

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAFAEL DE ALMEIDA REIS

**MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO
MEDIADA PELA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL EM RATOS**

CURITIBA

2015

RAFAEL DE ALMEIDA REIS

**MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO
MEDIADA PELA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientador: Prof^a. Dra. Luana Fischer

Coordenador: Prof^a. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire

CURITIBA

2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



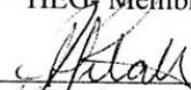
Ata da defesa de dissertação de mestrado de RAFAEL DE ALMEIDA REIS

Aos vinte e nove dias do mês de junho do ano de dois mil e quinze, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação do mestrando **Rafael de Almeida Reis**, intitulada “**MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO MEDIADA PELA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL EM RATOS**”. A abertura teve início às 14h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora do candidato, Professora Doutora Luana Fischer. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra ao aluno, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, a Professora Doutora Luana Fischer passou à palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Joice Maria da Cunha do departamento de Farmacologia da UFPR. Na sequência, passou à palavra a segunda examinadora, Professora Doutora Ana Márcia Delattre do Departamento de Fisiologia da UFPR. O aluno respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Luana Fischer fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “Aprovação”, habilitando-o ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Luana Fischer, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

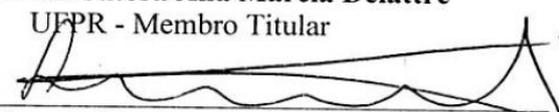
Curitiba, 29 de junho de dois mil e quinze.



Professor Doutor Joice Maria da Cunha
HEG, Membro Titular



Professora Doutora Ana Márcia Delattre
UFPR - Membro Titular



Professora Doutora Luana Fischer
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

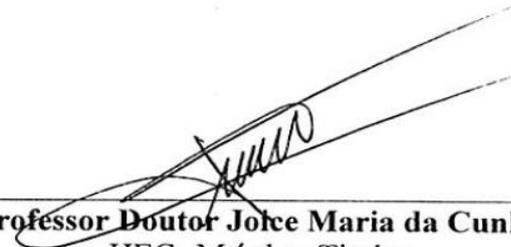


PARECER

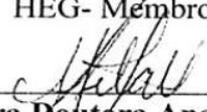
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **RAFAEL DE ALMEIDA REIS** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à Aprovação do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

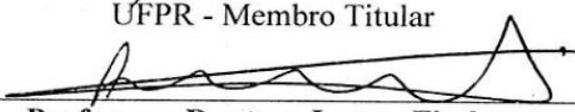
Curitiba, 29 de junho de dois mil e quinze.



Professor Doutor Joice Maria da Cunha
HEG- Membro Titular



Professora Doutora Ana Márcia Delattre
UFPR - Membro Titular



Professora Doutora Luana Fischer
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Dedico este trabalho a memória de minha mãe, Inácia, meu maior exemplo de vida. Nunca permitirei que seu esforço para garantir meu futuro tenha sido em vão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Inácia, que me deram a vida e as oportunidades para me tornar o que eu sou hoje.

A minha namorada, Iva, que me atura, me motiva e por ter me avisado quando abriu o processo seletivo para o mestrado.

Aos meus colegas e professores do Laboratório de Fisiologia da Dor, Beatriz, Dabna, Glaucia, Helena, Jéssica, Luana, Natália e Vinicius, por toda a ajuda que me deram, debates filosóficos, ensinamentos e, principalmente, por terem paciência comigo (quase sempre).

RESUMO

A percepção da dor pode ser modulada em diferentes níveis, desde sua entrada no sistema nervoso central até seu processamento pelas estruturas encefálicas superiores. A Substância Cinzenta Periaquedutal (PAG) é o principal núcleo de controle do mais conhecido sistema endógeno de modulação da dor, a via descendente. A neurotransmissão opioidérgica na PAG tem um papel central no controle dessa via. Dados recentes sugerem que a dopamina desempenha um papel na analgesia mediada por opióides na PAG. Este estudo teve como objetivo contribuir para a melhor compreensão da relação entre opióides e dopamina nos mecanismos antinociceptivos mediados pela PAG. Para isso, avaliamos a habilidade de antagonistas seletivos para receptores D1-*like* (SCH23390) ou D2-*like* (raclopride) em reduzir o efeito antinociceptivo induzido pela administração de agonista seletivo para receptores μ -opióide (DAMGO) na PAG. Também avaliamos o efeito da administração de agonista dopaminérgico D2-*like* (piribedil) na PAG sobre a resposta nociceptiva e a habilidade de antagonista opióide (naloxona) em reduzir esse efeito. Como a antinocicepção mediada por opióides, e possivelmente pela dopamina, na PAG se dá, ao menos em parte, pela inibição de mecanismos GABAérgicos, avaliamos a habilidade de antagonista de receptores GABA_A (bicuculina) em induzir analgesia em ratos despertos quando administrado na PAG. O efeito antinociceptivo induzido pela administração de DAMGO na PAG foi bloqueado pela coadministração de SCH23390 ou raclopride. A administração de piribedil na PAG induziu significativo efeito antinociceptivo, que foi bloqueado pela coadministração de raclopride ou naloxona. Finalmente, bicuculina na PAG não induziu antinocicepção em ratos despertos. Estes dados indicam que opióides e dopamina induzem antinocicepção na PAG de maneira codependente, e que não o fazem exclusivamente pela inibição de mecanismos GABAérgicos.

Palavras-chave: Substância Cinzenta Periaquedutal, Nocicepção, Dor, Dopamina, Opióide, GABA.

ABSTRACT

Pain perception can be modulated at different levels, from entering the central nervous system to its processing by the higher brain structures. The periaqueductal gray (PAG) is the major component of the best known endogenous pain modulation system, the descending pathway, where the opioidergic neurotransmission plays an important role. Recent data suggest that dopamine plays a role in opioid-mediated analgesia in the PAG. This study aimed to contribute to understanding the relationship between opioid and dopamine in the PAG-mediated antinociception. For this, we evaluated the ability of selective D1-like (SCH23390) or D2-like (raclopride) receptor antagonists to reduce the analgesic effect induced by administration of the selective μ -opioid receptor agonist (DAMGO) within the PAG. We also evaluated the effect of the administration of dopaminergic D2-like agonist (piribedil) within the PAG on the nociceptive response and the ability of opioid antagonist (naloxone) to reduce this effect. As the antinociception mediated by opioid and possibly by dopamine in the PAG occurs at least in part by inhibition of GABAergic mechanisms, we evaluated the ability of GABA_A receptor antagonist (bicuculline) administered within the PAG to induce analgesia in awake rats. The antinociceptive effect induced by DAMGO administration within the PAG was blocked by SCH23390 or raclopride co-administration. The administration of piribedil within the PAG induced a significant antinociceptive effect, which was blocked by co-administration of naloxone or raclopride. Finally, bicuculline within the PAG did not induce antinociception in awake rats. These data indicate that dopamine and opioids within the PAG induce antinociception in a co-dependent manner, and that do not exclusively by inhibition of GABAergic mechanisms.

Keywords: Periaqueductal Gray, Nociception, Pain, Dopamine, Opioid, GABA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO NOCICEPTIVA PERIFÉRICA PARA O CORNO DORSAL	15
FIGURA 2	– IMAGEM HISTOLÓGICA DO MESENCÉFALO INDICANDO A LOCALIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL	17
TABELA 1	– DISTRIBUIÇÃO E PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES OPIOIDÉRGICOS NA ANTINOCICEPÇÃO MEDIADA POR DIFERENTES SÍTIOS	20
TABELA 2	– SUMÁRIO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	27
GRÁFICO 1	– CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE SCH23390 SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO DAMGO NO <i>TAIL FLICK</i>	29
GRÁFICO 2	– CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE SCH23390 SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO DAMGO NO <i>RANDALL-SELITTO</i>	30
GRÁFICO 3	– CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE RACLOPRIDE SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO DAMGO NO <i>TAIL FLICK</i>	31
GRÁFICO 4	– CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE RACLOPRIDE SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO DAMGO NO <i>RANDALL-SELITTO</i>	31
GRÁFICO 5	– CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE PIRIBEDIL NO <i>TAIL FLICK</i>	32
GRÁFICO 6	– CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE PIRIBEDIL NO <i>RANDALL-SELITTO</i>	33
GRÁFICO 7	– EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE RACLOPRIDE SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO PIRIBEDIL NO <i>RANDALL-SELITTO</i>	33
GRÁFICO 8	– EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE NALOXONA SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO PIRIBEDIL NO <i>RANDALL-SELITTO</i>	34
GRÁFICO 9	– CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPAG DE BICUCULINA NO <i>RANDALL-SELITTO</i>	34
TABELA 3	– EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA	35

LISTA DE ABREVIações

ACC	–	CÓRTEX ANTERIOR CINGULADO
EXIN	–	INTERNEURÔNIO EXCITATÓRIO
IN	–	INTERNEURÔNIO
ININ	–	INTERNEURÔNIO INIBITÓRIO
NAc	–	NÚCLEO ACCUMBENS
NS	–	NOCICEPTIVO ESPECÍFICO
PAF	–	FIBRA AFERENTE PERIFÉRICA
PAG	–	SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL
PN	–	NEURÔNIO DE PROJEÇÃO
RAIC	–	CÓRTEX INSULAR AGRANULAR ROSTRAL
RVM	–	BULBO ROSTRAL VENTROMEDIAL
SHT	–	TRATO ESPINOHIPOTALÂMICO
SMT	–	TRATO ESPINOMESENFALÍFICO
SNC	–	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SRT	–	TRATO ESPINORETICULAR
STT	–	TRATO ESPINOTALÂMICO
VLO	–	CÓRTEX ORBITAL VENTROLATERAL
VTA	–	ÁREA TEGMENTAL VENTRAL
WDR	–	VARIAÇÃO DINÂMICA AMPLA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 A DOR COMO UM COMPONENTE EVOLUTIVO E SEU IMPACTO NA SOCIEDADE	12
1.2 A DOR COMO EFEITO RESULTANTE DO PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO NOCICEPTIVA	13
1.3 O PAPEL DA PAG NA MODULAÇÃO DA DOR	16
1.4 CARACTERIZAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO OPIOIDÉRGICA	19
1.5 PARTICIPAÇÃO DA DOPAMINA NOS MECANISMOS ANALGÉSICOS ENDÓGENOS	21
1.6 DOPAMINA E OPIÓIDES ENDÓGENOS PODEM ATUAR NA PAG DE MANEIRA CODEPENDENTE?	22
1.7 OBJETIVOS	23
1.7.1 OBJETIVO GERAL	23
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1 ANIMAIS	24
2.2 DROGAS UTILIZADAS	24
2.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	24
2.3.1 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E MAPEAMENTO HISTOLÓGICO	24
2.3.2 TESTE DE RETIRADA DA CAUDA (<i>tail flick</i>)	25
2.3.3 TESTE DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO (<i>Randall-Selitto</i>)	25
2.3.4 TESTE DO CAMPO ABERTO (<i>Open Field</i>)	26
2.3.5 ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS NO SITIO DE INJEÇÃO	26
2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
2.4.1 EXPERIMENTO 1	27
2.4.2 EXPERIMENTO 2	28
2.4.3 EXPERIMENTO 3	28
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3. RESULTADOS	29

3.1 ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA POR DAMGO FOI BLOQUEADA PELO SCH23390 E PELO RACLOPRIDE	29
3.2 ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO PIRIBEDIL FOI BLOQUEADA PELO RACLOPRIDE E PELA NALOXONA	32
3.3 BICUCULINA NÃO INDUZIU EFEITO ANTINOCICEPTIVO	34
3.4 AVALIAÇÃO DOS PADRÕES MOTORES NO <i>OPEN FIELD</i>	35
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1.A DOR COMO UM COMPONENTE EVOLUTIVO E SEU IMPACTO NA SOCIEDADE

A dor possui um papel fundamental na natureza, sendo essencial na autopreservação dos organismos vivos. Através da dor, aprendemos a nos distanciar de potenciais situações de lesão, doença e morte. Mesmo em situações onde a fonte do estímulo nocivo possui caráter inescapável, como lesões teciduais e a maioria das doenças, as modificações comportamentais induzidas pela dor contribuem para a recuperação do organismo (Le Bars et al., 2001). Podemos observar claramente o caráter vital da dor nos casos de insensibilidade congênita à estímulos nocivos. Esses indivíduos raramente chegam à adolescência, incapazes de perceber condições que estejam colocando suas vidas em risco (Young, 2008).

Mas existem situações em que a dor perde seu caráter de aviso e passa a se tornar o problema em si. Isso ocorre caracteristicamente nas chamadas dores crônicas ou persistentes. Em oposição ao tipo de dor fisiológica, fásica ou aguda, que permanece tão somente até a retirada do estímulo nocivo ou a resolução de um processo inflamatório, a dor crônica é patológica, por consequência de dano tecidual permanente e/ou lesão de nervo periférico, podendo perdurar por meses ou anos (Millan, 1999, Hahm et al., 2011).

Não há dados sobre a prevalência de dor crônica no Brasil, mas, extrapolando dados da população americana (IOM, 2011) para a brasileira, chegaríamos ao número de setenta e três milhões de pessoas nessa condição em todo o país. Certamente este é um dos maiores problemas da saúde pública, possivelmente a nível mundial, que além de afetar diretamente a qualidade de vida de milhões de pessoas, está associado a um gigantesco impacto econômico. Só nos Estados Unidos, a estimativa de custo com tratamento e perda de produtividade relacionadas à dor crônica em 2010 foi estimada em pelo menos 560 bilhões de dólares (IOM, 2011). Pessoas que sofrem algum tipo de dor crônica, como enxaqueca ou dor articular, possuem um gasto significativamente maior com cuidados médicos e maior número de faltas no trabalho em relação às pessoas sem dor (Gaskin and Richard, 2012). Considerando esse impacto na economia mundial e, ainda mais importante, a inquestionável perda de qualidade de vida daqueles que convivem com a dor, é

fundamental o investimento em pesquisas acerca dos mecanismos de processamento e modulação da dor.

Há muito tempo a humanidade interfere nesses mecanismos, por exemplo, através do uso do ópio, um extrato da papoula com propriedades analgésicas, cujos primeiros registros de uso datam de 3.000 anos A.C.. O princípio ativo desta planta, a morfina, foi revelado apenas no início do século XIX (Duarte, 2005), e ainda é o principal meio de aliviar dores severas até os dias atuais. Os opióides, classe de substâncias da qual a morfina faz parte, também são produzidos endogenamente e têm um papel central nos mecanismos endógenos de modulação da dor, como discutido a seguir. Essas drogas seriam uma excelente solução para o tratamento da maioria das condições dolorosas, não fossem os efeitos colaterais, como sedação, náusea, vômito, depressão respiratória, constipação, e, principalmente, o desenvolvimento de tolerância e adicção.

Sob tais observações, é evidente a necessidade de nos aprimorarmos na busca por alternativas viáveis de combate a dor crônica. O adequado conhecimento dos mecanismos envolvidos na modulação endógena da dor é essencial para o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, fundamentadas na poderosa capacidade do Sistema Nervoso Central (SNC) de afetar a experiência dolorosa.

1.2.A DOR COMO EFEITO RESULTANTE DO PROCESSAMENTO DA INFORMAÇÃO NOCICEPTIVA

Em geral, a dor é a experiência pessoal resultante de um estímulo nocivo. Este é primariamente detectado pelo nosso organismo através de neurônios especializados, os chamados nociceptores. A informação captada por esses neurônios aferentes primários converge ao SNC através de potenciais de ação, sendo processada por regiões espinhais e encefálicas específicas, podendo ou não ser percebida como dor (Millan, 1999).

Um estímulo nocivo pode ser classificado de acordo com sua natureza, podendo ser elétrico, térmico (calor/frio), mecânico ou químico (Le Bars et al., 2001). Os já mencionados nociceptores são povoados por famílias de canais que são sensíveis a estímulos provenientes de uma ou mais dessas fontes. Quando ativados, esses canais se abrem, permitindo a entrada de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, despolarizando a membrana do nociceptor, podendo disparar um potencial de ação. Os nociceptores

frequentemente expressam canais sensíveis a estímulos de diferentes naturezas, sendo nomeados polimodais (Geffeney and Goodman, 2012).

Os nociceptores estão presentes em dois tipos de fibras aferentes periféricas (*peripheral afferent fibres*, PAFs). As do tipo A δ , mielinizadas, são responsáveis pela primeira sensação dolorosa, transmitindo rapidamente a informação ao SNC. As do tipo C, amielinizadas, são de transmissão lenta, induzindo uma segunda sensação dolorosa, de aspecto difuso (Millan, 1999, Brooks and Tracey, 2005). Como demonstrado na FIGURA 1, essas PAFs fazem sinapses com neurônios de segunda ordem no Corno Dorsal da Medula Espinhal. Estes podem ser nociceptivos específicos (*nociceptive-specific*, NS) ou de variação dinâmica ampla (*wide-dynamic range*, WDR). Cada um desses ainda pode ser dividido em neurônio de projeção (*projection neurone*, PN), que estabelece conexão com as regiões supraespinhais, e interneurônio (*interneurone*, IN), que estabelece sinapses inter ou intralaminares. Adicionalmente, os INs são subdivididos em excitatórios (*excitatory interneurons*, EXINs) e inibitórios (*inhibitory interneurons*, ININs) (Millan, 1999). Estes últimos possuem um papel chave na via descendente de modulação da dor, que será posteriormente abordada. As Laminas I, II₀, V, VI e X são as mais atuantes na recepção, processamento e transmissão da informação nociceptiva (Millan, 1999).

A informação nociceptiva ascende para diferentes áreas supraespinhais através dos tratos espinotalâmico (*spinothalamic tract*, STT), espinoreticular (*spinoreticular tract*, SRT), espinomesencefálico (*spinomesencephalic tract*, SMT) e espinohipotálâmico (*spinohypothalamic tract*, SHT). De forma simplificada, podemos dividir a percepção da dor em dois componentes. O primeiro, sensorial-discriminativo, é processado em grande parte pelo tálamo e pelo córtex somatossensorial. Suas funções remetem ao estabelecimento de intensidade, localização, duração, padrão temporal e tipo do estímulo nocivo. Já o componente afetivo-cognitivo envolve diversas regiões do encéfalo, sendo particularmente processado pelo córtex anterior cingulado (*anterior cingulate cortex*, ACC) e pela Insula. Este componente determina como a dor interage com o humor, a atenção e a memória, bem como nosso nível de tolerância e capacidade de lidar com o estímulo recebido (Millan, 1999, Brooks and Tracey, 2005).

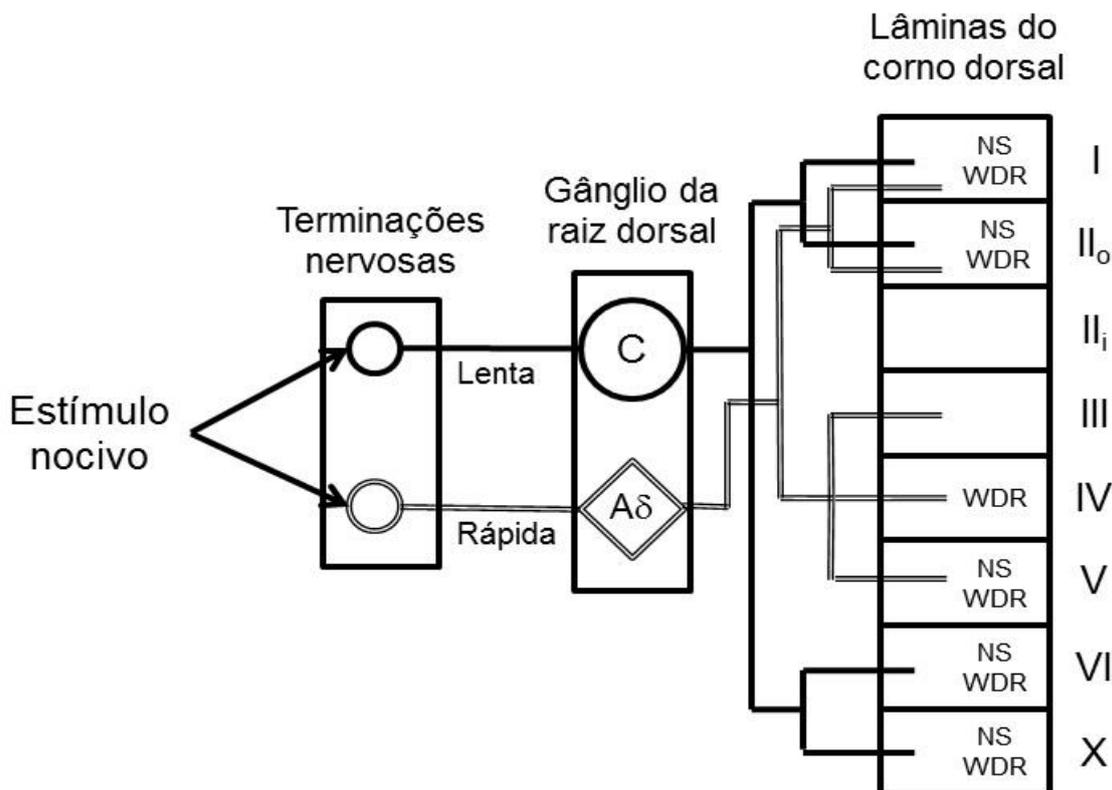


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSMISSÃO DA INFORMAÇÃO NOCICEPTIVA PERIFÉRICA PARA O CORNO DORSAL. O estímulo nocivo ativa as terminações nervosas dos nociceptores cujos corpos celulares se encontram no gânglio da raiz dorsal. Esses nociceptores possuem projeções ligadas a neurônios de segunda ordem no corno dorsal, anatomicamente divididos em lâminas. FONTE: Adaptada de Millan (1999).

Sabemos que a percepção da dor pode ser modulada em diferentes níveis, desde sua entrada no SNC, ou seja, durante a transmissão da informação nociceptiva na Medula Espinhal, até seu processamento pelas estruturas encefálicas superiores. Importante ressaltar que essa modulação pode ocorrer nos dois sentidos, tanto facilitando quanto inibindo a transmissão de impulsos associados a estímulos nociceptivos e, portanto, aumentando ou diminuindo a percepção da dor (Melzack and Wall, 1965, Stamford, 1995, Millan, 1999, Brooks and Tracey, 2005). Como citado anteriormente, essa modulação da dor já é conhecida há muito tempo, mas seus mecanismos ainda não foram completamente esclarecidos.

Alguns desses mecanismos são conhecidos e nos fornecem pistas sobre o funcionamento do sistema nociceptivo e de que forma podemos interferir nesse sistema. Um exemplo é o controle nociceptivo ascendente, pela qual um intenso estímulo nocivo pode ativar efeitos analgésicos, diminuindo a entrada de informações nociceptivas subsequentes. Essa via depende em grande parte de inibição neuronal no núcleo accumbens (NAc) induzida por opióides e pela

dopamina. O núcleo accumbens *per se* parece atuar na facilitação da transmissão nociceptiva (Gear and Levine, 1995, Gear et al., 1999, Gear and Levine, 2011, Mason, 2012b).

O mecanismo clássico de modulação da dor, proposto inicialmente por Basbaum e Fields (1978 e 1984), é o da via descendente. Ao receber projeções da amígdala, tálamo, hipotálamo, áreas corticais e do corno dorsal, a Substância Cinzenta Periaquedutal (*periaqueductal grey*, PAG) envia eferências para as regiões de onde partem a maioria das fibras descendentes, a Região Pericerulea Rostromedial, o Núcleo Paragigantocelular e o Bulbo Rostral Ventromedial (*rostral ventromedial medulla*, RVM). Provavelmente a conexão mais importante se faz com os neurônios do RVM, região que inclui o Núcleo Magno da Rafe e formação reticular adjacente (Stamford, 1995, Millan, 1999, Millan 2002, Fields, 2004). A partir destes núcleos as fibras descendentes se projetam através do *funículo dorsolateral*, estabelecendo sinapses com ININs e EXINs no corno dorsal, controlando a passagem dos impulsos nociceptivos (Stamford, 1995, Millan, 1999, Millan, 2002, Fields, 2004).

1.3. O PAPEL DA PAG NA MODULAÇÃO DA DOR

Dentre as regiões do SNC responsáveis pela modulação da dor, a PAG tem importância central (Stamford, 1995, Millan, 1999, Millan, 2002). Desde que Reynolds (1969), em seu clássico estudo, observou que a estimulação elétrica da PAG induzia um importante efeito analgésico, inúmeras pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de melhor compreender sua função na modulação da dor. Hoje sabemos que a PAG é o principal núcleo de controle das grandes vias modulatórias descendentes, fazendo a ligação de diversas estruturas prosencefálicas com a medula espinhal (Stamford, 1995).

Conforme demonstrado na FIGURA 2, a PAG se localiza no Mesencéfalo, circunvizinhando o Aqueduto Cerebral. Entre as funções conhecidas da PAG se incluem o processamento de reações comportamentais ligadas ao medo e ansiedade, regulação de componentes autonômicos e, como já foi dito, a modulação da dor (Behbehani, 1995). Estas funções se distribuem entre grupos neuronais organizados em padrões colunares longitudinais. De maior importância para este trabalho, a porção ventrolateral da PAG está fortemente relacionada com a analgesia induzida por opióides (Bandler and Shipley, 1994).

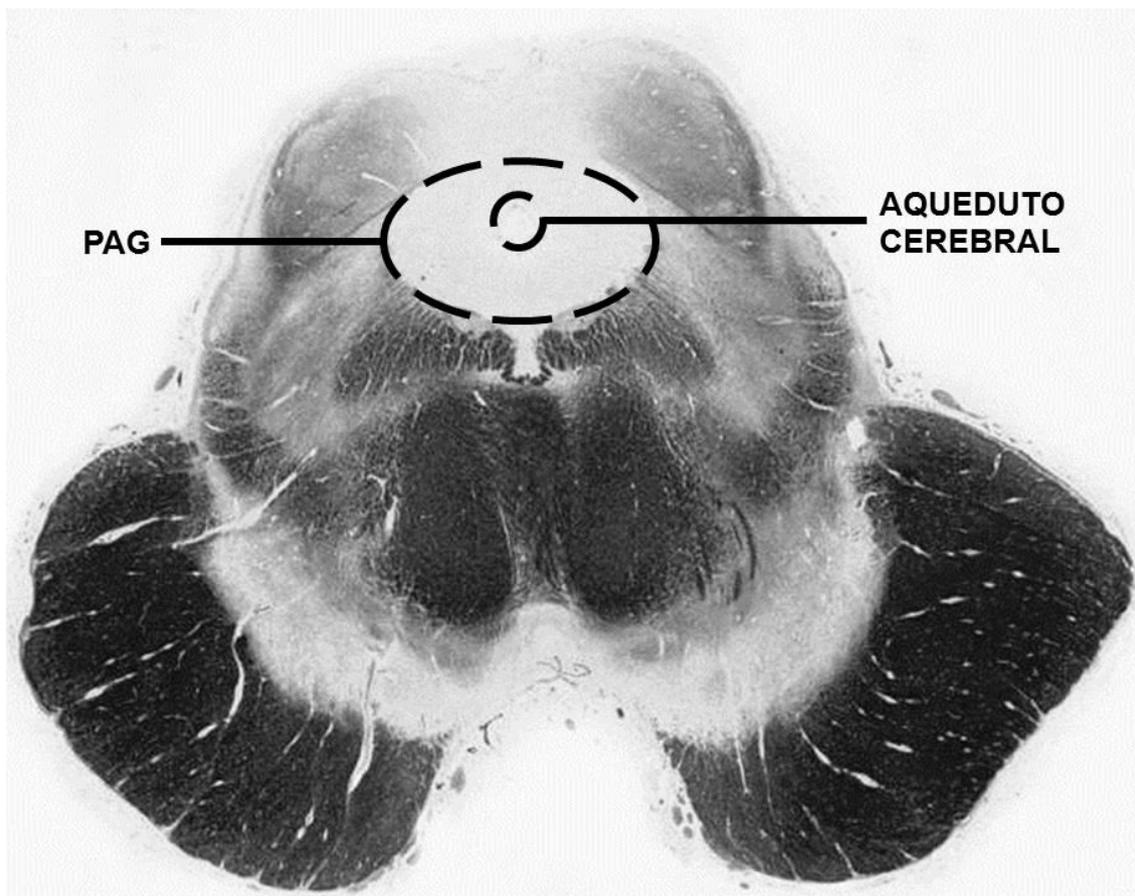


FIGURA 2 – IMAGEM HISTOLÓGICA DO MESENCÉFALO INDICANDO A LOCALIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (PAG). FONTE: Adaptada de Queiroz (2006).

O efeito antinociceptivo induzido pela PAG pode ser obtido pela administração de agonista opióide (Depaulis et al., 1987, Smith et al., 1988, Tseng and Tang, 1989, Smith et al., 1992, Rossi et al., 1994, Lane et al., 2005, Morgan and Clayton, 2005, Meyer et al., 2009, Mehta et al., 2011), agonista dopaminérgico (Meyer et al., 2009) ou antagonista GABAérgico (Moreau and Fields, 1986, Sandküler et al., 1989, Roychowdhury and Fields, 1996). Entretanto, o efeito obtido pelo antagonista GABAérgico só pode ser observado em experimentos que usaram ratos anestesiados. Quando testado em ratos despertos, nenhum efeito analgésico foi observado (Zambotti et al., 1982, Depaulis et al., 1987, Yu and Han, 1990).

A PAG também parece ser de grande importância na analgesia induzida por outras regiões do SNC. O efeito analgésico decorrente da estimulação elétrica do córtex motor foi bloqueado por antagonista opióide intraPAG (Chiou et al., 2013). Da mesma forma, a administração de agonista opióide na amígdala, na habênula ou por via sistêmica induz analgesia de forma dependente da ativação de receptores opióides na PAG (Yu and Han, 1990, Pavlovic et al., 1996, Manning and Franklin,

1998, Tershner and Helmsteller, 2000). A ativação de receptores dopaminérgico na PAG parece ser necessária na analgesia induzida pela estimulação do córtex motor ou por agonista opióide sistêmico (Flores et al., 2004, Chiou et al., 2013). Por fim, a administração de agonista GABAérgico intraPAG parece se contrapor aos efeitos antinociceptivos de agonista opióide administrado na PAG, no núcleo talâmico parafascicular ou pela via subcutânea (Zambotti et al., 1982, Depaulis et al., 1987, Munn et al., 2009).

O principal mecanismo pelo qual a PAG modula a nocicepção é pela inibição da transmissão do estímulo nocivo no corno dorsal. Internamente, neurônios GABAérgicos inibem tonicamente as eferências da PAG para o RVM (Reichling and Basbaum, 1990, Fields, 2004, Millan, 2002). Estes interneurônios GABAérgicos parecem expressar receptores opióides, que são inibitórios (Vaughan And Christie, 1997, Millan, 2002, Hahm et al., 2011). Também foi proposto que esses interneurônios expressariam receptores dopaminérgicos do tipo inibitório (Meyer et al., 2009). Dessa forma, a liberação de opióides endógenos ou dopamina na PAG induziria a inibição do tônus GABAérgico, desinibindo as projeções da PAG para o RVM, ativando a via descendente de modulação da dor (Moreau and Fields, 1986, Stamford, 1995, Stiller et al., 1996, Vaughan and Christie, 1997, Fields, 2004, Meyer et al., 2009, Hahm et al., 2011, Ingram, 2012).

A teoria mais aceita é de que isto ocorra pela modulação de duas classes de neurônios no RVM, diferenciadas pelo início da atividade elétrica em resposta a um reflexo nociceptivo (por exemplo, reflexo de retirada da pata ou cauda em resposta a estímulo térmico ou mecânico). As células *ON* iniciam e as células *OFF* interrompem sua atividade elétrica imediatamente antes do reflexo nociceptivo. Ambas as células se projetam do RVM para a medula espinhal. As células *ON* facilitam a transmissão da informação nociceptiva, de acordo com seu padrão de disparo coincidente com o reflexo nociceptivo. As células *OFF* inibem a transmissão da informação nociceptiva, coerente com seu padrão de disparo que é interrompido antes do reflexo nociceptivo. Portanto, a maior ativação de uma classe em detrimento da outra ajustará a dificuldade de transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal (Fields et al., 1991, Heinricher et al., 1992, Fields, 2004). Recentemente foi proposto que esta teoria possa conter erros por ter sido testada em animais anestesiados. Por exemplo, a frequência de disparos das células *OFF* é maior imediatamente antes de um reflexo nociceptivo do que quando esse reflexo não ocorre (Mason, 2012a).

Adicionalmente, a redução na frequência de disparos das células *ON* podem induzir analgesia mesmo na ausência de ativação das células *OFF* (Mason, 2012a). Mais importante, o efeito da morfina sobre animais despertos modificou o padrão fásico de resposta a estímulos nocivos das células *ON* e *OFF*, mas não interferiu no padrão tônico de disparo destas células. Entretanto, em animais anestesiados, ambos os padrões foram afetados, sugerindo que a anestesia pode influenciar no efeito de drogas em testes nociceptivos (Mason, 2012a).

Ao contrário dos mecanismos espinhais de modulação da dor, o papel da PAG nos mecanismos modulatórios supraespinhais é muito menos conhecido, mas possivelmente dependa, em parte, da ativação da via dopaminérgica mesolímbica. Existem projeções da PAG para a Área Tegmental Ventral (*ventral tegmental area*, VTA) (Omelchenko and Sesack, 2010), Tálamo e amígdala (Hasue and Shammah-Lagnado, 2002). A VTA projeta neurônios dopaminérgicos para diversas regiões ligadas ao componente emocional e cognitivo da dor, como o ACC, o córtex orbital ventrolateral (*ventrolateral orbital cortex*, VLO), o córtex insular agranular rostral (*rostral agranular insular cortex*, RAIC), a amígdala e o NAc. De fato, estudos demonstraram que a ativação da via mesolímbica induz efeito antinociceptivo pela ativação de receptores dopaminérgicos nessas regiões (Altier and Stewart, 1999, Wood, 2008, Sheng et al., 2009, Dang et al., 2011). Como já mencionado, existem evidências da participação da PAG na analgesia induzida pela amígdala (Pavlovic et al., 1996, Tershner and Helmsteller, 2000), pelo NAc (Yu and Han, 1990, Mason, 2012b) e pelo VLO (Xie et al., 2009). Entretanto, ainda não está esclarecido se a participação da PAG na analgesia induzida por essas regiões ocorre através de mecanismos supraespinhais ou pela ativação da via descendente.

Os mecanismos responsáveis pelo papel central da PAG na modulação da dor não são totalmente conhecidos, mas o tônus opioidérgico na PAG e no RVM certamente é de grande relevância (Heinricher et al., 1992, Fields, 2004).

1.4. CARACTERIZAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO OPIOIDÉRGICA

De fato, estudos demonstraram a existência de receptores opióides em diversas áreas do SNC que participam da modulação da nocicepção. As principais classes de receptores opióides conhecidas e estudadas atualmente são μ (*mu*), δ (*delta*) e κ (*kappa*). Para as três classes, a sinalização intracelular é inibitória, resultando em abertura de canais de K^+ e fechamento de canais de Ca^{2+} . Como demonstrado na

TABELA 1, dentre os subtipos de receptores, o receptor μ se destaca nas pesquisas por sua efetiva participação na analgesia, tanto central quanto periférica (Smith et al., 1988, Rossi et al., 1994, Vaughan and Christie, 1997, Yaksh, 1997, Fields, 2004, Hahm et al., 2011).

SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO	AÇÃO ANTINOCICEPTIVA		FARMACOLOGIA
	Reflexo	Fuga	
Prosencéfalo/Diencéfalo			
Amígdala (corticomedial)	0	++	μ
Núcleo Accumbens		+	μ
Mesencéfalo			
Substância Cinzenta Periaquedutal	+++	+++	$\mu \gg \delta = \kappa = 0$
Formação Reticular Mesencefálica	++	++	μ
Substância Negra	++	++	$\mu \gg \delta = \kappa = 0$
Bulbo Raquidiano			
Medula Medial	++	++	$\mu = \delta > \kappa = 0$
Medula Espinhal	+++	+++	$\mu = \delta > \kappa = 0$
Sítios periféricos			
		+++	$\mu = \kappa > \delta = 0$

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO E PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES OPIOIDÉRGICOS NA ANTINOCICEPÇÃO MEDIADA POR DIFERENTES SÍTIOS. Podemos observar a massiva distribuição dos receptores μ -opióides desde as regiões periféricas até as regiões corticais do SNC. Os sinais positivos (+) indicam o grau de interferência da ativação do receptor opióide (μ , δ ou κ) sobre o comportamento defensivo. FONTE: Adaptado de Yaksh (1997).

Os neurotransmissores opióides compõem um intrincado conjunto de famílias com participações diferenciadas na modulação da dor. Para facilitar seu entendimento, costuma-se dividir os opióides endógenos em três grupos principais. As encefalinas atuam fortemente como ININs em estruturas supraespinhais (incluindo a PAG), desinibindo, via ativação de receptores μ e δ , projeções que ativam a via antinociceptiva descendente. O grupo das dinorfinas é particularmente seletivo aos receptores κ , possuindo duas particularidades. Pode atuar de forma tanto pró quanto antinociceptiva, e exerce parte de seus efeitos de forma independente de receptores opióides. Finalmente, a β -endorfina atua principalmente na PAG e na amígdala, via projeção do núcleo arqueado hipotalâmico, ativando receptores μ e exercendo funções antinociceptivas. O grupo das melanocortinas (produto do mesmo precursor da b-endorfina) e o das endomorfina são menos estudados, mas sabe-se que atuam de forma pró e antinociceptiva, respectivamente (Millan, 2002).

Experimentalmente, a morfina é o agonista opióide mais utilizado para mimetizar os efeitos dos opióides endógenos, sendo um agonista preferencial de receptores μ ,

podendo também se ligar a receptores δ e κ . Na PAG, estudos utilizando diferentes agonistas e antagonistas opióides demonstraram a predominância dos receptores μ na indução de analgesia (Rossi et al., 1994, Smith et al., 1988, Smith et al., 1992, Vaughan and Christie, 1997). Desta forma, a utilização de agonista mais seletivo para este tipo de receptor pode ser preferível para o estudo dos mecanismos de modulação da dor mediados pela PAG.

O papel dos neurotransmissores opióides na antinocicepção é de claro protagonismo, mas pode ser influenciado pela atuação de diversos outros neurotransmissores. Como já descrito, sua interação com a atividade GABAérgica na PAG está bem estabelecida pela literatura. No entanto, pouco se sabe a respeito da relação entre opióides e dopamina na modulação da dor.

1.5. PARTICIPAÇÃO DA DOPAMINA NOS MECANISMOS ANALGÉSICOS ENDÓGENOS

A dopamina é um neurotransmissor do grupo das catecolaminas, responsável pela modulação de diversas funções encefálicas, incluindo a atividade motora, cognição, emoção e a modulação da dor. Existem cinco subtipos de receptores dopaminérgicos. Os receptores D1 e D5 estão acoplados a proteínas G estimulatórias, sendo dessa forma agrupados na subfamília *D1-like*. Os receptores D2, D3 e D4 se acoplam em proteínas G inibitórias, compondo a subfamília *D2-like*. Portanto, em termos gerais, a dopamina pode atuar sobre a célula-alvo de forma estimulatória ou inibitória (Missale et al., 1998, Millan, 2002, Wood, 2008).

Existem poucas projeções dopaminérgicas das regiões supraespinhais para a medula espinhal. A participação da neurotransmissão dopaminérgica no corno dorsal depende do tipo de receptor ativado. Receptores da família *D2-like* parecem ter um papel antinociceptivo, enquanto receptores da família *D1-like* facilitam a transmissão do estímulo nocivo no corno dorsal (Millan, 2002). Situação similar pode ser encontrada em outras estruturas do SNC. No núcleo accumbens, a ativação de receptores *D2-like* induz analgesia (Taylor et al., 2003), enquanto seu bloqueio impede o efeito analgésico induzido pela morfina na VTA (Altier and Stewart, 1998). A administração de agonista dopaminérgico não seletivo ou D2-Like na VLO também induz efeito analgésico, possivelmente via inibição pré-sináptica GABAérgica (Sheng et al., 2009, Tang et al., 2009, Dang et al., 2011).

Como já foi dito anteriormente, evidências recentes têm demonstrado que a dopamina parece participar da analgesia mediada pela PAG. A presença de neurônios dopaminérgicos nessa região está bem caracterizada, em grande parte estabelecendo sinapses locais (Hasue and Shammah-Lagnado, 2002, Flores, 2004, Lu et al., 2006, Meyer et al., 2009, Omelchenko and Sesack, 2010, Suckow et al., 2013). Entretanto, sua atuação nos mecanismos modulatórios da PAG ainda não está bem estabelecido.

A liberação endógena de dopamina na PAG parece contribuir para a analgesia mediada por opióides, uma vez que a administração de morfina intraPAG foi atenuada pela administração de antagonista dopaminérgico não seletivo no mesmo sítio (Meyer et al., 2009). Adicionalmente, a lesão de neurônios dopaminérgicos na PAG ou a administração local de antagonista *D1-like*, mas não *D2-like*, atenuou a analgesia induzida pela administração sistêmica de agonista opióide (Flores et al., 2004). Em concordância, a antinocicepção induzida por estimulação elétrica do córtex motor, em teste de estimulação elétrica da pata, foi bloqueada pela administração na PAG de antagonista dopaminérgico não seletivo ou *D1-like*, mas não *D2-like* (Chiou et al., 2013). Em aparente oposição, outro estudo demonstrou que antagonista *D2-like*, mas não *D1-like*, bloqueou o efeito antinociceptivo da administração de agonista dopaminérgico não seletivo na PAG (Meyer et al. 2009). Em conjunto, estes estudos indicam que ambas as subfamílias de receptores dopaminérgicos, *D1-* e *D2-like*, podem ter participação na antinocicepção mediada pela PAG.

1.6. DOPAMINA E OPIÓIDES ENDÓGENOS PODEM ATUAR NA PAG DE MANEIRA CODEPENDENTE?

Embora evidências demonstrem que o bloqueio de receptores dopaminérgicos na PAG diminua o efeito antinociceptivo de agonistas opióides (Meyer et al., 2009), não há concordância na literatura sobre qual subtipo de receptor dopaminérgico medeia esse efeito (Flores et al., 2004, Meyer et al., 2009, Chiou et al., 2013). Tampouco se sabe se a analgesia induzida pela administração de agonista seletivo μ -opioide na PAG é afetada, e em qual proporção, pela coadministração de antagonistas seletivos *D1-like* ou *D2-like*.

Ainda menos se conhece a respeito dos efeitos mediados pela dopamina na PAG, embora tenha sido demonstrado que a administração cumulativa de agonista

dopaminérgico não seletivo induza antinocicepção mediada por receptores *D2-like* (Meyer et al., 2009), não se sabe qual o efeito da administração de agonista seletivo *D2-like*. Também não há evidências na literatura que demonstrem se a antinocicepção mediada por agonista dopaminérgico na PAG depende de opioides.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. OBJETIVO GERAL

Diante do exposto o objetivo deste trabalho foi contribuir com o esclarecimento da relação entre mecanismos dopaminérgicos e opioidérgicos na analgesia mediada pela PAG em ratos.

1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o envolvimento de receptores dopaminérgicos no efeito antinociceptivo mediado por agonista μ -opióide na PAG.
- Contribuir para elucidar o papel dos receptores *D2-like* no efeito antinociceptivo mediado pela PAG.
- Testar a hipótese de que antagonista GABAérgico administrado na PAG induz analgesia em animais despertos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar pesando entre 250-330 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (3 a 5 por gaiola) contendo maravalha, em ambiente com controle de luminosidade (ciclos claro/escuro de 12 horas) com alimentação e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as diretrizes propostas pela IASP (Associação Internacional para Estudo da Dor) para pesquisa em animais conscientes (Zimmermann, 1983). Em particular, a duração dos experimentos foi a menor possível, a intensidade do estímulo nociceptivo e o número de animais por grupo foram mantidos ao mínimo necessário. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (CEUA nº 751).

2.2. DROGAS UTILIZADAS

Piribedil, agonista dopaminérgico seletivo para receptores D2-*like* (1,5, 6 e 12 µg) foi utilizado por ser mais estável que a dopamina e pela comprovada atuação desse subtipo de receptor na antinocicepção em outras regiões do SNC, conforme descrito na introdução; SCH 23390, antagonista seletivo de receptores D1-*like* (2, 4 e 6 µg) (Flores et al., 2004, Meyer et al., 2009); Raclopride, antagonista seletivo de receptores D2-*like* (2, 4 e 6 µg) (Dang et al., 2011); Naloxona, antagonista opióide não seletivo (0,5 µg) (Chiou et al., 2013); DAMGO (*[D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin*), agonista seletivo µ-opióide (0,15 µg) (Schmidt et al., 2002); Bicuculina, antagonista de receptores GABA_A (12,5, 25 e 37,5 ng) (Moreau and Fields, 1986). Todas as drogas foram adquiridas da Sigma-aldrich, SP, Brasil, exceto piribedil, adquirido da Tocris Biocience, USA. As drogas foram dissolvidas em salina (NaCl 0,9%), exceto piribedil e bicuculina, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO 100%).

2.3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.3.1. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E MAPEAMENTO HISTOLÓGICO

Os animais foram previamente anestesiados com xilazina (100 mg/kg) e cetamina (600 mg/kg). A seguir uma cânula guia de aço inoxidável de calibre 25 foi posicionada segundo o plano estereotáxico estabelecido de forma que sua

extremidade inferior localize-se 1,5 mm dorsalmente ao sítio de interesse. A cânula foi fixada no local com resina acrílica. As coordenadas utilizadas para injeção na porção ventrolateral da PAG a partir da lambda foram: 0 milímetros ântero-posterior; -2 milímetros médio-lateral; -3,9 milímetros dorso-ventral; 18 graus de angulação. Depois da cirurgia, os animais receberam dipirona (50 mg/kg) e enrofloxacina (0,5 mg/kg). Os experimento foram realizados entre 7 e 9 dias após a implantação das cânulas.

Em todos os experimentos foi realizado o mapeamento histológico com o objetivo de confirmar o sítio da injeção. Para isso os animais foram eutanasiados com uma overdose de pentobarbital e perfundidos, através do coração, com solução salina seguida por uma solução de formalina 4%. Na sequência, o corante Azul de Evans (1%, 0,5 µl) foi administrado no sítio de injeção, o cérebro foi removido, armazenado em freezer por uma semana, e cortado coronalmente. O sítio de injeção foi mapeado de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 1986).

2.3.2. TESTE DE RETIRADA DA CAUDA (*tail flick*)

O teste de retirada da cauda, ou *tail flick*, avalia uma resposta nociceptiva reflexa integrada ao nível medular (pode ser observada em animais descerebrados). Portanto, qualquer manipulação experimental supra-espinhal que o module necessariamente o faz através de vias descendentes de modulação da dor. Os animais foram posicionados sobre a superfície plana do aparato de teste, sendo gentilmente restritos pelo experimentador. Foi registrado o tempo necessário para cada animal exibir o reflexo de retirada da cauda em resposta ao calor gerado por um feixe de luz focalizado na superfície dorsal da cauda (de 2 a 5 cm a partir do topo). Um timer digital gravou automaticamente a latência de resposta (Acurácia de 0,1 segundo). A intensidade do feixe de luz foi ajustada para produzir uma linha de base da latência entre 2,5 e 3,5 segundos. O ponto de corte foi de 6 segundos, utilizado para prevenir danos aos tecidos.

2.3.3. TESTE DE LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO (*Randall-Selitto*)

O teste de limiar mecânico, ao contrario do anterior, necessita da integração de vias encefálicas superiores, não sendo, portanto, estritamente reflexo. Para a quantificação do limiar nociceptivo mecânico, foi realizado o teste de *Randall-Selitto* (Randall and Selitto, 1957). Neste teste, uma pressão com aumento gradual e

contínuo foi aplicada na face dorsal da pata ipsilateral dos ratos. Quando o animal exibiu o comportamento de retirada da pata, a força aplicada foi imediatamente interrompida, o seu valor registrado e utilizado como medida do limiar nociceptivo mecânico. O limiar de nocicepção mecânica é definido como a força em gramas que induz o reflexo de retirada da pata. Foi estabelecida uma linha de base do limiar entre 80 e 150 g, para evitar grande variabilidade das medidas basais. O ponto de corte foi de 240 g, utilizado para prevenir dano tecidual.

2.3.4. TESTE DO CAMPO ABERTO (*Open Field*)

O teste do campo aberto foi utilizado como um indicador global da atividade locomotora, descartando a possibilidade da administração da droga na PAG afetar o comportamento motor dos animais. O teste do campo aberto consiste em uma área circular (60 de diâmetro), dividido em 12 quadrados, limitado por uma parede de 50 cm de altura, e iluminado por quatro lâmpadas de 60w situadas 48 cm acima do piso da área. Cada animal foi posicionado no centro e, a seguir, permitido explorar por 1 minuto. O comportamento exploratório foi medido pela quantidade de quadrados cruzados nesse tempo e pelo número de vezes que o animal ficou levantado sobre duas patas.

2.3.5. ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS NO SÍTIO DE INJEÇÃO

O animal foi gentilmente contido enquanto uma agulha 1,5 mm maior que a cânula guia, acoplada a um tubo plástico flexível, foi posicionada no sítio de injeção. A droga foi injetada por uma seringa de vidro (Hamilton, Reno, NV) a uma taxa de 0,75 µl/min (total 0,5 µl).

2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os grupos experimentais foram divididos conforme apresentado na TABELA 2. Ratos cujo mapeamento histológico revelou erro no posicionamento da cânula guia ou cuja média da medida basal ficou fora da linha de base foram excluídos da pesquisa, o que explica a variação do n entre os grupos.

TABELA 2 – SUMÁRIO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

DROGA 1	DROGA 2	N*
A. RANDALL-SELITTO/TAIL FLICK (tempo 15, 30 e 60 min)		
Veículo (Salina)	Veículo (Salina)	7/5
DAMGO 0,3 µg	Veículo (Salina)	7/6
DAMGO 0,3 µg	SCH23390 2 µg	6/3
DAMGO 0,3 µg	SCH23390 4 µg	6/6
DAMGO 0,3 µg	SCH23390 6 µg	7/0
Veículo (Salina)	SCH23390 4 µg	5/5
DAMGO 0,3 µg	Raclopride 2 µg	10/5
DAMGO 0,3 µg	Raclopride 4 µg	10/0
Veículo (Salina)	Raclopride 4 µg	5/5
B. RANDALL-SELITTO/TAIL FLICK (tempo 5, 15 e 30 min)		
Veículo (DMSO) [#]	Veículo (Salina)	5/4
Piribedil 1,5 µg	Veículo (Salina)	6/4
Piribedil 6 µg	Veículo (Salina)	6/6
Piribedil 12 µg	Veículo (Salina)	10/10
C. RANDALL-SELITTO (tempo 5, 15 e 30 min)		
Piribedil 12 µg	Raclopride 4 µg	7
Piribedil 12 µg	Naloxona 0,5 µg	5
Veículo (Salina)	Naloxona 0,5 µg	5
Bicuculina 12,5 ng	-	6
Bicuculina 25 ng	-	6
Bicuculina 37,5 ng	-	5

*Nas sessões A e B, o valor de N a esquerda indica o número de ratos submetidos apenas ao Randall-Selitto. O valor a direita indica o número de ratos submetidos a ambos os testes, Randall-Selitto e Tail Flick.

[#]O grupo controle indicado foi utilizado como base de comparação para os grupos relatados nas sessões B e C.

2.4.1. EXPERIMENTO 1

O primeiro experimento visou avaliar o efeito de antagonistas dopaminérgico sobre a analgesia induzida por agonista opióide na PAG. Os ratos foram trazidos para a sala de experimentação entre 7 e 9 dias após a cirurgia estereotáxica. Primeiro, uma medida basal do *tail flick* e do *Randall-Selitto* foi obtida 10 minutos antes da administração das drogas, sendo utilizada a média de duas medidas por teste. Na sequência, foi administrado SCH 23390, raclopride ou salina cinco minutos antes da administração do DAMGO ou seu veículo (conforme apresentado na sessão A da TABELA 1). Novas medidas, da mesma forma que na medida basal, foram obtidas 15, 30 e 60 minutos após a administração do DAMGO. Em seguida, os ratos foram submetidos ao *open field*, sacrificados, perfundidos e seus cérebros retirados para o mapeamento histológico.

2.4.2. EXPERIMENTO 2

O segundo experimento teve por objetivo avaliar a analgesia induzida por agonista dopaminérgico na PAG e a interferência de antagonista para receptores D2-like ou antagonista opióide não seletivo sobre esse efeito. Os ratos foram trazidos para a sala de experimentação entre 7 e 9 dias após a cirurgia estereotáxica. Primeiro, uma medida basal do *tail flick* e do *Randall-Selitto* foi obtida 10 minutos antes da administração das drogas, sendo utilizada a média de duas medidas por teste. Na sequência, foi administrado raclopride, naloxona ou salina cinco minutos antes da administração do piribedil ou seu veículo (conforme apresentado nas sessões B e C da TABELA 1). Novas medidas, da mesma forma que na medida basal, foram obtidas 5, 15 e 30 minutos após a administração do piribedil. Em seguida, os ratos foram submetidos ao *open field*, sacrificados, perfundidos e seus cérebros retirados para o mapeamento histológico.

2.4.3. EXPERIMENTO 3

Por último, este experimento objetivou testar a analgesia induzida por antagonista GABAérgico na PAG em ratos despertos. Os ratos foram trazidos para a sala de experimentação entre 7 e 9 dias após a cirurgia estereotáxica. Primeiro, uma medida basal do *Randall-Selitto* foi obtida 10 minutos antes da administração da droga, sendo utilizada a média de duas medidas. Na sequência, foi administrada bicuculina (conforme apresentado na sessão C da TABELA 1). Novas medidas, da mesma forma que na medida basal, foram obtidas 5, 15 e 30 minutos após a administração da bicuculina. Em seguida, os ratos foram submetidos ao *open field*, sacrificados, perfundidos e seus cérebros retirados para o mapeamento histológico.

2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias com medidas repetidas (para os dados dos testes nociceptivos) e uma via (para os dados do *open field*), seguidos pelo teste de Tukey. O nível de significância igual ou menor a 0,05 foi utilizado. Os resultados foram apresentados nos gráficos como média + erro padrão das médias (EPM). Para realização dos cálculos estatísticos e representação gráfica utilizamos o programa Sigma Plot[®] (Systat Software, San Jose, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1. ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA POR DAMGO FOI BLOQUEADA PELO SCH23390 E PELO RACLOPRIDE

A administração do agonista μ -opióide DAMGO na PAG aumentou significativamente a latência de retirada da cauda no *tail flick* em relação ao grupo controle [F(5,75)=7,681; P=0,019]. Administrado após o antagonista D1-like SCH23390, o efeito do DAMGO foi suprimido na dose de 4 μ g do antagonista [F(5,75)=7,681; P=0,997], conforme apresentado no GRÁFICO 1. No *Randall-Selitto*, a analgesia induzida pelo DAMGO [F(5,96)=10,384; P<0,001] foi abolida pela dose de 6 μ g de SCH23390 [F(5,96)= 10,384; P=0,952] (GRÁFICO 2). SCH23390 por si só não afetou o resultado de ambos os testes ($2,68 \pm 0,14$ s e $117 \pm 6,57$ g; dados obtidos 15 minutos após a administração da droga).

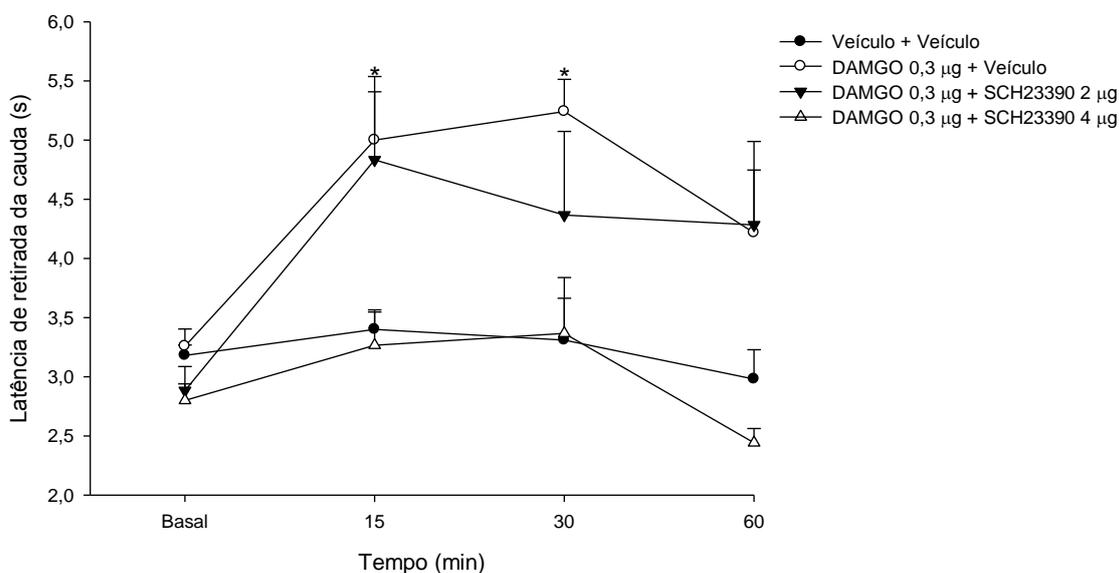


GRÁFICO 1 – CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE SCH23390 SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO DAMGO NO *TAIL FLICK*. SCH23390 na dose 4 μ g bloqueou o aumento da latência de retirada da cauda induzido pelo DAMGO. Asteriscos indicam onde a droga divergiu significativamente do grupo controle (Veículo). ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. Nesta e nas demais figuras os dados estão expressos como média + EPM. Ver materiais e métodos para detalhes adicionais sobre a coleta e análise dos dados.

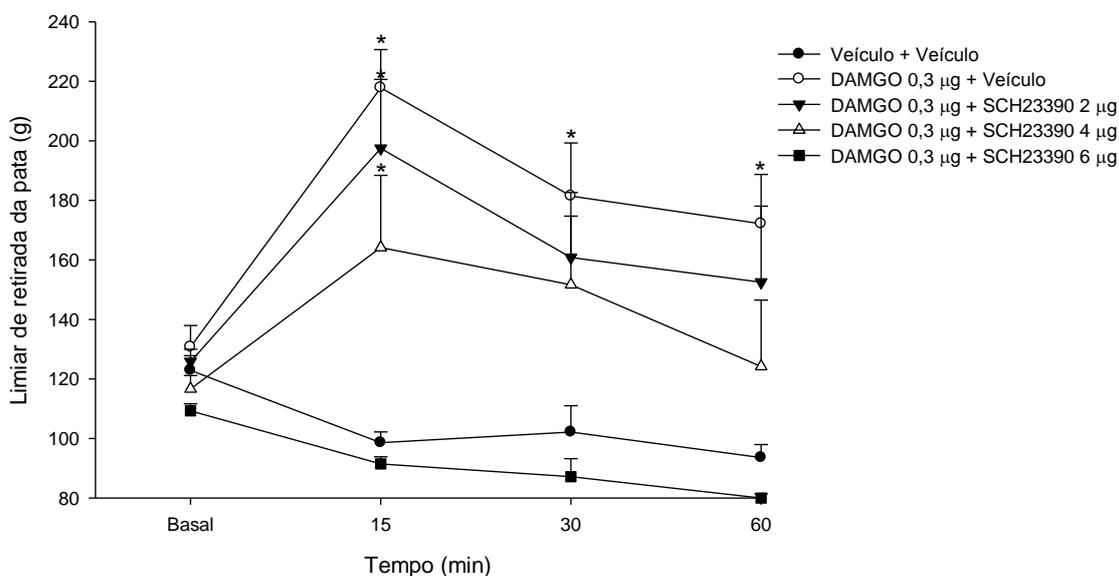


GRÁFICO 2 – CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAGA DE SCH23390 SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO DAMGO NO *RANDALL-SELITTO*. SCH23390 na dose de 6 µg bloqueou o aumento do limiar de retirada da pata induzido pelo DAMGO. Asteriscos indicam onde a droga divergiu significativamente do grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

Administrado na PAG em conjunto com o antagonista D2-like raclopride, o agonista μ -opióide não foi capaz de produzir antinocicepção significativa no *tail flick* se comparado ao grupo controle [$F(5,75)=6,926$; $P=0,923$] (GRÁFICO 3). Como demonstrado no GRÁFICO 4, o antagonista D2-like atenuou a antinocicepção do DAMGO no *Randall-Selitto* na dose de 2 µg, mantendo diferença significativa apenas no tempo 15, em relação ao controle [$F(15,117)=2,673$; $P<0,001$]. Na dose de 4 µg a antinocicepção foi completamente suprimida ($F(5,117)=10,219$; $P=0,700$). Assim como o SCH23390, raclopride por si só não afetou o resultado de ambos os testes ($2,76 \pm 0,15$ s e $103 \pm 2,68$ g; dados obtidos 15 minutos após a administração da droga).

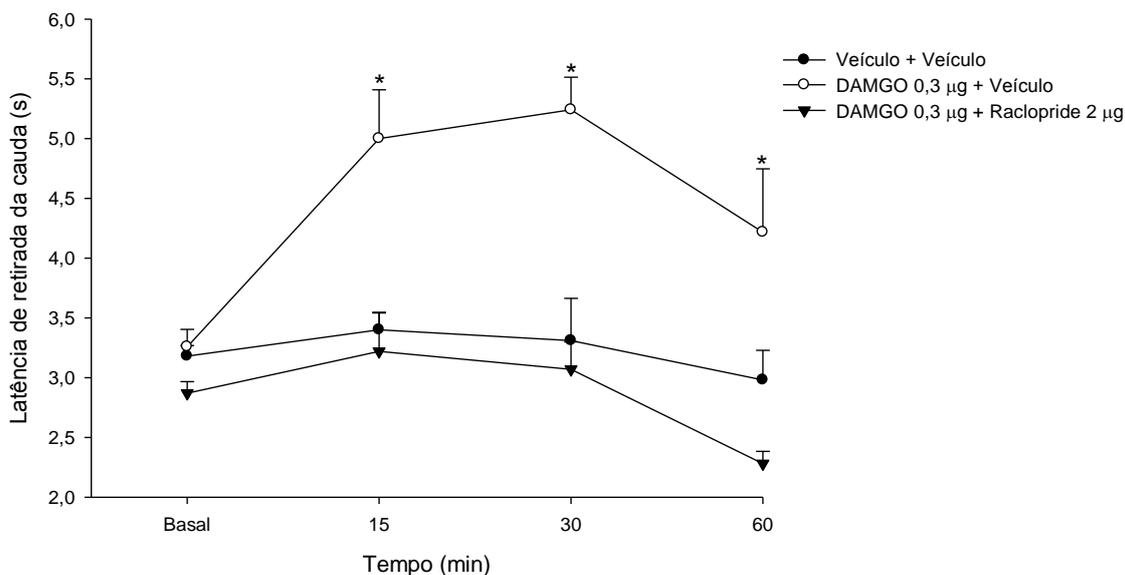


GRÁFICO 3 – CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE RACLOPRIDE SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO DAMGO NO *TAIL FLICK*. Raclopride bloqueou o aumento da latência de retirada da cauda induzido pelo DAMGO na dose utilizada. Asteriscos indicam onde a droga divergiu significativamente do grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

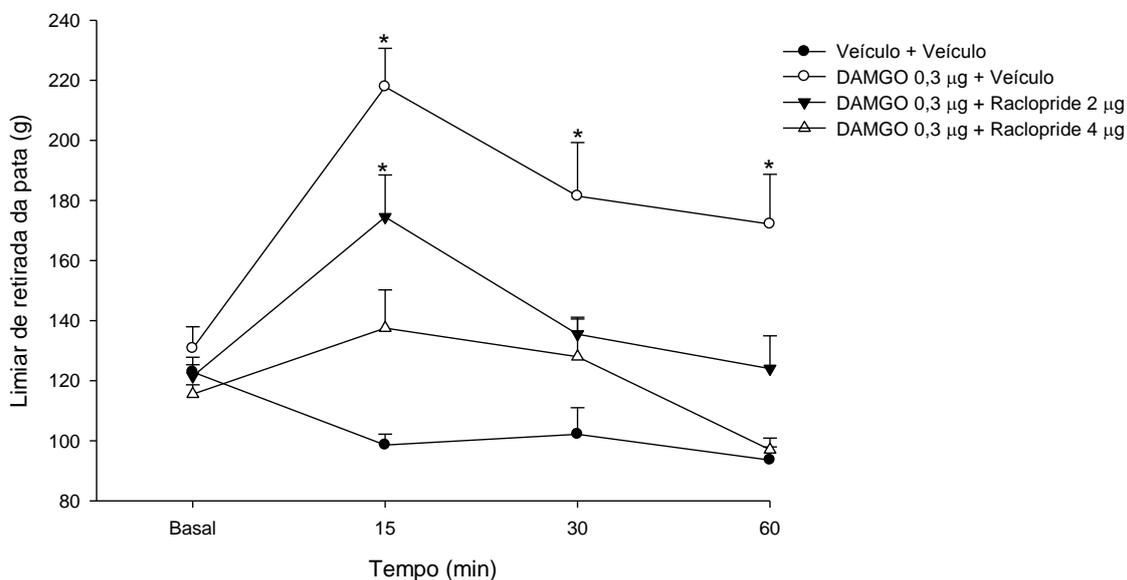


GRÁFICO 4 – CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE RACLOPRIDE SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO DAMGO NO *RANDALL-SELITTO*. Raclopride bloqueou o aumento do limiar de retirada da pata induzido pelo DAMGO na dose de 4 µg. Asteriscos indicam onde a droga divergiu significativamente do grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

3.2. ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO PIRIBEDIL FOI BLOQUEADA PELO RACLOPRIDE E PELA NALOXONA

No *tail flick* não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos [F(9,60)=0,780; P=0,915], como demonstrado no GRÁFICO 5. No *Randall-Selitto* (GRÁFICO 6), a dose de 12 µg do agonista D2-*like* piribedil na PAG induziu um efeito antinociceptivo transiente no teste de estímulo mecânico na pata. Entre tratamentos, o piribedil divergiu do grupo controle apenas no tempo 5 [F(9,69)=1,768; P=0,034]. Nas menores doses (GRÁFICO 6), ou administrado em conjunto com raclopride (GRÁFICO 7) ou com naloxona (GRÁFICO 8), o piribedil falhou em produzir qualquer efeito antinociceptivo.

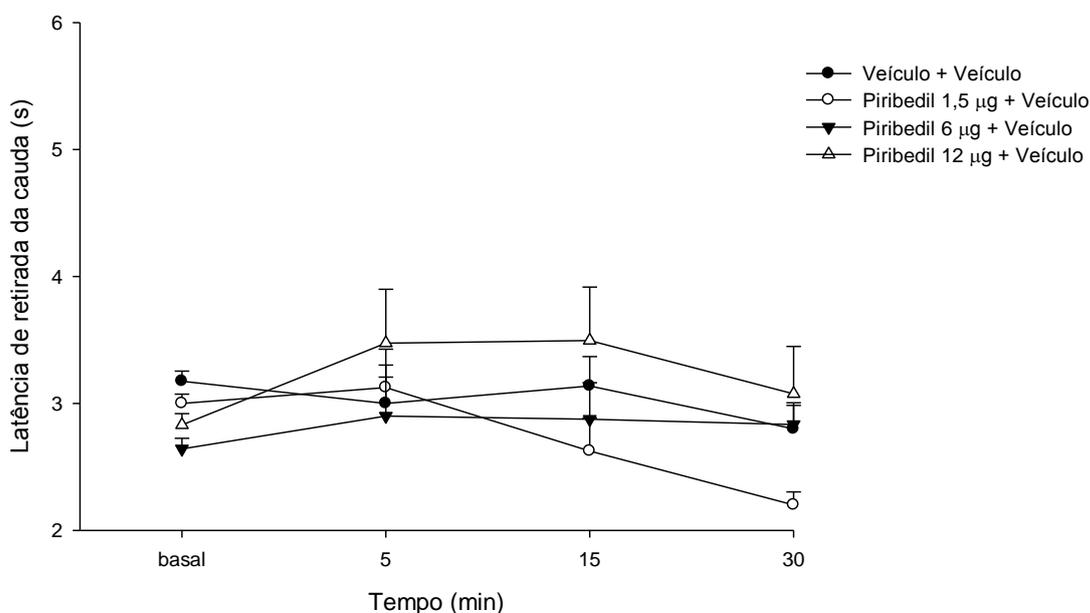


GRÁFICO 5 – CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE PIRIBEDIL NO *TAIL FLICK*. Piribedil não divergiu significativamente do grupo controle nas doses utilizadas em qualquer tempo testado. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

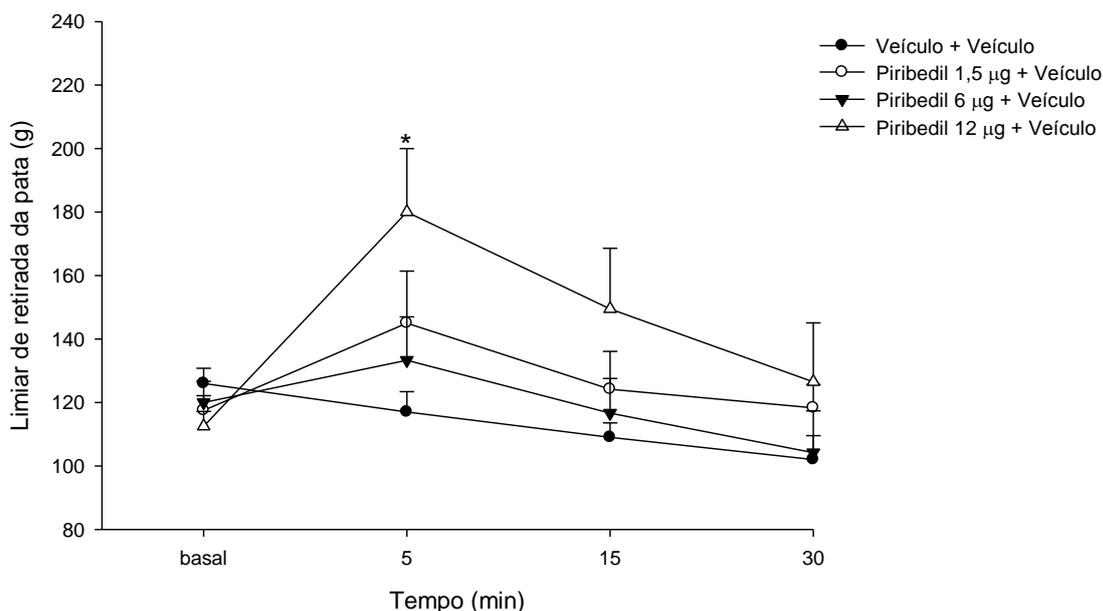


GRÁFICO 6 – CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE PIRIBEDIL NO RANDALL-SELITTO. Piribedil divergiu significativamente do grupo controle na dose de 12 µg no tempo 5 min, conforme assinalado por asterisco no gráfico. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

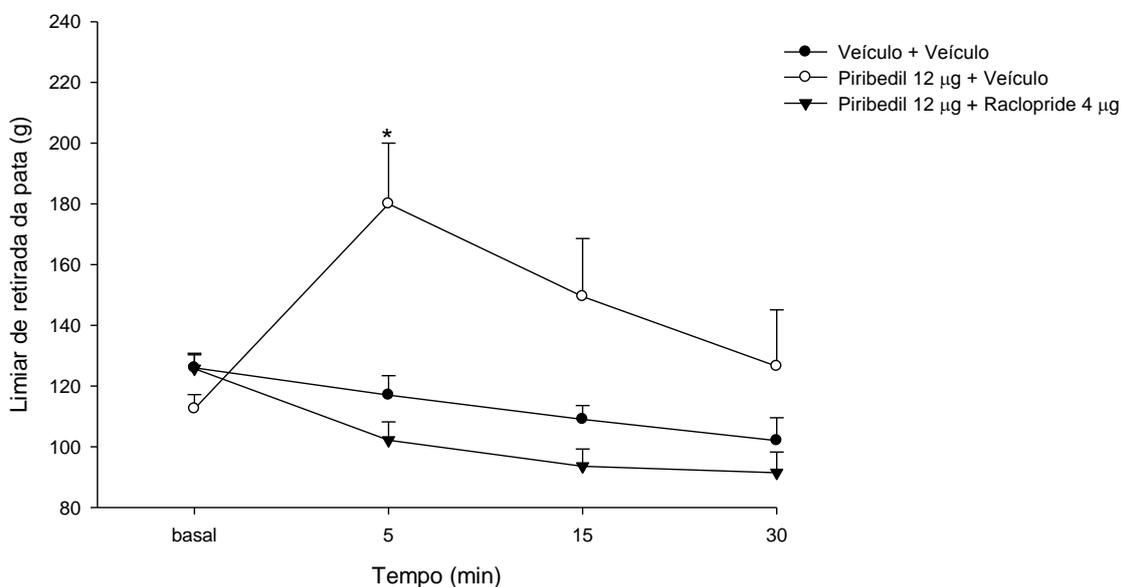


GRÁFICO 7 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE RACLOPRIDE SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO PIRIBEDIL NO RANDALL-SELITTO. Raclopride bloqueou o aumento do limiar de retirada da pata induzido pelo PIRIBEDIL. Asterisco indica onde a droga divergiu significativamente do grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

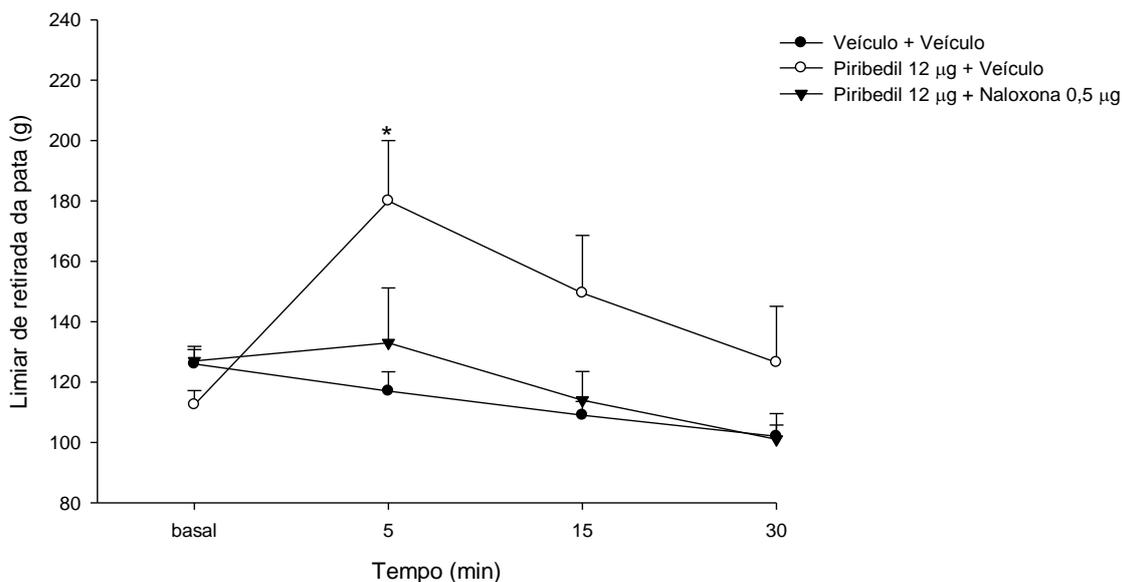


GRÁFICO 8 – EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE NALOXONA SOBRE A ANALGESIA INDUZIDA PELO PIRIBEDIL NO *RANDALL-SELITTO*. Naloxona bloqueou o aumento do limiar de retirada da pata induzido pelo PIRIBEDIL. Asterisco indica onde a droga divergiu significativamente do grupo controle. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

3.3. BICUCULINA NÃO INDUZIU EFEITO ANTINOCICEPTIVO

Conforme evidenciado no GRÁFICO 9, nenhuma das três doses utilizadas de bicuculina na PAG produziu antinocicepção, tanto em relação ao tempo [$F(3,54)=2,2289$; $P=0,089$] quanto ao tratamento [$F(3,54)=0,638$; $P=0,600$].

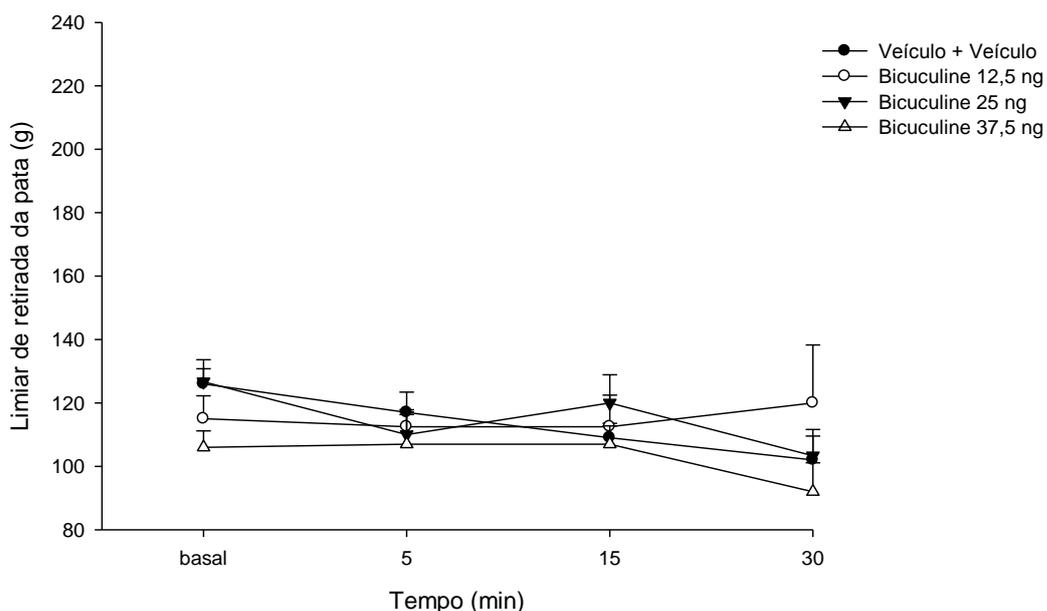


GRÁFICO 9 – CURVA DOSE-RESPOSTA DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-PAG DE BICUCULINA NO *RANDALL-SELITTO*. Bicuculina não divergiu significativamente do grupo controle em qualquer tempo testado. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

3.4. AVALIAÇÃO DOS PADRÕES MOTORES NO *OPEN FIELD*

A TABELA 3 expõe os dados da atividade locomotora dos animais após a administração dos tratamentos na PAG. No que se refere a movimentação dos animais na arena (quadrados cruzados), ocorreu um aumento significativo no grupo que recebeu 12 µg de piribedil quando comparado ao que recebeu 1,5 µg e 6 µg da mesma droga [F(3,23)=6,137; P=0,015 e P=0,0,006, respectivamente], mas não quando comparado ao grupo controle (P=0,635). Não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao número de levantamentos.

TABELA 3 – EFEITO DOS DIFERENTES TRATAMENTOS SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA

TRATAMENTO	QUADRADOS CRUZADOS (média ± EPM)	LEVANTAMENTOS (média ± EPM)
Veículo (Salina)	18,86 ± 2,05	8,43 ± 0,84
DAMGO 0,3 µg	17,86 ± 3,11	6 ± 0,66
DAMGO 0,3 µg + SCH23390 2 µg	15,5 ± 3,71	5,5 ± 0,89
DAMGO 0,3 µg + SCH23390 4 µg	15 ± 1,77	7,67 ± 0,56
DAMGO 0,3 µg + SCH23390 6 µg	15,86 ± 2,5	6,86 ± 0,6
SCH23390 4 µg	17,6 ± 2,09	6,4 ± 0,81
DAMGO 0,3 µg + raclopride 2 µg	18,3 ± 1,84	6,5 ± 0,54
DAMGO 0,3 µg + raclopride 4 µg	19,2 ± 2,31	6,5 ± 0,86
raclopride 4 µg	15 ± 1,82	6,4 ± 0,51
Veículo (DMSO)	22 ± 1,76	8,2 ± 1,02
piribedil 1,5 µg	17,67 ± 2,17	6,5 ± 1,02
piribedil 6 µg	16,83 ± 1,54	8 ± 1,39
piribedil 12 µg*	24,7 ± 1,14	9,4 ± 0,92
piribedil 12 µg + raclopride 4 µg	23,86 ± 1,97	9,29 ± 0,92
piribedil 12 µg + naloxona 0,5 µg	22 ± 2,61	7,4 ± 0,87
bicuculina 12,5 ng	22,67 ± 2,4	9,33 ± 1,12
bicuculina 25 ng	19,83 ± 2,73	8 ± 1,29
bicuculina 37,5 ng	21,8 ± 1,72	9,4 ± 1,36

ANOVA de uma via, seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$. Os dados estão expressos como média ± erro padrão das médias. Ver materiais e métodos para detalhes adicionais sobre a coleta e análise dos dados. (*) O número de quadrados cruzados pelos animais que receberam piribedil na dose 12 µg foi significativamente maior em relação àqueles que receberam as doses de 1,5 e 6 µg da mesma droga.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que a antinocicepção induzida pela administração de agonista μ -opióide (DAMGO) na PAG pode ser bloqueada pela coadministração de antagonistas dopaminérgicos seletivos tanto para receptores D1-*like* (SCH23390) quanto D2-*like* (raclopride). Este resultado foi obtido em ambos os testes utilizados, *Randall-Selitto* e *tail flick*. Também demonstramos que a administração intraPAG de agonista dopaminérgico seletivo para receptores D2-*like* (piribedil) induz um efeito antinociceptivo transiente no teste *Randall-Selitto*, mas não no *tail flick*. O bloqueio desse efeito pela coadministração de raclopride ou antagonista opióide não seletivo (naloxona) indica que é mediado, de fato, por receptores dopaminérgicos D2-*like* e que o faz de maneira dependente da ativação de receptores opióides. Finalmente, demonstramos que a administração de antagonista GABAérgico (bicuculina) na PAG não induz antinocicepção no teste *Randall-Selitto* em ratos despertos.

O efeito antinociceptivo induzido por agonista μ -opióide na PAG obtido neste trabalho está de acordo com a literatura (Depaulis et al., 1987, Smith et al., 1988, Tseng and Tang, 1989, Smith et al., 1992, Rossi et al., 1994, Lane et al., 2005, Morgan and Clayton, 2005, Meyer et al., 2009, Mehta et al., 2011). Nossos dados indicam a participação de receptores dopaminérgicos D1-*like* e D2-*like* nesse efeito. Isto está consonante com dado de outro estudo que atenuou a antinocicepção induzida pela morfina intraPAG coadministrando α -flupenthixol (antagonista dopaminérgico não seletivo) (Meyer et al., 2009). Por outro lado, Flores e colaboradores (2004) reverteram a antinocicepção induzida pela heroína sistêmica apenas pela coadministração de SCH23390. Quando eticlopride (antagonista D2-*like*) foi utilizado, a analgesia da heroína se manteve. Adicionalmente, outro estudo reverteu a antinocicepção induzida pela estimulação elétrica do córtex motor através da administração de α -flupenthixol ou SCH23390 na PAG, enquanto eticlopride falhou em produzir esse efeito (Chiou et al., 2013). Entretanto, esses estudos (Flores et al., 2004, Chiou et al., 2013) induziram antinocicepção ao ativar indiretamente a PAG (por administração sistêmica de opióides ou estimulação do córtex motor), enquanto nós o fizemos de maneira direta (administrando agonista μ -opióide intraPAG), o que pode justificar essa aparente contradição.

Meyer e colaboradores (2009) fornecem evidências da atuação direta da dopamina na PAG como um neurotransmissor antinociceptivo. Em seus

experimentos, a apomorfina (agonista dopaminérgico não seletivo) na PAG induziu analgesia quando administrada em doses cumulativas. Nesse mesmo estudo a ação da apomorfina foi bloqueada por eticlopride, mas não por SCH23390, o que sugere participação de receptores da família D2, não D1. De fato, muitas pesquisas relacionando dopamina e analgesia ressaltam uma maior participação dos receptores D2-*like* em diferentes regiões do SNC (Rooney and Sewell, 1989, Altier and Stewart, 1998, Magnusson and Fisher, 2000, Taylor et al., 2003, Meyer et al., 2009, Sheng et al., 2009, Dang et al., 2011). Tendo isto em mente, e considerando que foram necessárias consecutivas injeções de apomorfina para produzir analgesia na PAG, selecionamos o agonista seletivo para receptores D2-*like*, piribedil, buscando analisar o efeito de uma dose única sobre a transmissão nociceptiva. Como esperado, o piribedil provocou o aumento do limiar de retirada da pata, o que indica um efeito analgésico, que pode ser bloqueado pela administração de raclopride. Estes dados somados nos levam a sugerir que a ação direta da dopamina na PAG se deva principalmente pela ativação de receptores D2-*like*.

O efeito analgésico do piribedil intraPAG também foi bloqueado pela coadministração de naloxona. De fato, a ativação de mecanismos opióides parece ter um papel central na analgesia mediada pela PAG (Smith et al., 1988, Tseng and Tang, 1989, Smith et al., 1992, Pavlovic et al., 1996, Manning and Franklin, 1998, Tershner and Helmsteller, 2000, Lane et al., 2005, Mehta et al., 2011, Chiou et al., 2013). Entretanto, nosso resultado é a primeira evidência de que a analgesia induzida por mecanismos dopaminérgicos na PAG seja dependente de opióides. Novos estudos são necessários para compreender de que forma essa dependência se estabelece. É possível que, assim como a ação dos opióides na PAG induza a liberação de dopamina, esta também induza a liberação de opióides.

Sendo a PAG o centro da via modulatória descendente, seria lógico supor que os efeitos da dopamina na PAG, assim como dos opióides, dependem da ativação dessa via. No entanto, nossos resultados não suportam essa ideia, uma vez que o piribedil não induziu qualquer efeito sobre a latência de retirada da cauda no *tail flick*. Como já descrito na metodologia deste trabalho, o *tail flick* avalia uma resposta nociceptiva reflexa integrada ao nível medular. Portanto, qualquer manipulação experimental supraespinal que o module necessariamente o faz através da via descendente. Isto sugere que a antinocicepção induzida pela ativação de receptores D2-*like* na PAG não ocorre pela ativação da via descendente. Nosso dado parece

estar de acordo com outro estudo (Flores et al., 2004), no qual foi observado que a lesão de neurônios dopaminérgicos na PAG atenuou a antinocicepção induzida por opióide sistêmico no teste da placa quente (*hot plate*), mas não no teste de imersão da cauda (*tail immersion*). O *tail immersion* é um teste similar ao *tail flick*, tendo por objetivo avaliar um mecanismo reflexo de resposta ao estímulo nocivo, enquanto o *hot plate* envolve também a participação do processamento supraespinhal (Le Bars et al., 2001, Flores et al., 2004). Desta forma, é possível supor que a administração sistêmica de opióides atue sobre a via descendente de forma independente dos neurônios dopaminérgicos na PAG, mas dependa destes, ao menos em parte, para a ativação de mecanismos supraespinhais de modulação da dor.

Ao contrário do piritidil, a administração de DAMGO na PAG induziu antinocicepção nos dois testes (*tail flick* e *Randall-Selitto*). O mais importante foi observar que a coadministração de SCH23390 ou de raclopride bloquearam a analgesia do DAMGO em ambos os testes. Isso indica que a ativação direta de receptores μ -opióide na PAG depende da ativação de receptores dopaminérgicos para modular tanto mecanismos reflexos quanto respostas mais complexas desencadeados por estímulo nocivo.

O mecanismo pelo qual essa relação entre dopamina e opióides se estabelece não é conhecido, mas podemos especular que vias antinociceptivas distintas podem coexistir na PAG. Já foi sugerido antes na literatura a existência de múltiplas vias inibitórias da dor neste sitio (Smith et al., 1992). Isto explicaria a diferença na participação dos subgrupos de receptores dopaminérgicos na PAG encontrada em estudos anteriores. Uma via, ativada por neurônios opioidérgicos extrínsecos a PAG (talvez as projeções do núcleo arqueado liberando β -endorfina), induziria indiretamente a liberação de dopamina em sinapses excitatórias (via receptores D1-like), que, por sua vez, ativaria projeções da PAG para outros sítios modulatórios da dor. Outra via, dopaminérgica, atuaria em receptores D2-like, desinibindo indiretamente neurônios opioidérgicos (talvez encefalinérgicos) que atuariam em outra via antinociceptiva, provavelmente supraespinhal. Sendo a hipótese das duas vias verdadeira, ambas teriam participação de receptores μ -opióide, já que tanto SCH23390 quanto raclopride foram capazes de bloquear o efeito analgésico do DAMGO.

Tendo em vista que ambos, dopamina e opióides, possam ter como parte de seus mecanismos de ação a inibição de interneurônios GABAérgicos (Moreau and

Fields, 1986, Stamford, 1995, Stiller et al., 1996, Vaughan and Christie, 1997, Fields, 2004, Meyer et al., 2009, Hahm et al., 2011, Ingram, 2012), logo se supoe que a administração de antagonista GABAérgico na PAG teria um significativo efeito analgésico. No entanto, existe controvérsia na literatura a esse respeito. Alguns estudos demonstraram um efeito antinociceptivo (Moreau and Fields, 1986, Sandküler et al., 1989, Pan and Fields, 1996, Budai et al., 1998, Koyama et al., 1998, Roychowdhury and Fields, 1996, McMullan and Lumb, 2006) quando antagonista GABAérgico foi administrado na PAG em animais anestesiados. No entanto, trabalhos que testaram esse efeito em animais acordados não obtiveram o mesmo resultado (Zambotti et al., 1982, Depaulis et al., 1987, Yu and Han, 1990). Portanto, os dados da literatura suportam os resultados deste trabalho, que não observou qualquer efeito analgésico nas três doses de bicuculina utilizadas. Uma possível explicação para os resultados contraditórios encontrados nos estudos citados pode ser encontrada em revisão de Peggy Mason (2012a), que ressalta a possibilidade de alterações nos padrões neuronais da via descendente de modulação da dor em ratos anestesiados. Essas alterações poderiam facilitar a ativação dos mecanismos analgésicos na PAG, possibilitando os efeitos da bicuculina (ou da picrotoxina, outro antagonista GABAérgico) relatados na literatura.

Considerando a inabilidade de antagonista GABAérgico em induzir analgesia na PAG em ratos despertos, parece improvável que o efeito antinociceptivo dos opióides e da dopamina se dê exclusivamente pela inibição da atividade GABAérgica. Entretanto, esta inibição deve ser necessária, como demonstram os estudos que bloquearam a analgesia induzida por opióides extra ou intraPAG administrando muscimol neste mesmo sitio (Zambotti et al., 1982, Depaulis et al., 1987, Munn et al., 2009). Nossa hipótese é de que diferentes mecanismos na PAG devam ser ativados em conjunto para que haja efetiva modulação da dor. Os opióides endógenos, a dopamina e o GABA claramente possuem participação de destaque nesses mecanismos, mas muitas dúvidas ainda precisam ser sanadas antes que um modelo integrativo possa ser proposto.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o efeito analgésico induzido pela ativação de receptores μ -opióide na PAG depende, ao menos em parte, da ativação de receptores dopaminérgicos. Adicionalmente, a antinocicepção induzida pela ativação de receptores *D2-like* na PAG demanda a ativação de receptores opióides e provavelmente atue em mecanismos supraespinhais. Por ultimo, antagonista GABAérgico administrado na PAG não induz analgesia em ratos despertos, ao menos em resposta a estímulo nociceptivo fásico.

Compreendemos que nossos dados, em adição à literatura existente, indicam uma participação efetiva da neurotransmissão dopaminérgica na modulação da dor. Conquanto os opióides ainda sejam a principal classe de fármacos utilizada no combate a dor crônica, tratamentos alternativos ou complementares tendo como alvo receptores dopaminérgicos podem ser desenvolvidos na medida em que a participação desses receptores na modulação da dor seja melhor esclarecida.

REFERÊNCIAS

- Altier N, Stewart J (Dopamine receptor antagonist in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. JPET 285:208–215.1998).
- Altier N, Stewart J (The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. Life Sci 65:2269-2287.1999).
- Bandler R, Shipley MT (Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? Trends Neurosci 17(9):379-89.1994)
- Basbaum AI, Fields HL (Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis. Ann Neurol 4:451-462.1978).
- Basbaum AI, Fields HL (Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. Ann Rev Neurosci 7:309-38.1984).
- Behbehani MM (Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. Prog Neurobiol 46(6):575-605.1995)
- Brooks J, Tracey I (From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. J Anat 207:19-33.2005).
- Budai D, Harasawa I, Fields HL (Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through α 2-adrenergic receptors. J Neurophysiol 80:2244-2254.1998).
- Chiou R, Chang C, Kuo C (Involvement of the periaqueductal gray in the effect of motor cortex stimulation. Brain Res 1500:28-35.2013).
- Dang YH, Xing B, Zhao Y, Zhao XJ, Huo FQ, Tang JS, Qu CL, Chen T (The role of dopamine receptors in ventrolateral orbital cortex-evoked antinociception in a rat formalin test model. Eur J Pharmacol 657:97-103.2011).
- Depaulis A, Morgan MM, Liebeskind JC (GABAergic modulation of the analgesic effects of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. Brain Res 436:223-228.1987).

Duarte DF ([Opium and opioids: a brief history.]. *Rev Bras Anesthesiol* 55:135-146.2005).

Fields HL, Heinricher MM, Mason P (Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Ann Rev Neurosci* 14:219-45.1991).

Fields H (State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 5:565-575.2004).

Flores JA, El Banoua F, Galan-Rodriguez B, Fernandez-Espejo E (Opiate antinociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors. *Pain* 110:205-214.2004).

Gaskin DJ, Richard P (The economic cost of pain in the United States. *J Pain* 13:715-724.2012).

Gear RW, Levine JD (Antinociception produced by ascending spino-supraspinal pathway. *J Neurosci* 15(4):3154-3161.1995).

Gear RW, Aley KO, Levine JD (Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci* 19(16):7175-7181.1999).

Gear RW, Levine JD (Nucleus accumbens facilitates nociception. *Exp Neurol* 229(2):502-506.2011).

Geffeney SL, Goodman MB (How we feel: Ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception. *Neuron* 74(4):609-619.2012).

Hahm ET, Kim Y, Lee JJ, Cho YW (GABAergic synaptic response and its opioidergic modulation in periaqueductal gray neurons of rats with neuropathic pain. *BMC Neurosci* 12:41.2011).

Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ (Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 454:15-33.2002).

Heinricher MM, Morgan MM, Fields HL (Direct and indirect actions of morphine on medullary neurons that modulate nociception. *Neuroscience* 48:533-543.1992).

Ingram SL (Association of mu-opioid and NMDA receptors in the periaqueductal gray: what does it mean for pain control? *Neuropsychopharmacology* 37:315-316.2012).

IOM (Institute of Medicine) (Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Reserch. Washington, DC: The National Academies Press.2011).

Koyama N, Nishio T, Yokota T (Non-serotonergic midbrain neurons are involved in picrotoxin-induced analgesia. An immunohistochemical study in the rat. *Neurosci Lett* 291(3):147-50.2000).

Lane DA, Patel PA, Morgan MM (Evidence for an intrinsic mechanism of antinociceptive tolerance within the ventrolateral periaqueductal gray of rats. *Neuroscience* 135:227-234.2005).

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53:597-652.2001).

Lu J, Jhou TC, Saper CB (Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J Neurosci* 26(1):193-202.2006).

Magnusson JE, Fisher K (The involvement of dopamine in nociception: the role of D1 and D2 receptors in the dorsolateral striatum. *Brain Res* 855:260-266.2000).

Manning BH, Franklin KBJ (Morphine analgesia in the formalin test: reversal by microinjection of quaternary naloxone into the posterior hypothalamic area or periaqueductal gray. *Behav Brain Res* 92(1):97-102.1998).

Mason P (Medullary circuits for nociceptive modulation. *Curr Opin Neurobiol* 22(4):640-5.2012a).

Mason P (Two noegatives make a positive: Telencephalic-mediated analgesia. *Exp Neurol* 236(2):336-8.2012b).

McMullan S, Lumb BM (Midbrain control of spinal nociception discriminates between responses evoked by myelinated and unmyelinated heat nociceptors in the rat. *Pain* 124:59-68.2006).

Mehta AK, Halder S, Khanna N, Tandon OP, Sharma KK (Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone and N-methyl-D-aspartate: role of opioid and N-methyl-D-aspartate receptors. *Hum Exp Toxicol* 31:51.2011).

Melzack R, Wall PD (Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150:971-979.1965).

Meyer PJ, Morgan MM, Kozell LB, Ingram SL (Contribution of dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated antinociception. *Psychopharmacology (Berl)* 204:531-540.2009).

Millan MJ (The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.1999).

Millan MJ (Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6):355-474.2002).

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.1998).

Morales-Lázaro SL, Simon AS, Rosenbaum T (The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J Physiol* 591(13):3109-3121.2013).

Moreau JL, Fields HL (Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. *Brain Res* 397:37-46.1986).

Morgan MM, Clayton CC (Defensive behaviors evoked from the ventrolateral periaqueductal gray of the rat: Comparison of opioid and GABA disinhibition. *Behav Brain Res* 164:61-66.2005).

Munn EM, Harte SE, Lagman A, Borszcz GS (Contribution of the periaqueductal gray to the suppression of pain affect produced by administration of morphine into the intralaminar thalamus of rat. *J Pain* 10(4):426-435.2009).

Omelchenko N, Sesack SR (Periaqueductal gray afferents synapse onto dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *J Neurosci Res* 88:981-991.2010).

Pan ZZ, Fields HL (Endogenous opioid-mediated inhibition of putative pain-modulating neurons in rat rostral ventromedial medulla. *Neurosci* 74(3):855-862.1996).

Pavlovic ZW, Cooper ML, Bodnar RJ (Opioid antagonists in the periaqueductal gray inhibit morphine and beta-endorphin analgesia elicited from the amygdala of rats. *Brain Res* 741:13-26.1996).

Paxinos G, Watson C (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. New York: Academic Press.1986).

Queiroz LS (Mesencéfalo. Campinas: UNICAMP.2006)

Randall LO, Selitto JJ (A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn* 111(4):409-19.1957).

Reichling DB, Basbaum AI (Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: II. Electron microscopic immunocytochemical evidence of GABAergic control over the projection from the periaqueductal gray to the nucleus raphe magnus in the rat. *J Comp Neurol* 302:378-393.1990).

Reynolds DV (Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164:444-445.1969).

Rooney KF, Sewell RDE (Evaluation of selective actions of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists on opioid antinociception. *Eur J Pharmacol* 168(3):329-36.1989).

Rossi GC, Pasternak GW, Bodnar RJ (Mu and delta opioid synergy between the periaqueductal gray and the rostro-ventral medulla. *Brain Res* 665:85-93.1994).

Roychowdhury SM, Fields HL (Endogenous opioids acting at medullary μ -opioid receptor contribute to the behavioral antinociception produced by GABA antagonism in the midbrain periaqueductal gray. *Neurosci* 74(3):863-872.1996).

Sandküler J, Willmann E, Fu Q (Blockade of GABA_A receptors in the midbrain periaqueductal gray abolishes nociceptive spinal dorsal horn neuronal activity. *Eur J Pharmacol* 160:163-166.1989).

Schmidt BL, Tambeli CH, Levine JD, Gear RW (μ/δ Cooperativity and opposing kappa-opioid effects in nucleus accumbens-mediated antinociception in the rat. *Eur J Neurosci* 15:861-868.2002).

Sheng HY, Qu CL, Huo FQ, Du JQ, Tang JS (D2-like but not D1-like dopamine receptors are involved in the ventrolateral orbital cortex-induced antinociception: a GABAergic modulation mechanism. *Exp Neurol* 215:128-134.2009).

Smith DJ, Perrotti JM, Crisp T, Cabral ME, Long JT, Scalzitti JM (The μ opiate receptor is responsible for descending pain inhibition originating in the periaqueductal gray region of the rat brain. *Eur J Pharmacol* 156:47-54.1988).

Smith DJ, Robertson B, Monroe PJ, Taylor DA, Leedham JA, Cabral JDY (Opioid receptors mediating antinociception from β -endorphin and morphine in the periaqueductal gray. *Neuropharmacol* 31(11):1137-1150.1992).

Stamford JA (Descending control of pain. *Br J Anaesth* 75:217-227.1995).

Stiller C, Bergquist J, Beck O, Ekman R, Brodin E (Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Neurosci Lett* 209:165-168.1996).

Suckow SK, Deichsel EL, Ingram SL, Morgan MM, Aicher SA (Columnar distribution of catecholaminergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray and their relationship to efferent pathways. *Synapse* 67:94-108.2013).

Tang J, Qu C, Huo F (The thalamic nucleus submedius and ventrolateral orbital cortex are involved in nociceptive modulation: a novel pain modulation pathway. *Prog Neurobiol* 89:383-389.2009).

Taylor BK, Joshi C, Uppal H (Stimulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. *Brain Res* 987:135-143.2003).

Tershner SA, Helmstetter FJ (Antinociception produced by μ opioid receptor activation in the amygdala is partly dependent on activation of μ opioid and neurotensin receptors in the ventral periaqueductal gray. *Brain Res* 865:17-26.2000).

Tseng LLF, Tang R (Differential actions of the blockade of spinal opioid, adrenergic and serotonergic receptors on the tail-flick inhibition induced by morphine microinjected into dorsal raphe and central gray in rats. *Neurosci* 33(1):93-100.1989).

Vaughan CW, Christie MJ (Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. *J Physiol* 498 (Pt 2):463-472.1997).

Wood PB (Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev Neurother* 8:781-797.2008).

Xie Y, Huo F, Tang J (Cerebral cortex modulation of pain. *Acta Pharmacol Sin* 30(1):31-41.2009).

Yaksh TL (Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand* 41:94-111.1997).

Young FBJ (A life without pain? Hedonists take note. *Clin Genet* 73:31-33.2008).

Yu LC, Han JS (Habenula as a relay in the descending pathway from nucleus accumbens to periaqueductal grey subserving antinociception. *Int J Neurosci* 54:245-251.1990).

Zambotti F, Zonta N, Parenti M, Tommasi R, Vicentini L, Conci F, Mantegazza P (Periaqueductal gray matter involvement in the muscimol-induced decrease of morphine antinociception. *318:368-369.1982).*

Zimmermann M. (Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2):109-110.1983).