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

A



B

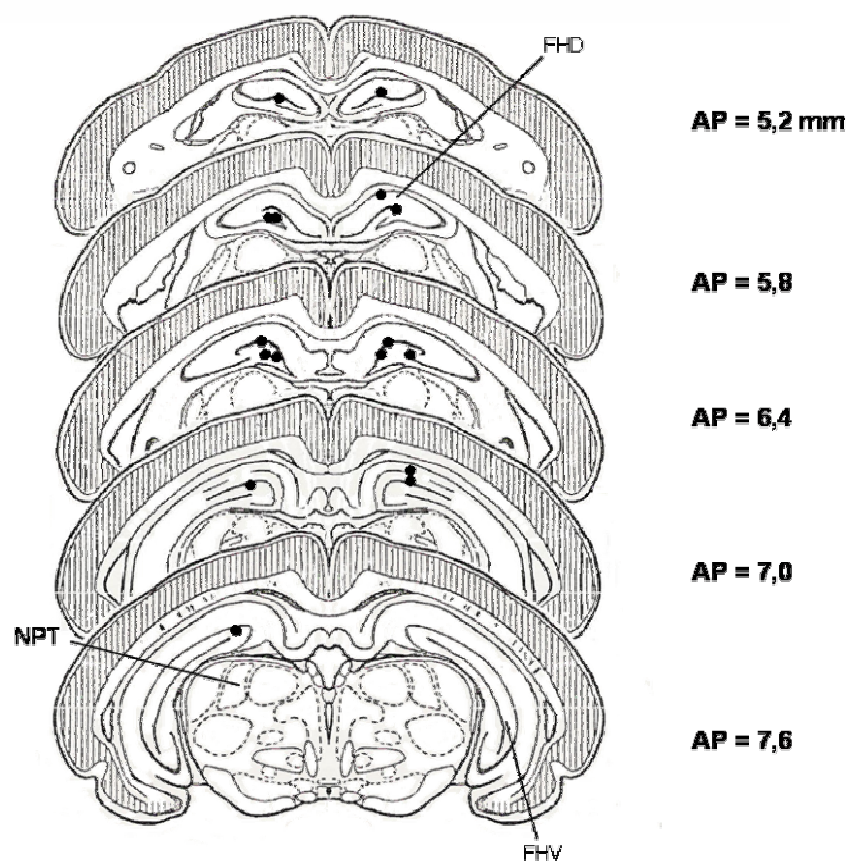
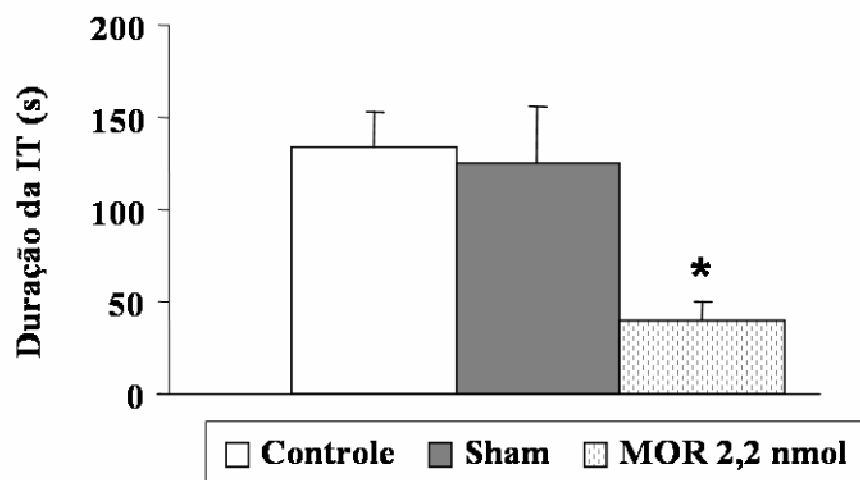


Figura 2: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=8) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de MOR 1,1 nmol (grupo 2) na FHD. As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle e sham. B) Desenho esquemático de seções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

A



B

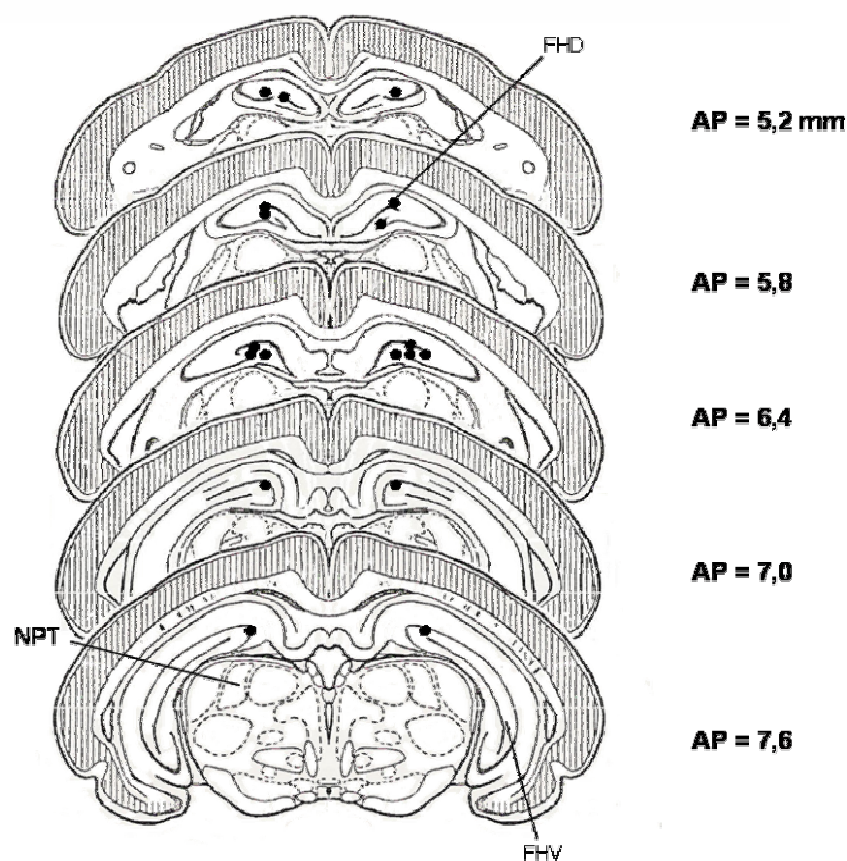
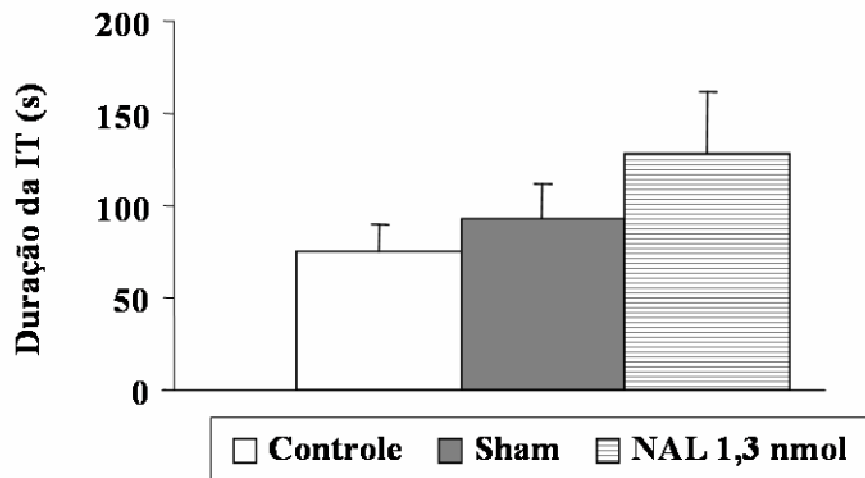


Figura 3: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=9) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de MOR 2,2 nmol (grupo 3) na FHD. As barras verticais representam o EPM.* $p < 0,05$ comparado com grupo controle e sham. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

A



B

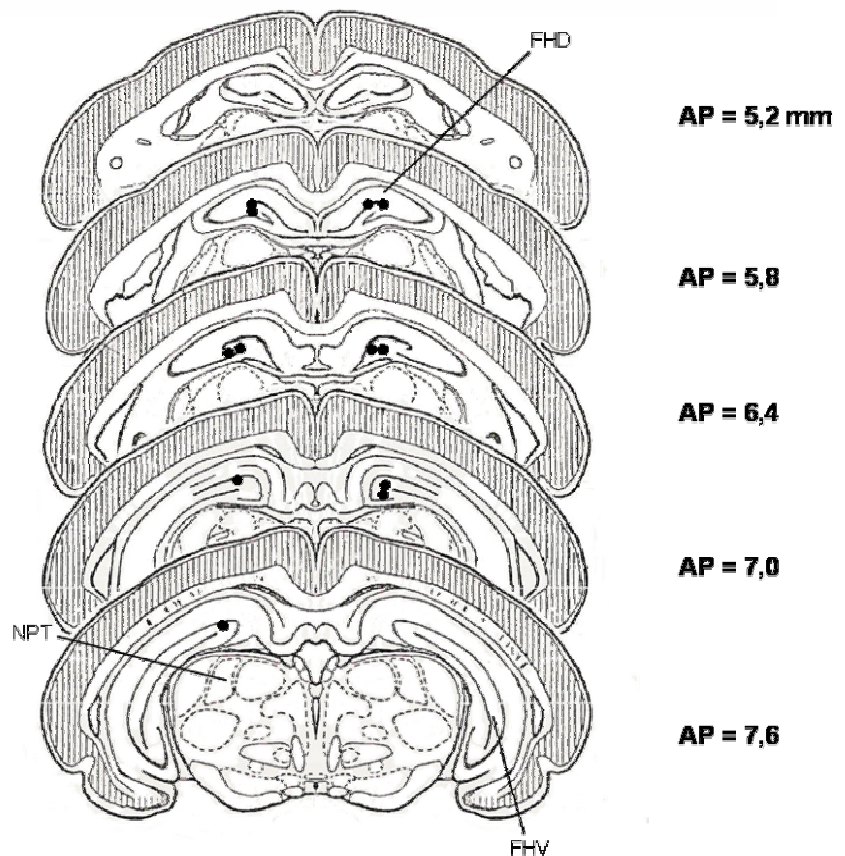
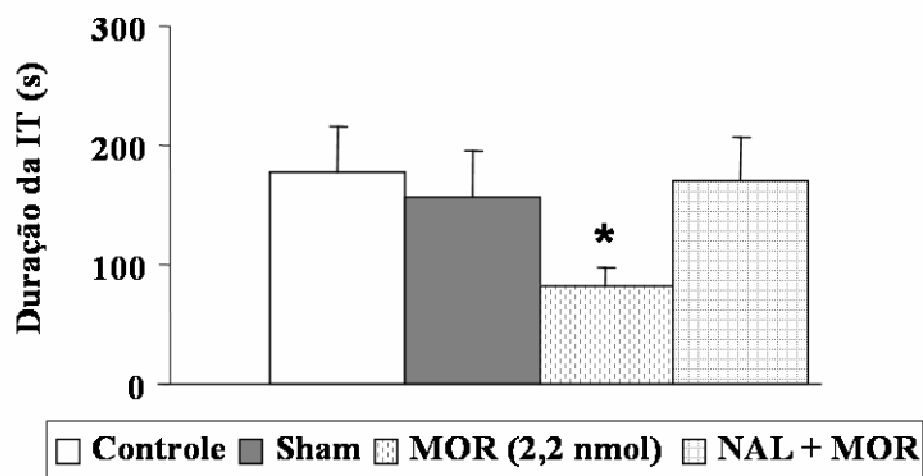


Figura 4: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias ($n=6$) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de NAL 1,3 nmol (grupo 4) na FHD. As barras verticais representam o EPM. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

A



B

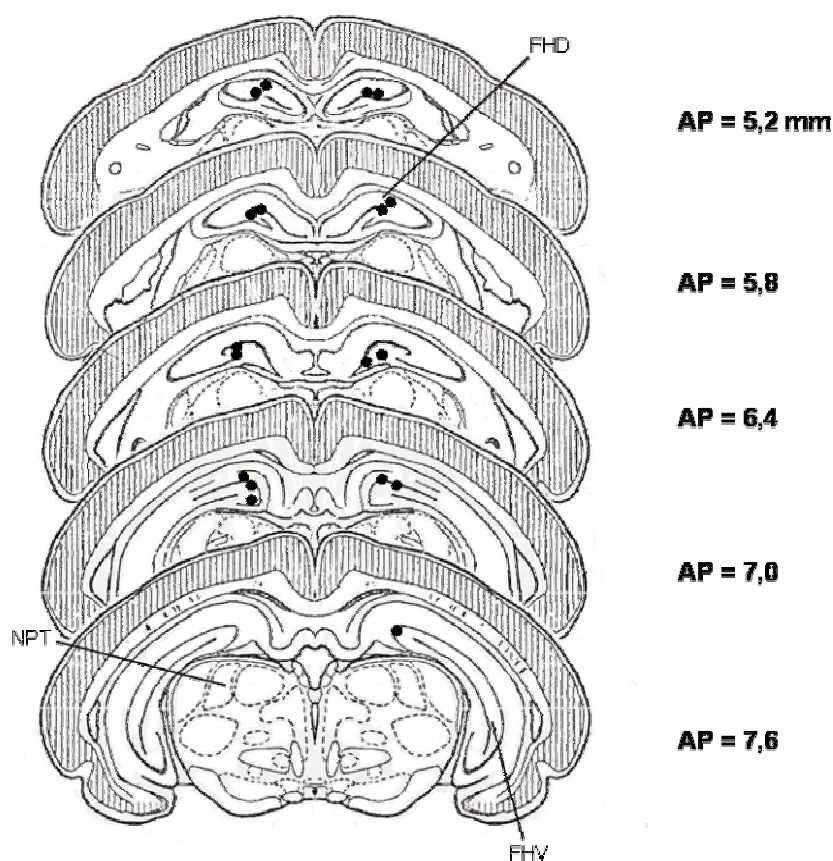
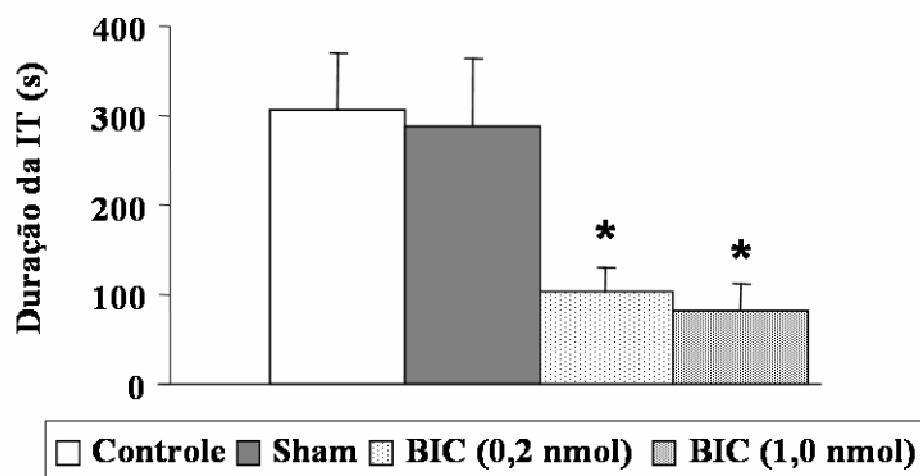


Figura 5: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=9) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de 2,2 nmol de MOR e após o 1,3 nmol de NAL seguido por 2,2 nmol de MOR na FHD. As barras verticais representam o EPM. *p<0,05 comparado com os demais grupos. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

Após receberem, em dias consecutivos, microinjeções do antagonista GABAérgico bicuculina nas doses de 0,2 e de 1 nmol, a duração da IT diminuiu nas cobaias ($F_{(3,36)}=11,577$, $p<0,001$). Os valores encontrados para o grupo 6 foram: controle $306 \pm 62,0$ s, “sham” $288 \pm 75,6$ s, bicuculina 0,2 nmol $102 \pm 28,4$ s e bicuculina 1,0 nmol $82 \pm 29,1$ s (figura 6A).

Em relação à microinjeção do agonista GABAérgico muscimol (grupos 7 e 8), apenas demonstraram um aumento no tempo de permanência em IT aqueles animais que receberam a dose maior da droga (figura 8A). A média dos episódios de IT dos animais que receberam a microinjeção bilateral de 0,5 nmol de muscimol ($96 \pm 14,4$ s) na FHD (figura 7A) não diferiu significativamente ($p>0,05$) dos experimentos controle ($106 \pm 18,7$ s) e “sham” ($110 \pm 16,6$ s). Enquanto que, o grupo de animais que receberam 1,0 nmol de muscimol ($316 \pm 54,1$ s) apresentaram aumento do tempo em relação ao seu controle ($177 \pm 36,6$ s) e “sham” ($159 \pm 29,8$ s) ($F_{(2,12)}=19,107$, $p<0,001$).

A



B

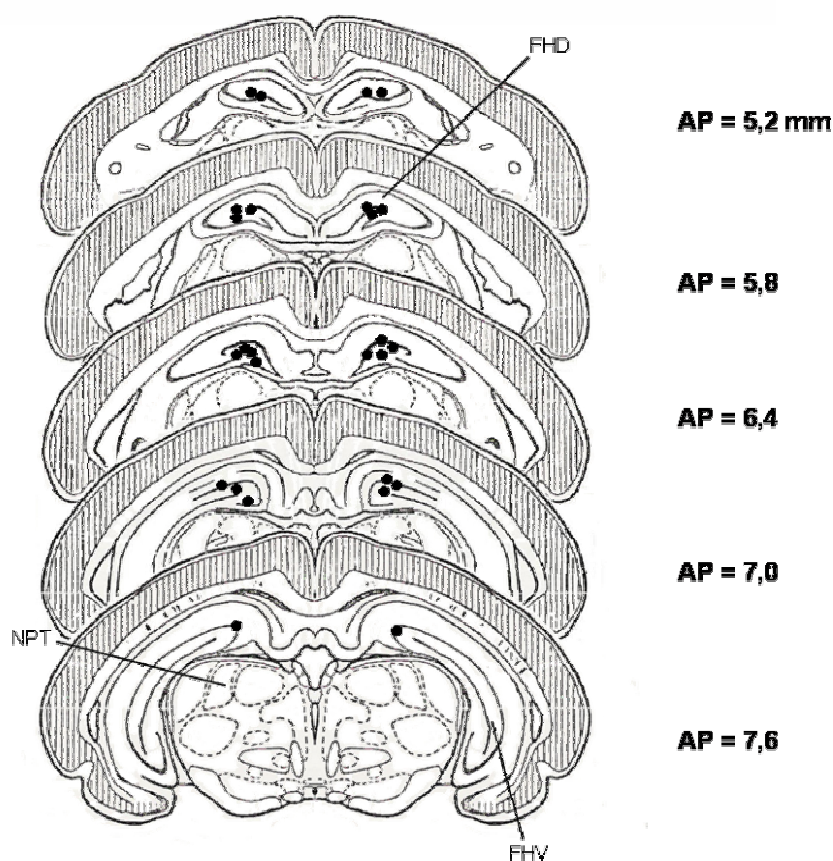
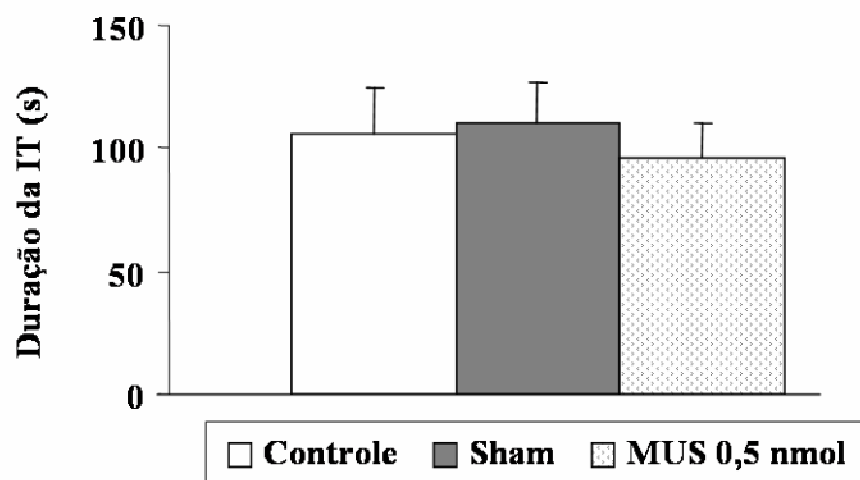


Figura 6: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=13) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de BIC na dose de 0,2 nmol e de 1 nmol na FHD. As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ comparado com grupo controle e sham. B) Desenho esquemático de seções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

A



B

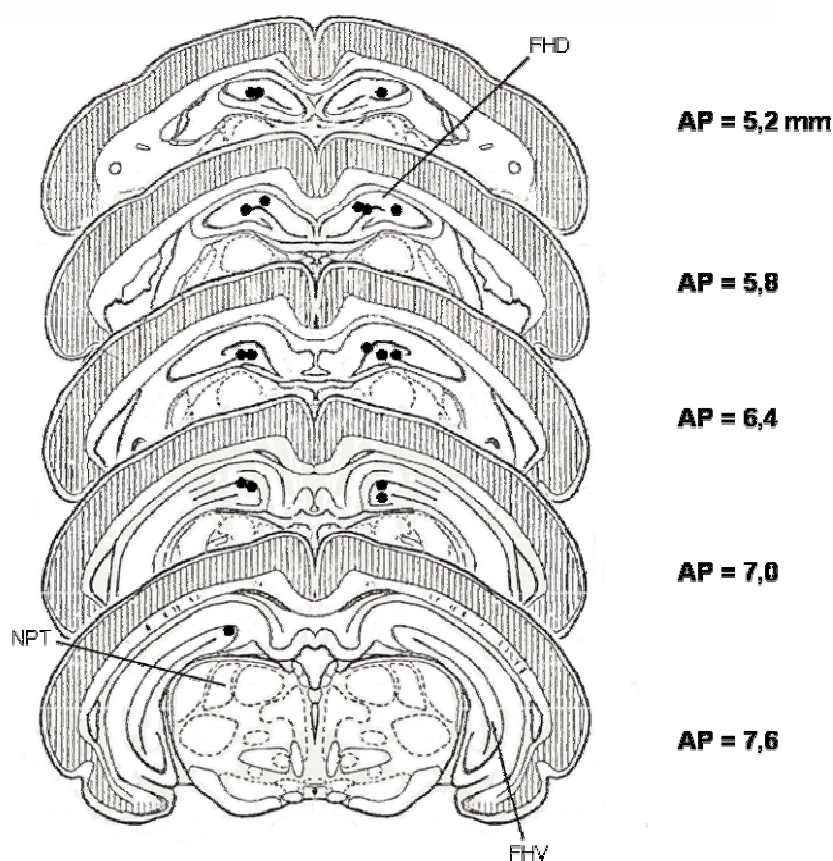


Figura 7: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias ($n=9$) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de MUS (0,5 nmol) na FHD. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

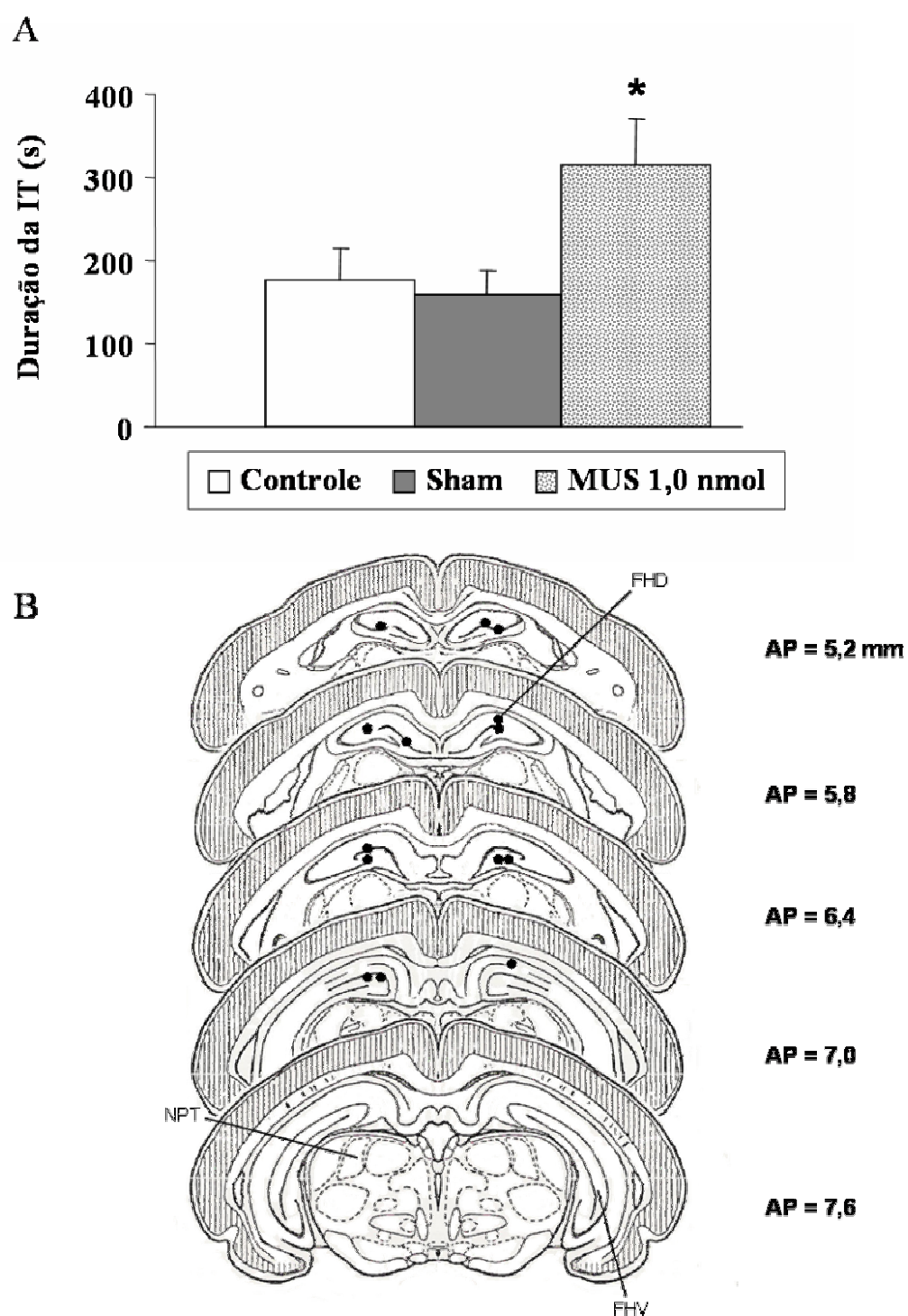
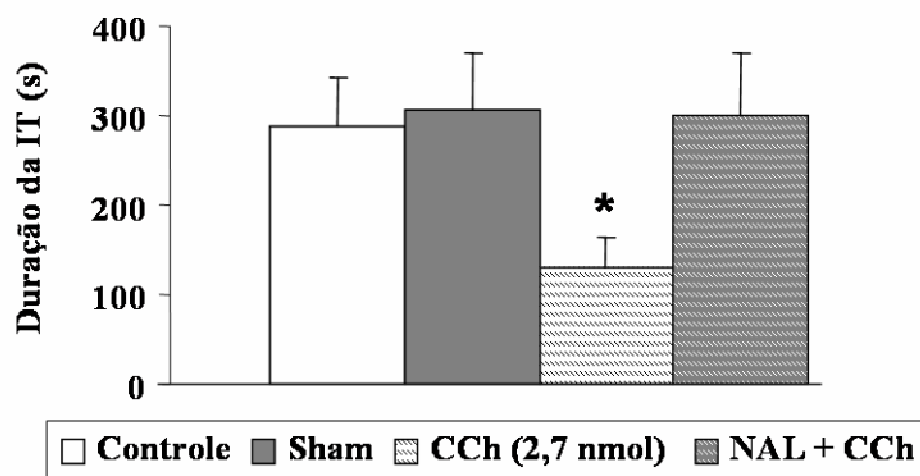


Figura 8: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=7) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de MUS (1,0 nmol) na FHD (grupo 8). B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

Em relação ao bloqueio dos receptores opioidérgicos e estimulação dos receptores colinérgicos, nossos resultados mostraram que a microinjeção bilateral de carbacol na FHD de cobaias produziu uma diminuição da duração dos episódios de IT (figura 9A) comparado com os procedimentos controle, “sham” e NAL+CCh (grupo 9). Os valores encontrados foram: controle $288 \pm 55,4$ s, “sham” $305 \pm 63,8$ s, carbacol $129 \pm 33,7$ s e NAL + CCh $299 \pm 70,2$ s ($F_{(3,27)}=19,255$, $p<0,001$).

A



B

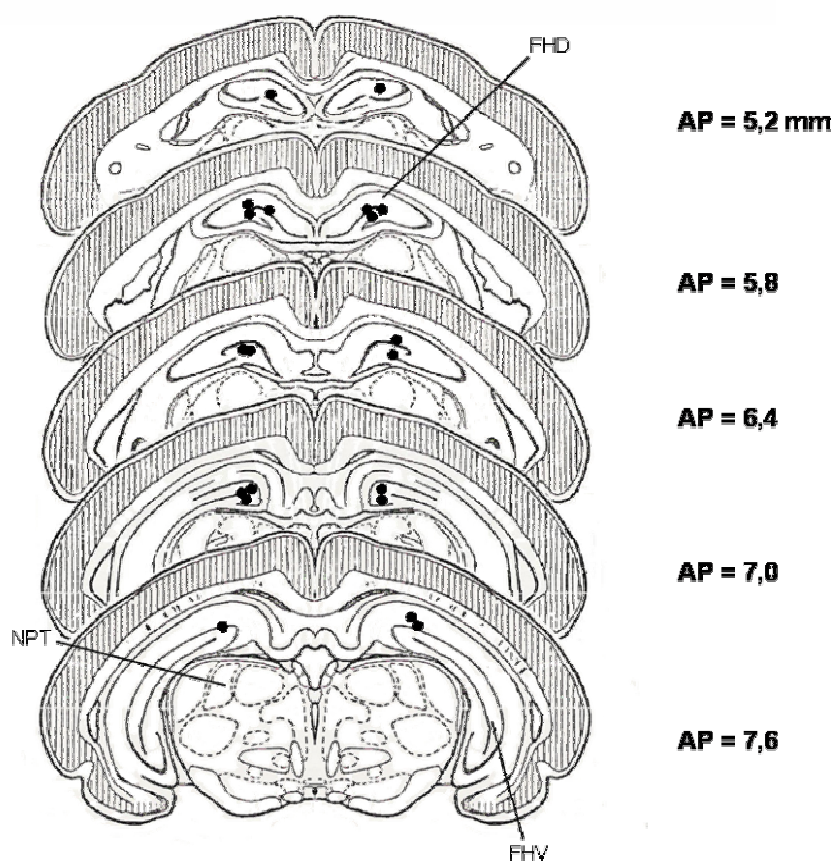
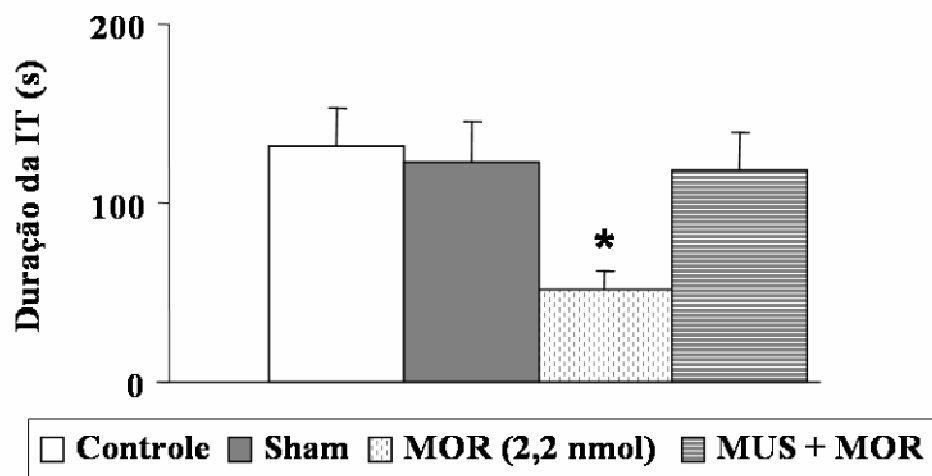


Figura 9: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=10) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de 2,7 nmol de CCh e após a microinjeção de 1,3 nmol de NAL seguida por 2,7 nmol de CCh na FHD (grupo 9). As barras verticais representam o EPM. * p<0,05 comparado com os demais grupos. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

No grupo 10 os animais receberam microinjeção de um agonista GABAérgico (muscimol) e posteriormente a microinjeção de um agonista opioidérgico (morfina). A microinjeção isolada de 1,1 nmol de morfina na FHD de cobaias produziu uma diminuição na duração dos episódios de IT ($F_{(3,24)}=18,995$, $p<0,001$). A microinjeção prévia de muscimol preveniu a redução do tempo de permanência em IT, resultado semelhante ao encontrado nos demais procedimentos experimentais (controle e “sham”). Os valores encontrados foram: controle $132 \pm 21,2$ s, “sham” $123 \pm 22,8$ s, morfina $51 \pm 11,3$ s e MUS+MOR $119 \pm 21,5$ s (figura 10A).

As figuras 1 a 10 (B) representam as localizações esquemáticas das microinjeções de cada um dos grupos experimentais estudados.

A



B

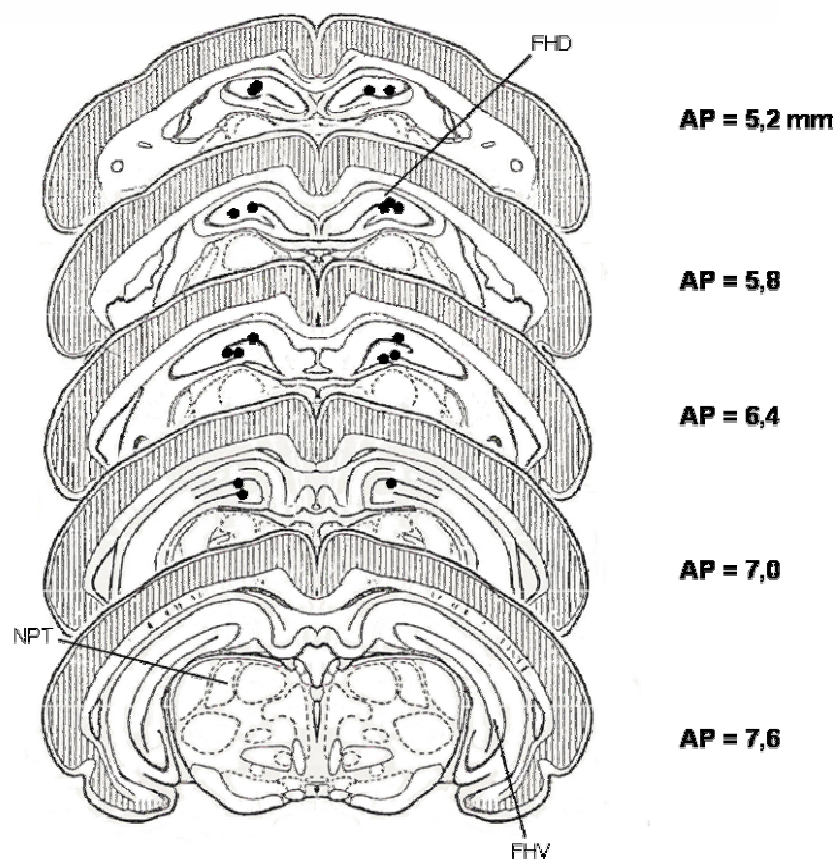


Figura 10: A) Média dos episódios de IT (s) em cobaias (n=9) em situação controle, após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de 2,2 mol de MOR e após a microinjeção de 0,5 nmol de MUS seguido por 2,2 nmol de MOR na FHD (grupo 10). As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ comparado com os demais grupos. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da FHD de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

4.2) Experimento 2

EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS OPIOIDÉRGICOS, GABAÉRGICOS E COLINÉRGICOS NA FHD SOBRE A NOCICEPÇÃO AVALIADA PELA RESPOSTA DE VOCALIZAÇÃO INDUZIDA POR UM ESTÍMULO NOCIVO PERIFÉRICO EM COBAIAS

Neste experimento os animais receberam uma estimulação nociva periférica (choque na coxa) antes e após a microinjeção de drogas. A vocalização foi registrada e os valores obtidos foram convertidos em índice de vocalização e foram comparados entre os diferentes tempos e tratamentos estudados.

Os animais que receberam microinjeção de morfina (2,2 nmol) na FHD apresentaram uma diminuição da resposta de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo, indicando um efeito antinociceptivo dessa droga. Este efeito foi bloqueado pela microinjeção prévia de naloxone no mesmo sítio. A microinjeção de morfina em uma dose menor (1,1 nmol) e de naloxone em uma dose de 1,3 nmol não produziram efeito (figura 11). O teste estatístico “Two Way RM ANOVA” mostrou que existe uma interação entre os tempos e tratamentos estudados ($F_{(24,168)} = 8,179$, $p < 0,001$). O pós-teste de Duncan mostrou que aos 2 min não houve diferença significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), entretanto, dos cinco min em diante, houve uma queda acentuada na vocalização no grupo morfina 2,2 nmol em relação aos demais grupos estudados ($p < 0,05$).

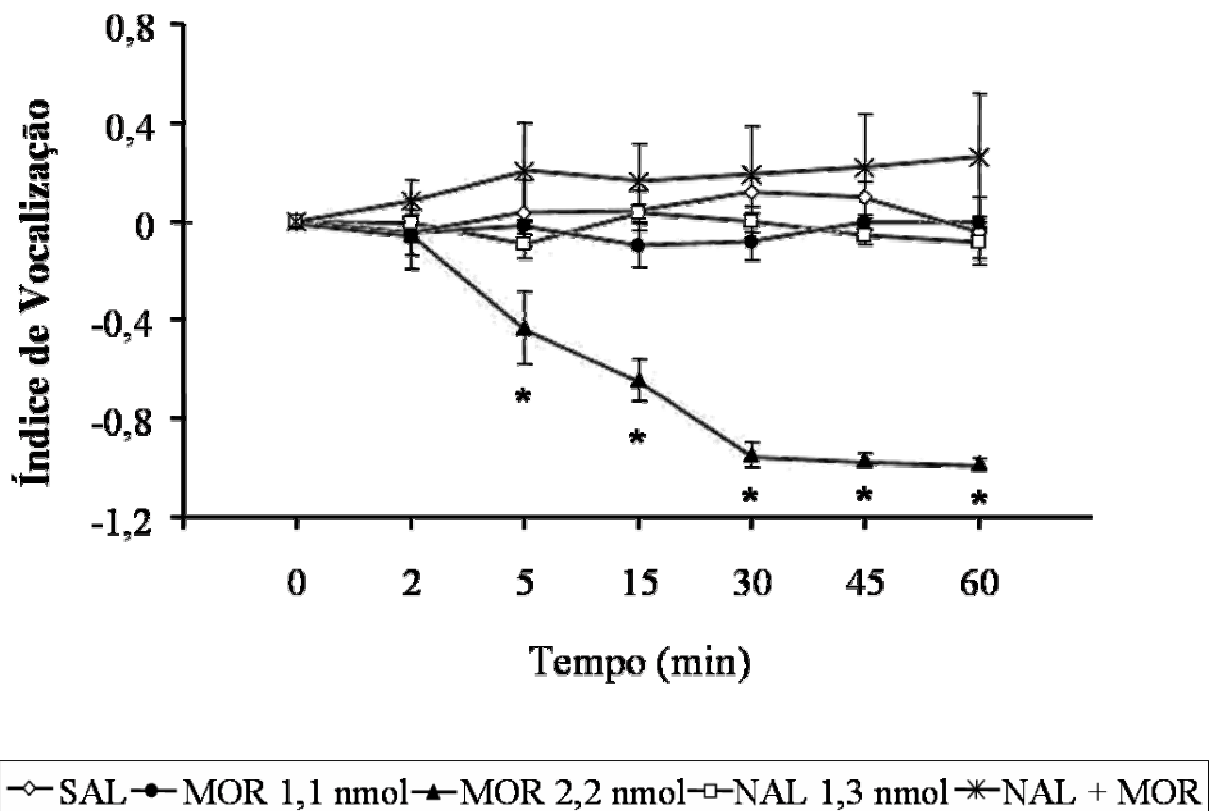


Figura 11: Índice de vocalização (média $\pm$ EMP) anterior (tempo zero) e posterior (2, 5, 15, 30, 45 e 60 min) à microinjeção de 0,9% de salina (n=6), de 1,1 nmol de morfina (n=6), de 2,2 nmol de morfina (n=7), de 1,3 nmol de naloxone (n=7) e do bloqueio da morfina 2,2 nmol com naloxone (1,3 nmol) (n=7). As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ comparado com o mesmo tempo do grupo SAL, MOR 1,1 nmol e NAL+MOR.

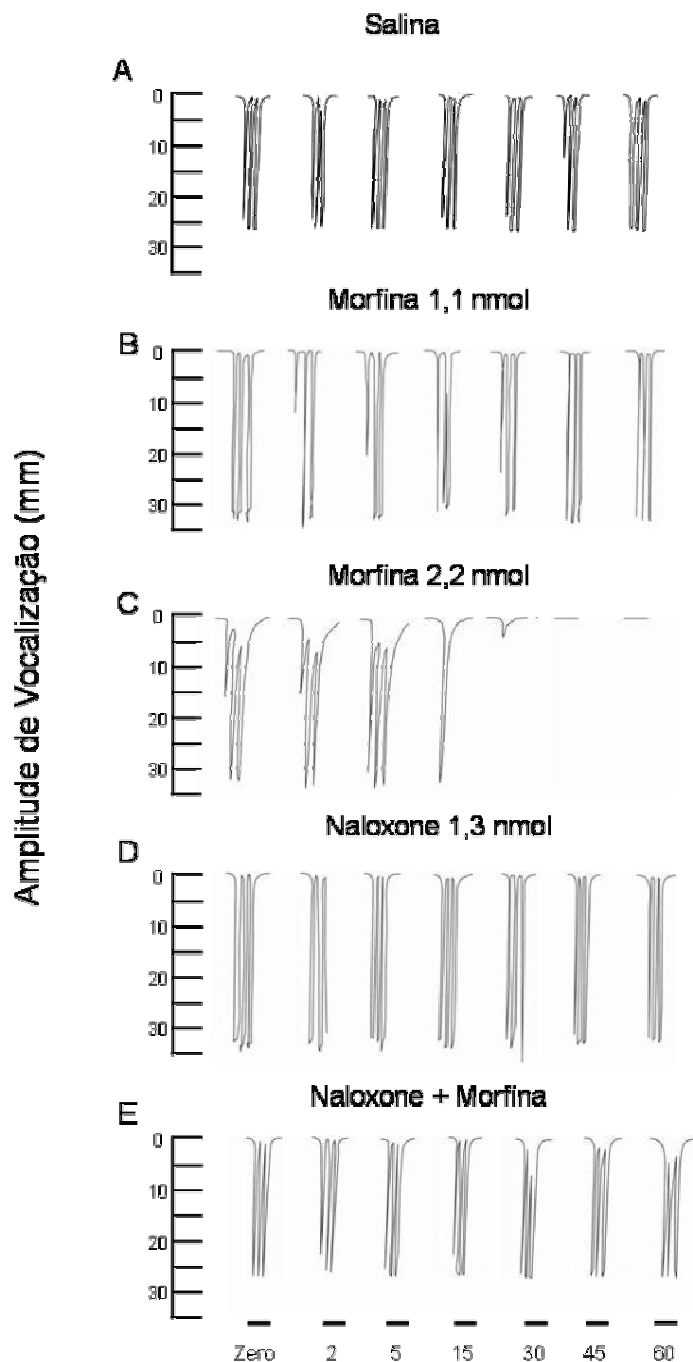


Figura 12: Registro poligráfico da vocalização (amplitude em mm) de um animal representativo de cada grupo experimental após a microinjeção de diferentes drogas na FHD de cobaias. A) animal pré-tratado com SAL (0,9%); B) animal pré-tratado com MOR (1,1 nmol); C) animal pré-tratado com MOR (2,2 nmol); D) animal pré-tratado com NAL (1,3 nmol); E) animal pré-tratado com NAL (1,3 nmol) seguido de MOR (2,2 nmol). As barras horizontais indicam a duração da estimulação nociva (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). O zero representa o registro de vocalização anterior à microinjeção da(s) droga(s).

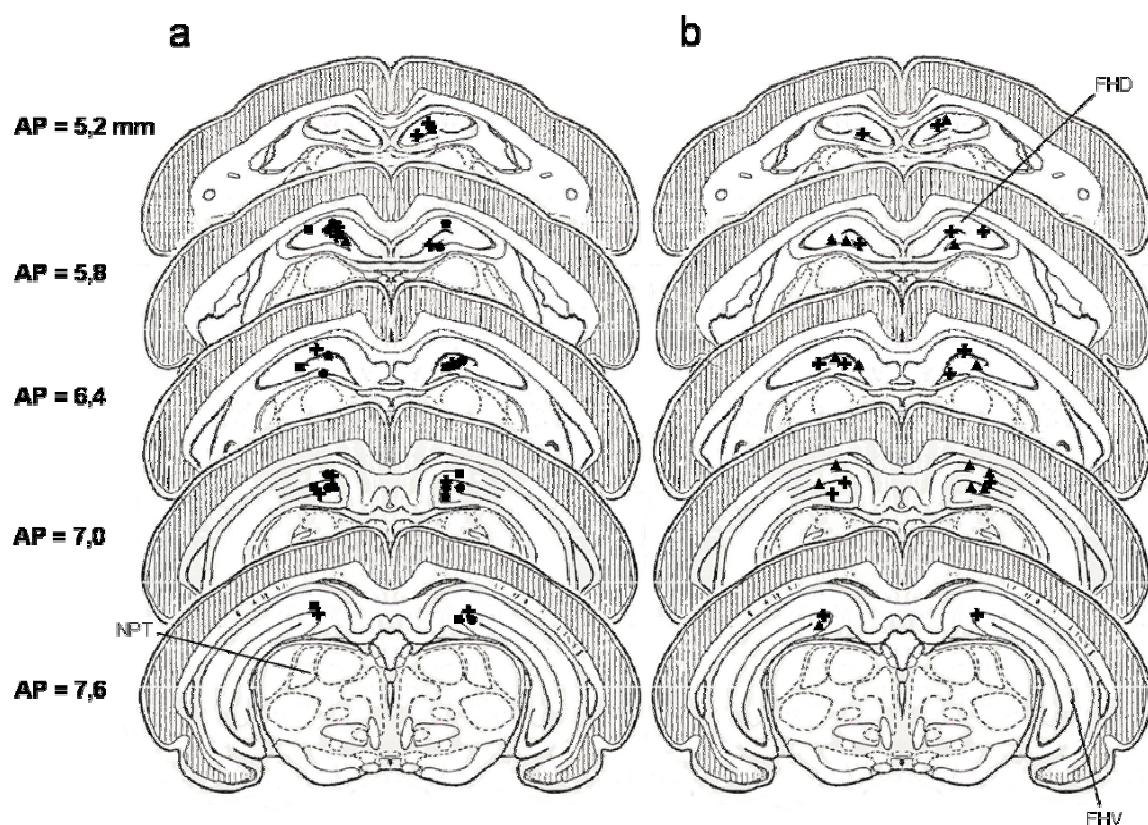


Figura 13: Localização esquemática dos sítios das microinjeções de: a) 0,9% de solução salina (+, grupo 1), de 1,1 nmol de morfina (■, grupo 2), de 2,2 nmol de morfina (●, grupo 3) e b) 1,3 nmol de naloxone (+, grupo 4), de 1,3 nmol de naloxone seguido de 2,2 nmol de morfina (▲, grupo 5). FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

Os próximos grupos realizados receberam microinjeção do antagonista GABAérgico bicuculina em duas doses 0,2 e 1,0 nmol. Os animais que receberam a dose maior (1,0 nmol) de bicuculina apresentaram uma resposta antinociceptiva logo nos primeiros dois min após a microinjeção e esse efeito se manteve ao longo do experimento (figura 14). O grupo que recebeu a menor dose de bicuculina, entretanto, não apresentou nenhuma alteração no teste algesimétrico realizado, sendo, seus resultados, semelhantes aos dos animais do grupo salina. A análise estatística mostrou que existe uma interação entre os tempos e tratamentos estudados ($F_{(12,108)} = 8,057$, $p < 0,001$). Em todos os tempos houve uma diferença significativa entre os grupos bicuculina 1,0 nmol e os grupos salina e bicuculina 0,2 nmol ($p < 0,05$) e estes não foram diferentes entre si ($p > 0,05$).

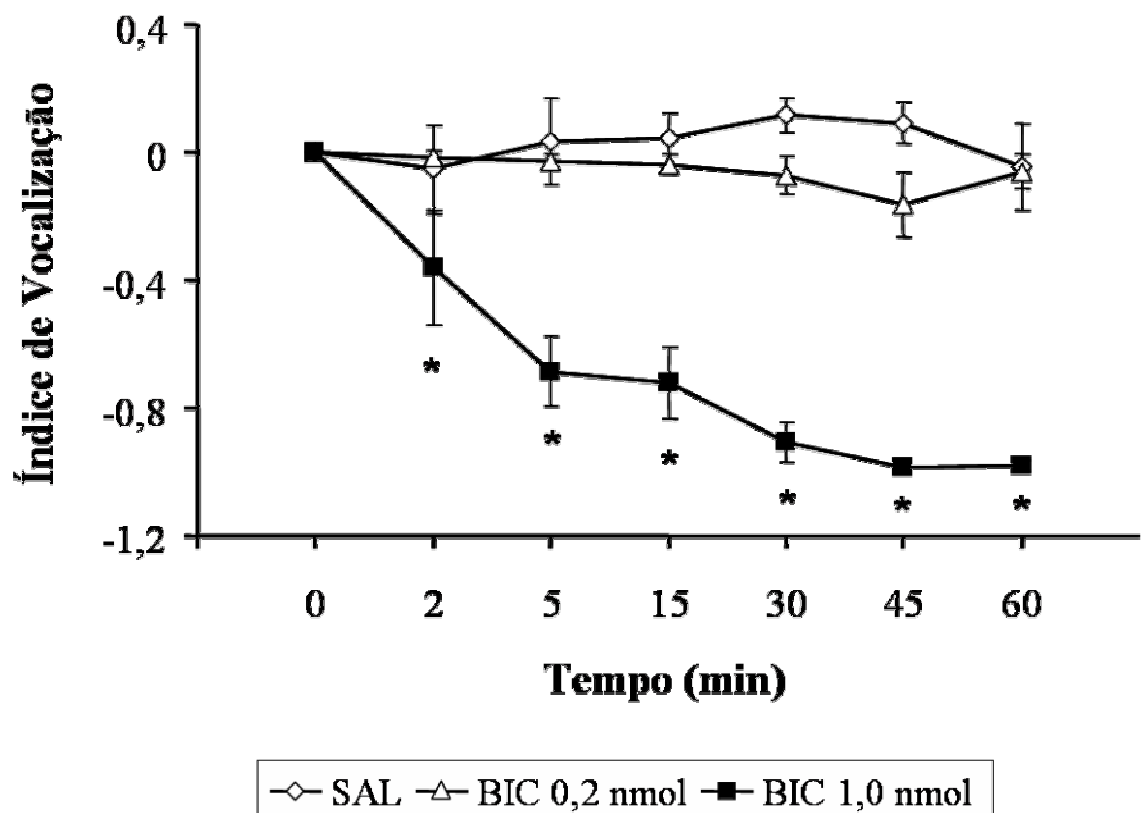


Figura 14: Índice de vocalização (média $\pm$ EMP) anterior (tempo zero) e posterior (2, 5, 15, 45 e 60 min) à microinjeção de 0,9% de salina (n=6), de 0,2 nmol de bicuculina (n=7) e de 1,0 nmol de bicuculina (n=8). As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ comparado com o mesmo tempo do grupo SAL, BIC 0,2 nmol.

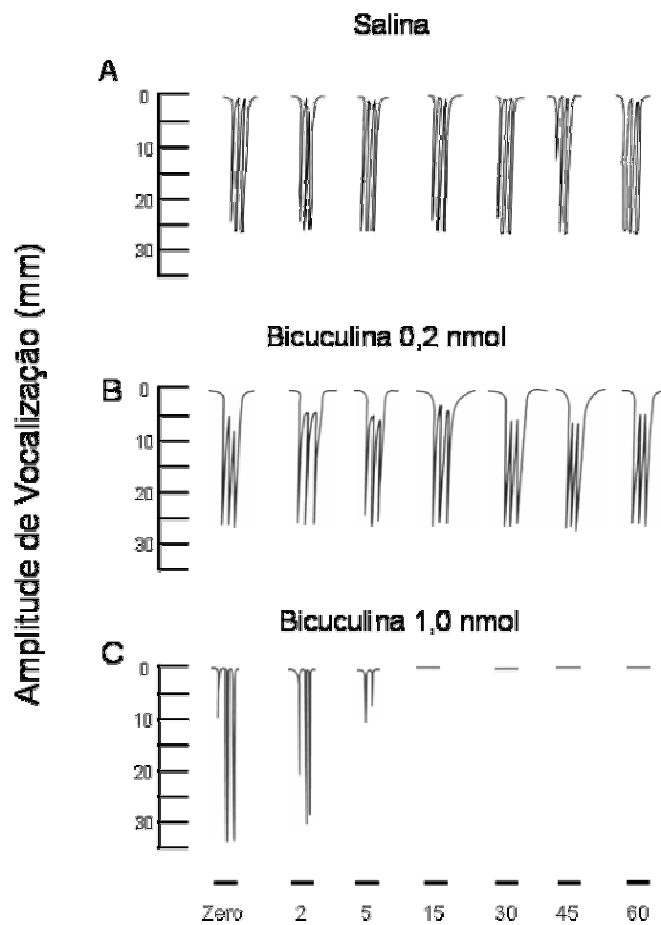


Figura 15: Registro poligráfico da vocalização (amplitude em mm) de um animal representativo de cada grupo experimental após a microinjeção de diferentes drogas na formação hipocampal dorsal de cobaias. A) animal pré-tratado com salina (0,9%); B) animal pré-tratado com bicuculina (0,2 nmol) e C) animal pré-tratado com bicuculina (1,0 nmol). As barras horizontais indicam a duração da estimulação nociva (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). O zero representa o registro de vocalização anterior à microinjeção da(s) droga(s).

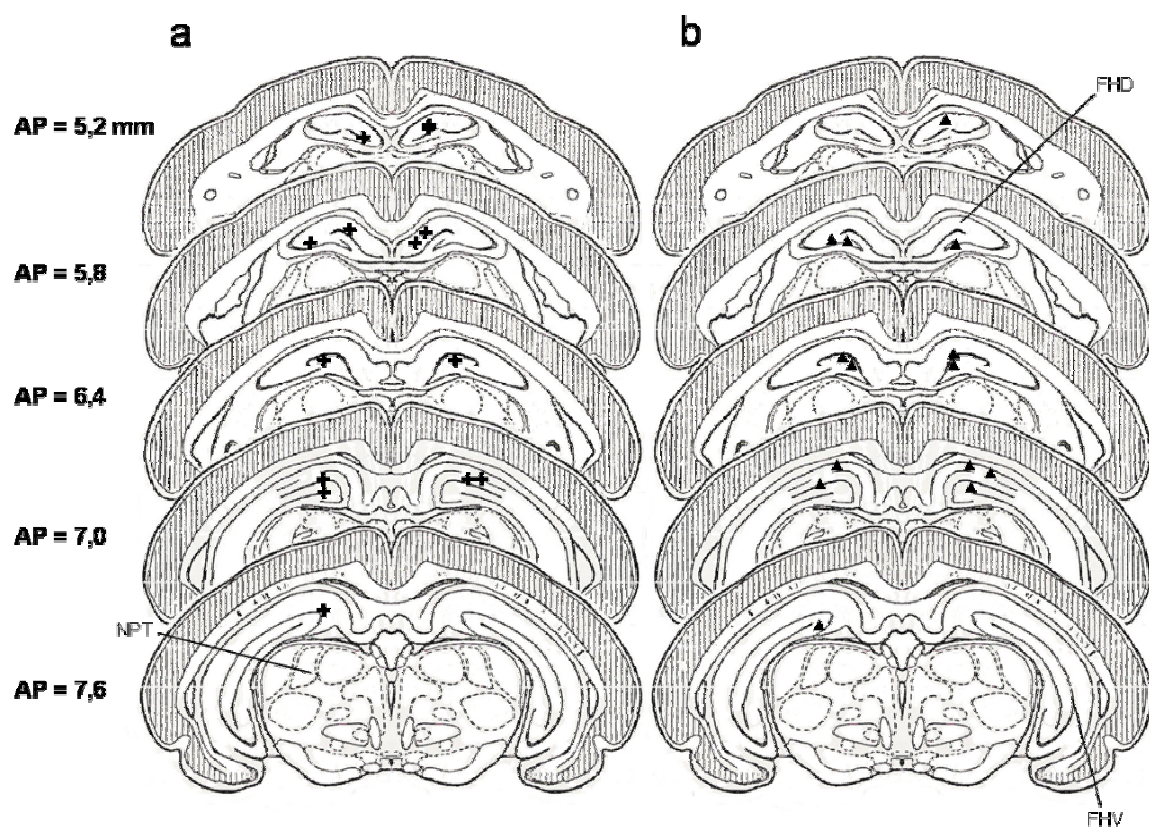


Figura 16: Localização esquemática dos sítios das microinjeções de: a) 0,2 nmol de bicuculina (grupo 6) e b) 1,0 nmol de bicuculina (grupo 7). FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

Em relação ao agonista GABAérgico, os resultados obtidos mostraram que a microinjeção de muscimol na dose de 1,0 nmol provocou uma resposta hiperalgésica por parte do animal, o que foi comprovado pelo aumento do índice de vocalização. A dose de 0,5 nmol de muscimol não promoveu alteração na resposta de vocalização, ou seja, não foi diferente da encontrada no grupo salina (figura 17).

O teste estatístico “Two Way RM ANOVA” mostrou que houve interação entre tempo e tratamento ($F_{(12,114)} = 5,035$, $p < 0,001$). Nos tempos de dois a 60 min o grupo muscimol 1,0 nmol foi estatisticamente diferente dos grupos salina e muscimol 0,5 nmol (Duncan, $p < 0,05$).

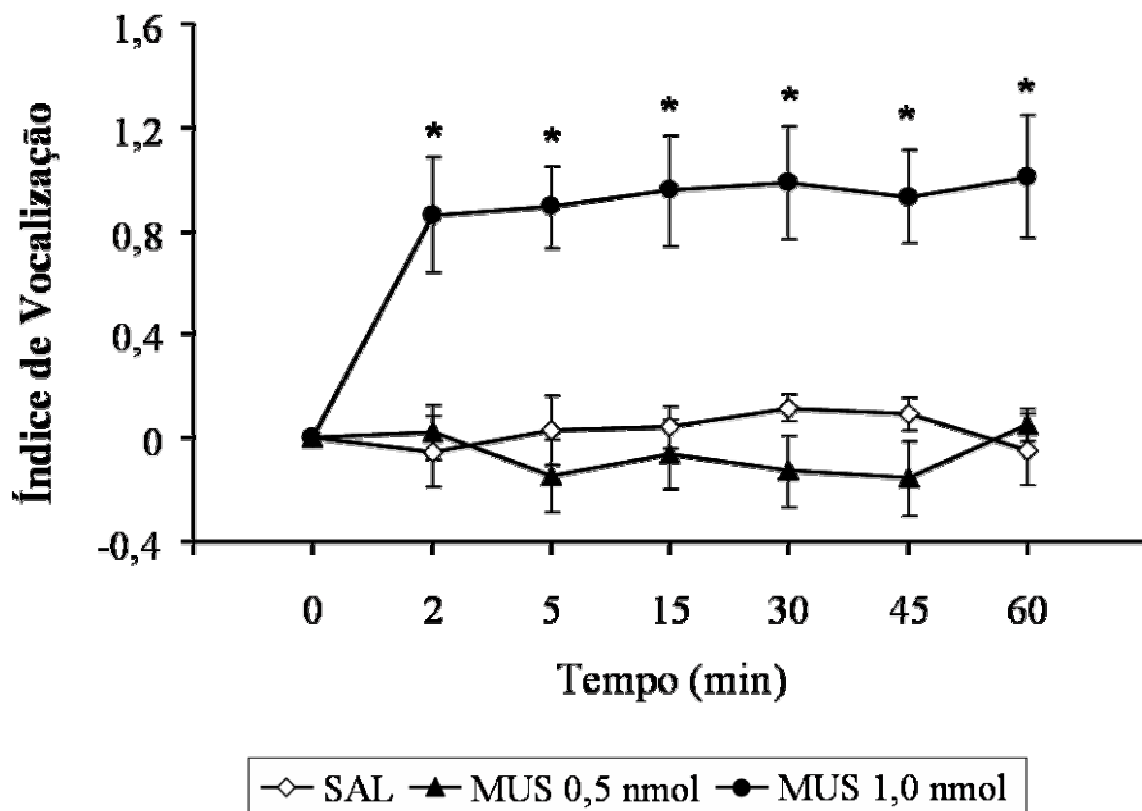


Figura 17: Índice de vocalização (média $\pm$ EMP) anterior (tempo zero) e posterior (2, 5, 15, 30, 45 e 60 min) à microinjeção de 0,9% de salina (n=6), de 0,5 nmol de muscimol (n=9) e de 1,0 nmol de muscimol (n=7). As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ comparado com o mesmo tempo do grupo SAL e MUS 0,5 nmol.

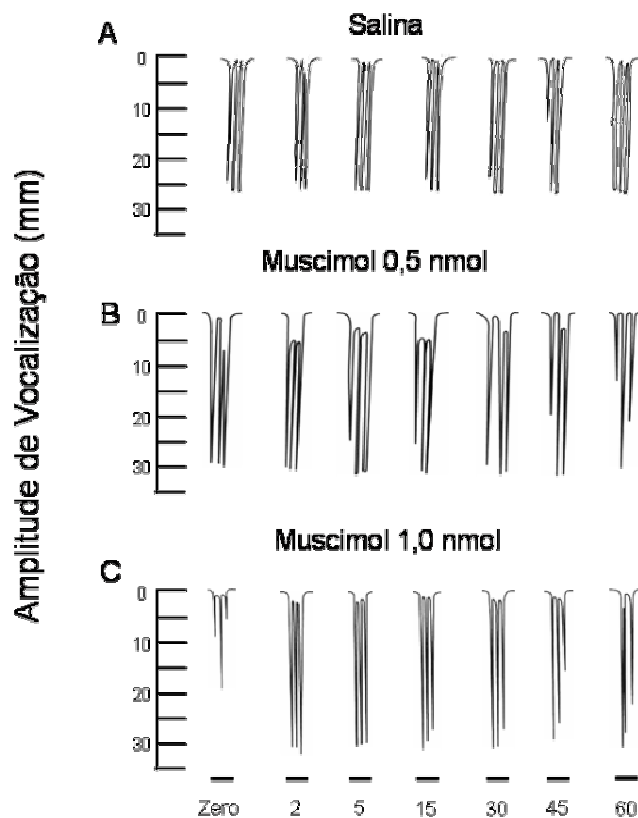


Figura 18: Registro poligráfico da vocalização (amplitude em mm) de um animal representativo de cada grupo experimental após a microinjeção de diferentes drogas na formação hipocampal dorsal de cobaias. A) animal pré-tratado com salina (0,9%); B) animal pré-tratado com muscimol (0,5 nmol) e C) animal pré-tratado com muscimol (1,0 nmol). As barras horizontais indicam a duração da estimulação nociva (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). O zero representa o registro de vocalização anterior à microinjeção da(s) droga(s).

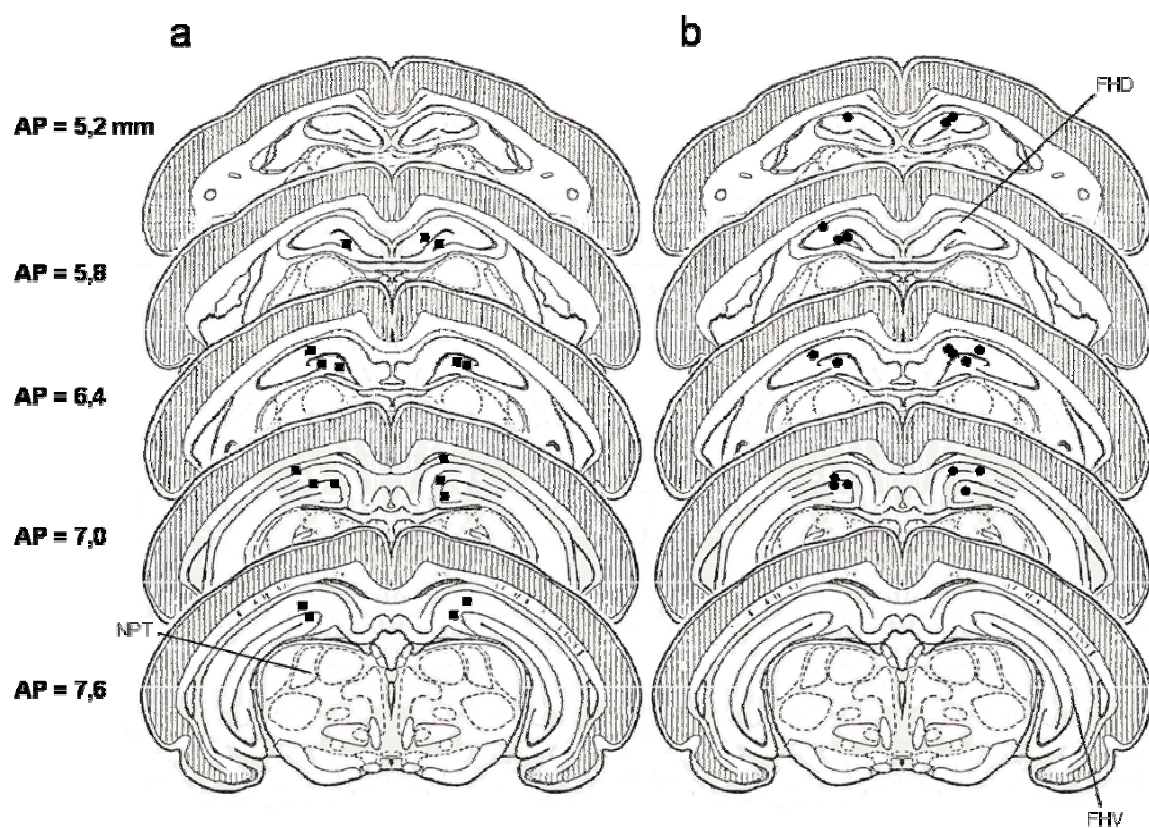


Figura 19: Localização esquemática dos sítios das microinjeções de: a) 0,5 nmol de muscimol (grupo 8) e b) 1,0 nmol de muscimol (grupo 9). FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

A estimulação colinérgica da FHD com o carbacol promoveu uma diminuição no índice de vocalização medido, indicando que o carbacol produziu antinocicepção. A prévia microinjeção de atropina foi capaz de bloquear essa resposta, enquanto que a atropina por si só não promoveu nenhuma modificação no índice registrado (figura 20). Os testes estatísticos mostraram que houve interação entre tempo e tratamento ($F_{(18,144)} = 7,141$, $p < 0,001$) e que o grupo carbacol foi diferente (Duncan, $p < 0,05$) dos demais grupos experimentais em todos os tempos após a microinjeção das drogas. Além disso, os grupos SAL, ATR e ATR+CCh não diferiram entre si ($p > 0,05$).

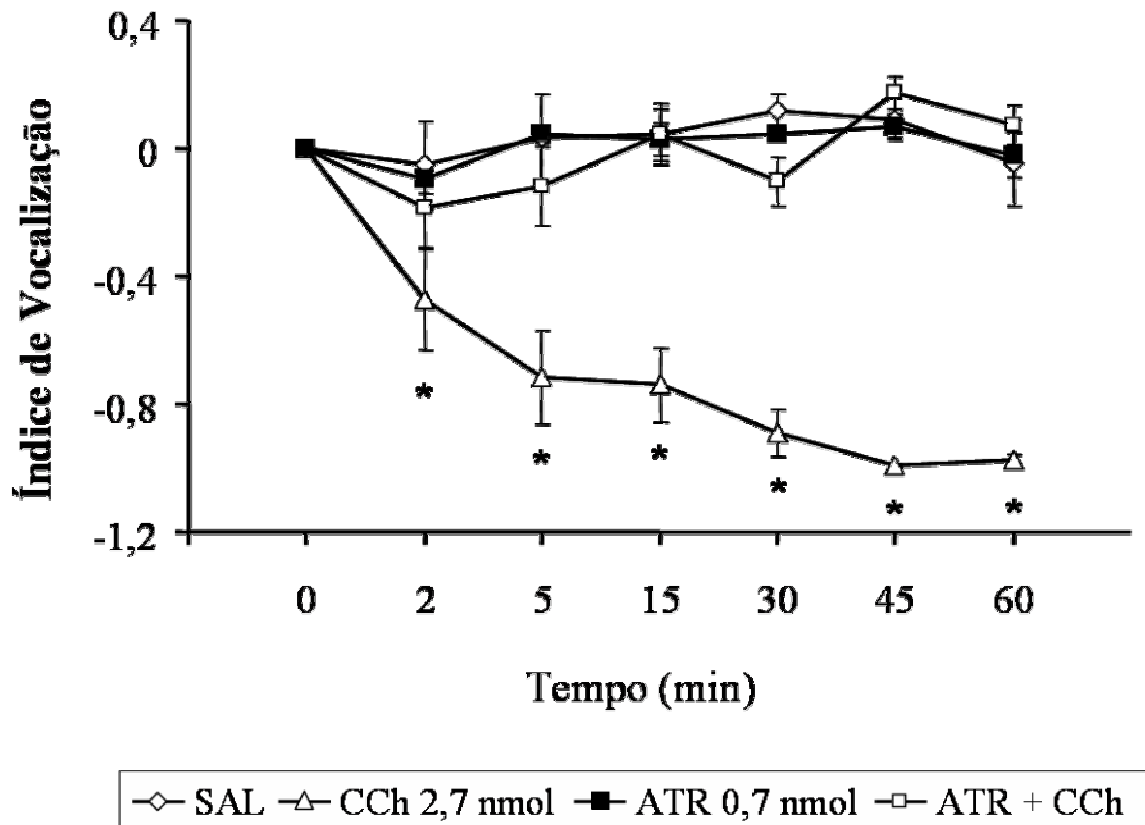


Figura 20: Índice de vocalização (média $\pm$ EMP) anterior (tempo zero) e posterior (2, 5, 15, 30, 45 e 60 min) à microinjeção de 0,9% de salina (n=6), de 2,7 nmol de carbacol (n=8), de 0,7 nmol de atropina (n=7) e de 0,7 nmol de atropina seguido por 2,7 nmol de carbacol (ATR+CCh) (n=7). As barras verticais representam o EPM. *p<0,05 comparado com o mesmo tempo do grupo SAL, ATR 0,7 nmol e ATR+CCh.

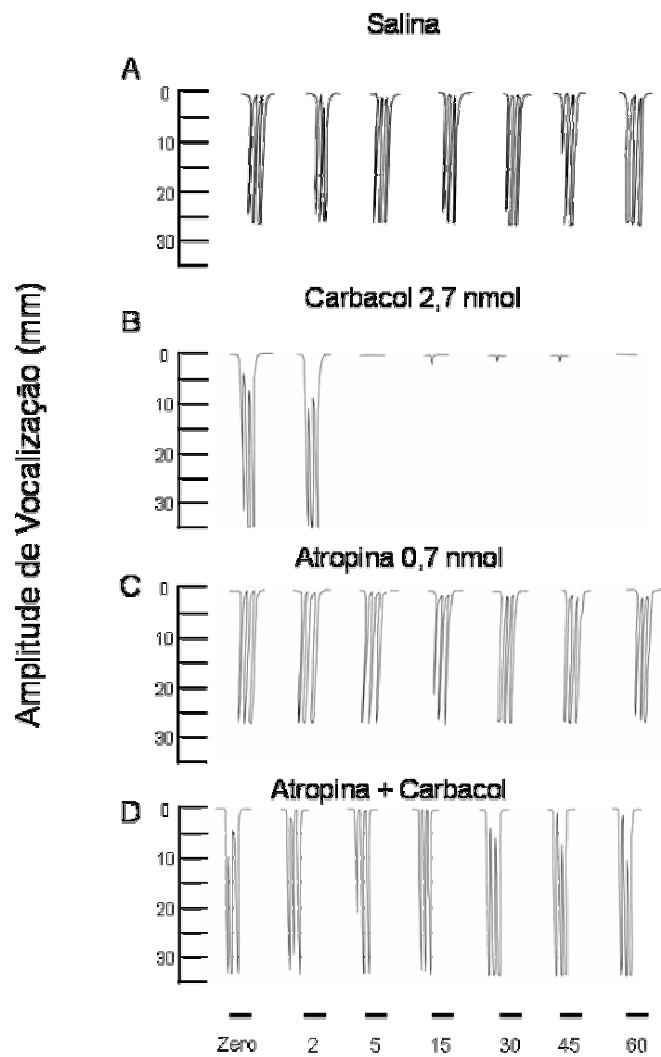


Figura 21: Registro poligráfico da vocalização (amplitude em mm) de um animal representativo de cada grupo experimental após a microinjeção de diferentes drogas na formação hipocampal dorsal de cobaias. A) animal pré-tratado com salina (0,9%); B) animal pré-tratado com carbacol (2,7 nmol); C) animal pré-tratado com atropina (0,7 nmol) e D) animal pré-tratado com atropina seguida de carbacol (ATR+CCh). As barras horizontais indicam a duração da estimulação nociva (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). O zero representa o registro de vocalização anterior à microinjeção da(s) droga(s).

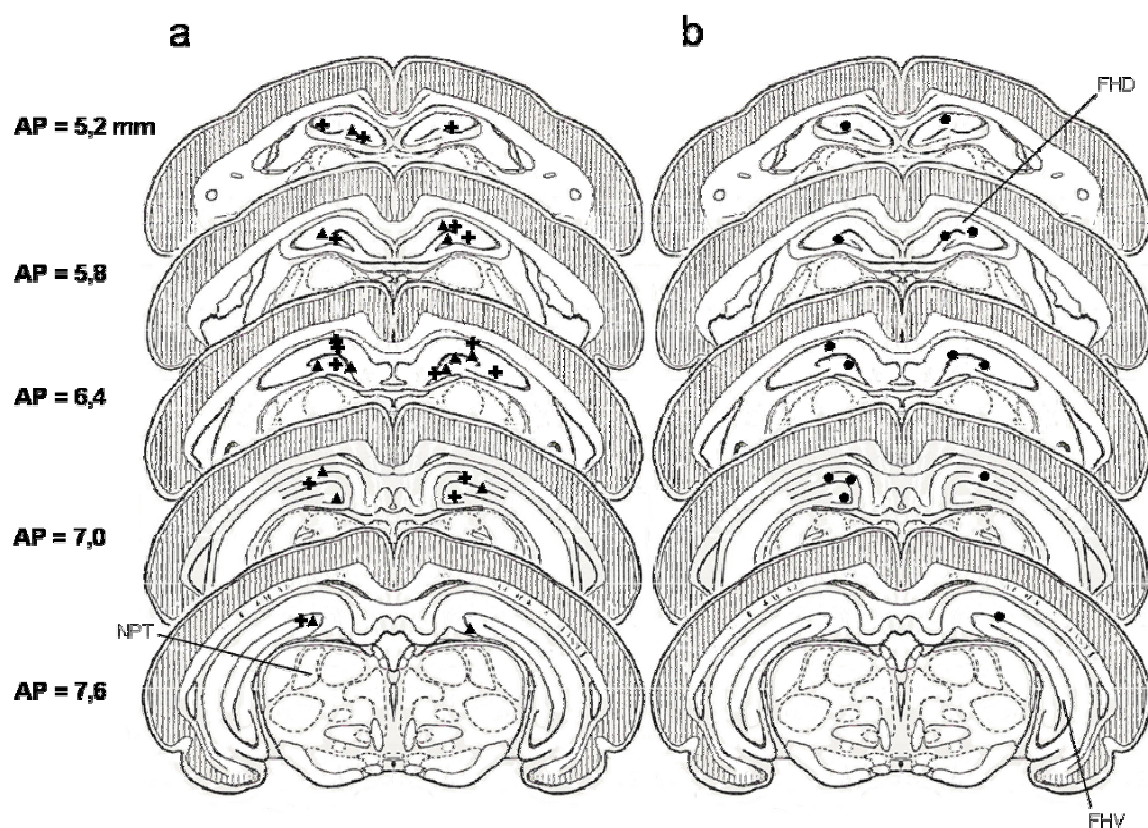


Figura 22: Localização esquemática dos sítios das microinjeções de: a) 2,7 nmol de carbacol (+, grupo 10), de 0,7 nmol de atropina (▲, grupo 11) e b) de atropina seguida de carbacol (ATR+CCh)(●, grupo 12). FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

Após estudarmos a influência desses três sistemas de neurotransmissores na FHD de cobaias, realizamos outros dois grupos experimentais a fim de se averiguar a relação entre esses sistemas neurotransmissores, nessa mesma estrutura, na resposta de vocalização.

Para testarmos se a analgesia promovida pelo carbacol estaria sob a influência opioidérgica, foi feito o grupo NAL+CCh (figura 23). Foi utilizada uma dose de naloxone que por si só não produziu alteração na resposta nociceptiva. O grupo NAL+CCh foi comparado com o grupo salina e nenhuma diferença significativa foi encontrada no índice de vocalização ($F_{(6,66)} = 0,829$, $p = 5,552$, Two Way RM ANOVA).

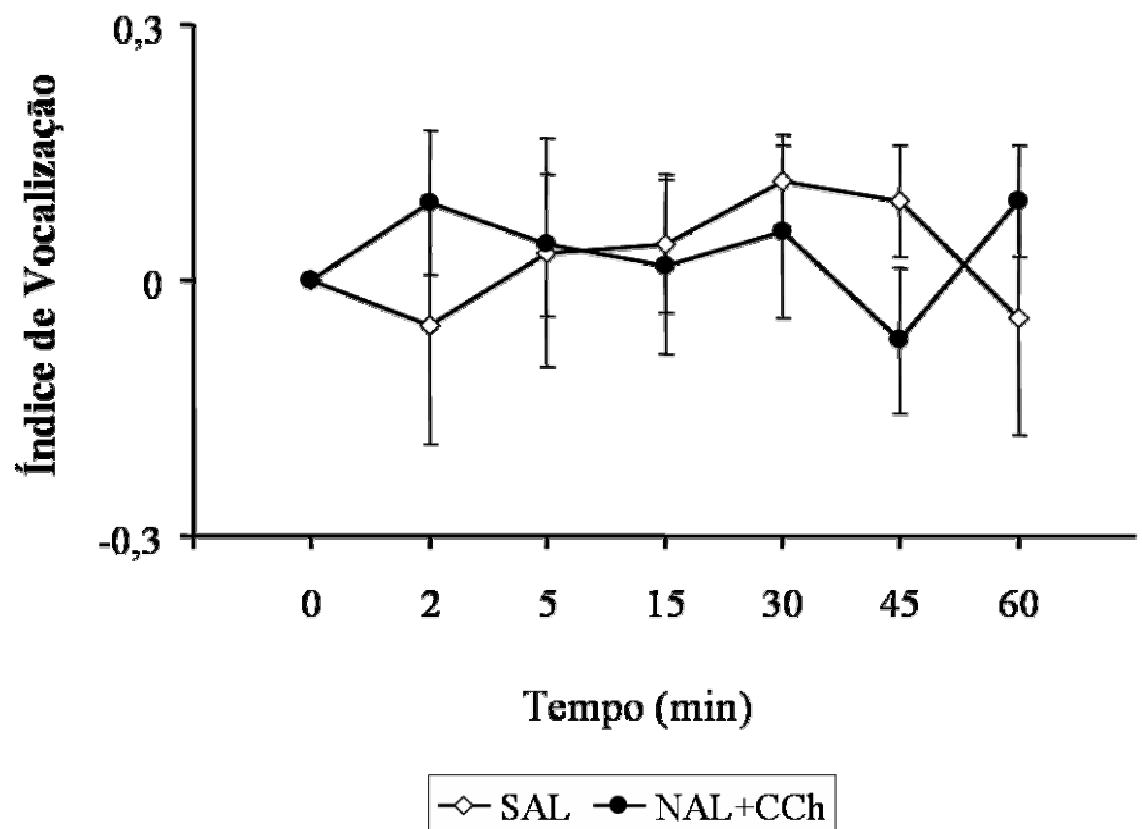


Figura 23: Índice de vocalização (média $\pm$ EMP) anterior (tempo zero) e posterior (2, 5, 15, 30, 45 e 60 min) à microinjeção de 0,9% de salina (n=6) e de 1,3 nmol de naloxone seguido por 2,7 nmol de carbacol (NAL+CCh) (n=9). As barras verticais representam o EPM.

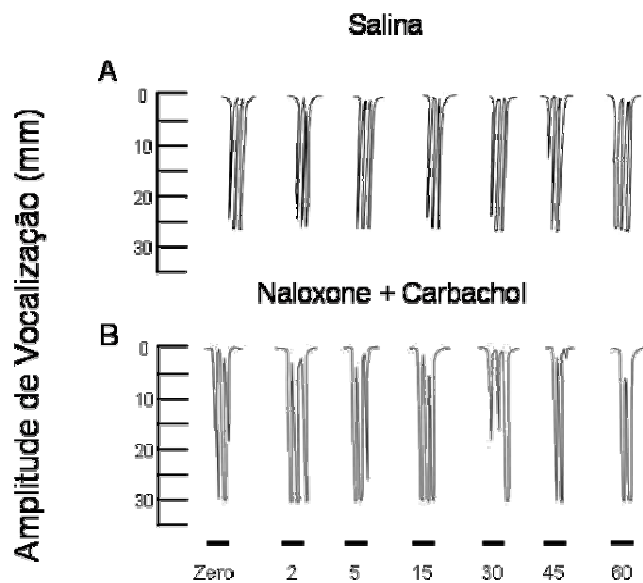


Figura 24: Registro poligráfico da vocalização (amplitude em mm) de um animal representativo de cada grupo experimental após a microinjeção de diferentes drogas na formação hipocampal dorsal de cobaias. A) animal pré-tratado com salina (0,9%) e B) animal pré-tratado com naloxone seguido por carbachol (NAL+CCh). As barras horizontais indicam a duração da estimulação nociva (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). O zero representa o registro de vocalização anterior à microinjeção da(s) droga(s).

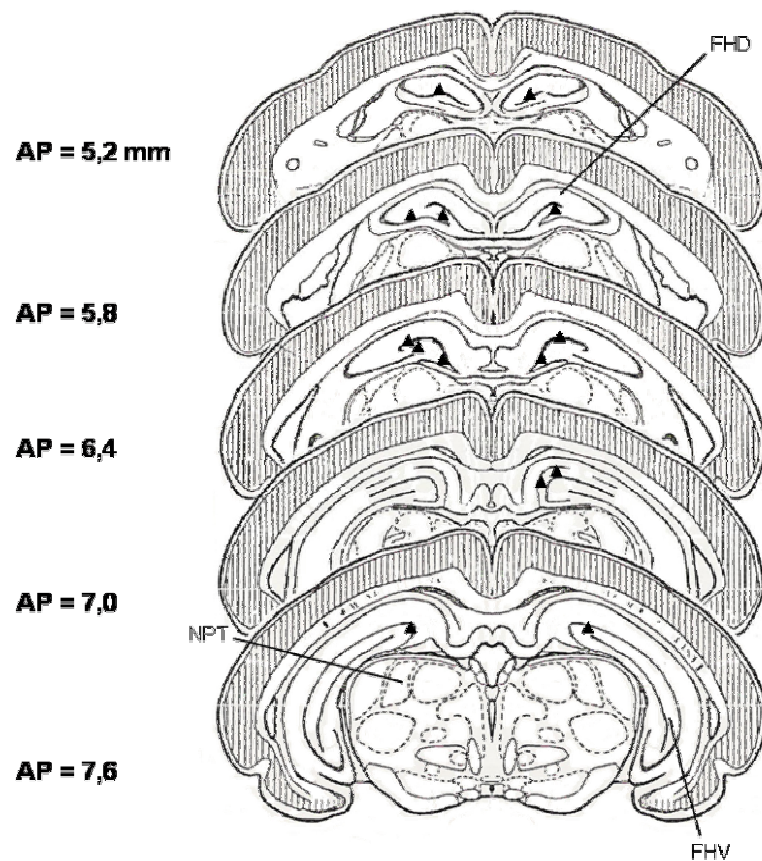


Figura 25: Localização esquemática dos sítios das microinjeções de 1,3 nmol de naloxone seguido por 2,7 nmol de carbacol (NAL+CCh) (grupo 13). FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

Foi realizado o grupo MUS+MOR a fim de se averiguar se a analgesia promovida pela morfina estava sob a influência GABAérgica (figura 26). A dose do muscimol (0,5 nmol) neste caso também foi aquela que não promoveu alteração quando administrado isoladamente. O pré-tratamento com muscimol promoveu um bloqueio na resposta analgésica promovida pela morfina ($F_{(6,78)}=0,516$, $p=0,795$, Two Way RM ANOVA).

As figuras 12, 15, 18, 21, 24 e 27 ilustram registros poligráficos de animais representativos de cada um dos grupos experimentais, enquanto que as figuras 13, 16, 19, 22, 25 e 28 mostram o desenho esquemático da FHD com as projeções dos pontos em que foram realizadas as microinjeções.

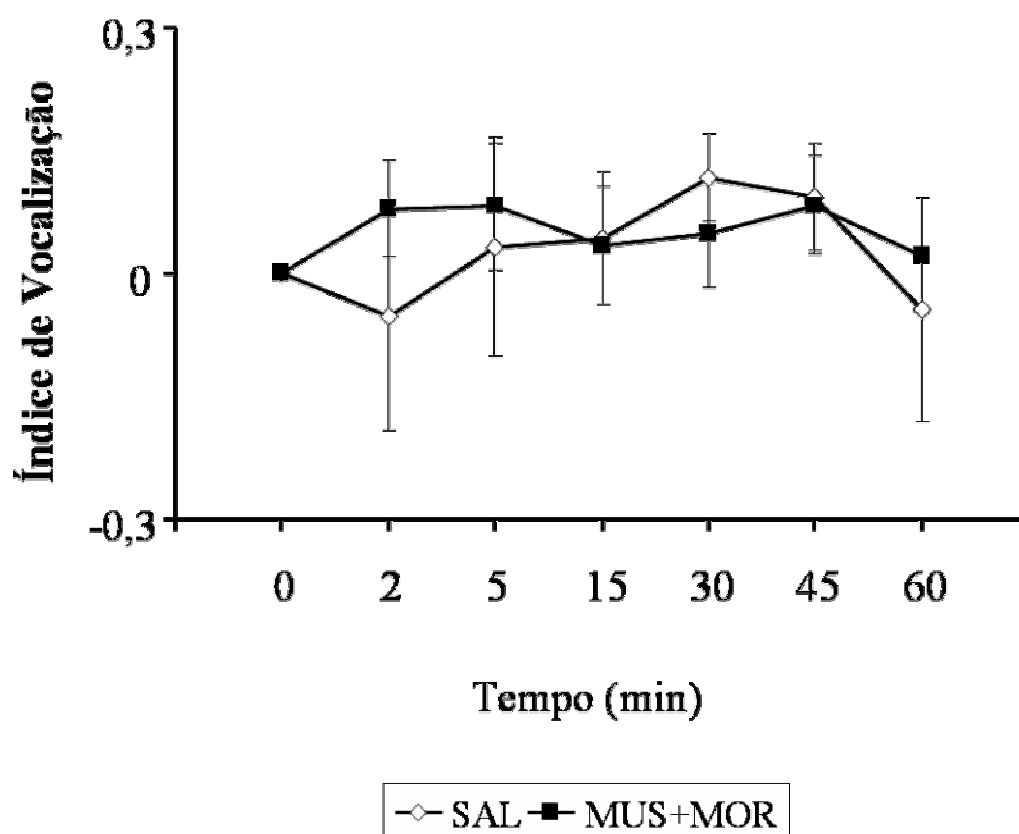


Figura 26: Índice de vocalização (média $\pm$ EMP) anterior (tempo zero) e posterior (2, 5, 15, 30, 45 e 60 min) à microinjeção de 0,9% de salina (n=6) e de 0,5 nmol de muscimol seguido por 1,1 nmol de morfina (MUS+MOR)(n=9) na FHD. As barras verticais representam o EPM.

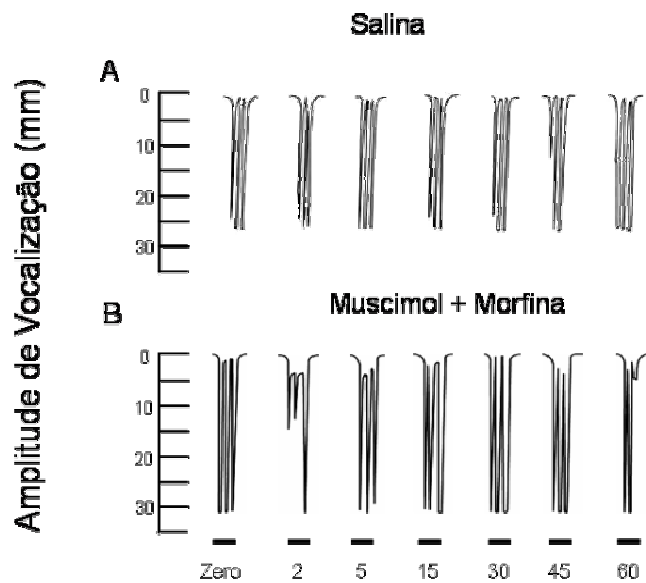


Figura 27: Registro poligráfico da vocalização (amplitude em mm) de um animal representativo de cada grupo experimental após a microinjeção de diferentes drogas na formação hipocampal dorsal de cobaias. A) animal pré-tratado com salina (0,9%) e B) animal pré-tratado com muscimol seguido por morfina (MUS+MOR) na FHD. As barras horizontais indicam a duração da estimulação nociva (3 s) nos diferentes intervalos de tempo (min). O zero representa o registro de vocalização anterior à microinjeção da(s) droga(s).

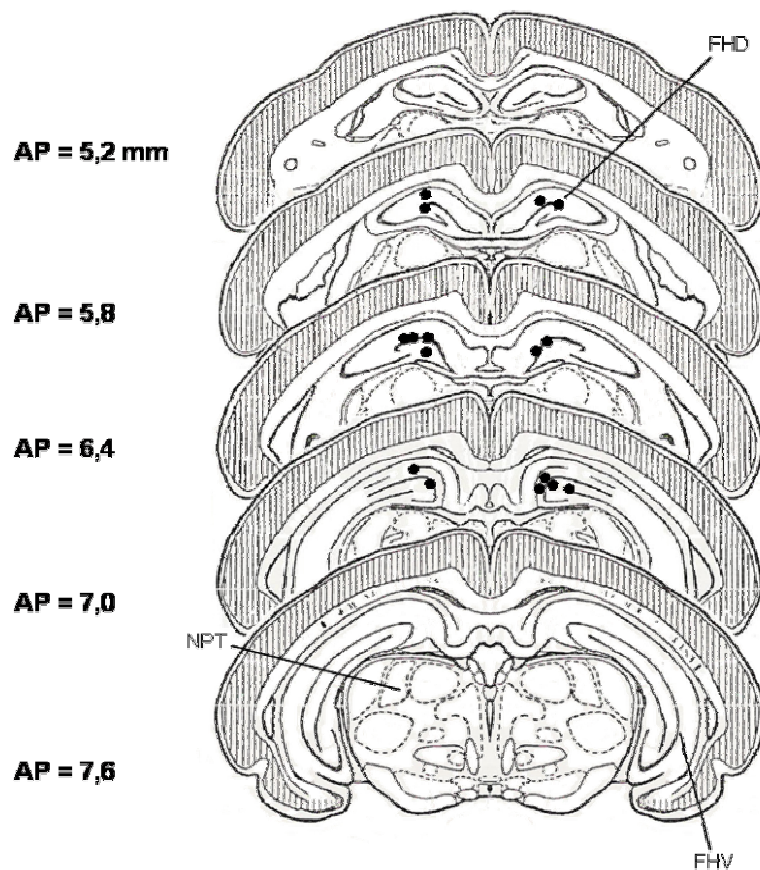


Figura 28: Localização esquemática dos sítios das microinjeções de 0,5 nmol de muscimol seguido por 2,2 nmol morfina (MUS+MOR) (grupo 14). FHD - formação hipocampal dorsal, FHV - formação hipocampal ventral, NPT - núcleo posterior do tálamo.

4.3) Experimento 3

ESTUDO DA CONEXÃO ENTRE FHD E ASM NA MODULAÇÃO DA IMOBILIDADE TÔNICA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE

A microinjeção de salina em ambas as estruturas (na FHD e na ASM) não alterou a duração da IT em cobaias ($p > 0,05$). Os valores encontrados no grupo 1 foram: controle $170 \pm 25,2$ s, “sham” $235 \pm 44,8$ s e drogas $205 \pm 16,4$ s (figura 29A).

Os animais do grupo 2 (figura 30A) receberam a microinjeção de carbacol na ASM, 10 minutos após a microinjeção de salina na FHD, e mostraram uma diminuição significativa ($F_{(2,10)} = 60,470$, $p < 0,001$) no tempo de permanência no comportamento de IT ($75 \pm 14,5$ s) comparado ao controle ($308 \pm 22,0$ s) e “sham” ($269 \pm 36,9$ s).

As microinjeções de muscimol na ASM e de salina na FHD (grupo 3, figura 31A) não promoveram alteração no tempo em que os animais permaneceram em IT ($p > 0,05$). Os valores encontrados foram: controle ($192 \pm 42,0$ s), “sham” ($153 \pm 45,4$ s) e drogas ($170 \pm 48,3$ s).

Quando a FHD foi pré-tratada com lidocaína (2%) seguida (10 min) por 5,4 nmol de carbacol na ASM (grupo 4, figura 32A) não houve diferença significativa entre os resultados encontrados ($p > 0,05$), ou seja, ocorreu um bloqueio do efeito de redução da IT promovido pelo CCh quando microinjetado na ASM. Os resultados encontrados foram: controle ($242 \pm 77,6$ s), “sham” ($199 \pm 51,4$ s) e drogas ($223 \pm 52,8$ s).

O mesmo resultado foi encontrado quando a FHD recebeu microinjeção do antagonista muscarínico, atropina. O grupo 5 (figura 33A) recebeu microinjeção de atropina na FHD (0,7 nmol) e a ASM recebeu microinjeção de carbacol (5,4 nmol) 10 min depois e os resultados encontrados não revelaram diferença estatística entre os procedimentos

experimentais ($p > 0,05$). A duração do tempo de permanência em IT no controle foi de $195 \pm 37,6$ s, no “sham” $187 \pm 36,0$ s e após as microinjeções das drogas $151 \pm 18,5$ s.

Os animais que receberam a microinjeção de lidocaína (2%) na ASM e carbacol (2,7 nmol) na FHD após 10 min mostraram uma diminuição no tempo de permanência em IT ($F_{(2,24)} = 22,248$, $p < 0,001$) quando comparados com o procedimento controle e “sham” (grupo 6). Os resultados encontrados foram: controle ($159 \pm 24,8$ s), “sham” ($134 \pm 22,4$ s) e experimental ($29 \pm 6,0$ s) (figura 34A).

O grupo 7 recebeu microinjeção de muscimol (1,0 nmol) na ASM seguido por carbacol (2,7 nmol) na FHD e observamos diminuição da resposta comportamental de IT, indicando que, nessa resposta, o efeito do CCh na FHD não depende de sua conexão com a ASM (figura 35A) ($F_{(2,12)} = 24,717$, $p < 0,001$). A duração do tempo de permanência em IT no controle foi de $304 \pm 36,1$ s, no “sham” $252 \pm 26,2$ s e no bloqueio $89 \pm 17,3$ s.

As figuras de 29 a 35 (B) representam as localizações esquemáticas das microinjeções de cada um dos grupos experimentais estudados.

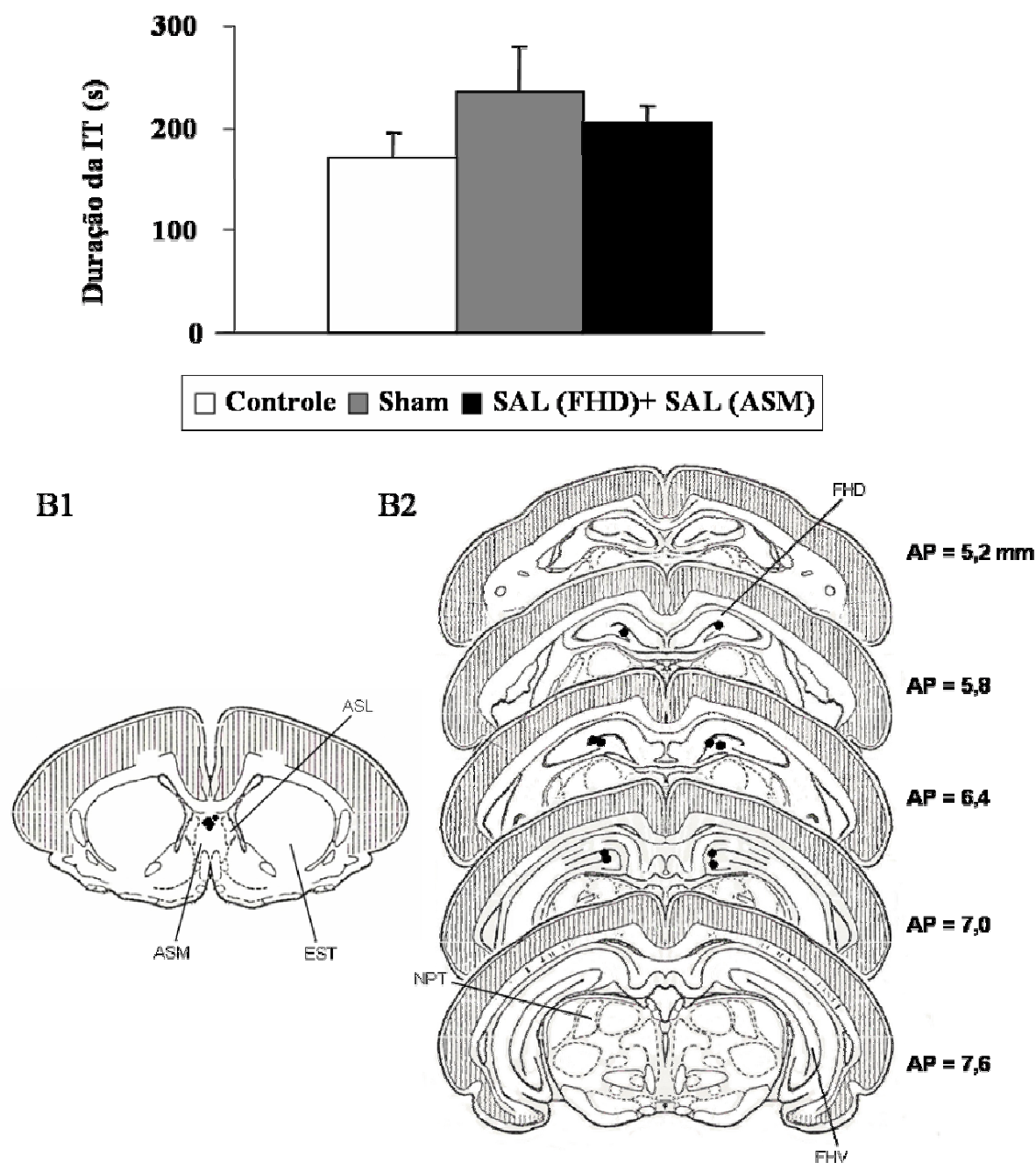


Figura 29: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=5) em situação controle, sham e após a microinjeção de SAL (0,9%) na FHD seguida pela microinjeção de SAL (0,9%) na ASM (grupo 1). As barras verticais representam o EPM.* $p < 0,05$ comparado com grupo controle e sham. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da ASM (B1) e da FHD (B2) de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. ASM- área septal medial, ASL- área septal lateral, EST- estriado. FHD- formação hipocampal dorsal, FHV- formação hipocampal ventral, NPT- núcleo posterior do tálamo.

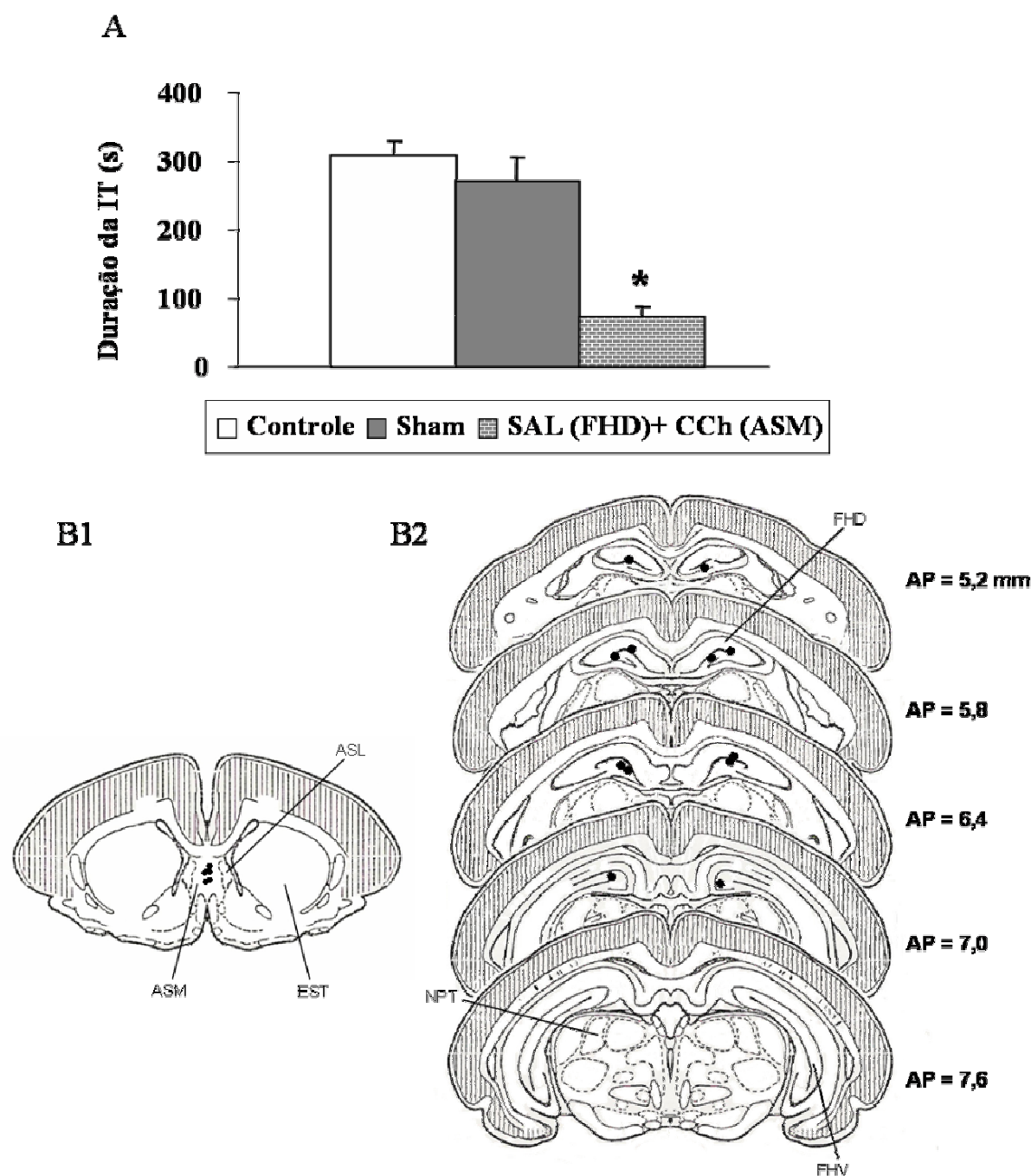


Figura 30: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias ($n=6$) em situação controle, sham e após a microinjeção de SAL (0,9%) na FHD seguida pela microinjeção de CCh (5,4 nmol) na ASM (grupo 2). As barras verticais representam o EPM. * $p<0,05$ comparado com grupo controle e sham. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da ASM (B1) e da FHD (B2) de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. ASM- área septal medial, ASL- área septal lateral, EST- estriado. FHD- formação hipocampal dorsal, FHV- formação hipocampal ventral, NPT- núcleo posterior do tálamo.

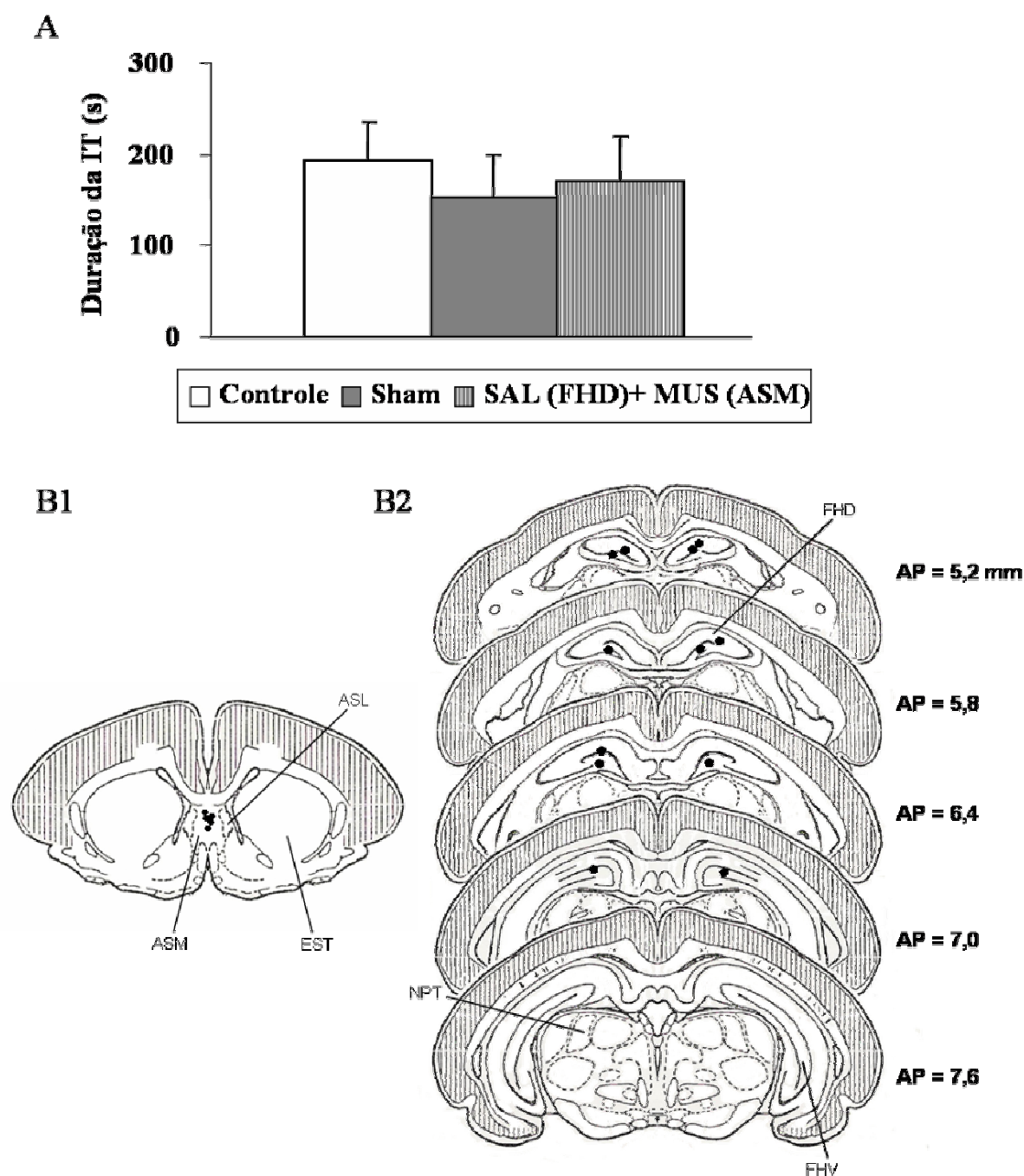


Figura 31: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=6) em situação controle, sham e após a microinjeção bilateral de SAL (0,9%) na FHD seguida pela microinjeção de muscimol (1,0 nmol) na ASM (grupo 3). As barras verticais representam o EPM. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da ASM (B1) e da FHD (B2) de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. ASM- área septal medial, ASL- área septal lateral, EST- estriado. FHD- formação hipocampal dorsal, FHV- formação hipocampal ventral, NPT- núcleo posterior do tálamo.

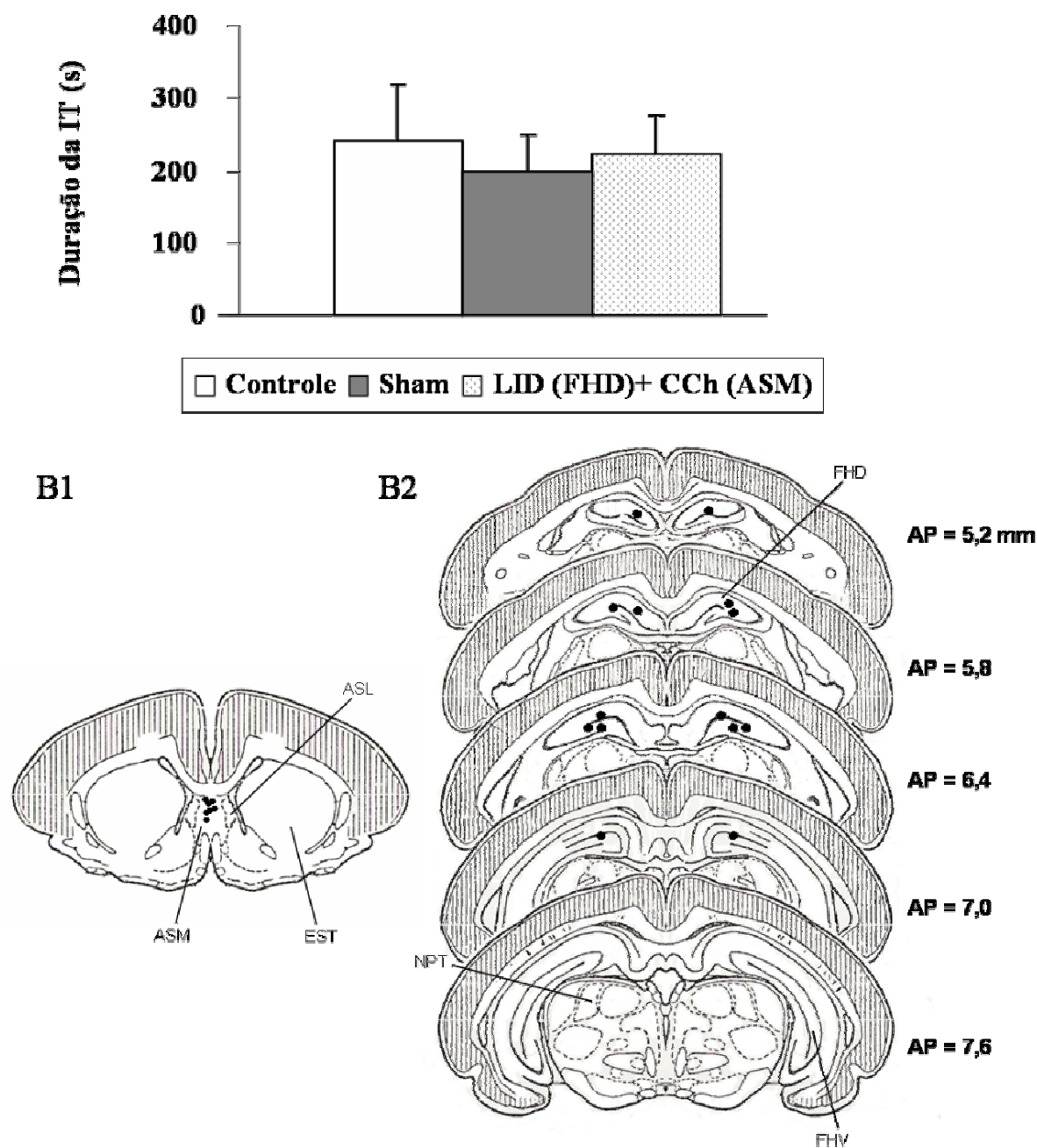


Figura 32: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=7) em situação controle, sham e após a microinjeção de LID (2%) na FHD seguida pela microinjeção de CCh (5,4 nmol) na ASM (grupo 4). As barras verticais representam o EPM. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da ASM (B1) e da FHD (B2) de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. ASM- área septal medial, ASL- área septal lateral, EST- estriado. FHD- formação hipocampal dorsal, FHV- formação hipocampal ventral, NPT- núcleo posterior do tálamo.

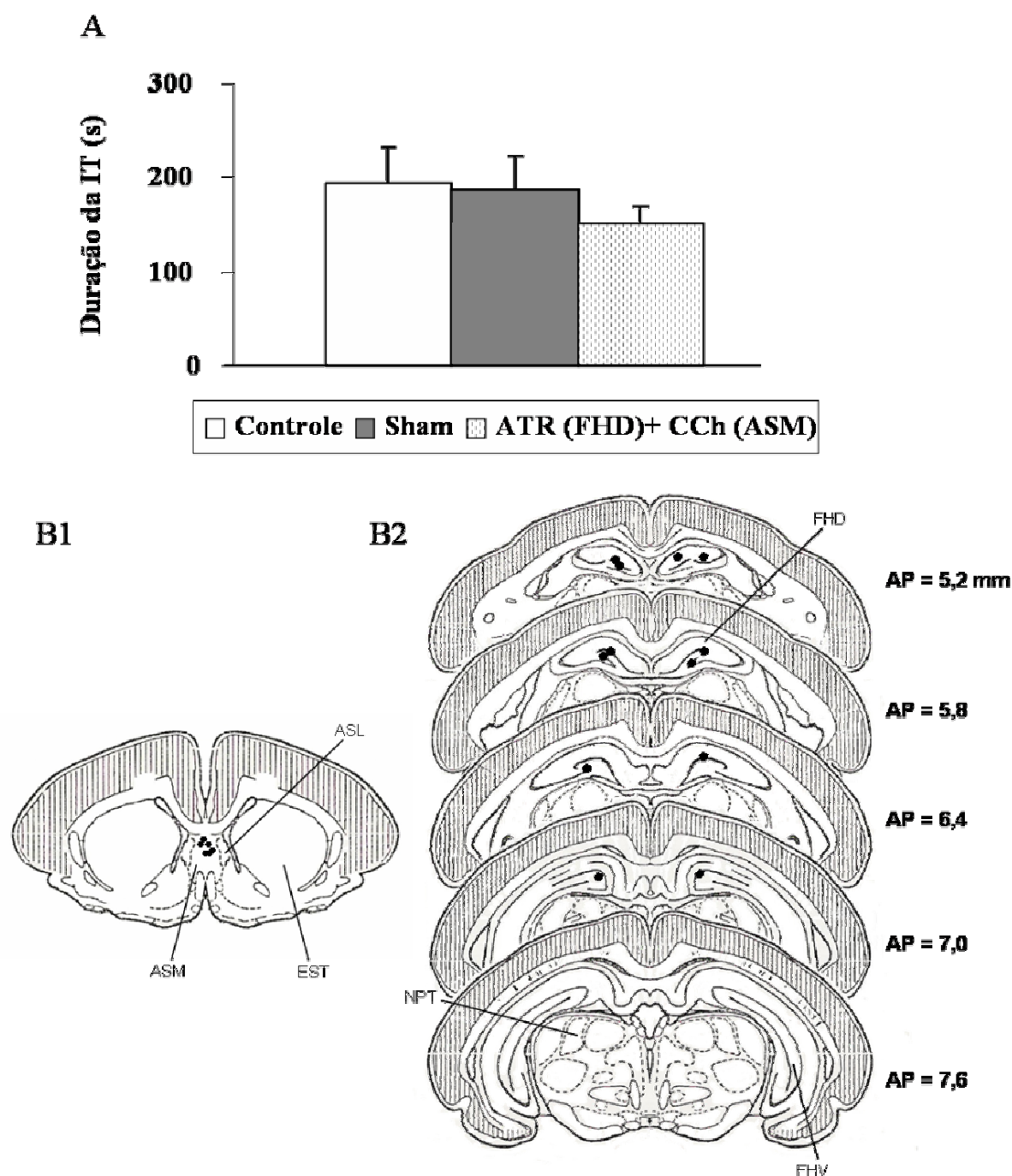
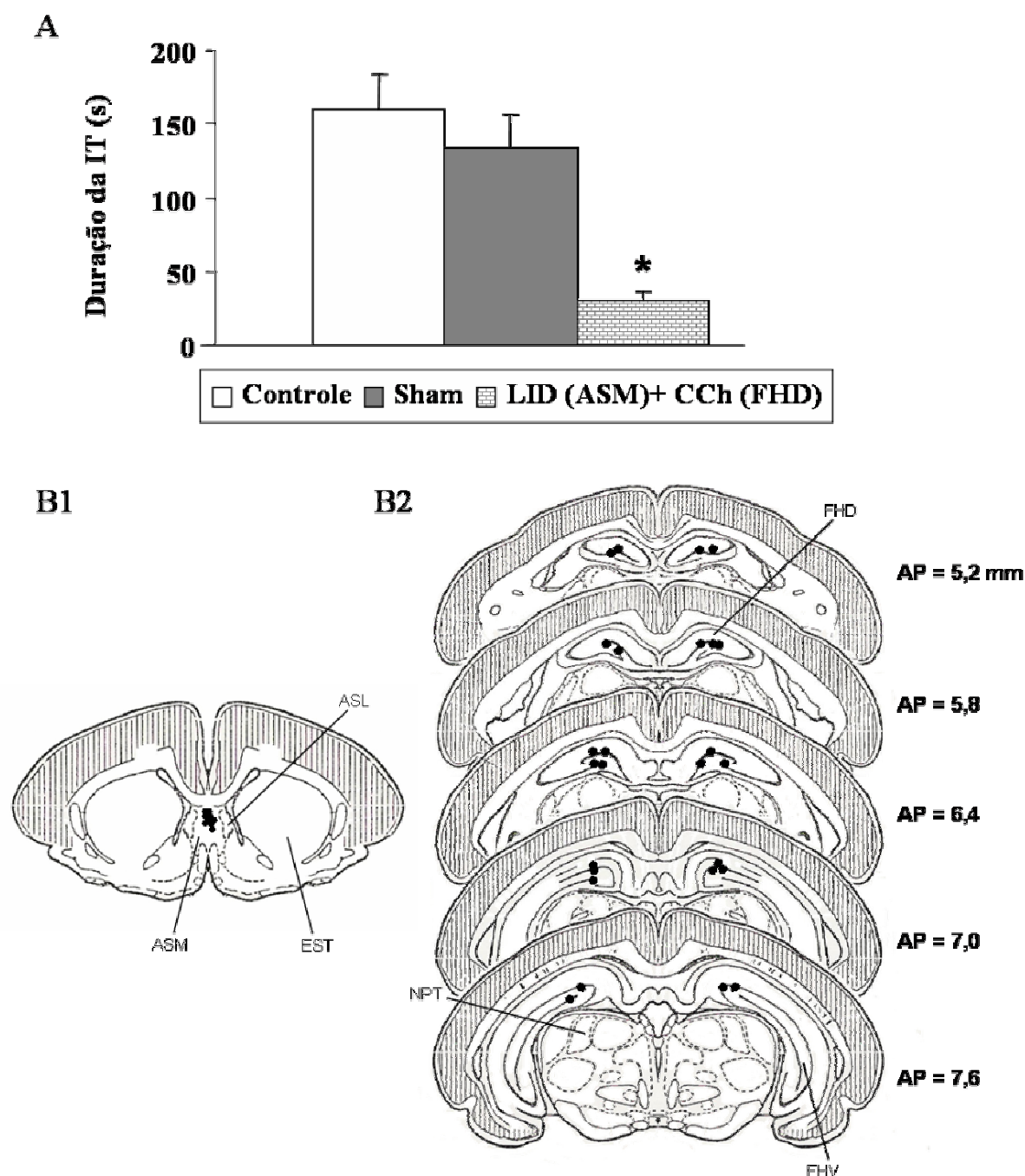


Figura 33: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=6) em situação controle, sham e após a microinjeção de ATR (0,7 nmol) na FHD seguida pela microinjeção de CCh (5,4 nmol) na ASM (grupo 5). As barras verticais representam o EPM. B) Desenho esquemático de secções frontais de níveis representativos da ASM (B1) e da FHD (B2) de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. ASM- área septal medial, ASL- área septal lateral, EST- estriado. FHD- formação hipocampal dorsal, FHV- formação hipocampal ventral, NPT- núcleo posterior do tálamo.



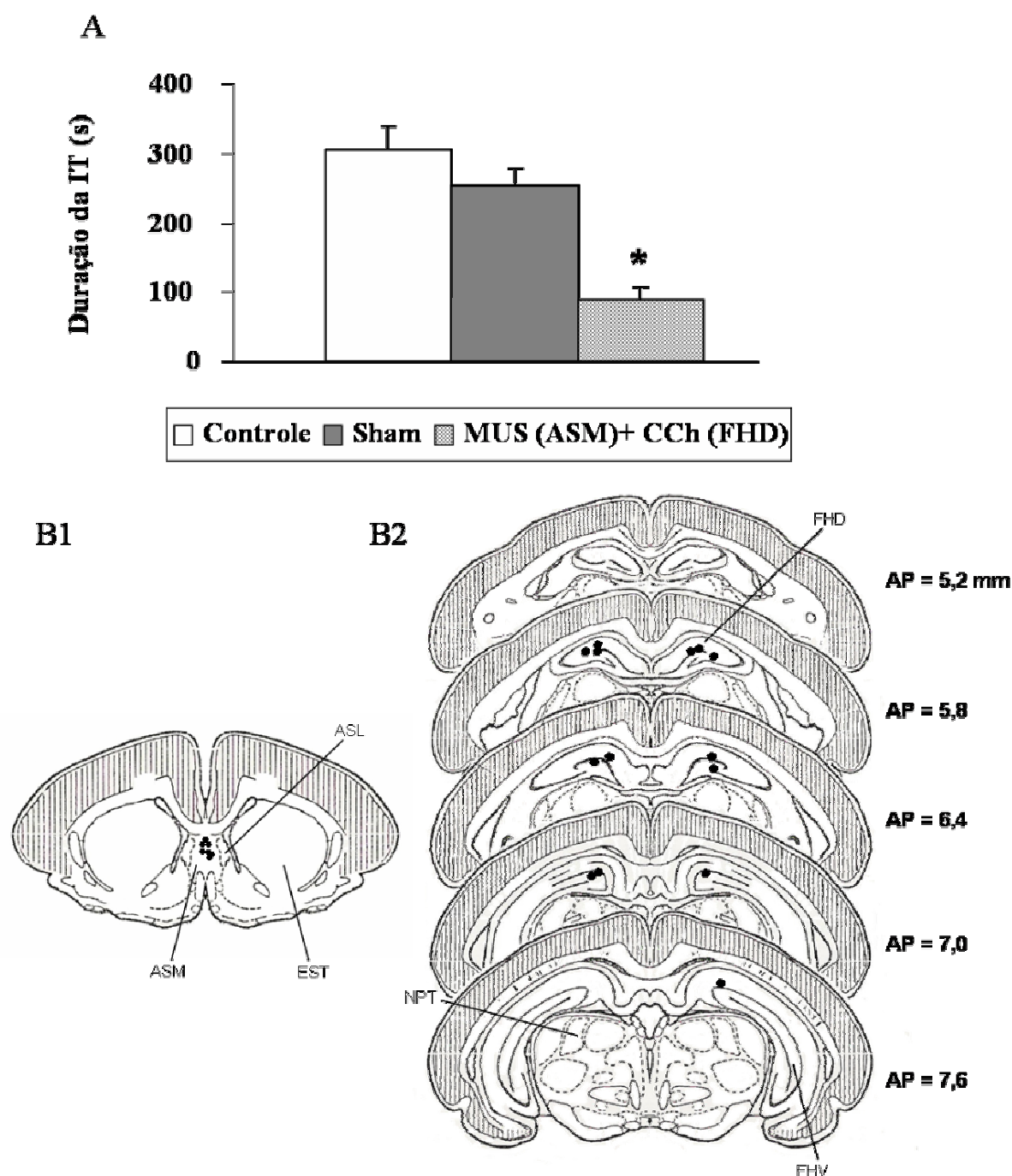


Figura 35: A) Média dos episódios (s) de IT em cobaias (n=7) em situação controle, sham e após a microinjeção de MUS (1,0 nmol) na ASM seguida pela microinjeção de CCh (2,7 nmol) na FHD (grupo 7). As barras verticais representam o EPM. * $p < 0,05$ comparado com os demais procedimentos. B) Desenho esquemático de seções frontais de níveis representativos da ASM (B1) e da FHD (B2) de cobaias com a projeção dos pontos onde foram realizadas as microinjeções. ASM- área septal medial, ASL- área septal lateral, EST- estriado. FHD- formação hipocampal dorsal, FHV- formação hipocampal ventral, NPT- núcleo posterior do tálamo.

5) DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que microinjeção de morfina na FHD em doses e grupos diferentes promoveu uma diminuição significativa na duração dos episódios de IT em cobaias, sendo esse efeito bloqueado pela administração prévia de naloxone no mesmo sítio. Entretanto, no que diz respeito à antinocicepção, avaliada pelo teste de vocalização induzido por um estímulo nocivo periférico, somente a dose maior de morfina (2,2 nmol) administrada na FHD foi efetiva. Esse efeito de diminuição da amplitude média de vocalização teve início aos 5 minutos após a morfina e prolongou-se até os 60 minutos. Da mesma forma que ocorreu com a resposta de IT, o efeito antinociceptivo da morfina foi antagonizado pela microinjeção prévia do naloxone sugerindo assim, a participação de receptores μ -opióides.

Os receptores opióides quando ativados exercem um papel fundamental nos mecanismos centrais de regulação da dor (PRZEWLOCKI; PRZEWLOCKA, 2001). A injeção subcutânea de morfina produz um aumento significativo (84%) na latência da resposta de retirada da cauda em ratos, quando comparado ao controle e essa resposta perdura por quatro horas (BHALLA et al., 2004). Em outro experimento foi demonstrado que a administração iv de morfina aumenta a taxa de disparo nos neurônios da CA1 da FHD e bloqueia a resposta ao aquecimento nocivo da cauda, enquanto que o naloxone administrado pela mesma via reverteu esses efeitos (SINCLAIR; LO, 1986). Craft et al. (1995) mostraram em ratos que a administração sistêmica e local (intravesical) de agonistas μ , κ e δ opióides produz antinocicepção em resposta a irritação química visceral induzida pela resiniferatoxina, um agonista do receptor vanilóide. Estudos realizados com camundongos e ratos mostraram redução significativa da resposta nociceptiva nas duas fases do teste da formalina após a administração sistêmica de morfina (HUNSKAAR et al., 1985; JOURDAN et al., 1997; PANG et al., 2001).

A formação hipocampal é uma estrutura que apresenta significantes densidades de receptores opióides, μ (MCLEAN et al., 1987), κ (DRAKE et al., 1996; CAUDLE et al., 1997), δ (MCLEAN et al., 1987) e nociceptina/orfanina (SANDIN et al., 2004). A administração intrahipocampal de opióides promove alterações cardiovasculares (WANG; INGENITO, 1994; SHEN; INGENITO, 1999) e modificações no aprendizado e memória (McDANIEL et al., 1990; MEILANDT et al., 2004; ZHAO et al., 2004). A administração intrahipocampal de morfina promove ações excitatórias em células piramidais (CA1) registradas em preparações de fatias (slices) hipocampais (ROBINSON; DEADWYLER, 1981).

O envolvimento do sistema opioidérgico na modulação da IT também tem sido amplamente descrito na literatura. Em relação a essa resposta comportamental, o efeito de agonista opióide depende tanto da via em que é administrado, quanto do sítio da microinjeção. A administração sistêmica de morfina potencializa a duração dos episódios de IT em cobaias (MUCHA, 1980), ratos (SMITH; MEYER, 1985) galinhas (HICKS et al., 1975) e coelhos (CARLI et al., 1978). A microinjeção de morfina em alguns sítios encefálicos, como na SCP ventrolateral (MONASSI et al., 1999) e no núcleo magno da rafe (DA SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2007) promove um aumento na duração dos episódios de IT, enquanto que no núcleo central da amígdala produz uma diminuição na duração dessa resposta (LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002). No presente trabalho também observamos que a administração de morfina na FHD, promoveu uma diminuição significativa na duração dos episódios de IT em cobaias.

Sabe-se que o efeito antinociceptivo produzido pela morfina é devido principalmente a sua alta afinidade por receptores do tipo μ -opióide. Entretanto, no presente trabalho, a antinocicepção obtida somente com a maior dose de morfina (2,2 nmol) talvez se deva a

participação e ativação concomitante de outros receptores opióides, inclusive do tipo κ , encontrado em alta densidade na FH de cobaias (FOOTE; MAURER, 1986).

Em relação a participação do sistema GABAérgico na regulação da resposta comportamental de IT, nossos resultados mostraram que a microinjeção na FHD de bicuculina (antagonista GABA_A) em ambas as doses (0,2 nmol e 1 nmol) promoveu diminuição da média dos episódios de IT comparado com o experimento controle e “sham”. Entretanto, o efeito antinociceptivo foi obtido somente com a dose maior de bicuculina. Assim, podemos aventar a hipótese de que a diferença encontrada seja devido ao fato de que estímulos sensoriais de intensidades diferentes como os que desencadeiam a IT e nocicepção possam ativar de maneira distinta os circuitos opioidérgicos e GABAérgicos da FHD envolvidos na modulação dessas respostas.

O muscimol, agonista do receptor GABA_A, por sua vez, provocou aumento na duração dos episódios de IT na dose de 1,0 nmol, e nenhuma alteração com 0,5 nmol. Com relação a resposta nociceptiva somente a microinjeção de 1,0 nmol promoveu um aumento na resposta de vocalização, induzida pela estimulação periférica nociva, indicando uma ação hiperalgésica. Sabe-se que a ablação bilateral do hipocampo dorsal (WOODRUFF et al., 1975) aumenta a susceptibilidade e a duração da IT em coelhos. O hipocampo poderia então, funcionar não somente de maneira a inibir o movimento, mas também como parte de um sistema que atenuaria a IT, permitindo ao animal iniciar outro comportamento (WOODRUFF et al., 1975). Assim, o muscimol microinjetado na FHD, por meio da ativação de receptores GABAérgicos poderia inibir neurônios efetores do hipocampo com efeito semelhante a retirada funcional dessa estrutura e assim, aumentar a duração da IT. Por outro lado, a integridade da FHD parece ser necessária para a resposta antinociceptiva que ocorre pela ativação do hipocampo. Podemos assim, aventar hipótese de que a hiperalgesia obtida pelo

muscimol seria decorrente da inativação da referida estrutura, pois, quando ativada produz antinocicepção.

Dados anteriores do laboratório já haviam mostrado a participação do sistema colinérgico hipocampal na modulação do comportamento de IT, no qual a microinjeção de carbacol promove uma diminuição dessa resposta comportamental enquanto que a atropina promove um aumento (BAPTISTA, 2000). A administração do agente anticolinérgico escopolamina via sistêmica (WOODRUFF et al., 1976), também produz um aumento da IT em coelhos.

No presente trabalho, verificamos a participação da estimulação colinérgica hipocampal na resposta nociceptiva. A microinjeção de carbacol na FHD promoveu antinocicepção avaliada pela diminuição da vocalização induzida por um estímulo nocivo periférico. O efeito antinociceptivo do carbacol ocorreu logo nos primeiros 5 minutos, após a microinjeção e se manteve até o final do experimento (60 minutos). A microinjeção prévia do antagonista colinérgico (atropina) numa dose *per se* sem efeito bloqueou a antinocicepção produzida pelo carbacol, indicando envolvimento de receptores muscarínicos. Resultados semelhantes de redução do tempo de IT e antinocicepção foram demonstrados em outros trabalho desse laboratório abordando estruturas prosencefálicas e rombencefálicas de cobaias, como o núcleo central da amígdala (LEITE-PANISSI et al., 2003) e o núcleo magno da rafe, respectivamente (da SILVA; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2006).

Ghelardini et al. (1997) mostraram que a cafeína sistêmica produz significativa antinocicepção em ratos (teste de pressão na pata) e camundongos (placa-quente e constrição abdominal) por meio da liberação de acetilcolina no hipocampo e que a atropina previne essa antinocicepção. Klamt e Prado (1991), por sua vez, mostraram que a microinjeção do agonista muscarínico carbacol no hipocampo atenua comportamentos dolorosos nos ratos.

Por outro lado, a participação do sistema colinérgico hipocampal no processamento nociceptivo tem sido sugerido por vários autores incluindo Ceccarelli et al. (1999), Khanna e Sinclair (1992), Dong et al. (2004), que utilizaram diferentes abordagens experimentais. O estímulo aversivo, por meio de choques nas patas (DONG et al., 2004) e o estímulo nocivo tônico induzido pela injeção de formalina na pata, promoveram um aumento na liberação de acetilcolina no hipocampo de ratos (CECCARELLI et al., 1999). Dados eletrofisiológicos mostraram que em ratos, estímulos nociceptivos de curta duração ativam a via colinérgica septo-hipocampal (DUTAR et al., 1985) e induzem a depressão de longa duração dos neurônios piramidais hipocampais (KHANNA; SINCLAIR, 1989; 1992).

Curiosamente, Aloisi et al. (1993) relataram que a injeção subcutânea de formalina na pata traseira do rato induz comportamento nociceptivo persistente e observaram uma diminuição prolongada na atividade da enzima colina acetiltransferase que sintetiza a acetilcolina no hipocampo dorsal.

Estudos prévios deste laboratório (MONASSI et al., 1999; LEITE-PANISSI; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2002) demonstraram haver uma interação entre os sistemas colinérgico, opioidérgico e GABAérgico na modulação da IT em pelo menos duas estruturas encefálicas, a substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPvl) e núcleo central da amígdala. Monassi et al. (1999) sugerem que na SCPvl exista um mesmo circuito de neurotransmissores responsável tanto pela modulação da IT em cobaias, quanto pela regulação da antinocicepção (MONASSI, 2000). Acredita-se que, na SCPvl, a microinjeção de carbacol ativaria neurônios opioidérgicos, os quais, por sua vez, inibiriam neurônios GABAérgicos, desinibindo, desta maneira, neurônios de eferência da SCPvl e promovendo a ativação de uma via descendente que possivelmente modula a resposta de IT e antinocicepção.

No presente trabalho, também observamos uma interação entre esses três sistemas de neurotransmissores. A microinjeção prévia de naloxone na FHD foi capaz de bloquear os efeitos inibitórios do carbacol bem como da morfina em ambos os procedimentos experimentais, ou seja, de diminuição da duração da IT e da antinocicepção. Assim, nossos resultados sugerem que a estimulação de receptores muscarínicos da FHD poderia promover diminuição da IT e antinocicepção por meio da ativação de interneurônios opioidérgicos, uma vez que o naloxone foi capaz de bloquear a resposta induzida pelo carbacol (Figura 36).

Em relação à interação entre os neurotransmissores opioidérgico e GABAérgico, resultados do presente trabalho também mostraram que a administração prévia do agonista GABAérgico muscimol, numa dose *per se* sem efeito seguida pela administração de morfina foi capaz de prevenir os efeitos promovidos pela morfina, ou seja, inibir a diminuição da IT e a antinocicepção. Sendo assim, poderíamos sugerir que na FHD existe uma interação complexa em um circuito neuronal envolvendo terminações colinérgicas, interneurônios encefalinérgicos e GABAérgicos modulando as respostas de IT e de nocicepção (Figura 36).

No que diz respeito a FHD, a inibição dos interneurônios GABAérgicos promovidos pela ativação opioidérgica desinibe neurônios efetores hipocampais produzindo a diminuição da duração da IT e antinocicepção. É interessante observar que a microinjeção no hipocampo de carbacol, morfina e bicuculina produz uma diminuição significativa da duração da IT e antinocicepção indicando que a integridade e ativação desse sítio se faz necessária para estes efeitos. Por outro lado, a inativação da FHD, por meio da microinjeção de muscimol, produziu aumento da duração da IT e hiperalgesia. Nossos resultados referentes a IT corroboram os achados de Woodruff et al. (1975), os quais mostraram que a ablação bilateral do hipocampo dorsal resultou em um aumento na duração da IT em coelhos.

As principais vias sinápticas excitatórias da FH, as fibras musgosas (provenientes do giro denteado) e a via perforante (proveniente do córtex entorrinal) contém peptídeos opióides

(MCGINTY et al., 1983) e também receptores opióides em alta densidade (MANSOUR et al., 1995).

Zieglängsberger et al. (1979) relataram que a excitação de neurônios piramidais hipocámpais por opióides parece ser causada pela inibição de interneurônios GABAérgicos, conclusão essa que tem sido corroborada por estudos subsequentes (DUNWIDDIE et al., 1980; COHEN et al., 1992; CAPOGNA et al., 1993; PIGUET; NORTH, 1993). Além disso, Wiesner et al. (1986) e Neumaier et al. (1988) também demonstraram que os opióides no giro denteado atuam por meio de um mecanismo desinibitório. Esses achados corroboram nossos resultados evidenciando uma interação entre os sistemas gabaérgico e opioidérgico da FHD.

Kalyuzhny e Wessendorf (1998) encontraram nas regiões CA1, CA3 e giro denteado do hipocampo de rato com dupla marcação para receptores μ -opióides (marcação imunofluorescente) e para neurônios GABAérgicos (descarboxilase). A presença de receptores μ -opióides em neurônios GABAérgicos sugere que por sua posição, os receptores μ -opióides possam controlar diretamente a atividade dos neurônios GABAérgicos não só no hipocampo mas também em áreas encefálicas, como no córtex cerebral, no diencéfalo, mesencéfalo e estriado (KALYUZHNY; WESSENDORF, 1997; 1998). Isso sugere que a ativação do receptor μ -opióide modula diretamente a atividade de neurônios GABAérgicos envolvidos no componente supraespinal da analgesia opióide (KALYUZHNY; WESSENDORF, 1998).

Blasco-Ibanez et al. (1998) demonstraram que células que contêm encefalina no hipocampo são classificadas como interneurônios especializados em inervar outros interneurônios. Esses mesmos autores mostraram que a encefalina pode exercer uma importante função na sincronização e regulação de tempo de inibição envolvido na rede de atividades rítmicas do hipocampo.

Lupica et al. (1992) mostraram que a administração do agonista μ -opiíide (DAGO) ou do antagonista GABA_A (bicuculina) no hipocampo de ratos promove uma diminuição da frequência dos potenciais pós-sinápticos inibitórios espontâneos. Portanto, a ativação do receptor μ promoveria um aumento do potencial excitatório pós-sináptico pela inibição de interneurônios GABAérgicos. Nossos dados corroboram os resultados encontrados nos trabalhos acima referidos, pois mostram que a administração prévia de uma dose inefetiva do agonista GABAérgico muscimol na FHD, foi capaz de prevenir os efeitos promovidos pela morfina, ou seja, de inibir a redução da IT e a antinocicepção.

O presente resultado sugere que os mesmos sistema de neurotransmissores na FHD podem modular, independentemente, a duração da resposta defensiva de IT e a nocicepção, promovendo uma diminuição na IT e a ativação de um sistema antinociceptivo como demonstrado pela diminuição do índice de vocalização. Embora as respostas de IT e antinociceptiva possam ser deflagradas em resposta a estímulos ameaçadores, também pode ocorrer analgesia com redução da duração da IT. Assim, Amir (1986) sugere a ocorrência de uma analgesia profunda após o final da IT, visto que, a primeira reação após a IT é a fuga. Sabe-se ainda que a antinocicepção também pode ocorrer durante a elaboração de outros comportamentos defensivos, incluindo a fuga (HARRIS; 1996, RODGERS; RANDALL, 1987). Dessa forma, como a estimulação colinérgica ou opioidérgica da FHD está mais relacionada com a finalização dos episódios de IT isto sugere que essa estrutura possa fazer parte do substrato neural também envolvido na emissão dos comportamentos ativos (como a fuga) que são disparados logo depois da resposta de IT.

Experimentos prévios realizados nesse laboratório indicaram que, dentre as várias estruturas centrais envolvidas com o comportamento da IT, a ASM também pode participar da modulação deste comportamento, uma vez que a microinjeção de carbacol nesta região promoveu uma diminuição do tempo de permanência em IT (KINA et al., 1994). Nossos

resultados também mostraram que a microinjeção prévia de salina na FHD e de carbacol na ASM também promoveram diminuição no tempo de duração da IT. Já as microinjeções de salina na FHD e muscimol na ASM não promoveram alteração na duração do comportamento de IT. O resultado encontrado talvez se deva ao fato de que a dose de muscimol utilizada atue da mesma maneira que a xilocaína, como anestésico local ou de que essa dose não tenha sido suficiente para promover alteração no comportamento de IT.

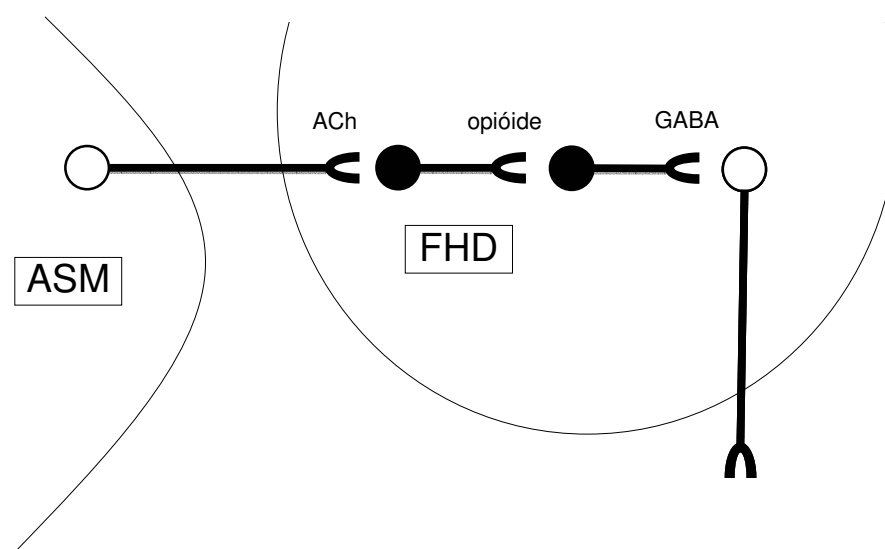
O mesmo resultado foi encontrado após a microinjeção de xilocaína na ASM, sugerindo que, provavelmente a estimulação do sistema colinérgico da ASM esteja participando, não de maneira tônica, mas de maneira fásica, no término dessa resposta comportamental (KINA et al., 1994). Com base no fato de que a principal aferência subcortical para a FHD é a via septo-hipocampal e essa via origina-se no complexo ASM/BDB (AMARAL; KURZ, 1985; WAINER et al., 1985; BRASHEAR et al., 1986), no presente trabalho averiguamos os efeitos do bloqueio da FHD, com o anestésico local lidocaína, seguido pela estimulação muscarínica da ASM com o carbacol. As respostas de IT não diferiram daquelas encontradas no controle e no “sham”, ou seja, o bloqueio da FHD com lidocaína, impediu que a estimulação colinérgica da ASM promovesse a diminuição da duração da resposta comportamental de IT. Esses resultados, portanto, indicam que a ação colinérgica do carbacol na ASM sobre a duração da resposta de IT ocorre via projeções para FHD, pois sua exclusão pela lidocaína inibiu o efeito de redução dessa resposta comportamental.

As fibras que compõe a via septo-hipocampal apresentam três principais neurotransmissores, a acetilcolina, o GABA e o glutamato (AMARAL; KURZ, 1985; WAINER et al., 1985; BRASHEAR et al., 1986; SOTTY et al., 2003; COLOM et al., 2005). As fibras colinérgicas estão em maior número e são as principais fontes de acetilcolina na FH (AMARAL; KURZ, 1985; WAINER et al., 1985; BRASHEAR et al., 1986). Dessa forma, no

presente trabalho, efetuamos o bloqueio colinérgico na FHD com atropina e estimulamos a ASM com carbacol e novamente não foi encontrada alteração na duração da IT. Esses achados mostram que, provavelmente a diminuição do tempo do comportamento de IT promovido pela estimulação colinérgica na ASM depende de sua eferência colinérgica para a FHD (Figura 36). Nossos resultados sugerem, portanto, que a estimulação colinérgica da ASM é capaz de liberar acetilcolina na FHD visto que, a inibição com xilocaína ou o bloqueio colinérgico com atropina dessa estrutura foi capaz de bloquear o efeito de diminuição da IT pelo CCh na ASM. Estes achados, de uma maneira indireta, corroboram os resultados encontrados por Gorman et al. (1994) que demonstraram que a administração de escopolamina (antagonista muscarínico inespecífico) na ASM promoveu diminuição da liberação de acetilcolina de maneira dose-dependente no hipocampo.

A FHD poderia influenciar a resposta comportamental defensiva de IT em cobaias por meio de sua conexão recíproca com a ASM (ALONSO; KÖHLER, 1982; SCHWERDTFEGGER; BUHL, 1986). Dessa maneira, bloqueamos farmacologicamente a ASM com lidocaína ou muscimol e estimulamos a FHD com carbacol. Nossos resultados demonstram que mesmo com o bloqueio farmacológico da ASM, o carbacol microinjetado na FHD foi capaz de continuar promovendo uma diminuição no tempo em que os animais permaneceram em IT, ou seja, resultado semelhante ao obtido após a microinjeção isolada de carbacol na FHD. Esses achados indicam que, embora a conexão entre ASM e FHD seja bidirecional, na modulação da resposta IT, somente a projeção colinérgica da ASM para a FHD parece ter importância funcional, pois, o bloqueio com a atropina na FHD impediu o efeito do CCh na ASM. Por outro lado, o inverso não é verdadeiro, pois, a resposta de diminuição da IT pela ativação colinérgica da FHD ocorre mesmo na ausência da ASM, quando esta é excluída funcionalmente pela xilocaína ou inibida pelo muscimol. Diante desses resultados podemos aventar a hipótese de que a ASM não seja a principal via pela qual a FHD possa

Figura 36: Desenho esquemático do possível circuito colinérgico-opioidérgico-GABAérgico presente na ASM e FHD envolvido na modulação das respostas de IT e nociceptiva. Acredita-se que a liberação de acetilcolina na FHD, proveniente, provavelmente, de fibras septais mediais, ativaria neurônios opioidérgicos, os quais, por sua vez, inibiriam interneurônios GABAérgicos, desinibindo, desta maneira, neurônios de eferência da FHD. Esses neurônios, por sua vez, promoveriam a ativação de vias que modulariam as respostas de IT, diminuindo sua duração e as respostas nociceptivas, promovendo antinocicepção.



modular a resposta comportamental de IT. Assim, na modulação da IT pela FHD poderiam estar envolvidas outras conexões, tais como a área septal lateral bem como outras regiões subcorticais, como o núcleo accumbens ou a amígdala (AMARAL; WITTER, 1995). No que diz respeito a essas duas últimas estruturas citadas, salientamos que já foi demonstrado nesse laboratório a participação de ambas na modulação da IT (BRANCO-DE-OLIVEIRA et al., 2005; LEITE-PANISSI et al., 1999; 2006). Além disso, a presença de conexões entre essas estruturas também já foi demonstrada por meio de um estudo neuroanatômico realizado com encéfalo de cobaias, no qual Sorensen (1985) comprovou a presença de fibras de projeção do córtex entorrinal, CA1 e subiculum para o núcleo accumbens e do córtex entorrinal para as regiões do estriado e da amígdala. Groenewegen et al. (1999) demonstraram que o hipocampo apresenta conexões com o núcleo accumbens, particularmente com sua região mais externa (shell). Os aferentes hipocámpais para o núcleo accumbens interagem com fibras dopaminérgicas da área tegmental ventral, formando efetivamente uma interface funcional entre o sistema límbico e sistema motor (MOGENSON et al., 1993). A estimulação elétrica do hipocampo ou injeção local do agonista do receptor de glutamato no núcleo accumbens promove um aumento na atividade locomotora de animais acordados (DONZANTI E URETSKY, 1983; STRECKER; MONETA, 1994). Além disso, o núcleo accumbens e a amígdala, juntamente com a SCP, também poderiam estar envolvidos com a FHD na modulação da resposta antinociceptiva. A FHD poderia, indiretamente, por meio dessas estruturas, promover a ativação de vias descendentes inibitórias (FINCH, 1996; GROENEWEGEN et al., 1999; FRENCH; TOTTERDELL, 2003) envolvidas na modulação da dor. Estudos recentes têm demonstrado projeções hipocámpais e amigdalóides para neurônios em comum no núcleo accumbens (FRENCH; TOTTERDELL, 2003) e conexões opioidérgicas entre o núcleo accumbens, amígdala e SCP (YU; HAN, 1990; MA; HAN, 1991;

1992), sugerindo que essas estruturas poderiam fazer parte da alça mesolímbica, desempenhando, desta maneira, funções relacionadas a modulação da dor.

6) CONCLUSÕES

A microinjeção de morfina ou carbacol na formação hipocampal dorsal promoveu uma diminuição na duração da resposta comportamental de IT e antinocicepção antagonizadas pela microinjeção prévia de naloxone, indicando uma possível participação de receptores μ -opioides na modulação desses comportamentos. Além disso, a antinocicepção colinérgica foi antagonizada pela atropina, o que indica envolvimento de receptores muscarínicos.

A microinjeção do agonista GABAérgico muscimol na formação hipocampal dorsal, promoveu aumento no tempo de duração da IT e hiperalgesia, e a bicuculina produziu respostas contrárias indicando que a integridade dessa estrutura parece facilitar o término dos episódios de IT.

A administração prévia de muscimol numa dose inefetiva bloqueou os efeitos antinociceptivos e de diminuição da duração da IT promovidos pela morfina sugerindo uma interação entre os sistemas opioidérgico e GABAérgico na FHD.

É possível que na formação hipocampal dorsal exista uma interação entre esses três sistemas de neurotransmissores (colinérgico, opioiodérgico e GABAérgico) participando na modulação das respostas de IT e antinociceptiva.

O efeito de diminuição da duração da IT pelo do carbacol na ASM parece depender da aferência colinérgica para a FHD, uma vez que, o bloqueio dos receptores colinérgicos pela atropina ou o uso do anestésico lidocaína na FHD aboliu essa resposta. Entretanto, o inverso não é verdadeiro, pois, a exclusão da ASM não alterou o efeito diminuição da IT pela ativação colinérgica da FHD.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Schrattenholz A, Maelicke A. Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: distribution on the neuronal surface and modulation of receptor activity. *J Recept Signal Transduct Res* 1997; 17(1-3): 243-266.
- Aloisi AM, Albonetti ME, Lodi L, Lupo C, Carli G. Decrease of hippocampal choline acetyltransferase activity induced by formalin pain. *Brain Res* 1993; 629(1): 167-170.
- Alonso A, Kohler C. Evidence for separate projections of hippocampal pyramidal and non-pyramidal neurons to different parts of the septum in the rat brain. *Neurosci Lett* 1982; 31(3): 209-214.
- Alvarez EO, Banzan AM. Further evidence that histamine in hippocampus affects the exploratory behavior in the rat. *Physiol Behav* 1985; 34(5): 661-664.
- Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 1985; 240(1): 37-59.
- Amaral DG, Witter, MP. Hippocampal formation. In: Paxinos G (Ed.). *The rat nervous system*, 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1995; 443-493.
- Amir S. Catalepsy induced by body pinch: relation to stress-induced analgesia. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 467: 226-237.
- Apartis E, Poindessous-Jazat FR, Lamour YA, Bassant MH. Loss of rhythmically bursting neurons in rat medial septum following selective lesion of septohippocampal cholinergic system. *J Neurophysiol* 1998; 79: 1633-1642.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci* 1995; 15(5 Pt 1): 3328-3341.
- Baptista V. Participação do sistema colinérgico da formação hipocampal dorsal na modulação da imobilidade tônica em cobaias. Ribeirão Preto, 2000, 94p. Dissertação (Mestrado) – FMRP/USP.
- Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann Rev Neurosci* 1984; 7: 309-338.
- Bhalla S, Matwyshyn G, Gulati A. Central endothelin-B receptor stimulation does not affect morphine analgesia in rats. *Pharmacology* 2004; 72(1): 20-25.
- Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol* 1988; 39: 43-68.
- Blasco-Ibanez JM, Martinez-Guijarro FJ, Freund TF. Enkephalin-containing interneurons are specialized to innervate other interneurons in the hippocampal CA1 region of the rat and guinea-pig. *Eur J Neurosci* 1998; 10(5): 1784-1795.

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

Branco-de-Oliveira, MV, Silva LFS, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L. Influência da microinjeção de morfina na região dorsolateral do núcleo accumbens na duração da imobilidade tônica em cobaias. *Fesbe* 2005, resumo 05.143.

Brandão ML, Rees H, Witt S, Roberts MH. Central antiaversive and antinociceptive effects of anterior pretectal nucleus stimulation: attenuation of autonomic and aversive effects of medial hypothalamic stimulation. *Brain Res* 1991; 542(2):266-272.

Brashear HR, Zaborszky L, Heimer L. Distribution of GABAergic and cholinergic neurons in the rat diagonal band. *Neuroscience* 1986; 17(2): 439-451.

Buzsaki G, Leung LW, Vanderwolf CH. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* 1983; 287(2): 139-171.

Buzsaki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 2002; 33: 325-340.

Capogna M, Gähwiler BH, Thompson SM. Mechanism of mu-opioid receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 1993; 470: 539-558.

Carli G, Farabollini F, Fontani G. Responses to painful stimuli during animal hypnosis. *Advances in Pain Research and Therapy. Vol 1.* New York: Raven Press; 1976; 727-731.

Carli G, Farabollini F, Fontani G. Pain and animal hypnosis. Further studies on the effects of morphine and naloxone. *Pain Abs* 1978; 2:14.

Caudle RM, Mannes AJ, Iadarola MJ. GR89,696 is a kappa-2 opioid receptor agonist and a kappa-1 opioid receptor antagonist in the guinea pig hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283(3): 1342-1349.

Ceccarelli I, Casamenti F, Massafra C, Pepeu G, Scali C, Aloisi AM. Effects of novelty and pain on behavior and hippocampal extracellular ACh levels in male and female rats. *Brain Res* 1999; 815(2): 169-176.

Cohen GA, Doze VA, Madison DV. Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron* 1992; 9(2): 325-335.

Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido-Sanabria E. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse* 2005; 58(3): 151-164.

Colombo M, Fernandez T, Nakamura K, Gross CG. Functional differentiation along the anterior-posterior axis of the hippocampus in monkeys. *J Neurophysiol* 1998; 80(2): 1002-1005.

Craft RM, Henley SR, Haaseth RC, Hruby VJ, Porreca F. Opioid antinociception in a rat model of visceral pain: systemic versus local drug administration. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275(3): 1535-1542.

Crawford FT. Induction and duration of tonic immobility. *Psychol Rec* 1977; 1: 89-107.

da Silva LF, Menescal-de-Oliveira L. Cholinergic modulation of tonic immobility and nociception in the NRM of guinea pig. *Physiol Behav* 2006; 87(4): 821-827.

da Silva LF, Menescal-de-Oliveira L. Role of opioidergic and GABAergic neurotransmission of the nucleus raphe magnus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Brain Res Bull* 2007; 72(1): 25-31.

Dafny N, Dong WQ, Prieto-Gomez C, Reyes-Vazquez C, Stanford J, Qiao JT. Lateral hypothalamus: site involved in pain modulation. *Neuroscience* 1996; 70(2): 449-460.

De Oliveira L, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. The lateral hypothalamus in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Neuroreport* 1997; 8(16): 3489-3493.

Dong Y, Mao J, Shangguan D, Zhao R, Liu G. Acetylcholine release in the hippocampus during the operant conditioned reflex and the footshock stimulus in rats. *Neurosci Lett* 2004; 369(2): 121-125.

Donzanti BA, Uretsky NJ. Effects of excitatory amino acids on locomotor activity after bilateral microinjection into the rat nucleus accumbens: possible dependence on dopaminergic mechanisms. *Neuropharmacology* 1983; 22(8): 971-981.

Douglas RJ. The hippocampus and behavior. *Psychol Bull* 1967; 67(6): 416-422.

Dragoi G, Carpi D, Recce M, Csicsvari J, Buzsaki G. Interactions between hippocampus and medial septum during sharp waves and theta oscillation in the behaving rat. *J Neurosci* 1999; 19(14): 6191-6199.

Drake CT, Patterson TA, Simmons ML, Chavkin C, Milner TA. Kappa opioid receptor-like immunoreactivity in guinea pig brain: ultrastructural localization in presynaptic terminals in hippocampal formation. *J Comp Neurol* 1996; 370(3): 377-395.

Drake CT, Milner TA. Mu opioid receptors are in somatodendritic and axonal compartments of GABAergic neurons in rat hippocampal formation. *Brain Res* 1999; 849(1-2): 203-215.

Drake CT, Milner TA. Mu opioid receptors are in discrete hippocampal interneuron subpopulations. *Hippocampus* 2002; 12(2): 119-136.

Dudar JD, Whishaw IQ, Szerb JC. Release of acetylcholine from the hippocampus of freely moving rats during sensory stimulation and running. *Neuropharmacol* 1979; 18(8-9): 673-678.

Dunwiddie T, Mueller A, Palmer M, Stewart J, Hoffer B. Electrophysiological interactions of enkephalins with neuronal circuitry in the rat hippocampus. I. Effects on pyramidal cell activity. *Brain Res* 1980; 184(2): 311-330.

Dutar P, Lamour Y, Jobert A. Activation of identified septo-hippocampal neurons by noxious peripheral stimulation. *Brain Res* 1985; 328(1): 15-21.

Ettinger RH, Thompson RW. The role of dopaminergic systems in the mediation of tonic immobility (animal hypnosis) in chickens. *Bull Psychon Soc* 1978; 12: 301-302.

Fanselow MS. Conditional and uncontrol components of post-shock freezing. *J Biol Sci* 1980; 15: 177-182.

Farabollini F, Facchinetti F, Lupo C, Carli G. Time-course of opioid and pituitary-adrenal hormone modifications during the immobility reaction in rabbits. *Physiol Behav* 1990; 47(2): 337-341.

Faris PD, Sainsbury RS. The role of the pontis oralis in the generation of RSA activity in the hippocampus of the guinea pig. *Physiol Behav* 1990; 47(6): 1193-1199.

Finch DM. Neurophysiology of converging synaptic inputs from the rat prefrontal cortex, amygdala, midline thalamus, and hippocampal formation onto single neurons of the caudate/putamen and nucleus accumbens. *Hippocampus* 1996; 6(5), 495-512.

Flicker C, Geyer MA. Behavior during hippocampal microinfusions. II. Muscarinic locomotor activation. *Brain Res Rev* 1982; 4:105-127.

Foote RW, Maurer R. Distribution of opioid binding sites in the guinea pig hippocampus as compared to the rat: a quantitative analysis. *Neuroscience* 1986; 19(3): 847-856.

French SJ, Totterdell S. Individual nucleus accumbens-projection neurons receive both basolateral amygdala and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience* 2003; 119(1): 19-31.

Freund TF, Antal M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 1988; 336(6195): 170-3.

Gallup GG Jr. Animal hypnosis: factual status of a fictional concept. *Psychol Bull* 1974; 81(11): 836-853.

Gannon RL, Terrian DM. Kappa opioid agonists inhibit transmitter release from guinea pig hippocampal mossy fiber synaptosomes. *Neurochem Res* 1992; 17(8):741-747.

Garritano J, Martinez C, Grossman K, Intemann P, Merritt K, Pfoff R, Smock T. The output of the hippocampus is inhibited during social behavior in the male rat. *Exp Brain Res* 1996; 111(1): 35-40.

Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A. Caffeine induces central cholinergic analgesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 356(5): 590-595.

Gorman LK, Pang K, Frick KM, Givens B, Olton DS. Acetylcholine release in the hippocampus: effects of cholinergic and GABAergic compounds in the medial septal area. *Neurosci Lett* 1994; 166(2): 199-202.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 877:49-63.

Gulyás AI, Gorcs TJ, Freund TF. Innervation of different peptide-containing neurons in the hippocampus by GABAergic septal afferents. *Neuroscience* 1990; 37(1): 31-44.

Gulyás AI, Toth K, Danos P, Freund TF. Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 1991; 312(3): 371-378.

Harper RM. Frequency changes in hippocampal electrical activity during movement and tonic immobility. *Physiol Behav* 1971; 7(1): 55-58.

Harris JA. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. *J Physiol Paris* 1996; 90(1): 15-25.

Hatton DC, Woodruff ML, Meyer ME. Cholinergic modulation of tonic immobility in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Comp Physiol Psychol* 1975; 89(9): 1053-1060.

Herzog HA, jr; Burghardt GM. Prey movement and predatory behavior of juvenile western yellow-bellied racers, *Coluber constrictor mormon*. *Herpetologica* 1974; 30: 258-289.

Hicks LE, Maser JD, Gallup GG Jr, Edson PH. Possible serotonergic mediation of tonic immobility: effects of morphine and serotonin blockade. *Psychopharmacologia* 1975; 42(1): 51-56.

Hisamitsu T, Fujishita M, Asamoto S, Nakamura A, Takeshige C. Serotonergic neurons in the brainstem modulate animal hypnosis. *Brain Res Bull* 1992; 29(2):141-145.

Hosoi M, Oka T, Hori T. Prostaglandin E receptor EP3 subtype is involved in thermal hyperalgesia through its actions in the preoptic hypothalamus and the diagonal band of Broca in rats. *Pain* 1997; 71(3): 303-311.

Hunskar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods* 1985; 14(1): 69-76.

Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behav Neural Biol* 1993; 60(1): 9-26.

Joseph R. Traumatic amnesia, repression, and hippocampus injury due to emotional stress, corticosteroids and enkephalins. *Child Psychiatry Hum Dev* 1998; 29(2): 169-185.

Jourdan D, Ardid D, Bardin L, Bardin M, Neuzeret D, Lanphouthacoul L, Eschalier A. A new automated method of pain scoring in the formalin test in rats. *Pain* 1997; 71(3): 265-270.

Kalyuzhny AE, Wessendorf MW. CNS GABA neurons express the mu-opioid receptor: immunocytochemical studies. *Neuroreport* 1997; 8(15): 3367-3372.

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(4): 528-547.

Katayama Y, Watkins LR, Becker DP, Hayes RL. Non-opiate analgesia induced by carbachol microinjection into the pontine parabrachial region of the cat. *Brain Res* 1984; 296(2): 263-283.

Kavaliers M, Choleris E. Antipredator responses and defensive behavior: ecological and ethological approaches for the neurosciences. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25(7-8): 577-586.

Khanna S, Sinclair JG. Noxious stimuli produce prolonged changes in the CA1 region of the rat hippocampus. *Pain* 1989; 39(3): 337-343.

Khanna S, Sinclair JG. Responses in the CA1 region of the rat hippocampus to a noxious stimulus. *Exp Neurol* 1992; 117(1): 28-35.

Kina IY, Brentegani MR, Hoffmann A, Menescal-de-Oliveira L. Influência da estimulação colinérgica da área septal sobre a duração da imobilidade tônica. *FeSBE* 1994, resumo 1.50.

Klamt JG, Prado WA. Antinociception and behavioral changes induced by carbachol microinjected into identified sites of the rat brain. *Brain Res* 1991; 549(1): 9-18.

Klemm WR. Correlation of hippocampal theta rhythm, muscle activity and brain stem reticular formation activity. *Commun Behav Biol* 1970; 5:147-151.

Klemm WR. Neurophysiologic studies of the immobility reflex ("animal hypnosis"). In: Ehrenpreis S, Solnitzky OC (Eds.). *Neurosciences research*. Vol.4. New York: Academic Press; 1971; 165-212.

Kryukov VI. A model of attention and memory based on the principle of the dominant and the comparator function of the hippocampus. *Neurosci Behav Physiol* 2005; 35(3): 235-252.

Lathe R. Hormones and the hippocampus. *J Neuroendocrinol* 2001; 169: 205-231.

Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsaki G. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* 1994; 62: 1033-1047.

Leite-Panissi CRA, Monassi CR, Menescal-De-Oliveira L. Role of the amygdaloid nuclei in the modulation of tonic immobility in guinea pigs. *Physiol Behav* 1999; 67(5): 717-724.

Leite-Panissi CRA, 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 CRA, Menescal-de-Oliveira L. Central nucleus of the amygdala and the control of tonic immobility in guinea pigs. *Brain Res Bull* 2002; 58(1): 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(1-2): 167-178.

Leite-Panissi CR, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L. Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(10): 1571-1579.

Leite-Panissi CR, Ferrarese AA, Terzian AL, Menescal-de-Oliveira L. Serotonergic activation of the basolateral amygdala and modulation of tonic immobility in guinea pig. *Brain Res Bull* 2006; 69(4): 356-364.

Leranth C, Frotscher M. Organization of the septal region in the rat brain: cholinergic-GABAergic interconnections and the termination of hippocampo-septal fibers. *J Comp Neurol* 1989; 289(2): 304-314.

Levey AI, Edmunds SM, Koliatsos V, Wiley RG, Heilman CJ. Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. *J Neurosci* 1995; 15 (5 Pt 2):4077-4092.

Leuner B, Mirescu C, Noiman L, Gould E. Maternal experience inhibits the production of immature neurons in the hippocampus during the postpartum period through elevations in adrenal steroids. *Hippocampus* 2007; 17(6): 434-442.

Lico MC, Hoffmann A, Covian MR. Influence of some limbic structures upon somatic and autonomic manifestations of pain. *Physiol Behav* 1974; 12: 805-811.

Lupica CR, Proctor WR, Dunwiddie TV. Dissociation of mu and delta opioid receptor-mediated reductions in evoked and spontaneous synaptic inhibition in the rat hippocampus in vitro. *Brain Res* 1992; 593(2): 226-238.

Ma QP, Han JS. Neurochemical studies on the mesolimbic circuitry of antinociception. *Brain Res* 1991; 566(1-2): 95-102.

Ma QP, Han JS. Naloxone blocks opioid peptide release in periaqueductal gray and amygdala elicited by morphine injected into N. accumbens. *Peptides* 1992; 13(2): 261-265.

Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* 1995; 18(1): 22-29.

McDaniel KL, Mundy WR, Tilson HA. Microinjection of dynorphin into the hippocampus impairs spatial learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 35(2): 429-435.

McEchron MD, Tseng W, Disterhoft JF. Single neurons in CA1 hippocampus encode trace interval duration during trace heart rate (fear) conditioning in rabbit. *J Neurosci* 2003; 23(4): 1535-1547.

McGinty JF, Henriksen SJ, Goldstein A, Terenius L, Bloom FE. Dynorphin is contained within hippocampal mossy fibers: immunochemical alterations after kainic acid administration and colchicine-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(2): 589-593.

McGraw CP, Klemm WR. Mechanisms of the immobility reflex ("animal hypnosis"): III. Neocortical inhibition in rats. *Commun Behav Biol* 1969; 3: 53-59.

- McGraw CP, Klemm WR. Genetic differences in susceptibility of rats to the immobility reflex ("animal hypnosis"). *Behav Genet* 1973; 3(2): 155-162.
- McKenna JE, Melzack R. Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyrus. *Pain* 1992; 49(1): 105-112.
- McLean S, Rothman RB, Jacobson AE, Rice KC, Herkenham M. Distribution of opiate receptor subtypes and enkephalin and dynorphin immunoreactivity in the hippocampus of squirrel, guinea pig, rat, and hamster. *J Comp Neurol* 1987; 255(4): 497-510.
- McQuiston AR, Madison DV. Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 1999; 19(8): 2887-2896.
- Meilandt WJ, Barea-Rodriguez E, Harvey SA, Martinez JL Jr. Role of hippocampal CA3 mu-opioid receptors in spatial learning and memory. *J Neurosci* 2004; 24(12): 2953-2962.
- Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A. The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. *Behav Brain Res* 1993; 56(2): 127-132.
- Menescal-de-Oliveira L, Brentegani MR, Leite-Panissi CRA, Monassi CR. 1999. Cholinergic-opioidergic interaction in the ventrolateral periaqueductal gray matter inducing antinociception in guinea pigs. 9th World Congress on Pain 1999, resumo 58.
- Misgeld U, Frotscher M. Postsynaptic-GABAergic inhibition of non-pyramidal neurons in the guinea-pig hippocampus. *Neuroscience* 1986; 19(1): 193-206.
- Miyashita T, Williams CL. Peripheral arousal-related hormones modulate norepinephrine release in the hippocampus via influences on brainstem nuclei. *Behav Brain Res* 2004; 153(1):87-95.
- 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(1): 53-59.
- Monassi CR, Leite-Panissi CRA, Menescal-de-Oliveira L. Ventrolateral periaqueductal gray matter and the control of tonic immobility. *Brain Res Bull* 1999; 50(3): 201-208.
- Monassi CR. Papel da circuitaria neuronal intrínseca da substância cinzenta periaquedutal na modulação da imobilidade tônica em cobaias. Ribeirão Preto, 2000. 207 p. Tese (Doutorado) – FMRP/USP.
- 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(1-2): 169-180.
- Monmaur P, Breton P. Elicitation of hippocampal theta by intraseptal carbachol injection in freely moving rats. *Brain Res* 1991; 544(1): 150-155.

- Monmaur P, Sharif A, M'Harzi M. Involvement of septal muscarinic receptors in cholinergically mediated changes in rat rearing activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 58(2): 577-582.
- Mucha RF. Effects of naloxone and morphine on guinea pig tonic immobility. *Behav Neur Biol* 1980; 28: 111-115.
- Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, Kubo C, Senba E. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res* 2005; 53(2): 129-139.
- Neumaier JF, Mailheau S, Chavkin C. Opioid receptor-mediated responses in the dentate gyrus and CA1 region of the rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244(2): 564-570.
- Ojika K, Mitake S, Tohdoh N, Appel SH, Otsuka Y, Katada E, Matsukawa N. Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP). *Prog Neurobiol* 2000; 60(1): 37-83.
- Oliveira MA, Prado WA. Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats. *Brain Res Bull* 2001; 54(1): 55-63.
- Pang CS, Tsang SF, Yang JC. Effects of melatonin, morphine and diazepam on formalin-induced nociception in mice. *Life Sci* 2001; 68(8): 943-951.
- Pavlidis C, Nivon LG, McEwen BS. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 2002; 12(2): 245-257.
- Pentkowski NS, Blanchard DC, Lever C, Litvin Y, Blanchard RJ. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *Eur J Neurosci* 2006; 23(8): 2185-2196.
- Piguet P, North RA. Opioid actions at mu and delta receptors in the rat dentate gyrus in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 266(2): 1139-1149.
- Ploghaus A, Narain C, Beckmann CF, Clare S, Bantick S, Wise R, Matthews PM, Rawlins JN, Tracey I. Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci* 2001; 21:9896-9903.
- Prado WA, Roberts HT. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. *Brain Res* 1985; 340: 219-228.
- Prestrude AM, Johnstone SM. Effect of skin surface temperature on localization error and two-point threshold. *TIT J Life Sci* 1977; 7(3-4): 59-64.
- Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 2001; 429(1-3): 79-91.
- Racz B, Fuzesi M, Halasy K. The hippocampal opioidergic system: a comparative immunocytochemical study in four rodents. *Neurobiology (Bp)* 1998; 6(4): 429-441.

Ratner SC, Thompson RW. Immobility reaction (fear) of domestic fowl as a function of age and prior experience. *Anim Behav* 1960; 8: 186-191.

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

Ribak CE, Vaughn JE, Saito K. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res* 1978;140(2): 315-332.

Robinson JH, Deadwyler SA. Intracellular correlates of morphine excitation in the hippocampal slice preparation. *Brain Res* 1981; 224(2): 375-387.

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

Rössner W. *Stereotaktischer Hirnatlas vom Meerschweinchen*. Pallas Verlag, Munich, 1965.

Salin PA, Weisskopf MG, Nicoll RA. A comparison of the role of dynorphin in the hippocampal mossy fiber pathway in guinea pig and rat. *J Neurosci* 1995; 15(10): 6939-6945.

Sandin J, Ogren SO, Terenius L. Nociceptin/orphanin FQ modulates spatial learning via ORL-1 receptors in the dorsal hippocampus of the rat. *Brain Res* 2004; 997(2): 222-233.

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

Schvarcz JR. Long-term results of stimulation of the septal area for relief of neurogenic pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1993; 58: 154-155.

Schwerdtfeger WK, Buhl E. Various types of non-pyramidal hippocampal neurons project to the septum and contralateral hippocampus. *Brain Res* 1986; 386(1-2): 146-154.

Shen S, Ingenito AJ. Depressor effect of kappa opioid agonist on hypertension induced by isolation in the rat. *Clin Exp Hypertens* 1999; 21(3): 275-297.

Silhol M, Arancibia S, Maurice T, Tapia-Arancibia L. Spatial memory training modifies the expression of brain-derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience* 2007; 146(3): 962-973.

Sinclair JG, Lo GF. Morphine, but not atropine, blocks nociceptor-driven activity in rat dorsal hippocampal neurones. *Neurosci Lett* 1986; 68(1): 47-50.

Sloviter RS, Dichter MA, Rachinsky TL, Dean E, Goodman JH, Sollas AL, Martin DL. Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol* 1996; 373(4): 593-618.

Smith RL, Meyer ME. Morphine and naloxone effects on tonic immobility and the dorsal immobility response in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1985; 22(4): 505-507.

Sorensen KE. The connections of the hippocampal region. New observations on efferent connections in the guinea pig, and their functional implications. *Acta Neurol Scand* 1985; 72(6): 550-560.

Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S. Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol* 2003; 551(Pt 3): 927-943.

Storm-Mathisen J, Fonnum F. Localization of transmitter candidates in the hippocampal region. *Prog Brain Res* 1972; 36: 41-58.

Strecker RE, Moneta ME. Electrical stimulation of the kindled hippocampus briefly increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 1994; 176(2): 173-177.

Svorad D. Animal hypnosis (Totstellreflex) as experimental model for psychiatry; electroencephalographic and evolutionary aspect. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 1957; 77(5): 533-539.

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.

Thompson RW. A central cholinergics inhibition system as a basis for tonic immobility in chickens. *Psychol Rec* 1977; 1: 109-121.

Thompson RW, Joseph S. The effect of norepinephrine on tonic immobility in chickens. *Bull Psychon Soc* 1978; 12(2): 123-124.

Tóth K, Freund TF. Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 1992; 49(4): 793-805.

Trivedi MA, Coover GD. Neurotoxic lesions of the dorsal and ventral hippocampus impair acquisition and expression of trace-conditioned fear-potentiated startle in rats. *Behav Brain Res* 2006; 168(2): 289-298.

Vanderwolf CH. Cerebral activity and behavior: control by central cholinergic and serotonergic systems. *Int Rev Neurobiol* 1988; 30:225-340.

Wainer BH, Levey AI, Rye DB, Mesulam MM, Mufson EJ. Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci Lett* 1985; 54(1): 45-52.

Wang JQ, Ingenito AJ. Cardiovascular effects of microinjection of dynorphin-A(1-8) into the hippocampus in conscious, spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Clin Exp Hypertens* 1994; 16(2): 229-243.

Wei F, Xu ZC, Qu Z, Milbrandt J, Zhuo M. Role of EGR1 in hippocampal synaptic enhancement induced by tetanic stimulation and amputation. *J Cell Biol* 2000; 149: 1325-1334.

Whishaw IQ, Flannigan KP, Schallert T. An assessment of the state hypothesis of animal 'hypnosis' through an analysis of neocortical and hippocampal EEG in spontaneously immobile and hypnotized rabbits. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1982; 54(4): 365-374.

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 2006; 313(5790): 1093-1097.

Wiesner JB, Henriksen SJ, Bloom FE. Opioid enhancement of perforant path transmission: effect of an enkephalin analog on inhibition and facilitation in the dentate gyrus. *Brain Res* 1986; 399(2): 404-408.

Wittenberg GM, Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trends Neurosci* 2002; 25(10): 501-505.

Woodruff ML, Hatton DC, Meyer ME. Hippocampal ablation prolongs immobility response in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Comp Physiol Psychol* 1975; 88(1): 329-334.

Woodruff ML, Hatton DC, Frankl MB, Meyer ME. Effects of scopolamine and physostigmine on tonic immobility in ducks and guinea pigs. *Physiolol Psychol* 1976; 4(2): 198-200.

Yu LC, Han JS. Habenula as a relay in the descending pathway from nucleus accumbens to periaqueductal grey subserving antinociception. *Int J Neurosci* 1990; 54(3-4): 245-251.

Zhao H, Xu H, Xu X. Effects of naloxone on the long-term potentiation of EPSPs from the pathway of Schaffer collateral to CA1 region of hippocampus in aged rats with declined memory. *Brain Res* 2004; 996(1): 111-116.

Zieglgänsberger W, French ED, Siggins GR, Bloom FE. Opioid peptides may excite hippocampal pyramidal neurons by inhibiting adjacent inhibitory interneurons. *Science* 1979; 205(4404): 415-417.

Apêndice

Tabela 1: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de solução salina (NaCl 0,9%) na FHD.

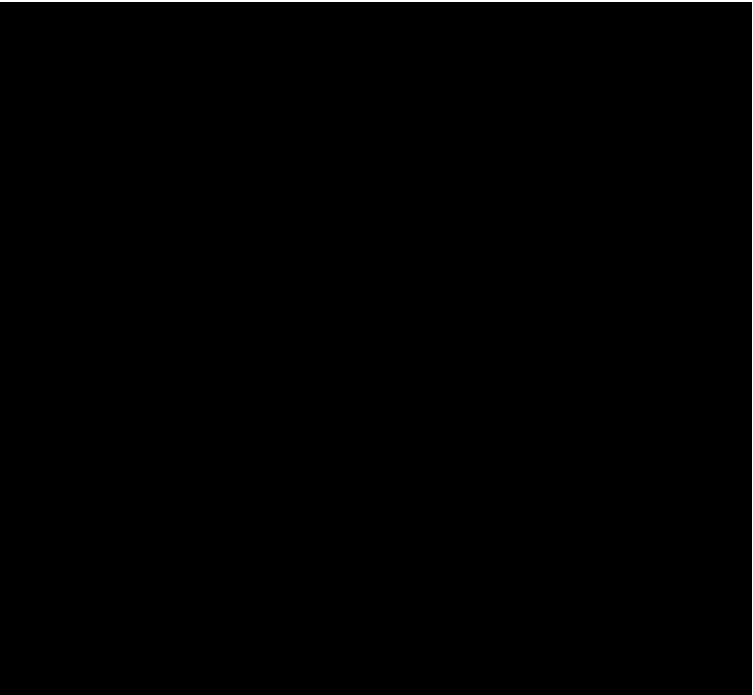


Tabela 2: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de morfina (1,1 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	MOR (1,1 nmol)
1	66	96	49
2	128	90	45
3	110	154	59
4	364	422	266
5	85	31	37
6	121	73	51
7	47	89	88
8	42	21	13
Média	120	122	76
EPM	36,6	45,3	28,1

Tabela 3: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de morfina (2,2 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	MOR (2,2 nmol)
1	82	63	13
2	84	117	32
3	145	92	45
4	219	183	97
5	66	48	17
6	78	43	10
7	215	341	51
8	173	95	71
9	142	141	25
Média	134	125	40
EPM	19,9	30,9	9,7

Tabela 4: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de naloxone (1,3 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	NAL (1,3 nmol)
1	48	59	154
2	46	45	33
3	144	155	93
4	87	137	67
5	65	66	267
6	56	95	151
Média	74	93	128
EPM	15,2	18,2	33,9

Tabela 5: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção de 2,2 nmol de morfina e após a microinjeção bilateral de naloxone (1,3 nmol) seguido de morfina (2,2 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)				
Animal	Controle	Sham	MOR (2,2 nmol)	NAL (1,3 nmol) + MOR (2,2 nmol)
1	98	65	46	117
2	106	92	50	84
3	269	211	108	189
4	118	102	77	84
5	255	285	122	314
6	419	392	181	388
7	130	84	55	90
8	107	100	35	141
9	102	84	57	133
Média	178	157	81	171
EPM	37,4	38,1	15,8	36,3

Tabela 6: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de bicuculina na dose de 0,2 nmol e na dose de 1,1 nmol na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)				
Animal	Controle	Sham	BIC (0,2 nmol)	BIC (1,0 nmol)
1	516	320	76	66
2	165	136	58	25
3	686	353	59	11
4	63	75	28	24
5	186	69	171	29
6	129	87	8	3
7	308	199	144	107
8	51	47	24	3
9	103	295	165	154
10	615	878	379	366
11	378	296	31	26
12	570	834	155	200
13	209	155	23	47
Média	306	288	102	82
EPM	62,0	75,6	28,4	29,1

Tabela 7: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de muscimol (0,5 nmol) na FHD.

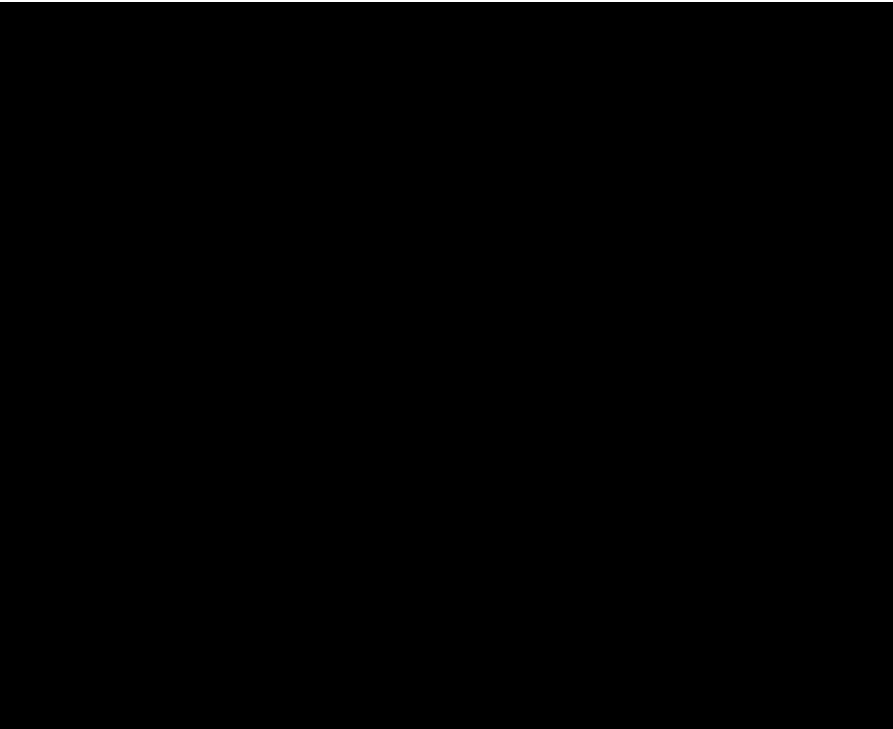


Tabela 8: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de muscimol (1,0 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	MUS (1,0 nmol)
1	75	103	149
2	214	185	325
3	192	139	412
4	325	209	508
5	67	112	176
6	255	300	440
7	113	67	200
Média	177	159	316
EPM	36,6	29,8	54,1

Tabela 9: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção de carbacol (2,7 nmol) e após a microinjeção bilateral de naloxone (1,3 nmol) seguido de carbacol (2,7 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)				
Animal	Controle	Sham	CCh (2,7 nmol)	NAL (1,3 nmol) + CCh (2,7nmol)
1	63	80	22	104
2	286	309	98	259
3	88	78	27	99
4	82	112	44	100
5	615	713	359	813
6	412	381	136	321
7	396	453	220	378
8	260	202	80	185
9	294	271	90	237
10	380	448	214	491
Média	288	305	129	299
EPM	55,4	63,8	33,7	70,2

Tabela 10: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção de morfina (2,2 nmol) e após a microinjeção bilateral de muscimol (0,5 nmol) seguido de morfina (2,2 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)				
Animal	Controle	Sham	MOR (2,2 nmol)	MUS (0,5 nmol) + MOR (2,2 nmol)
1	56	68	33	48
2	214	185	45	161
3	192	139	56	155
4	53	48	13	65
5	213	247	123	243
6	86	66	33	53
7	113	86	29	130
8	107	85	40	73
9	152	181	86	138
Média	132	123	51	119
EPM	21,2	22,8	11,3	21,5

Tabela 11: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de solução salina (0,9%) na FHD.

Índice de Vocalização							
Salina (0,9%)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,46	-0,59	0,08	0,06	0,03	-0,14
2	0,00	-0,10	0,02	-0,27	0,12	0,01	0,01
3	0,00	-0,57	0,36	0,34	0,34	0,34	0,19
4	0,00	-0,04	0,10	-0,04	-0,06	-0,02	-0,67
5	0,00	-0,18	0,21	0,04	0,14	0,25	0,25
6	0,00	0,11	0,09	0,11	0,11	-0,06	0,09
Média	0,00	-0,05	0,03	0,04	0,12	0,09	-0,05
EPM	0,00	0,14	0,13	0,08	0,05	0,07	0,14

Tabela 12: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de morfina (1,1 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Morfina (1,1 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,06	0,03
2	0,00	-0,07	-0,04	-0,08	-0,03	-0,03	-0,03
3	0,00	0,00	0,03	-0,53	-0,18	-0,12	-0,08
4	0,00	-0,11	-0,06	-0,06	-0,39	0,03	0,02
5	0,00	0,04	0,07	0,05	0,10	0,02	0,08
6	0,00	-0,19	-0,13	0,00	-0,04	-0,04	-0,07
Média	0,00	-0,05	-0,02	-0,10	-0,09	-0,01	-0,01
EPM	0,00	0,04	0,03	0,09	0,07	0,03	0,03

Tabela 13: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de morfina (2,2 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Morfina (2,2 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,12	-0,29	-0,38	-0,65	-0,82	-1,00
2	0,00	0,09	-0,67	-0,44	-1,00	-0,94	-0,85
3	0,00	0,08	0,27	-0,56	-0,96	-1,00	-1,00
4	0,00	0,12	-0,22	-0,83	-1,00	-1,00	-1,00
5	0,00	-0,39	-0,86	-0,82	-1,00	-1,00	-1,00
6	0,00	-0,30	-0,50	-0,94	-1,00	-1,00	-1,00
7	0,00	-0,11	-0,78	-0,52	-1,00	-1,00	-1,00
Média	0,00	-0,05	-0,44	-0,64	-0,94	-0,97	-0,98
EPM	0,00	0,08	0,15	0,08	0,05	0,03	0,02

Tabela 14: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de naloxone (1,3 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Naloxone (1,3 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	-0,24	0,04	0,06	0,00	-0,09	0,06
2	0,00	0,01	-0,24	-0,13	-0,04	-0,10	0,02
3	0,00	-0,07	-0,03	0,00	0,06	-0,07	-0,32
4	0,00	-0,03	-0,04	-0,02	0,02	-0,05	-0,05
5	0,00	0,23	-0,38	0,22	-0,22	-0,18	-0,32
6	0,00	-0,01	-0,02	0,03	0,06	0,01	-0,01
7	0,00	0,04	0,03	0,06	0,09	0,06	0,02
Média	0,00	-0,01	-0,09	0,03	-0,01	-0,06	-0,09
EPM	0,00	0,05	0,06	0,04	0,04	0,03	0,06

Tabela 15: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de naloxone (1,3 nmol) seguido por morfina (2,2 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Naloxone (1,3 nmol) + Morfina (2,2 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,22	0,02	0,12	0,25	0,15	-0,08
2	0,00	0,02	-0,09	0,14	0,17	0,07	0,10
3	0,00	0,06	-0,20	0,00	0,14	0,13	0,04
4	0,00	0,01	-0,02	-0,05	0,06	0,05	0,04
5	0,00	0,41	1,28	1,02	1,13	1,47	1,85
6	0,00	-0,32	-0,25	-0,30	-0,59	-0,30	0,20
7	0,00	0,10	0,07	0,06	0,09	0,01	0,07
Média	0,00	0,07	0,11	0,14	0,18	0,23	0,32
EPM	0,00	0,08	0,20	0,16	0,19	0,22	0,26

Tabela 16: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de bicuculina (0,2 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Bicuculina (0,2 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,06	0,03
2	0,00	-0,07	-0,04	-0,08	-0,03	-0,03	-0,03
3	0,00	-0,01	0,00	-0,08	0,00	-0,01	-0,03
4	0,00	0,02	0,06	0,06	0,02	-0,11	0,05
5	0,00	-0,01	-0,09	0,03	0,05	0,03	0,04
6	0,00	-0,12	-0,10	-0,17	-0,38	-0,65	-0,18
7	0,00	0,06	-0,01	-0,06	-0,19	-0,41	-0,31
Média	0,00	-0,02	-0,03	-0,04	-0,07	-0,16	-0,06
EPM	0,00	0,02	0,02	0,03	0,06	0,10	0,05

Tabela 17: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de bicuculina (1,0 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Bicuculina (1,0 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,01	-1,00	-0,98	-0,99	-1,00	-1,00
2	0,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
3	0,00	-0,04	-0,13	-0,26	-0,68	-0,97	-0,99
4	0,00	-0,97	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
5	0,00	0,34	-0,76	-0,79	-1,00	-1,00	-1,00
6	0,00	-0,68	-0,59	-0,34	-1,00	-1,00	-1,00
7	0,00	-0,59	-0,46	-0,95	-1,00	-1,00	-1,00
8	0,00	0,06	-0,55	-0,45	-0,58	-0,89	-0,86
Média	0,00	-0,36	-0,68	-0,72	-0,91	-0,98	-0,98
EPM	0,00	0,18	0,11	0,11	0,06	0,01	0,02

Tabela 18: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de muscimol (0,5 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Muscimol (0,5 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,10	0,03	0,09	-0,23	-0,28	-0,27
2	0,00	0,11	-0,02	-0,36	-0,80	-0,33	-0,08
3	0,00	-0,12	-0,27	-0,79	0,00	-0,60	-0,07
4	0,00	-0,45	-1,00	0,16	-0,32	-0,73	0,18
5	0,00	-0,40	0,19	-0,34	-0,47	-0,35	-0,01
6	0,00	0,48	0,48	-0,10	-0,19	0,33	0,10
7	0,00	0,37	-0,19	0,63	0,65	0,60	0,42
8	0,00	0,10	-0,54	0,11	0,20	0,02	0,18
9	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	-0,07	0,01
Média	0,00	0,02	-0,15	-0,06	-0,13	-0,16	0,05
EPM	0,00	0,10	0,14	0,13	0,14	0,14	0,07

Tabela 19: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de muscimol (1,0 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Muscimol 1,0 nmol							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,85	1,17	1,23	1,12	1,13	1,17
2	0,00	0,83	0,77	0,38	0,60	0,70	0,74
3	0,00	0,60	1,02	1,12	1,17	1,18	1,18
4	0,00	1,38	1,04	1,25	1,43	1,25	1,47
5	0,00	1,73	1,19	1,75	1,80	1,42	1,55
6	0,00	0,75	1,07	0,88	0,79	0,84	1,23
7	0,00	-0,09	-0,01	0,09	0,02	0,02	-0,27
Média	0,00	0,86	0,89	0,96	0,99	0,93	1,01
EPM	0,00	0,22	0,16	0,21	0,22	0,18	0,24

Tabela 20: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de carbacol (2,7 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Carbacol (2,7 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,05	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
2	0,00	-0,74	-1,00	-0,88	-1,00	-1,00	-1,00
3	0,00	0,04	0,05	-0,41	-0,41	-0,95	-0,96
4	0,00	-0,92	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
5	0,00	-0,39	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00
6	0,00	-0,79	-0,84	-0,76	-0,89	-1,00	-0,92
7	0,00	-0,03	-0,19	-0,11	-0,84	-1,00	-1,00
8	0,00	-0,99	-0,74	-0,76	-1,00	-0,99	-0,90
Média	0,00	-0,47	-0,71	-0,74	-0,89	-0,99	-0,97
EPM	0,00	0,16	0,15	0,11	0,07	0,01	0,01

Tabela 21: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de atropina (0,7 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Atropina (0,7 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,01	0,14	0,14	0,04	0,14	0,16
2	0,00	-0,01	0,03	0,01	-0,04	0,00	-0,22
3	0,00	-0,07	-0,04	-0,02	0,00	0,00	0,04
4	0,00	-0,17	0,04	0,01	0,11	-0,03	-0,03
5	0,00	-0,33	-0,03	-0,20	0,12	0,07	-0,20
6	0,00	-0,02	0,15	0,23	0,06	0,25	0,26
7	0,00	-0,06	0,02	0,04	0,02	0,06	-0,15
Média	0,00	-0,09	0,04	0,03	0,04	0,07	-0,02
EPM	0,00	0,05	0,03	0,05	0,02	0,04	0,07

Tabela 22: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de atropina (0,7 nmol) seguido por carbacol (2,7 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Atropina (0,7 nmol) + Carbacol (2,7 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,00	0,20	0,01	-0,06	-0,09	0,11	0,12
2	0,00	0,00	-0,14	-0,39	-0,17	0,00	-0,15
3	0,00	-0,36	-0,77	-0,04	0,09	0,24	0,21
4	0,00	0,01	0,09	0,05	-0,17	0,07	-0,14
5	0,00	-0,25	-0,21	0,36	-0,38	0,37	0,12
6	0,00	-0,77	0,28	0,31	0,22	0,29	0,26
7	0,00	-0,14	-0,07	0,10	-0,22	0,14	0,12
Média	0,00	-0,19	-0,12	0,05	-0,10	0,17	0,07
EPM	0,00	0,12	0,12	0,10	0,08	0,05	0,06

Tabela 23: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de naloxone (1,3 nmol) seguido por carbacol (2,7 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Naloxone (1,3 nmol) + Carbacol (2,7 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,0	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4
2	0,0	0,0	-0,3	-0,4	-0,4	0,1	0,0
3	0,0	-0,3	0,0	-0,2	0,0	-0,5	0,0
4	0,0	0,0	-0,2	-0,1	0,0	0,0	-0,1
5	0,0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	0,0
6	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	-0,1	0,1
7	0,0	0,2	0,2	0,2	0,2	-0,2	0,2
Média	0,00	0,09	0,04	0,02	0,06	-0,07	0,09
EPM	0,00	0,08	0,08	0,10	0,10	0,09	0,06

Tabela 24: Valores individuais do índice de vocalização em resposta à aplicação do estímulo periférico nocivo em cobaias antes (controle) e após (2, 5, 15, 30, 45, 60 min) a microinjeção bilateral de muscimol (0,5 nmol) seguido por morfina (1,1 nmol) na FHD.

Índice de Vocalização							
Muscimol (0,5 nmol) + Morfina (2,2 nmol)							
Animal	Controle	2 min	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
1	0,0	0,25	0,24	0,20	0,15	0,16	0,20
2	0,0	0,07	0,07	0,06	-0,07	0,01	-0,08
3	0,0	-0,21	0,04	-0,01	-0,17	-0,07	-0,13
4	0,0	0,12	0,10	0,10	0,12	0,12	0,12
5	0,0	0,01	0,00	0,01	-0,01	0,01	-0,04
6	0,0	0,00	-0,33	-0,22	-0,12	-0,12	-0,20
7	0,0	-0,06	-0,06	-0,09	-0,08	0,00	-0,02
8	0,0	0,37	0,52	0,48	0,48	0,48	0,48
9	0,0	0,16	0,16	-0,22	0,15	0,16	-0,14
Média	0,00	0,08	0,08	0,03	0,05	0,08	0,02
EPM	0,00	0,06	0,08	0,07	0,07	0,06	0,07

Tabela 25: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de solução salina (NaCl 0,9%) na FHD seguido por solução salina (0,9%) na ASM.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	SAL (FHD) + SAL (ASM)
1	107	190	209
2	189	290	159
3	143	79	177
4	256	305	234
5	156	312	245
Média	170	235	205
EPM	25,2	44,8	16,4

Tabela 26: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de solução salina (NaCl 0,9%) na FHD seguido por carbacol (5,4 nmol) na ASM.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	SAL (FHD) + CCh (ASM)
1	277	167	23
2	321	245	56
3	282	211	72
4	356	299	111
5	378	427	118
6	234	266	67
Média	308	269	75
EPM	22,0	36,6	14,5

Tabela 27: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de solução salina (NaCl 0,9%) na FHD seguido por muscimol (1,0 nmol) na ASM.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	SAL (FHD) + MUS (ASM)
1	252	302	317
2	90	68	124
3	113	83	116
4	368	290	323
5	153	84	74
6	176	89	67
Média	192	153	170
EPM	42,0	45,4	48,3

Tabela 28: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham) e após a microinjeção bilateral de lidocaína (2%) na FHD seguido por carbacol (5,4 nmol) na ASM.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	LID (FHD) + CCh (ASM)
1	89	122	59
2	177	124	154
3	298	138	175
4	223	340	404
5	176	131	237
6	671	444	419
7	60	93	115
Média	242	199	223
EPM	77,6	51,4	52,8

Tabela 29: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de atropina (0,7 nmol) na FHD seguido por carbacol (5,4 nmol) na ASM.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	ATR (FHD) + CCh (ASM)
1	335	270	178
2	208	239	190
3	124	98	109
4	184	247	158
5	248	211	190
6	74	56	82
Média	195	187	151
EPM	37,6	36,0	18,5

Tabela 30: Durações médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de lidocaína (2%) na ASM seguido por carbacol (2,7 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	LID (ASM)+ CCh (FHD)
1	113	76	16
2	109	105	2
3	64	77	16
4	174	244	9
5	193	111	57
6	316	162	39
7	307	329	51
8	116	105	54
9	207	100	66
10	46	47	27
11	185	183	24
12	202	150	13
13	39	49	9
Média	159	134	29
EPM	24,8	22,4	6,0

Tabela 31: Médias individuais dos cinco episódios de imobilidade tônica em cobaias antes do procedimento cirúrgico (controle), após o procedimento cirúrgico (sham), após a microinjeção bilateral de muscimol (1,0 nmol) na ASM seguido por carbacol (2,7 nmol) na FHD.

Duração da Imobilidade Tônica (s)			
Animal	Controle	Sham	MUS (ASM) + CCh (FHD)
1	271	240	162
2	477	352	107
3	169	130	88
4	248	292	129
5	291	225	39
6	348	239	48
7	325	288	56
Média	304	252	90
EPM	36,2	26,2	17,3

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](#)