UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Psicologia e Educação

Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia

Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no corno dorsal da medula espinal na antinocicepção induzida pelo medo

Yara Fabrini dos Santos

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências de Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Psicobiologia

Ribeirão Preto, SP

-2010-

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Yara Fabrini dos Santos

Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no corno dorsal da medula espinal na antinocicepção induzida pelo medo

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências de Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Psicobiologia

Orientador: **Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza**

Ribeirão Preto, SP

-2010-

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Fabrini-Santos, Yara

Papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no corno dorsal da medula espinal na antinocicepção induzida pelo medo. Ribeirão Preto, 2010.

57 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Nunes-de-Souza, Ricardo Luiz.

1. Camundongos. 2. Corno dorsal da medula. 3. Antinocicepção. 4. NMDA. 5. Óxido Nítrico .6. Glutamato. 7. Labirinto em cruz elevado.

Dedico esse trabalho...

A minha mãe, meu exemplo de vida, que me ensinou que quando se tem um sonho deve-se correr atrás, pois nada nessa vida vem de graça. Ao meu pai que mesmo do jeito dele sempre me apoiou e incentivou. E por fim, ao meu amor pela presença incondicional e pelo apoio de todos os dias.

AMO VOCÊS!!!

“ É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver”

(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por trilhar meus caminhos e abençoar minhas escolhas sempre. "Tudo posso naquele que me fortalece"

Ao Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, pelos ensinamentos, orientação e confiança, mesmo nos momentos em que eu desanimava, agradeço também pelos diversos momentos de risadas na copinha do laboratório. Você é um grande exemplo!

Às técnicas do laboratório Rosana e Bete, que com o passar do tempo se tornaram grandes amigas e companheiras.

À minha amiga e excelente secretária do PANT, Tirene que sempre esteve à disposição para ajudar.

À secretária do programa de Psicobiologia, Renata Vicentini pela competência e dedicação e por me ajudar sempre que precisei.

Aos professores Cleópatra Planeta e Francisco Fracasso pela amizade e convivência durante esses dois anos de trabalho.

Aos funcionários do Biotério e Transporte da FCFAr da UNESP e também aos funcionários da Secção de Apoio.

Aos meus grandes amigos da Psicobiologia, Juliana, Carol, Eduardo (Dudu), Roberto, Eduardo (Niquito) e Ravier por me agüentar sempre em Ribeirão e pelas infinitas horas de conversas na cantina do seu Zé. Um

agradecimento especial a minha amiga Jú por sempre abrir as portas da sua casa quando precisei.

Ás minhas amigas de republica em Ribeirão, Juliana, Denise e Juzinha, amei conviver esses poucos meses com vocês!

Ás minhas amigas de Bragança, Gandini, Taciana, Helena, Talita (Tatola), Vanessa (Penélope), Ana Ligia por sempre me incentivar e fazer rir nas horas mais difíceis. Pelos nossos encontros de todo ano onde podíamos matar a saudade!

Ás minha amigas de Fartura, Carol, Tatola, Paulinha, Talitinha, Analu, Bruna, pela companhia incondicional, pelas idas ao Espetinho para tomar aquela cervejinha e relaxar, pelas horas de conversas dando risadas da Carol (desculpa amiga). Enfim, meninas vocês sempre estarão guardadas em meu coração.

Agradeço aos meus queridos tios Neto e Jô, por me carregarem para todos os cantos durante todos esses anos.... Já rodamos muito! Amo vocês.

Aos meus avós (Ivone, José Vieira, Cinira e Leonel) que sempre me apoiaram em todas as circunstâncias. Nunca esquecerei o que minha avó Ivone me disse: Filha, estudo é a única coisa que ninguém tira de você, então, siga em frente! Vocês são tudo pra mim!

Aos meus grandes amores, Ygor, Yago e Miguel, obrigada por alegrar meus dias, cada um com seu jeito. Vocês são tudo pra mim!

Aos meus "bonsdrastos"Isabeli e Valdeci por me acolher em suas vidas de uma maneira que jamais irei esquecer! Amo vocês.

Aos meus professores da graduação, pois foi através deles que me apaixonei pela Farmacologia, vendo os desenhos do professor Carlos e suas explicações que me deixava fascinada. Meu muito obrigada a todos vocês!

Ás minhas amigas e vizinhas de Araraquara, Nilva, Miriane e Samira, obrigada pela companhia.

Aos meus grandes amigos e amigas de Araraquara e companheiros de laboratório, Vanessa, Roberta, Paulinha, Joyce, Alianda, Tati, Renata, Kelciane, Ana Cláudia, Cássia, Karina, Sheila, Egberto, Marcelo, Fabio, Tarciso, Diego, Leonardo, Alexandre, Paulão e Vampeta. Obrigada a todos vocês que me ajudaram todos esses dias desde o momento em que entrei no laboratório, cada um da sua maneira, alguns me fazendo rir, outros me ensinando tudo o que precisava aprender, outros me confortando nos momentos de tristeza e desanimo.

Á UNESP/Araraquara pelo espaço cedido para a realização desse trabalho.

Á CAPES pelo apoio financeiro e por ter confiado em meu trabalho.

Á FFCLRP por ter me dado a oportunidade de realizar meu trabalho e por proporcionar a divulgação do trabalho diversos congressos.

"Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações. Pois boas lembranças são marcantes, e o que é marcante nunca se esquece! Uma grande amizade mesmo com o passar do tempo é cultivada assim!

Vinícius de Moraes.

SUMÁRIO

RESUMO **11**

ABSTRACT **13**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS **15**

1. INTRODUÇÃO **16**

1.1. Neurofisiologia da Dor 17

1.2. Modulação da Dor 20

1.3. Mediadores Químicos 24

1.3.1. Glutamato/NMDA 24

1.3.2. Óxido Nítrico (NO) 26

2. OBJETIVOS **29**

2.1. Objetivos Gerais 30

2.2. Objetivos Específicos 30

3. MATERIAIS E MÉTODOS **31**

3.1. Drogas 32

3.2. Injeção Intratecal.....32

3.3. Teste da Formalina.....33

3.4. Aparatos..... 34

3.5. Procedimentos.....35

3.5.1. Padronização das doses do NMDA.....35

3.5.2. Efeito da injeção intratecal do NMDA no tempo de lambidas na pata de animais submetidos ao teste da formalina.....35

3.5.3. Efeito da injeção intratecal do NMDA na antinocicepção induzida pela exposição dos animais ao LCE aberto.....35

3.5.4. Padronização das doses do L-NAME.....35

3.5.5. Efeitos da injeção intratecal do L-NAME sobre a ação anti-antinociceptiva do NMDA em camundongos expostos ao LCEa..... ...36

3.5.6. Análise estatística.....36

4. RESULTADOS.....37

5. DISCUSSÃO.....42

6. CONCLUSÃO.....49

REFERÊNCIAS.....51

RESUMO

Quando confrontado com situações de medo os roedores apresentam respostas comportamentais (ex., luta, fuga, imobilidade e vocalização) e neurovegetativas (taquicardia, hipertensão e defecação) que caracterizam a reação de defesa. Em geral essas respostas são acompanhadas de antinocicepção. Estudos demonstram um papel do óxido nítrico (NO) e de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) na mediação de respostas nociceptivas no corno dorsal da medula espinal. Resultados do nosso laboratório demonstraram que a exposição a uma situação ameaçadora, como o labirinto em cruz elevado aberto ou sem paredes (LCEa), provoca antinocicepção de alta magnitude em ratos e camundongos. Assim, o presente estudo teve por objetivo investigar o papel do complexo receptor glutamato/NMDA e NO no corno dorsal da medula espinal na resposta antinociceptiva induzida pela exposição ao LCEa. Camundongos receberam injeção por via intratecal (i.t.) de NMDA (0; 0,4 ou 0,8 nmol/5,0 µl) para avaliar seus efeitos intrínsecos sobre a nocicepção. Enquanto a dose de 0,8 nmol de NMDA provocou efeitos nociceptivos, a dose de 0,4 nmol se mostrou desprovida de efeitos. Em seguida, nosso estudo avaliou os efeitos do NMDA (0; 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol, i.t.) na nocicepção induzida pela injeção de formalina 2,5% na pata traseira direita do camundongo. Nenhuma dose de NMDA aumentou o tempo de lambidas na pata durante os 10 minutos do teste. Assim, investigamos os efeitos da injeção i.t. de NMDA (0; 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol) na antinocicepção induzida pela exposição ao ambiente aversivo (LCEa) ou não aversivo (LCE fechado: quatro braços com paredes; LCEf) em camundongos pré-tratados com formalina a 2,5% na pata traseira direita, durante 10 minutos. O tratamento com NMDA (0,4 nmol) reverteu parcialmente a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa, sem afetar a resposta dos animais expostos ao LCEf. Para avaliar se os efeitos anti-antinociceptivos do NMDA (0,4 nmol) dependem da síntese de NO, camundongos receberam injeção i.t. combinada de L-NAME (N-nitro-L-arginina-metil-éster), um inibidor da NOS, e NMDA. O pré-tratamento com L-NAME (40 nmoles/5,0 µl i.t.) bloqueou seletivamente os efeitos anti-antinociceptivos do NMDA. Tomados em conjunto, nossos resultados sugerem que a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa pode ser parcialmente revertida pela ativação de receptores NMDA e indicam que esse efeito depende da síntese de NO no corno dorsal da medula espinal de camundongos.

ABSTRACT

Rodents exposed to threatening situations (e.g., prey-predator interactions) usually display defensive behaviors (e.g., fight, flight, freezing, vocalization), and neurovegetative (e.g., tachycardia, hypertension, defecation) responses characterized as a fear reaction. Commonly, these responses are accompanied by antinociception. Evidence showing that the glutamate NMDA (N-methyl-d-aspartate) receptor and nitric oxide (NO) complex located within the dorsal horn of the spinal cord in the mediation of the nociceptive response have instigated researchers to investigate the role of the NMDA/NO on some types of fear-induced antinociception. This study investigated the role of the glutamate-NMDA receptor complex and NO in the dorsal horn of the spinal cord of mice in the antinociception induced by a potentially aversive situation, i.e., an exposure to an open elevated plus maze (oEPM: four open arms). Mice were intrathecally (i.t.) injected with N-methyl-D-aspartic acid (NMDA: 0, 0.4 or 0.8 nmol/5.0 µl) to assess its intrinsic effects upon nociception. Results showed that NMDA at 0.8 nmol, but not at 0.4 nmol, was able to induce intrinsic nociceptive effect. When injected in animals pre-treated with formalin 2.5% into the right hind paw (nociceptive test), NMDA (0, 0.1, 0.2 or 0.4 nmol, i.t.) did not change time spent licking the formalin injected paw. Then, we investigated the effects of NMDA injection (0, 0.1, 0.2 or 0.4 nmol, i.t.) on nociceptive response induced by formalin test in mice exposed to the oEPM (aversive situation) or enclosed EPM (eEPM: four enclosed arms; control situation) for 10 minutes. NMDA treatment (0.4 nmol) partially reversed the antinociception induced by oEPM exposure without affect nociception in mice exposed to the eEPM. Finally, we investigated whether the anti-antinociceptive effect of NMDA would be dependent on NO synthesis by injecting L-NAME (N-nitro-L-arginine-methyl-ester) i.t., a inhibitor of NOS (nitric oxide synthase), 10 minutes before NMDA injection. L-NAME pretreatment (40 nmol/5.0 µl; i.t.) selectivelly blocked anti-antinociceptive effect of NMDA 0.4 nmol. Taken together, our results suggest that antinociception induced by oEPM exposure (*i*) is, at least in part, reversed by NMDA receptors activation and (*ii*) this NMDA effect seems to be dependent on NO synthesis within the dorsal horn of the spinal cord in mice.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA: α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato

ATP: Adenosina tri-fosfato

BDNF: Fator neurotrófico derivado do encefálo

CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitocina

GMPc: guanosina monofosfato ciclase

I.t: Injeção intratecal

LCE: Labirinto em cruz elevado

LCEa: Labirinto em cruz elevado aberto

LCEf: Labirinto em cruz elevado fechado

LNAME: N-nitro-L-arginina-metil-éster

MCP: Matéria cinzenta periaquedutal

MK801: Maleato de Dizocilpina

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

NOe: Óxido nítrico endotelial

NOi: Óxido nítrico induzível

NOn: Óxido nítrico neuronal

NOS: Óxido nítrico sintase

NPLA: Nω-propil-L-arginina

PKG: Proteína quinase dependente de GMPc

SBNeC: Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento

SNC: Sistema nervoso central

TrK: Receptor do tipo tirosina quinase

TNF-α: Fator α de necrose tumoral

α1-ARs:adrenoreceptores

1.INTRODUÇÃO

1.1. Neurofisiologia da Dor

Antigamente acreditava-se que a dor fosse uma punição dos deuses, demônios e espíritos. A palavra dor, derivada do Latim *peone* e do Grego *poine,* significa penalidade ou punição. Aristóteles a considerava como um sentimento, e a classificou como uma paixão, onde o coração é a fonte ou o centro de seu processamento. Este conceito Aristotélico perdurou por dois mil anos, apesar de Descartes, Galeno e Vesalius postularem que a dor era um sentimento em que o cérebro tinha um papel muito importante (STIMMEL, B, 1983[1] apud BAUMANN; STRICKLAND, 2008). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (1979), podemos defini-la como "uma experiência emocional e sensorial desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou ainda descrita em termos de tal lesão" (BOND, 2006). No entanto, a dor é uma experiência complexa que não envolve somente a transdução de estímulos nocivos advindos do ambiente, mas principalmente seu processamento cognitivo emocional, realizado pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (JULIUS; BASBAUM, 2001). Desse modo, temos mecanismos modulatórios atuando em regiões, tais como, as terminações nervosas livres, o corno dorsal da medula espinal e nas estruturas supraespinais (MILLAN, 1999).

Há aproximadamente cem anos, Sherrington (SHERRINGTON, 1906[2], *apud* JULIUS; BASBAUM, 2001) propôs a existência de nociceptores (receptores para estímulos nocivos), localizados em fibras aferentes primárias que são ativadas por estímulos capazes de provocar uma lesão no tecido (JULIUS; BASBAUM, 2001). Essas fibras aferentes respondem a modalidades de estímulos diferentes (nociceptores polimodais), e estímulos com propriedades específicas (estímulos térmicos e mecânicos) (MEYER et al., 2006). São encontradas tanto em estruturas somáticas (osso, pele, tecido conjuntivo e músculo) como em estruturas viscerais (órgãos semelhantes ao pâncreas e intestino) (BAUMANN; STRICKLAND, 2008). Além disso, podem ser divididas em três grandes grupos, segundo critérios funcionais e anatômicos. Aquelas que possuem largo diâmetro,

---

[1] STIMMEL, B. Pain, Analgesia and Addiction. **The Pharmacology of Pain**. New York: Raven Press. p.1,-2, 1983.
[2] SHERRINGTON, C.S. The Integrative Action of the Nervous System. **Scribner**. New York.1906

denominadas de fibras aferentes Aβ mielinizadas, de rápida velocidade de condução (> 2 m/s). A maior parte, mas não todas as fibras Aβ, possui terminais periféricos especializados em detectar estímulos de baixa intensidade, detectando assim estímulos inócuos que não contribuem com a dor. Entretanto, há também fibras de pequeno e médio diâmetro que possuem terminais periféricos especializados em detectar estímulos com altos limiares, requisitando assim, estímulos nocivos para ativá-las e então produzirem dor. Entre elas estão fibras amielinizadas de baixa velocidade de condução (< 2 m/s), denominadas fibras C e fibras mielinizadas com uma velocidade de condução um pouco mais rápida (> 2 m/s), denominadas fibras Aδ. Há duas classes principais de fibras do tipo Aδ: ambas respondem a estímulos mecânicos intensos, mas podem ser distinguidas por sua capacidade de responder a estímulos de calor intenso ou como são afetadas pela lesão tecidual. A maioria das fibras C é considerada como nociceptores polimodais, pois respondem a modalidades diferentes de estímulos. Sendo ativadas por estímulos nocivos mecânicos e térmicos, algumas são insensíveis a estímulos mecânicos, mas respondem ao calor nocivo. A maioria delas também responde a estímulos químicos nocivos, como ácido ou capsaicina (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM; WOOLF, 1999; HUNT; MANTHY, 2001). Por fim, há um tipo de nociceptores chamado de “nociceptores silenciosos” ou “adormecidos”, que passam a ser ativados apenas quando sensibilizados por lesão tecidual (JULIUS; BASBAUM, 2001).

As fibras aferentes primárias são responsáveis por transformar diferentes tipos de estímulos em despolarização de membrana celular codificados em potenciais de ação propagantes para que então ocorra a liberação do neurotransmissor na sinapse espinal ou no final do nervo periférico (JULIUS; MCCLESKEY, 2006). A conexão entre as fibras aferentes primárias e os neurônios de segunda ordem envolve a liberação de vários neurotransmissores, entre eles, glutamato, substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitocina (CGRP). Uma série de eventos que influenciam o processamento da dor pode ser explicado pela interação entre receptor e neurotransmissor nessas sinapses presentes no corno dorsal da medula. Por exemplo, a estimulação por estímulos nocivos e não nocivos de fibras Aβ que se projetam para essa região da

medula juntamente com outras fibras nociceptivas podendo levar a um efeito inibitório da transmissão da dor (BAUMANN; STRICKLAND, 2008).

O corno dorsal da medula espinal é dividido em uma série de lâminas, baseando-se em critérios citoarquitetônicos como, diferenças de tamanho e densidade dos neurônios. As lâminas I e II são frequentemente chamadas de superficiais e constituem o principal alvo das fibras aferentes primárias. Entretanto, lâminas mais profundas (III e IV) também possuem um papel importante na dor (TOOD; KOEBER, 2006). As fibras aferentes primárias (Aδ, Aβ e C) penetram pela raiz dorsal e terminam principalmente nas lâminas I, II e V do corno dorsal da medula, onde efetuam sinapses com neurônios de segunda ordem ou com os interneurônios (CRAIG, 2003). Sendo assim essa região da medula espinal funciona como uma estação relé para a transmissão da dor de estruturas periféricas para algumas regiões no encéfalo (MELLO; DICKENSON, 2008).

Em resumo, após a injúria, ocorre a transmissão da dor até o corno dorsal através das fibras aferentes primárias, e daí essa informação é conduzida até o encéfalo, através de vias ascendentes (MELLO; DICKENSON, 2008).

Após interações diretas ou indiretas com neurônios de projeção do corno dorsal da medula espinal, os axônios de neurônios de segunda ordem constituem fascículos que formam feixes ou vias que transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas encefálicas e diencefálicas incluindo, tálamo, matéria cinzenta periaquedutal (MCP), região parabraquial, formação reticular, complexo amidalóide, núcleo septal e hipotálamo, dentre outras (ALMEIDA, 2004).

A neuroanatomia e organização dessas vias ascendentes da dor são altamente complexas. Existem dois principais tipos de vias ascendentes identificadas, as quais podem ser convenientemente chamadas de vias mono ou polissinápticas. As vias monossinápticas incluem os feixes: espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, espinoparabraquio-amidalóide, espinoparabraquio-hipotalâmico, espino-hipotalâmico e neoespinotalâmico. Essas vias são filogeneticamente mais recentes, projetam-se diretamente para estruturas encefálicas e estão relacionadas com a transmissão da dor rápida ou

aguda, possuem poucas sinapses, sendo a primeira na medula, a segunda no complexo ventral posterior do tálamo e a terceira no córtex somatossensorial primário. Já as vias polissinápticas (trato paleoespinotalâmico, espinocervical e coluna dorsal polissináptica) são vias mais recentes que possuem várias estações relés em estruturas bulbares, pontinas e mesencefálicas antes de alcançar estruturas prosencefálicas, são responsáveis por conduzir a informação nociva em baixa velocidade e estão relacionadas com a dor lenta ou crônica (MILLAN, 1999; DOSTROVSKY; CRAIG, 2006; ALMEIDA, 2004).

Dependendo de suas características a dor pode ser classificada em aguda ou crônica. A dor crônica se caracteriza por ser persistente e que ultrapassa o dano causado e/ou a injúria no nervo. Pode ser espontânea (não é eliciada por estímulos externos), provocada pela presença da hiperalgesia (um aumento da dor, o qual é desencadeado por estímulos nocivos de baixa intensidade) e/ou pela alodinia (dor eliciada normalmente por estímulos não nocivos). A dor crônica não possui um papel fisiológico, ou seja, não tem valor adaptativo. Ao contrário da crônica, a dor aguda possui a função de proteger nosso organismo contra influências externas danosas, através da ativação fásica de nociceptores por estímulos nocivos. Desde modo, evoca respostas protetoras, como reação de fuga e/ou retirada motora para que cesse a exposição ao estímulo nocivo, assim eliminando-a (MILLAN, 1999).

1.2. Modulação da Dor

A relação entre a intensidade da dor e o estímulo periférico que a evoca depende de inúmeras variáveis que incluem a presença de outro estímulo somático e fatores psicológicos como atenção, expectativa e alerta. Estes fatores psicológicos em questão são influenciados por dicas contextuais que ditam a significância do estímulo e ajudam a determinar uma resposta apropriada. Por exemplo, indivíduos que sofreram alguma injúria traumática durante competições ou combates frequentemente relatam ausência de dor, apesar dessa mesma injúria ser extremamente dolorosa em outras circunstâncias. A modificação da resposta neural, comportamental e subjetiva da dor por estímulos sensoriais

concomitantes e por situações de alerta, expectativa e atenção resulta na ativação de redes no sistema nervoso central que modulam a transmissão nociceptiva (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

Deste modo, em certas condições, tanto a dor como a sua ameaça pode eliciar diferentes respostas comportamentais, endócrinas (secreção de corticosterona) e ativação simpática (taquicardia e hipertensão) que, juntas com a resposta de antinocicepção transitória, melhoram o desempenho do repertório comportamental, permitindo o sucesso frente a encontros agressivos (ex., numa interação presa *vs* predador) e outras situações que ameace a integridade do indivíduo (MILLAN, 1999). O sistema de modulação da dor foi proposto primeiramente por Head e Holmes no início de 1911, entretanto, a existência de um sistema específico modulatório da dor foi discutido em detalhes em 1965, por Melzack e Wall (MELZACK; WALL, 1965[3] apud FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

O mecanismo supracitado faz parte das vias inibitórias descendentes, onde o sistema defensivo é ativado frente a situações de estresse ou medo, o que permite ao animal exibir respostas defensivas ao invés de gastar seu tempo com comportamentos recuperativos, promovendo um aumento nas chances de sobrevivência. Neste sentido, segundo Bolles e Fanselow (1980) a inibição da resposta nociceptiva é de fundamental importância para a sobrevivência do indivíduo (BOLLES; FANSELOW, 1980[4] *apud* HARRIS, 1996).

O sistema inibitório descendente tem como estrutura essencial à matéria cinzenta periaquedutal (MCP). A estimulação dessa área em animais produz analgesia, enquanto as respostas a outros estímulos ambientais (alerta e atenção) permanecem intactas. Entretanto, estão ausentes as respostas esperadas com aplicação de estímulos nocivos como orientação, vocalização e fuga. Esse mesmo efeito observado em animais também pode ser observado em

---

[3] MELZACK, R; WALL, P.D. Pain Mechanisms: a new theory. **Science**. v. 150, p971-979, 1965.

[4] BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, Amsterdam, v. 3, p. 291-322, 1980.

pacientes com dores crônicas, onde a estimulação da MCP produz analgesia sem que ocorra qualquer outro tipo de resposta defensiva, como, por exemplo, a fuga. A descoberta desse papel da MCP foi de grande valor para o avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos na modulação da dor (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006). Corroborando as citações acima, pesquisas vêm demonstrando que a MCP faz parte de um circuito do sistema nervoso central (SNC) que controla a transmissão nociceptiva processada na medula espinal (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991).

Neste sentido, neurônios do corno dorsal da medula espinal são inibidos pela estimulação dessa estrutura, e lesões no funículo dorso lateral bloqueiam a inibição do SNC sobre neurônios do corno dorsal e respostas reflexas nocifensivas. Entretanto, além da MCP, diferentes áreas (amígdala, hipotálamo, *locus coeruleus* e núcleo magno da rafe) podem ser ativadas tanto por medo inato (p. ex., predador) ou medo apreendido, levando o animal a exibir diferentes respostas comportamentais, autonômicas bem como a redução da sensibilidade à dor (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006; HARRIS, 1996 LESTER; FANSELOW, 1985; KAVALIERS, 1988). Sendo assim, diante de situações ameaçadoras (ex., predador), os animais apresentam um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas geralmente acompanhadas por antinocicepção (p. ex., KELLY, 1986; RODGERS, 1995).

O estudo desses mecanismos modulatórios da dor tem sido muito desafiador. Entretanto, um significante progresso tem sido feito, e várias estruturas e fatores envolvidos com sua ativação elucidados (FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006).

Os mecanismos subjacentes a antinocicepção induzida pelo medo têm sido alvo de muitas investigações, levando para tal fim o emprego de modelos animais originalmente desenvolvidos para o estudo da ansiedade. Neste intuito, o labirinto em cruz elevado (LCE) tem sido usado para avaliar se o medo desencadeado pela exposição ao aparato também altera a nocicepção (LEE; RODGERS, 1990; TAUKULIS; GOGGIN, 1990, CONCEIÇÃO et al., 1992).

O LCE é um modelo animal de ansiedade originalmente descrito por Pellow et al., (1985), usando ratos como sujeitos experimentais, sendo posteriormente validado para camundongos (STEPHENS et al., 1986; LISTER, 1987). Este modelo baseia-se no medo natural de roedores a espaços abertos e é frequentemente usado para avaliar a ansiedade bem como o potencial ansiolítico ou ansiogênico de drogas. Sendo assim, quando o animal é colocado no centro do labirinto (no cruzamento entre os braços), o qual possui dois braços abertos unidos perpendicularmente a dois braços fechados, demonstra preferência pela a exploração do compartimento fechado. Este modelo elicia no animal reações de conflito associadas, por um lado, aos impulsos exploratórios (exemplo, reconhecimento do ambiente) e, por outro, a aversão desencadeada pelos locais abertos.

Recentes resultados em nosso laboratório demonstraram que a exposição de camundongos aos LCE padrão, fechado (semelhante ao padrão, porém com todos os braços protegidos por paredes) ou aberto (também semelhante ao LCE padrão, porém com todos os braços sem paredes) interfere de maneira diferencial na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na pata. Enquanto a exposição ao LCE padrão não altera consistentemente a resposta nociceptiva, a exposição ao LCE aberto resulta em expressiva antinocicepção (MENDES-GOMES; NUNES-DE-SOUZA, 2005). Tais resultados sugerem que a situação de conflito gerada pela exposição ao LCE padrão mostra-se insuficiente para ativar mecanismos inibitórios da dor. Entretanto, quando expostos a uma situação de perigo iminente e inescapável, como o LCE aberto, a antinocicepção é evidenciada. Segundo Mendes-Gomes e Nunes-de-Souza (2005), a injeção intra-MCP de midazolam não altera a antinocicepção induzida pelo LCE aberto no teste de formalina, sugerindo, portanto, que os receptores benzodiazepínicos desta estrutura mesencefálica não participam da mediação dessa resposta. Corroborando esses resultados, Miguel (2006) concluiu que a injeção intra-MCP de inibidores da síntese de óxido nítrico (NO), como o NPLA (Nω-propil-L-arginina) não reverte a antinocicepção induzida pela exposição ao LCE aberto. No entanto, a injeção intra-MCP de NPLA foi capaz de reverter a antinocicepção provocada pela injeção de NMDA nessa mesma estrutura mesencefálica

(MIGUEL; NUNES-DE-SOUZA, 2006). Esses resultados inconsistentes apontam para a necessidade de novas investigações sobre o papel do óxido nítrico da MCP na antinocicepção induzida por estímulos aversivos ambientais, como a exposição ao LCE aberto.

1.3. Mediadores químicos

As injúrias ou as enfermidades frequentemente resultam em dor ou hiperalgesia. Estes eventos sensoriais anormais têm origem, pelo menos em parte, na ativação de mediadores inflamatórios em fibras aferentes primárias de neurônios nociceptivos (McMAHON; BENNETT; BEVAN, 2006). Temos também mediadores químicos atuando na transmissão da resposta nociceptiva no SNC. Dentre os vários mediadores químicos da dor (central e/ou periférico), o glutamato, o óxido nítrico, a substância P, as cininas e as prostagladinas desempenham papéis importantes.

1.3.1. Glutamato/NMDA

Os aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato e o aspartato, são considerados os maiores neurotransmissores envolvidos na sinalização da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal. Além do envolvimento com a sinalização nociceptiva o glutamato também desempenha diferentes funções incluindo a sinaptogênese, plasticidade sináptica, refinamento de conexões e morte celular (URCH; RAHMAN; DICKENSON, 2001). As funções do glutamato foram descritas inicialmente no sistema nervoso central, mas este neurotransmissor também exerce um papel importante na sinalização de tecidos como ossos, pele, astrócitos, coração, pâncreas e medula óssea (SKERRY; GENEVER, 2001).

Basicamente suas ações estão ligadas a diferentes receptores que são divididos em duas grandes subcategorias: receptores metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores ionotrópicos são acoplados a canais iônicos, podendo ainda ser subdivididos em três grupos distintos, conforme sua permeabilidade a

íons e ativação por ligantes, são eles: receptores NMDA, cainato e AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato). Estes dois últimos são denominados receptores do tipo não-NMDA (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998; YOU et al., 2003).

Como em grande parte das sinapses excitatórias do sistema nervoso, a maioria dos terminais pré-sinápticos excitatórios do corno dorsal da medula espinal libera glutamato que ativa receptores ionotrópicos localizados em neurônios pós-sinápticos (WOOLF; SALTER, 2006).

Segundo Mello e Dickenson (2008), o glutamato liberado por fibras aferentes primárias em resposta a dor aguda e estimulações nocivas persistentes atua em receptores AMPA e NMDA, respectivamente. Diante da alta e persistente estimulação de fibras C, ocorre a amplificação e prolongamento das respostas dos neurônios localizados no corno dorsal. Esse aumento da atividade é resultado da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Entretanto, quando ocorre apenas uma baixa freqüência de estímulos nocivos ou táteis, como, por exemplo, na dor aguda, não há a possibilidade de ativação dos receptores NMDA, visto que nessas condições os canais de íons desses receptores são bloqueados por níveis normais de magnésio, encontrados em tecidos nervosos. Estes canais de magnésio requerem uma despolarização da membrana, permitindo assim que ocorra a ativação dos receptores NMDA e conseqüentemente a abertura de canais de cálcio.

Há várias evidências do envolvimento dos receptores NMDA no desenvolvimento de sensibilização central, associada com a sustentação dos impulsos nociceptivos em modelos animais de dor inflamatória, em particular na segunda fase do teste da formalina (HALEY; SULLIVAN; DICKENSON 1990).

Deste modo, a ativação dos receptores NMDA está predominantemente associada com estados de ativação prolongados de fibras aferentes e com o desenvolvimento da hipersensibilidade central. Ambos estados estão associados com as respostas frente ao teste da formalina (CHAPMAN et al., 1995). Várias alterações intracelulares associadas com a ativação do receptor NMDA são essenciais para o desenvolvimento da hipersensibilização central como, por

exemplo, o influxo de cálcio nos neurônios, via canais associados com o receptor NMDA (MAYER; WESTBROOK, 1987). Eventos semelhantes são funcionalmente relevantes para a transmissão nociceptiva, visto que a administração de antagonistas de canais de cálcio reduz drasticamente a segunda fase do teste da formalina, enquanto na primeira fase há apenas um leve efeito desses antagonistas (MALMBERG; YAKSH, 1994). Esse aumento do nível intracelular de cálcio, devido à ativação de receptores NMDA, estimula imediatamente a expressão do gene c-fos, e reciprocamente o seu bloqueio inibe essa expressão (CHAPMAN et al., 1995). Corroborando esses resultados, Rahman et al. (2002) demonstraram que a expressão da proteína fos no nível da camada superficial do corno dorsal da medula espinal, em resposta à estimulação nociceptiva (térmica ou mecânica), ou pela injeção de formalina na pata do animal, é reduzida pela injeção intratecal de antagonista de receptores do tipo NMDA, sugerindo novamente o envolvimento desses receptores na expressão dessa proteína, através de diferentes tipos de estimulação nociva.

Recentes trabalhos vêm dando suporte a idéia de que a ativação dos receptores NMDA no corno dorsal da medula (por exemplo: após a lesão tecidual periférica) pode induzir um aumento persistente da nocicepção via produção de óxido nítrico (LI; TONG; EISENACH; FIGUEORA, 1994; MELLER; DYKSTRA; GEBHART, 1996; MELLER; GEBHART, 1993).

1.3.2. Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é uma dentre muitas moléculas encontradas no SNC. Este mensageiro neuronal foi primeiramente identificado como um fator de relaxamento derivado do endotélio, responsável pelo relaxamento da musculatura lisa dos vasos (FREIRE et al., 2009). O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a partir da reação de biossíntese de L-arginina em L-citrulina. A ativação dessa enzima é dependente da interação com a calmodulina, que por sua vez, é controlada pelos níveis de cálcio através da ativação dos receptores glutamatérgicos (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; GARTHWAIT et al., 1989; GUIX et al., 2005; MOREIRA; MOLCHANOV; GUIMARÃES, 2004).

As diferenças de especificidade, relação com inibidores e diferenças de substratos sugerem que há diferentes subtipos de NOS. Neste sentido, foi confirmado, através de estudos de clonagem e caracterização, três distintas isoformas de NOS. Entre elas temos a NOSi (descrita como induzível por citocinas em macrófagos e hepatócitos, também conhecida como NOS do tipo II), a NOSe (identificada como constitutiva em células endoteliais, também conhecida como NOS do tipo III) e por fim, e também a do nosso interesse, a NOSn (definida como constitutiva encontrada em tecidos neuronais, também conhecida como do tipo I) (KNOWLES; MONCADA, 1994). As enzimas constitutivas estão normalmente presentes nas células, enquanto as outras são induzidas por algum estímulo externo durante um processo infeccioso, onde as células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO (QUEIROZ; BATISTA, 1999; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A síntese de óxido nítrico via NOSe no endotélio vascular ocorre em resposta a liberação de acetilcolina, já a síntese de óxido nítrico via NOSi ocorre em resposta a liberação de citocinas em macrófagos, entretanto, a síntese via NOSn ocorre em respostas a liberação do glutamato (KNOWLES; MONCADA, 1994).

Em nível de sinapse neuronal, a estimulação do neurônio leva a liberação de glutamato que se liga aos seus receptores do tipo NMDA. Enquanto persistir essa união (glutamato/receptor NMDA), o cálcio é capaz de entrar no citoplasma do neurônio pós-sináptico levando à ativação da NOSn, resultando na síntese de NO. Assim, o NO recém sintetizado deixa o neurônio pós-sináptico por difusão direta pela membrana da célula. O NO desempenha um papel como mensageiro retrógrado, difundindo-se do neurônio pós-sináptico e retornando para o neurônio pré-sináptico onde ativa a enzima guanilato ciclase. A guanilato ciclase catalisa a reação que produz guanosina monofosfato ciclase (GMPc). A GMPc, por sua vez, desencadeia o processo que resulta na liberação do glutamato e o ciclo se repete (QUEIROZ; BATISTA, 1999).

Estudos conduzidos por Skilling et al. (1988) demonstraram que na segunda fase do teste de formalina há liberação de glutamato e aspartato e,

conseqüentemente, há síntese de óxido nítrico no corno dorsal da medula espinal. Além disso, há várias evidências de que tanto o NO como a GMPc estão envolvidos com o processo nociceptivo (MELLER; GEBHART, 1993; DUARTE; FERREIRA, 2000; SEMOS; HESDLEY, 1994; HOHEISEL; UNGER; MENSE, 2005).

Há relatos na literatura que indicam que a injeção intratecal de inibidores da síntese de NO (ex., L-NAME) podem reduzir as respostas nociceptivas apresentadas durante o teste de formalina, sugerindo uma contribuição do NO durante respostas nociceptivas prolongadas induzidas por estímulos químicos periféricos (*para revisão ver*, SAKURADA et al., 1996).

Estas observações suportam a hipótese de que receptores glutamatérgicos espinais, particularmente o subtipo NMDA, possuem um papel importante na codificação de informações aferentes que após a injúria do nervo ou tecido, aumentam a liberação de glutamato espinal o que acarreta em uma hiperalgesia (CHAPLAN; MALMBERG; YAKSH, 1997).

Deste modo, considerando que o corno dorsal da medula é uma região crucial na transmissão de respostas nociceptivas, e que animais diante de situações ameaçadoras apresentam um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas geralmente acompanhadas por antinocicepção (KELLY, 1986; RODGERS, 1995), parece ser relevante estudar o papel de receptores NMDA e do óxido nítrico em animais expostos a situações ameaçadoras, como o LCE aberto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral investigar o papel do complexo receptor glutamato/NMDA e óxido nítrico no corno dorsal da medula espinal na antinocicepção induzida pelo medo em camundongos.

2.2. Objetivos Específicos

− Identificar uma dose de NMDA, administrada por via intratecal, desprovida de atividade intrínseca sobre a nocicepção.

− Identificar doses de NMDA intratecal desprovidas de atividade intrínseca sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina 2,5% na pata de camundongos.

− Investigar os efeitos das injeções intratecal de NMDA sobre a antinocicepção induzida pela exposição de camundongos ao LCE aberto.

− Identificar uma dose intratecal de L-NAME, inibidor da enzima de síntese de NO, desprovida de atividade intrínseca sobre a resposta nociceptiva induzida pelo teste de formalina a 2,5% na pata de camundongos.

− Avaliar se os efeitos da injeção intratecal de NMDA sobre a antinocicepção induzida pela exposição ao LCE aberto podem ser revertidos pelo pré-tratamento local com L-NAME.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos albinos machos (23-33 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista UNESP. Os animais (n= 6 a 15) foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 1 C°), umidade (55 ± 5%) e luz (ciclo de 12/12 horas, luzes acesas às 07:00) e tiveram acesso livre ao alimento e a água, exceto durante os períodos dos experimentos. Os experimentos realizados neste projeto estão de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC), baseadas na *US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Além disso, todos os procedimentos foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (Protocolo: CEP-FCFar 44-2008).

3.1. Drogas

Foram utilizadas as seguintes drogas: NMDA (N-metil-D-aspartato), agonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (0,1; 0,2; 0,4 ou 0,8 nmol) e também o L-NAME (N-nitro-L-arginina-metil-éster), um inibidor não seletivo da enzima de síntese de óxido nítrico (NOS; 40 e 80 nmoles). As drogas foram preparadas no momento do teste, em solução salina fisiológica. Todas as doses dos compostos acima foram baseadas em um estudo conduzido por SAKURADA et al. (1996) e também em experimentos piloto em nosso laboratório. As drogas foram administradas através da técnica da injeção intratecal, num volume de 5,0 µl. Para atenuar eventual estresse do procedimento de injeção, os animais sofreram habituação às condições experimentais no dia anterior aos testes.

3.2. Injeção Intratecal

De acordo com os procedimentos descritos na literatura por Hylden e Wilcox (1980), a injeção intratecal (ilustrada na Fig. 1) consiste numa técnica de rápida execução e com um alto grau de acurácia e reprodutibilidade, na qual o experimentador segura o animal pela região da crista ilíaca e insere a agulha gengival no espaço subaracnóide, entre as vértebras L5 e L6. Após a injeção, a

agulha gengival, que está conectada a uma seringa de Hamilton de 25µl, é cuidadosamente removida.

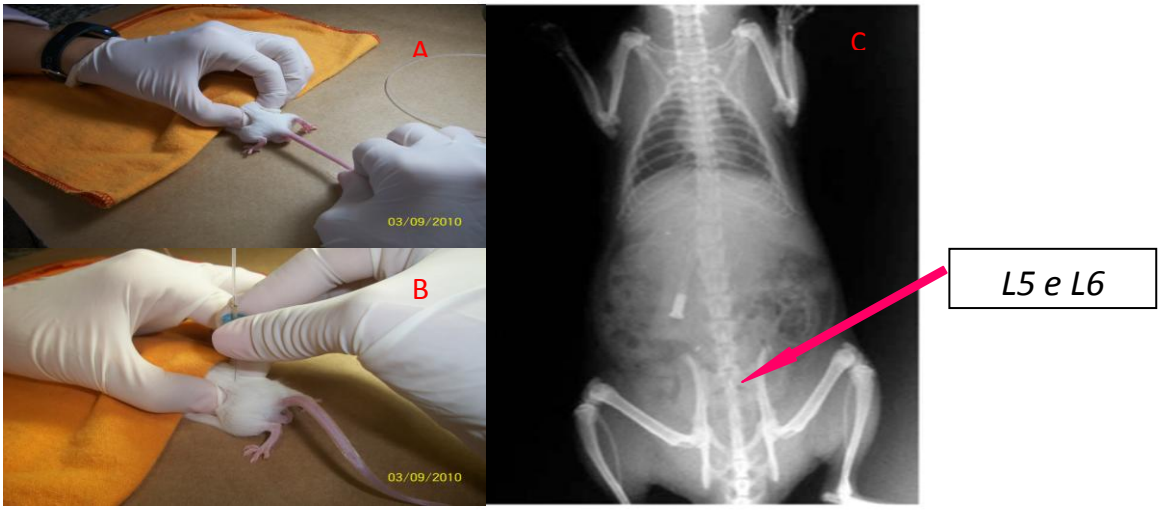


Figura 1: Fotografia ilustrando a técnica da injeção intratecal. Em A: localização da crista ilíaca. Em B: realização da i.t através da agulha gengival conectada a seringa de Hamilton. Em C: representação da localização das vértebras L5 e L6 (Retirado de BRAGA-SILVA et al., 2007).

3.3. Teste da formalina

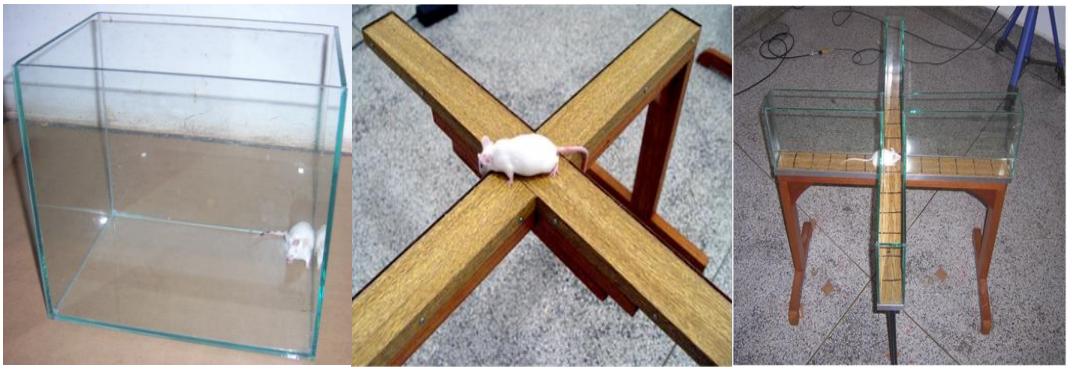
O teste de formalina é um modelo amplamente utilizado para avaliar comportamentos nociceptivos em roedores (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1994). A injeção de formalina provoca uma resposta nociceptiva bifásica (DUBBUISSON; DENNIS, 1977). A primeira fase (fásica) é observada nos primeiros 5 minutos, enquanto a segunda fase (tônica) inicia-se depois de 20 minutos da injeção de formalina e dura por volta de 40-50 minutos. A primeira fase é ocasionada predominantemente pela estimulação direta de nociceptores (LE BARS; GAZARIU; CADDEN, 2001) enquanto a segunda fase parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico injuriado, com mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinal (TJOLSEN et al., 1992; McCALL; TANNER; LEVINE, 1996). Essas mudanças funcionais, análogas ao mecanismo de potencialização a longo prazo, devem-se provavelmente, à atividade neural contínua produzida durante a primeira fase, pois sua atenuação, quando por exemplo o animal é exposto ao estresse, resulta em hipoalgesia na fase tônica (VACCARINO et al., 1992). Tem sido demonstrado que a injeção de formalina produz um imediato aumento de glutamato e aspartato na medula espinal (SKILLING et al., 1988), e a administração de MK-801 (Maleato

de Dizilpina), antagonista não competitivo de receptores NMDA, reduz a resposta dos neurônios no corno dorsal à formalina (HALEY; SULLIVAN; DICKENSON, 1990). No presente estudo, os camundongos foram tratados com 50 μL de solução de formalina a 2,5%, injetada subcutaneamente na superfície dorsal da pata traseira direita.

3.4. Aparatos

Para avaliação das respostas comportamentais, foram utilizados uma caixa de vidro (30 X 20 X 25 cm) (ver Fig. 2A), que consistiu num ambiente neutro para o animal, e os labirintos em cruz elevado (LCE) aberto (ver Fig. 2B) (LCEa, situação aversiva) e fechado (ver Fig. 2C) (LCEf, situação controle). O LCEf é feito de acrílico transparente e consiste em dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), unidos ortogonalmente a outros dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm), elevados 38,5 cm do solo por um suporte de madeira. O LCEa é semelhante ao LCEf, exceto pelo fato de ser formado por quatro braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm).

Os camundongos foram individualmente colocados sobre a plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços (a posição de colocação do animal no labirinto foi semelhante para os dois aparelhos) e puderam explorar o labirinto por 10 minutos. Todos os dois LCE foram posicionados de modo semelhante na sala experimental.



(A) **(B)** **(C)**

Figura 2: Apresenta os diferentes tipos de aparatos em que os animais foram submetidos durante a realização desse trabalho. Letra A: caixa de vidro; B: labirinto em cruz elevado aberto (LCEa); C: labirinto em cruz elevado fechado (LCEf).

3.5. Procedimentos

3.5.1. Padronização das doses do NMDA

Inicialmente, o estudo procurou identificar uma dose de NMDA que não produzisse efeitos *per se* no tempo de lambidas na pata. Assim, foram utilizadas as doses de 0,4 nmol e 0,8 nmol num volume de 5,0 µl, tendo como grupo controle os animais que receberam salina. Imediatamente após a injeção intratecal, cada animal foi colocado na caixa de vidro por 10 minutos, para o registro do tempo de lambidas na pata (minuto a minuto/tempo total).

3.5.2. Efeito da injeção intratecal do NMDA no tempo de lambidas na pata de animais submetidos ao teste da formalina

Com os resultados obtidos na etapa de padronização da dose do NMDA, foi realizado um novo experimento para avaliar se o NMDA aumentaria o tempo de lambidas na pata de camundongos previamente tratados com injeção de formalina a 2,5% na pata traseira direita. Assim, 20 minutos após a injeção de formalina, camundongos receberam injeção intratecal de NMDA (0; 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol/5,0 µl) e foram imediatamente expostos à caixa de vidro por 10 minutos, para o registro do tempo de lambidas na pata.

3.5.3. Efeito da injeção intratecal do NMDA na antinocicepção induzida pela exposição dos animais ao LCE aberto

Vinte e cinco minutos após a injeção de formalina a 2,5% na pata traseira direita, cada camundongo recebeu injeção intratecal do NMDA (0; 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol/5,0 µl) e foi imediatamente exposto por 10 minutos ao LCEa ou LCEf para o registro do tempo de lambidas na pata tratada com formalina 2,5%.

3.5.4. Padronização das doses do L-NAME

Nesta etapa do estudo, procuramos identificar uma dose de L-NAME desprovida de efeitos intrínsecos sobre o tempo de lambidas na pata tratada com formalina 2,5%. Para tal, os animais foram previamente tratados com formalina 2,5% na pata direita traseira, após 15 minutos receberam injeção intratecal de L-NAME (40 ou 80 nmoles/5,0 µl) e, após 10 minutos, os animais foram colocados na caixa de vidro para o registro do tempo de lambidas na pata tratada por 10 minutos.

3.5.5. Efeitos da injeção intratecal do L-NAME sobre a ação anti-antinociceptiva do NMDA em camundongos expostos ao LCEa.

Quinze minutos após a injeção de formalina a 2,5% na pata direita traseira, cada camundongo recebeu injeção intratecal de L-NAME (0 ou 40 nmoles/5,0 µl) e, após 10 minutos, injeção intratecal de NMDA (0 ou 0,4 nmol/5,0 µl), sendo, em seguida, exposto ao LCEa para o registro do tempo de lambidas na tratada com formalina 2,5%, por 10 minutos.

3.5.6. Análise estatística

Todos os resultados foram inicialmente submetidos ao teste homogeneidade das variâncias de Levene. Em caso de valores significativos de *p*, os dados foram transformados em escala logarítmica, raiz quadrada ou cúbica antes do prosseguimento da análise estatística. Os dados foram submetidos às análises de variância (ANOVA) unifatorial, bifatorial (fator 1: tipo de labirinto; fator 2: tratamento ou fator 1: tratamento; fator 2: tempo) e multifatorial [fator 1: pré-tratamento; fator 2: tratamento; fator 3: tempo (intervalos)], em seguida ao teste de comparações múltiplas de Duncan. Valores de *p* iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

A Figura 3 (A-B) mostra os efeitos de injeções de NMDA (0; 0,4 ou 0,8 nmol/5,0 µl, i.t.) sobre a resposta nociceptiva (tempo de lambidas na pata) de camundongos. A ANOVA unifatorial revelou diferenças significativas para o fator tratamento ($F_{2,27}$ = 7,23, p<0,05). O teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que os animais tratados com NMDA 0,8 nmol aumentaram o tempo de lambidas na pata, comparados aos animais NMDA 0,4 nmol e salina (ver Fig 3B). Além disso, a ANOVA bifatorial (tratamento *vs* tempo) revelou diferenças significativas para o fator tratamento ($F_{2,27}$ = 6,12, p<0,05), tempo ($F_{9,24}$ = 4,23, p<0,05) e interação entre os fatores ($F_{18,24}$ = 4,43, p<0,05). O teste de comparações múltiplas de Duncan revelou que os animais tratados com NMDA 0,8 nmol apresentaram um aumento no tempo de lambidas na pata logo nos primeiros 3 minutos do teste quando comparado aos animais NMDA 0,4 nmol e salina, cuja descrição se encontra na figura 3A.

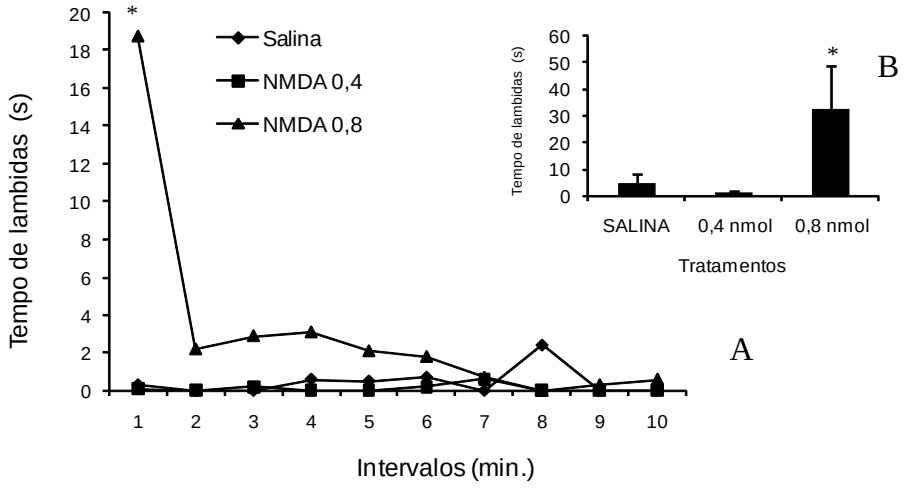


Figura 3 – Efeito da injeção intratecal com NMDA (0; 0,4 ou 0,8 nmol/5,0 µl) sobre a resposta nociceptiva (tempo de lambidas na pata) de camundongos, avaliada (A) minuto a minuto e (B) no total de 10 minutos de teste. *p<0,05 comparado ao grupo salina.

A Figura 4 mostra os efeitos da injeção intratecal do NMDA (0; 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol/5,0 µl) no tempo de lambidas na pata tratada com formalina. A ANOVA unifatorial revelou não haver diferença significativa entre os grupos tratados com diferentes doses do NMDA ($F_{3,40}$ = 0,57, p >0,05), quando os animais foram expostos a caixa de vidro por 10 minutos.

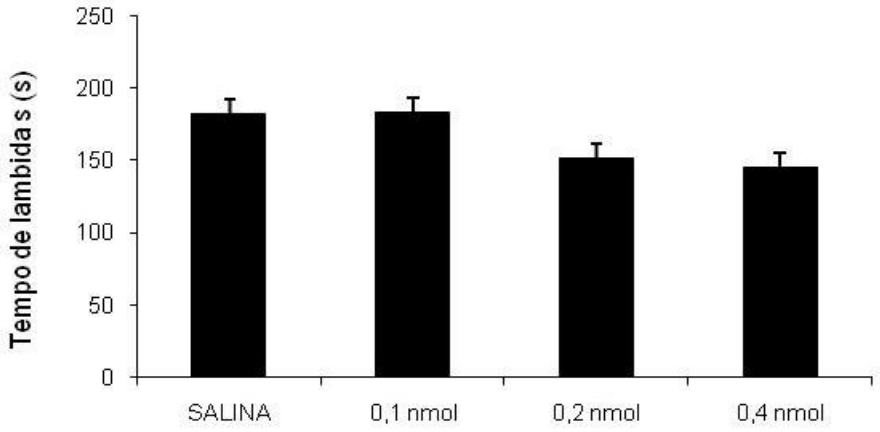


Figura 4- Avaliação da resposta nociceptiva (tempo de lambidas na pata) induzida pela injeção de formalina a 2,5% na pata traseira direita em camundongos que receberam injeção intratecal de NMDA (0; 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol/5,0 µl).

A Figura 5 mostra os efeitos da injeção intratecal de NMDA (0; 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol/5,0 µl) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na pata em camundongos expostos ao LCEf e LCEa. A ANOVA bifatorial revelou haver diferenças significativas para o fator tipo de labirinto ($F_{1,103}$ = 303,74, $p < 0,05$) bem como para o fator tratamento ($F_{3,103}$ = 3,20, $p < 0,05$), porém não significativo para a interação tipo de labirinto versus tratamento ($F_{3,103}$ = 1,54, $p > 0,05$). O teste post hoc de Duncan confirmou uma diminuição no tempo de lambidas nos animais expostos ao LCEa comparado aos grupos expostos ao LCEf ($p<0,05$). No entanto, o tratamento com a dose de 0,4 nmol de NMDA aumentou o tempo de lambidas na pata dos animais expostos ao LCEa quando comparados aos tratados com salina ($p<0,05$).

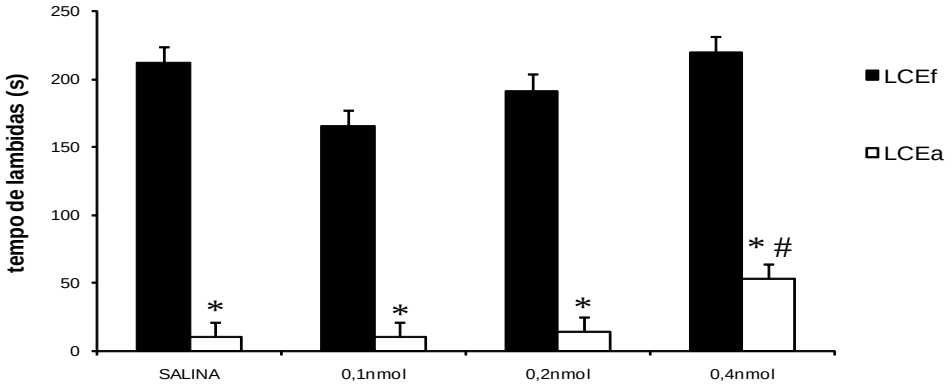


Figura 5- Efeitos da injeção intratecal de NMDA (0; 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol) no tempo de lambidas no teste da formalina em animais expostos ao LCE (aberto e fechado) * $p<0,05$ comparado ao grupo LCEf. # $p<0,05$ comparado ao grupo salina LCEa.

A Figura 6 mostra os efeitos da injeção intratecal do L-NAME (0, 40 e 80 nmoles/5,0 µl) sobre o tempo de lambidas na pata tratada com formalina. A ANOVA unifatorial revelou não haver diferença significativa entre os grupos tratados com diferentes doses do L-NAME ($F_{2,20}$ = 2,28 p > 0,05), quando os animais foram expostos a caixa de vidro por 10 minutos.

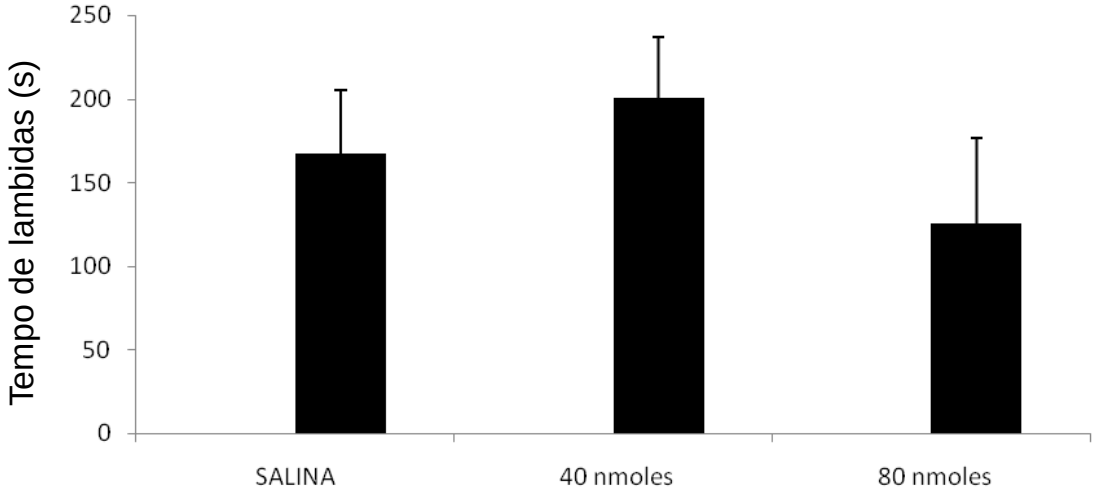
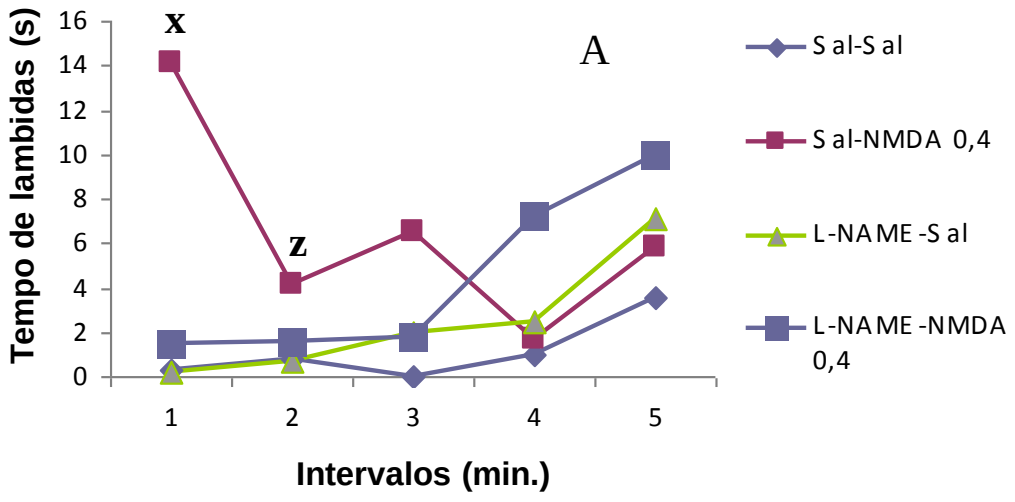


Figura 6- Ausência de efeitos da injeção intratecal de L-NAME (40 ou 80 nmoles) sobre o tempo de lambidas na pata induzida pela injeção de formalina a 2,5% na pata traseira direita de camundongos.

A Figura 7 (A-C) mostra os efeitos da injeção intratecal do L-NAME (40 nmoles/5,0 µl) sobre a ação anti-antinociceptiva do NMDA em animais submetidos ao teste de formalina e expostos ao LCEa. A ANOVA multifatorial revelou haver efeito significativo do tratamento ($F_{1,38}$= 9,13, p,< 0,05) e interação entre o pré-tratamento e o intervalo ($F_{1,38}$= 2,8, p< 0,05). Entretanto, revelou não haver efeito do pré-tratamento ($F_{1,38}$= 0,001, p> 0,05), intervalo ($F_{1,38}$= 1,57, p> 0,05), interação entre tratamento e intervalo ($F_{1,38}$= 0,56 p> 0,05) e entre pré-tratamento, tratamento e intervalo ($F_{1,38}$= 1,11 p> 0,05) (ver Fig. 7A). Além disso, ANOVA bifatorial dos primeiros cinco minutos revelou haver efeito do tratamento ($F_{1,38}$ = 7,2, p < 0,05), bem como da interação pré-tratamento versus tratamento ($F_{1,38}$ = 3,99, p < 0,05), porém revelou não haver efeito do pré-tratamento ($F_{1,38}$ = 1,7, p > 0,05) (ver Fig. 7B). Já a ANOVA bifatorial dos últimos cinco minutos revelou não

haver efeito do pré-tratamento ($F_{1,38}$ = 0,58, p > 0,05), do tratamento ($F_{1,38}$ = 2,22, p > 0,05), e tampouco da interação pré-tratamento versus tratamento ($F_{1,38}$ = 0,22, p > 0,05) (ver Fig. 7C).



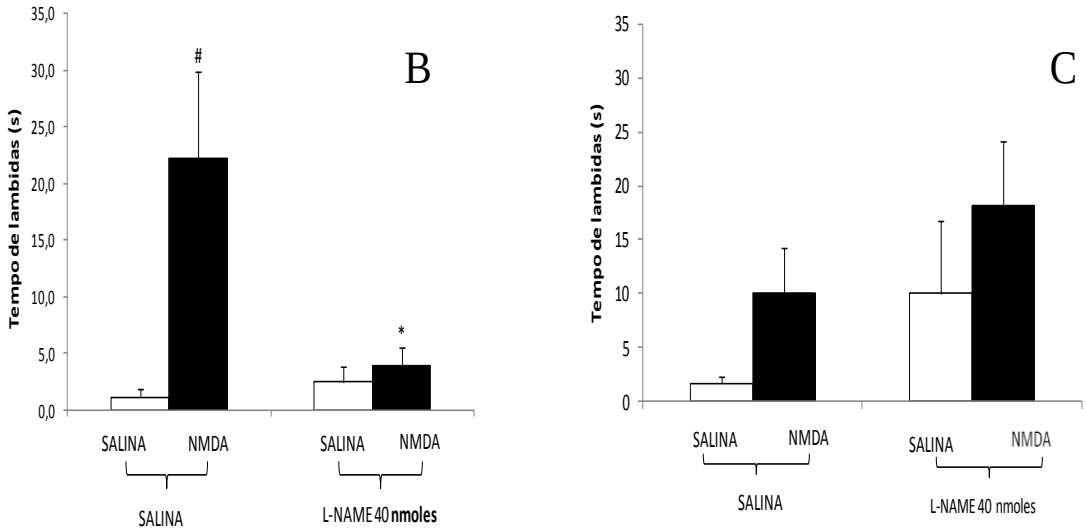


Figura 7 (A; B e C). Efeitos da injeção intratecal de L-NAME (0 ou 40 nmoles) sobre o tempo de lambidas na pata induzidas pela injeção de formalina a 2,5% em animais tratados NMDA i.t. (0 ou 0,4 nmol) e expostos ao LCE aberto. (A) Avaliação da nocicepção em 5 intervalos de 2 minutos (1; 2; 3; 4 e 5). (B) Avaliação da nocicepção nos primeiros 5 minutos do teste (0-5 minutos). (C) Avaliação da nocicepção nos últimos 05 minutos do teste (6-10 minutos). * p<0,05 comparado ao grupo SALINA + NMDA. # p<0,05 comparado ao grupo SALINA + SALINA. x p <0,05 comparado ao restante dos grupos. z p<0,05 comparado ao grupo SALINA+SALINA.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a injeção intratecal de 0,8 nmol de NMDA induziu o comportamento de lamber a pata em camundongos que não haviam recebido injeção prévia de formalina 2,5%. Tais características de efeito *per se* do NMDA confirmam os resultados obtidos por Ferreira, Santos e Calixto (1999) e indicam um papel pró-nociceptivo da transmissão glutamatérgica nos receptores NMDA localizados na medula espinal de camundongos. De modo importante, o efeito pró-nociceptivo do NMDA mostrou ser dependente da dose deste agonista glutamatérgico injetado por via intratecal. Assim, enquanto produziu uma resposta nociceptiva na dose 0,8 nmol, a injeção intratecal de 0,4 nmol de NMDA não alterou o tempo total de lambidas na pata. Esse efeito dose-dependente do NMDA mostrou-se interessante, uma vez que um dos objetivos do presente estudo foi identificar uma dose de NMDA desprovida de atividade intrínseca sobre a nocicepção, para que pudéssemos avaliar os efeitos deste agonista glutamatérgico na antinocicepção induzida pela exposição ao LCE aberto.

Embora a dose de 0,4 nmol de NMDA não tenha produzido efeitos intrínsecos sobre a nocicepção, tornou-se relevante avaliar seus efeitos sobre a resposta nociceptiva induzida pelo teste da formalina. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o tratamento intratecal de 0,1; 0,2 ou 0,4 nmol de NMDA não afetou significativamente o tempo de lambidas na pata induzidas pela injeção de formalina na pata de camundongos expostos a um ambiente neutro (caixa de vidro). Estes resultados foram de elevada importância para a continuidade do estudo, pois nosso objetivo nessa etapa era investigar a existência de uma dose de NMDA que não provocasse quaisquer efeitos sobre a resposta nociceptiva induzida pela formalina.

Estudos anteriores indicam que a sensibilização central e comportamentos nociceptivos tônicos associados com a injúria tecidual induzida pela injeção de formalina dependem, pelo menos em parte, da ativação de receptores NMDA (HALEY; SULLIVAN; DICKENSON, 1990; CODERRE; MELZACK, 1992; CHAPMAN et al., 1995). Os resultados obtidos no presente estudo parecem corroborar tais evidências. Neste sentido, o tratamento com a dose mais alta de NMDA (0,4 nmol) bloqueou a antinocicepção induzida pela exposição ao LCE

aberto quando comparado ao grupo salina. No entanto, cabe ressaltar que esse bloqueio foi parcial, uma vez que a resposta nociceptiva desse grupo foi significativamente menor que a dos animais tratados com 0,4 nmol de NMDA e expostos ao LCE fechado (situação controle). Cabe ressaltar também que o bloqueio da antinocicepção obtido com injeção intratecal de NMDA não se deve a potencial ação pró-nociceptiva deste agonista glutamatérgico. Esta conclusão se baseia no fato de que a injeção intratecal de 0,4 nmol de NMDA não alterou o perfil da resposta nociceptiva de animais expostos ao LCE fechado, quando comparado aos tratados com salina e expostos a mesma condição.

O efeito parcial do NMDA (0,4 nmol) parece corroborar resultados encontrados por outros autores, os quais demonstraram que a expressão da c-fos nas lâminas superficiais (I e II) do corno dorsal da medula induzida pela injeção de formalina pode ser reduzida pela injeção intratecal de antagonista de receptores NMDA (RAHMAN et al., 2002). Entretanto, como essa expressão de c-fos é apenas reduzida, e não abolida, Rahman et al. (2002) sugeriram o envolvimento de outros neurotransmissores como, por exemplo, a substância P, liberados pelos neurônios aferentes primários. Neste mesmo sentido, Millan (2002), sugeriu que vários neurotransmissores como, por exemplo, serotonina, acetilcolina e melanocortina estão envolvidos com a modulação facilitatória das respostas nociceptivas no corno dorsal da medula. Segundo Woolf e Salter (2006), o influxo de cálcio através da ativação de receptores NMDA é a maior, mas, não a única e exclusiva via de potencialização induzida no corno dorsal. A ativação dos canais de cálcio voltagem dependente pode aumentar a transmissão excitatória através de mecanismos que não envolvem a ativação de receptores NMDA. Neurotrofinas semelhantes ao BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo) atuam através de receptores do tipo tirosina quinase (Trk), facilitando a transmissão sináptica, e esse mecanismo é pelo menos em parte independente de receptores NMDA pós-sinápticos. Há também evidências de que o aumento dessas transmissões sinápticas possa ocorrer através de citocinas, semelhantes ao fator-α de necrose tumoral (TNF-α) liberadas a partir de células glias no corno dorsal da medula (WATKINS; MILLIGANG; MAIER, 2001; WOOLF; SALTER, 2006). Em resumo, nossos resultados indicam um papel de receptores

glutamatérgicos do tipo NMDA da medula espinal na inibição da antinocicepção induzida pelo medo (exposição ao LCEa).

Tem sido proposto que o NO atua como mensageiro retrógrado, isto é, se difunde para terminais pré-sinápticos de fibras aferentes primárias e estimula a guanilato ciclase. Uma vez que tal ação resulta na formação de GMPc, que por sua vez ativa a PKG (proteína quinase dependente de GMPc), resultando na liberação de glutamato e, conseqüentemente, na ativação da NOSn (XU et al., 2007), um dos objetivos do presente estudo foi investigar se o papel anti-antinociceptivo do NMDA na medula espinal depende da síntese de NO.

Assim, a etapa seguinte do nosso estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do pré-tratamento intratecal com o inibidor da enzima de síntese de NO, o L-NAME, sobre os efeitos inibitórios do NMDA na antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa. Para evitar resultados falso-positivos com o estudo da injeção combinada com esses dois compostos, fez-se inicialmente fundamental identificar uma dose de L-NAME desprovida de quaisquer efeitos sobre a resposta nociceptiva provocada pelo teste de formalina na pata. Assim, injeções i.t. de L-NAME (40 ou 80 nmoles) não alteraram o padrão da resposta nociceptiva (tempo de lambidas na pata) nos animais submetidos ao teste de formalina a 2,5%. Estes resultados sugerem que o L-NAME, nas doses de 40 e 80 nmoles, não produz um efeito *per se* em animais submetidos a esse teste nociceptivo. Em um estudo conduzido por Sakurada et al. (1996), foi demonstrado que a injeção intratecal de NMDA provocou comportamentos similares àquelas respostas observadas no teste de formalina. Além disso, esta expressão da resposta nociceptiva foi atenuada com a co-administração de L-NAME (40 e 80 nmoles), sugerindo que as respostas induzidas pelo NMDA podem ser mediadas pela produção de óxido nítrico. Nossos resultados sugerem que os efeitos nociceptivos provocados pela liberação de glutamato, desencadeada pela injeção de formalina na pata, mostram-se inferiores a ativação direta dos receptores NMDA no corno dorsal da medula espinal (via injeção intratecal de NMDA), uma vez que o tratamento com L-NAME (40 e 80 nmoles) não produziu efeito algum nos animais que receberam formalina a 2,5%. Outras explicações plausíveis estão associadas ao envolvimento de outros mediadores da resposta nociceptiva. Por exemplo,

existem evidências sugestivas na literatura indicando que durante condições inflamatórias e de injúrias do nervo ocorre a liberação de noradrenalina pelo sistema nervoso simpático. Neste mesmo sentido, alguns trabalhos demonstram que adrenoceptores (α1-ARs) medeiam às respostas inflamatórias como, por exemplo, as evocadas pela capsaicina e pela formalina (revisão ver, MILLAN 1999). Além disso, há relatos de que os nociceptores liberam peptídeos e neurotransmissores [p. ex., substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitocina e adenosina tri-fosfato (ATP)], a partir de terminais periféricos, quando ativados por estímulos nocivos e esses são capazes de facilitar a inflamação (JULIUS; BASBAUM, 2001). Ainda, estudos realizados por Skilling et al. (1988) demonstraram que a injeção subcutânea de formalina provoca a liberação de aminoácidos excitatórios (p. ex., glutamato e aspartato) e de peptídeos como a substância P no corno dorsal da medula espinal. A partir desses resultados, sugerimos que a ausência de efeitos do L-NAME em animais que foram submetidos ao teste da formalina a 2,5% pode ser decorrente da liberação de outros mediadores da nocicepção que não dependem da síntese de óxido nítrico.

Assim, dada a caracterização de ausência de efeitos intrínsecos das duas doses de L-NAME na resposta nociceptiva induzida pela injeção de formalina na pata, fez-se necessário investigar qual seria o efeito do L-NAME sobre a resposta anti-antinociceptiva do NMDA. Dessa forma, animais previamente tratados com formalina na pata receberam L-NAME (0 ou 40 nmoles, i.t.) e, após 10 minutos, a injeção de NMDA (0,4 nmol, i.t.) e, em seguida, foram expostos ao LCEa por 10 minutos. Além de confirmar o papel anti-antinociceptivo do NMDA, nossos resultados ilustraram que o bloqueio da resposta antinociceptiva ocorre nos primeiros minutos do teste. Em outras palavras, a partir da análise feita a cada cinco minutos, pode-se verificar que logo nos primeiros cinco minutos do teste houve um efeito do tratamento, ou seja, a análise estatística revelou diferenças entre os animais tratados com NMDA e os animais controle (salina), confirmando os resultados apresentados na Figura 5, onde o tratamento com NMDA 0,4 nmol reverteu parcialmente a antinocicepção induzida pelo LCE aberto. De modo interessante, a análise estatística revelou não haver diferença entre os pré-tratamentos (L-NAME e salina), confirmando que o L-NAME (40 nmoles) não

produz efeito *per se* sobre a nocicepção. Ainda, mais importante foi a análise estatística ter revelado haver interação entre o pré-tratamento e o tratamento, o que significa que o efeito do tratamento depende do seu pré-tratamento. Isso pode ser observado quando os grupos L-NAME + NMDA e SALINA + NMDA são comparados. Em outras palavras, os resultados observados sugerem que o pré-tratamento com L-NAME reverte os efeitos anti-antinociceptivos do NMDA em animais submetidos ao LCE aberto. Diferentemente do que foi observado nos primeiros cinco minutos de teste, a análise estatística dos últimos cinco minutos revelou não haver efeito algum do pré-tratamento ou do tratamento sobre a antinocicepção induzida pelo medo. Alguns estudos demonstram que, baixas doses (1 nmol) de NMDA podem provocar hiperalgesia de curta duração (3 a 4 minutos), enquanto altas doses (ex., 6,8 nmoles) deste agonista glutamatérgico podem provocar hiperalgesia de longa duração (até 45 minutos) (FERREIRA; SANTOS; CALIXTO, 1998; KOLHEKAR; MELLER; GEBHART, 1993; MALMBERG; YAKSH, 1992). Baseado nesses achados é possível que o efeito do NMDA observado no presente estudo pode ter se concentrado apenas nos primeiros cinco minutos do teste. Isso pode ser observado quando se faz a análise da nocicepção a cada dois minutos (ver Fig. 7A), onde o tratamento com NMDA 0,4 nmol se mostra significativamente diferente do tratamento controle (salina) apenas nos primeiros minutos do teste.

Conforme destacado na Introdução deste estudo, animais em situações de ameaça ou perigo (p. ex., diante do predador) exibem diferentes tipos de respostas comportamentais e autonômicas bem como redução da sensibilidade à dor (KELLY, 1986; RODGERS, 1995; FIELDS; BASBAUM; HEINRICHER, 2006). Os resultados do presente estudo mostraram que a antinocicepção induzida pela exposição ao LCEa pode ser atenuada pelo tratamento intratecal com NMDA, sugerindo um importante papel dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA localizados na medula espinal de camundongos no processo de facilitação da resposta nociceptiva. De modo interessante, este efeito decorrente da ativação de receptores NMDA pode ser seletivamente antagonizado quando a enzima de síntese de óxido nítrico está inibida. Assim, considerando-se que a redução da sensibilidade a estímulos nociceptivos diante de situações aversivas pode ser

uma resposta adaptativa para os animais lidarem com a iminência do perigo, nossos resultados sugerem que a exposição ao LCEa produz antinocicepção por desencadear, pelo menos em parte, a ativação de mecanismos inibitórios sobre as ações do glutamato nos receptores NMDA do corno dorsal da medula espinal.

6. CONCLUSÃO

− Nossos resultados confirmam um papel pró-nociceptivo dos receptores NMDA no corno dorsal da medula, visto que a injeção intratecal de NMDA 0,8 nmol em camundongos expostos a caixa de vidro eliciou uma resposta nociceptiva manifestada como lambidas na pata.

- A reversão da antinocicepção induzida pelo medo em camundongos expostos ao LCE aberto através da injeção intratecal de NMDA numa dose desprovida de efeitos intrínsecos sobre a nocicepção (0,4 nmol), sugere que esses receptores participam pelo menos em parte da reversão desta antinocicepção.

− Nossos resultados sugerem que o papel dos receptores NMDA da medula espinal de reverter os efeitos antinociceptivos da exposição ao LCEa depende, pelo menos em parte, da síntese de óxido nítrico, visto que a injeção local de L-NAME, um inibidor da síntese de NO, antagonizou o efeito anti-antinociceptivo de injeções de NMDA na medula espinal de camundongos expostos ao ambiente aversivo.

Referências Bibliograficas[5]

[5] De acordo com as normas com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR6023.

ABBOTT, V.F.; FRANKLIN, K.B.J.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoringproperties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain,** Netherlands, v: 60, p.91-102, 1994

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research,** Netherlends, 1000: 40 – 56, 2004.
BASBAUM, A.I.; WOOLF, C.J. Pain. **Current Biology,** England, v.9, p.429-31, 1999.

BAUMANN, T.J.; STRICKLAND, J. Pain Management. In: DIPIRO, J.T; TALBERT, R.L; YEE, C.G; POSEY, L.M. **Pharmacotherapy "A Pathophysiologic Approach.** 7th ed. The Macgraw-Hill Companies: USA, 2008, p.989

BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, Amsterdam, v. 3, p. 291-322, 1980.

BOND, M.R. Psychiatry disorders and pain. In: McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of pain.** 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006. p. 259.

BRAGA-SILVA, J.; GEHLEN, D.; ROMAN, J.A.; MACHADO, D.C.; DA COSTA, J.C.; FAÚNDEZ, M.; ORSI, V.V.; BRAGA, R. Modelo experimental de lesão raquimedular em ratos com dispositivo para acesso de agentes terapêuticos locais. **Acta Ortopédica Brasileira,** Brazil, v.15, p. 155-157. 2007.

CHAPLAN, S.R.; MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve evoked allodynia in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics,** United States, v.280 (2), p.829-838, 1997.

CHAPMAN, C.; BURITOVA, J.; HONORE, P.; BESSON, J.M. 7-Nitro-indazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, reduces formalin evoked c-FOS expression in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. **Brain Research,** Netherlends, v.697, p.258-61, 1995.

CODERRE, T.J.; MELZACK, R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury.**The Journal of Neuroscience,** Washington, DC, v. 12, p. 3671-5, 1992.

CONCEIÇÃO, I.M.; MAIOLINI JUNIOR, M.; MATTIA, N.; VITAL, M.A.; SANTOS, B.R.; SMAILI, S.; FRUSSA-FILHO, R. Anxiety-induced antinociception in the mouse. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brazil, v. 25, n. 8, p. 831-834, 1992.

CRAIG, A.D. PAIN MECHANISMS: Labeled Lines Versus Convergence in Central Processing. **Annual Review Neuroscience,** United States*,* v.26, p.1–30, 2003.

DOSTROVSKY, O.J.; CRAIG, A.D. Ascending projection system. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of pain.** 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006, p. 187.

DUARTE, I.D.; FERREIRA, S.D. L-NAME causes antinociception by stimulation of the arginine-NO-cGMP pathway. **Mediotors Inflammatories,** United States, v.9, p.25-30, 2000.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brainstem stimulation in rats and cats. **Pain**, Amsterdam. v.4, p.161-174, 1977.

DUSSE, L.M.S.A.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** Brazil, v.39, p. 343-50, 2003.

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic spinal and supraspinal L-arginina-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intratecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, England, v.38, p. 835-42, 1999.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed). **Wall and Melzack's Textbook of pain.** 5th ed. Churchill Livingstone :Elsevier:, 2006, p.125-127.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON. Neurotransmitter in nociceptive modulatory circuits. **Annual Review of Neuroscience,** Palo Alto. v.14, p. 219-45, 1991.

FREIRE, M.A.M.; GUIMARÃES, J.S.; LEAL, W.G.; PEREIRA, A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. **Frontiers in Neuroscience**, Switzerland, v. 3, p. 175-181, 2009.

GARTHWAITE, J.; GARTHWAITE, G.; PALMER, R.M; MONCADA, S. NMDA receptor induces nitric oxides synthesis from arginine in rat brain slices. **European Journal Pharmacology,** Netherlands, v. 55, p. 413-416, 1989.

GUIMARÃES, F.S.; BEIJAMINI, V.; MOREIRA, F.A.; AGUIAR D.C.; DE LUCCA, A.C.B. Role of nitric oxide in brain regions related to defensives reactions. **Neurocience and Biobehavioral Reviews,** United States v. 29, p. 1313-322, 2005.

GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M; MUNOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in neurobiology,** England, v.76, p.126-52, 2005.

HALEY, J.E.; SULLIVAN, A.F.; DICKENSON A.H. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor envolvimente inprolonged chemical nociception in the rat. **Brain Research,** Netherlends, v 518, p. 218-226, 1990.

HARRIS, J.A. Descending antinociceptive mechanisms in the brainstem: their role in the animal's defensive system. **Journal of Physiology, Paris,** v. 90, n.1, p.15-25, 1996.

HOHEISEL, U.; UNGER, T.; MENSE, S. The possible role of the NO-cGMP pathway in nociception: Different spinal an supraspinal action of enzyme blockers on rat dorsal horn neuroneus. **Pain,** Netherlands, v.20, p.1-10, 2005.

HUNT, S.P.; MANTHY, P. The Molecular Dynamics of Pain Control. **Nature,** England, v.2, p.83-91, 2001.

HYLDEN, J.L.K.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology,** Netherlands, v. 67, p.313-316, 1980.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular Mechanisms of Nociception. **Nature,** England, v. 413, p.203-10, 2001.

JULIUS, D.; MCCLESKEY, E.W. Cellular and molecular properties of primary afferent neurons. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of pain.** 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006, p.35.

KAVALIERS, M. Brief exposure to a natural predator, the short-tail weasel, induces benzodiazepine sensitive antinociception in white-footed mice. **Physiology and Behaviour**, New York, v. 43, n. 2, p. 187-193, 1988.

KELLY, D.D. **Stress induced analgesia**, New York: NY Academy of Sciences, v.467, 1986.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide sinthases in mammals. **Biochemical Journal,** England, v. 298, p. 249-58, 1994.

KOLHEKAR, R.; MELLER, S.T GEBHART, G.F.Characterization of the role of spinal N-methyl-D-aspartate receptors in thermal nociception in the rat. **Neurociensce**, United States, v. 57, p. 385-395, 1993.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEE, C.; RODGERS, R.J. Antinociceptive effects of plus-maze exposure: influence of opiate receptor manipulations. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 102, n. 4, p. 507-513,1990.

LESTER, L.S.; FANSELOW, M.S. Exposure to a cat produces opioid antinociception in rats. **Behavioral Neuroscience**, Washington DC, v. 99, n. 4, p. 756-759, 1985.

LI, P.; TONG, C.; EISENACH, J.C.; FIGUEORA, J.P. NMDA causes release of nitric oxide from rat spinal cord in vitro. **Brain Research,** Netherlends, v. 637, p.287-91, 1994.

LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

MALMBERG, A.B.; YASK, T.L. Hiperalgesia Mediated by Spinal Glutamate or Substance P Receptor Blocked by Spinal Cyclooxygenase Inhibition. **Science**, United States, v. 257, p. 1276-1278, 1992.

MALMBERG, A.B.; YASK, T.L. Voltage-sensitive calcium channel in spinal nociceptive processing: Blockade of N- and P-type channel inhibits formalin-induce nociception. **The Journal of Neuroscience,** Washington, DC, v.14, p.4882-90, 1994.

MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. **The Journal of Physiological,** England, v.394, p. 501-27, 1987.

McCALL, W.D.; TANNER, K.D.; LEVINE, J.D. Formalin induces biphasic activity in Cfibers in the rat. **Neuroscience Letters**, Ireland, v. 208, n. 1, p. 45-48, 1996.

McMAHON, S.B.; BENNETT, D.LH.; BEVAN, S. Inflammatory mediators of pain. In: McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of pain.** 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006, p. 49.

MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-Daspartate receptors and protein Kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience,** United States, v.71, p. 327-35, 1996.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric Oxide and nociception processing in the spinal cord. **Pain,** Netherlands, v. 52, p. 127-36, 1993.

MELLO, R.D.; DICKENSON A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia,** England, v. 101, p. 1-9, 2008.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain Mechanisms: a new theory. **Science**, United States, v. 150, p. 971-979, 1965.

MENDES-GOMES, J.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Concurrent nociceptive stimulation impairs the anxiolytic effect of midazolam injected into the periaqueductal gray in mice. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1047, n. 1, p. 97-104, 2005.

MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: MCMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **WALL and MELZACK'S textbook of pain**. 5th. ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006. p. 3.

MIGUEL, T.T. **Antinocicepção induzida pelo medo: efeito da inibição da óxido nítrico sintase na matéria cinzenta periaquedutal de camundongos**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, PPG-CF, UFSCar, São Carlos, 2006.

MIGUEL, T.T.; NUNES-DE-SOUZA, R.L. Defensive-like behaviors and antinociception induced by NMDA injection into the periaqueductal gray of mice depend on nitric oxide synthesis. **Brain Research,** Netherlands, v. 1076, p. 42-8, 2006.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, New York, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

MOREIRA, F.A.; MOLCHANOV, M.L.; GUIMARÃES, F.S. Ionotropic glutamate-receptor antogonists inhibit the aversive effects of nitric oxide donor injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology,** Germany, v.203, p.171-99, 2004.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology,** England, v.54, p. 581-618, 1998.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções Biológicas do Óxido Nitrico. **Química Nova,** Brazil, v.22, p.584-90, 1999.

RAHMAN, O.I.F.; TERAYAMA, R.; IKEDA, T.; KOGANEMARU, M.; NAKAMURA, T.; SHIBA, R.; NISHIMORI, T. Differential effects of NMDA and AMPA/KA receptor antagonists on c-Fos or Zif/286 expression in the rat spinal dorsal horn induce bu noxious thermal or mechanical stimulation, or formalin injection. **Neuroscience Research,** Ireland, v. 43, p. 389-99, 2002.

RODGERS, R.J. Neuropharmacological Aspects of Adaptative Pain Inhibition in Murine “Victims” of Aggression. **Aggressive Behavior**, New York, v. 21, p. 29-39, 1995.

SAKURADA, T.; MANOME, Y.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, A. Involviment of nitric oxide in spinally mediated capsaicin and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry International,** England, v. 29, p. 271-78, 1996.

SEMOS, M.L.; HEADLEY, P.M. The role of nitric oxide in spinal nociceptive reflexes in rats with neurogenic and non-neurogenic peripheral inflammation. **Neuropharmacology,** England, v.33, p. 1487-97, 1994.

SKERRY, T.M.; GENEVER, P.G. Glutamate signalling in non-neuronal tissues.

Trends Pharmacological Sciencies, England, 22: 174 – 181, 2001.

SKILLING, S.R.; SMULLIN, D.H.; BEITZ, A.J.; LARSON, A.A. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord. **Journal Neurochemistry,** England, v.51, p.127-32, 1988.

STEPHENS, D.N.; MELDRUM, B.S.; WEIDMANN, R.; SCHNEIDER, C.; GRUTZNER, M. Does the excitatory amino acid receptor antagonist 2-APH exhibit anxiolytic activity? **Psychopharmacology**, Germany, v. 90, n. 2, p. 166-169, 1986.

STIMMEL, B. Pain, Analgesia and Addiction: **The Pharmacology of Pain**. New York: Raven Press, p. 1-2, 1983.

TAUKULIS, H.K.; GOGGIN, C.E. Diazepam-stress interactions in the rat: effects on autoanalgesia and a plus-maze model of anxiety. **Behavioral and Neural Biology**, New York, v. 53, n. 2, p. 205-216, 1990.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TODD, A.J.; KOERBER, H.R. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Ed.). **WALL and MELZACK'S textbook of pain**. 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006. p. 73-74.

URCH, C.E.; RAHMAN, W.; DICKENSON, A.H. Electrophysiological studies on the role of the NMDA receptor in nociception in the developing rat spinal cord. **Developmental Brain Research**, v.126, p. 81–89, 2001.

VACCARINO, A.L.; MAREK, P.; STEMBERG, W.; LIEBESKIND, J.C. NMDA receptor antagonist MK-801 blocks non-opioid stress-induced analgesia in the formalin test. **Pain**, Amsterdam, v. 50, n. 1, p. 19-123, 1992.

WATKINS, L.R.; MILLIGANG, E.D.; MAIER, S.F. Spinal cord glia: new players in pain. **Pain**, Netherlands, v. 93, p. 201-205, 2001.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Plasticity and pain: role of the dorsal horn. In: McMAHOM, S.B.; KOLTZENBURG, M. (Eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of pain.** 5th ed. Churchill Livingstone: Elsevier, 2006, p.93-97.

XU, L.; MABUCHI, T.; KATANO, T.; MATSUMURA, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; SAKIMURA, K.; MISHINA, M. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. **Nitric oxide**, United States, v. 17, p. 18-24, 2007.

YOU, H.J.; MORCH, C.D.; CHEN, J.; ARENDT-NIELSEN,L. Role of central NMDA versus non-NMDA receptor in spinal withdrawal reflex in spinal anesthetized rats under normal and hyperexcitable. **Brain Research**, Netherlands, v. 981, p. 12-22, 2003.

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