

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

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO
ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA EPIBATIDINA EM
MODELO DE DOR NEUROPÁTICA EM RATOS**

Karina Abdo Costa

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

KARINA ABDO COSTA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EFEITO
ANTINOCICEPTIVO INDUZIDO PELA EPIBATIDINA
EM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA EM RATOS**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado

Ribeirão Preto

2010

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo. (Ribeirão Preto – SP)

Costa, Karina Abdo

Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo induzido pela epibatidina em modelo de dor neuropática em ratos / Karina Abdo Costa; Orientador: Wiliam Alves do Prado – Ribeirão Preto, 2010.

123 f.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. epibatidina, dor neuropática, 2. neurotransmissão colinérgica, 3. alodínia, 4. substância cinzenta periaquedutal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karina Abdo Costa

Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo induzido pela epibatidina em modelo de dor neuropática em ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências - Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Wiliam Alves do Prado
Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Gabriela Rocha Lauretti
Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Jyrson Guilherme Klamt
Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Carlos Amílcar Parada
Instituição: IB – UNICAMP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi
Instituição: FORP-USP

Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Mecanismos Centrais do Controle da Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

A minha mãe Catarina. Pelo exemplo constante de superação, dedicação e amor. Que este trabalho seja mais uma constatação de que seus esforços nunca foram em vão.

Aos meus queridos irmãos Marcos e André, por serem acima de tudo grandes amigos e as minhas cunhadas, Marilza e Arliana, que se tornaram minhas irmãs.

Ao meu sobrinho Leonardo, inspiração diária.

Ao meu amor Flávio pelo carinho, respeito, companheirismo, paciência e principalmente pelo seu amor. Obrigado, por além de tudo, me estender as mãos nos momentos em que mais precisei. Não existem palavras que expressem todo amor e gratidão que sinto por você.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. William Alves do Prado, pela orientação na realização desse trabalho. A liberdade intelectual, a confiança, o respeito pessoal e a tolerância exercidas sempre, me fizeram lidar com alguns de meus limites e conhecer alguns potenciais que, de outra forma, poderiam ainda estar fora de meu alcance.

Ao querido Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho da Faculdade de Farmácia da UFMG, onde conheci e me encantei com a beleza da ciência e da vida acadêmica. Você fez a diferença.

Aos colegas de laboratório e amigos Gláucia, Carol, Rafael, Marcelo, Josie, Thiago, Ariane, Ana Carolina, Liliane e Bete.

Aos colegas de trabalho, que ao longo desses quatro anos, tornaram-se grande amigos Quintino e João Walter. Além da ajuda profissional, compartilharam ansiedades e conhecimentos ao longo desses quatro anos.

A minha querida amiga Aline pelo carinho, pelos conselhos, puxões de orelha, caronas (sempre preciosas), companhia e amizade.

Aos queridos amigos Walter, Márcia Rédua, Cris Zanoni, Renato Leonardo, Dionéia, Fabi, Dani, Joyce, Vivi, Kellen, Caryne, Elias Jr., Antônio Carlos e Leonardo.

A minha família que sempre me apóia e me faz sentir especial.

A minha nova família, Canhestro e Silva, por me acolherem como filha e compartilhar sonhos e planos.

À todos os colegas do departamento de Farmacologia.

À todos os professores do Departamento de Farmacologia.

Aos técnicos, Paulo Roberto Castania e Marcos Antônio de Carvalho pela ótima convivência e colaboração na realização dos experimentos.

Aos secretários Fátima Helena Ferreira Petean, José Waldik Ramon e Sônia Maria Stefanelli.

Aos professores e colegas do DOL, pela oportunidade de vivenciar discussões de grande importância na minha formação científica.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

COSTA, K.A. **Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo induzido pela epibatidina em modelo de dor neuropática em ratos**. 2010. 123p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os receptores nicotínicos são encontrados no Sistema Nervoso Central e exercem papel na modulação sináptica, na plasticidade neuronal e em diversas funções cognitivas. A diversidade dos receptores nicotínicos associada ao seu possível envolvimento em diferentes processos fisiológicos e patológicos vem sendo amplamente estudado. Vários estudos demonstraram que a administração de agonistas nicotínicos por via sistêmica, intratecal ou intracerebroventricular causa antinociceção, sendo que este efeito parece depender da ativação de centros supraespinais. O presente estudo examinou o efeito da injeção sistêmica, da microinjeção no núcleo pretectal anterior (NPtA) e na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPvl) da epibatidina, um agonista de receptores nicotínicos neuronais, sobre a alodínia mecânica induzida por ligadura dos troncos dos nervos espinais L5 e L6. Também se avaliou o efeito da microinjeção de atropina ou mecamilamina sobre o efeito antinociceptivo induzido pela microinjeção de epibatidina na SCPvl e o efeito da mecamilamina sobre o efeito antialodínico observado após injeção sistêmica da epibatidina. Inicialmente se observou que a ligadura dos troncos L5 e L6 dos nervos espinais induz alodínia mecânica já no 2º dia após cirurgia, mantendo-se constante até pelo menos o 28º dia após a ligadura. Nenhuma alteração no limiar de resposta a estímulos mecânicos foi observada nos animais “sham” ou na pata contralateral. A injeção sistêmica (3,0 µg/kg, i.p.) de epibatidina induz efeito antialodínico, porém essa mesma dose não altera o desempenho dos animais no teste do rota-rod. Além disso, a microinjeção na SCPvl, mas não no NPtA (0,3 µg/0,3 µL) de epibatidina induziu efeito antialodínico. Mecamilamina microinjetada na SCPvl aboliu o efeito antinociceptivo induzido pela epibatidina microinjetada neste mesmo núcleo e o efeito da epibatidina administrada por via sistêmica. Estes resultados permitem concluir que a injeção sistêmica e central de epibatidina induz efeito antialodínico no modelo de dor neuropática e esse efeito depende da interação dessa substância com receptores nicotínicos localizados na SCPvl.

Palavras chaves: epibatidina, dor neuropática, neurotransmissão colinérgica, alodínia, substância cinzenta periaquedutal.

ABSTRACT

COSTA, K.A. Pharmacological characterization of the antinociceptive effects induced by epibatidine in model of neuropathic pain in rats. 2010. Thesis (Doctoral) School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2010.

Nicotinic receptors are found in the central nervous system (CNS) and have an important function in modulating neural synaptic, CNS plasticity and many other cognitive functions. A variety of subtypes of nicotinic receptors are related with physiological and pathological processes. Recently, studies have been demonstrating that nicotinic agonists injected either systemically or centrally have an antinociceptive effect. The present study examined; 1) the effect of epibatidine injected systemically and centrally into the anterior pretectal nucleus (APTn) and into the ventro lateral periaqueductal gray (vlPAG) on the mechanical allodynia induced by ligation of trunk lumbar (L5-L6) spinal nerve; 2) the effect of microinjection of nicotinic antagonist (atropine and mecamylamine) on the antinociceptive effect induced by epibatidine microinjection into the vlPAG. 3) the effect of mecamylamine on the antiallodynic effect, observed after systemic administration of epibatidine. It was demonstrated that the ligation of trunk lumbar (L5-L6) spinal nerve produced mechanical allodynia after two days post-operative and it was maintained for 28 days. Sham group and the contralateral paw had no change in the threshold response. Systemic injection of epibatidine (3,0 µg/kg, i.p.) induced an antiallodynic effect, without affecting motor function. Central injection of epibatidine into the vlPAG (0,3 µg/0,3 µL) also had an antiallodynic effect, but no effect on APTn was observed. Mecamylamine injected into the vlPAG abolished the antiallodynic effect of epibatidine injected systemically and centrally (vlPAG). These results show that the epibatidine injected either systemically or into the vlPAG produced an antiallodynic effect on the neuropathic pain model and also infer that this antiallodynic effect produced by epibatidine requires the interaction of epibatidine with vlPAG nicotinic receptors.

Key words: epibatidine, neuropathic pain, neurotransmission cholinergic allodynia, periaqueductal gray.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática da ligadura das raízes dorsais L5 e L6 do nervo ciático	35
FIGURA 2	Diagrama esquemático mostrando visão dorsal das estruturas ósseas na região do baixo lombar e sacral	36
FIGURA 3	Aparato para realização do teste nociceptivo	37
FIGURA 4	Aparelho estereotáxico usado para implante da cânula-guia	38
FIGURA 5	Sistema usado para a realização do teste do rota-rod	39
FIGURA 6	Representação esquemática do experimento 1	42
FIGURA 7	Representação esquemática da seqüência temporal do teste do rota-rod	42
FIGURA 8	Representação esquemática da seqüência temporal do experimento 3	44
FIGURA 9	Representação esquemática da seqüência temporal dos experimentos envolvendo microinjeção de epibatidina, salina ou dos antagonistas	46
FIGURA 10	Curso temporal da alodinia mecânica induzida pela ligadura dos nervos L5 e L6	50
FIGURA 11	Efeito da administração intraperitoneal de epibatidina 3 ou 5 µg/kg no desempenho dos animais no teste do rota-rod	52
FIGURA 12	Efeito da administração de epibatidina (3 µg/kg, i.p.) ou salina (seta) sobre o limiar mecânico	55
FIGURA 13	Efeito da microinjeção de epibatidina (0,3 µg/0,3 µL) ou salina (seta) no núcleo pretectal anterior (NPtA) sobre o limiar mecânico	57
FIGURA 14	Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção no NPtA	58
FIGURA 15	Efeito da microinjeção de epibatidina (0,3 µg/0,3 µL) ou salina (seta) na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral sobre o limiar mecânico	60
FIGURA 16	Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção na SCPvl	61

FIGURA 17	Efeito da microinjeção de atropina (100 ng/0,3 µL) ou salina (seta) na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral sobre o efeito antialodínico induzido pela microinjeção de epibatidina nesse mesmo núcleo.....	64
FIGURA 18	Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção na SCPvl.....	65
FIGURA 19	Efeito da microinjeção de mecamilamina (1 µg/0,3 µL) ou salina (seta) na substância cinzenta periaquedutal ventro lateral sobre o efeito antialodínico induzido pela microinjeção de epibatidina nesse mesmo núcleo.....	66
FIGURA 20	Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção na PAGvl	67
FIGURA 21	Efeito da microinjeção de mecamilamina (1,0 µg/0,3 µL) ou salina (seta) na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral sobre o efeito antialodínico induzido pela injeção sistêmica de epibatidina	69
FIGURA 22	Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção ns SCPvl.....	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	Animais.....	34
3.2	Modelo de dor neuropática	34
3.3	Modelo de alodinia mecânica	36
3.4	Implante da cânula guia	37
3.5	Microinjeção	38
3.6	Teste de Rota-rod	39
3.7	Análise histológica.....	40
3.8	Drogas.....	40
3.9	Protocolo experimental.....	41
3.9.1	Alodinia mecânica induzida por ligadura de nervos L5 e L6.....	41
3.9.2	Efeito a administração sistêmica de epibatidina sobre o teste do rota-rod....	42
3.4.3	Efeito da injeção sistêmica de epibatidina sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos.....	43
3.9.4	Efeito da microinjeção intracerebral de epibatidina sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos.....	44
3.9.5	Efeito da microinjeção intracerebral de mecamilamina ou atropina sobre o efeito antialodínico da epibatidina	46
3.10	Análise estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Alodinia mecânica induzida por ligadura dos troncos dos nervos espinais L5 e L6	48

4.2	2 Efeito da administração sistêmica de epibatidina sobre o teste do rotarod	51
4.3	Efeito da administração sistêmica de epibatidina sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervo	53
4.4	Efeito da microinjeção de epibatidina no núcleo pretectal anterior (NPtA) sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos	56
4.5	Efeito da microinjeção de epibatidina no substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPvl) sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos	59
4.6	Efeito da microinjeção de atropina ou mecamilamina na SCPvl sobre o efeito antialodínico da microinjeção de epibatidina na mesma região.....	62
4.7	Efeito da microinjeção de mecamilamina na SCPvl sobre o efeito antialodínico induzido pela injeção sistêmica da epibatidina.....	68
5	DISCUSSÃO	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

A dor desempenha importante papel protetor para os seres vivos, pois os alerta sobre a existência de danos teciduais potenciais ou reais e gera respostas reflexas coordenadas e comportamentais para minimizar tal dano. Quando o dano tecidual é inevitável, uma série de alterações fenotípicas da excitabilidade do sistema nervoso periférico (SNP) e central (SNC) se estabelece no intuito de recuperar o tecido lesado.

De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), a dor é uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais, emocionais e cognitivos e está associada a uma lesão real ou potencial. O aspecto da dor mais freqüentemente avaliado nos modelos experimentais é o sensorial e, portanto, usa-se o termo nocicepção ou resposta nociceptiva para se referir à habilidade para detectar e reagir a estímulos nocivos. Outros termos amplamente usados em estudos clínicos e experimentais para se referir à sensibilização dos nociceptores durante o processo inflamatório são hiperalgesia e alodinia. De acordo com a IASP, hiperalgesia é uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso, enquanto alodinia é a dor induzida por um estímulo que normalmente não provoca dor. Uma adaptação dessas definições para os modelos experimentais permitiria afirmar que a hiperalgesia representa uma resposta nociceptiva aumentada a estímulos originalmente nocivos, enquanto a alodinia é caracterizada pela resposta nociceptiva induzida por estímulos originalmente inócuos.

De uma forma geral, a resposta nociceptiva se inicia com a ativação de um grupo especial de neurônios sensoriais por estímulos nocivos térmicos, mecânicos ou químicos. Esses neurônios, chamados neurônio aferente primário (NAP), são neurônios pseudo-unipolares cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD), nodosos ou trigeminais, dependendo da parte do corpo que inervam. Além das terminações periféricas, denominados nociceptores, os NAPs possuem prolongamento central que adentra o corno dorsal da medula espinal. Os NAP diferem de outros neurônios sensoriais, principalmente, em relação ao limiar para ativação. Em situações normais, nas quais não há processo inflamatório associado, os nociceptores apresentam limiar de ativação bem mais elevado do que aquele dos demais neurônios sensoriais. Durante o processo inflamatório pode ocorrer diminuição do limiar para ativação dos nociceptores e o desenvolvimento de alodinia ou hiperalgesia. Para revisões sobre o assunto, veja CATERINA; JULIUS (2001), LEWIN et al. (2004), MILLAN (1999), RAJA et al. (1999) e SNIDER; McMAHON (1998).

Os NAP podem ser classificados quanto ao diâmetro de seus axônios, mielinização e velocidade de condução do potencial de ação. Os NAPs denominados tradicionalmente como fibras C apresentam axônios de pequeno diâmetro, não mielinizados e conduzem em menor velocidade o potencial de ação, enquanto aqueles denominados fibras A δ apresentam axônios de maior diâmetro, mielinizados e maior velocidade de condução (JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999; SNIDER; McMAHON, 1998). Os NAPs também podem ser classificados quanto ao aspecto funcional como sensíveis a estímulos mecânicos, térmicos, químicos ou de caráter polimodal. Apesar de todas as combinações de sensibilidade serem

encontradas, os nociceptores polimodais, que respondem a todos os tipos de estímulos, são os mais comuns (HUNT; MANTYH, 2001).

A informação nociceptiva gerada pela ativação de um nociceptor percorre toda a extensão do NAP, passando pelas raízes dorsais (BESSON; CAHOUCHE, 1987) e, em seguida, estabelece sinapses com neurônios de segunda ordem através dos quais a informação nociceptiva é transmitida para diversas regiões supraespinais (WILLIS, 1985). A substância cinzenta da medula espinal pode ser citoarquiteticamente dividida em 10 lâminas: Lâmina I (marginal), II (substância gelatinosa), III e IV (*nucleus proprius*) e V e VI (lâminas profundas) compreendem o corno dorsal da medula espinal; a lâmina VII corresponde à substância cinzenta intermediária, as lâminas VIII e IX compreendem o corno ventral medial e lateral, respectivamente, enquanto a lâmina X é a região que circunda o canal central. As lâminas I e II (mais superficiais), V, VI e a lâmina X, constituem regiões espinais predominantemente implicadas na recepção, processamento e transmissão rostral da informação nociceptiva.

As fibras do tipo C projetam-se fortemente para a lâmina II e menos intensamente para a lâmina I, V e X. Por outro lado, as fibras A δ terminam na lâmina I e em menor extensão nas lâminas II e X. Em contraste, as fibras de grande diâmetro e baixo limiar de ativação A β , que conduzem informações não nociceptivas, arborizam-se profundamente nas lâminas III e IV, menos marcadamente nas lâminas V e VI e de forma bem discreta nas lâminas I e II (KANDEL et al., 2003).

Três tipos básicos de neurônios podem ser identificados no corno dorsal da medula espinal no que diz respeito a natureza de suas respostas a estímulos nociceptivos (CERVERO, 1995; MENSE, 1993, SCHAIBLE; GRUBB, 1993; WILLIS; COGGESHALL, 1991). Primeiro, neurônios tipicamente silenciosos, ativados exclusivamente por estímulos nocivos conduzidos por fibras C e A δ e concentrados nas lâminas I e II, embora também sejam encontrados nas lâminas profundas V e VI. A habilidade desses neurônios em codificar a intensidade do estímulo está limitada; segundo, neurônios multirreceptivos ou de faixa dinâmica ampla, que manifestam considerável convergência de aferências cutâneas, viscerais e musculares (GEBHART, 1995; MENSE, 1993; NESS, GEBHART, 1990), e são predominantemente encontrados nas lâminas IV, V e VI e, em menor número, nas lâminas I, II e X. Esses neurônios de faixa dinâmica ampla são os principais codificadores da intensidade do estímulo e respondem tanto à estimulação nociva quanto inócua (DUBNER et al., 1989); a terceira classe compreende os neurônios não nociceptivos que são encontrados principalmente nas lâminas III e IV, mas ocorrem também na lâmina I.

Na lâmina I existem neurônios que respondem especificamente ao frio e unidades polimodais responsivas ao frio, ao calor e a estímulos mecânicos (DOSTROVKY; CRAYG, 1996; ZHANG; CRAIG, 1997). Portanto, as propriedades codificadoras dos neurônios no corno dorsal podem ser bem mais complexas que a classificação moderadamente simplista apresentada acima (MORGAN, 1998).

Os neurônios do corno dorsal da medula espinal responsivos as aferências sensoriais também podem ser classificados como supraespinais (neurônios de

projeção); propioespinais intersegmentares (e contralaterais), interneurônios interlaminares intrasegmentares e interneurônios intralaminares intrasegmentares (BIELLA et al., 1997; WILLIS; COGGESHALL, 1991). Em cada caso, podem compreender neurônios de faixa dinâmica ampla, não nociceptivos e nociceptivos específicos. Tanto os neurônios de projeção quanto interneurônios podem ser ativados pelo NAP (COGGESHALL et al., 1997; WILLIS; COGGESHALL, 1991).

Os neurônios de projeção, por definição, são aqueles que transmitem a informação nociceptiva diretamente para centros supraespinais. Em contraste, os interneurônios estão envolvidos com a transferência inter e intralaminar, integração e modulação da informação nociceptiva e podem ser excitatórios ou inibitórios. Embora essa divisão seja útil, certos interneurônios podem interagir com outros neurônios presentes no corno dorsal da medula espinal ou com o próprio NAP e exercer ações tanto inibitórias quanto facilitatórias atuando, por exemplo, em diferentes subtipos de receptores. O conjunto de axônios de neurônios de projeção compõe tratos ascendentes encarregados de transmitir a informação nociceptiva até estruturas supraespinais onde as várias submodalidades como qualidade, intensidade, localização e aspectos emocionais ou afetivos são integrados (BASBAUM et al., 2009).

Um dos principais tratos somatossensoriais ascendentes é o trato espinotalâmico, que se projeta principalmente para o tálamo. Esse trato é composto principalmente por neurônios que respondem a estímulos nociceptivos (55% de neurônios de faixa dinâmica ampla e 32% de neurônios nociceptivos específicos) e, em menos proporção, por neurônios não nociceptivos (CHUNG et al., 1979; GIESLER et al.,

1981; MILNE et al., 1981). Portanto, este trato pode conduzir tanto informações nociceptivas quanto não nociceptivas (temperatura, pressão e prurido) (ANDREW; CRAIG, 2001a, b; CRAIG et al., 2001; LYNN, 1992; WILLIS et al., 2001).

O trato espinotalâmico pode ser filogeneticamente dividido em neoespinotalâmico e paleoespinotalâmico. As fibras do trato neoespinotalâmico têm origem em células das lâminas I e V do corno dorsal da medula espinal e dirigem-se ao tálamo ventral póstero-lateral e porção medial do tálamo posterior que, por sua vez, projetam-se para o córtex somatosensorial. Este trato é responsável pela condução rápida da informação nociceptiva, permitindo rápida percepção da dor, localização e intensidade do estímulo (CRAIG, 1991; CRAIG et al., 2001; MILLAN 1999). Por outro lado, as células do trato paleoespinotalâmico, localizadas principalmente nas lâminas profundas e, em menor proporção, nas lâminas superficiais da substância cinzenta da medula espinal, projetam-se para núcleos da formação reticular bulbar, ponte, mesencéfalo, hipotálamo e aos núcleos medial e intralaminar do tálamo que, por sua vez, projetam-se para estruturas límbicas e difusamente para o córtex, especificamente para o córtex frontal orbital (BURSTEIN; POTREBIC, 1993; GIESLER et al., 1979; JASMIN et al., 1997; NEWMAN et al., 1996). Este trato conduz a informação nociceptiva de modo lento, mal localizado, porém com forte conotação afetiva, motivando fortes reações comportamentais defensivas (ALBE-FESSARD et al., 1985; BESSON et al., 1982; CRAIG, 1991; CRAIG et al., 2001; KERR-LIPPMAN, 1974; MILLAN, 1999).

O trato espinoreticular, por sua vez, é formado por neurônios nociceptivos específicos e de faixa dinâmica ampla e, em menor proporção, por neurônios não-

nociceptivos, que recebem aferências da pele, vísceras e músculos (MILLAN, 1999). Estes neurônios estão localizados nas lâminas profundas (V e VI) e, em menor proporção, nas lâminas I, VII e VIII (WILLIS; COGGSHALL, 1991; WILLIS; WESTLUND, 1997) e se projetam principalmente para núcleos da formação reticular, tais como o núcleo reticular gigantocelular, reticular paragigantocelular lateral e dorsal e região parabraquial (CECHETTO et al., 1985; HYLDEN et al., 1985; MENETREY; BASBAUM, 1987). Neste sentido, o trato espinoreticular parece estar relacionado com características motivacionais-afetivas e respostas autonômicas da dor (CHANDLER et al., 1992; MENSE, 1983; WILLIS; WESTLUND, 1997; MILLAN, 1999).

O trato espinomesencefálico origina-se principalmente nas lâminas I, II, IV, V, VI, mas também é observado nas lâminas VII, X e no corno ventral da medula espinal. Este trato é formado principalmente por neurônios nociceptivos específicos e, em menor proporção, por neurônios de faixa dinâmica ampla e não nociceptivos (MILLAN, 2002) que se projetam principalmente para substância cinzenta periaquedutal lateral (SCPI) e ventrolateral (SCPvI), núcleo pretectal posterior, núcleo de Darkschewitsch, colículo superior, núcleo intersticial de Cajal, núcleo pretectal anterior (NPtA), núcleo cuneiforme, núcleo de Edinger-Westphal, formação reticular e tálamo, indicando envolvimento com aspectos motivacionais-afetivos, autonômicos e motores da dor (ALMEIDA et al., 2004).

A via da coluna dorsal-lemnisco medial é formada por neurônios nociceptivos específicos, de faixa dinâmica ampla e não nociceptivos, localizados principalmente nas lâminas III e V e, em menor proporção, nas lâminas IV e VII (MILLAN, 2002) e

projetam-se principalmente para os núcleos da coluna dorsal (núcleo cuneato e grácil) através do funículo dorsal ipsilateral (RUSTIONI, 1973; RUSTIONI, 1974; RUSTIONI et al., 1979). Essa via, através dos núcleos da coluna dorsal, desempenha importante papel de integração da informação sensorial de órgãos abdominais e pele com o tálamo (ALMEIDA et al., 2004).

Por último, o trato espinocervical é formado principalmente por neurônios de faixa dinâmica ampla e, em menor proporção, por neurônios não-nociceptivos localizados nas lâminas III e IV e, em menor extensão, nas lâminas I, II e V. Este trato projeta-se através do funículo dorsolateral ipsilateral, tendo como alvo principal o núcleo cervical lateral que se projeta contralateralmente para o tálamo, a SCP e o colículo superior. Neste sentido, o trato espinocervical parece ser importante para características motivacionais-afetivas, discriminativa-sensorial e respostas autonômicas da dor (MILLAN, 1999 e 2002).

A modulação da transmissão nociceptiva pode ocorrer na periferia, no corno dorsal da medula espinal e em centros supraespinais. A proposição de um sistema modulatório específico para o controle da dor foi inicialmente feita por Melzack; Wall (1965). Reynolds (1969) mostrou a importância de sistemas descendentes no controle da dor, ao observar que a estimulação elétrica da SCP causava forte antinocicepção em ratos. Desde então, amplo mapeamento de sítios encefálicos tem sido feito a fim de encontrar locais onde a estimulação produza antinocicepção. Entre as estruturas encontradas destacam-se, além da SCP, o núcleo dorsal da rafe (NDR), RVM e o NPtA.

De forma geral, a resposta nociceptiva tem importante papel adaptativo, conferindo proteção aos organismos que reagem a estes estímulos de modo a preservar sua integridade. No entanto, dependendo da duração e intensidade, a dor pode representar agressão ao organismo e influenciar o comportamento do indivíduo, como no caso da dor neuropática, que é uma caracterizada por dor espontânea e intensa sem funções protetoras ou reparadoras aparentes e que resulta de lesões do sistema nervoso periférico ou central.

De acordo com a IASP, a dor neuropática é definida como uma condição dolorosa iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção no sistema nervoso. Evidências mostram que injúria de nervo altera a atividade normal das fibras aferentes primárias nociceptivas e das fibras A β gerando sinais de dor espontânea (estímulo-independente) e dor estímulo-dependente, tais como alodinia e hiperalgesia, que normalmente são refratários à maioria dos analgésicos convencionais (AMIR et al., 2002; JENSEN et al., 2001; OSSIPOV; PORRECA, 2009; WOOLF, 2004; WOOLF; MANNION, 1999).

A dor neuropática pode ser classificada temporalmente como dor crônica. É uma síndrome complexa resultante de lesões ou disfunção de fibras nervosas e difere-se da dor nociceptiva na qual ocorre dor decorrente da estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos (WOOLF; MANNION, 1999). Embora a dor causada por injúrias em nervos periféricos seja interpretada como sinônimo de dor neuropática, esta pode estar também associada a danos a danos no SNC, como a síndrome talâmica, que pode ocorrer, raramente, como seqüela de acidente vascular encefálico (BOIVE et al., 1989). Na dor neuropática, a

lesão das fibras condutoras causa distúrbio das funções motoras e sensoriais e pode, paradoxalmente, estar associada a hiperalgesia, alodinia, parestesia e a dor espontânea. Destas alterações, a alodinia mecânica corresponde à principal perturbação de sensação. O padrão de alteração de sensibilidade na dor neuropática difere da hiperalgesia primária e da dor nociceptiva e assemelha-se a hiperalgesia secundária, além disso, é acompanhada de dano tecidual e alodinia mecânica (MILLAN, 1999).

O início da dor neuropática está associado com o aumento no número de disparos ectópicos espontâneos de potenciais de ação. Evidências mostram que a excitabilidade exacerbada e geração de maior número de potenciais ectópicos e descargas espontâneas podem decorrer da liberação de fatores de crescimento que aumentam a expressão, distribuição e cinética de canais de Ca^{2+} e Na^{+} no sítio da lesão e nas fibras não lesadas (HINSON et al., 1997; REYNOLDS; WOOLF, 1993; VABNICK et al., 1996; WOOLF; MANNION, 1999). Além disso, também se observa mudanças na expressão de neurotransmissores, liberação de citocinas pró-inflamatórias que, em conjunto, contribuem para a sensibilização e ativação das fibras sensoriais de pequeno e grosso calibre (LI et al., 2000; OSSIPOV; PORRECA, 2009). No entanto, a atividade espontânea rapidamente declina, enquanto os sinais comportamentais de dor persistem por um longo período após a lesão inicial. Neste sentido, tais evidências indicam que os mecanismos que iniciam a dor neuropática podem diferir dos mecanismos que mantêm o processo (BIAN et al., 1999; BURGESS et al., 2002; CHAPLAN et al., 1994; LIU et al., 2001; MALAN et al., 2000; OSSIPOV; PORRECA, 2005; SUN et al., 2005). Assim, em paralelo à atividade ectópica espontânea dos nervos lesados, uma série de mudanças biológicas é

desencadeada resultando em sensibilização dos elementos neurais envolvidos no processamento da informação nociceptiva (BESSON, 1999; COSTIGAN; WOOLF, 2000).

Os prováveis mecanismos envolvidos na manutenção dos sinais comportamentais nas fases mais tardias da neuropatia envolvam a sensibilização central, alterações morfológicas no corno dorsal da medula espinal e ativação de mecanismos descendentes facilitatórios de origem supra-espinal. A facilitação descendente, originada principalmente no RVM e projetada para medula espinal através do DLF, parecem ser importantes para a expressão da dor neuropática (OSSIPOV et al., 2001). O bloqueio da facilitação descendente causado pela lesão no DLF ou a microinjeção de lidocaína ou antagonista de colecistocinina_B no RVM bloqueiam o comportamento de dor neuropática (KOVELOWSKI et al., 2000; OSSIPOV et al., 2000; PERTOVAARA et al., 1996). A lesão seletiva de células que expressam receptores μ -opióides no RVM também bloqueia o comportamento nociceptivo associado à lesão de nervo (POREECA et al., 2001). No entanto, o papel de vias descendentes facilitatórias na iniciação ou manutenção da expressão da dor neuropática ainda não está completamente elucidada.

Diversos modelos experimentais de nocicepção neuropática têm sido desenvolvidos para mimetizar a síndrome neuropática humana. A injúria traumática do nervo (transecção parcial ou total do nervo ou constrição do nervo ciático), a inflamação perineural, a administração de substâncias neurotóxicas e o diabetes experimental (BENNETT; XIE, 1988; SELTZER et al., 1990; ALEY et al., 1996; CHACUR et al., 2001) são modelos capazes de reproduzir síndromes neuropáticas. As medidas

indiretas e comportamentos nociceptivos, tais como alterações do comportamento exploratório, autolimpeza, interação social, preferência de local, autotomia (morder diretamente o tecido desnervado), flexão espontânea do membro lesado ou mudanças no comportamento geral, associadas à avaliação de parâmetros fisiológicos como atividade espontânea da fibra aferente primária, são usados para aferir a sensibilidade dolorosa anormal em animais com neuropatia (DUBNER; REN, 1999; KAUPPILA, 1998; LIU et al., 2000; MILLS et al., 2001).

O modelo de ligadura de nervo em ratos descrito por Kim; Chung (1992) é muito usado para o estudo dos mecanismos da nocicepção neuropática. Neste modelo a ligadura dos ramos medulares L5 e L6 induz comportamento de nocicepção espontânea, hiperalgesia e alodinia. No estudo original, os autores avaliaram o efeito da ligadura das raízes dorsais sobre o limiar nociceptivo medido pela latência de retirada da pata a estímulos térmicos (teste de Hargreaves) e a estímulos mecânicos (filamentos de Von Frey). Foi observado que a ligadura das raízes produz hiperalgesia de longa duração (cerca de 5 semanas), alodinia mecânica (cerca de 10 semanas) e comportamento sugestivo de nocicepção espontânea na pata afetada.

A injúria neural por trauma mecânico, transecção ou ligadura de nervo periférico, produz interrupção imediata e muitas vezes irreversível da condução elétrica do nervo, seguida por degeneração Waleriana do axônio distal à lesão. Tal injúria de fibras nervosas induz ainda sensibilidade a estímulos mecânicos no sítio receptivo do nervo lesado, que persiste por várias semanas após a lesão neural, podendo apresentar também expressiva sensibilidade a estímulos térmicos. Nestes casos, fibras C são ativadas por descargas tônicas, de acordo com a temperatura, enquanto

algumas fibras A β , que normalmente não são excitáveis pelo aumento da temperatura, mostram respostas prolongadas e irregulares quando aquecidas (DICKHAUS et al., 1976; ZIMMERMANN, 1985; ZIMMERMANN; HERDEGEN, 1996). Poucas horas após a desnervação surgem múltiplos brotos de regeneração do nervo lesado, também denominado neuroma (WALL et al., 1979). Estes neuromas são geralmente formados por fibras do tipo C e mostram atividade espontânea, excitabilidade anormal e descargas características (CULP; OCHOA, 1982; HAN et al., 2000; ZIMMERMANN, 1985). Normalmente as descargas elétricas são irregulares e não se reproduzem bem com estimulação repetida. Os tipos irregulares de descarga presumivelmente produzem as sensações de parestesia relatadas por pacientes neuropáticos, como formigamento, prurido ou choque (ZIMMERMANN, 2001).

Independente da origem da dor neuropática, essa condição produz alodínia e sensação de dor persistente de difícil alívio, uma vez que não responde aos tratamentos convencionais como uso de antiinflamatórios ou opióides. Dessa forma, a busca por tratamentos que aliviem de forma satisfatória a dor neuropática tem se tornada cada vez mais importante. A nicotina mostrou ter vários efeitos fisiológicos e farmacológicos através da ativação de receptores nicotínicos neuronais. (ABDIN et al., 2006).

Os receptores nicotínicos são canais iônicos controlados por ligantes e sua ativação aumenta a permeabilidade celular ao Na⁺, K⁺ e ao Ca²⁺. Os receptores nicotínicos são divididos em duas classes: musculares e neuronais. Os receptores musculares são pentâmeros compostos de 4 subunidades distintas (α , β , γ , δ na proporção

estequiométrica de 2:1:1:1, respectivamente). As subunidades individuais são cerca de 40% idênticas nas suas seqüências de aminoácidos, sugerindo que se originam de um gene primordial comum. Esses receptores são encontrados na junção neuromuscular esquelética, onde são responsáveis pela manutenção do tônus muscular e, dessa forma, são alvos de drogas usadas clinicamente para promover relaxamento muscular (HOFFMAN; TAYLOR, 2003; JENSEN et al., 2005; PICCIOTO et al., 2000).

Os receptores nicotínicos neuronais encontrados nos gânglios e no SNC também ocorrem como pentâmeros de unidades compostas de uma, duas ou mais subunidades. Embora apenas uma única subunidade do tipo de seqüência α (designada como $\alpha 1$) seja abundantemente encontrada no músculo, juntamente com β , γ e δ , pelo menos oito subtipos de α ($\alpha 2$ - $\alpha 9$) e três do tipo não- α (designados como $\beta 2$ - $\beta 4$) são encontrados em tecidos neuronais. Apesar de nem todas as combinações de subunidades α e β formarem receptores funcionais, a diversidade na composição das subunidades é grande e ultrapassa a capacidade dos ligantes de distinguirem subtipos com base na sua seletividade (TAYLOR, 2003).

As subunidades dos receptores nicotínicos neuronais podem ser divididas em subfamílias, baseado na homologia e filogenia, como também, nas propriedades farmacológicas e fisiológicas. Subunidades $\alpha 1$ - $\alpha 6$ combinadas com subunidades $\beta 2$ - $\beta 4$ podem compreender uma família e subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 8$ podem compreender uma segunda família. Subunidades $\alpha 9$ têm propriedades farmacológicas distintas e, provavelmente, participa de uma terceira família. Dessa forma, os receptores nicotínicos podem ser funcionalmente divididos em receptores que possuem a

subunidade $\beta 2$ combinada com várias subunidades α e que apresentam alta afinidade pela nicotina, ou ainda, naqueles que possuem subunidade $\beta 4$ combinada com várias subunidades α e apresentam afinidade pela nicotina 10 - 100 vezes menor. Além disso, receptores nicotínicos contendo subunidades $\beta 4/\alpha 3$ estão expressos em grande quantidade no SNP e parecem ser essenciais para transmissão sináptica no gânglio autonômico. Por outro lado, os receptores presentes em maior quantidade no encéfalo são aqueles que apresentam subunidades $\beta 2/\alpha 4$ e receptores contendo subunidade $\alpha 7$ (PICCIOTTO et al., 2000).

Os receptores nicotínicos neuronais estão envolvidos em numerosos processos relacionados com funções cognitivas, aprendizado e memória, bem como, controle motor e analgesia. Além disso, esses receptores neuronais regulam a liberação sináptica de outros neurotransmissores importantes como dopamina, norepinefrina, serotonina, glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) (CORDERO-ERAUSQUIN; CHANGEUX, 2001). Dessa forma, tem sido proposto que os receptores nicotínicos neuronais sejam alvos terapêuticos potenciais para o tratamento da dor, epilepsia, várias doenças neurodegenerativas e alterações psiquiátricas como doença de Alzheimer, Parkinsonismo, esquizofrenia, ansiedade e depressão (JENSEN et al., 2005).

Os mecanismos associados ao efeito antinociceptivo dos agonistas de receptores nicotínicos neuronais vêm sendo amplamente estudados, uma vez que pode proporcionar a descoberta de um novo alvo terapêutico para o alívio da dor, sintoma associado com diversas condições patológicas que mais causa sofrimento aos pacientes. O envolvimento de mecanismos colinérgicos no controle da nocicepção

foi descoberto em 1932 (DAVIS et al., 1932). Posteriormente, estudos demonstraram que a administração de agonistas nicotínicos neuronais causa diferentes respostas em animais experimentais. A nicotina (TRIPATH et al., 1982) ou agonistas nicotínicos (TRAYNOR, 1998) aumentam a latência no teste de retirada de cauda, teste da placa quente e inibem comportamento nociceptivo espontâneo em roedores.

Para investigar a resposta antinociceptiva mediada pelos receptores nicotínicos neuronais tem sido amplamente usada a epibatidina, uma neurotoxina obtida da pele de *Epipedobates tricolor*, que mostrou ser um potente agonista em várias preparações com receptores nicotínicos neuronais. De forma interessante, esse agonista foi mais potente do que a morfina em induzir analgesia (KHAN et al., 1997). Recentemente, Radek et al. (2004) demonstraram, através de eletromiografia, o efeito da epibatidina no reflexo flexor de fibras aferentes primárias do tipo C. De forma semelhante a obtida após uso de morfina e ao antagonista dos receptores NMDA, MK801, a administração sistêmica de epibatidina reduziu a atividade das fibras C. Esse efeito da epibatidina foi inibido pela administração intracerebroventricular (i.c.v.) de antagonistas de receptores nicotínicos. Por outro lado, a epibatidina aumentou a atividade das fibras C quando administrada por via intratecal (i.t.), demonstrando que a administração sistêmica de epibatidina exerce efeito antinociceptivo provavelmente atuando em centros supraespinais.

Além disso, vários estudos demonstraram que a administração sistêmica de epibatidina tem efeito antinociceptivo (BADIO; DALY, 1994; BONHAUS et al., 1995; RUPNIAK et al., 1994; SPANDE et al., 1992). Por outro lado, quando administrada

pela via i.t., a epibatidina induz resposta complexa, caracterizada pela hiperatividade induzida pelo toque, após baixas doses e pela vocalização intermitente após altas doses da mesma droga (KHAN et al., 1998). Quando foi avaliada a hiperalgesia mecânica ou térmica induzida pela lesão parcial do nervo ciático, a administração i.t. da epibatidina ou nicotina induziu efeito antinociceptivo (RASHID; UEDA, 2002).

Embora a administração sistêmica ou i.t. de epibatidina possa induzir resposta antinociceptiva dependendo da dose e do modelo avaliado, tem sido sugerido que os agonistas dos receptores nicotínicos produzam esses efeitos predominantemente pela ativação da via inibitória descendente originada em regiões do tronco cerebral, incluindo o NRM (BITNER et al., 1998). Cucchiaro et al. (2004) também demonstraram a participação do NDR na resposta antinociceptiva induzida pela epibatidina. Nesse estudo, os pesquisadores investigaram o efeito da epibatidina administrada por via subcutânea (s.c.) ou no NDR sobre a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído. O agonista nicotínico foi mais potente em induzir efeito antinociceptivo quando administrado centralmente, demonstrando que o NDR também pode estar envolvido na resposta induzida por esse agonista.

Apesar da existência de vários estudos demonstrando que agonistas dos receptores nicotínicos neuronais induzem resposta antinociceptiva em diferentes modelos experimentais, e que essa ação pareça ser predominantemente supraespinal, não há estudos que tenham caracterizado de forma ampla os possíveis locais de ação dos agonistas nicotínicos em regiões supraespinais em modelo de dor neuropática, e nem investigado os mecanismos envolvidos nessas respostas. Essas investigações

são importantes para ampliar o conhecimento do papel desses receptores no controle da dor e das vias ativadas por neurônios colinérgicos no SNC.

Diante do exposto, o presente estudo, avalia o efeito antinociceptivo da microinjeção de um agonista nicotínico neuronal. Para tal, usou-se a epibatidina, uma vez que, vários estudos demonstraram que este agonista atua em receptores nicotínicos neuronais e não periféricos. Além disso, existem evidências de que a epibatidina não ativa outros tipos de receptores, tais como receptores para bradicinina, receptores serotoninérgicos, adrenérgicos, colinérgicos muscarínicos ou dopaminérgicos (BANNON et al., 1995). Para avaliar o efeito antinociceptivo desse agonista, avaliou-se a alodinia mecânica induzida pelo modelo de dor neuropática em ratos, que simula alterações neuronais observadas clinicamente e contribui para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na produção e manutenção da dor neuropática (PITCHER et al., 1999). Além disso, alguns estudos mostraram que a epibatidina altera a temperatura corporal, o que pode reduzir a sensibilidade do animal ao calor, interferindo assim, em modelos que usam estímulo térmico nocivo (BANNON et al., 1995).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito antinociceptivo da epibatidina, agonista nicotínico neuronal, sobre a alodínia mecânica induzida pela ligadura de nervo em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar se a injeção sistêmica, a microinjeção no NPtA e na SCPvl de epibatidina induz alodínia mecânica no modelo de dor neuropática em ratos.
- Investigar se os receptores colinérgicos muscarínicos ou nicotínicos são importantes para o efeito antinociceptivo da epibatidina nos núcleos acima citados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram usados ratos Wistar machos (150 – 170 g), provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada (22 ± 1 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e ração e água fornecidos *ad libitum*. Os animais foram ambientados na sala de experimento antes da realização dos protocolos. Durante os experimentos, os animais foram manipulados cuidadosamente, de forma a resultar no menor estresse comportamental possível. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para experimentação em animais (ZIMMERMANN, 1983) e o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP (protocolo nº 008/2006).

3.2 Modelo de dor neuropática

Neuropatia foi induzida experimentalmente pelo procedimento de ligadura dos nervos espinais L5 e L6, como descrito por Kim; Chung (1992). Os animais foram previamente anestesiados com hidrato de cloral 4% (1ml/100g; i.p.) e, em seguida, foi realizada incisão cirúrgica de cerca de 1,5 cm de extensão no dorso do animal na região do plexo lombosacral, expondo o espaço que se estende da vértebra lombar 4 (L4) até a sacral (S1) (FIGURA 1). O músculo eretor da espinha e os músculo multífido foram afastados até a exposição dos processos transversos das vértebras L5 e L6, os quais foram

removidos para expor os nervos espinais L5 e L6. Estes nervos foram separados do tecido conjuntivo e firmemente amarrados com fio catgut cromado 5.0 (ETHICON), em posição imediatamente distal ao gânglio da raiz dorsal (FIGURA 2). Na seqüência, a incisão cirúrgica foi fechada, os animais foram tratados com injeção intramuscular de 0,3 ml de antibiótico (Pentabiótico Veterinário®, Fort Dodge) e mantidos em recuperação.

Os animais que apresentaram disfunção motora ou falharam em desenvolver alodinia mecânica, no segundo dia após o procedimento, foram eliminados do experimento. O grupo controle (“sham”) foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos sem a ligadura.

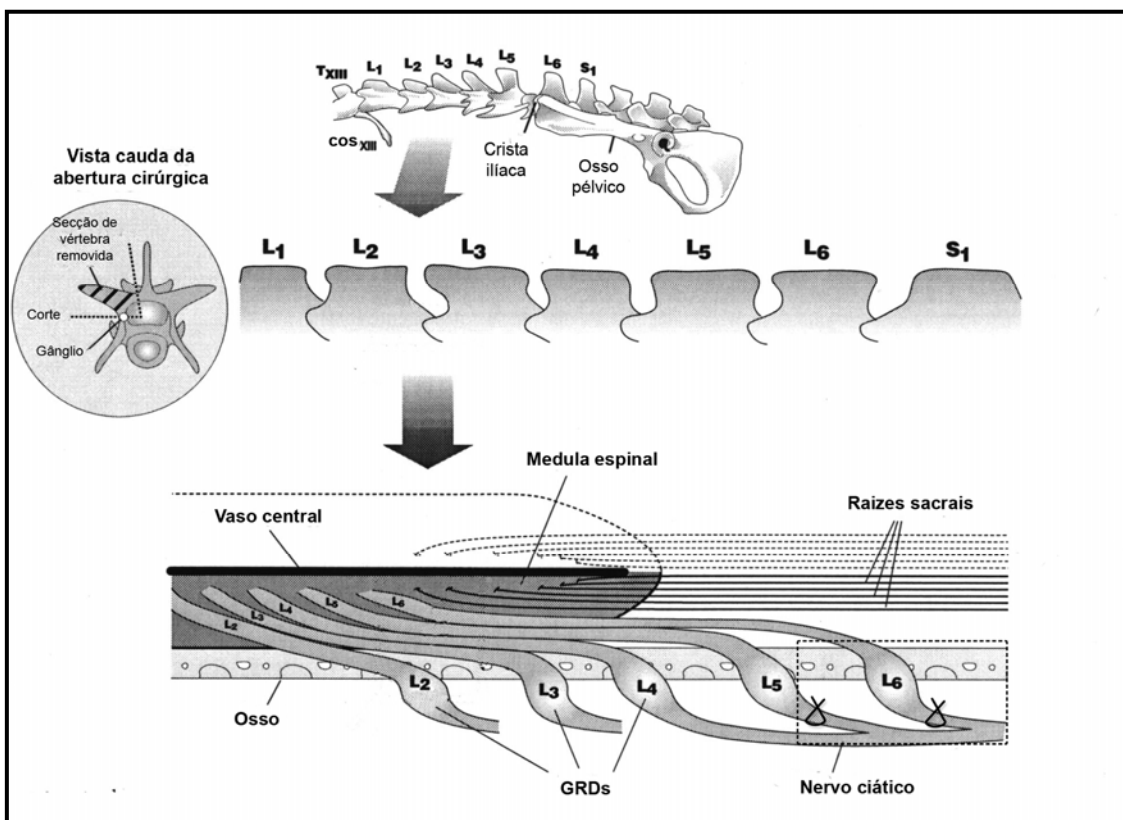


FIGURA 1 – Representação esquemática da ligadura das raízes dorsais L5 e L6 do nervo ciático. Adaptado de Tabo et al. (1999).

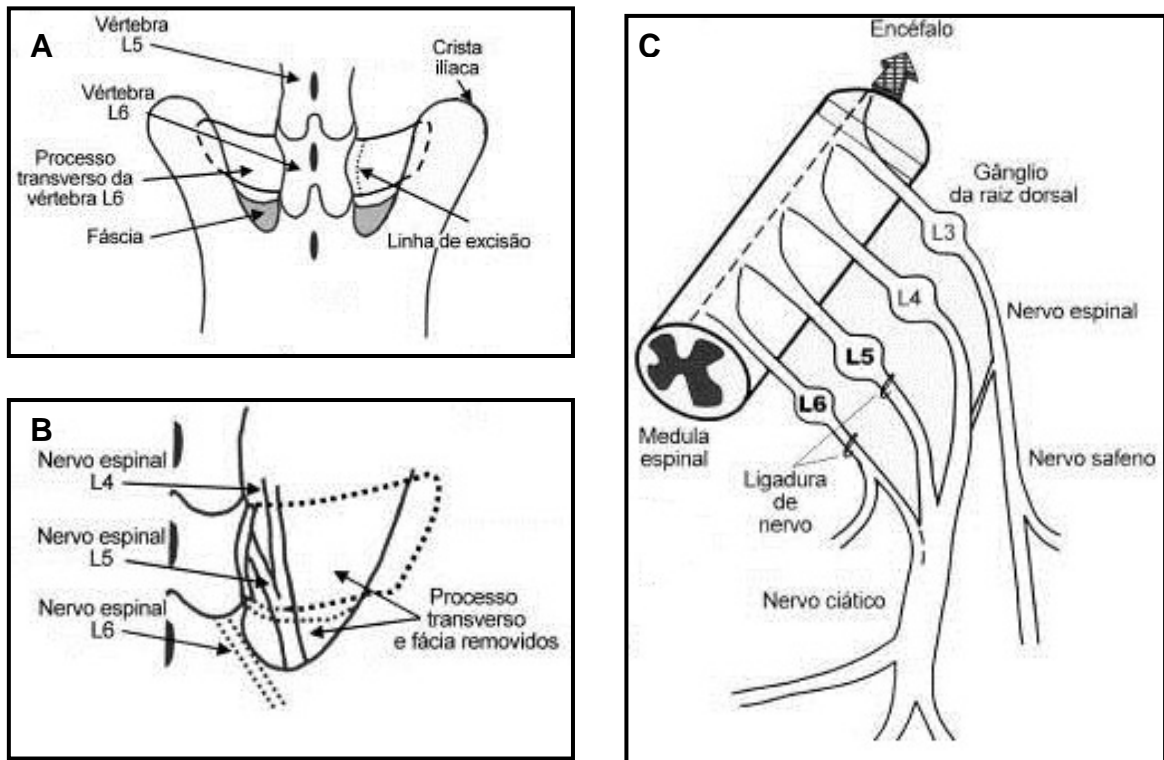


FIGURA 2 – Diagrama esquemático mostrando visão dorsal das estruturas ósseas na região do baixo lombar e sacral. Visão geral das estruturas ósseas após remoção dos músculos paraespinais (**A**). Visão do lado direito após remoção da fásia e do processo transverso das vértebras L5 e L6 (**B**). Esquema mostrando os locais onde os nervos espinais L5 e L6 são submetidos à constricção (**C**).

3.3 Modelo de alodinia mecânica

Para avaliar o limiar nociceptivo a estímulos mecânicos, foi usado anestesiômetro eletrônico (INSIGHT[®]) como descrito por Möller et al. (1998) e que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g) (FIGURA 3). No dia do experimento, após ambientação dos animais, foi aplicada uma força linearmente crescente sobre o centro da superfície plantar da pata posterior dos ratos até a manifestação da resposta nociceptiva. Os estímulos foram repetidos três vezes para a obtenção da média.

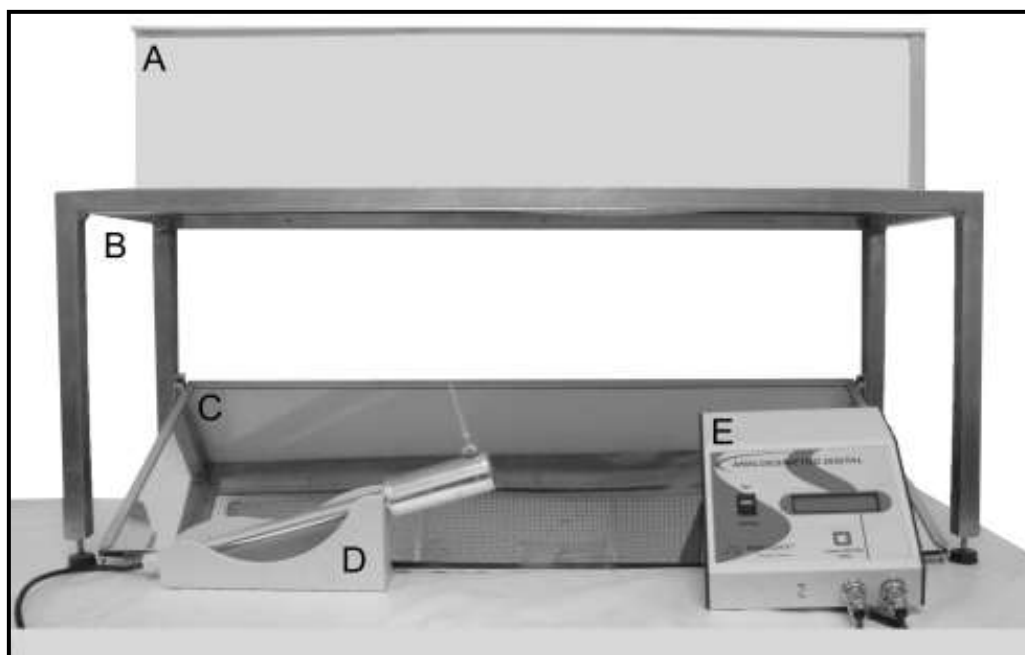


FIGURA 3 - Aparato para realização do teste nociceptivo, formado pela caixa de acrílico para contenção de animais (12x20x17 cm) (A), mesa com assoalho de malha de aço (B), espelho refletor (C), haste de estimulação plantar (D) e contador digital de força (E).

3.4 Implante da cânula guia

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (50 mg/kg, i.p.) e fixados em aparelho estereotáxico (DKI) (FIGURA 4). A calota craniana foi exposta e os animais receberam implante crônico de cânula guia de aço inoxidável (23-G) de 12 mm de comprimento. As cânulas foram direcionadas de modo a manter a extremidade inferior 3 mm acima do alvo, segundo as coordenadas do Atlas de Paxinos; Watson (2005). Para evitar obstrução da cânula-guia, um mandril de aço inoxidável (30-G) foi introduzido e fixado no interior da mesma. Os implantes foram fixados com acrílico autopolimerizável (Simplex[®], São Paulo, Brasil) ancorado por dois parafusos de aço inoxidável rosqueados na calota craniana do animal. Após a cirurgia os animais permaneceram no biotério por um período de recuperação de sete dias.

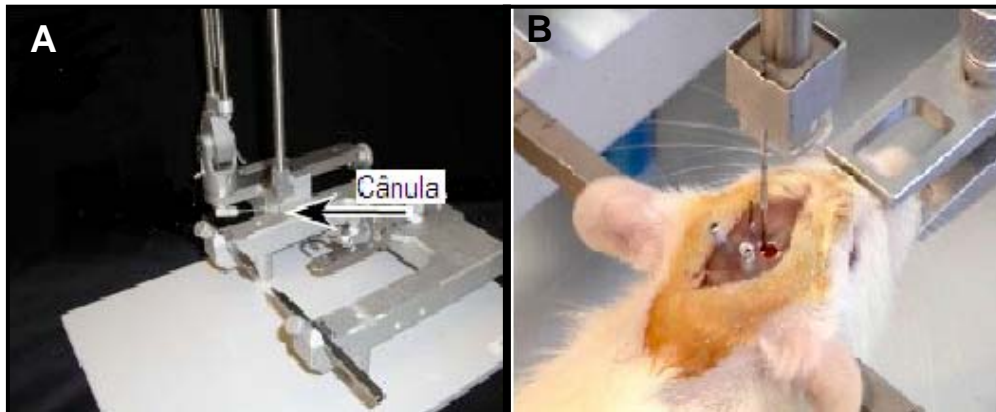


FIGURA 4 – Aparelho estereotáxico usado para implante da cânula-guia (A) e implante da cânula-guia no animal fixado no aparelho (B).

3.5 Microinjeção

A microinjeção foi feita através de agulha de vidro (70-90 μm) conectada a um tubo de aço inoxidável (30-G). O conjunto é protegido por um sistema telescópico de tubos de aço inoxidável que compreende um tubo 30-G conectado a um tubo 23-G. Esta proteção permite o deslizamento do conjunto de agulha de vidro e tubo de aço no seu interior. O tubo 30-G conectado à agulha de vidro é conectado em sua outra extremidade a um tubo de polietileno (PE 10) sobreposto a um papel milimetrado para medida do deslocamento do volume. O polietileno é preenchido com solução contendo droga ou salina e sua outra extremidade é conectada a uma seringa de vidro de 10 ml (vazia) usada para fazer pressão dentro do polietileno, provocando o deslocamento da solução. Uma pequena bolha de ar permite a visualização do deslocamento do volume. A proteção de aço com a agulha foi inserida na cânula-guia e a agulha introduzida até o alvo (3 mm abaixo da ponta da cânula). O volume total da injeção (0,30 μl) foi administrado lentamente a uma velocidade constante

durante 2 minutos, a fim de evitar a rápida expansão do tecido, e a agulha foi removida 20 segundos após o procedimento.

3.6 Teste de Rota-rod

Os animais foram treinados no dia anterior ao teste, sendo colocados três vezes não consecutivas na barra giratória a uma velocidade constante de 10 rotações por minuto (rpm) e com tempo de corte de 120 segundos (FIGURA 5). No dia do teste, o limiar basal foi obtido pela média dos três registros do tempo de permanência na barra giratória (em segundos) como descrito anteriormente. Após a obtenção dos valores basais dos animais, esperou-se aproximadamente 3 horas para início do teste, no qual cada animal recebeu o tratamento e após 1 hora foram colocados na barra giratória, nas mesmas condições citadas anteriormente, e o tempo de permanência obtido como a média de três medidas.



FIGURA 5 – Sistema usado para a realização do teste do rota-rod.

3.7 Análise histológica

Após os experimentos, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.) e 0,30 µl de corante Fast Green (1%) foi microinjetado nas regiões da microinjeção. Em seguida os animais foram sacrificados com tiopental sódico e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução de NaCl 0,9% e solução tamponada de formaldeído 10%, em volume suficiente para fixar os tecidos. Os encéfalos foram retirados e mantidos em formaldeído 10% por no mínimo dois dias. Após esse período, os encéfalos foram congelados e cortados em criostato em fatias de 100 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas e secas ao ar.

3.8 Drogas

- 2,2,2 – tribromoetanol (Aldrich)
- Hidrato de cloral (Vetec, Brasil): agente sedativo e hipnótico usado para anestesia na cirurgia de ligadura de nervo. Solução a 4% preparada em solução de NaCl 0,9 % e administrada na dose de 1 ml/100 g (i.p.).
- Pentabiótico (Fort Dodge): antibiótico de largo espectro usado após o procedimento de ligadura de nervo . Cada frasco-ampola de 1,7, contendo a mistura de benzilpenicilina benzatina (600.000 UI), benzilpenicilina procaína (300.000 UI), benzilpenicilina potássica (300.000 UI), sulfato de diidroestreptomicina (250 mg) e sulfato de estreptomicina (250 mg). O

pentabiótico foi diluído em 3 mL de água destilada estéril e administrado um volume de 0,2 mL por via intramuscular (i.m.).

- (±)-Hidrocloridrato de epibatidina: agonista colinérgicos para receptores nicotínicos neuronais. A epibatidina foi mantida em solução estoque a -20°C em uma concentração de 1 mg/mL. Imediatamente antes das injeções, essa droga foi descongelada e, quando necessário, diluídas em salina, de forma a serem obtidas as concentrações adequadas para cada protocolo experimental.
- Sulfato de atropina (Sigma): antagonista colinérgico muscarínico. Dissolvido em salina estéril e microinjetado na dose de 100 ng/0,3 µL.
- Hidrocloridrato de mecamilamina (RBI): antagonista seletivo para receptores colinérgicos nicotínicos. Dissolvido em salina estéril e microinjetado na dose de 1 µg/0,3 µL (CUCCHIARO et al., 2005).

3.9 Protocolo experimental

3.9.1 Alodinia mecânica induzida por ligadura de nervos L5 e L6

Para realização deste experimento, os animais foram primeiramente testados com von Frey eletrônico para obtenção dos limiares basais de retirada da pata a estimulação mecânica nas patas ipsi e contralateral (tempo zero) e em seguida submetidos à cirurgia de ligadura de nervo ou cirurgia “sham”. Após a cirurgia, os animais foram novamente testados com o von Frey no 2º, 7º, 14º, 21º e 28º dias após a cirurgia (FIGURA 6).



FIGURA 6 – Representação esquemática do experimento 1.

3.9.2 Efeito a administração sistêmica de epibatidina sobre o teste do rota-rod

Com o objetivo de avaliar se a epibatidina promoveu incoordenação motora nos animais por sedação e/ou relaxamento muscular usou-se o teste do rota-rod. Os animais foram treinados no dia anterior ao teste, sendo colocados na haste girante por no máximo 120 segundo a uma velocidade de 10 rpm. No dia do teste, o limiar basal foi obtido e após três horas os animais foram tratados com salina ou epibatidina (3 ou 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) e testados 1 hora após o tratamento (FIGURA 7).

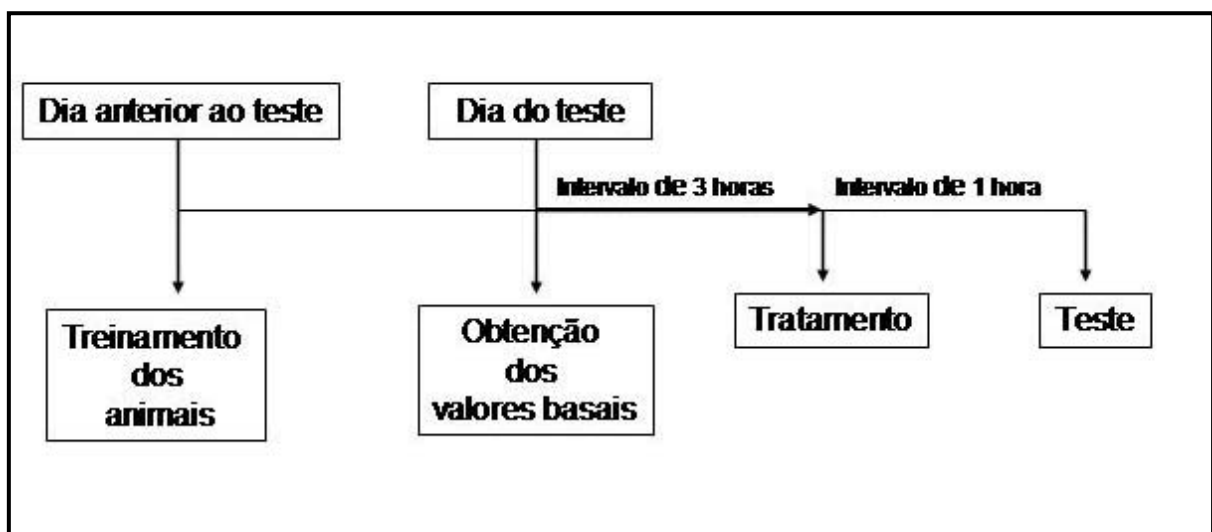


FIGURA 7 – Representação esquemática da seqüência temporal do teste do rota-rod.

3.9.3 Efeito da injeção sistêmica de epibatidina sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos

As etapas seguidas neste rotocolo estão representadas esquematicamente na Figura 8:

- Os animais foram submetidos ao teste de Von Frey, para determinação do limiar de retirada das patas ipsi e contralateral ao estímulo mecânico antes de qualquer procedimento, sendo este valor considerado como valor basal no presente teste (**Basal 1**).
- Após a determinação do limiar basal, realizou-se ligadura de nervo ou falsa ligadura (sham). A distribuição dos animais foi feita aleatoriamente de forma que o valor basal dos diferentes grupos fosse semelhante.
- Após a ligadura ou falsa ligadura (sham), os animais foram mantidos no biotério do departamento, até o último dia do experimento, sendo levados para a sala de teste algumas horas antes do experimento para ambientação. No segundo dia após a cirurgia, realizou-se avaliação visual para observar se a ligadura causou alteração motora nos animais. Em caso positivo, o animal foi eliminado do experimento. Observou-se o caminhar dos animais e foi feito teste de reflexos da pata, importantes na determinação da função motora. Esta avaliação foi qualitativa e baseada no comportamento do animal. Os animais cuja função motora não estivesse alterada foram submetidos ao teste de Von Frey.
- O teste de Von Frey foi realizado no segundo dia após a cirurgia de ligadura para verificar o sucesso da cirurgia de ligadura na indução de alodinia mecânica (**Basal 2**).
- No décimo dia após a ligadura de nervo avaliou-se o efeito da administração sistêmica de epibatidina sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura dos ramos

L5 e L6. Para tal procedimento, os animais foram testados previamente, sem a administração de nenhuma droga, para verificar o limiar nociceptivo no décimo dia da ligadura (**Basal 3**). O limiar nociceptivo, em todos os testes, foi avaliado nas patas ipsi e contralateral dos animais ligados e sham.

- Após o teste Basal do 10º dia, ou seja, avaliação do limiar nociceptivo após todos os procedimentos pelo qual o animal foi submetido, injetou-se epibatidina (3 µg/kg; i.p.) ou salina e realizou-se o teste de Von Frey 5, 30, 60, 120 e 180 min após a injeção.

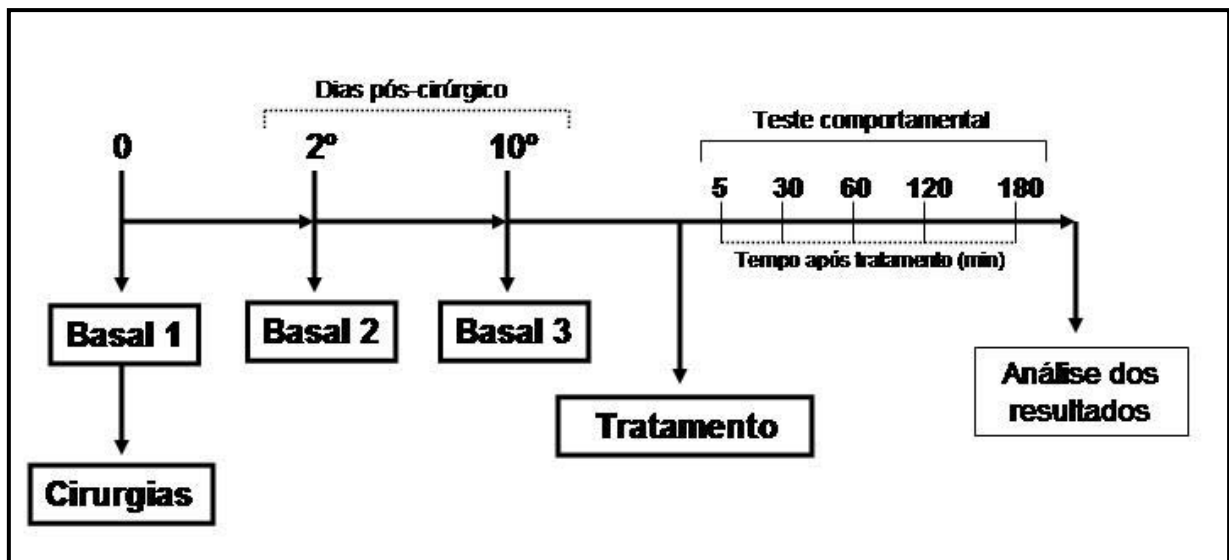


FIGURA 8 – Representação esquemática da seqüência temporal do experimento 3. O tratamento representa injeção sistêmica de epibatidina ou salina.

3.9.4 Efeito da microinjeção intracerebral de epibatidina sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos

Avaliou-se o efeito na microinjeção de epibatidina na SCPvl e no NPtA. Para tal, seguiu-se o procedimento descrito no protocolo 3.9.2, acrescentando-se as seguintes etapas:

- No terceiro dia após a cirurgia de ligadura de nervo, realizou-se implante da cânula-guia na área a ser estudada. Em seguida, os animais foram mantidos no biotério por sete dias, ou seja, até o décimo dia após a ligadura de nervo.
- Após o teste Basal do 10º dia (Basal 3), ou seja, avaliação do limiar nociceptivo após todos os procedimentos pelo qual o animal foi submetido, microinjetou-se epibatidina 0,3 µg/0,3 µl ou veículo 0,3 µl e realizou-se o teste de Von Frey 5, 30, 60, 120 e 180 min após a microinjeção.
- Após os experimentos, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (10 mg/kg, i.p.) e 0,30 µl de corante Fast green foi microinjetado na região da microinjeção. Os animais foram sacrificados com hidrato de cloral e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução de NaCl 0,9% seguida de solução tamponada de formaldeído 10%, em volume suficiente para fixar os tecidos. Os encéfalos foram retirados e mantidos em formaldeído 10% por no mínimo dois dias. Após esse período, os encéfalos foram congelados e cortados em criostato em fatias de 100 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâminas de vidro gelatinizadas, secos ao ar e analisadas em relação ao local da microinjeção.
- Somente os animais cuja microinjeção estava localizada na área estudada foram usados para análise (FIGURA 9).

Foram usadas as seguintes coordenadas para implante da cânula-guia no NPtA e SCPvl, respectivamente: antero-posterior= + 3,00 e +1,00 mm, a partir do plano interaural; lateral= +1,7 e -2,5mm a partir da sutura mediana e ventral= -2,5 e -3,1mm a partir da sutura mediana. Para implante na SCPvl o ângulo de entrada da cânula foi +18° da posição vertical.

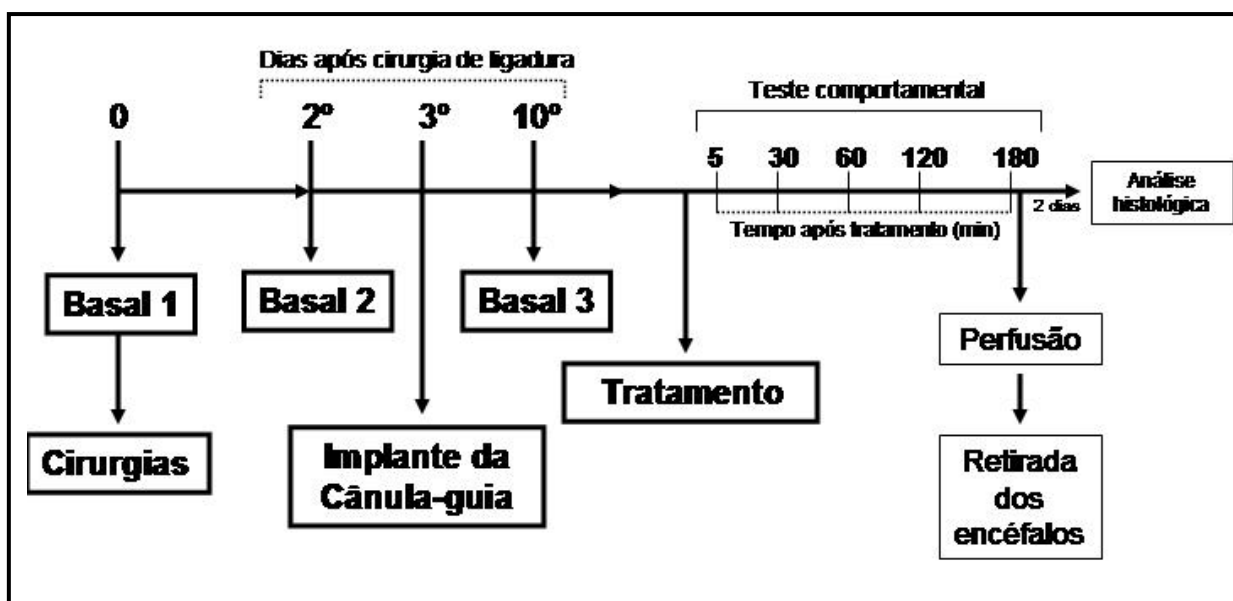


FIGURA 9 – Representação esquemática da seqüência temporal dos experimentos envolvendo microinjeção de epibatidina, salina ou dos antagonistas.

3.9.5 Efeito da microinjeção intracerebral de mecamilamina ou atropina sobre o efeito antialodínico da epibatidina

Os protocolos que envolveram microinjeção dos antagonistas atropina ou mecamilamina, a seqüência temporal foi a mesma citada anteriormente, porém os antagonistas foram microinjetados na SCPvl imediatamente antes da microinjeção de epibatidina ou salina. Para avaliar o efeito da microinjeção da mecamilamina sobre o efeito antialodínico induzido pela injeção sistêmica de epibatidina, a microinjeção de mecamilamina na SCPvl foi realizada 10 minutos antes da injeção sistêmica de epibatidina.

3.10 Análise estatística

Os dados foram analisados pela análise de variância multivariada (MANOVA) com medidas repetidas para comparar os grupos em todos os tempos. Os fatores analisados foram tempo, tratamento e interação tratamento x tempo. Em caso de interação estatisticamente significativa para a interação tratamento x tempo, os dados foram analisados por meio da análise de variância simples (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. Para o teste do rota-rod realizou-se análise de variância simples (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e o nível de significância adotado foi de 5 %.

4 RESULTADOS

4.1 Alodinia mecânica induzida por ligadura dos troncos dos nervos espinais L5 e L6

Inicialmente, padronizou-se o modelo de ligadura de nervo como descrito previamente por Kim; Chung (2005) e o procedimento experimental está representado na Figura 6. A ligadura do tronco dos nervos espinais L5 e L6 reduziu significativamente o limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos (alodinia mecânica) na pata ipsilateral à ligadura. Este efeito já se mostra presente no 2º dia após a cirurgia, mantendo-se constante até pelo menos o 28º dia. Não se observou alodinia mecânica na pata ipsilateral dos animais “sham” operados (FIGURA 10A).

Nenhuma alteração em relação ao limiar de resposta à aplicação de estímulos mecânicos foi observado na pata contralateral a cirurgia tanto dos animais que receberam a ligadura no tronco dos nervos L5 e L6 como nos animais “sham” operados (FIGURA 10B). Embora os dados das patas ipsi e contralateral estejam representados separadamente, os dados foram analisados juntos e foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{3,42}=335,0$; $P<0,0001$), tempo ($F_{5,210}=33,07$; $P<0,0001$) e mostraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{15,210}=24,89$; $P<0,0001$).

Durante todo período pós-cirúrgico, os animais apresentaram sinais indicativos de boa saúde, tais como limpeza da pele, ausência de escaras ou feridas e manutenção do ganho de peso. Porém, a maior parte dos animais submetidos à

cirurgia de ligadura do tronco dos nervos espinais L5 e L6 apresentou grau variado de anormalidade da pata ipsilateral, como ventroflexão, locomoção claudicada e alteração postural. Em geral, estas alterações persistiram por todo o experimento, com recuperação parcial em alguns casos.

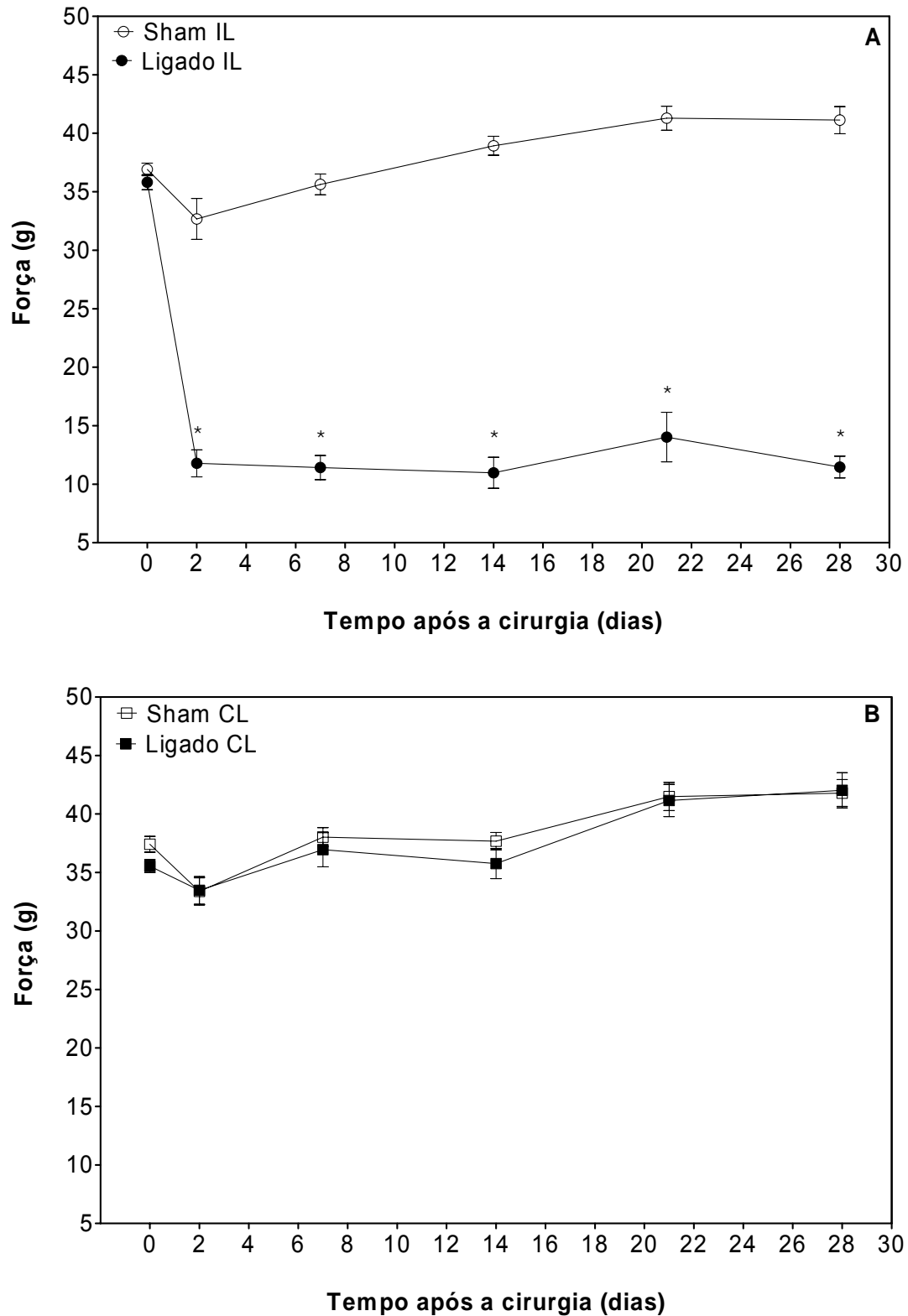


FIGURA 10 – Curso temporal da alodinia mecânica induzida pela ligadura dos nervos L5 e L6. Estão representados alterações de limiar medidos nas patas ipsilaterais (IL) (**A**) e nas patas contralaterais (CL) (**B**). Os pontos representam a média \pm EPM. (*), $P < 0,05$ ($n = 11-12$).

4.2 Efeito da administração sistêmica de epibatidina sobre o teste do rota-rod

Esse teste teve como objetivo verificar se o efeito antinociceptivo induzido pela epibatidina foi causado por um efeito dessa droga sobre a função motora dos animais. Sessenta minutos após a administração de epibatidina (3 ou 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; i.p) ou salina, correspondente ao pico do efeito antialodínico, os animais foram submetidos ao teste do rota-rod. O tempo de corte foi de 120 segundos.

A dose inferior (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; i.p.) não alterou a atividade motora dos animais no presente teste, por outro lado, a dose de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p., causou pequena alteração motora, porém, não significativa, percebida pela diminuição do tempo de permanência dos animais no aparato (FIGURA 11). Dessa forma, é pouco provável que o efeito antinociceptivo observado após administração sistêmica de epibatidina 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; i.p. decorra de efeito dessa droga sobre a atividade motora dos animais.

Embora esteja claro que a Epibatidina nas doses de 3 ou 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, por via sistêmica (i.p.), não altera o desempenho dos animais no teste de Rota-Rod, 1 hora após a sua administração, quando comparado com o grupo que recebeu controle, várias alterações comportamentais são percebidas imediatamente após a administração da droga e esses efeitos duram alguns segundos.

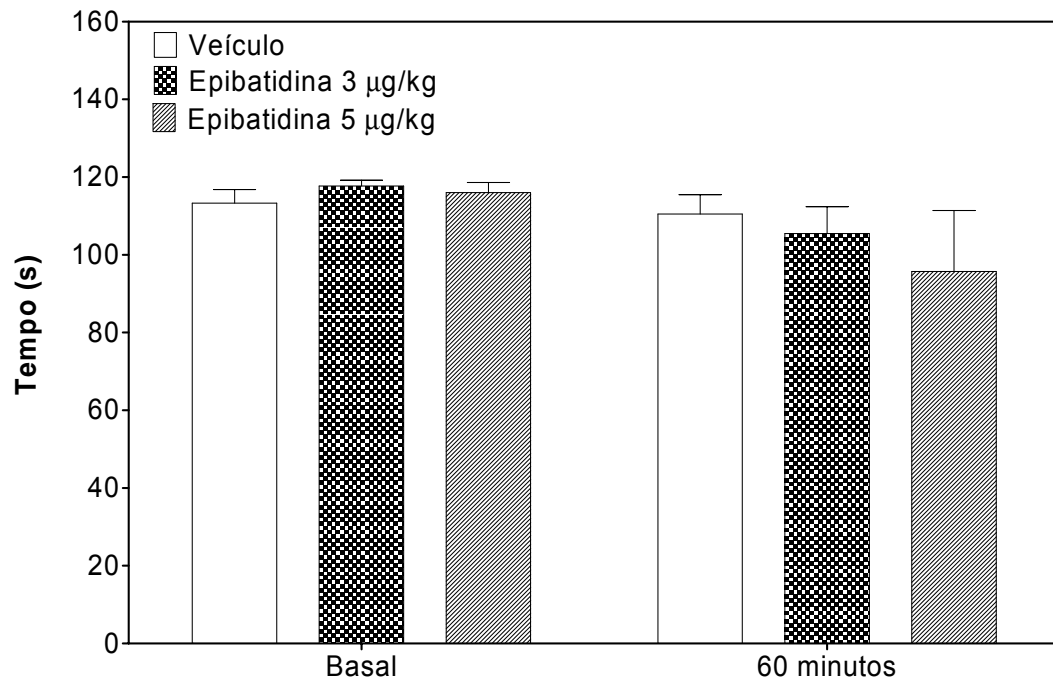


FIGURA 11 – Efeito da administração intraperitoneal de epibatidina 3 ou 5 µg/kg no desempenho dos animais no teste do rota-rod. A droga ou o veículo foi administrada logo após a leitura basal w 60 minutos antes do teste. As barras correspondem a média ± EPM de 06 animais por grupo.

4.3 Efeito da administração sistêmica de epibatidina sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervo

Uma vez demonstrado que a ligadura de nervo induz intensa e demorada alodinia mecânica na pata ipsilateral, mas não na pata contralateral e, além disso, os animais sham operados não tiveram alteração do limiar nociceptivo, avaliou-se o efeito da administração de epibatidina (3 µg/kg; i.p.) dez dias após a cirurgia de ligadura de nervo.

Após medida basal do limiar para estímulo mecânico das patas ipsi e contralateral (Basal 1), os animais foram submetidos à cirurgia de ligadura de nervo. No segundo dia após a cirurgia, os animais foram avaliados em relação à atividade motora, para verificar se a cirurgia não comprometeu a capacidade do animal de responder á estímulos e foram, novamente, submetidos ao teste de von frey com o objetivo de avaliar o sucesso da cirurgia (Basal 2).

No 10º dia após a cirurgia realizou-se o experimento. Antes da administração do agonista nicotínico, os animais foram submetidos ao teste de von frey para avaliar o limiar mecânico das patas ipsi e contralateral dos animais com ligadura, bem como, dos animais sham operados (Basal 3). Posteriormente, os animais receberam injeção de epibatidina (3 µg/kg, i.p.) ou veículo, no volume de 1 mL para cada 100 g de animal. O teste de von frey foi realizado 5, 30, 60, 120 e 180 minutos após a administração da droga ou do veículo.

A epibatidina reduziu de forma parcial, porém significativa, a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervo na pata ipsilateral (FIGURA 12A), porém não alterou o limiar da pata contralateral (FIGURA 12B), bem como, não modificou o limiar das patas ipsi e contralaterais dos animais sham operados. De forma semelhante, o veículo não alterou o limiar de retirada de pata em nenhum grupo. O efeito da epibatidina é rápido, sendo observado já nos primeiros 5 minutos e com pico de ação 60 minutos após a administração.

Embora os dados das patas ipsi e contralateral estejam representados separadamente, os dados das Figuras 12A e 12B foram analisados juntos e foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{7,48}=153,0$; $P<0,0001$), tempo ($F_{7,336}=18,51$; $P<0,0001$) e mostraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{49,336}=19,85$; $P<0,0001$).

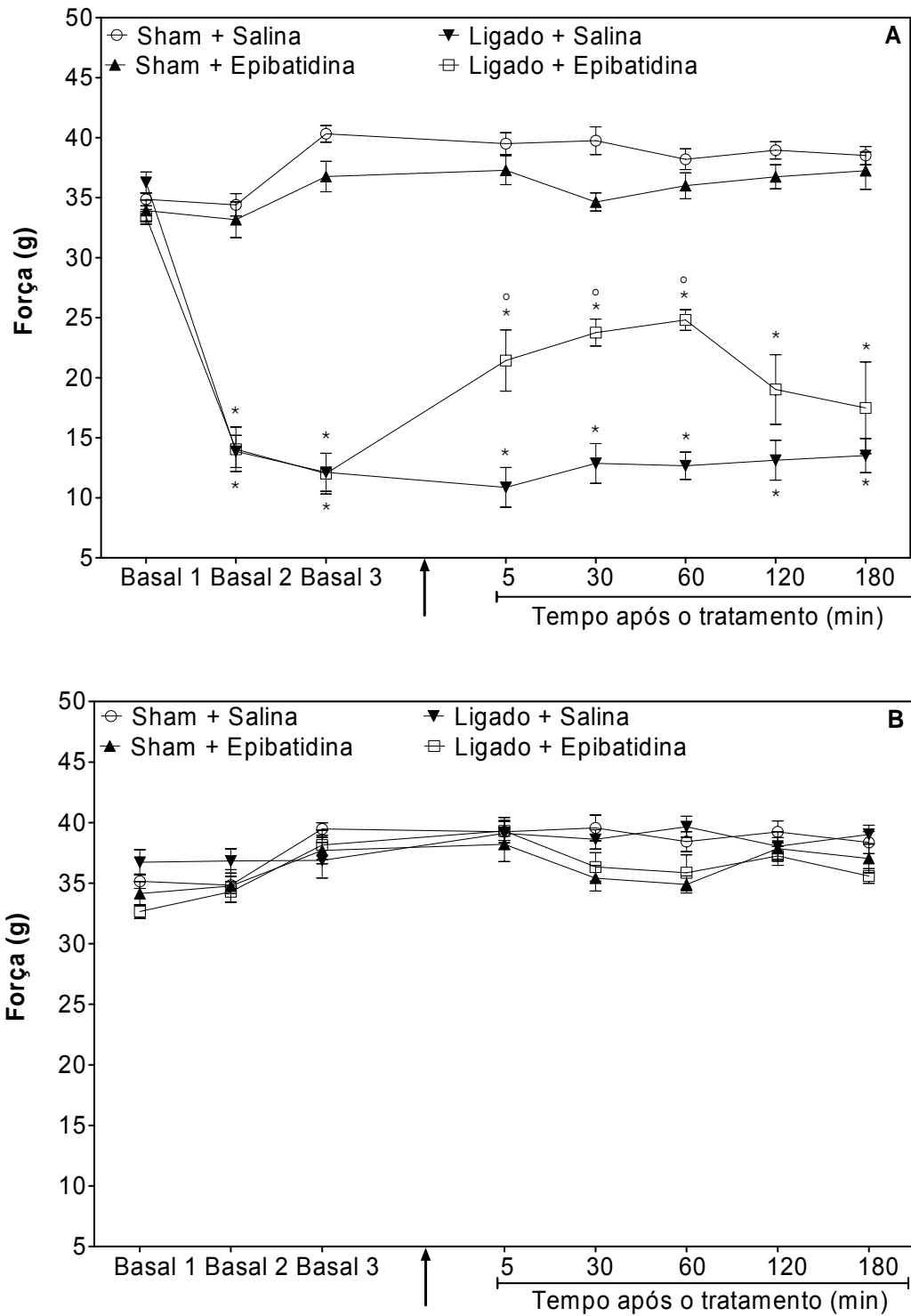


FIGURA 12 – Efeito da administração de epibatidina (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) ou salina (seta) sobre o limiar mecânico medido nas patas ipsi (A) e contralateral (B) no décimo dia após a ligadura de nervo ou da cirurgia sham. Diferença de Sham + Salina ou (°) de Ligado + Sham, $P < 0,05$ ($n = 08-06$).

4.4 Efeito da microinjeção de epibatidina no núcleo pretectal anterior (NPtA) sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos

Primeiramente, investigou-se o efeito da microinjeção de epibatidina no NPtA por ser um núcleo reconhecidamente importante na modulação da resposta dolorosa e ativar vias descendentes inibitórias e facilitatórias.

A microinjeção de epibatidina 0,3 µg/0,3µl ou salina 0,3µl no NPtA não alterou a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervo na pata ipsilateral (FIGURA 13A) nem o limiar de retirada de pata à estimulação mecânica das patas contralateral (Figura 13B), bem como dos animais “sham” operados. Os dados das Figuras 13A e 13B foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{7,42}=842,0$; $P<0,0001$), tempo ($F_{7,294}=42,8$; $P<0,0001$) e mostraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{49,294}=20,5$; $P<0,0001$). Os sítios de injeção de epibatidina ou salina no NPtA estão representados na Figura 14.

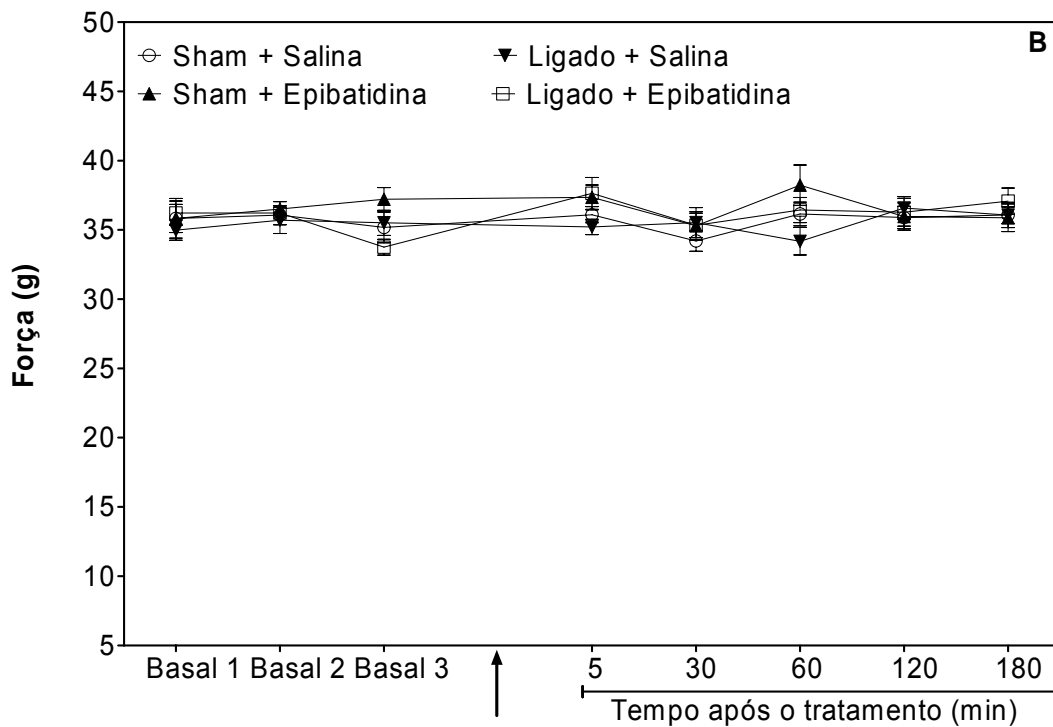
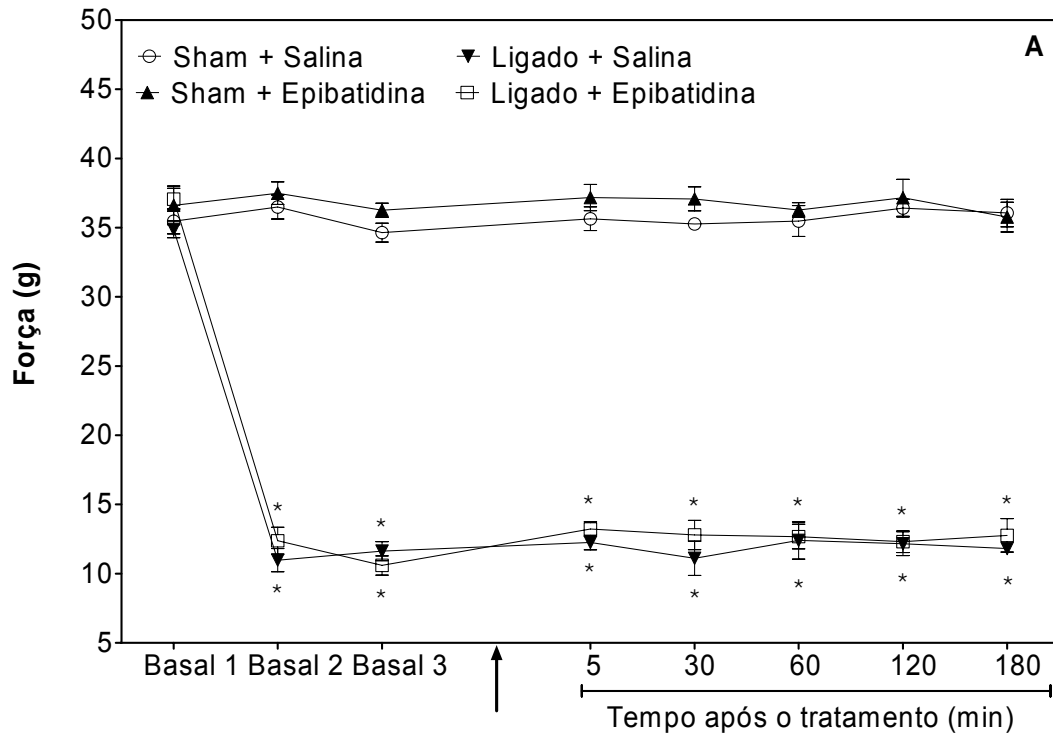


FIGURA 13 – Efeito da microinjeção de epibatidina ($0,3 \mu\text{g}/0,3 \mu\text{L}$) ou salina (seta) no núcleo pretectal anterior (NPTA) sobre o limiar mecânico medido nas patas ipsi (**A**) e contralateral (**B**) no décimo dia após a ligadura de nervo ou da cirurgia sham. (*) diferença de Sham + Salina, $P < 0,05$ ($n = 06-07$).

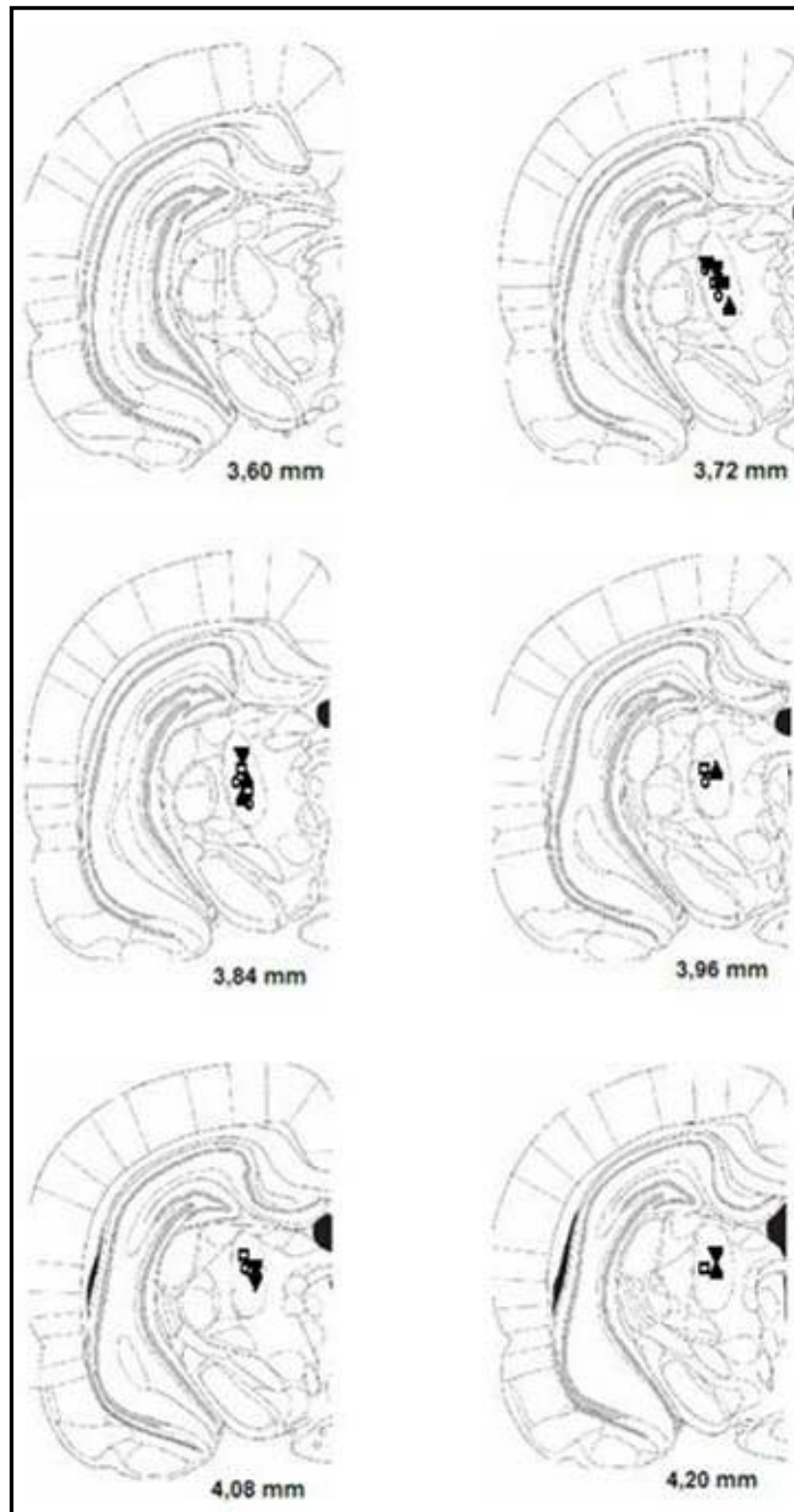


FIGURA 14 – Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção no NPtA com indicação do nível antero-posterior em relação à linha interaural, conforme Paxino; Watson (2005). Cada símbolo corresponde a um animal.

4.5 Efeito da microinjeção de epibatidina no substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (SCPvl) sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos

Investigou-se o efeito da microinjeção de epibatidina na SCPvl, por ser uma região reconhecidamente importante na modulação da resposta dolorosa e por apresentar neurotransmissão colinérgica e com presença de receptores nicotínicos (ADEM et al., 1989; SKOUBIS et al., 2006). A microinjeção de epibatidina 0,3 µg/0,3µl SCPvl reduziu parcialmente a alodinia mecânica observada na pata ipsi no 10º dia após a ligadura (FIGURA 15A), mas não alterou o limiar de retirada de pata à estimulação mecânica na pata contralateral (FIGURA 15B). Nenhum efeito foi observado quando a epibatidina foi administrada nos animais sham. De forma semelhante, a microinjeção do veículo (salina 0,3 µl) não alterou o limiar nociceptivo em nenhuma situação.

A magnitude do efeito antialodínico da epibatidina microinjeta da SCPvl foi semelhante ao observado após a administração do agonista nicotínico por via sistêmica. Os dados das Figuras 15A e 15B foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{7,46}=343,6$; $p<0,0001$), tempo ($F_{7,322}=34,26$; $p<0,0001$) e mostraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{49,322}=25,23$; $p<0,0001$). Os sítios de injeção de epibatidina ou salina na SCPvl estão representados na Figura 16.

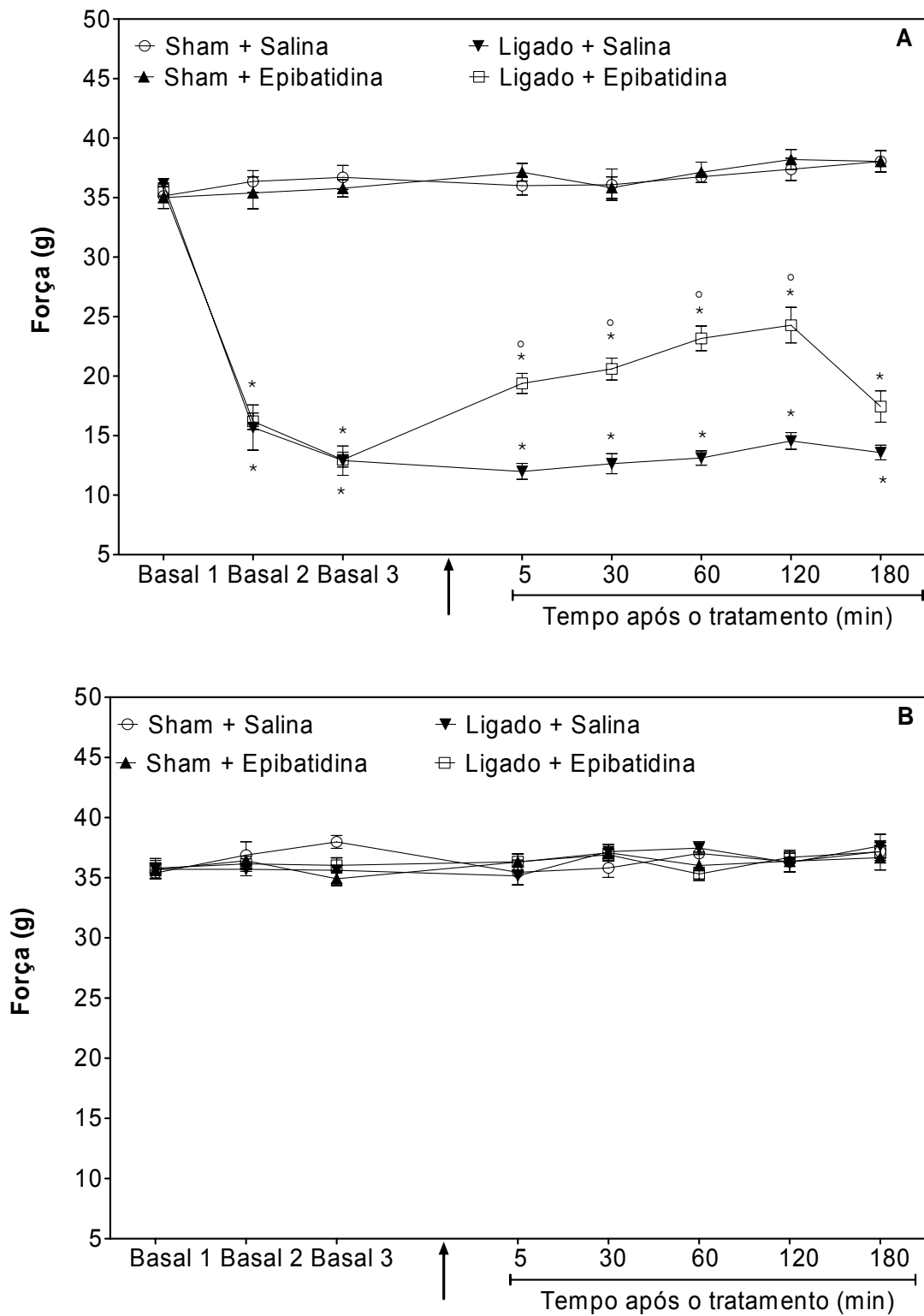


FIGURA 15 – Efeito da microinjeção de epibatidina ($0,3 \mu\text{g}/0,3 \mu\text{L}$) ou salina (seta) na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral sobre o limiar mecânico nas patas ipsi (**A**) e contralaterais (**B**) no décimo dia após a ligadura de nervo ou da cirurgia sham. (*) diferença de Sham + Salina e (°) diferença de Ligado + Salina, $P < 0,05$ ($n=06-08$).

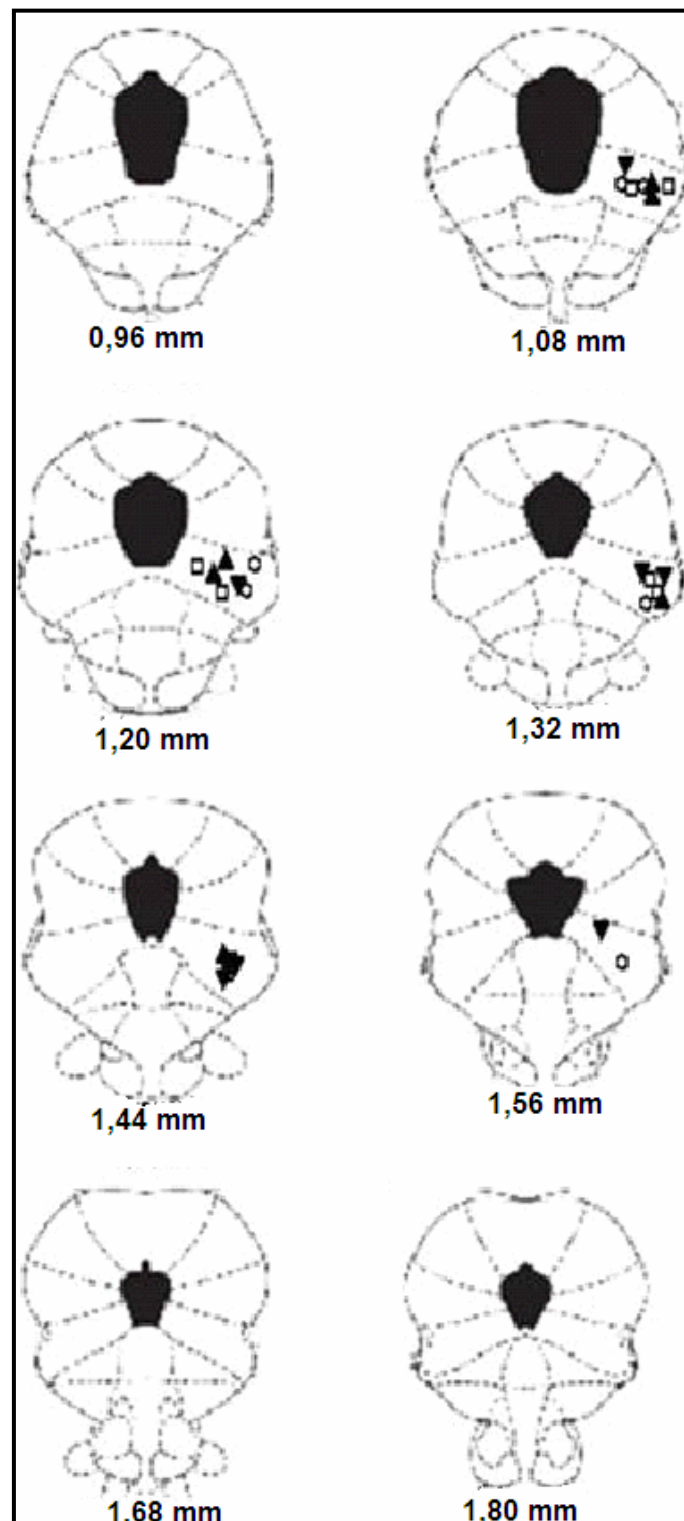


FIGURA 16 – Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção na SCPvl com indicação do nível antero-posterior em relação à linha interaural, conforme Paxino; Watson (2005). Cada símbolo corresponde a um animal.

4.6 Efeito da microinjeção de atropina ou mecamilamina na SCPvl sobre o efeito antialodínico da microinjeção de epibatidina na mesma região

A administração sistêmica de epibatidina (3 µg/kg; i.p.) causa efeito antialodínico no décimo dia após a ligadura dos ramos dos nervos L5 e L6, porém quando microinjetada no NPtA (0,3 µg/0,3 µL) esse efeito não é observado. No entanto, quando a microinjeção da epibatidina é realizada na SCPvl, observa-se efeito antialodínico semelhante ao obtido após administração sistêmica. Em nenhum dos casos observa-se alteração no limiar de retirada da pata à estimulação mecânica nos animais “sham” operados, dessa forma, os protocolos seguintes foram realizados apenas em ratos com ligadura de nervos.

Para investigar o tipo de receptor colinérgico envolvido no efeito antialodínico da microinjeção da epibatidina na SCPvl, microinjetou-se nessa região antagonista seletivo para receptores muscarínicos, (atropina 100 ng/0,3 µL), ou antagonista seletivo para receptores nicotínicos, (mecamilamina 1 µg/0,3 µL), imediatamente antes da microinjeção de epibatidina. A microinjeção de atropina não alterou o efeito antialodínico da epibatidina na pata ipsilateral, embora uma pequena redução, estatisticamente significativa, tenha sido observada 5 minutos após sua microinjeção (FIGURA 17A). Nenhum efeito foi observado na pata contralateral (FIGURA 17B).

Os dados das Figuras 17A e 17B foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{7,58}=1340,19$; $p<0,0001$), tempo ($F_{7,406}=181,5$; $p<0,0001$) e mostraram significativa

interação tratamento x tempo ($F_{49,409}=35,22$; $p<0,0001$). Os sítios de injeção de epibatidina, atropina ou salina na SCPvl estão representados na Figuras 18.

Por outro lado, a microinjeção de mecamilamina na SCPvl aboliu o efeito antialodínico na pata ipsilateral observado após a microinjeção de epibatidina nessa mesma região (FIGURA 19A) sem alterar o limiar de retirada da pata contralateral à estimulação mecânica (FIGURA 19B). Os dados das Figuras 19A e 19B foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{7,52}=948,1$; $p<0,0001$), tempo ($F_{7,364}=155,6$; $p<0,0001$) e mostraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{49,364}=31,58$; $p<0,0001$). Os sítios de injeção de epibatidina, mecamilamina ou salina na SCPvl estão representados na Figuras 20.

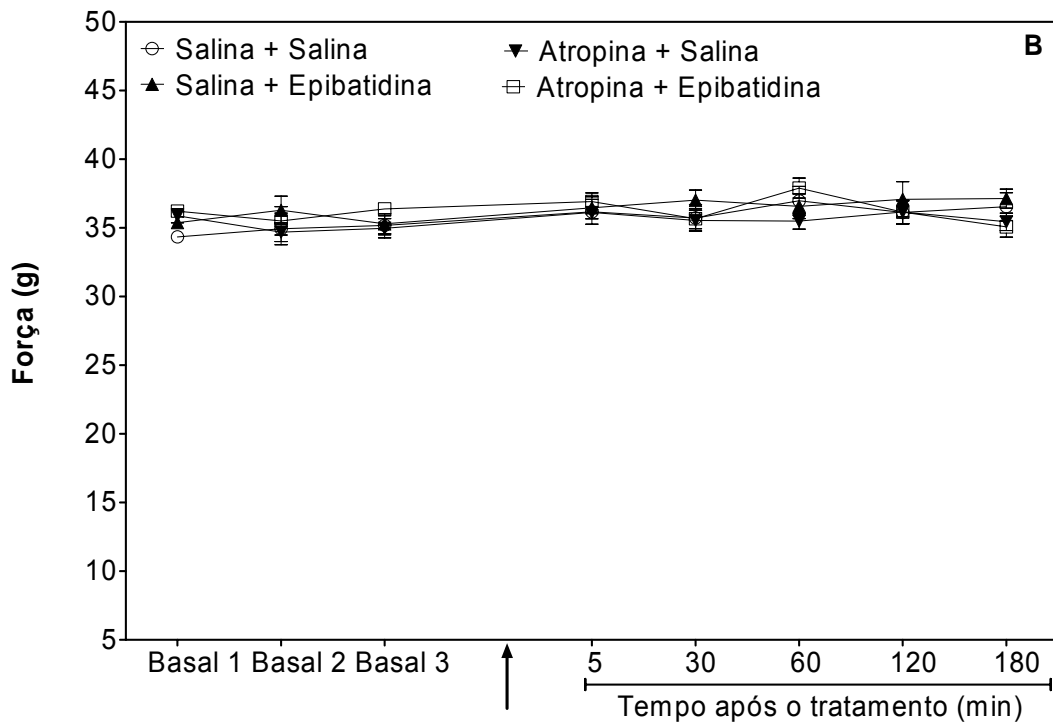
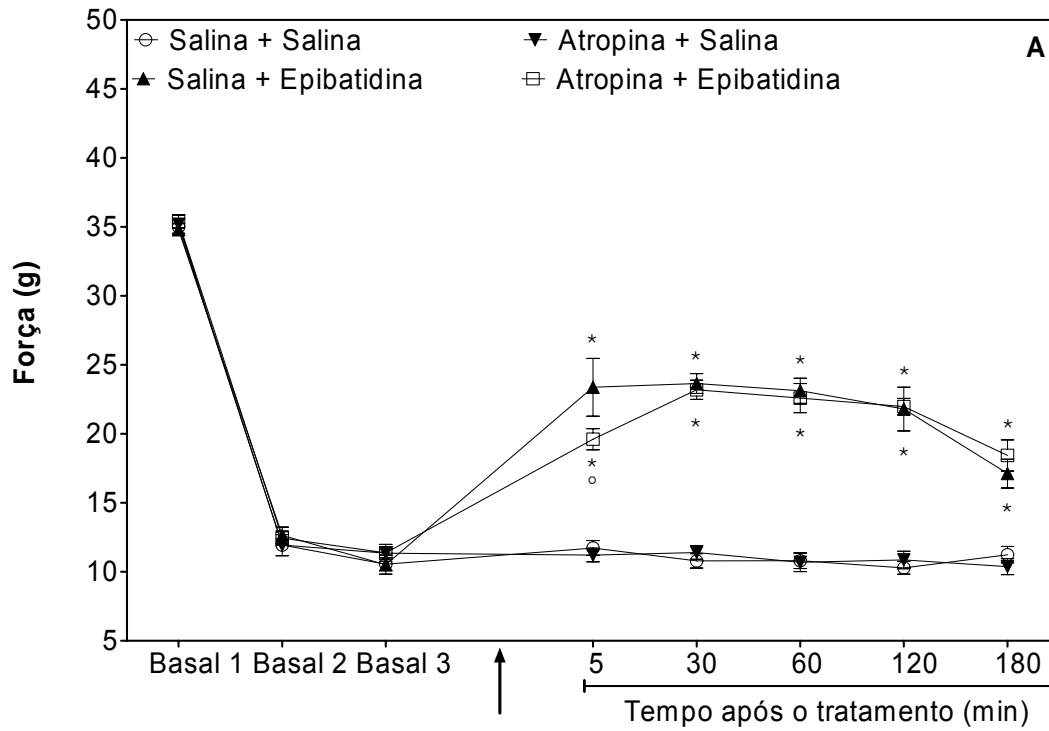


FIGURA 17 – Efeito da microinjeção de atropina (100 ng/0,3 μ L) ou salina (seta) na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral sobre o efeito antialodínico induzido pela microinjeção de epibatidina nesse mesmo núcleo nas patas ipsi (**A**) e contralateral (**B**). (*) diferença de Salina + Salina e (°) diferença de Salina + Epibatidina, $P < 0,05$ (n=08-09).

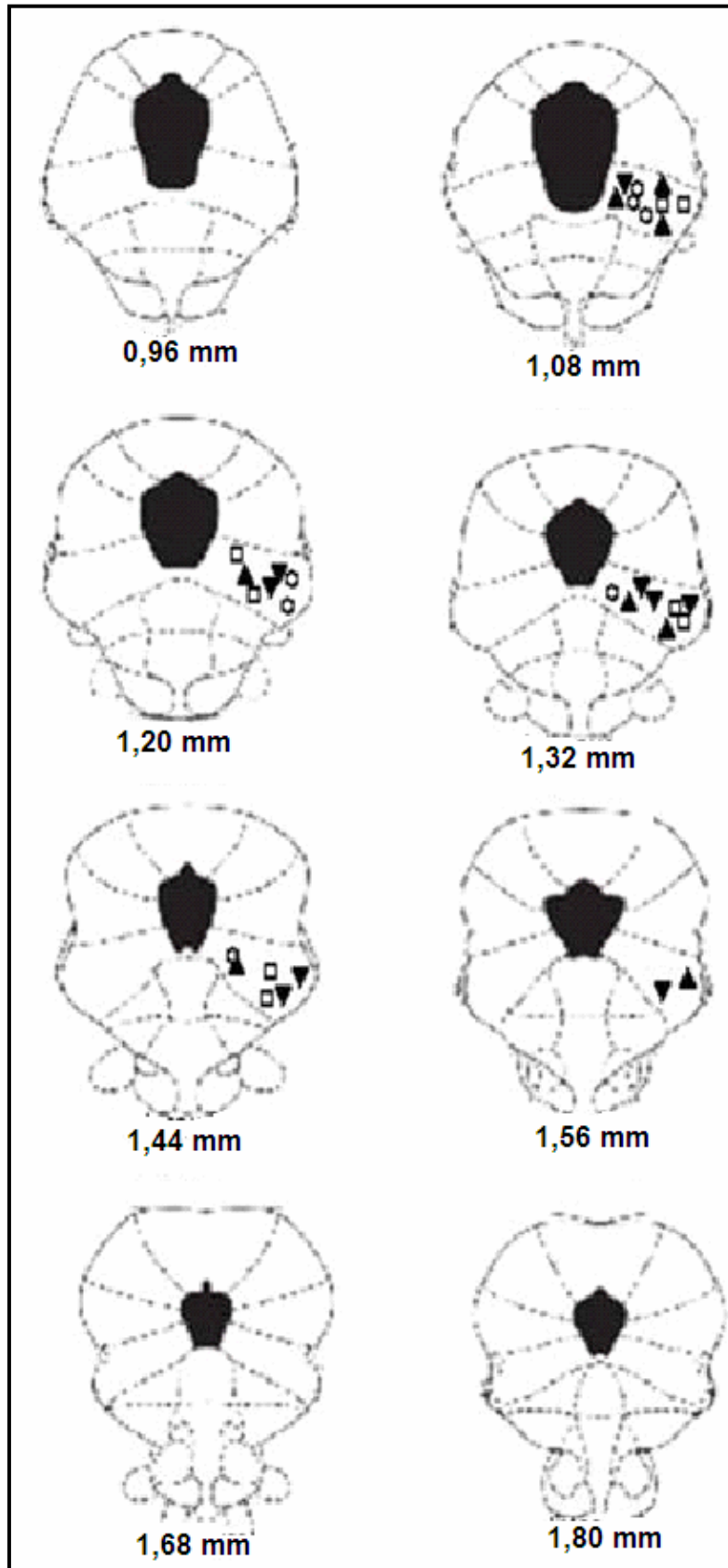


FIGURA 18 – Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção na SCPvl com indicação do nível antero-posterior em relação à linha interaural, conforme Paxino; Watson (2005). Cada símbolo corresponde a um animal.

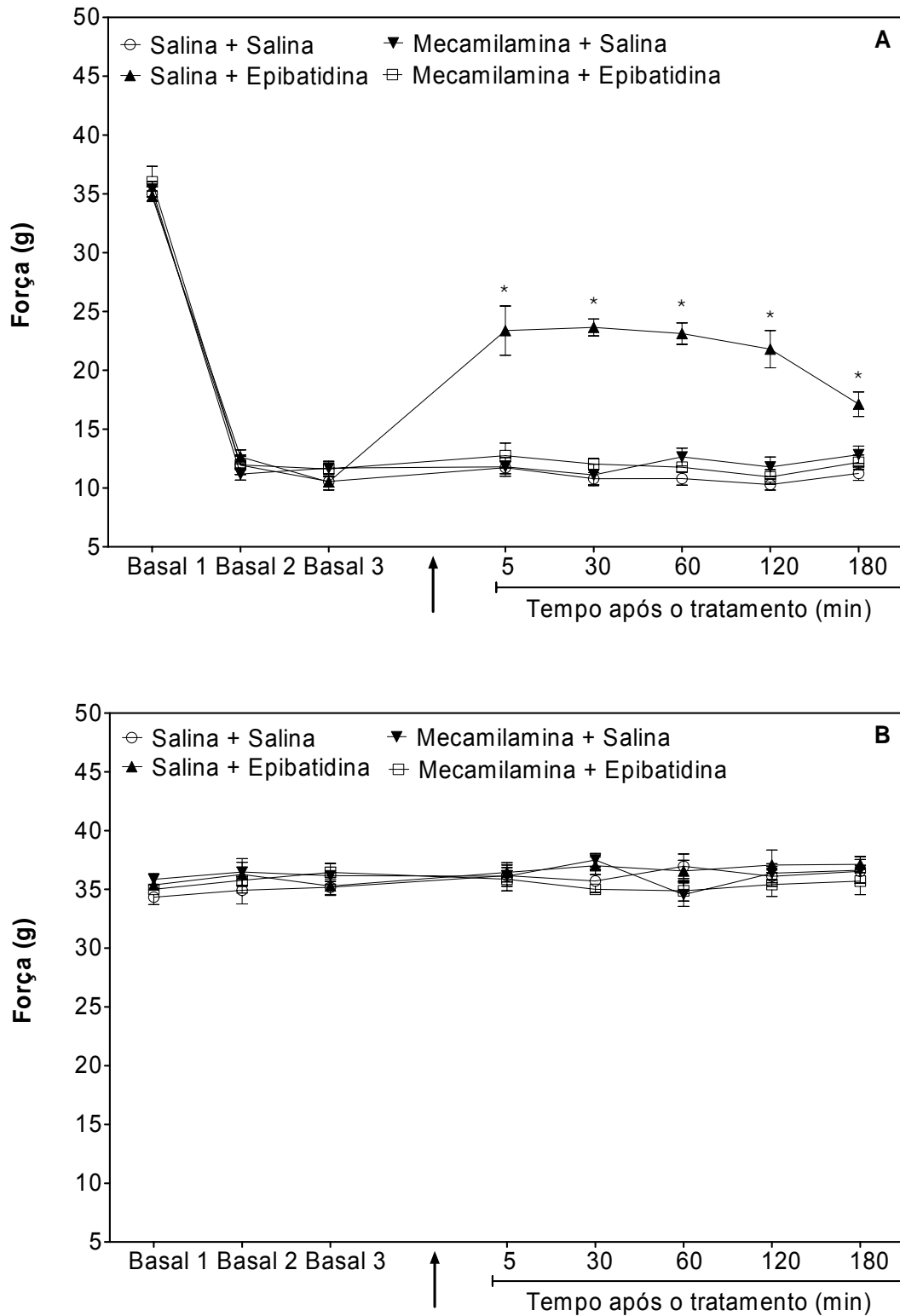


FIGURA 19 – Efeito da microinjeção de mecamilamina ($1 \mu\text{g}/0,3 \mu\text{L}$) ou salina (seta) na substância cinzenta periaquedutal ventro lateral sobre o efeito antialodínico induzido pela microinjeção de epibatidina nesse mesmo núcleo nas patas ipsi (**A**) e contralateral (**B**). (*) diferença de Salina + Salina, $P < 0,05$ ($n=08-09$).

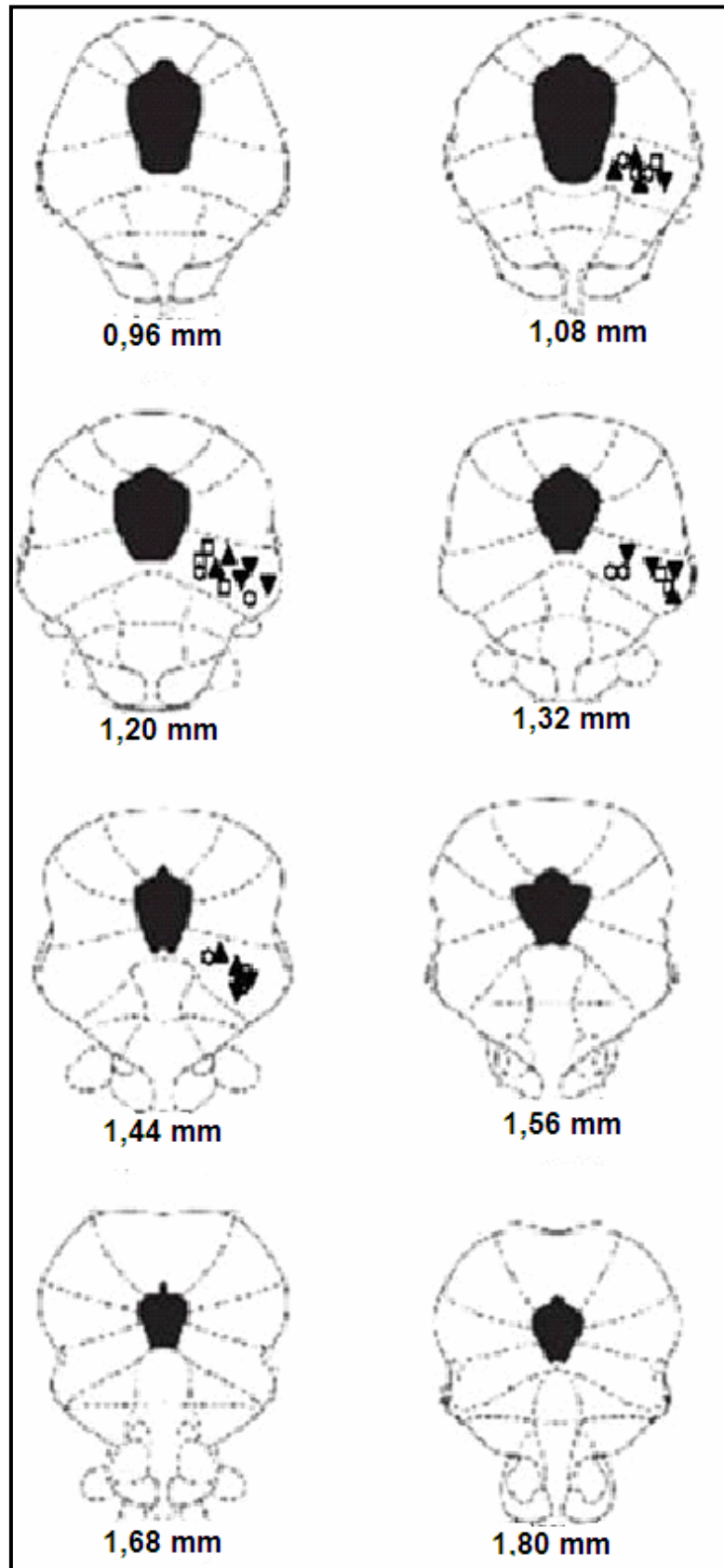


FIGURA 20 – Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção na PAGvl com indicação do nível antero-posterior em relação à linha interaural, conforme Paxino; Watson (2005). Cada símbolo corresponde a um animal.

4.7 Efeito da microinjeção de mecamilamina na SCPvl sobre o efeito antialodínico induzido pela injeção sistêmica da epibatidina

A microinjeção de epibatidina na SCPvl, no décimo dia após a ligadura de nervo, promoveu efeito antialodínico parcial nas patas ipsilateral. Esse efeito foi semelhante ao observado após a injeção sistêmica desse mesmo agonista nicotínico e, além disso, o efeito antialodínico observado após a microinjeção nesse núcleo foi abolido pela microinjeção de mecamilamina e não de atropina nesse mesmo núcleo

Dessa forma, avaliou-se o efeito da microinjeção de mecamilamina (1 µg/0,3 µL) na SCPvl sobre a resposta antialodínica induzida pela administração sistêmica de epibatidina (3 µg/kg; i.p.). A mecamilamina previamente administrada na SCPvl aboliu o efeito antialodínico induzido pela injeção sistêmica de epibatidina na pata ipsilateral (FIGURA 21A), mas não alterou o limiar de retirada da pata à estimulação mecânica na pata contralateral (FIGURA 21 B).

Os dados das Figuras 21A e 21B foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{7,32}=264,6$; $p<0,0001$), tempo ($F_{7,224}=97,98$; $p<0,0001$) e mostraram significativa interação tratamento x tempo ($F_{49,224}=21,59$; $p<0,0001$). Os sítios de injeção de mecamilamina ou salina na SCPvl estão representados na Figura 22.

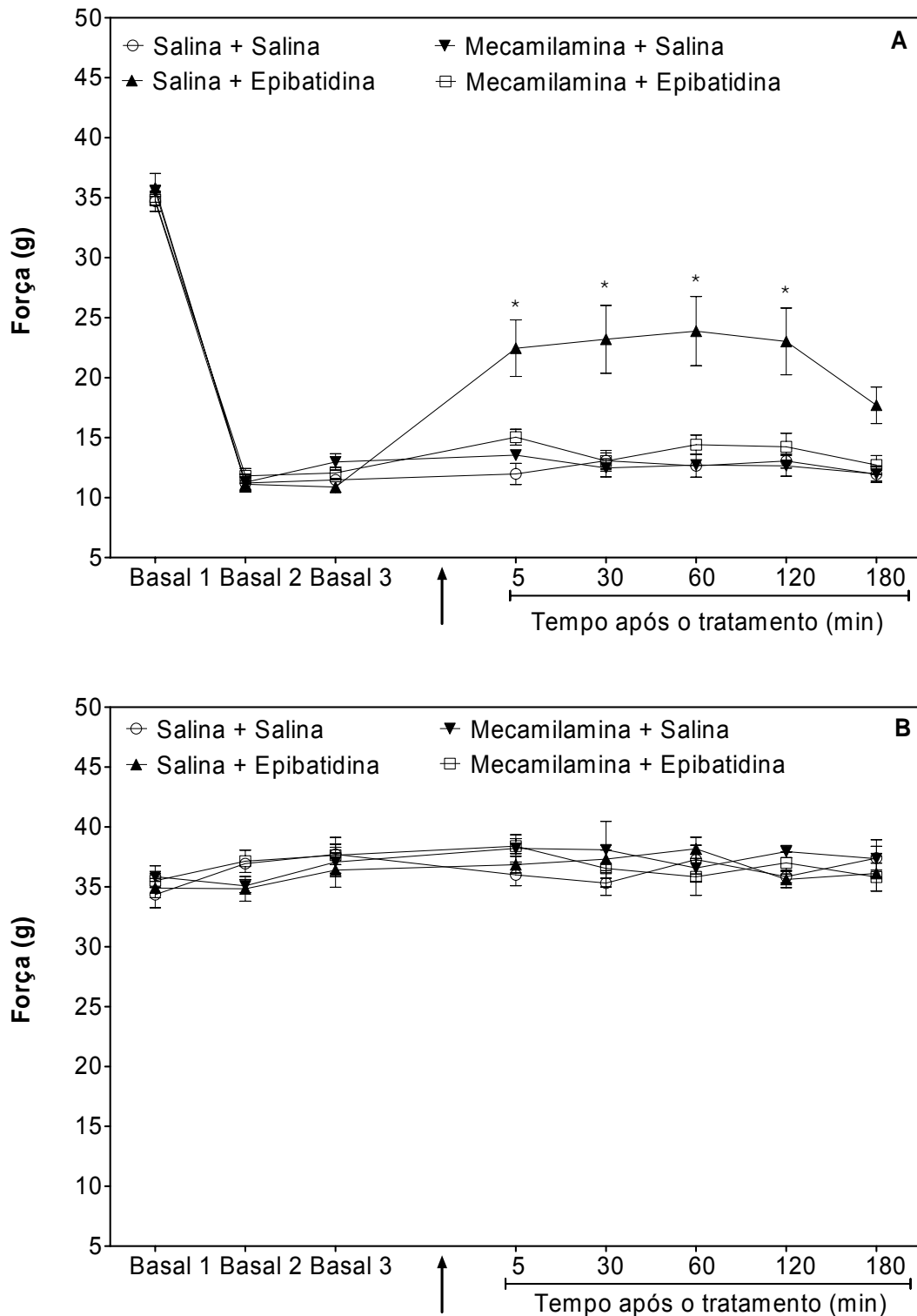


FIGURA 21 – Efeito da microinjeção de mecamilamina (1,0 $\mu\text{g}/0,3 \mu\text{L}$) ou salina (seta) na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral sobre o efeito antialodínico induzido pela injeção sistêmica de epibatidina (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; i.p.) nas patas ipsi (**A**) e contralateral (**B**). (*) diferença de Salina + Salina, $P < 0,05$ ($n=05$).

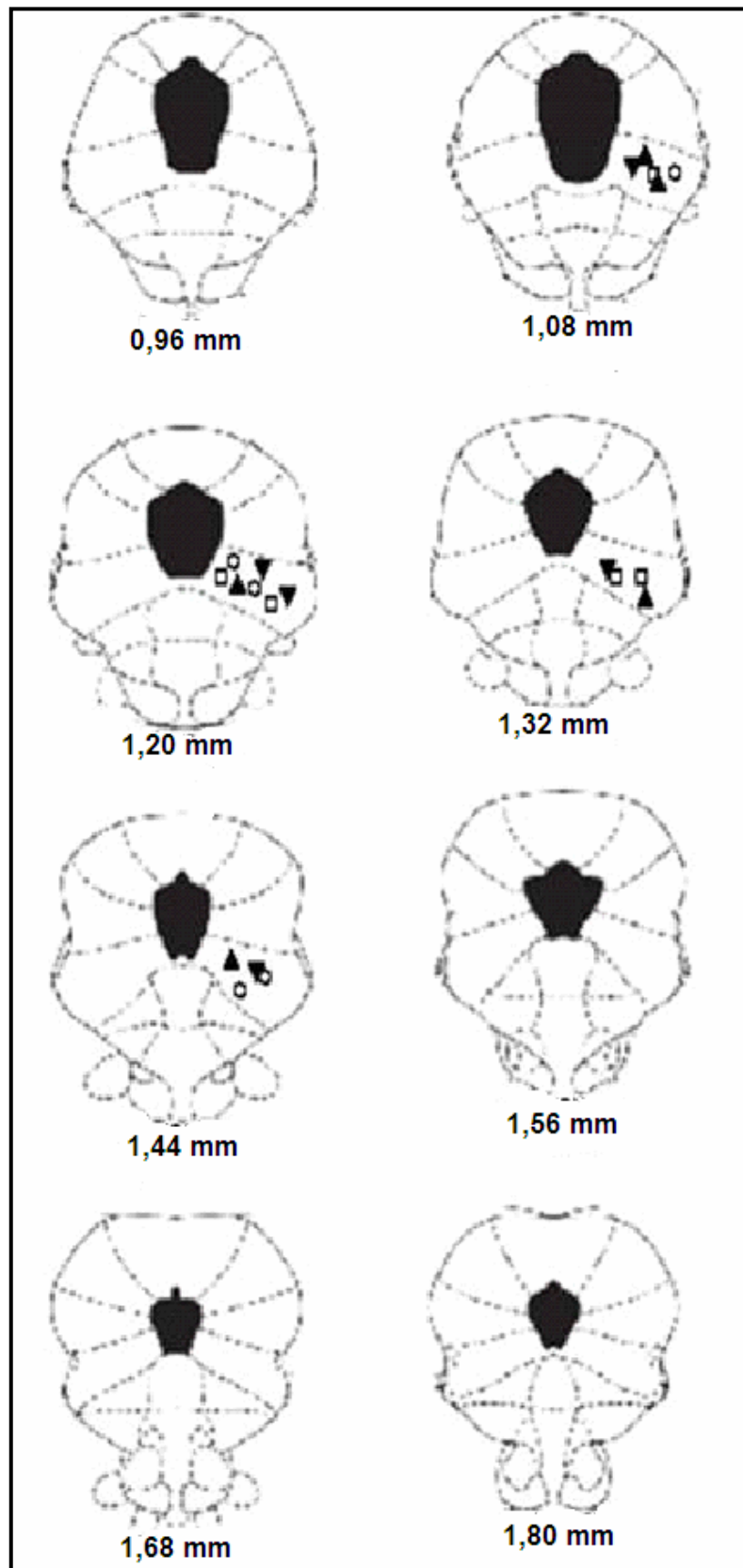


FIGURA 22 – Secções coronais mostrando a localização do sítio de injeção ns SCPvl com indicação do nível antero-posterior em relação à linha interaural, conforme Paxino; Watson (2005). Cada símbolo corresponde a um animal.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a injeção sistêmica, bem como a microinjeção na SCPvl, de epibatidina, um agonista de receptores nicotínicos neuronais, reduz parcialmente a alodinia mecânica induzida por ligadura de nervos em ratos. Além disso, é possível observar que a mecamilamina, antagonista nicotínico, mas não atropina, antagonista muscarínico, quando administrada na SCPvl abole o efeito antialodínico observado tanto após a administração sistêmica como após a microinjeção de epibatidina no mesmo núcleo.

As primeiras observações sobre o possível efeito analgésico da nicotina aconteceram antes de 1932 (DAVIS et al, 1932, citado por ARNERIC et al., 2007). No entanto, só com a descoberta da epibatidina, uma neurotoxina obtida da pele de *Epiplatys tricolor* (SPANDE et al., 1992), que foi possível a identificação de uma fração da neurotoxina capaz de produzir efeito de Straub na cauda de camundongos, efeito característico de alguns opióides. Na década de 90, com o avanço de técnicas de espectrofotometria, foi possível a identificação da substância ativa, a epibatidina, que passou a ser sintetizada industrialmente e seu efeito analgésico foi melhor observado. Tal efeito analgésico mostrou-se 80 vezes mais potente do que o causado pela morfina, sem ser bloqueado pela naloxona (QIAN et al., 1993; SULLIVAN et al., 1994). Em adição, a analgesia induzida pela epibatidina é atenuada pelo pré-tratamento com mecamilamina, mas não com hexametônio, sugerindo um mecanismo de ação nicotínico central.

Além do efeito analgésico, a epibatidina, assim como a nicotina e outros agonistas nicotínicos neuronais, reduz a atividade motora e a temperatura corporal em doses menores do que as necessárias para causar analgesia (DECKER et al., 1994; SULLIVAN et al., 1994). Conseqüentemente, os efeitos da epibatidina sobre a atividade motora e/ou temperatura podem contribuir para o aparente efeito antinociceptivo observado em modelos experimentais. Por exemplo, no teste da placa quente, o animal é colocado em uma superfície aquecida e o tempo necessário para manifestar uma resposta, como pular ou lambear as patas posteriores, é medido. Se um composto como a epibatidina diminui a atividade motora, o aumento no tempo de permanência do animal na placa quente pode ser erroneamente interpretado como um efeito antinociceptivo. De forma semelhante, é plausível que um composto que diminua a temperatura corporal possa causar uma redução da sensibilidade ao calor, produzindo aumento no tempo de permanência do animal na superfície aquecida, influenciando assim, o efeito antinociceptivo observados em modelos semelhantes (BANNON et al., 1995).

Tais fatores foram decisivos para a escolha do teste usado para avaliar o efeito antinociceptivo da epibatidina no presente estudo. Para evitar possíveis interferências em relação à temperatura corporal, optou-se por um teste mecânico, assim, em todos os experimentos no qual se avaliou o efeito antinociceptivo da epibatidina, mediu-se o limiar nociceptivo a estímulos mecânicos com o von Frey eletrônico. Para indução de alodinia mecânica, usou-se o modelo de ligadura de nervo descrito por Kim; Chung (1992), que mimetiza uma condição dolorosa de difícil tratamento em humanos.

Observou-se que a ligadura dos ramos L5 e L6 dos nervos espinais causou alodinia mecânica na pata ipsilateral ao lado ligado. Além disso, a alodinia mecânica aferida pelo teste de von Frey foi observada a partir do segundo dia após a cirurgia de ligadura e se estendeu até pelo menos o 28º dia, corroborando com os experimentos de Kim; Chung (1992) que observaram aumento de resposta à estimulação mecânica com filamentos de von Frey a partir do primeiro dia após a ligadura, estendendo-se por cerca de dez semanas.

Após a padronização de um teste nociceptivo que não fosse influenciado pela possível diminuição da temperatura corporal causada pela epibatidina, foi importante assegurar que a dose usada no presente estudo não causasse alterações motoras. Para tal, optou-se pela realização do teste do rota-rod antes da escolha da dose para o teste antinociceptivo. As doses de 3 ou 5 µg/kg (i.p.) não causaram diminuição estatisticamente significativa no tempo de permanência dos animais no aparelho, em ensaio realizado 60 minutos após a administração. Uma vez que doses inferiores a 5 µg/kg, por via sistêmica, causaram efeito antinociceptivo em diferentes estudos (CUCCHIARO et al., 2005; CHUCCIARO et al., 2006; GILBERT et al., 2001; RAO et al., 1996) e que a dose de 3 µg/kg (i.p.) não alterou o tempo de permanência dos animais no rota-rod, essa dose foi testada em relação ao seu efeito antinociceptivo no modelo escolhido para o presente estudo.

De fato, epibatidina (3,0 µg/kg; i.p.) reduziu de forma parcial, porém estatisticamente significativa, a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervos em ratos, na pata ipsilateral ao lado ligado. Estudos recentes demonstram que agonistas nicotínicos tem efeito antinociceptivo em diferentes modelos experimentais e, que em alguns

casos, as doses necessárias para causar efeito antinociceptivo também causa disfunção motora. Kesingland et al. (2000) realizaram um estudo no qual se comparou o efeito antinociceptivo da epibatidina com o do ABT-594 ((R)-5-(2-azetidinilmetoxi)-2-cloropiridina), um derivado da epibatidina com similar afinidade pelos receptores nicotínicos, em três diferentes modelos. Os autores observaram que tanto a epibatidina, como o ABT-594, exibiram efeito antinociceptivo no teste de retirada de cauda, reduziram a hiperalgesia mecânica no modelo de dor neuropática, como descrito por Seltzer et al. (1990), e no modelo de inflamação induzido pelo adjuvante completo de Freund. No entanto, quando as mesmas doses capazes de produzir efeito antinociceptivos em tais modelos foram testadas no rota-rod, houve comprometimento motor.

No presente estudo a dose de 3,0 µg/kg não alterou o tempo de permanência dos animais no teste do rota-rod, mas causou efeito antialodínico na pata ipsilateral à lesão, porém não na pata contralateral. Esses resultados, quando analisados em conjunto, nos permitem afirmar que a epibatidina injetada por via sistêmica induziu efeito antialodínico em animais submetidos à ligadura dos ramos L5 e L6 dos nervos espinais, e que esse efeito, no presente estudo, não pode ser diretamente associado a alterações motoras ou alterações da temperatura corporal do animal.

Vários estudos demonstraram que agonistas nicotínicos causam efeito antinociceptivo após administração sistêmica (ACETO et al., 1986; CUCCHIARO et al., 2005; CUCCHIARO et al. 2006; DAMAJ et al., 1998; ROGERS; IWAMOTO, 1993; SAHLEY; BERNSTON, 1979; TRIPATHI et al., 1982), intracerebroventricular (ACETO et al., 1986; IWAMAMOTO, 1989; MOLINERO; DEL RIO, 1987, PHAN et

al., 1973, RAO et al.; 1996; SAHLEY; BERNTSON, 1979) e espinal (ACETO et al., 1986; CHRISTENSEN; SMITH, 1990; DAMAJ et al.; 1995 e 1996; LAWAND et al., 1999). No entanto, Rogers; Iwamoto (1993) e Yakh et al. (1985) não conseguiram demonstrar efeito antinociceptivo após administração intratecal de nicotina em ratos. Por outro lado, a administração espinal de agonistas nicotínicos, como a nicotina e a citisina causam atividade algogénica (agitação induzida pelo toque, comportamento de escape e vocalização), hipertensão e taquicardia (GILLBERG et al., 1990, KHAN et al., 1994a,b,c e 1996). A presença de diferentes subtipos de receptores nicotínicos foram descritos atualmente (GAO et al, 2010; McGEHEE; ROLE, 1995) e podem ser a explicação para a diversidade de efeitos observados após a administração de tais compostos, tornando-se assim importante o estudo dos efeitos antinociceptivos desse agonistas quando administrados por diferentes vias (DAMAJ et al., 1998), bem como despertado grande interesse em relação ao possível mecanismo responsável pelo efeito antinociceptivo produzido por agonistas nicotínicos.

Sabe-se que agonistas de receptores nicotínicos neuronais produzem efeito antinociceptivo predominantemente pela ativação de via inibitória descendente a partir da ativação de diferentes núcleos supraespinais incluindo tálamo, núcleo magno da rafe e núcleo tegumental pedunculopontino (BITNER et al., 1998; JURNA et al., 1993). A grande distribuição de diferentes subtipos de receptores nicotínicos neuronais pode ser responsável por mais de um mecanismo relacionado ao efeito antinociceptivo atribuído à ativação desses receptores (PICCIOTTO, et al., 2000; ROBERTS et al. 1995; ZOLI et al., 1995). Levando-se em consideração tais fatores,

várias estruturas encefálicas podem ser ativadas pela epibatidina causando efeito antinociceptivo.

Com o objetivo de estudar alguns núcleos encefálicos onde a microinjeção de epibatidina poderia causar efeito antinociceptivo na alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervo em ratos, esse agonista foi microinjetado no NPtA. A epibatidina, na dose de 0,3 µg/0,3 µL não teve efeito antialodínico quando microinjetada nesse núcleo, porém quando a mesma dose foi microinjetado na SCPvl, observou-se efeito antialodínico parcial, semelhante ao observado após administração sistêmica, não podendo a falta de efeito no NPtA ser atribuída a uma dose inadequada.

O NPtA é uma estrutura bilateral localizada dorsomedialmente entre o mesencéfalo e o diencéfalo, rostral ao colículo superior e dorsal ao tálamo. Junto com os núcleos do trato óptico, pretectal olivar, pretectal médio e pretectal posterior, forma o complexo pretectal (WEBER; HARTING, 1980).

O NPtA é umas poucas áreas encefálicas cuja estimulação elétrica aumenta a latência de resposta nos testes de retirada de cauda e placa quente em ratos sem reação aversiva e sem alterar a função motora dos animais durante a estimulação (PRADO; ROBERTIS, 1985; ROBERTS; REES, 1986; RHODES; LIEBERSKIND, 1978). A antinocicepção decorrente da estimulação elétrica do NPtA foi também observada nos testes da formalina, pressão da pata (WILSON et al., 1991) e abertura da mandíbula (CHIANG et al., 1989). Desta forma, o NPtA interfere não somente com respostas reflexas espinais, como o reflexo de retirada de cauda, mas também inibe o reflexo de abertura mandibular integrado no nível trigeminal e a

resposta a formalina que é um comportamento elaborado supraespinalmente. Em adição, o NPtA aparentemente não exerce papel tônico frente a estímulos nocivos, uma vez que o bloqueio neural não altera o limiar de retirada de cauda a estímulos térmicos em ratos (ROSA et al., 1998; PRADO; FAGANELLO, 2000), porém a lesão bilateral deste núcleo, aumenta a autotomia observada após lesão de nervo (REES et al., 1995), indicando que este o NPtA pode ser tonicamente ativado para o controle de dor persistente (VILLARREAL et al., 2003).

Embora esteja claro que o NPtA tenha importante papel na modulação da resposta nociceptiva em ratos, não há estudos que demonstrem importância de receptores nicotínicos nesse núcleo, o que pode explicar a ausência de efeito antinociceptivo após microinjeção de epibatidina. No entanto, Rees et al. (1987) mostraram que mecanismos opióides, colinérgicos e noradrenérgicos são ativados quando o NPtA é artificialmente estimulado e tenha sido identificado a presença de receptores colinérgicos M2 (SCHWARTZ, 1986), mas não observado efeito antinociceptivo neste núcleo após a microinjeção de carbacol (KLAMT; PRADO, 1991).

Projeções diretas do NPtA para a medula espinal ainda não foram demonstradas, o que implica que a modulação de neurônios do corno dorsal da medula espinal pela ativação de NPtA deve depender de conexões intermediárias. Eferências do NPtA para áreas encefálicas distintas envolvidas no controle nociceptivo incluem o núcleo tegmental pedunculopontino, núcleo reticular gigantocelular, núcleo reticular paragigantocelular (NRPG), hipotálamo, SCP e núcleo magno da rafe (NMR) (WEBER; HARTING, 1980; TERENCEZI et al., 1991 e 1992).

A ausência de estudos demonstrando a presença de receptores nicotínicos no NPtA, bem como o fato de agonistas dos receptores nicotínicos neuronais produzirem seu efeito antinociceptivo predominantemente pela ativação de vias descendentes inibitórias originadas em regiões do tronco encefálico, incluindo NMR (BITNER et al., 1998, CUCCHIARO et al., 2005) justificam a ausência da participação direta do NPtA no efeito antinociceptivo induzido pela epibatidina, porém não descartam modulação indireta desse núcleo sobre outras estruturas importantes nessa resposta, fato esse que não pode ser esclarecido com os dados apresentados no presente estudo.

Apesar do interesse em relação aos mecanismos colinérgicos nos múltiplos sistemas de modulação da dor, pouco se sabe sobre quais locais do SNC os agonistas colinérgicos produzem antinocicepção. O rápido início de ação de agentes colinomiméticos após administração i.c.v. leva a acreditar que estruturas vizinhas ao sistema ventricular, principalmente a área septal e a SCP, podem estar envolvidas com o efeito antinociceptivo dessas substâncias (METYS et al., 1969). De fato, observou-se no presente estudo, que a epibatidina microinjetada na SCPvl induz efeito antinociceptivo parcial, porém estatisticamente significativo, sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura de nervo em ratos. Além disso, o efeito antialodínico causado pela microinjeção de epibatidina na SCPvl foi abolida pela mecamilamina, antagonista nicotínico, mas não pela atropina, antagonista muscarínico.

A SCP é uma estrutura mesencefálica conhecida pelo seu importante papel na modulação da resposta nociceptiva (BASBAUM, 1982). A estimulação elétrica, a microinjeção de opióides ou a microinjeção de agonistas colinérgicos podem causar antinocicepção em diferentes regiões da SCP (GUIMARÃES et al., 2000; KLAMT;

PRADO, 1991; YAKSH; RUDY, 1978). Poucos neurônios na SCP projetam-se diretamente para o corno dorsal da medula espinal. Em vez disso, eles fazem conexões excitatórias com neurônios do bulbo rostroventral, principalmente com neurônios serotoninérgicos na linha média do NMR. Neurônios desse núcleo projetam-se para a medula espinal atrás da parte dorsal do funículo lateral e fazem conexões inibitórias com neurônios das lâminas I, II e V do corno dorsal. A estimulação do bulbo rostroventral inibe neurônios do corno dorsal, inclusive neurônios do trato espinotalâmico que respondem à estimulação nociceptiva (BASBAUM; FIELDS, 1979; BEHBEHANI, 1995, BEITZ et al., 1983; KANDEL et al., 2003; MANTYH; PESCHANSKI, 1982).

Os resultados observados no presente estudo são corroborados por resultados anteriores no qual se observou que a microinjeção de carbacol na SCP aumenta o tempo de latência no teste de retirada da cauda (GUIMARÃES et al., 2000; GUIMARÃES; PRADO, 1994). Guimarães et al. (2000) demonstraram que o efeito antinociceptivo induzido pela microinjeção de carbacol na SCP foi mimetizado pelo agonista nicotínico, 4-fenilpiperazina iodina, mas não pelo agonista muscarínico, betanecol. Além disso, tal efeito foi inibido pela mecamilamina, mas não pela atropina ou pela naloxona, um antagonista opióide. Além disso, esses autores demonstraram que o mecanismo ativado pela injeção de carbacol na SCP responsável pelo reflexo de retirada de cauda ao estímulo nocivo difere do mecanismo que inibe a reação motora de defesa ativada após estimulação elétrica da cauda.

Resultados semelhantes foram obtidos quando a epibatidina foi testada em outros núcleos com importante papel nos mecanismos descendentes inibitórios com o qual a SCP faz conexão. O núcleo dorsal da rafe (NDR), assim como o NMR está envolvidos na modulação central da dor. Como citado anteriormente, o NMR pode diretamente modular a transmissão da dor no corno dorsal da medula espinal através de vias descendentes. Os efeitos do NDR sobre a transmissão da resposta nociceptiva na medula espinal provavelmente ocorre pela conexão deste núcleo com o NMR (WANG; NAKAI, 1994). Cucchiaro et al. (2005) investigaram o efeito da epibatidina microinjetada no NDR sobre a resposta nociceptiva induzida pela formalina. A injeção sistêmica, bem como a microinjeção de epibatidina no NDR diminui a resposta nociceptiva nas fases I e II do teste da formalina e esse efeito antinociceptivo foi abolido quando mecamilamina foi microinjetada nesse mesmo núcleo. Além disso, os autores observaram alteração motora após microinjeção no NDR, mas não após a administração sistêmica de epibatidina. Os animais exibiram comprometimento moto, imobilidade e aumento do tônus muscular de forma dose dependente e esse efeito durou aproximadamente 15 minutos. A alteração motora também foi inibida quando mecamilamina foi administrada no mesmo núcleo.

A epibatidina também mostrou efeito antinociceptivo quando microinjetada no lócus coeruleus (LC). Cucchiaro et al. (2006) mostraram que tanto a epibatidina administrada por via sistêmica quanto microinjetada no LC produziu efeito antinociceptivo nas duas fases do teste da formalina e, igualmente ao que foi observado após a microinjeção do agonista no NDR, a microinjeção no LC também causou comprometimento motor nos primeiros minutos e as duas respostas foram inibidas quando se microinjetou mecamilamina neste núcleo. Porém, quando

mecamilamina foi microinjetada no LC, 10 minutos antes da injeção sistêmica de epibatidina, não houve inibição do efeito antinociceptivo do agonista nicotínico.

Esse último dado difere do resultado apresentado no presente estudo, no qual se observou que a microinjeção de mecamilamina, 10 minutos antes da microinjeção de epibatidina na SCPvl, aboliu o efeito antialodínico desta última. Embora não seja possível explicar claramente, a administração sistêmica de epibatidina parece depender da integridade dos receptores nicotínicos na SCPvl, diferente do que foi observado por Cucchiaro et al. (2006), no qual a administração sistêmica não foi influenciada pelo bloqueio desses receptores no LC.

A explicação dos mecanismos pelo qual agonistas nicotínicos exerçam efeitos antinociceptivos não está clara. A epibatidina é capaz de causar efeito antinociceptivo em diferentes modelos experimentais quando microinjetada em núcleos presentes no tronco encefálico e reconhecidamente importantes na modulação da resposta nociceptiva, como NMR, NDR, LC e, conforme demonstrado no presente estudo, na SCPvl. No entanto, quando avalia-se o papel individual desses núcleos na resposta antinociceptiva observada após administração sistêmica de epibatidina, eles parecem atuar de forma diferente. Experimentos adicionais são necessários para ajudar na compreensão de como esses núcleos são ativados após administração sistêmica ou intracerebral de agonistas nicotínicos.

Os dados do presente estudo, quando analisados em conjunto, permitem afirmar que epibatidina tem efeito antinociceptivo, quando injetada por via sistêmica, sobre a alodinia mecânica induzida pela ligadura dos ramos L5 e L6 dos nervos espinais em

doses que não causam alterações motoras. O efeito antinociceptivo observado após administração sistêmica depende da disponibilidade dos receptores nicotínicos presentes na SCPvl. Além disso, a microinjeção de epibatidina na SCPvl, mas não no NPtA, tem efeito antialodínico no mesmo teste, resposta essa que depende da interação com receptores nicotínicos, mas não com receptores muscarínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDIN, M.J.; MORIOKA, N.; MORITA, K.; KITAYAMA, T.; KITAYAMA, S.; NAKASHIMA, T.; DOHI, T. Analgesic action of nicotine on tibial nerve transection (TNT)-induced mechanical allodynia through enhancement of the glycinergic inhibitory system in spinal cord. *Life Sci.*, v. 80, n. 1, p. 9 – 16, aug. 2006.

ACETO, M.D.; BAGLEY, R.S.; DEWEY, W.L.; FU, T.C.; MARTIN, B.R. The spinal cord as a major site for the antinociceptive action of nicotine in the rat. *Neuropharmacology*, v. 25, n. 9, p. 1031 – 1036, sep. 1986.

ADEM, A; NORDBERG, A.; JOSSAN, S.S.; SARA, V.; GILLBERG, P.G. Quantitative autoradiography of nicotinic receptors in large cryosections of human brain hemispheres. *Neurosci. Lett.*, v. 101, n. 3, p. 247 – 252, jul. 1989.

ALBE-FESSARD, D.; BERKLEY, K.J.; KRUGER, L.; RALSTON, H.J.; WILLIS, W.D.Jr. Diencephalic mechanisms of pain sensation. *Brain Res.*, v. 356, n. 3, p. 217 – 296, aug. 1985.

ALEY, K.O.; REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience*, v. 73, n. 1, p. 259 – 265, jul. 1996.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res.*, v. 1000, n. 1 – 2, p. 40 – 56, mar. 2004.

AMIR, R.; MICHAELIS, M.; DEVOR, M. Burst discharge in primary sensory neurons: triggered by subthreshold oscillations, maintained by depolarizing afterpotentials. *J. Neurosci.*, v. 22, n. 3, p. 1187 – 1198, feb. 2002.

ANDREW, D.; CRAIG, A.D. Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch. *Nat. Neurosci.*, v. 4, n. 1, p. 72 – 77, jan. 2001a.

ANDREW, D.; CRAIG, A.D. Spinothalamic lamina I neurones selectively responsive to cutaneous warming in cats. *J. Physiol.*, n. 537, pt. 2, p. 489 – 495, dec. 2001b.

ARNERIC, S.P. HOLLADAY, M.; WILLIAMS, M. Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem. Pharmacol.*, v. 74, n. 8, p. 1092 – 1101, oct. 2007.

BADIO, B.; DALY, J.W. Epibatidine, a potent analgesic and nicotinic agonist. *Mol. Pharmacol.*, v. 45, n. 4, p. 563 – 569, Apr. 1994.

BANNON, A.W.; GUNTHER, K.L.; DECKER, G.; DECKER, M.W. Is epibatidine really analgesic? Dissociation of the activity, temperature, and analgesic effects of (\pm)-epibatidine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 51, n. 4, p. 693 – 698, Aug. 1995.

BASBAUM, A.I. Anatomical substrates for the descending control of nociception. In: Sjörlund, A., eds. Brain stem control of spinal mechanisms. Amsterdam: Elsevier; 1982: 119 – 133.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, p. 267 – 284, oct. 2009.

BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. *J. Comp. Neurol.*, v. 187, n. 3, p. 513 – 531, oct. 1979.

BEHBEHANI, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.*, v. 46, n. 6, p. 575 – 605, aug. 1995.

BEITZ, A.J.; MULLETT, M.A.; WEINER, L.L. The periaqueductal gray projections to the rat spinal trigeminal, raphe magnus, gigantocellular pars alpha and paragigantocellular nuclei arise from separate neurons. *Brain Res.*, v. 288, n. 1 – 2, p. 307 – 314, dec. 1983.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. *The Lancet*, v. 353, n. 9164, p. 1610 – 1615, may. 1999.

BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.*, v. 67, n. 1, p. 67 – 186, jan. 1987.

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v. 33, n. 1, p. 87 – 107, apr. 1988.

BIAN, D.; OSSIPOV, M.H.; IBRAHIM, M.; RAFFA, R.B.; TALLARIDA, R.J.; MALAN, T.P. Jr, LAI, J.; PORRECA, F. Loss of antiallodynic and antinociceptive spinal/supraspinal morphine synergy in nerve-injured rats: restoration by MK-801 ou dynorphin antiserum. *Brain Res.*, v. 831, n. 1 – 2, p. 55 – 63, jun. 1999.

BIELLA, G.; RIVA, L.; SOTGIU, M.L. Interaction between neurons in different laminae of the dorsal horn of the spinal cord. A correlation study in normal and neuropathic rats. *Eur. J. Neurosci.*, v. 9, n. 5, p. 1017 – 1025, may. 1997.

BITNER, R.S.; NIKKEL, A.L.; CURZON, P.; ARNERIC, S.P.; BANNON, A.W.; DECKER, M.W. Role of the nucleus raphe magnus in antinociception produced by ABY-594: immediate early gene responses possibly linked to neuronal nicotinic acetylcholine receptors on serotonergic neurons. *J. Neurosci.*, v. 18, n. 14, p. 5426-5432, jul. 1998.

BITNER, R.S.; NIKKEL, A.L.; CURZON, P.; DONNELLY-ROBERTS, D.L.; PUTTFAREKEN, P.S.; NAMOVIE, M.; JACOBS, I.C.; MEYER, M.D.; DECKER, M.W. Reduced nicotinic receptor-mediated antinociception following in vivo antisense knock-down in rat. *Brain Res.*, v. 871, n. 1, p. 66-74, jul. 2000.

BOIVE, J.; LEIJON, G.; JOHANSSON, I. Central post-stroke pain – a study of the mechanisms through analyses of the sensory abnormalities. *Pain*, v. 37, n. 2, p. 173 – 185, 1989,

BONHAUS, D.W.; BLEY, K.R.; BROKA, C.A.; FONTANA, D.J.; LEUNG, E.; LEWIS, R.; SHIEH, A.; WONG, E.H. Characterization of the electrophysiological, biochemical and behavioral actions of epibatidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 272, n. 3, p. 1199 – 1203, Mar. 1995.

BURGESS, S.E.; GARDELL, R.L.; OSSIPOV, M.H.; MALAN Jr., T.P.; WANDERAH, J.L.; PORRECA, F. Time-dependent descending facilitation from the rostral ventromedial medulla maintains, but not initiate, neuropathic pain. *J. Neurosci.*, v. 22, n. 12, p. 5129 – 5136, jun. 2002.

BURSTEIN, R.; POTREBIC, S. Retrograde labeling of neurons in the spinal cord that project directly to the amygdala or the orbital cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.*, v. 335, n. 4, p. 469 – 485, sep. 1993.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: A molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 24, p. 487-517, 2001.

CECHETTO, D.F.; STANDAERT, D.G.; SAPER, C.B. Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, v. 240, n. 2, p. 153 – 160, oct. 1985.

CERVERO, F. What is a nociceptor-specific (class 3) cell?, *Pain*, v. 62, n. 1, p. 123 – 125, jul. 1995.

CHACUR, M.; MILLIGAN, E.D.; GAZDA, L.S.; ARMSTRONG, C.; WANG, H.; TRACEY, K.J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain*, v. 94, n. 3, p. 231 – 244, dec. 2001.

CHANDLER, M.J.; HOBBS, S.F.; FU, Q.G.; KENSHALO, D.R.Jr.; BLAIR, R.W.; FOREMAN, R.D. Responses of neurons in ventroposterolateral nucleus of primate thalamus to urinary bladder distension. *Brain Res.*, v. 571, n. 1, p. 26 – 34, jan. 1992.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.W.; POGREL, J.W.; CHUNG, J.M. YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods.*, v. 53, n. 1, p. 55 – 63, jul. 1994.

CHIANG, C.Y.; CHEN, I.C.; DOSTROVSKY, J.O.; SESSLE, B.J. Inhibitory effect of stimulation of the anterior pretectal nucleus on the jaw-opening reflex. *Brain Res.*, v. 497, n. 2, p. 325 – 333, sep. 1989.

CHRISTENSEN, M.K.; SMITH, D.F. Antinociceptive effects of the stereoisomers of nicotine given intrathecally in spinal rats. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, v. 80, n. 3, p. 189 – 194, 1990.

CHUNG, J.M.; KENSHALO, D.R.Jr.; GERHART, K.D.; WILLIS, W.D. Excitation of primate spinothalamic neurons by cutaneous C-fiber volleys. *J. Neurophysiol.*, v. 42, n. 5, p. 1354 – 1369, sep. 1979.

COGGESHALL, R.E.; ZHOU, S.; CARTON, S.M. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res.*, v. 764, n. 1 – 2, p. 126 – 132, aug. 1997.

CORDERO-ERAUSQUIN, M.; CHANGEUX, J. Tonic nicotinic modulation of serotonergic transmission in the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 98, n. 5, Feb. 2001.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C.J. Pain: Molecular mechanisms. *J. Pain*, v. 1, Suppl. 3, p. 35 – 44, sep. 2000.

CRAIG, A.D. Spinal distribution of ascending lamina I axons anterogradely labeled with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) in the cat. *J. Comp. Neurol.*, v. 313, n. 2, p. 377 – 393, nov. 1991.

CRAIG, A.D.; KROUT, K.; ANDREW, D. Quantitative response characteristics of thermoreceptive and nociceptive lamina I spinothalamic neurons in the cat. *J. Neurophysiol.*, v. 86, n. 3, p. 1459 – 1480, sep. 2001.

CUCCHIARO, G.; CHAIJALE, N.; COMMONS, K.G. The dorsal raphe nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the alpha4 nicotinic receptor agonist epibatidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 313, n. 1, p. 389-394, dec. 2005.

CUCCHIARO, G.; CHAIJALE, N.; COMMONS, K.G. The locus coeruleus nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the nicotinic receptor agonist, epibatidine. *Neuropharmacology*, v. 50, n. 7, p. 769 – 776, feb. 2006.

CULP, W.J.; OCHOA, J. Abnormal nerves and muscles as impulse generators. Oxford: Oxford University Press, 1982.

DAMAJ, M.I.; CREASY, K.R.; WELCH, S.P.; ROSECRANS, J.A.; ACETO, M.D.; MARTIN, B.R. Comparative pharmacology of nicotine and ABT-418, a new nicotinic agonist. *Psychopharmacology*, v. 120, n. 4, p. 483 – 490, aug. 1995.

DAMAJ, M.I.; WELCH, S.P.; MARTIN, B.R. Characterization and modulation of acute tolerance to nicotine in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 277, n. 1, p. 454 – 461, apr. 1996.

DAMAJ, M.I.; FEI-YIN, M.; DUKAT, M.; GLASSCO, W.; GLENNON, R.A.; MARTIN, B.R. Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systemic and intrathecal administration in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 284, n. 3, p. 1058 – 1065, mar. 1998.

DAVIS, L.; POLLOCH, L.J.; STONE, T.T. Visceral pain. *Surg. Gynaecol. Obstet.* v. 55, p. 418 – 426, 1932.

DECKER, M.W.; BRIONI, J.D.; SULLIVAN, J.P.; BUCKLEY, M.J.; RADEK, R.J.; RASZKIEWICZ, J.L.; KANG, C.H.; KIM, D.J.; GIARDINA, W.J.; WASICAK, J.T., et al.

(S)-3-methyl-5-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)isoxazole (ABT 418): a novel cholinergic ligand with cognition-enhancing and anxiolytic activities: II. In vivo characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 270, n. 1, p. 319 – 328, jul. 1994.

DICKHAUS, H.; ZIMMERMANN, M.; ZOTTERMAN, Y. The development in regeneration of cutaneous nerves of C-fibre receptors responding to noxious heating of the skin. In: ZOTTERMAN, Y. Sensory functions of the skin in primates. Oxford: Pergamon, 1976, p. 415 – 425.

DOSTROVSKY, J.O.; CRAIG, A.D. Cooling-specific spinothalamic neurons in the monkey. *J. Neurophysiol.*, v. 76, n. 6, p. 3656 – 3665, dec. 1996.

DUBNER, R.; KENSHALO, D.R.Jr.; MAIXNER, W.; BUSHNELL, M.C.; OLIVEIRAS, J.L. The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli. *J. Neurophysiol.*, v. 62, n. 2, p. 450 – 457, aug. 1989.

DUBNER, R.; REN, K. Assessing transient and persistent pain in animals. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. Textbook of pain. London: Churchill Livingstone, 1999, p. 359 – 370.

GAO, B.; HIERL, M.; CLARKIN, K.; JUAN, T.; NGUYEN, H.; van der VALK, H.D.; GUO, W.; LEHTO S.G.; MATSON, D.; McDERMOTT, J.S.; KNOP, J.; GAIDA, K.; CAO, L.; WALDON, D.; ALBRECHT, B.K.; BOEZIO, A.A.; COPELAND, K.W.; HARMANGE, J.; SPRINGER, S.K.; MALMBERG, A.B.; McDONOUGH, S.I.

Pharmacological effects of nonselective and subtype-selective nicotinic receptor agonist in animal models of persistent pain. *Pain*, v. 149, n. 1, p. 33 – 49, apr. 2010.

GEBHART, G.F. Visceral Pain. Seattle: IASP Press, 1995, 516 p.

GIESLER, G.J.Jr.; MENÉTREY, D.; BASBAUM, A.I. Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, v. 184, n. 1, p. 107 – 126, mar. 1979.

GIESLER, G.J.Jr.; YEZIERSKI, R.P.; GERHART, K.D.; WILLIS, W.D. Spinothalamic tract neurons that project to medial and/or lateral thalamic nuclei: evidence for a physiologically novel population of spinal cord neurons. *J. Neurophysiol.*, v. 46, n. 6, p. 1285 – 1308, dec. 1981.

GILBERT, S.D.; CLARK, T.M.; FLORES, C.M. Antihyperalgesic activity of epibatidine in the formalin model of facial pain. *Pain*, v. 89, n. 2 – 3, jan. 2001.

GILLBERG, P.G.; HARTVIG, P.; GORDH, T.; SOTTILE, A.; JANSSON, I.; ARCHER, T.; POST, C. Behavioral effects after intrathecal administration of cholinergic receptor agonists in the rat. *Psychopharmacology*, v. 100, n. 4, p. 464 – 469, 1990.

GUIMARÃES, A.P.; GUIMARÃES, F.S.; PRADO, W.A. Modulation of carbachol-induced antinociception from the rat periaqueductal gray. *Brain Res. Bull.*, v. 51, n. 6, p. 471 – 478, apr. 2000.

GUIMARÃES, A.P.; PRADO, W.A. Antinociceptive effects of carbachol microinjected into different portions of the mesencephalic periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res.*, v. 647, n. 2, p. 220 – 230, jun. 1994.

HAN, H.C.; LEE, D.H.; CHUNG, J.M. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain*, v. 84, n. 2 – 3, p. 253 – 261, feb. 2000.

HINSON, A.W.; GU, X.Q.; DIB-HAJJ, S.; BLACK, J.A.; WAXMAN, S.G. Schwann cells modulate sodium channel expression in spinal sensory neurons in vitro. *Glia*, v. 21, n. 4, p. 339 – 349, dec. 1997.

HOFFMAN, B.B.; TAYLOR, P. Neurotransmissão. In: *GOODMAN & GILMAN, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. cap. 6, p. 89-117.

HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 2, n. 2, p. 83-91, feb. 2001.

HYLDEN, J.L.; HAYASHI, H.; BENNETT, G.J.; DUBNER, R. Spinal lamina I neurons projecting to the parabrachial area of the cat midbrain. *Brain Res.*, v. 336, n. 1, p. 195 – 198, jun. 1985.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN – IASP PAIN TERMINOLOGY. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>. Acessado em nov. 2009.

IWAMOTO, E.T. Antinociception after nicotine administration into the mesopontine tegmentum of rats: evidence for muscarinic actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 251, n. 2, p. 412 – 421, nov. 1989.

JASMIN, L.; BURKEY, A.R.; CARD, J.P.; BASBAUM, A.I. Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino-)parabrachio-amygdaloid, in the rat. *J. Neurosci.*, v. 17, n. 10, p. 3751 – 3765, may. 1997.

JENSEN, A.A.; FRØLUN, B.; LILJEFORS, T.; KROGSGAARD-LARSEN, P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J. Med. Chem.*, v. 48, n. 15, p. 4705-4745, jul. 2005.

JENSEN, T.S.; GOTTRUP, H.; SINDRUP, S.H.; BACH, F.W. The clinical picture of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 429, n. 1-3, p. 1 – 11, out. 2001.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 6852, p. 203-210, sep. 2001.

JURNA, I.; KRAUSS, P.; BALDAU, J. Depression by nicotine of pain-related nociceptive activity in the rat thalamus and spinal cord. *Clin. Investig.*, v. 72, n. 1, p. 65 – 73, dec. 1993.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. A percepção da dor. In: *Princípios da Neurociência*. 4 ed. Barueri: Manole, 2003. cap. 24, p. 472 – 491.

KAUPPILA, T. Correlation between autotomy-behavior and current theories of neuropathic pain. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 23, n. 1, p. 111 - 129, 1998.

KERR, F.W.; LIPPMAN, H.H. The primate spinothalamic tract as demonstrated by anterolateral cordotomy and midthoracic myelotomy. In Bonica, J.J. *Advances in Neurology*. New York: Raven, v. 4, p. 147 – 156, 1974.

KESINGLAND, A.C.; GENTRY, C.T.; PANESAR, M.S.; BOWES, M.A.; VERNIER, J.M.; CUBE, R.; WALKER, K.; URBAN, L. Analgesic profile of the nicotinic acetylcholine receptor agonists, (+)-epibatidine and ABT-594 in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, v. 86, n. 1 – 2, may. 2000.

KHAN, I.M.; TAYLOR, P.; YAKSH, T.L. Cardiovascular and behavioral responses to nicotinic agents administered intrathecally. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 270, n. 1, p. 150 – 158, jul. 1994a.

KHAN, I.M.; YAKSH, T.L.; TAYLOR, P. Ligand specificity of nicotinic acetylcholine receptors in rat spinal cord: studies with nicotine and cytosine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 270, n. 1, p. 159 – 166, jul. 1994b.

KHAN, I.M.; PRINTZ, M.P.; YAKSH, T.L.; TAYLOR, P. Augmented responses to intrathecal nicotinic agonists in spontaneous hypertension. *Hypertension*, v. 24, n. 5, p. 611 – 619, nov. 1994c.

KHAN, I.M.; MARSALA, M.; PRINTZ, M.P.; TAYLOR, P.; TAKSH, T.L. Intrathecal nicotinic agonist-elicited release of excitatory amino acids as measured by in vivo spinal microdialysis in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 278, n. 1, p. 97 – 106, jul. 1996.

KHAN, I.M.; YAKSH, T.L.; TAYLOR, P. Epibatidine binding sites and activity in the spinal cord. *Brain Res.*, v. 753, n. 2, p. 269-282, apr. 1997.

KHAN, I.M.; BUERKLE, H.; TAYLOR, P.; YAKSH, T.L. Nociceptive and antinociceptive responses to intrathecally administered nicotinic agonist. *Neuropharmacology*, v. 37, n. 12, p. 1515-1525, dec. 1998.

KIM, S.H.; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, v. 50, n. 3, p. 355-363, sep. 1992.

KLAMT, J.G.; PRADO, W.A. Antinociception and behavioral changes induced by carbachol microinjected into identified sites of the rat brain. *Brain Res.*, v. 549, n. 1, p. 9 – 18, may. 1991.

KOVELOWSKI, C.J.; OSSIPOV, M.H.; SUN, H.; LAI, J.; MALAN, T.P.; PORRECA, F. Supraspinal cholecystinin may drive tonic descending facilitation mechanisms to maintain neuropathic pain in the rat. *Pain*, v. 87, n. 3, p. 265 – 273, sep. 2000.

LAWAND, N.B.; LU, Y.; WESTLUND, K.N. Nicotinic cholinergic receptors: potential targets for inflammatory pain relief. *Pain*, v. 80, n. 1 – 2, p. 291 – 299, mar. 1999.

LEWIN, R.G.; LU, Y.; PARK, T.J. A plethora of painful molecules. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 14, n. 4, p. 443-449, aug. 2004.

LI, Y.; DORSI, M.J.; MEYER, R.A.; BEZBERG, A.J. Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain*, v. 85, n. 3, p. 493 – 502, apr. 2000.

LIU, C.N.; RABER, P.; ZIV-SEFER, S.; DEVOR, M. Hyperexcitability in sensory neurons of rats selected for high versus low neuropathic pain phenotype. *Neuroscience*, v. 105, n. 1, p. 265 – 275, 2001.

LIU, C.N.; WALL, P.D.; BEN-DOR, E.; MICHAELIS, M.; AMIR, R.; DEVOR, M. Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain*, v. 85, n. 3, p. 503 – 521, apr. 2000.

LYNN, R.B. Mechanisms of esophageal pain. *Am. J. Med.*, v. 92, n. 5A, p. 11S – 19S, may. 1992.

MALAN, T.P.; OSSIPOV, M.H.; GARDELL, L.R.; IBRAHIM, M.; BIAN, D.; LAI, J.; PORRECA, F. Extraterritorial neuropathic pain correlates with multisegmental elevation of spinal dynorphin in nerve-injured rats. *Pain*, v. 86, n. 1 – 2, p. 185 – 194, may. 2000.

MANTYH, P.W.; PESCHANSKI, M. Spinal projections from the periaqueductal grey and dorsal raphe in the rat, cat and monkey. *Neuroscience*, v. 7, n. 11, p. 2769 – 2776, 1982.

McGEHEE, D.S.; ROLE, L.W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, p. 521 – 546, 1995.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, v. 150, n. 699, p. 971 – 979, nov. 1965.

MENÉTREY, D.; BASBAUM, A.I. Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. *J. Comp. Neurol.*, v. 255, n. 3, p. 439 – 450, jan. 1987.

MENSE, S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. *Am. J. Med.*, v. 75, n. 5A, p. 4 – 14, nov. 1983.

MENSE, S. Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain*, v. 54, n. 3, p. 241 – 289, sep. 1993.

METYS, J.; WAGNER, N.; METYSOVÁ, J.; HERZ, A. Studies on the central antinociceptive action of cholinomimetic agents. *Int. J. Neuropharmacol.*, v. 8, n. 5, p. 413 – 425, sep. 1969.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, v. 57, n. 1, p. 1-164, jan. 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.*, v. 66, n. 6, p. 355 – 474, apr. 2002.

MILLS, C.D.; GRADY, J.J.; HULSEBOSCH, C.E. Changes in exploratory behavior as a measure of chronic central pain following spinal cord injury. *J. Neurotrauma*, v. 18, n. 10, p. 1091 – 1105, oct. 2001.

MILNE, R.J.; FOREMAN, R.D.; GIESLER, G.J.Jr.; WILLIS, W.D. Convergence of cutaneous and pelvic visceral nociceptive inputs onto primate spinothalamic neurons. *Pain*, v. 11, n. 2, p. 163 – 183, oct. 1981.

MOLINERO, M.T.; DEL RIO, J. Substance P, nicotinic acetylcholine receptors and antinociception in the rat. *Neuropharmacology*, v. 26, n. 12, p. 1715 – 1720, dec. 1987.

MÖLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J. Neurosci. Methods*, v. 84, n. 1-2, p. 41-47, oct. 1998.

MORGAN, M.M. Direct comparison of heat-evoked activity of nociceptive neurons in the dorsal horn with the hindpaw withdrawal reflex in the rat. *J. Neurophysiol.*, v. 79, n. 1, p. 174 – 180, jan. 1998.

NESS, T.J.; GEBHART, G.F. Visceral pain: a review of experimental studies. *Pain*, v. 41, n. 2, p. 167 – 234, may. 1990.

NEWMAN, H.M.; STEVENS, R.T.; APKARIAN, A.V. Direct spinal projections to limbic and striatal areas: anterograde transport studies from the upper cervical spinal cord and the cervical enlargement in squirrel monkey and rat. *J. Comp. Neurol.*, v. 365, n. 4, p. 640 – 658, feb. 1996.

OSSIPOV, M.H.; HON, S.T.; MALAN, P.Jr.; LAI, J.; PORRECA, F. Mediation of spinal nerve injury induced tactile allodynia by descending facilitatory pathways in the dorsolateral funiculus in rats. *Neurosci. Lett.*, v. 290, n. 2, p. 129 – 132, aug. 2000.

OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; MALAN, P, Jr.; VANDERAH, T.W.; PORRECA, F. Tonic descending facilitation as a mechanism of neuropathic pain. In: *Neuropathic pain: Pathophysiology and treatment* (Hansson, P.T.; Fields, H.L.; Hill, R.G.; Marchettini, P, eds), pp. 107 – 124. Seattle: International Association for the Study of Pain, 2001.

OSSIPOV, M.H.; PORRECA, F. *Endogenous pain modulation: descending excitatory systems*. In: *Handbook of Clinical Neurology* (eds. F. Cervero and T.S. Jensen), Oxford: Elsevier, 2005.

OSSIPOV, M.H.; PORRECA, F. *Neuropathic pain: Basic Mechanisms (Animal)*. In: *Science of pain*. 1 ed. Oxford: Elsevier, 2009, cap. 55, p. 833 – 855.

PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain*. 5th edition, Academic Press, Sydney. 2005.

PERTOVAARA, A.; WEI, H.; HÄMÄLÄINEN, M.M. Lidocaine in the rostroventromedial medulla and the periaqueductal gray attenuates allodynia in neuropathic rats. *Neurosci. Lett.*, v. 218, n. 2, p. 127 – 130, nov. 1996.

PHAN, D.V.; DODA, M.; BITE, A.; GYÖRGY, L. Antinociceptive activity of nicotine. *Acta Physiol. Acad. Scient. Hungaricae*, v. 44, p. 393 – 405.

PICCIOTTO, M.R.; CALDARONE, B.J.; KING, S.L.; ZACHARIOU, V. Nicotinic receptors in the brain: Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 5, p.451-465, may. 2000.

PITCHER, G.M.; RITCHIE, J.; HENRY, J.L. Nerve constriction in the rat: model of neuropathic, surgical and central pain. *Pain*, v. 83, n. 1, p. 37 – 46, Oct. 1999.

PRADO, W.A.; FAGANELLO, F.A. The anterior pretectal nucleus participates as a relay station in the glutamate-, but not morphine-induced antinociception from the dorsal raphe nucleus in rats. *Pain*, v. 88, n. 2, p. 169 – 176, nov. 2000.

PRADO, W.A.; ROBERTS, M.H. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating identified sites in the rat brain. *Brain Res.*, v. 340, n. 2, p. 219 – 228, aug. 1985.

QIAN, C.; LI, T.; SHEN, T.Y.; LIBERTINE-GARAHAN, L.; ECKMAN, J.; BIFTU, T.; IP.S. Epibatidine is a nicotinic analgesic. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 250, n. 3, p. 13-14, dec. 1993.

RADEK, R.J.; CURZON, P.; DECKER, M.W. Supraspinal and systemic administration of the nicotinic-cholinergic agonist (+/-)-epibatidine has inhibitory effects on C-fiber reflexes in the rat. *Brain Res. Bull.*, v. 64, n. 4, p. 323-330, dec. 2004.

RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: *Textbook of Pain*, ed. WALL, P.D.; MELZACK, R., p. 11-57. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

RAO, T.S.; CORREA, L.D.; REID, R.T.; LLOYD, G.K. Evaluation of anti-nociceptive effects of neuronal nicotinic acetylcholine receptor (NACHR) ligands in the rat tail-flick assay. *Neuropharmacology*, v. 35, n. 4, p. 393 – 405, apr. 1996.

RASHID, H.; UEDA, H. Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its spinal GABA-mediated mechanism. *Brain Res.*, v. 953, n. 1-2, p. 53-62, oct. 2002.

REES, H.; PRADO, W.A.; RAWLING, S.; ROBERTS, M.H. The effects of intraperitoneal administration of antagonists and development of morphine tolerance on the antinociception induced by stimulating the anterior pretectal nucleus of the rat. *J. Physiol.*, v. 92, n. 4, p. 769 – 779, dec. 1987.

REES, H.; TERENCE, M.G.; ROBERTS, M.H. Anterior pretectal nucleus facilitation of superficial dorsal horn neurones and modulation of deafferentation pain in the rat. *J. Physiol.*, v. 489, pt. 1, p. 159 – 169, nov. 1995.

REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, v. 164, n. 878. p. 444 – 445, apr. 1969.

REYNOLDS, M.L.; WOOLF, C.J. Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 3, n. 5, p. 683 – 693, oct. 1993.

RHODES, D.L.; LIEBESKIND, J.C. Analgesia from rostral brain stem stimulation in the rat. *Brain Res.*, v. 143, n. 3, p. 521 – 532, mar. 1978.

ROBERTS, M.H.; REES, H. The antinociceptive effects of stimulating the pretectal nucleus of the rat. *Pain*, v. 25, n. 1, p. 83 – 93, apr. 1986.

ROBERTS, R.G.; STEVENSON, J.E.; WESTERMAN, R.A.; PENNEFATHER, J. Nicotinic acetylcholine receptors on capsaicin-sensitive nerves. *Neuroreport*, v. 6, n. 11, p. 1578 – 1582, jul. 1995.

ROGERS, D.T.; IWAMOTO, E.T. Multiple spinal mediators in parenteral nicotine-induced antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 267, n. 1, p. 341 – 349, oct. 1993.

ROSA, M.L.; OLIVEIRA, M.A.; VALENTE, R.B.; COIMBRA, N.C.; PRADO, W.A. Pharmacological and neuroanatomical evidence for the involvement of the anterior pretectal nucleus in the antinociception induced by stimulation of the dorsal raphe nucleus in rats. *Pain*, v. 74, n. 2 – 3, p. 171 – 179, feb. 1998.

RUSTIONI, A. Non-primary afferents to the nucleus gracilis from the lumbar cord of the cat. *Brain Res.*, v. 51, p. 81 – 95, mar. 1973.

RUSTIONI, A. Non-primary afferents to the cuneate nucleus in the brachial dorsal funiculus of the cat. *Brain Res.*, v. 75, n. 2, p. 247 – 259, jul. 1974.

RUSTIONI, A.; HAYES, N.L.; O'NEIL, S. Dorsal column nuclei and ascending spinal afferents in macaques. *Brain*, v. 102, n. 1, p. 95 – 125, mar. 1979.

RUPNIAK, N.M.; PATEL, S.; MARWOOD, R.; WEBB, J.; TRAYNOR, J.R.; ELLIOTT, J.; REEDMAN, S.B.; FLETCHER, S.R.; HILL, R.G. Antinociceptive and toxic effects of (+)-epibatidine oxalate attributable to nicotinic agonist activity. *Br. J. Pharmacol.*, v. 113, n. 4, p. 1487 -1493, Dec. 1994.

SAHLEY, T.L.; BERNTSON, G.G. Antinociceptive effects of central and systemic administrations of nicotine in the rat. *Psychopharmacology*, v. 65, n. 3, p. 279 – 283, nov. 1979.

SCHAIBLE, H.G.; GRUBB, B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, v. 55, n. 1, p. 5 – 54, oct. 1993.

SCHWARTZ, R.D. Autoradiographic distribution of high affinity muscarinic and nicotinic cholinergic receptors labeled with [3H]acetylcholine in rat brain. *Life Sci.*, v. 38, n. 23, p. 2111 – 2119, jun. 1986.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, v. 43, n. 2, p. 205 – 218, nov. 1990.

SKOUBIS, P.D.; HRADIL, V.; CHIN, C.L.; LUO, Y.; FOX, G.B.; MCGARAUGHTY, S. Mapping brain activity following administration of a nicotinic acetylcholine receptor agonist, ABT-594, using functional magnetic resonance imaging in awake rats. *Neuroscience*, v. 137, n. 2, p. 583 – 591, nov. 2006.

SNIDER, W.D.; McMAHON, S.B. Tackling pain in source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, v. 20, n. 4, p. 629-632, apr. 1998.

SPANDE, T.F.; GARRAFFO, H.M.; YEH, H.J.; PU, Q.L.; PANNELL, L.K.; DALY, J.W. A new class of alkaloids from a dendrobatid poison frog: a structure for alkaloid 251F. *J. Nat. Prod.*, v. 55, n. 6, p.707 – 722, Jun. 1992.

SULLIVAN, J.P.; DECKER, M.W.; BRIONI, J.D.; DONNELLY-ROBERTS, D.; ANDERSON, D.J.; BANNON, A.W.; KANG, C.H.; ADAMS, P.; PIATTONI-KAPLAN, M.; BUCKLEY, M.J. et al. (+/-)-Epibatidine elicits a diversity of in vitro and in vivo effects mediated by nicotinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 271, n. 2, p. 624 – 631, nov. 1994.

SUN, Q.; TU, H.; XING, G.G.; HAN, J.S.; WAN, Y. Ectopic discharges from injured nerve fibers are highly correlated with tactile allodynia only in early, but not late, stage in rats with spinal nerve ligation. *Exp. Neurol.*, v. 191, n. 1, p. 128 – 136, jan. 2005.

TABO, E.; JINKS, S.L.; EISELE Jr, J.H.; CARSTENS, E. Behavioral manifestations of neuropathic pain and mechanical allodynia, and changes in spinal dorsal horn neurons, following L4-L6 dorsal root constriction in rats. *Pain*, v. 80, n. 3, p. 503-520, apr. 1999.

TAYLOR, P. Agentes que atuam na junção neuromuscular e nos gânglios autônomos. In: *GOODMAN & GILMAN, As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. cap. 9, p. 147-162.

TERENZI, M.G.; REES, H.; MORGAN, S.J.; FOSTER, G.A.; ROBERTS, M.H. The antinociception evoked by anterior pretectal nucleus stimulation is partially dependent upon ventrolateral medullary neurones. *Pain*, v. 47, n. 2, p. 231 – 239, nov. 1991.

TERENZI, M.G.; REES, H.; ROBERTS, M.H. The pontine parabrachial region mediates some of the descending inhibitory effects of stimulating the anterior pretectal nucleus. *Brain Res.*, v. 594, n. 2, p. 205 – 214, oct. 1992.

TRAYNOR, J.R. Epibatidine and pain. *Br. J. Anaesth.*, v. 81, n. 1, p. 69-76, jul. 1998.

TRIPATH, H.L.; MATTIN, B.R., ACETO, M.D. Nicotine-induced antinociception in rats and mice. Correlation with nicotine brain levels. *J. Pharm. Exp. Therap.*, v. 221, n. 1, p. 91-96, apr. 1982.

VABNICK, I.; NOVAKOVIC, S.D.; LEVINSON, S.R.; SCHACHNER, M.; SHRAGER, P. The clustering of axonal sodium channel during development of the peripheral nervous system. *J. Neurosci.*, v. 16, n. 16, p. 4914 – 4922, aug, 1996.

VILLARREAL, C.F.; DEL BEL, E.A.; PRADO, W.A. Involvement of the anterior pretectal nucleus in the control of persistent pain: a behavioral and c-Fos expression study in the rat. *Pain*, v. 103, n. 1 – 2, p. 163 – 174, may. 2003.

WALL, P.D.; DEVOR, M.; INBAL, R.; SCADDING, J.W.; SCHONFELD, D.; SELTZER, Z.; TOMKIEWICZ, M.M. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*, v. 7, n. 2, p. 103 – 111, oct. 1979.

WANG, Q.P.; NAKAI, Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res. Bull.*, v. 34, n. 6, p. 575 – 585, 1994.

WEBER, J.T.; HARTING, J.K. The efferent projections of the pretectal complex: an autoradiographic and horseradish peroxidase analysis. *Brain Res.*, v. 194, n. 1, p. 1 – 28, jul. 1980.

WILLIS, W.D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 308, n. 1136, p. 253 – 270, feb. 1985.

WILLIS, W.D.; COGGESHALL, R.E. Sensory mechanisms of the spinal cord. 2 ed. New York: Plenum Press, 1991, 595p.

WILLIS, W.D.Jr.; ZHANG, X.; HONDA, C.N.; GIESLER, G.J.Jr. Projections from the marginal zone and deep dorsal horn to the ventrobasal nuclei of the primate thalamus. *Pain*, v. 92, n. 1 – 2, p. 267 – 276, may. 2001.

WILLIS, W.D.; ZHANG, X.; HONDA, C.N.; GIESLER, G.J.Jr. Projections from the marginal zone and deep dorsal horn to the ventrobasal nuclei of the primate thalamus. *Pain*, v. 92, n. 1 – 2, p. 267 – 276, may. 2001.

WILSON, D.G.; REES, H.; ROBERTS, M.H. The antinociceptive effects of anterior pretectal stimulation in tests using thermal, mechanical and chemical noxious stimuli. *Pain*, v. 44, n. 2, p. 195 – 200, feb. 1991.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann. Intern. Med.*, v. 140, n. 6, p. 441-451, mar. 2004.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet*, v. 353, n. 9168, p. 1959 – 1964, jun. 1999.

YAKSH, T.L.; DIRKSEN, R.; HARTY, G.J. Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 117, n. 1, p. 81 – 88, oct. 1985.

YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain*, v. 4, n. 4, p. 299 – 359, apr. 1978.

ZHANG, E.T.; CRAIG, A.D. Morphology and distribution of spinothalamic lamina I neurons in the monkey. *J. Neurosci.*, v. 17, n. 9, p. 3274 – 3284, may. 1997.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-110, jun. 1983.

ZIMMERMANN, M. Functional characteristics of sensory fibres in regenerating cutaneous nerves. In: DELWAIDE, P.J.; GORIO, A. *Clinical Neurophysiology in peripheral neuropathies*. Amsterdam: Elsevier, 1985, p. 41 – 56.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 429, n. 1 – 3, p. 23 – 37, oct. 2001.

ZIMMERMANN, M.; HERDEGEN, T. Plasticity of the nervous system at the systemic, cellular and molecular levels: a mechanism of chronic pain and hyperalgesia. In: CARLI, G.; ZIMMERMANN, M. *Towards the neurobiology of chronic pain*. Progress in Brain Research, v. 110, Amsterdam: Elsevier, p. 233 – 259, 1996.

ZOLI, M.; Le NOVÈRE, N.; HILL, J.A.; CHANGEUX, J.P. Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.*, v. 15, n. 3, pt. 1, p. 1912-1939, mar. 1995.

MANUSCRIPT

**Pharmacological evidence for a periaqueductal gray as a site of
action of the antinociceptive effects of the epibatidine in a rat model
of neuropathic pain**

Karina Abdo Costa, Quintino Moura Dias Junior, João Walter da Silveira,
William A. Prado*

*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto,
University of
Sao Paulo, Ribeirão Preto, SP 14049-900 Brazil*

* Corresponding author.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto
Av. Bandeirantes 3900, CEP 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Tel.: +55 16 36023038; fax: +55 16 36332301.

E-mail address: wadprado@fmrp.usp.br (WA Prado)

INTRODUCTION

Nicotine and nicotinic agonists have been known for many years to have analgesic properties. However, the high incidence and severity of side effects associated with these drugs has limited their clinical use. Recent studies on the analgesic effects of epibatidine, a nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) ligand (QIAN et al., 1993; SULLIVAN et al., 1994; BANNON et al., 1998), and other epibatidine derivatives such as ABT-594 (BANNON et al., 1998) have triggered a new interest on the mechanism of antinociception produced by nicotinic agonists. It has been postulated that nicotinic acetylcholine receptor agonists produce their antinociceptive effects predominantly via activation of descending inhibitory pain pathways originating in the brainstem regions, including the nucleus raphe magnus (BITNER et al., 1998; CUCCHIARO, 2005 and 2006).

Several studies have demonstrated that systemic administration of epibatidine has antinociceptive effect (BADIO; DALY, 1994; BONHAUS et al. 1995; RUPNIAK et al. 1994; SPANDE et al., 1992). Furthermore, when administered through it, the epibatidine induces a complex response, characterized by hyperactivity induced by touch, after low doses and intermittent vocalization after high doses of the same drug (KHAN et al., 1998). When evaluated the mechanical or thermal hyperalgesia induced by partial sciatic nerve injury, the administration it of epibatidine or nicotine induced antinociception (RASHID; UEDA, 2002).

Central modulation of pain involves the nucleus raphe magnus (NRM), dorsal raphe (DR), locus coeruleus (LC) and periaqueductal gray matter (CUCCHIARO 2005). The NRM can directly control pain transmission in the dorsal horn of the spinal cord via descending projections. The effects of the DR on the spinal cord are most likely mediated by its interconnection with the NRM (Wang and Nakai, 1994). The antinociceptive effects of the LC are probably mediated both by the DR and direct projections to the dorsal horn (PROUDFIT and CLARK, 1991] and (TJOLSEN et al., 1991). There is clear experimental evidence that the NRM (Bitner et al., 1998]) and (CURZON et al., 1998) and DR (CUCCHIARO et al., 2005) mediate the antinociception produced by epibatidine and the nicotinic agonist ABT-594. It is unknown whether the LC can also produce analgesia when stimulated with nicotinic agonists

The present study utilized a rat model of neuropathic pain to test if the ventrolateral PAG (vlPAG) is a target for epibatidine-induced antinociception or side effects. The effect of local administration of epibatidine into the PAG on nociceptive response and motor behavior was measured. These data have been then compared with those observed in rats that received systemic epibatidine.

METHODS

SUBJECTS

The experiments were conducted with male Wistar rats (140–160 g) from the main animalhouse of the University of São Paulo (USP; Campus of Ribeirao Preto), housed two to a cage with free access to food and water and maintained at an average ambient temperature of 23 ± 1 °C with a 12-hlight-dark cycle before and after surgery. The experiments were approved by the Commission of Ethics in Animal Resea8/2006). The proposals of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP were followed throughout the experiments.

SPINAL NERVE LIGATION (SNL)

Tight ligation of the L5/L6 spinal nerve was performed according to the method of KIM and CHUNG (1992). The rats were maintained under anesthesia with hydrate clorate 4% (1 ml/100 g, i.p.). After surgical preparation of the rats and exposure of the dorsal vertebral column from L4 to S2, the exposed L5 and L6 spinal nerves were tightly ligated with chromic catgut 5-0 suture. The incision was closed, and the animals were allowed to recover. Rats that exhibited motor deficiency or a lack of subsequent increased sensitivity to innocuous mechanical stimulation were excluded from additional testing. Sham control rats underwent the same operation and handling as the experimental animals, but without SNL.

CANNULA IMPLANTATION

Rats were anesthetized with tribromoethanol (50 mg/kg i.p.). A 12 mm length of a 23-gauge stainless steel guide cannula was implanted into the skull to lie 3.0 mm above the target site in the vIPAG. The stereotaxic coordinates (in mm) used were AP, 1.0 from the ear bars; L, -2.5 from the midline; and H, -3.1 from the skull surface, all taken from Paxinos and Watson's atlas (Paxinos and Watson, 1986). The guide cannula was then fixed to the skull with two steel screws and dental cement. After receiving penicillin (50 mg/kg i.m.), the animal was allowed to recover for 7 days before the microinjection.

ALGESIMETRIC TEST

Mechanical allodynia was tested in rats as previously reported (VIVANCOS et al., 2004). In a quiet room, rats were placed in acrylic cages (12×10×17 cm) with wire-grid floors 15–30 min before the start of testing. The test consisted of evoking a hind-paw flexion reflex with a hand-held force transducer (electronic anesthesiometer; IITC Life Science) adapted with a 0.7-mm² polypropylene tip. The investigator was trained to apply the tip perpendicularly to the central area of the hind paw with a gradual increase in pressure. The end point was characterized by the removal of the paw followed by clear flinching movements. After the paw withdrawal, the intensity of the pressure was automatically recorded, and the final value for the response was obtained by averaging the three measurements. The animals were tested before and after surgeries and treatments. The results are expressed by mean±SEM.

INTRACEREBRAL INJECTION

Drug or vehicle was microinjected intracerebrally using a glass needle (70-90 μm, o.d.) protected by a system of telescoping steel tubes. The assembly was inserted into the guide cannula and the needle advanced to protrude 0.5 mm beyond the guide cannula tip. The volume of microinjection was 0.5 μl, delivered at a constant rate over a period of 3 min. The needle was removed 20 s after completion of the injection.

ROTA-ROD

The Rota-rod (Ugo Basile, Comerio, Italy) consisted of a 7-cm diameter drum rotating at 10 rpm, and was used to assess motor ataxia of epibatidine injection. Each rat was placed on the drum for up to 2 min and the time of permanence was recorded on two occasions. An initial trial was conducted in normal rats and the time spent on the drum was taken as baseline in the test. Two hours later, each animal was injected with saline or epibatidine (3 or 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and 60 minutes later positioned on the drum for a post injection recording of the time of permanence.

HISTOLOGY

At the end of the experiments, each animal was deeply anesthetized with intraperitoneal sodium thiopental and perfused through the heart with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline. Fast green (0.3 μl) was injected through the guide cannula when the animal was used for intracerebral injection. The brain was removed and the dye spot localized from 50- μm serial coronal sections stained with neutral red, and identified on diagrams from the atlas of Paxinos and Watson. Only animals that had the electrode or dye spot position confirmed by histology were considered for data analysis. Microscope images were captured using a video camera (Sony Hyper HAD) linked to a Leica DMRB (Nussloch, Germany) microscope. Due to the electrode diameter and characteristics of electric current used in the study, no attempt was made to determine the position of the electrode tip in a particular layer of the cortical area.

DRUGS

Epibatidine hydrochloride, atropine and mecamlamine HCL USP were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and RBI (São Paulo, Brazil), respectively.

DATA ANALYSIS

Hind-paw flexion reflex latencies are reported as means \pm SEM. Comparisons between control (sham) and test groups were made by multivariate analysis of variance (MANOVA) with repeated measures to compare the groups over all times. The factors analyzed were treatments, time and treatment x time interaction. In the case of treatment x time interaction, one-way analysis of variance followed by Bonferroni post hoc test. The analysis was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. The level of significance was set at $P < 0.05$ in all cases.

RESULTS

It was demonstrated that the ligation of trunk lumbar (L5-L6) spinal nerve produce mechanical allodynia after two days post-operative and it was maintained for 28 days. Sham group and the contralateral paw had no change in the threshold response. The mechanical allodynia of rats that received systemic epibatidine (3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) was significantly lower than that observed in the control group

($p < 0.001$) (Fig. 1). The administration of systemic epibatidine (3.0 or 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) did not affect motor behavior (Fig. 2).

Central injection of epibatidine into the vIPAG (0,3 $\mu\text{g}/0,3 \mu\text{L}$) also had an antiallodinic effect. Mecamylamine injected into the vIPAG abolishes the antiallodinic effect of epibatidine injected systemically and centrally (vIPAG). These results show that the epibatidine injected either systemically or into the vIPAG produced an antiallodinic effect on the neuropathic pain model.

DISCUSSION

It was observed that ligation of the branches of L5 and L6 spinal nerves caused mechanical allodynia in the paw ipsilateral to the side on. Moreover, the mechanical allodynia measured by test von Frey was observed from the second day after ligation and continued until at least day 28, corroborating with the experiments of Kim, Chung (1992) who observed increased response to mechanical stimulation with von Frey filaments from the first day after ligation, extending for about ten weeks.

After the standardization of a nociceptive test that was not influenced by the possible decrease in body temperature caused by epibatidine was important to ensure that the dose used in this study did not cause motor disorders. To this end, we opted for the testing of the rota-rod before choosing the dose to the antinociceptive test. Doses of 3 or 5 mg / kg (ip) caused no significant decrease in length of stay of animals in the apparatus under test achieved 60 minutes after administration. Since lower doses of 5 mg / kg systemically caused antinociceptive effect in different studies (CUCCHIARO et al., 2005; CHUCCIARO et al., 2006; GILBERT et al. 2001; RAO et al., 1996) and that the dose of 3 mg / kg (ip) did not alter the residence time of the animals on the rota-rod, that dose was tested in relation to its antinociceptive effect in the model chosen for this study.

In fact, epibatidine (3.0 mg / kg, ip) reduced in a partial but statistically significant, the mechanical allodynia induced by nerve ligation in rats, the paw ipsilateral next connected. Recent studies show that nicotinic agonists have antinociceptive effect in different experimental models and, in some cases, the doses needed to cause antinociceptive effect also causes motor dysfunction. Kesingland et al. (2000) conducted a study that compared the antinociceptive effect of epibatidine with the ABT-594 ((R) -5 - (2-azetidilmetoxi)-2-chloro), a derivative of epibatidine with similar affinity for nicotinic receptors in three different models. The authors noted that both epibatidine, such as ABT-594, exhibited antinociceptive effect in tail flick test, reduced the mechanical hyperalgesia in neuropathic pain model, as described by Seltzer et al. (1990), and the model of inflammation induced by Freund's complete adjuvant. However, when the same doses can produce antinociceptive effects in these models were tested on the rota-rod, there was motor impairment.

Several studies have demonstrated that nicotinic agonists cause antinociception after systemic administration (ACETO et al. 1986; CUCCHIARO et al., 2005; CUCCHIARO et al. 2006; DAMAJ et al. 1998; ROGERS; IWAMOTO, 1993; SAHLEY; BERNSTONE, 1979; TRIPATHI et al., 1982), intracerebroventricular (ACETO et al. 1986; IWAMAMOTO, 1989; MOLINERO, DEL RIO, 1987, PHAN et al., 1973, RAO et al., 1996; SAHLEY, BERNTSON, 1979) and spinal (ACETO et al. 1986; CHRISTENSEN, SMITH, 1990; DAMAJ et al., 1995 and 1996; LAWANDA et al., 1999). However, Rogers, Iwamoto (1993) and Yakh et al. (1985) failed to show

antinociceptive effect after intrathecal administration of nicotine in rats. Moreover, spinal administration of nicotinic agonists such as nicotine and cytisine caused algogenic activity (restlessness induced by touch, escape behavior and vocalization), hypertension and tachycardia (GILLBERG et al., 1990, KHAN et al., 1994a, b, c, 1996). The presence of different subtypes of nicotinic receptors have been described today (GAO et al, 2010; MCGEHEE; ROLE, 1995) and may be the explanation for the diversity of effects observed after administration of such compounds, thus making it important to study the antinociceptive effects of agonists when administered by different routes (DAMAJ et al., 1998) and attracted great interest in the possible mechanism responsible for the antinociception produced by nicotinic agonists.

Despite the interest in relation to cholinergic mechanisms in multiple systems of pain modulation, little is known about which parts of the CNS cholinergic agonists produce antinociception. The rapid onset of action of cholinomimetic agents after icv administration leads to believe that the structures surrounding the ventricular system, particularly the septal area and SCP, may be involved in the antinociceptive effect of these substances (METYS et al., 1969). In fact, it was observed in this study that the microinjected vPAG epibatidine induces antinociceptive effect partial but statistically significant, on mechanical allodynia induced by nerve ligation in rats. In addition, the allodynic effect caused by microinjection of epibatidine in vPAG was abolished by mecamylamine, nicotinic antagonist, but not by atropine, muscarinic antagonist.

REFERENCE LIST

ACETO, M.D.; BAGLEY, R.S.; DEWEY, W.L.; FU, T.C.; MARTIN, B.R. The spinal cord as a major site for the antinociceptive action of nicotine in the rat. *Neuropharmacology*, v. 25, n. 9, p. 1031 – 1036, sep. 1986.

BADIO, B.; DALY, J.W. Epibatidine, a potent analgesic and nicotinic agonist. *Mol. Pharmacol.*, v. 45, n. 4, p. 563 – 569, Apr. 1994.

BANNON, A.W.; DECKER, M.W.; HOLLADAY, M.W.; CURZON, P.; DONNELLY-ROBERTS, D.; PUTTFARCKEN, P.S.; BITNER, R.S.; DIAZ, A.; DICKENSON, A.H.; PORSOLT, R.D.; et al. Broad-spectrum, non-opioid analgesic activity by selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Science*, v. 279, p. 77-81, 1998.

BITNER, R.S.; NIKKEL, A.L.; CURZON, P.; ARNERIC, S.P.; BANNON, A.W.; DECKER, M.W. Role of the nucleus raphe magnus in antinociception produced by ABY-594: immediate early gene responses possibly linked to neuronal nicotinic acetylcholine receptors on serotonergic neurons. *J. Neurosci.*, v. 18, n. 14, p. 5426-5432, jul. 1998.

BONHAUS, D.W.; BLEY, K.R.; BROKA, C.A.; FONTANA, D.J.; LEUNG, E.; LEWIS, R.; SHIEH, A.; WONG, E.H. Characterization of the electrophysiological, biochemical and behavioral actions of epibatidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 272, n. 3, p. 1199 – 1203, Mar. 1995.

CHRISTENSEN, M.K.; SMITH, D.F. Antinociceptive effects of the stereoisomers of nicotine given intrathecally in spinal rats. *J. Neural Transm. Gen. Sect.*, v. 80, n. 3, p. 189 – 194, 1990.

CUCCHIARO, G.; CHAIJALE, N.; COMMONS, K.G. The dorsal raphe nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the alpha4 nicotinic receptor agonist epibatidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 313, n. 1, p. 389-394, dec. 2005.

CUCCHIARO, G.; CHAIJALE, N.; COMMONS, K.G. The locus coeruleus nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the nicotinic receptor agonist, epibatidine. *Neuropharmacology*, v. 50, n. 7, p. 769 – 776, feb. 2006.

CURZON, A.L. NIKKEL, A.W. BANNON, S.P. ARNERIC and M.W. DECKER, Differences between the antinociceptive effects of the cholinergic channel activators A-85380 and (+/-)-epibatidine in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **287** (1998), pp. 847–853.

DAMAJ, M.I.; CREASY, K.R.; WELCH, S.P.; ROSECRANS, J.A.; ACETO, M.D.; MARTIN, B.R. Comparative pharmacology of nicotine and ABT-418, a new nicotinic agonist. *Psychopharmacology*, v. 120, n. 4, p. 483 – 490, aug. 1995.

DAMAJ, M.I.; WELCH, S.P.; MARTIN, B.R. Characterization and modulation of acute tolerance to nicotine in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 277, n. 1, p. 454 – 461, apr. 1996.

DAMAJ, M.I.; FEI-YIN, M.; DUKAT, M.; GLASSCO, W.; GLENNON, R.A.; MARTIN, B.R. Antinociceptive responses to nicotinic acetylcholine receptor ligands after systemic and intrathecal administration in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 284, n. 3, p. 1058 – 1065, mar. 1998.

GILBERT, S.D.; CLARK, T.M.; FLORES, C.M. Antihyperalgesic activity of epibatidine in the formalin model of facial pain. *Pain*, v. 89, n. 2 – 3, jan. 2001.

GILLBERG, P.G.; HARTVIG, P.; GORDH, T.; SOTTILE, A.; JANSSON, I.; ARCHER, T.; POST, C. Behavioral effects after intrathecal administration of cholinergic receptor agonists in the rat. *Psychopharmacology*, v. 100, n. 4, p. 464 – 469, 1990.

IWAMOTO, E.T. Antinociception after nicotine administration into the mesopontine tegmentum of rats: evidence for muscarinic actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 251, n. 2, p. 412 – 421, nov. 1989.

LAWAND, N.B.; LU, Y.; WESTLUND, K.N. Nicotinic cholinergic receptors: potential targets for inflammatory pain relief. *Pain*, v. 80, n. 1 – 2, p. 291 – 299, mar. 1999.

KESINGLAND, A.C.; GENTRY, C.T.; PANESAR, M.S.; BOWES, M.A.; VERNIER, J.M.; CUBE, R.; WALKER, K.; URBAN, L. Analgesic profile of the nicotinic acetylcholine receptor agonists, (+)-epibatidine and ABT-594 in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, v. 86, n. 1 – 2, may. 2000.

KHAN, I.M.; TAYLOR, P.; YAKSH, T.L. Cardiovascular and behavioral responses to nicotinic agents administered intrathecally. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 270, n. 1, p. 150 – 158, jul. 1994a.

KHAN, I.M.; YAKSH, T.L.; TAYLOR, P. Ligand specificity of nicotinic acetylcholine receptors in rat spinal cord: studies with nicotine and cytisine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 270, n. 1, p. 159 – 166, jul. 1994b.

KHAN, I.M.; PRINTZ, M.P.; YAKSH, T.L.; TAYLOR, P. Augmented responses to intrathecal nicotinic agonists in spontaneous hypertension. *Hypertension*, v. 24, n. 5, p. 611 – 619, nov. 1994c.

KHAN, I.M.; MARSALA, M.; PRINTZ, M.P.; TAYLOR, P.; TAKSH, T.L. Intrathecal nicotinic agonist-elicited release of excitatory amino acids as measured by in vivo spinal microdialysis in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 278, n. 1, p. 97 – 106, jul. 1996.

KHAN, I.M.; BUERKLE, H.; TAYLOR, P.; YAKSH, T.L. Nociceptive and antinociceptive responses to intrathecally administered nicotinic agonist. *Neuropharmacology*, v. 37, n. 12, p. 1515-1525, dec. 1998.

KIM, S.H.; CHUNG, J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, v. 50, n. 3, p. 355-363, sep. 1992.

McGEHEE, D.S.; ROLE, L.W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, p. 521 – 546, 1995.

METYS, J.; WAGNER, N.; METYSOVÁ, J.; HERZ, A. Studies on the central antinociceptive action of cholinomimetic agents. *Int. J. Neuropharmacol.*, v. 8, n. 5, p. 413 – 425, sep. 1969.

MOLINERO, M.T.; DEL RIO, J. Substance P, nicotinic acetylcholine receptors and antinociception in the rat. *Neuropharmacology*, v. 26, n. 12, p. 1715 – 1720, dec. 1987.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1986.

PHAN, D.V.; DODA, M.; BITE, A.; GYÖRGY, L. Antinociceptive activity of nicotine. *Acta Physiol. Acad. Scient. Hungaricae*, v. 44, p. 393 – 405.

PROUDFIT; F.M. CLARK, The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord, *Prog. Brain Res.* **88** (1991), pp. 123–141.

QIAN, C.; LI, T.; SHEN, T.Y.; LIBERTINE-GARAHAN, L.; ECKMAN, J.; BIFTU, T.; IP.S. Epibatidine is a nicotinic analgesic. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 250, n. 3, r. 13-14, dec. 1993.

RAO, T.S.; CORREA, L.D.; REID, R.T.; LLOYD, G.K. Evaluation of anti-nociceptive effects of neuronal nicotinic acetylcholine receptor (NACHR) ligands in the rat tail-flick assay. *Neuropharmacology*, v. 35, n. 4, p. 393 – 405, apr. 1996.

RASHID, H.; UEDA, H. Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its spinal GABA-mediated mechanism. *Brain Res.*, v. 953, n. 1-2, p. 53-62, oct. 2002.

ROGERS, D.T.; IWAMOTO, E.T. Multiple spinal mediators in parenteral nicotine-induced antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 267, n. 1, p. 341 – 349, oct. 1993.

RUPNIAK, N.M.; PATEL, S.; MARWOOD, R.; WEBB, J.; TRAYNOR, J.R.; ELLIOTT, J.; REEDMAN, S.B.; FLETCHER, S.R.; HILL, R.G. Antinociceptive and toxic effects of (+)-epibatidine oxalate attributable to nicotinic agonist activity. *Br. J. Pharmacol.*, v. 113, n. 4, p. 1487 -1493, Dec. 1994.

SAHLEY, T.L.; BERNTSON, G.G. Antinociceptive effects of central and systemic administrations of nicotine in the rat. *Psychopharmacology*, v. 65, n. 3, p. 279 – 283, nov. 1979.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, v. 43, n. 2, p. 205 – 218, nov. 1990.

SPANDE, T.F.; GARRAFFO, H.M.; YEH, H.J.; PU, Q.L.; PANNELL, L.K.; DALY, J.W. A new class of alkaloids from a dendrobatid poison frog: a structure for alkaloid 251F. *J. Nat. Prod.*, v. 55, n. 6, p.707 – 722, Jun. 1992.

SULLIVAN, J.P.; DECKER, M.W.; BRIONI, J.D.; DONNELLY-ROBERTS, D.; ANDERSON, D.J.; BANNON, A.W.; KANG, C.H.; ADAMS, P.; PIATTONI-KAPLAN, M.; BUCKLEY, M.J. et al. (+/-)-Epibatidine elicits a diversity of in vitro and in vivo effects mediated by nicotinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 271, n. 2, p. 624 – 631, nov. 1994.

TJOLSEN, O.G. BERGE and K. Hole, Lesions of bulbo-spinal serotonergic or noradrenergic pathways reduce nociception as measured by the formalin test, *Acta Physiol. Scand.* **142** (1991), pp. 229–236.

TRIPATHI, H.L.; MATTIN, B.R., ACETO, M.D. Nicotine-induced antinociception in rats and mice. Correlation with nicotine brain levels. *J. Pharm. Exp. Ther.*, v. 221, n. 1, p. 91-96, apr. 1982.

VIVANCOS GG, VERRI WA JR, CUNHA TM, SCHIVO IR, PARADA CA, CUNHA FQ, FERREIRA SH. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res.* 37(3):391-9, 2004.

YAKSH, T.L.; DIRKSEN, R.; HARTY, G.J. Antinociceptive effects of intrathecally injected cholinomimetic drugs in the rat and cat. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 117, n. 1, p. 81 – 88, oct. 1985.

WANG and Y. NAKAI, The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation, *Brain Res. Bull.* **34** (1994), pp. 575–585.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Time course of mechanical allodynia induced by ligation of nerves L5 and L6. Are represented threshold changes measured in the paws ipsilateral (IL) and contralateral paws (CL). The points represent the mean \pm SEM. (*), $P < 0.05$

Figure 2

Effect of intraperitoneal administration of epibatidine 3 or 5 μg / kg on performance in the rota-rod test. The drug or vehicle was administered immediately after the baseline reading w 60 minutes before testing. The bars represent mean \pm SEM of 06 animals per group.

Figure 3

Effect epibatidine (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) or saline (arrow) on the mechanical threshold measured in the ipsilateral paw (IL) and contralateral (CL) the tenth day after nerve ligation or sham surgery. Difference from Sham + Saline or ($^{\circ}$) for Ligation + Saline, $P < 0.05$.

Figure 4

Effect of microinjection of epibatidine (0,3 $\mu\text{g}/0,3 \mu\text{L}$) or saline in the ventrolateral periaqueductal gray on the mechanical threshold in ipsilateral paw (IL) and contralateral (CL) the tenth day after ligation nerve or sham surgery. (*) Difference Sham + Saline and ($^{\circ}$) difference Ligation + Saline, $P < 0.05$

Figure 5

Effect of microinjection of atropine (100 ng/0,3 μL) or saline in the ventrolateral periaqueductal gray on the allodynic effect induced by microinjection of epibatidine in the same nucleus in ipsilateral paws (IL) and contralateral (CL). (*) Difference from Saline + Saline and ($^{\circ}$) difference in Salina + Epibatidine, $P < 0.05$.

Figure 6

Effect of microinjection of mecamlamine (1 $\mu\text{g}/0,3 \mu\text{L}$) or saline in the ventrolateral periaqueductal gray on the allodynic effect induced by microinjection of epibatidine in the same nucleus in ipsilateral paws (IL) and contralateral (CL). (*) Difference from Saline + Saline $P < 0.05$.

Figure 7

Effect of microinjection of mecamlamine (1 $\mu\text{g}/0,3 \mu\text{L}$) or saline in the ventrolateral periaqueductal gray on the allodynic effect induced by systemic injection of epibatidine (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; i.p.) in ipsilateral paws (IL) and contralateral (CL). (*) Difference from Saline + Saline $P < 0.05$.

FIGURE 1:

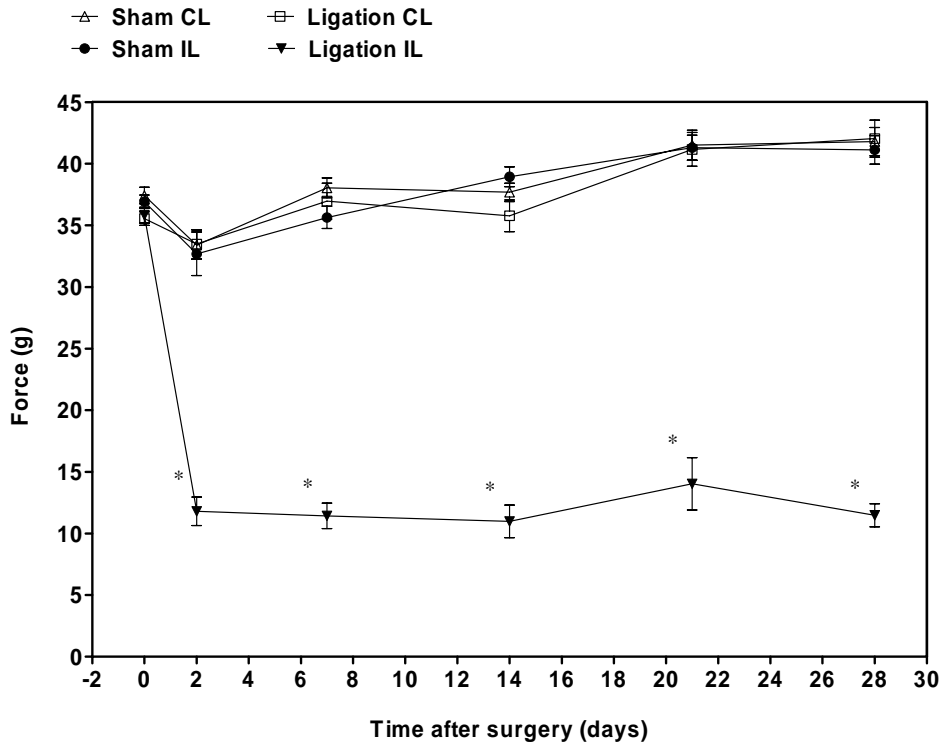


FIGURE 2:

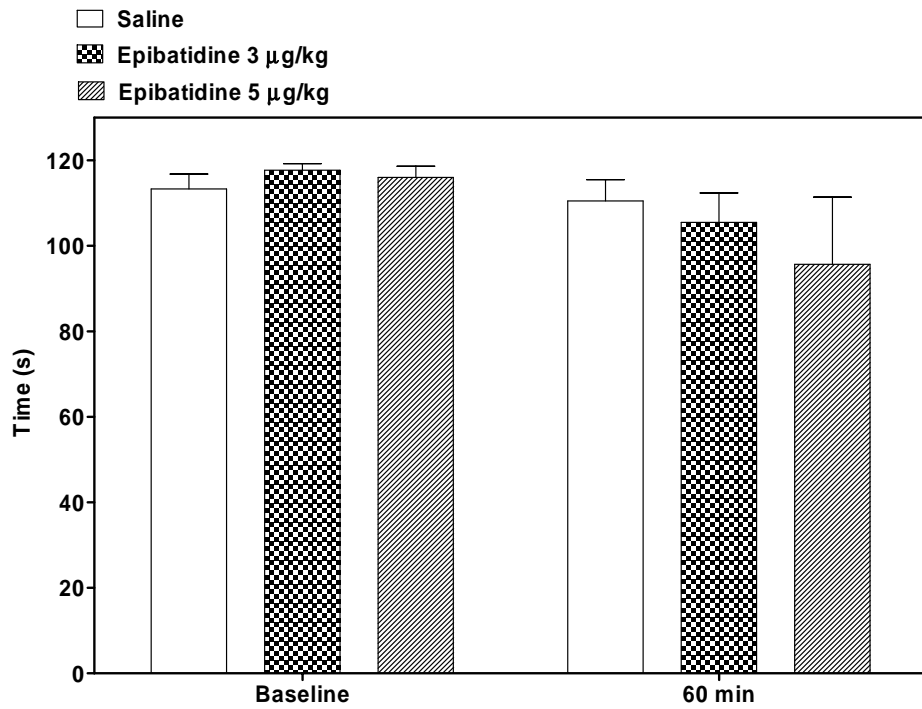


FIGURE 3:

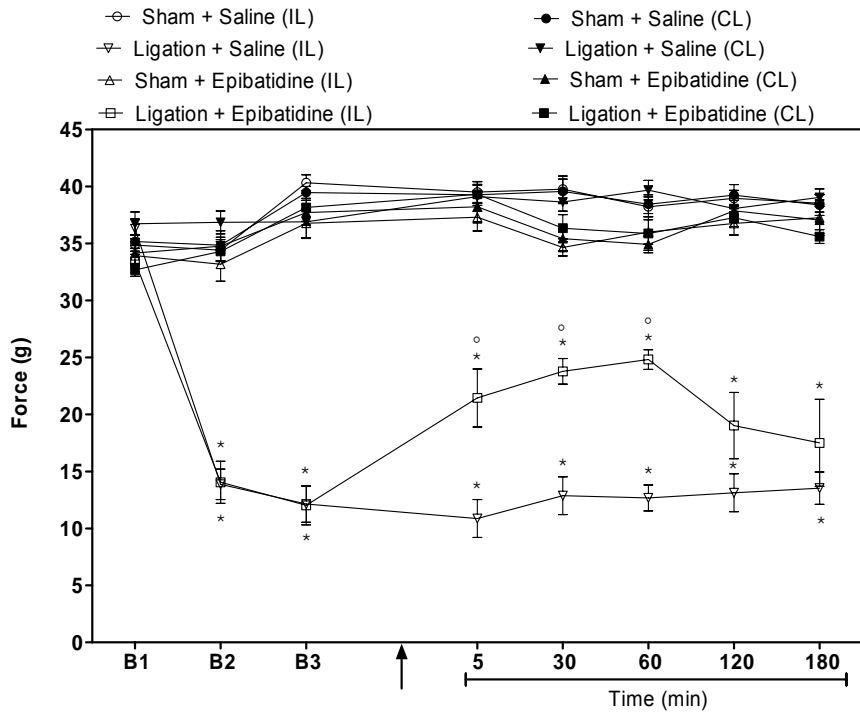


FIGURE 4:

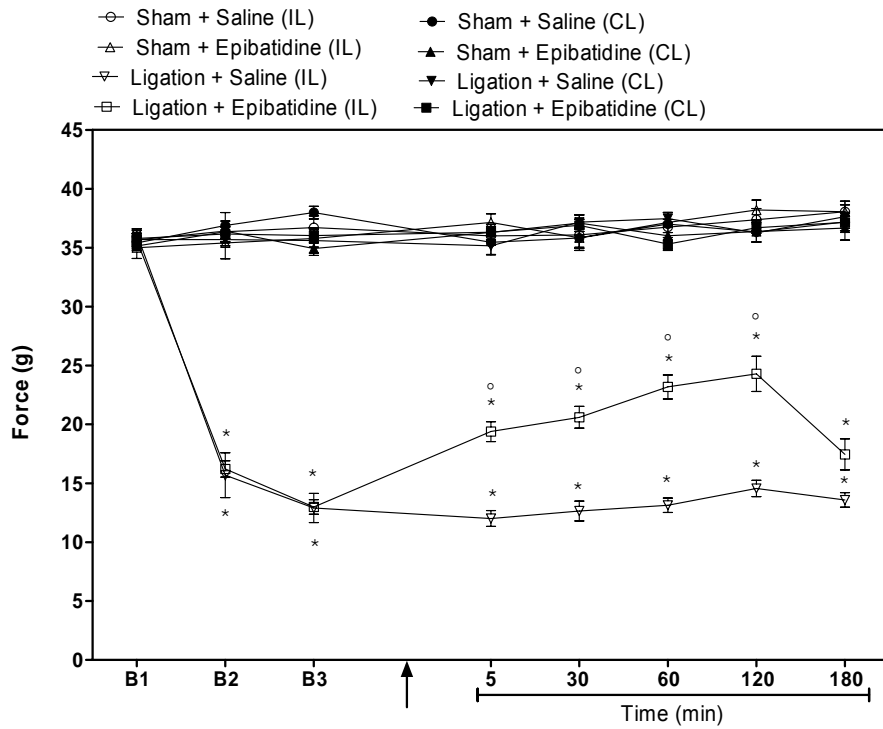


FIGURE 5:

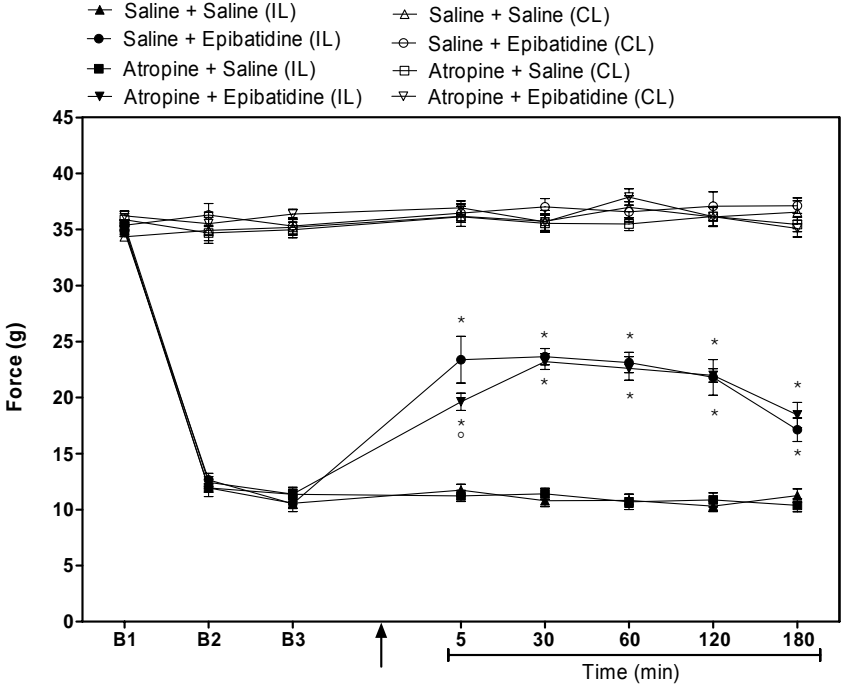


FIGURA 6:

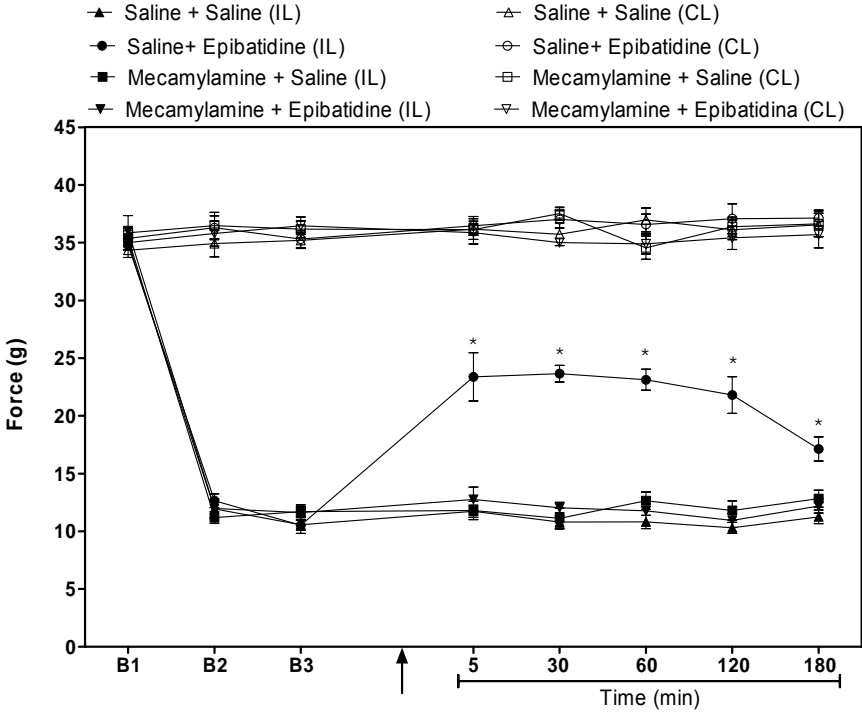
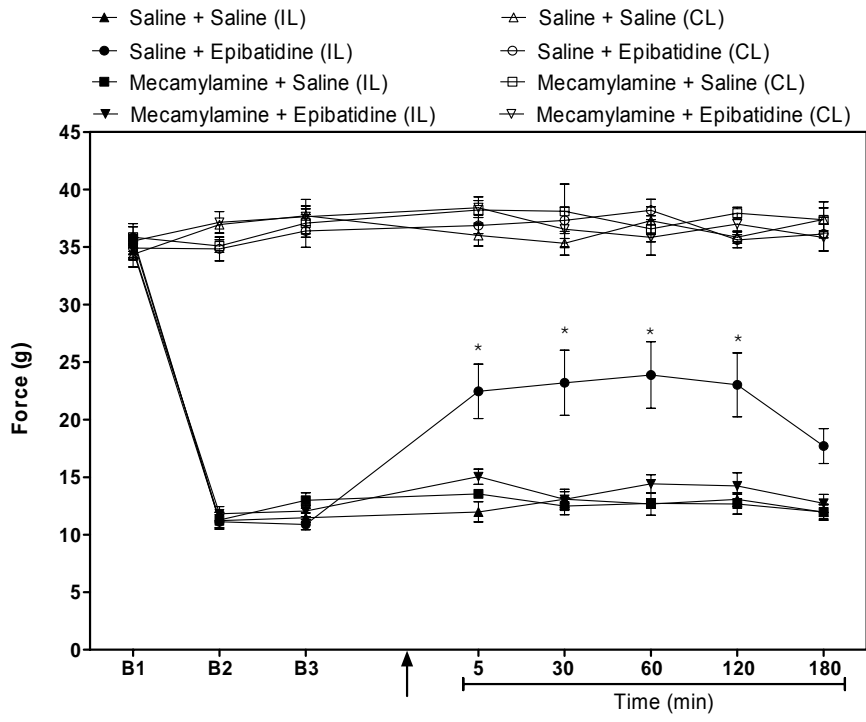


FIGURA 7:



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](#)