

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

*Córtex cingulado anterior e respostas nociceptivas em
cobaias: modulação GABAérgica, colinérgica e
opioidérgica*

João Zugaib Cavalcanti

Ribeirão Preto

2012

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

*Córtex cingulado anterior e respostas nociceptivas em
cobaias: modulação GABAérgica, colinérgica e
opioideérgica*

João Zugaib Cavalcanti

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP,
para a obtenção do título de Mestre em Ciências,
área de Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Leda Menescal de Oliveira

Ribeirão Preto

2012

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Cavalcanti, João Zugaib

Córtex cingulado anterior e respostas nociceptivas em cobaias: modulação GABAérgica, colinérgica e opioidérgica **Ribeirão Preto, 2012.**

90 p.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP

Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Leda Menescal de Oliveira.

Palavras-Chaves: Vocalização, Cobaias, Córtex cingulado anterior, nocicepção, formalina.

Data da defesa: 23 de fevereiro de 2012

Banca Examinadora

Profa. Dra. Leda Menescal de Oliveira (Orientadora)

Julgamento: _____ Assinatura _____.

Prof. Dr. Luis Felipe Souza da Silva

Julgamento: _____ Assinatura _____.

Profa. Dra. Anette Hoffmann

Julgamento: _____ Assinatura _____.

Agradecimentos

Aos meus pais devo a vida e por isso agradecer-lhes em primeira instância se faz oportuno. Não só por isso, entretanto... O gosto e o suporte na busca pelo conhecimento me foram incentivados e oferecidos durante toda minha trajetória. Portanto, Lucia Costa Zugaib e Marcio Alves Cavalcanti são os principais responsáveis por essa conquista. Muito obrigado!

Minha irmã Maria Zugaib Cavalcanti sempre ofereceu muito amor e admiração, que me renderam vontade e força para atingir meus objetivos. Minha filha Luiza, que muito amo e me esforço para que conquistas como essa possam fazê-la se orgulhar de mim. .

À minha mulher e companheira Sofia Waria, que me mostra a cada dia a preciosidade do amor. Obrigado por ter participado dessa trajetória tornando tudo mais belo.

À minha avó Edna, minha tia Fátima, minha tia Cecília e meu tio Luciano, que representaram o porto seguro para poder seguir o caminho que escolhi.

No âmbito acadêmico, agradeço primeiramente ao mestre Abrahão, que me proporcionou o contato com pesquisa básica, me fazendo optar pela carreira acadêmica. À prof^a Dr^a Leda Menescal de Oliveira que possibilitou meu ingresso neste departamento e sempre esteve engajada na minha formação. Agradeço ainda todos os docentes deste departamento pelo comprometimento em me tornar um indivíduo mais crítico. À FMRP, CAPES, FAPESP e CNPq por todo o suporte logístico e financeiro, que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os técnicos e funcionários deste departamento pelo ambiente harmônico, os bate papo no cafezinho e nas rodas de cigarro, as risadas e o suporte para as mais variadas necessidades. Em especial, Mariulza Rocha Brentegani e Rubens Fernando de Melo, que ofereceram além do apoio técnico eficiente, toda disponibilidade para resolver os mais variados problemas.

Aos colegas de laboratório e amigos, Marcinho da Bahia e Mateuzinho, que sempre estiveram ao lado para mostrar os atalhos e facilitar minha caminhada.

Agradeço aos amigos de Salvador, Brunão, Marcola, Mari e Cíntia, que me mostraram que trabalho sério também pode ser feito brincando.

Não menos importante agradeço a galera do baba de quinta-feira. Destaco o brother Kpta pela afinidade de idéias e pelos momentos de lazer proporcionados. Porém, seria tudo mais difícil se não houvesse a força de todos para formar essa equipe bicampeã de futsal no CEFER.

Por fim, agradeço todos aqueles que por algum descuido não foram citados, mas que tiveram sua participação nesses dois anos de mestrado.

1. Resumo	8
2. Abstract	10
3. Introdução	12
4. Objetivo	22
5. Materiais e métodos	23
5.1. ANIMAIS.....	23
5.2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	23
5.3. MICROINJEÇÃO DAS DROGAS	24
5.4. DROGAS UTILIZADAS	24
5.5. TESTE ALGESIMÉTRICO DE VOCALIZAÇÃO	25
5.6. TESTE DA FORMALINA.....	27
5.7. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	28
5.7.1. Experimento I: Efeito do agonista preferencial de receptores GABA _A , muscimol e do antagonista bicuculina, microinjetados no CCA sobre a resposta de vocalização.....	28
5.7.2. Experimento II: Efeito do agonista preferencial de receptores GABA _A , muscimol e do antagonista bicuculina, microinjetados no CCA sobre o teste da formalina.....	29
5.7.3. Experimento III: Efeito do agonista de receptores colinérgicos, carbacol e do antagonista muscarínico atropina, microinjetados no CCA sobre a resposta de vocalização	29
5.7.4. Experimento IV: Bloqueio da atividade do agonista de receptores colinérgicos, carbacol, com naloxona, um antagonista preferencial μ -opióide microinjetados no CCA sobre o teste de vocalização.....	29
5.7.5. Experimento V: Efeito do agonista de receptores colinérgicos, carbacol e do antagonista muscarínico, atropina, microinjetados no CCA sobre o teste da formalina.....	30
5.7.6. Experimento VI: Efeito do agonista preferencial de receptores de μ opióides, morfina e do seu antagonista, naloxona, microinjetados no CCA sobre o teste de vocalização	30
5.7.7. Experimento VII: Efeito do agonista preferencial de receptores de μ opióides, morfina e do seu antagonista, naloxona, microinjetados no CCA sobre o teste de formalina	30
5.8. HISTOLOGIA	30
5.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS	32
6. Resultados	33
6.1. EXPERIMENTO I.....	33
6.2. EXPERIMENTO II.....	41
6.3. EXPERIMENTO III.....	45
6.4. EXPERIMENTO IV	51
6.5. EXPERIMENTO V	54
6.6. EXPERIMENTO VI	58
7. Discussão.....	61
8. Conclusões.....	75
9. Referências Bibliográficas	76
10. Apêndice	82

1. Resumo

A dor é um fenômeno multidimensional, que geralmente desencadeia reações emocionais desconfortáveis quando identificada. Sua relação com injúria tecidual pode ser interpretado como um mecanismo adaptativo de defesa à integridade do organismo, tendo em vista sua preservação evolutiva. Porém, o substrato neurobiológico do organismo parece determinar a complexificação do repertório comportamental em diferentes espécies. Nesse sentido, o córtex cingulado anterior (CCA) tem sido amplamente descrito em mamíferos modulando diferentes aspectos da dor. O presente trabalho utilizou os testes algesimétricos de vocalização e da formalina em cobaias, para se avaliar o decurso temporal do efeito da microinjeção de agonistas e antagonistas GABAérgico (muscimol e bicuculina); colinérgico (carbacol e atropina) e opioidérgico (morfina e naloxona). A microinjeção de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl) exacerbou as respostas nociceptivas em ambos os testes, porém diferentes doses de muscimol (0,5, 1 e 2 nmol / 0,2 µl), não modificaram as respostas. O efeito da bicuculina foi bloqueado em ambos os testes pela microinjeção prévia de muscimol (1 nmol/ 0,2 µl) no CCA.

A microinjeção de carbacol (2,7 nmol /0,2 µl) neste substrato promoveu antinocicepção, evidenciada por meio da atenuação da amplitude das vocalizações, mas não pelo teste da formalina. Esse efeito foi bloqueado pela administração prévia de atropina (0,7 nmol /0,2 µl) e de naloxona (2,7 nmol /0,2 µl). A microinjeção de morfina (4,4 nmol /0,2 µl) promoveu antinocicepção em ambos os testes. Concluimos que a inibição do tônus GABAérgico no CCA exagera os comportamentos nociceptivos e que a antinocicepção promovida por carbacol pode ter sido mediada pelo sistema de opióides endógenos, tendo em

vista o bloqueio do seu efeito com naloxona. Além disso, a estimulação opióide promove uma contundente antinocicepção.

2. Abstract

Pain is a multidimensional phenomenon which usually triggers uncomfortable emotional reactions when identified. Its relation injury can be interpreted as an adaptive mechanism to defend the integrity of the body given its evolutionary conservation. However the neurobiological substrate of the body seems to determine the complexification of behavioral repertoire in different species. Thus, the anterior cingulate cortex (ACC) has been widely described in mammals by modulating different cognitive aspects of pain. This study used algometric tests of vocalization and formalin in guinea pigs to evaluate the time course of the effect of microinjection of GABA agonists and antagonists (bicuculline and muscimol) and cholinergic (carbachol and atropine) beyond the opioid antagonist naloxone. The microinjection of bicuculline (1 nmol / 0,2 µl) exacerbated the nociceptive behavior in both tests but different doses of muscimol (0,5; 1 e 2 nmol / 0,2 µl) did not change the responses. The effect of bicuculline was blocked in both tests by prior microinjection of muscimol (1 nmol / 0,2 µl) in the ACC.

The microinjection of carbachol (2,7 nmol / 0,2 µl) on this substrate promoted antinociception as evidenced by attenuation of the amplitude of the vocalizations, but not by the formalin test. This effect was blocked by prior administration of atropine (0,7 / 0,2 µl) and naloxone (0,7 nmol / 0, 2 µl). The microinjection of morphine (4,4 nmol / 0,2 µl) promoted antinociception in both tests. We conclude that inhibition of GABAergic tone in the ACC exacerbates nociceptive behaviors and that the antinociception promoted by carbachol may

have been mediated by endogenous opioid system in order blocking its effect with naloxone. In addition opioid stimulation promotes a striking antinociception.

3. Introdução

A dor pode ser considerada uma modalidade sensorial somática diferenciada, que freqüentemente está relacionada à lesão tecidual (Hathway e Fitzgerald, 2009). A definição mais utilizada atualmente diz que a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real, potencial ou descrita em tais termos (Merskey e Bogduk, 1994). De acordo com essa definição, a dor é um fenômeno multidimensional, constituído por um componente sensório-discriminativo e outro afetivo-motivacional. Embora sejam complementares no que se refere à percepção de dor, esses componentes possuem substratos neurais e vias sensoriais que são especializadas para cada uma dessas submodalidades perceptuais. O componente sensorial se refere à capacidade de localizar e qualificar um estímulo nociceptivo. O afetivo se refere ao conteúdo emocional de desprazer que acompanha a sensação de dor. Porém, a dor não deve ser entendida como uma função matemática da quantidade de lesão corporal, pois experiências prévias, situação ambiental, a significância da dor e a cultura, têm um papel importante na percepção de sua intensidade e qualidade (Lico *et al*, 1974).

Numa perspectiva de função biológica da nocicepção é plausível considerar, que a capacidade do indivíduo perceber potenciais ameaças à sua integridade física, favorece situações de defesa, busca por alimento e o sucesso reprodutivo. Porém, essa hipótese só é válida se a detecção do estímulo nocivo é acompanhada de um comportamento de esquivar-se da fonte do estímulo

(Walters, 1994). Evidências das propriedades funcionais, de mecanismos nociceptivos neurais e moleculares, análogas entre *Aplysia* e ratos, sugere uma pressão seletiva que preserva a capacidade de reconhecer estímulos nocivos e desencadear reações fisiológicas e comportamentais coerentes ao contexto ambiental (Walters, 2009a). Ainda neste âmbito, respostas comportamentais aversivas de retirada/escape têm sido demonstradas em diversas espécies do sub-reino Eumetazoa, que abrange todos os animais que possuem sistema nervoso. Porém, a diversidade do repertório comportamental apresentado por diferentes espécies possui relação com o grau de complexificação do sistema nervoso (Walters, 2009b). Diante disso, respostas cognitivas e emocionais desagradáveis promovidas pela sensação que acompanha uma injúria tecidual, parecem estar presentes em espécies, que ao longo do desenvolvimento filogenético, desenvolveram substratos encefálicos capacitados.

As primeiras evidências acerca da modulação encefálica da dor se referem ao envolvimento da substância cinzenta periaquedutal e do bulbo rostro-ventro-medial, enquanto substratos que atuam principalmente nas reações defensivas e autonômicas induzidas pela dor (Heinricher e Ingram, 2009). Posteriormente, outras estruturas do tronco encefálico e do diencefalo foram caracterizadas como estruturas que modulam esta sensação, relacionando-se com reações emocionais e memória nociceptiva (Millan, 2002). Mais recentemente, tem-se evidenciado que no córtex cerebral ocorre o processamento mais refinado da informação dolorosa, integrando componentes afetivos e cognitivos. Especificamente, o córtex cingulado é uma área especializada do neocórtex, que participa do processamento emocional e cognitivo e, transforma a necessidade interna do organismo na elaboração de comportamentos (Devinsky *et al*, 1995). Essa

heterogeneidade funcional está ligada à relação estrutura-função dos tipos neuronais que o compõem, bem como sua organização citoarquitetônica (Vogt, 2009). Circuitos neurais específicos são capazes de processar quantidades limitadas de informação, por exemplo, diferentes aspectos cognitivos de processamento da dor ou componentes da emoção, como desbalanço autonômico e desconforto. Evidências sugerem que a região anterior do córtex cingulado seja mais ativada em eventos de conteúdo emocional, enquanto a região posterior forneça o conteúdo cognitivo da tomada de decisão (Vogt, 2009).

O córtex cingulado anterior (CCA) possui uma organização celular intrínseca diferenciada, que provavelmente reflete uma neuroquímica particular. Embora sua citoarquitetura seja laminar, é desprovido de camada IV, que o caracteriza como uma região agranular. Apresenta neurônios com pequeno tamanho na camada III e uma camada II mais espessa quando comparado à região posterior (Vogt, 2004; Vogt, 2009). Além disso, possui um denso plexo dendrítico na camada Va e neurônios fusiformes na camada Vb orientados verticalmente projetando-se para a substância branca, o que não ocorre nos córtex cingulado posterior e mediocingulado. Estudos com experimentação animal ou com neuroimagem em humanos têm frequentemente utilizado a terminologia córtex cingulado anterior rostral e/ou caudal. Essa denominação aceita que o córtex cingulado anterior caudal é uma extensão do CCA e não uma entidade funcional independente. Estudos de imagem funcional em humanos e, particularmente, um trabalho realizado por Palomero-Gallagher et al (2008) sugerem que a região referida como córtex cingulado anterior caudal possui características morfológicas, neuroquímicas e funcionais distintas, sendo coerente referir-se a ela como córtex mediocingulado (Vogt, 2009).

A função do CCA na modulação da dor em humanos pode ser entendida observando que pacientes submetidos à cingulotomia para tratamento de dores crônicas, referem conseguir identificar e localizar um estímulo doloroso, porém esta sensação não parece ser incômoda, nem desagradável (Ballantine *et al*, 1967). Um estudo verificou que neurônios do CCA de coelhos anestesiados com halotano, eram ativados pela estimulação nociva em diferentes regiões do corpo. Assim, neurônios nesse substrato parecem não possuir uma organização somatotópica que permita discriminar a região do corpo onde o estímulo foi aplicado (Sikes e Vogt, 1992). Reações autonômicas e comportamentos com conteúdo emocional representam aspectos da percepção de dor, que caracterizam o papel de uma subregião do CCA, conhecida como pregenual (CCAp), que abrange as áreas 24a, 24b e 32 (Vogt, 2009).

Estudos com diferentes abordagens experimentais, incluindo lesão eletrolítica, estimulação elétrica e química no CCA, têm evidenciado seu papel na modulação de processos algícos (Pastoriza *et al*, 1995; Fuchs *et al*, 1996; Lee *et al*, 1999). Particularmente, parece estar envolvido na aquisição e retenção de memória nociceptiva, que surge como uma reação secundária à dor. Um trabalho realizado por Johansen *et al* (2001) verificou que a lesão do CCA impediu o aprendizado de esquiva, desencadeado pela associação do estímulo doloroso ao contexto ambiental. Sugere-se que esse processo seja dependente de uma atividade excitatória nos neurônios do CCA, tendo em vista que a microinjeção de ácido quinurênico (antagonista glutamatérgico) previamente às sessões de condicionamento, impediu a aquisição do aprendizado de esquiva (Johansen e Fields, 2004).

Registros autorradiográficos e de hibridização *in situ* demonstram a presença de receptores para uma variedade de transmissores com ações diferentes nesse substrato neural (Bozkurt *et al*, 2005; Xie *et al*, 2009). Nesse sentido, alguns mecanismos neuroquímicos subjacentes às respostas nociceptivas têm sido investigados, para se compreender a circuitaria intrínseca do CCA na percepção de dor. O sistema GABAérgico parece atuar como um importante sistema inibitório, responsável por exercer um efeito fisiológico tônico, sobre os neurônios piramidais do CCA, principalmente, os de projeção da camada V (Higashi *et al*, 1991). Registros eletrofisiológicos desses neurônios demonstraram que a aplicação de bicuculina (antagonista GABA), facilitou os potenciais excitatórios pós sinápticos promovidos por glutamato. Além disso, microinjeções de muscimol (agonista GABA_A) no CCA de ratos, impede a aquisição de memória nociceptiva relacionada ao contexto ambiental (Wang *et al*, 2005).

Ainda no que se refere ao envolvimento do GABA nos circuitos do CCA, responsáveis por diferentes aspectos da dor, LaGraize e Fuchs (2007) induziram neuropatia periférica em ratos e avaliaram o efeito de agonistas GABAérgicos na sensibilidade mecânica e no condicionamento de esquiva, induzido por estimulação mecânica nociva. Verificou-se que a aplicação de muscimol no CCA bloqueava as respostas comportamentais aversivas, de associação entre estímulos nocivos e o contexto ambiental, porém não influenciou respostas nociceptivas de retirada da pata. Esses resultados sugerem que o CCA parece exercer influência, particularmente, em testes algesimétricos que envolvam respostas comportamentais com conteúdo afetivo. Porém, essa especificidade funcional apresenta-se inconsistente, tendo em vista que outras evidências

demonstram a estimulação elétrica ou química do CCA alterando respostas nociceptivas reflexas (Calejesan et al, 2000).

O sistema de neurotransmissão colinérgico também tem sido explorado com diferentes abordagens experimentais, referentes à modulação central da dor (Yaksh *et al*, 1985; Menescal de Oliveira e Hoffmann, 1995; Guimarães e Prado, 1999; Guimarães *et al*, 2000). Especificamente, as projeções colinérgicas ao córtex cingulado provem principalmente do complexo da banda diagonal de Broca – septum medial (Gaykema et al, 1990), onde exercem funções de aprendizado e memória, essenciais nos comportamentos de esquiva e predição eliciados por estimulação nociva. Como demonstraram Ortega-Legaspi et al (2003), a microinjeção de escopolamina (antagonista muscarínico) previamente a um estímulo nocivo térmico e à desnervação do ciático de ratos diminui o escore de autotomia. Isto sugere o envolvimento do sistema colinérgico na aquisição de memória nociceptiva, pois, quando esta droga foi administrada posteriormente aos procedimentos citados, não foi capaz de modificar tal resposta. Corroborando esses achados, Malin et al (2007) verificaram que a aplicação de agonista colinérgico (oxotremorina) no CCA potencializa a aquisição de memória relacionada com eventos emocionais, utilizando como modelo experimental o treinamento de esquiva inibitória.

Nessa perspectiva, a estimulação química colinérgica, muscarínica ou nicotínica, foi capaz de melhorar a retenção de memória, após treinamento de uma semana, com o animal sendo submetido a choques nocivos na pata, dentro do labirinto em T elevado. Essa mesma resposta foi obtida quando microinjetou-se antagonistas GABA_A e GABA_B (bicuculina e saclofeno, respectivamente) no

CCA (Farr et al, 2000). Provavelmente, estes sistemas de transmissão interagem entre si e com diversos outros, direta e indiretamente, via interneurônios e por meio de projeções extrínsecas. A interpretação mais precisa do funcionamento de cada sistema de neurotransmissão e suas interações, são obtidos com registros eletrofisiológicos. Nesse sentido, McCormick e Prince (1986), demonstraram que a hiperpolarização de curta latência em neurônios piramidais da camada V do CCA, promovida por estimulação colinérgica, era mediada por interneurônios GABAérgicos, tendo em vista que, a administração prévia de seus antagonistas, bicuculina ou picrotoxina, desencadeava surtos de despolarização paroxísticas epileptiformes. Sugere-se a partir desses resultados que a atividade de interneurônios GABAérgicos no CCA pode ser acentuada pela excitação colinérgica.

Os efeitos da modulação opióide, em diferentes níveis de processamento da dor, também tem sido extensivamente investigado (Millan, 2002). Num nível celular, este sistema age basicamente inibindo os potenciais de ação, por aumentar a condutância ao potássio e reduzir a corrente de cálcio dependente de voltagem (Tanaka e North, 1994). Nesse sentido a atividade opioidérgica parece funcionar, em condições fisiológicas, como um sistema regulatório que se encontra quiescente, até ser recrutado em situações que exijam atenuar a sensação de dor ou o estresse (Herz et al, 1997). No CCA a atividade opióide parece refinar o balanço entre atividade excitatória e inibitória, pois, é capaz de inibir potenciais excitatórios pós sinápticos mediados por glutamato, bem como, potenciais inibitórios pós sinápticos desencadeados por ação GABAérgica (Tanaka e North, 1994). Um estudo com neuroimagem em humanos demonstrou que a neurotransmissão opióide no CCA está diminuída durante estados afetivos

com valência negativa (Zubieta et al, 2003). Além disso, a aplicação de morfina no CCA de ratos por meio de microdiálise induz uma redução nos níveis extracelulares de glutamato (Hao et al, 2005). Embora não sejam evidências diretas acerca da função deste sistema em aspectos nociceptivos, esses achados auxiliam na compreensão da neuroquímica intrínseca do substrato, o que, eventualmente, permite associações pertinentes dos mecanismos subjacentes a antinocicepção.

Camundongos que receberam a microinjeção de agonistas μ e δ opióides no CCA aumentaram a latência para emitir respostas nociceptivas, quando submetidos a uma plataforma com temperatura nociva (Lee et al, 1999). Os autores inferem que esse efeito antinociceptivo tenha sido promovido por uma redução na atividade sináptica excitatória e/ou aumento na transmissão inibitória do CCA. Adicionalmente, ratos com neuropatia, por ligadura do nervo que emerge de L₅, não alteraram o limiar nociceptivo para estimulação mecânica, quando receberam microinjeção de morfina no CCA. Porém, a resposta de escape do lugar, induzida por estimulação nociva foi reduzida, o que sugere a participação da neurotransmissão opioidérgica do CCA, eminentemente, na aversividade da resposta eliciada por estimulação nociva (LaGraize et al, 2006). Embora esses resultados possam parecer contraditórios, uma interpretação parcimoniosa permite aceitá-los como complementares, tendo em vista, as particularidades metodológicas, referentes às espécies, variações neuroanatômicas e natureza do estímulo.

Conforme descrito acima, testes algesimétricos específicos se destinam a verificar prioritariamente determinado componente da percepção de dor. Nesse

contexto, a vocalização tem sido apresentada na literatura como uma resposta emitida por alguns animais, diante de situações que possuem um conteúdo emocional (Jürgens, 1998). Quando esta resposta é emitida em consequência da aplicação de estímulos nocivos periféricos é aceitável interpretá-la como a expressão do componente afetivo-motivacional da dor (Menescal-de-Oliveira e Lico, 1977; Harte et al, 2004). Além disso, redes neurais de processamento da vocalização e da dor, compartilham muitos substratos encefálicos (Jürgens, 2009). Logo, a utilização de um teste algesimétrico que se destine a analisar comportamentos nociceptivos, exclusivamente esquelotomotor, fornece uma medida complementar, para verificar os mecanismos específicos desse fenômeno. Nesse âmbito, o teste de formalina, desencadeia a instalação de alterações patológicas plásticas no sistema de transmissão nociceptiva, como potenciação a longo prazo, *wind up*, aumento de campo receptivo e sensibilização central (Tjølsen et al, 1992). Esse método não avalia o limiar de dor, mas permite o avaliador quantificar as respostas comportamentais de um estímulo doloroso inflamatório persistente. Dubuisson e Dennis (1977) classificaram a intensidade da dor objetivamente em categorias comportamentais, que são apresentadas pelos animais e identificadas pelo avaliador. Os comportamentos recuperativos de lambe e/ou sacudir a pata, eliciados pela administração de formalina, eventualmente são tratados na literatura como relacionados ao componente sensorial da dor. Porém, existem evidências acerca de estruturas límbicas corticais, sendo ativadas e modulando a manifestação desses comportamentos (Yi et al, 2011).

Conforme exposto, a circuitaria intrínseca do CCA, envolvida na modulação de submodalidades específicas da percepção de dor ainda necessita de algumas

elucidações. Nesse sentido, propusemos neste trabalho um delineamento metodológico que agregou algumas informações acerca da neuroquímica do CCA de cobaias, envolvidos em diferentes aspectos nociceptivos. Não encontramos na literatura nenhum trabalho cuja proposta foi verificar possíveis influências e interações da neurotransmissão GABAérgica, colinérgica e opioidérgica do CCA, modulando a resposta de vocalização induzida pela aplicação de um estímulo nocivo periférico. Embora o teste da formalina, em ratos, tenha sido extensivamente utilizado como uma ferramenta para se investigar dor experimentalmente, em cobaias há poucos registros acerca das respostas comportamentais provocadas pela administração subcutânea de formalina na pata.

4. Objetivo

- Verificar o envolvimento dos sistemas de neurotransmissão GABAérgico, colinérgico e opioidérgico do CCA na modulação de respostas nociceptivas em cobaias (*Cavia porcellus*). Para tanto foram utilizados os modelos algesimétricos de vocalização e o teste da formalina.

5. Materiais e métodos

5.1. Animais

No presente estudo, utilizamos cobaias macho (*Cavia porcellus*), pesando entre 450-500 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas acrílicas, forradas com maravalha, com temperatura controlada ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclos de 12/12h de claro/escuro e com acesso livre a água e comida. As condições de manutenção dos animais e os procedimentos experimentais obedeceram aos padrões do guia para cuidados e uso de animais de laboratório, elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo nº 145/2010).

5.2. Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram profundamente anestesiados com uma associação de 0,2 ml de cloridrato de ketamina e 0,15 ml de xilazina (intramuscular). Em seguida, foram realizadas a tricotomia e assepsia da cabeça, imediatamente após a fixação da mesma em um aparelho estereotáxico (Davis-Kopff) adequado para animais de pequeno porte. Posteriormente à exposição da calota craniana, foi implantada a cânula-guia no CCA esquerdo, por onde foram efetuadas as administrações das drogas em estudo. A localização do implante teve como referência as coordenadas do Atlas de Rössner (1965) para cobaias. Os parâmetros

estereotáxicos utilizados para atingir o CCA foram 1,2 mm anteriormente ao bregma, 0,4 mm lateralmente à linha média e 4,7 mm acima da linha intraural. O comprimento da cânula-guia para o CCA foi de 10 mm. Os implantes foram fixados com auxílio de uma prótese de acrílico e um parafuso rosqueado na superfície óssea. Em seguida, os animais receberam uma injeção subcutânea de Banamine (Schering – Plough, flunixin meglumina, 2,5 mg/Kg, 10 mg/ml, 0,2 ml) que possui propriedades analgésicas e anti – inflamatórias. O período de recuperação foi de 5 a 7 dias, com livre acesso a comida e água.

5.3. Microinjeção das drogas

A administração das drogas foi realizada com uma seringa de Hamilton (5,0 ul) conectado por meio de um segmento de polietileno de aproximadamente 45 cm (PE-10), a uma agulha dental (Mizzi, USA) de 0,3 mm de diâmetro externo e 11 mm de comprimento para atingir o CCA. A cânula da injeção foi preenchida com a droga utilizada, enquanto que a microseringa e a parte do polietileno foram preenchidas com água destilada com uma pequena bolha separando os dois líquidos. A extremidade da agulha Mizzi foi 1 mm além da extremidade inferior da cânula guia para assim atingir o tecido cerebral. A microinjeção ocorreu em um período de 15 segundos e a agulha foi deixada no local por mais 60 segundos para evitar refluxo. Após esse período, a agulha foi retirada e o animal submetido aos testes de vocalização ou da formalina.

5.4. DROGAS UTILIZADAS

- Muscimol - agonista preferencial de receptores GABA_A (Sigma St. Louis - USA);

- Bicuculina – antagonista específico de receptores GABA_A (Sigma St. Louis - USA);
- Carbacol – agonista de receptores colinérgicos (Sigma St. Louis - USA);
- Atropina – antagonista de receptores muscarínicos (Sigma St. Louis - USA);
- Morfina – agonista preferencial de receptores μ -opioides (Sigma St. Louis - USA);
- Naloxona – antagonista preferencial de receptores μ -opioides (Sigma St. Louis - USA);
- Formalina.
- Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina tamponada (NaCl a 0,9%), que foi usada também para controle do veículo das drogas microinjetadas.
- Todas as microinjeções foram efetuadas em um volume de 0,2 μ l, de acordo com trabalhos anteriores (Coutinho e Menescal-de-Oliveira, 2010; Favaroni Mendes e Menescal-de-Oliveira, 2008).
- A formalina também foi diluída a 5% com solução salina (NaCl 0,9%), a partir de uma solução mãe de formaldeído (37%).

5.5. Teste algesimétrico de vocalização

O teste algesimétrico de vocalização utilizado em nosso laboratório, tem se mostrado adequado para a mensuração de respostas nociceptivas em cobaias (Menescal-de-Oliveira e Lico, 1977 e 1982; Menescal de Oliveira e Hoffmann, 1993). Esse teste consiste na aplicação de um estímulo agudo periférico nocivo (choque elétrico) que provoca a emissão de uma resposta de vocalização pelo animal, o que é interpretado como expressão de dor.

Para a aplicação do estímulo nocivo periférico, foi implantado, na região subcutânea da coxa do animal, um par de eletrodos de aço-inox, não isolados, medindo 0,3 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento. Após esse procedimento, a cobaia foi parcialmente contida em uma caixa de acrílico preenchida com espuma de nylon, onde permaneceu sem qualquer forma de manipulação por 20 minutos para habituação da situação experimental.

Após o período de habituação, os animais foram submetidos a um estímulo elétrico com corrente pulsada, forma de onda retangular, frequência de 100 Hz e duração do pulso de 0,5 ms. Inicialmente a intensidade do estímulo foi de 0,5 volt (V) para o estabelecimento do limiar da resposta de vocalização. Em caso de ausência da resposta, a intensidade da estimulação foi aumentada gradativamente até que o animal emitisse alguma vocalização ou até a intensidade máxima de 4,0 V. As cobaias que não responderam até a intensidade máxima (4,0 V), foram excluídas do experimento.

Estabelecida a magnitude da estimulação nociva que evocou a resposta de vocalização do animal, mais duas estimulações subseqüentes foram realizadas para confecção de uma linha de base ou registro controle. Na seqüência, a droga em estudo foi administrada no sítio previamente determinado, para em seguida, realizar-se novos registros das amplitudes das vocalizações nos intervalos de tempo de 2, 5, 15, 30, 45, 60 e 75 minutos após a microinjeção.

A vocalização é captada e convertida num sinal elétrico, por meio de um microfone Aiwa DM-64, conectado a um pré-amplificador (Bioelectric Preamplifier RB-5). Esses sinais são transmitidos para um dos canais do polígrafo (Nihon Kohden) para registros gráficos das respostas de vocalização. A amplitude dos

picos do registro gráfico é proporcional à intensidade de vocalização do animal. Dessa forma, a média dos picos de cada resposta representa um índice confiável da magnitude de vocalização.

5.6. TESTE DA FORMALINA

As cobaias foram levadas para a sala de experimentação 20 minutos antes do início do teste, para habituação numa caixa de acrílico (25 x 17 x 25 cm), onde foram realizadas as sessões experimentais. Em seguida, receberam a microinjeção das drogas testadas ou salina (NaCl 0,9%) no CCA. Um minuto após a microinjeção das drogas, os animais receberam uma injeção subcutânea - com um volume de 50 µl - de formalina diluída a 5%, na região dorsal da pata traseira direita. As sessões experimentais duraram 60 minutos, onde eram quantificados os comportamentos nociceptivos, dentro de janelas de cinco minutos. Os animais eram filmados com uma Webcam (Compaq), utilizando o software CyberLink YouCam. Posteriormente, a análise desses comportamentos era feita com o auxílio do programa VLC média player, que permite reproduzir o filme em diferentes velocidades e melhora a acurácia da análise. Experimentos prévios utilizando formalina têm caracterizado dois comportamentos induzidos (lambidas e sacudidas) que indicam dor e podem ser objetivamente quantificados.

Classicamente o teste de formalina produz uma resposta de dor bifásica, sendo a primeira, com uma duração média de 10 minutos e relacionada com a ativação direta dos nociceptores. A segunda fase consiste no desenvolvimento de um processo inflamatório e, conseqüentes alterações plásticas no corno dorsal da medula espinhal. Embora ratos apresentem um período quiescente entre essas

duas fases, estudos de validação do teste da formalina para outras espécies, como gatos e cobaias, não exibem essa característica (Dubuisson & Dennis, 1977; Wheeler-Aceto e Cowan, 1991).

5.7. Grupos experimentais

5.7.1. Experimento I: Efeito do agonista preferencial de receptores GABA_A, muscimol e do antagonista bicuculina, microinjetados no CCA sobre a resposta de vocalização

Grupo 1: Microinjeções de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) previamente ao teste de vocalização.

Grupo 2: Microinjeções de muscimol (0,5 nmol / 0,2 µl) previamente ao teste de vocalização.

Grupo 3: Microinjeções de muscimol (1 nmol / 0,2 µl) previamente ao teste de vocalização.

Grupo 4: Microinjeções de muscimol (2 nmol / 0,2 µl) previamente ao teste de vocalização.

Grupo 5: Microinjeções de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl), previamente ao teste de vocalização.

Grupo 6: Microinjeções de muscimol (1 nmol / 0,2 µl) 10 minutos antes de microinjeções de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl), previamente ao teste de vocalização.

5.7.2. Experimento II: Efeito do agonista preferencial de receptores GABA_A, muscimol e do antagonista bicuculina, microinjetados no CCA sobre o teste da formalina

Grupo 1: Microinjeções de solução salina a 0,9 % (0,2 µl) previamente ao teste da formalina.

Grupo 2: Microinjeções de muscimol (1 nmol / 0,2 µl) previamente ao teste da formalina.

Grupo 3: Microinjeções de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl) previamente ao teste da formalina.

Grupo 4: Microinjeções de muscimol (1 nmol / 0,2 µl) 10 minutos antes de microinjeções de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl), previamente ao teste da formalina.

5.7.3. Experimento III: Efeito do agonista de receptores colinérgicos, carbacol e do antagonista muscarínico atropina, microinjetados no CCA sobre a resposta de vocalização

Grupo 1: Microinjeções de carbacol (2,7 nmol / 0,2µl) , previamente ao teste de vocalização.

Grupo 2: Microinjeções de atropina (0,7 nmol / 0,2µl), previamente ao teste de vocalização.

Grupo 3: Microinjeções de atropina (0,7 nmol / 0,2µl) 10 minutos antes de microinjeções de carbacol (2,7 nmol / 0,2µl), previamente ao teste de vocalização.

5.7.4. Experimento IV: Bloqueio da atividade do agonista de receptores colinérgicos, carbacol, com naloxona, um antagonista preferencial µ-opiídeo microinjetados no CCA sobre o teste de vocalização

Grupo 1: Microinjeções de naloxona (2,7 nmol / 0,2µl) 10 minutos antes de microinjeções de carbacol (2,7 nmol / 0,2µl), previamente ao teste de vocalização.

5.7.5. Experimento V: Efeito do agonista de receptores colinérgicos, carbacol e do antagonista muscarínico, atropina, microinjetados no CCA sobre o teste da formalina

Grupo 1: Microinjeções de carbacol (2,7 nmol / 0,2µl), previamente ao teste da formalina.

Grupo 2: Microinjeções de atropina (0,7 nmol / 0,2µl), previamente ao teste da formalina.

5.7.6. Experimento VI: Efeito do agonista preferencial de receptores de μ opióides, morfina e do seu antagonista, naloxona, microinjetados no CCA sobre o teste de vocalização

Grupo 1: Microinjeções de morfina (4,4 nmol / 0,2µl), previamente ao teste de vocalização.

Grupo 2: Microinjeções de naloxona (2,7 nmol / 0,2µl) 10 minutos antes de microinjeções de morfina (4,4 nmol / 0,2µl), previamente ao teste de vocalização.

5.7.7. Experimento VII: Efeito do agonista preferencial de receptores de μ opióides, morfina e do seu antagonista, naloxona, microinjetados no CCA sobre o teste de formalina

Grupo 1: Microinjeções de morfina (4,4 nmol / 0,2µl), previamente ao teste de formalina.

Grupo 2: Microinjeções de naloxona (2,7 nmol / 0,2µl) 10 minutos antes de microinjeções de morfina (4,4 nmol / 0,2µl), previamente ao teste de formalina.

5.8. HISTOLOGIA

Após a realização do protocolo experimental, os animais foram anestesiados profundamente com tiopental sódico (40 mg/Kg, ip) e submetidos a perfusão trans-cardíaca, através do ventrículo esquerdo, com solução fisiológica, para

retirada do sangue do animal. Em seguida, foi perfundida uma solução de formaldeído a 10%, para fixação dos tecidos do animal. Os cérebros foram retirados e mantidos em solução de formaldeído (10%) por no mínimo 24 horas e na solução de sacarose por 2 dias. Após este tempo, foi realizado cortes de 40 μm no criostato (Mícron HM 505N) e corados com o método de *Nissl*. Os cortes foram analisados sob microscopia de luz (Axiovert 100, sistema de aquisição de imagens KS-300 Zeiss), e os sítios de microinjeção foram identificados segundo o Atlas de Rössner (1965), para cobaias. Foram considerados para análise dos resultados, apenas os animais cuja microinjeção atingiu a estrutura alvo, nos planos específicos da área a ser investigada (-1,2 à -2,6 mm referentes ao bregma).

5.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS

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

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

Valor da linha de base

Os resultados do teste da formalina consistiram na quantificação dos comportamentos recuperativos de lambe e/ou sacudir a pata durante 60 minutos, dividido em janelas de cinco minutos. Para análise desses dados foram feitas as médias dos grupos em cada janela de tempo e seus respectivos erros padrão (média \pm erro padrão da média).

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de uma análise de variância de duas vias para medidas (two-way ANOVA) e as diferenças determinadas pelo pós teste DUNCAN. Além disso, os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

6. Resultados

6.1. Experimento I

- Efeito do agonista preferencial de receptores GABA_A, muscimol e do seu antagonista, bicuculina, microinjetados no CCA sobre a resposta nociceptiva de vocalização

Nessa etapa experimental, observamos o decurso temporal do tratamento com bicuculina, muscimol e salina no CCA de cobaias, sobre a resposta nociceptiva de vocalização induzida por um estímulo nocivo periférico. Verificou-se, por meio do two-way ANOVA para medidas repetidas, que o tratamento com bicuculina (1 nmol / 0,2 µl) produziu um aumento significativo ($F_{(280, 35)} = 3,894$; $p < 0,001$) na amplitude dos registros de vocalização induzida pela aplicação de um estímulo nocivo periférico, em relação ao grupo salina e à linha de base (Figura 1). A aplicação do pós teste de DUNCAN mostrou diferença entre as médias experimentais nos tempos, 2, 5, 15, 30 e 45 minutos, e as médias controle nos mesmos períodos. Observa-se ainda que a microinjeção de muscimol (1 nmol / 0,2 µl), previamente à bicuculina bloqueou o efeito pronociceptivo desta droga. Dessa forma, muscimol + bicuculina quando microinjetados no CCA de cobaias não promoveram alteração significativa ($p > 0,05$) na média das amplitudes de vocalização em relação ao grupo salina e controle (linha de base). Além disso, muscimol microinjetado no CCA em diferentes doses (0,5; 1 e 2 nmol / 0,2 µl) não foi capaz de alterar a resposta nociceptiva de vocalização nos períodos avaliados,

em relação à linha de base (Figura 2). Também não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as médias da amplitude de vocalização entre os grupos de animais tratados com muscimol e o grupo tratado com solução salina.

A figura 3 mostra uma representação esquemática do CCA, contendo os sítios das microinjeções dos grupos citados nessa etapa experimental. As figuras 4 e 5 mostram registros de animais representativos do desempenho geral do grupo, no que se refere a resposta de vocalização. A fotomicrografia da figura 6 ilustra a localização de uma microinjeção no CCA de uma das cobaias utilizadas no estudo.

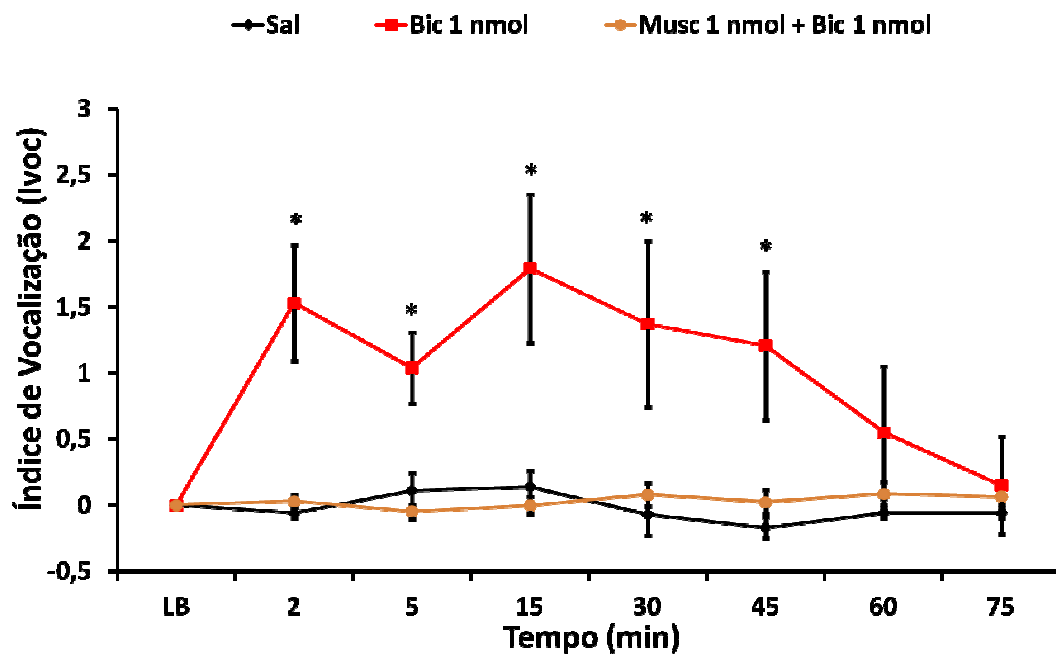


Figura 1 – Decurso temporal da média (\pm erro padrão da média) do índice de vocalização no período controle (LB) e após os tratamentos com salina 0,9 % (Sal; n = 7), bicuculina (Bic 1nmol; n=8) e 1 nmol de muscimol previamente a 1 nmol de bicuculina (Musc + Bic; n=8) no CCA. As barras verticais representam o EPM. * representa $p < 0,05$ quando comparado com os grupos salina, bicuculina e muscimol + bicuculina.

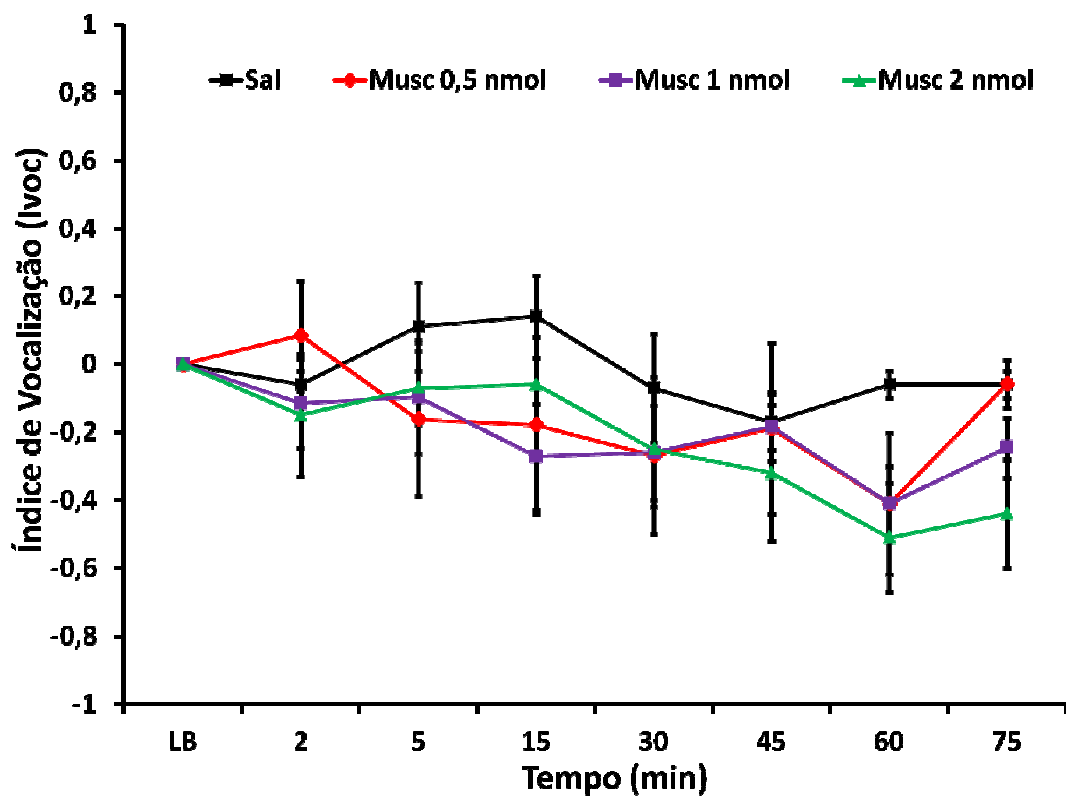


Figura 2 - Decurso temporal da média (\pm erro padrão da média) do índice de vocalização no período controle (LB) e após os tratamentos com salina 0,9 % (Sal; n = 7), muscimol (Musc 0,5 nmol; n=8), muscimol (Musc 1 nmol; n=8) e muscimol (Musc 2 nmol; n=6) no CCA. As barras verticais representam o EPM.

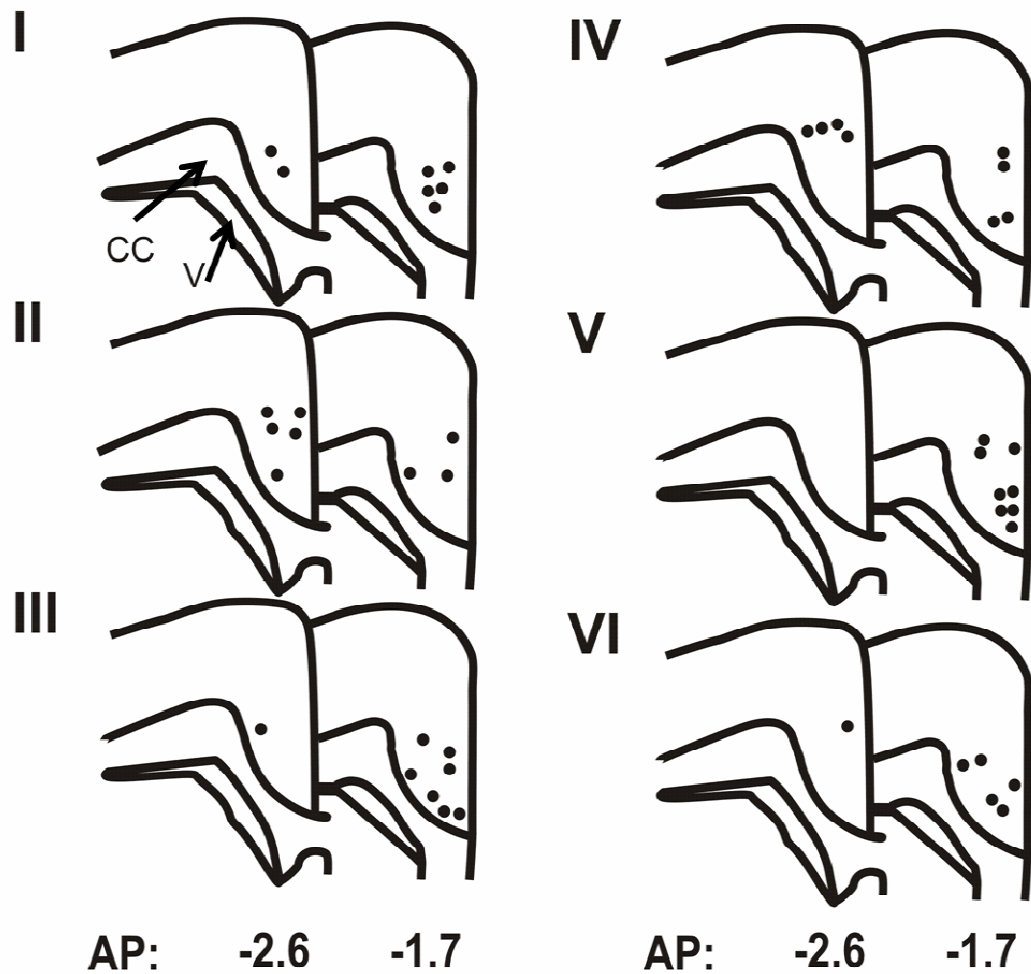


Figura 3 – Representação esquemática de secções do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções: I - Salina (NaCl 0,9%); II bicuculina (1 nmol); III muscimol (1 nmol) seguido de bicuculina (1nmol); IV muscimol (0,5 nmol), V muscimol (1 nmol); VI muscimol (2 nmol). AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.

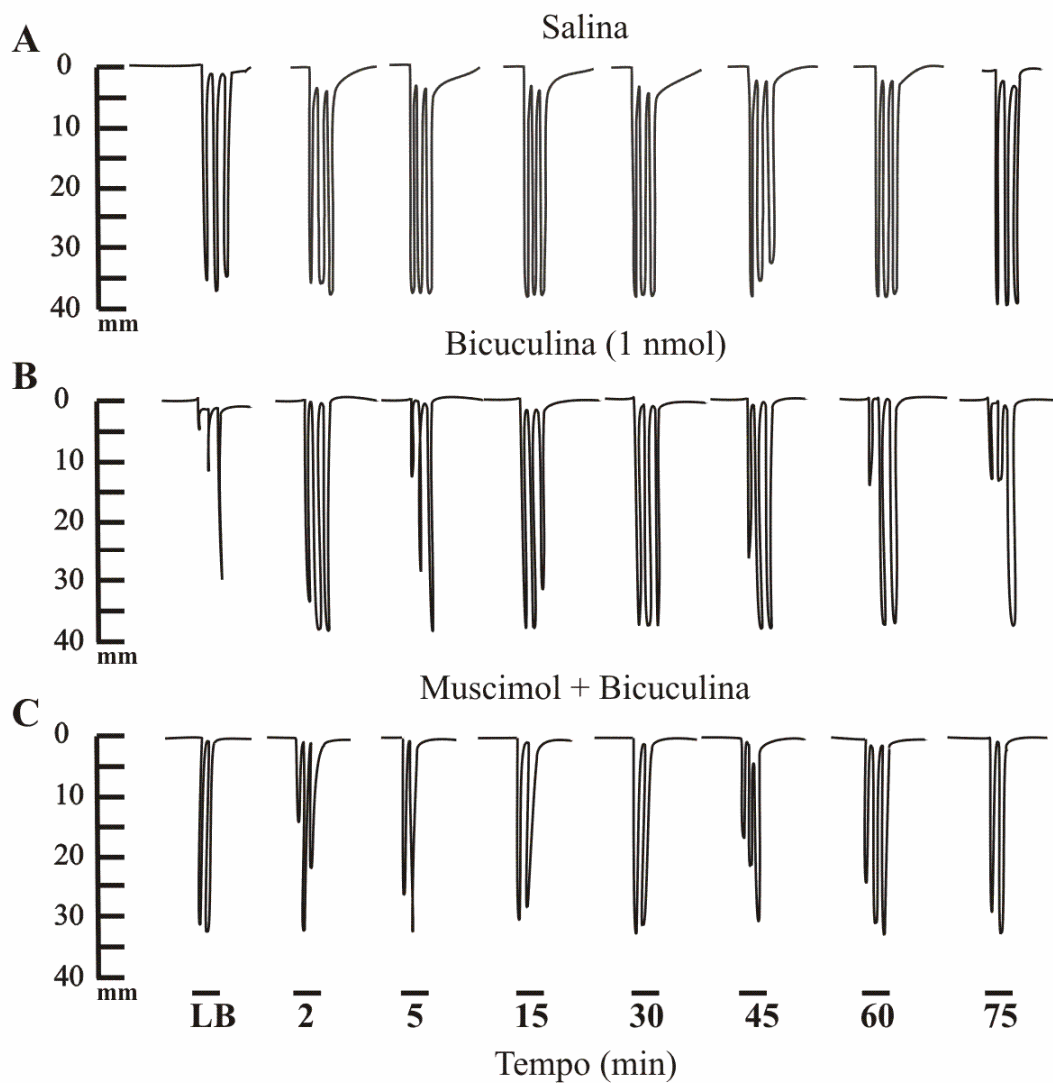


Figura 4 – Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após a microinjeções no CCA de cobaias. (A) salina, (B) bicuculina (1 nmol) e (C) muscimol (1 nmol) seguido de bicuculina (1 nmol). As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 seg) nos diferentes intervalos de tempo (minutos). A linha de base (LB) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

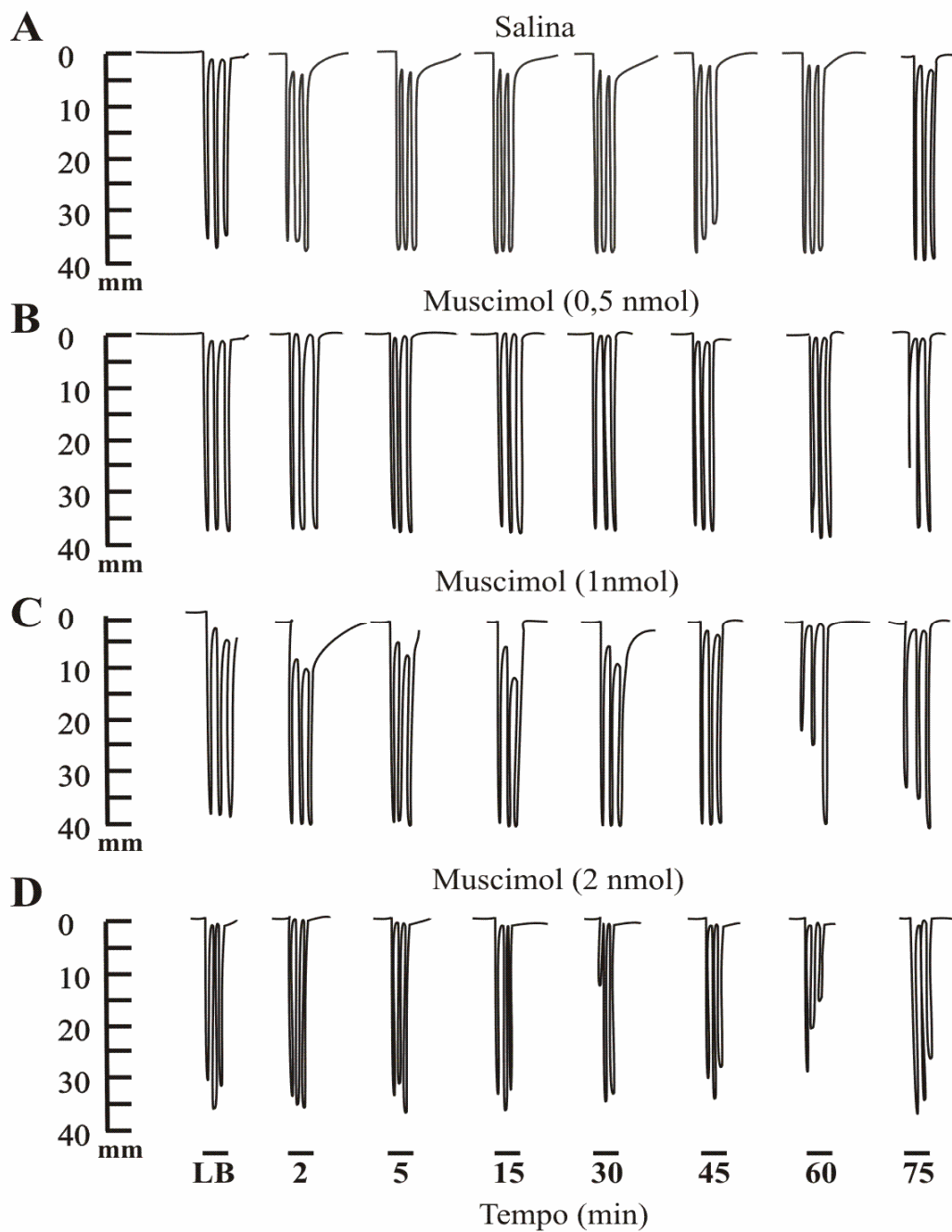


Figura 5 - Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após a microinjeções no CCA de cobaias. (A) salina, (B) muscimol (0,5 nmol), (C) muscimol (1 nmol) e (D) muscimol (2 nmol). As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 seg) nos diferentes intervalos de tempo (minutos). A linha de base (LB) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

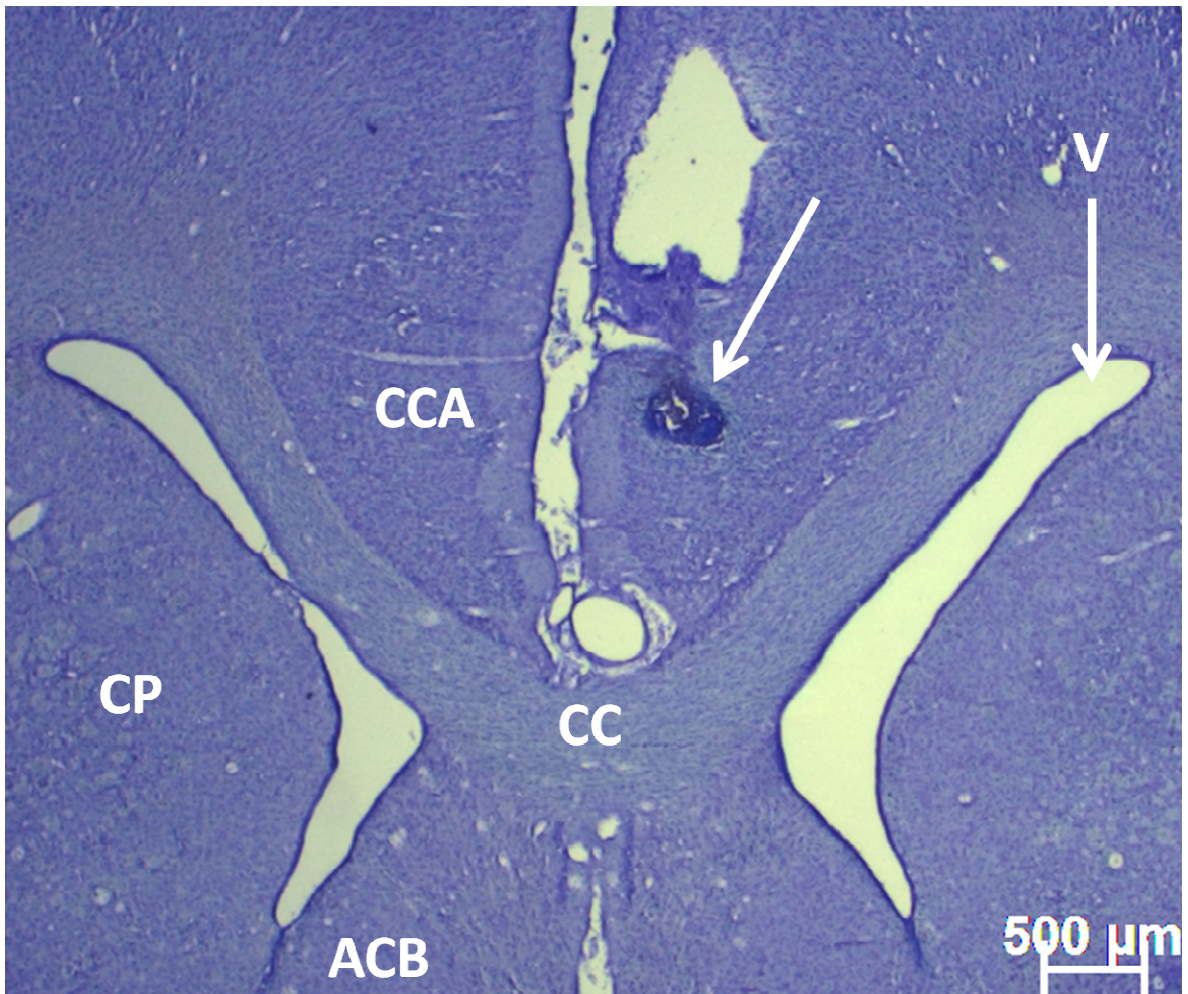


Figura 6 - Fotomicrografia de secção coronal do cérebro de cobaia representativo do grupo e do sítio de uma microinjeção localizada no córtex cingulado anterior (CCA). ACB = núcleo acumbens; CC = corpo caloso; CP = complexo caudado-putamen; V = ventrículo lateral.

6.2. Experimento II

- Efeito do agonista preferencial de receptores GABA_A, muscimol e do antagonista bicuculina, microinjetados no CCA sobre o teste da formalina

Assim como no teste algesimétrico de vocalização observamos o decurso temporal do efeito da bicuculina, muscimol e salina, microinjetados no CCA, sobre os comportamentos recuperativos de lambe e/ou sacudir a pata, após administração de formalina na mesma. Novamente, a bicuculina (1 nmol / 0,2 µl) promoveu um efeito pronociceptivo, evidenciado pelo aumento no número de lambidas e/ou sacudidas da pata que recebeu a injeção de formalina (Figura 7). Verifica-se que as médias nos intervalos de tempo, 0 – 5; 5 – 10 e 15 – 20 minutos, dos animais que foram tratados com bicuculina, quando comparados ao grupo controle (salina) nesses mesmos tempos, apresentaram valores significativamente maiores ($F_{(275,3)} = 8,524$; $p < 0,001$). Este efeito pronociceptivo promovido pelo tratamento com bicuculina no CCA também foi bloqueado neste teste, quando se microinjetou previamente o muscimol (1 nmol / 0,2 µl). Logo, a microinjeção de muscimol + bicuculina no CCA de cobaias não alterou as respostas nociceptivas induzidos pela formalina, quando comparados ao grupo controle (Figura 7). De forma semelhante ao que ocorreu no teste de vocalização, a microinjeção de muscimol, *per se*, (1 nmol / 0,2 µl) no CCA não foi capaz de promover nenhuma alteração significativa nas respostas nociceptivas de lambidas e sacudidas, em relação aos animais que receberam tratamento com salina (Figura 7).

A figura 8 mostra uma representação esquemática do CCA, com os sítios das microinjeções dos grupos experimentais descritos nesta seção de resultados.

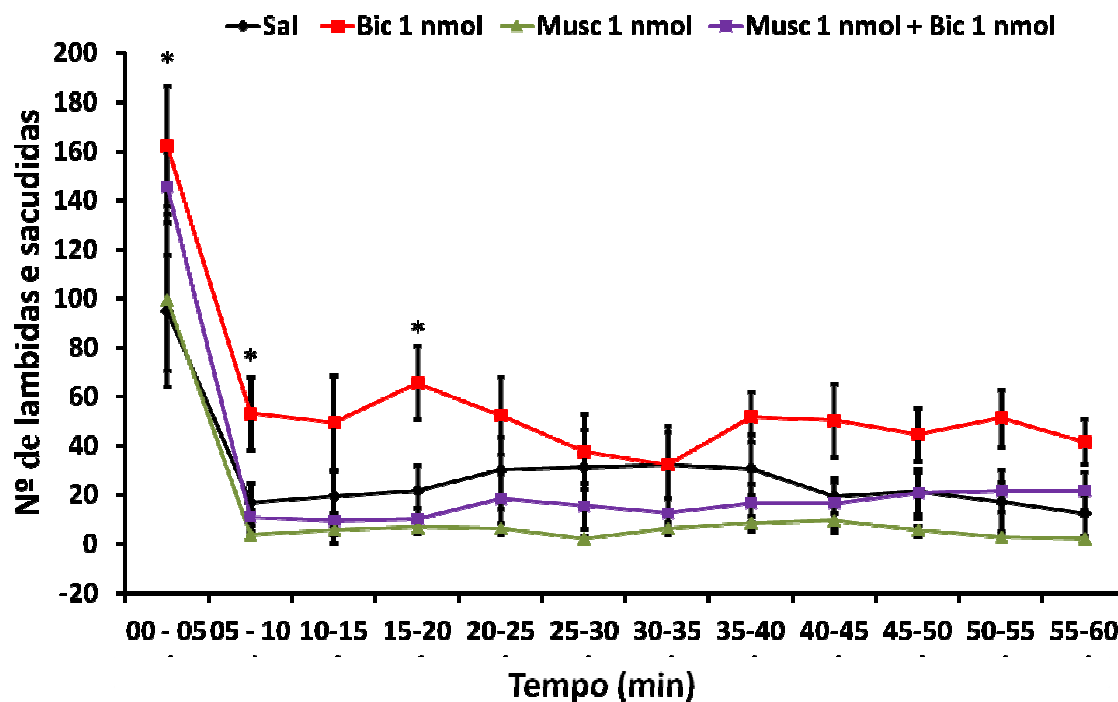


Figura 7 - Decurso temporal da média (\pm erro padrão da média) do número de lambidas e sacudidas emitidas pelas cobaias após injeção de formalina. Comparação de animais tratados com salina 0,9 % (Sal; n = 5), bicuculina (Bic 1nmol; n=8); muscimol (Bic 1nmol; n=8) e 1 nmol de muscimol previamente a 1 nmol de bicuculina (Musc + Bic n=8) no CCA. As barras verticais representam o EPM. * representa $p < 0,05$ quando comparado com os grupos salina, bicuculina, muscimol e muscimol + bicuculina.

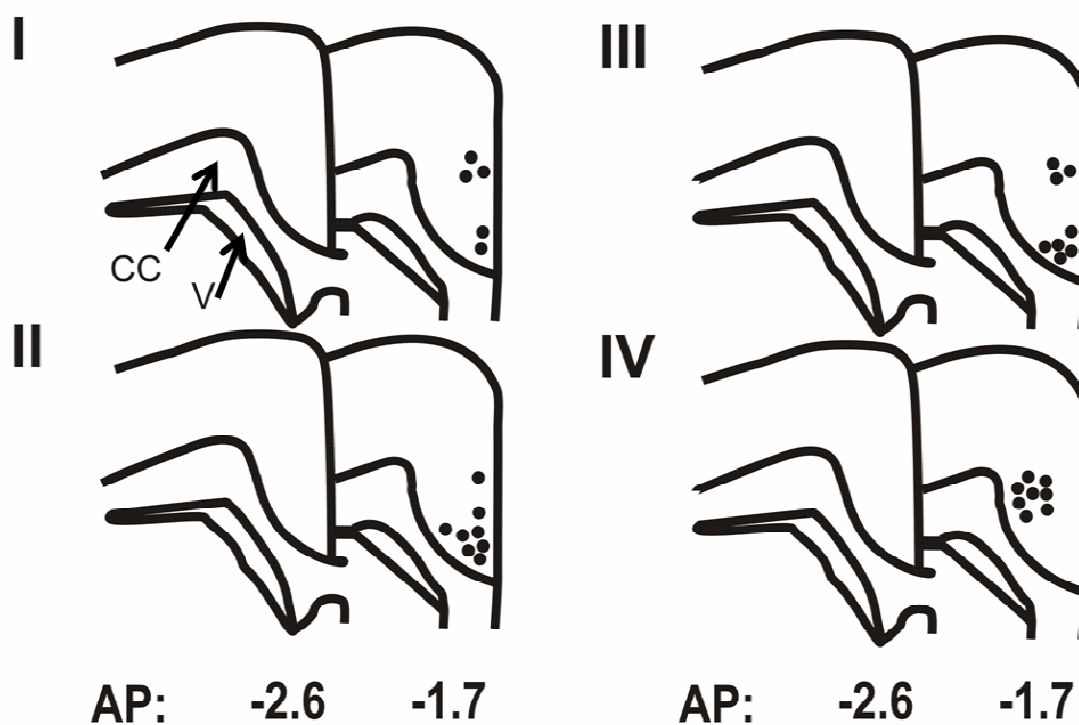


Figura 8 - Representação esquemática de secções do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções: I - Salina (NaCl 0,9%); II bicuculina (1 nmol); III muscimol (1 nmol); IV muscimol (1 nmol) seguido de bicuculina (1nmol). AP = plano Antero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.

6.3. Experimento III

- Efeito do agonista de receptores colinérgicos, carbacol e do antagonista muscarínico atropina, microinjetados no CCA sobre a resposta nociceptiva de vocalização. Envolvimento de interneurônios opioidérgicos

O tratamento com o agonista inespecífico de receptores colinérgicos, carbacol (2,7 nmol / 0,2 µl), produziu antinocicepção avaliada pela redução da amplitude dos registros de vocalização induzida pela aplicação de choque elétrico nocivo na pata das cobaias. Quando comparados aos registros da linha de base, a amplitude das vocalizações nos tempos de 15, 30, 60 e 75 minutos, do grupo tratado foram significativamente menores (Figura 9). De forma semelhante, em comparação com o grupo salina, a amplitude dos registros de vocalização dos animais tratados com carbacol também apresentou uma redução estatisticamente significativa ($F_{(152,14)} = 1,839$; $p < 0,05$). A microinjeção de antagonista muscarínico, atropina (0,7 nmol / 0,2 µl), no CCA, previamente ao tratamento com carbacol foi capaz de bloquear o efeito antinociceptivo promovido por esta droga em relação à linha de base e ao grupo salina. Assim, atropina + carbacol no CCA não alterou a amplitude dos registros de vocalização quando comparados ao grupo salina (Figura 9). Além disso, a microinjeção de atropina, *per se*, também não alterou a expressão comportamental nociceptiva das cobaias, evidenciada pela amplitude dos registros de vocalização.

Como forma de verificar se o efeito antinociceptivo promovido pela microinjeção de carbacol no CCA era mediado pela participação de interneurônios inibitórios, que não atuassem via neurotransmissão GABAérgica, investigamos o papel de um antagonista preferencial μ -opióide, naloxona (2,7 nmol / 0,2 μ l), previamente ao tratamento com carbacol. Verificamos que microinjeção prévia de naloxone também foi capaz de bloquear o efeito do carbacol na amplitude dos registros de vocalização. Ao longo de todo o decurso temporal de ação da droga não houve nenhuma alteração estatisticamente significante entre esse grupo e o grupo controle (Figura 10). Logo, naloxona + carbacol, microinjetados no CCA não alterou a amplitude dos registros de vocalização desencadeada por um estímulo nocivo periférico ($p > 0,05$).

A Figura 11 mostra uma representação esquemática do CCA, com os sítios das microinjeções dos grupos experimentais descritos nesta seção de resultados. A Figura 12 mostra registros de animais representativos do desempenho geral do grupo, no que se refere à resposta nociceptiva de vocalização.

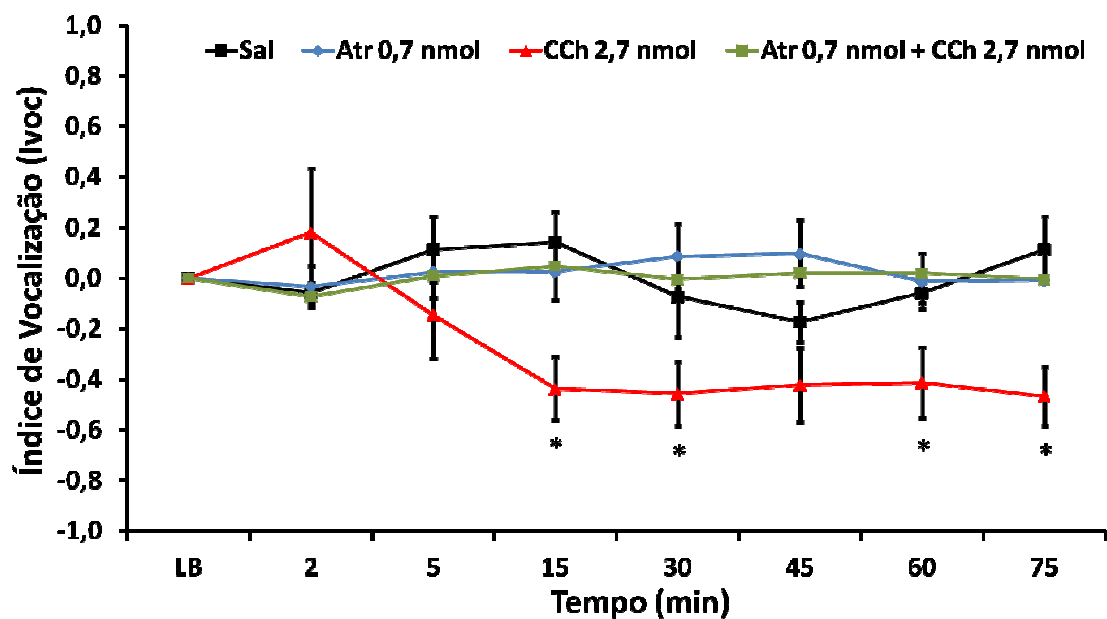


Figura 9 - Decurso temporal da média (\pm erro padrão da média) do índice de vocalização no período controle (LB) e após os tratamentos com salina 0,9 % (Sal; n = 7), carbacol (CCh 2,7 nmol; n=8), atropina (Atr 0,7 nmol; n=7) e atropina 0,7 nmol previamente a 2,7 nmol de carbacol (Atr + CCh; n=9) no CCA. As barras verticais representam o EPM. * representa $p < 0,05$ quando comparado com os grupos salina, carbacol, atropina e atropina + carbacol.

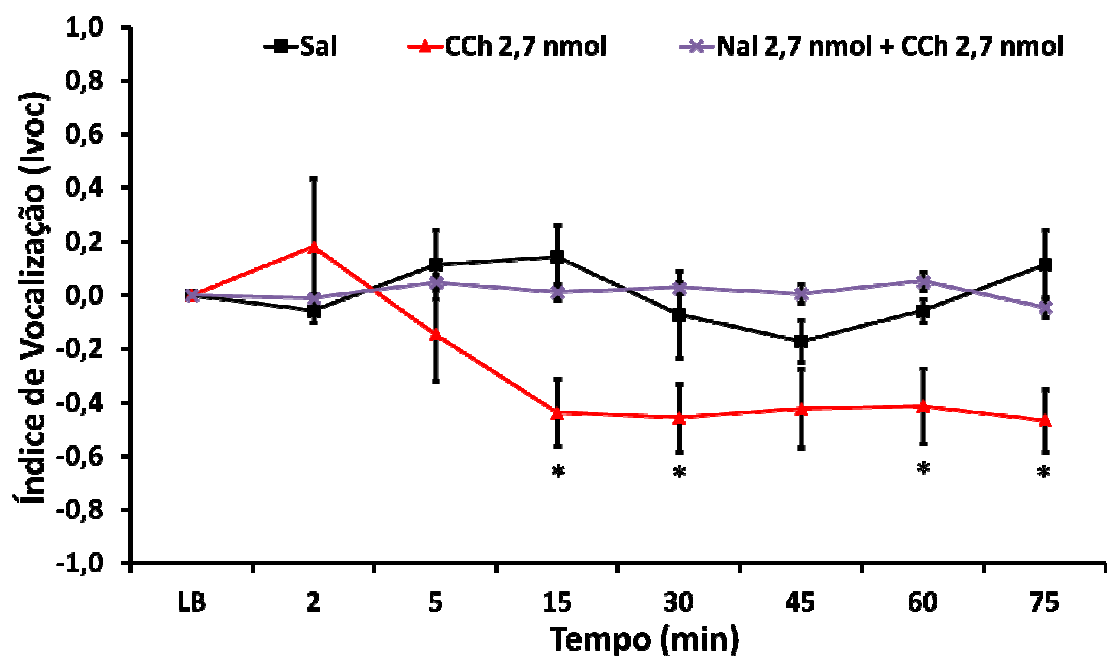


Figura 10 - Decurso temporal da média (\pm erro padrão da média) do índice de vocalização no período controle (LB) e após os tratamentos com salina 0,9 % (Sal; $n = 7$), carbacol (CCh 2,7 nmol; $n=8$) e naloxona 2,7 nmol previamente a 2,7 nmol de carbacol (Nal + CCh; $n=8$) no CCA. As barras verticais representam o EPM. * representa $p < 0,05$ quando comparado com os grupos salina, carbacol e naloxona + carbacol.

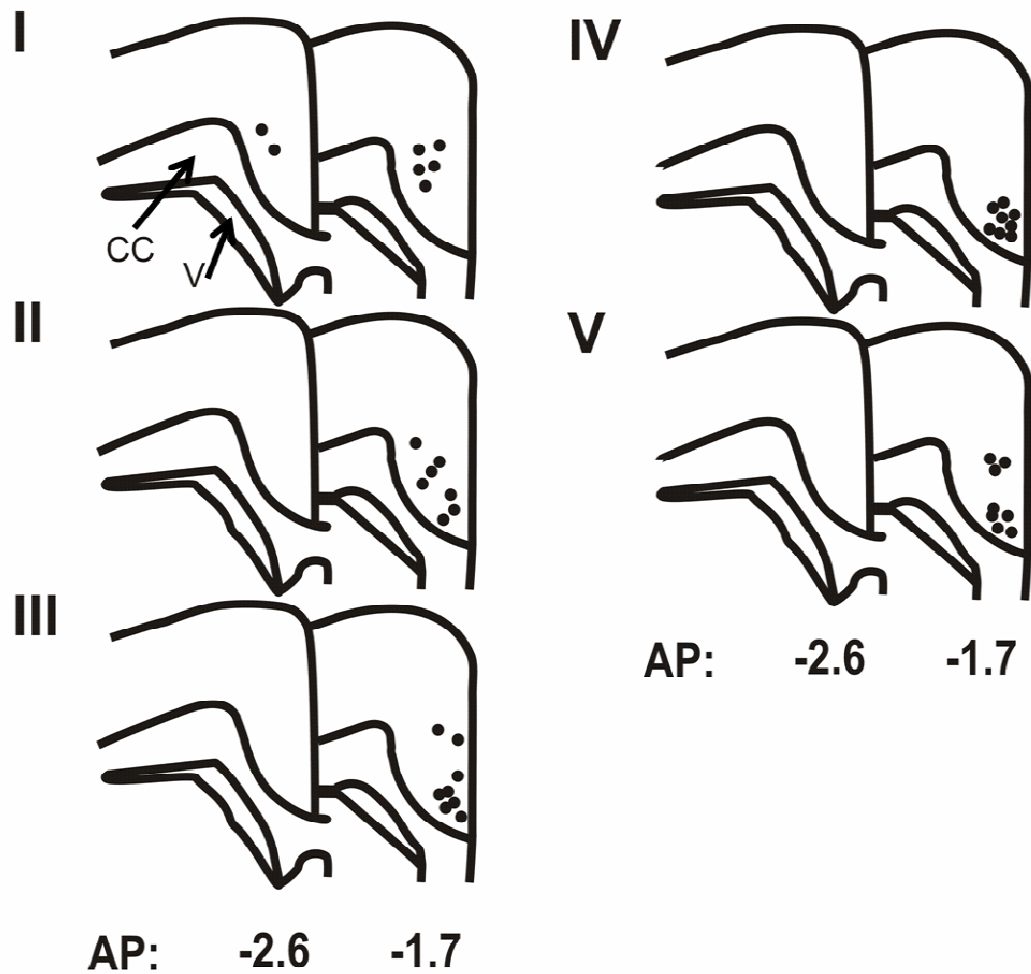


Figura 11 - Representação esquemática de secções do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções: I - Salina (NaCl 0,9%); II atropina (0,7 nmol); III carbacol (2,7 nmol); IV atropina (0,7 nmol) seguido de carbacol (2,7 nmol); V naloxona (2,7 nmol) seguido de carbacol (2,7 nmol). AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.

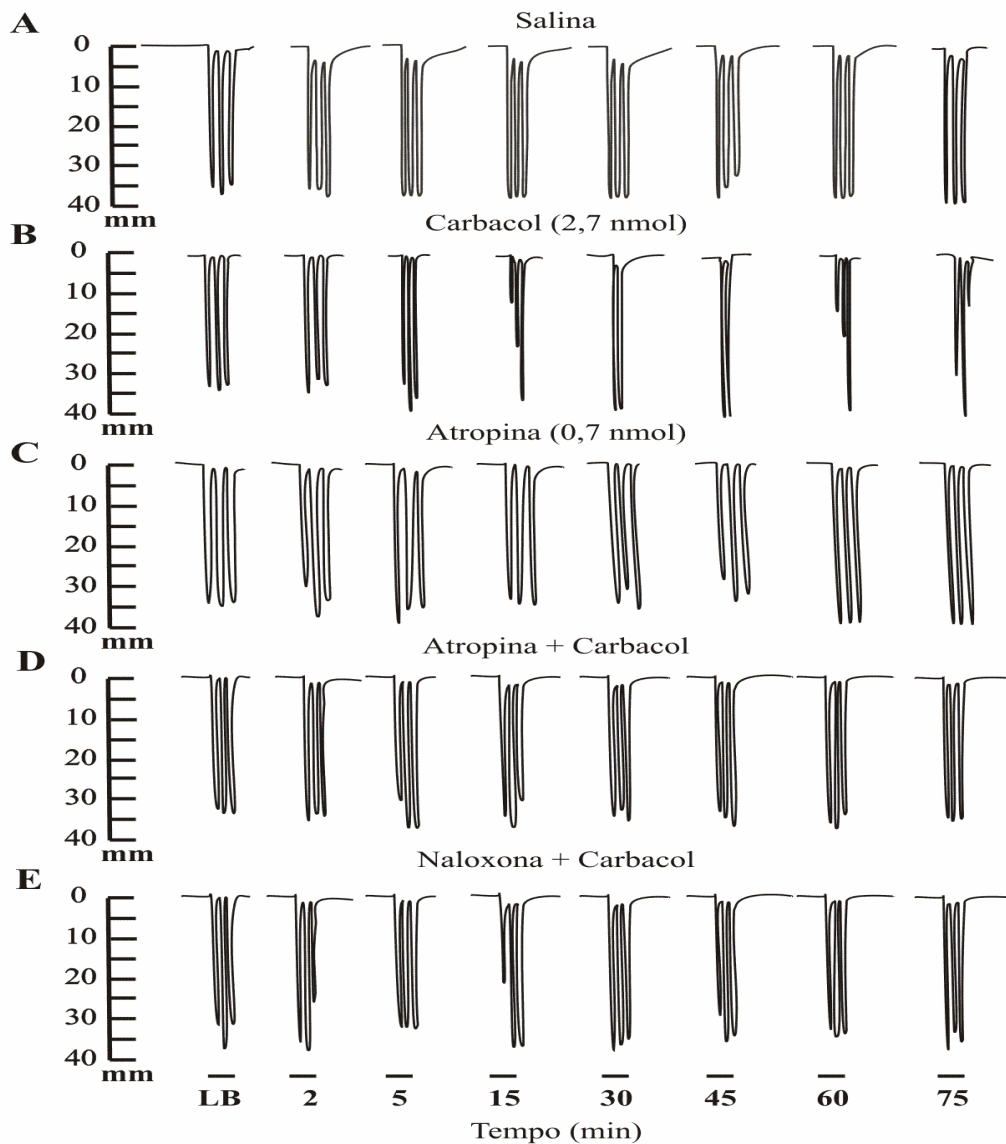


Figura 12 - Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após a microinjeções no CCA de cobaias. (A) salina, (B) carbacol (2,7 nmol), (C) atropina (0,7 nmol), (D) atropina (0,7 nmol) previamente ao carbacol (2,7 nmol), (E) naloxona (2,7 nmol) previamente ao carbacol (2,7 nmol). As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 seg) nos diferentes intervalos de tempo (minutos). A linha de base (LB) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

6.4. Experimento IV

- Efeito do agonista de receptores colinérgicos, carbacol e do antagonista muscarínico atropina, microinjetados no CCA sobre o teste da formalina

A microinjeção de carbacol (2,7 nmol / 0,2 µl) no CCA, não foi capaz de modificar as respostas nociceptivas induzidas pela aplicação de formalina na região dorsal da pata de cobaias. Portanto, não foram observadas alterações estatisticamente significantes ($p > 0,05$). A Figura 13 mostra que tanto a microinjeção de carbacol (2,7 nmol / 0,2 µl) quanto de atropina (0,7 nmol / 0,2 µl) no CCA não foram capazes de alterar o número de lambidas e/ou sacudidas apresentadas pelas cobaias, ao longo de todo o tempo analisado.

A Figura 14 mostra uma representação esquemática do CCA, com os sítios das microinjeções dos grupos experimentais descritos nesta seção de resultados.

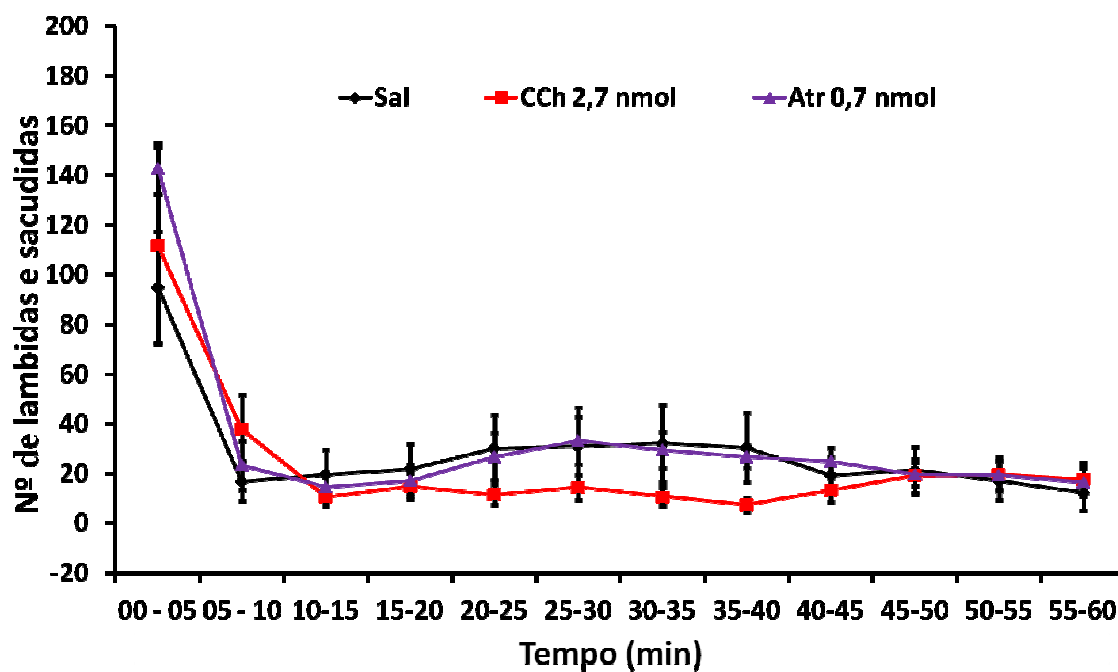


Figura 13 - Decurso temporal da média (\pm erro padrão da média) do número de lambidas e sacudidas emitidas pelas cobaias após injeção de formalina. Comparação de animais tratados com salina 0,9 % (Sal; n = 5), carbacol (CCh 2,7 nmol; n=8); atropina (Atr 0,7 nmol; n=8) no CCA. As barras verticais representam o EPM.

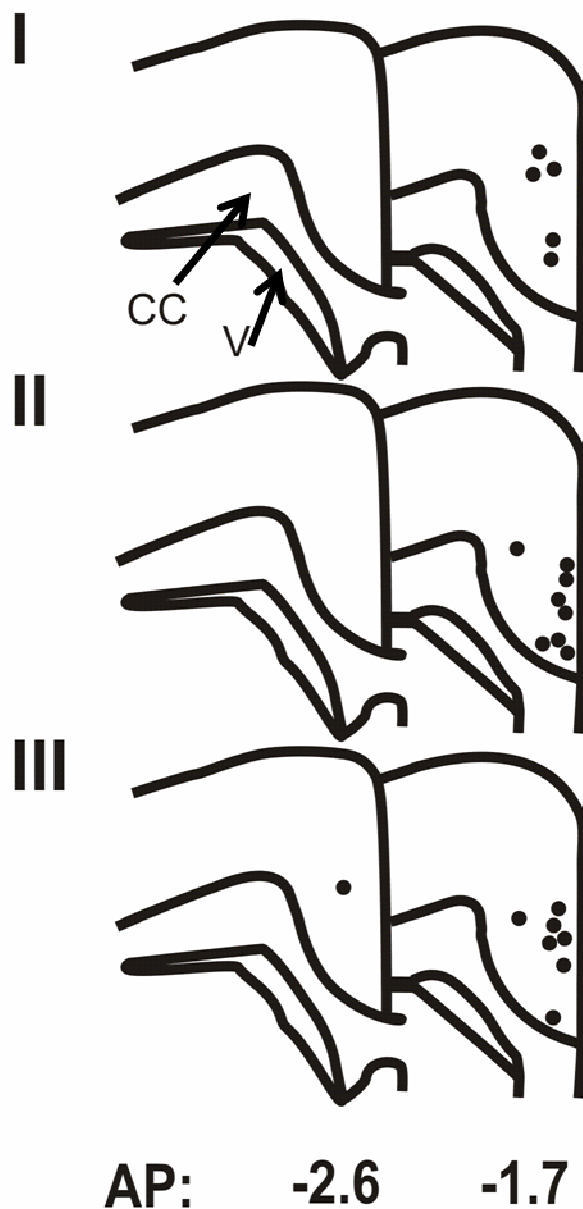


Figura 14 - Representação esquemática de secções do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções: I - Salina (NaCl 0,9%); II carbacol (2,7 nmol); III atropina (0,7 nmol). AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.

6.5. Experimento V

- Efeito do agonista preferencial de receptores μ opióides, morfina e do seu antagonista, naloxona, microinjetados no CCA sobre a resposta nociceptiva de vocalização

Nessa etapa experimental verificou-se, por meio do two-way ANOVA para medidas repetidas, que o tratamento com morfina (4,4 nmol / 0,2 μ l) no CCA das cobaias promoveu um efeito antinociceptivo ($F_{(98,7)} = 5,117$; $p < 0,001$), evidenciado pela redução na amplitude de vocalização, desencadeada pela aplicação de um estímulo nocivo agudo na periferia (Figura 15). A aplicação do pós-teste de Duncan evidenciou que este efeito ocorreu durante todo o decurso de tempo do nosso protocolo experimental, em relação ao grupo salina e à linha de base. Nota-se ainda que a microinjeção prévia de naloxona (2,7 nmol / 0,2 μ l) preveniu o efeito antinociceptivo promovido pela morfina. Dessa forma, naloxona + morfina quando microinjetados no CCA de cobaias não alteraram significativamente ($p > 0,05$) a média das amplitudes de vocalização, quando comparadas ao grupo salina e à linha de base.

A figura 16 mostra uma representação esquemática do CCA, contendo os sítios das microinjeções dos grupos citados nessa etapa experimental. A figura 17 mostra registros de animais representativos do desempenho geral do grupo, no que se refere a resposta de vocalização.

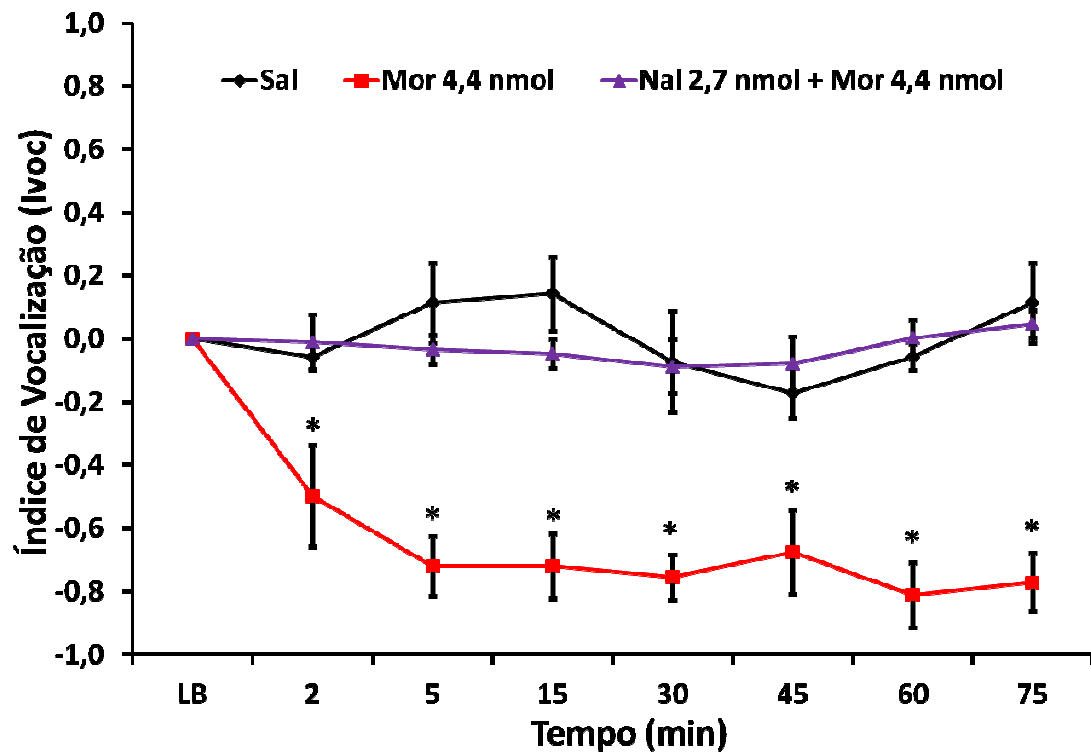


Figura 15 - Decurso temporal da média (\pm erro padrão da média) do índice de vocalização no período controle (LB) e após os tratamentos com salina 0,9 % (Sal; $n = 7$), morfina (Mor 4,4 nmol; $n=9$) e naloxona 2,7 nmol previamente a 4,4 nmol de morfina (Nal + Mor; $n=8$) no CCA. As barras verticais representam o EPM. * representa $p < 0,05$ quando comparado com os grupos salina, morfina e naloxona + morfina.

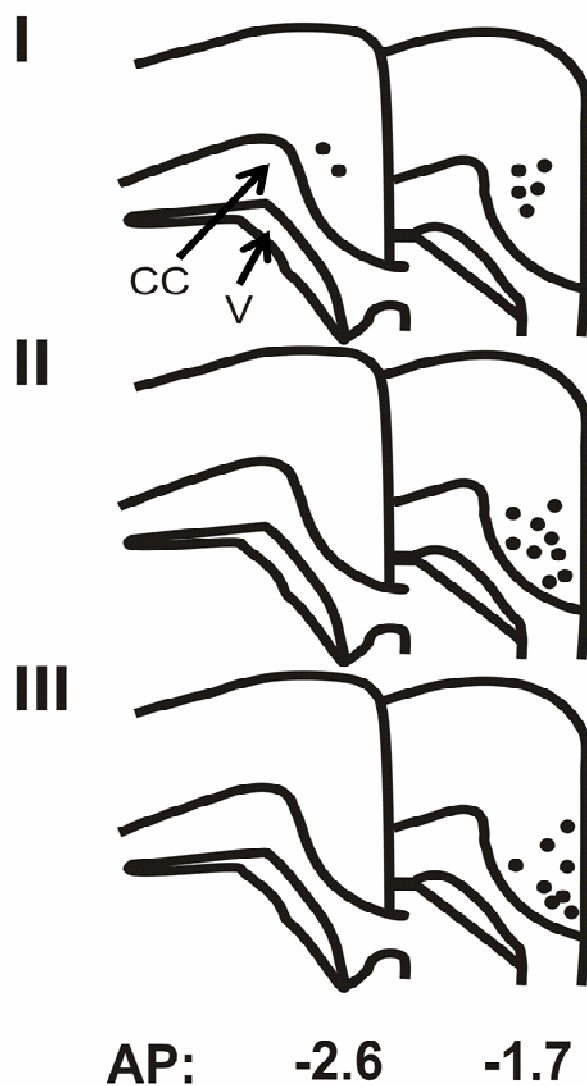


Figura 16 - Representação esquemática de secções do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções: I - Salina (NaCl 0,9%); II morfina (4,4 nmol); III naloxona (2,7 nmol) seguido de morfina (4,4 nmol). AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.

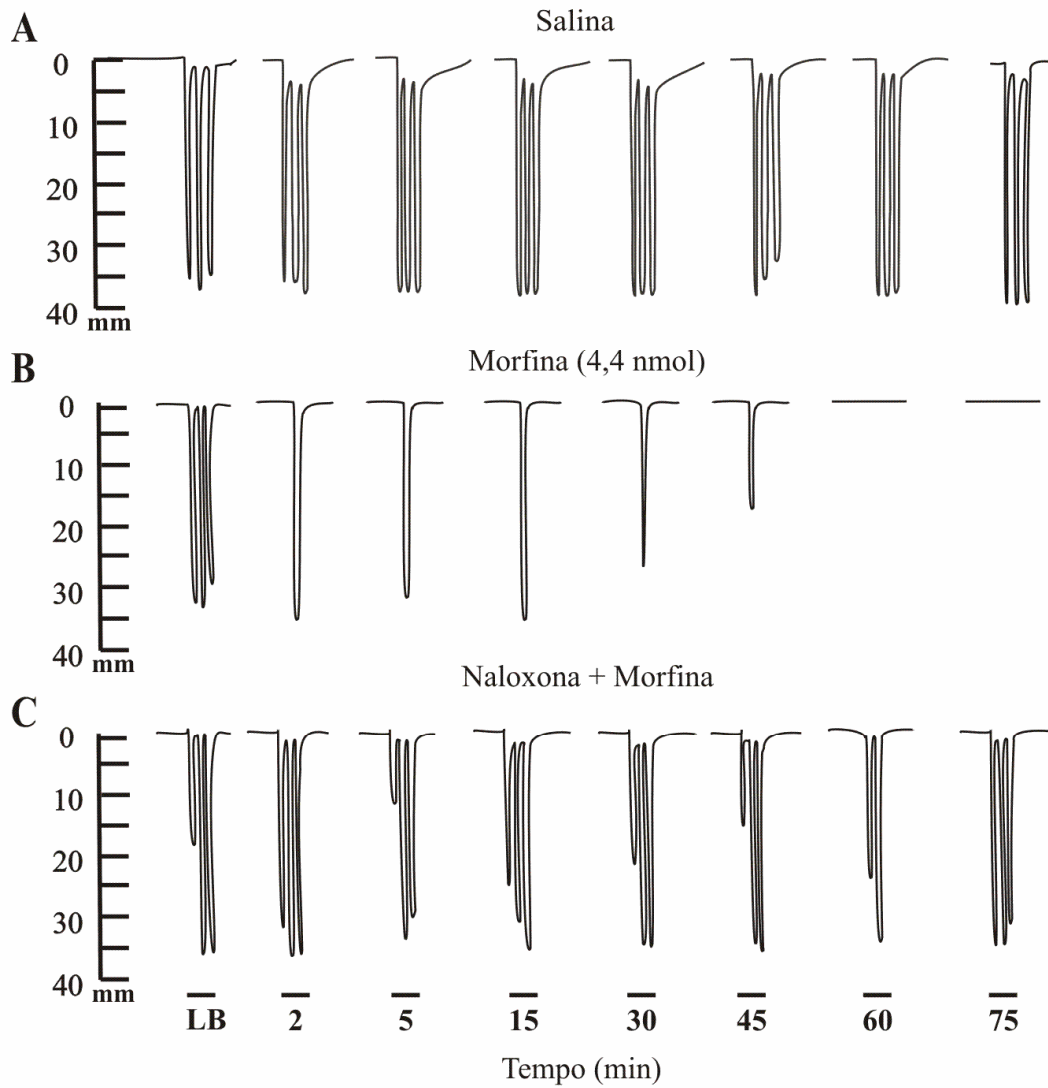


Figura 17 - Registro poligráfico da amplitude (mm) de vocalização de um animal representativo de cada grupo após a microinjeções no CCA de cobaias. (A) salina, (B) morfina (4,4 nmol), (C) naloxona (2,7 nmol) previamente à morfina (4,4 nmol). As barras horizontais indicam o período de aplicação do estímulo nocivo (3 seg) nos diferentes intervalos de tempo (minutos). A linha de base (LB) representa o registro de vocalização antes da microinjeção das drogas.

6.6. Experimento VI

- Efeito do agonista preferencial de receptores μ opióides, morfina e do seu antagonista, naloxona, microinjetados no CCA sobre o teste de formalina

Verificamos que a microinjeção de morfina no CCA das cobaias também promoveu um efeito antinociceptivo no teste da formalina. Conforme mostrado na figura 18, os animais que receberam esse tratamento apresentaram uma redução estatisticamente significativa do número de lambidas e/ou sacudidas da pata em que foi aplicada a formalina, utilizando o teste estatístico two way ANOVA para medidas repetidas ($F_{(198,22)} = 3,964$; $p < 0,001$). De acordo com o pós teste de DUNCAN esse efeito foi evidenciado nos intervalos de tempo, 0 – 5, 15 – 20, 20 – 25, 25 – 30, 30 – 35, 35 – 40, 40 – 45 minutos, quando comparados aos animais tratados com solução salina. Observamos ainda, assim como no teste algesimétrico de vocalização, que a microinjeção prévia do antagonista preferencial de receptores μ opióides, naloxona, foi capaz de prevenir o efeito antinociceptivo promovido pela morfina. Logo, a microinjeção de naloxona + morfina no CCA não alterou os comportamentos nociceptivos induzidos pela formalina, quando comparados ao grupo controle (Figura 18).

A figura 19 mostra uma representação esquemática do CCA, com os sítios das microinjeções dos grupos experimentais descritos nesta seção de resultados.

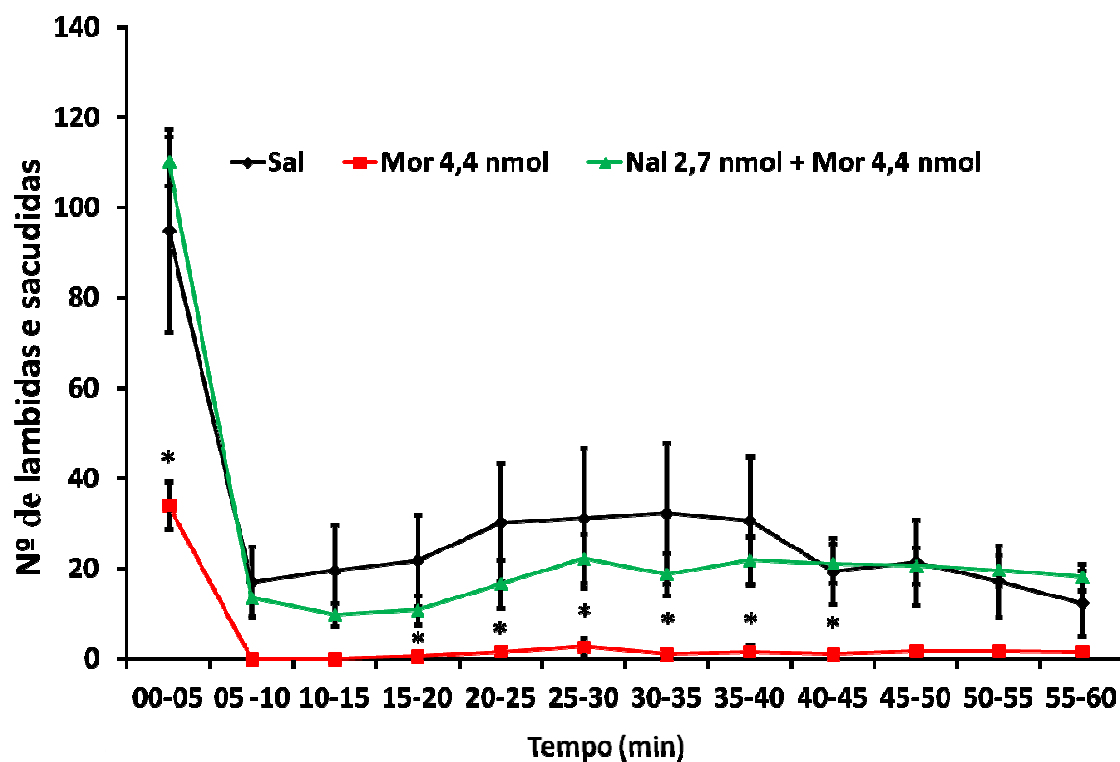


Figura 18 - Decurso temporal da média (\pm erro padrão da média) do número de lambidas e sacudidas emitidas pelas cobaias após injeção de formalina. Comparação de animais tratados com salina 0,9 % (Sal; n = 5), morfina (Mor 4,4 nmol; n=8) e naloxona 2,7 nmol previamente a 4,4 nmol de morfina (Nal + Mor; n=8) no CCA. As barras verticais representam o EPM. * representa $p < 0,05$ quando comparado com os grupos salina, morfina e naloxona + morfina.

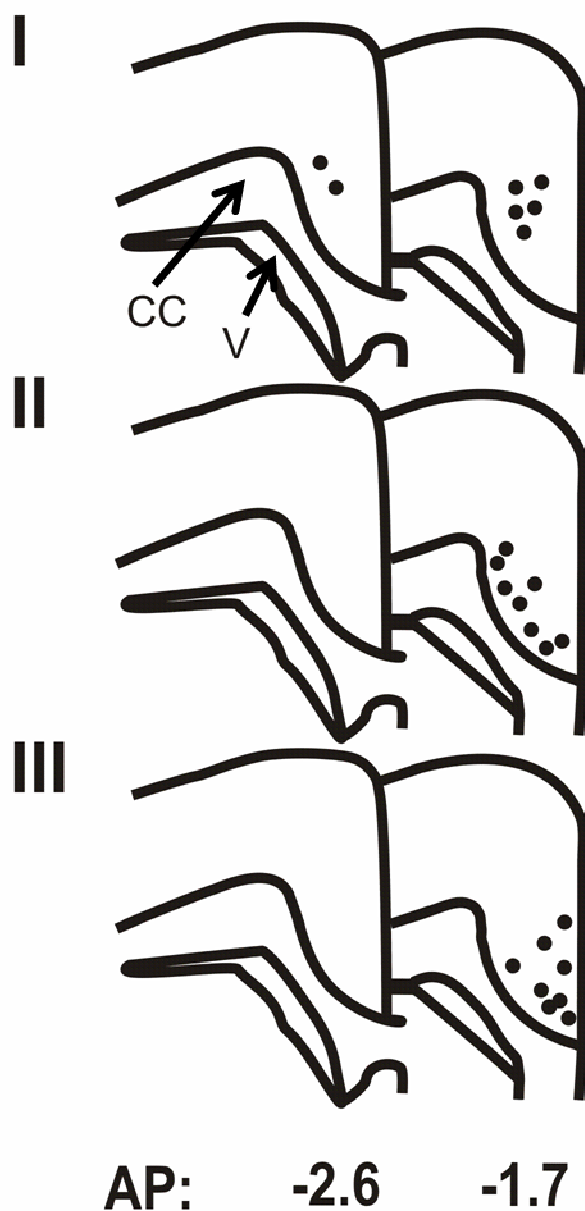


Figura 19 - Representação esquemática de secções do CCA de cobaias. Os círculos preenchidos (●) indicam os sítios das microinjeções: I - Salina (NaCl 0,9%); II morfina (4,4 nmol); III naloxona (2,7 nmol) seguido de morfina (4,4 nmol). AP = plano ântero – posterior; CC = corpo caloso; V = ventrículo lateral. Os esquemas foram modificados a partir do atlas de Rössner (1965), para cobaias.

7. Discussão

Nossos dados corroboram a idéia de que o CCA influencia respostas nociceptivas. Estudos com neuroimagem funcional em humanos e em animais de experimentação evidenciam um papel crítico no controle de sistemas motores vinculados a expressão das emoções, incluindo vocalização e dor, além de que, sua atividade está relacionada com o conteúdo negativo da emoção que acompanha a dor (Vogt e Vogt, 2009). O comportamento de vocalização embora seja considerado uma resposta de conteúdo emocional, pode expressar comportamentos de cunho hedonístico, como cópula, e/ou situações desagradáveis, como separação de filhotes da mãe e dor (Jürgens, 2009). Nesse sentido, não verificamos vocalizações espontâneas nos animais que receberam microinjeção de bicuculina (antagonistas GABA_A) no CCA, sendo este comportamento expresso somente durante a aplicação do estímulo nocivo periférico. Essa observação nos permite interpretar que esse tratamento tenha influenciado diretamente a expressão nociceptiva do animal. Nossos resultados também evidenciam algumas propriedades funcionais da neuroquímica intrínseca do CCA, envolvida na modulação de respostas nociceptivas. Com base em nossos dados e na literatura revisada, os sistemas de neurotransmissão GABAérgico, colinérgico e opioidérgico influenciam a elaboração de diferentes modalidades comportamentais nociceptivas neste substrato.

Verificamos que o bloqueio da atividade GABAérgica no CCA, por meio da administração de bicuculina, um antagonista específico de receptores GABA_A, exacerbou as respostas comportamentais nociceptivas de cobaias. Esse efeito

pronociceptivo foi evidenciado pelo aumento na amplitude das vocalizações induzidas por um estímulo nocivo periférico, bem como pelo número de lambidas e/ou sacudidas provocadas pela administração subcutânea de formalina na região dorsal da pata das cobaias. A alteração comportamental nociceptiva promovida pela administração de um antagonista GABAérgico, *per se*, sugere que nessa estrutura possa haver uma liberação tônica desse neurotransmissor, durante a aplicação de um estímulo nocivo periférico. Corroborando esses dados, registros eletrofisiológicos *in vitro* de células do CCA de ratos mostraram aumento da frequência, amplitude e comprimento dos potenciais de ação, após a administração de bicuculina, indicando a existência de um tônus GABAérgico nesse substrato (Higashi et al, 1991; Wang et al, 2005). O efeito pronociceptivo da bicuculina no CCA, pode ser compreendido, aceitando que o bloqueio da neurotransmissão GABAérgica inibitória facilitou os potenciais excitatórios pós-sinápticos, promovidos por estimulação nociva. Nessa perspectiva, evidências demonstram que durante a estimulação nociceptiva ocorre um aumento nos níveis extracelulares de glutamato no CCA, que eleva a atividade do substrato e exacerba a sensação dolorosa (Zhang et al, 2005; Xu et al, 2008).

A participação de interneurônios GABAérgicos no CCA tem sido avaliada com diferentes modelos algésimétricos (Wang et al, 2005; LaGraize e Fuchs, 2007), porém há poucos registros acerca da administração isolada de um antagonista GABAérgico modulando respostas nociceptivas (Jasmin et al, 2003). Nesse sentido, a microinjeção do agonista preferencial de receptores GABA_A, muscimol, no CCA de ratos não foi capaz de alterar as respostas nociceptivas no teste da formalina, nem a sensibilidade mecânica de ratos neuropáticos, testada com filamentos de *Von Frey* (LaGraize e Fuchs, 2007). Esses resultados estão de

acordo com nossas observações de que a microinjeção de diferentes doses de muscimol não foi capaz de influenciar a magnitude da resposta de vocalização desencadeada por um estímulo nocivo periférico, nem as respostas induzidas pela injeção de formalina na pata das cobaias. Em contrapartida, nos trabalhos referidos, o tratamento com muscimol no CCA reduziu a capacidade dos animais desenvolverem aversividade ao local onde recebiam estimulação nociva. Diante desses achados os autores concluíram que a estimulação GABAérgica do CCA é capaz de atenuar o componente afetivo da dor, sem alterar a capacidade do animal reconhecer o estímulo nocivo (Wang et al, 2005; LaGraize e Fuchs, 2007).

Nosso modelo algesimétrico de vocalização, embora esteja mais envolvido como a expressão do componente afetivo motivacional da dor em cobaias, também não apresentou nenhuma alteração na amplitude dos registros de vocalização nos grupos tratados com muscimol. Dados de outros modelos algesimétricos, foram comparados aos nossos, para analisarmos a função do substrato em diferentes condições. Dessa forma, atribuímos essas diferenças a questões metodológicas, que determinam os circuitos recrutados para modular adequadamente a melhor estratégia de comportamento, com base no contexto ambiental. Nesse sentido, testes que utilizam o paradigma de escape/esquiva induzido por estimulação nociva realizam sessões de condicionamento, com os estímulos geralmente não sendo aplicados durante a quantificação dos comportamentos (Farr et al, 2000). Nesse caso, não há aumento da neurotransmissão excitatória no CCA, desencadeada por estimulação nociva, que se oporia ao efeito inibitório promovido pela administração de agonistas GABAérgicos. Com isso, sugerimos que o nosso tratamento com muscimol não tenha sido capaz de subrepujar as descargas excitatórias no CCA, promovidas

pela aplicação de um estímulo nocivo de alta intensidade (choque elétrico), bem como pela ação da formalina.

Verificamos ainda que a exacerbação das respostas nociceptivas induzidas por bicuculina, nos dois testes algesimétricos, foi bloqueada pela administração prévia de muscimol. A partir dos mecanismos farmacológicos dessas drogas - nos quais os dois fármacos competem pelo mesmo sítio de ligação no receptor - sugerimos que o muscimol tenha ocupado o sítio de ligação dos receptores GABA_A e, reduzido o conteúdo de bicuculina ligada a esses receptores, bem como dado início a alguma resposta celular inibitória. Adicionalmente, o muscimol também é capaz de se ligar aos receptores GABA_C, o que não ocorre com a bicuculina. Sugerimos que o muscimol, em sinergismo com o *pool* endógeno de GABA, anulou o efeito promovido pela bicuculina, mas não foi capaz de impedir que os neurônios do CCA disparassem descargas excitatórias, tendo em vista que os animais responderam à estimulação nociceptiva. A validação desta hipótese requer a elucidação de mecanismos eletrofisiológicos e bioquímicos, com técnicas de alta acurácia, que não constitui o foco principal de nossas investigações no presente trabalho.

Outros estudos têm utilizado o teste da formalina, principalmente em ratos, para se investigar o papel do CCA na modulação de processos nociceptivos (Tjølsen et al, 1992). É interessante salientar que nesse teste existem algumas particularidades na expressão das respostas nociceptivas emitidas por cobaias, em relação aos ratos. Embora, ambas as espécies manifestem a dor, principalmente, por meio de lambidas e/ou sacudidas na pata, a quantidade desses comportamentos expressos ao longo do tempo variam entre elas. Ratos

apresentam duas fases bem definidas, relacionadas com diferentes aspectos da nocicepção, conforme descrito anteriormente. Observa-se na Figura 7 que imediatamente após a injeção de formalina as cobaias emitem uma grande quantidade de respostas nociceptivas, que reduzem significativamente após cinco minutos. Além disso, em termos qualitativos, observamos nesse período uma grande agitação do animal, que se manifestou por locomoção desorientada e cinesiológicamente alterada, saltos erráticos e alguns episódios de vocalização. Após os cinco primeiros minutos os animais tenderam a permanecer mais tempo num local, expressando numa frequência reduzida as respostas de lambidas e/ou sacudidas. A transição entre essas duas fases não é acompanhada por um período de remissão das respostas, conforme se observa em nos ratos.

A microinjeção de agonista colinérgico, carbacol, no CCA de cobaias atenuou o aspecto desagradável da dor, evidenciado pela redução na amplitude dos registros de vocalização induzida por um estímulo nocivo periférico. A neurotransmissão colinérgica no sistema nervoso central atua por meio da ativação de receptores nicotínicos e muscarínicos (ionotrópicos e metabotrópicos, respectivamente). A atividade colinérgica no CCA é mediada principalmente por neurônios de projeção subcortical, que ativados favorecem funções como aquisição e retenção de memória, bem como atuam na modulação nociceptiva (Farr et al, 2000). Antinocicepção produzida pelo tratamento com agentes colinérgicos têm sido descrita em alguns núcleos encefálicos (Menescal-de-Oliveira e Hoffmann, 1995; Guimarães e Prado, 1999; Harte et al, 2011). Ratos nos quais se microinjetou carbacol na substância cinzenta periaquedutal dorsal apresentaram um aumento no limiar de vocalizações induzidas por estimulação nociva, sendo esse efeito revertido pela microinjeção de antagonistas

colinérgicos, bem como pelo antagonista preferencial μ opióide, naloxona (Guimarães et al, 2000). Nesse contexto, a microinjeção de naloxona no núcleo central da amígdala e no hipocampo dorsal de cobaias submetidas ao mesmo modelo algesimétrico de vocalização utilizado nesse estudo, também foi capaz de bloquear a antinocicepção promovida por ação do carbacol nesses substratos. (Leite-Panissi et al, 2004; Favaroni Mendes e Menescal-de-Oliveira, 2008). Diante dessas evidências a antinocicepção promovida por estimulação colinérgica no CCA também pode ter sido dependente de sua interação com o sistema de transmissão opioidérgico.

Numa outra direção, ratos submetidos à desnervação do ciático reduziram o escore de autotomia, quando tratados com escopolamina (antagonista colinérgico) no CCA (Ortega-Legaspi et al, 2003). Os mecanismos celulares subjacentes a esse efeito se correlacionam positivamente com a expressão de RNAm e proteínas dos receptores M_1 e M_2 (Ortega-Legaspi et al, 2010). Adicionalmente, ratos submetidos ao teste de esQUIVA inibitória, numa plataforma contendo compartimentos, claro e escuro, aumentaram a latência de retenção de memória nociceptiva quando se microinjetou um agonista colinérgico, oxotremorine, no CCA (Malin et al, 2007). A metodologia desse trabalho consistiu na aplicação de choques nocivos e retenção do animal (15 segundos), quando este acessava o compartimento escuro da plataforma e, em seguida, administrava-se oxotremorine no CCA dos animais. Após 48 horas os animais eram novamente colocados na plataforma de teste, verificando-se que o grupo que recebeu esse tratamento evitou o acesso ao compartimento escuro. Esses dados sugerem que a neurotransmissão colinérgica no CCA está envolvida na consolidação de memória nociceptiva. Não devemos interpretar os resultados

expostos como paradoxais, tendo em vista os detalhes metodológicos entre os modelos expostos.

Confirmamos também que a antinocicepção promovida pela microinjeção de carbacol foi mediada, preferencialmente, por receptores muscarínicos. A Figura 9 ilustra o bloqueio deste efeito pela administração prévia do antagonista muscarínico, atropina. Ainda nesse sentido, verificamos que o efeito do carbacol evidenciou-se 15 minutos após a microinjeção, prolongando-se até 75 minutos. Essa característica temporal possui uma característica mais próxima com uma sinalização celular mediada por receptores metabotrópicos (Kandell et al, 2003). É possível que em situações nociceptivas agudas, como as apresentadas em nosso modelo, a neurotransmissão colinérgica no CCA atenua o desconforto oriundo da percepção de dor. Porém, sabe-se que a ligação do carbacol a receptores muscarínicos promove despolarizações na célula pós sináptica e, que a excitação de neurônios piramidais do CCA exacerba o desconforto motivado pela dor (Zhang e Séguéla, 2010). Diante destes achados, nossa hipótese é que a administração de carbacol no CCA tenha excitado preferencialmente interneurônios inibitórios, nas diferentes camadas, impedindo que os neurônios de projeção do substrato desencadeassem potenciais de ação. Embora haja registros eletrofisiológicos de interneurônios GABAérgicos no CCA de cobaias sendo ativados por estimulação colinérgica (McCormick e Prince, 1986), nossos resultados mostraram que a estimulação GABAérgica no CCA, *per se*, não foi capaz de reduzir as respostas nociceptivas nos testes de vocalização e da formalina.

A microinjeção de naloxona no CCA, previamente ao tratamento com carbacol, também reverteu a antinocicepção. Nesse caso, sugerimos que a sinalização colinérgica aumentou a disponibilidade de opióides endógenos no substrato, atenuando o componente afetivo-motivacional da dor, evidenciado pela redução na amplitude dos registros de vocalização induzida por estímulos nocivos periféricos. Não encontramos na literatura pesquisada nenhuma investigação propondo analisar essa interação no CCA em nível eletrofisiológico, bioquímico ou funcional. Porém, dados anatômicos acerca da distribuição de receptores opióides no CCA, bem como a eletrofisiologia da sinalização opioidérgica isolada forneceram consistência às nossas inferências (Tanaka e North, 1994; Palomero-Gallagher et al, 2008). Ainda no que se refere à possível interação entre esses sistemas, existe uma predominância de receptores muscarínicos em células pré sinápticas do CCA, bem como 60% dos seus neurônios opióides, nas camadas profundas, são interneurônios locais (Vogt e Vogt, 2009). Diante disso, cresce a probabilidade de que estimulação colinérgica no CCA tenha ativado interneurônios opióides locais.

Ainda nessa perspectiva, nosso trabalho também evidenciou a ação antinociceptiva da morfina, quando microinjetada no CCA. Esse efeito, além de mostrar o papel da neurotransmissão opióide nos modelos algesimétricos investigados, aparece como mais um indicativo de que a ação do carbacol no teste de vocalização foi mediada por opióides. Com base na literatura podemos inferir que nossos dados comportamentais são coerentes com os mecanismos subjacentes à sinalização opióide na circuitaria intrínseca do CCA. Em termos neuroanatômicos, esse substrato neural possui um grande número de neurônios opioidérgicos, distribuídos por todas as camadas corticais. Além disso, neurônios

nociceptivos tálamo-corticais, que liberam glutamato, possuem uma alta densidade de receptores μ em seu terminal axônico (Vogt et al, 1995). Funcionalmente, a organização desses receptores justifica a redução nos níveis extracelulares de glutamato no CCA, em ratos submetidos ao tratamento agudo com morfina por via sistêmica (Hao et al, 2005). Ainda no que se refere aos neurônios opióides do CCA, eles possuem uma morfologia bipolar ou multipolar, que os permite modular aferências, eferências e circuitos locais (Vogt et al, 1995). Diante disso, evidências de registros extracelulares multiunitários no CCA de ratos submetidos ao teste da placa quente, demonstraram que a administração sistêmica de morfina, além de aumentar a latência para emitir a resposta nociceptiva, foi capaz de reduzir a magnitude da resposta neural, a fração de neurônios responsivos e a duração (Wang et al, 2009).

Um trabalho realizado por LaGraize et al, 2006 demonstrou que a microinjeção de morfina no CCA promoveu um efeito antinociceptivo em ratos com neuropatia induzida pela ligadura do nervo que emerge de L₅. A interpretação desses resultados evidenciou que os animais tratados não evitavam e/ou esquivavam do compartimento em que recebiam estimulação mecânica nociva. Logo, a estimulação do sistema opióide no CCA diminui a capacidade do animal realizar a associação entre estimulação nociva e o contexto ambiental. Assim como no presente trabalho, a administração prévia de naloxona foi capaz de prevenir o efeito promovido pela morfina, o que confirma os referidos efeitos sendo mediados pela ativação dos receptores opióides (LaGraize et al, 2006).

Nossos resultados referentes ao teste da formalina também evidenciaram antinocicepção promovida pela microinjeção de morfina no CCA, sendo revertida

pela aplicação prévia de naloxona. Embora, o tratamento com carbacol não tenha apresentado efeito no teste da formalina, esse achado não invalida nossa hipótese acerca da interação entre esses sistemas. Conforme exibido nas figuras 9 e 15, a antinocicepção promovida pela morfina possui uma maior magnitude quando comparada ao carbacol. Para tanto, salientamos que a maior densidade de receptores opióides distribuídos nos diferentes tipos neuronais do CCA parece ter sido um fator importante na determinação dessas particularidades. Nesse sentido, inferimos que a estimulação com morfina exógena tenha hiperpolarizado não só o neurônio de projeção descendente, como também as aferências nociceptivas, que liberam principalmente colecistocinina e glutamato (Erel *et al*, 2004). Em contrapartida, o carbacol agiu eminentemente nos neurônios opióides locais do CCA, estimulando a liberação desses peptídeos produzidos endógenamente. Logo, essa manipulação farmacológica não se mostrou suficiente para conter as descargas excitatórias nociceptivas e, conseqüentemente, reduzir as respostas nociceptivas.

Verificamos ainda que a microinjeção isolada de um antagonista muscarínico, atropina, no CCA não foi capaz de modificar as respostas nociceptivas investigadas. Essa observação sugere que não há liberação tônica de acetilcolina, sendo este sistema recrutado em situações que impliquem mudanças no funcionamento da estrutura. Nesse sentido, o desenvolvimento de aversividade a um ambiente, determinado por estimulação nociva, parece ser dependente da neurotransmissão colinérgica no CCA (Malin *et al*, 2007). Porém, nosso protocolo experimental não envolveu sessões de pré-condicionamento, evitando que o animal pudesse realizar alguma associação ao contexto ambiental no qual foram aplicados os estímulos nocivos. Embora tenhamos utilizado testes

algosimétricos com propriedades funcionais distintas, nenhum deles representa um modelo de dor crônica. Essas características metodológicas também podem ter determinado a ausência do efeito da atropina, tendo em vista que a microinjeção de um antagonista colinérgico foi capaz de reduzir as respostas nociceptivas induzidos por um modelo de dor neuropática crônica em ratos (Ortega-Legaspi et al, 2003).

O teste da formalina em cobaias não apresentou sensibilidade para manifestar o efeito de agentes colinérgicos no CCA. Os comportamentos recuperativos de lambidas e/ou sacudidas não sofreram influência do tratamento com carbacol nem atropina. Nossos resultados com microinjeção de bicuculina, bem como trabalhos com estimulação elétrica e lesão do CCA, mostraram que este substrato neural pode estar envolvido na modulação das respostas comportamentais nociceptivas induzidas pela formalina (Fuchs et al, 1996). Conforme observamos, a segunda fase do teste apresenta uma resposta comportamental mais branda. Paralelamente, o efeito produzido pelo carbacol no teste de vocalização ocorreu 15 minutos após a microinjeção, o que coincide com o início da fase inflamatória do teste da formalina em ratos. Desse modo, não pudemos verificar o real efeito do carbacol na ativação direta dos nociceptores promovida pela administração subcutânea de formalina. Entretanto, esses resultados corroboram um estudo realizado por Kender et al, 2008, em que a microinjeção carbacol na área tegmentar ventral foi capaz de aumentar o limiar nociceptivo para as respostas de vocalização desencadeadas por um estímulo nocivo periférico, sem interferir nos reflexos motores espinhais.

O componente afetivo motivacional da dor se refere ao indivíduo interpretá-la como uma experiência emocional desagradável, motivada por estimulação de

alta intensidade e/ou memórias negativas (Vogt, 2009). Nesse âmbito, respostas imunes, endócrinas e neurais interagem bidirecionalmente, desencadeando reações de desbalanço autonômico e desconforto (Chapman et al, 2008). Entretanto, o desencadeamento dessas reações é dependente e indissociável da capacidade do indivíduo discriminar se um estímulo é nocivo. Diferentes submodalidades cognitivas estão contidas nesse componente, incluindo o desenvolvimento de aversividade (esquiva) a um contexto ambiental no qual se aplicou previamente estímulos nocivos, bem como a expressão de um comportamento com conteúdo emocional negativo durante a estimulação. Logo, diferentes protocolos experimentais elucidam uma parcela desse componente e, a interpretação dos resultados deve levar em consideração essas particularidades (LeBars, 2001).

A literatura tem destacado diferentes modelos algesimétricos para se investigar experimentalmente esse componente da dor (Johansen et al, 2001; Borszcz, 1995). Nosso modelo de vocalização deve ser compreendido como uma reação comportamental de conteúdo emocional, emitida numa situação de dor aguda, na qual o animal não pode escapar da fonte de estímulo. Em contrapartida, os estudos têm frequentemente demonstrado o papel do CCA na modulação de respostas nociceptivas antecipatórias, que visam a esquiva do perigo em potencial (Johansen e Fields, 2004; Wang et al, 2005). Um estudo desenvolvido em nosso laboratório evidenciou que a microinjeção de agonista de aminoácidos excitatórios (DLH) no CCA de cobaias diminuiu a duração dos episódios do comportamento defensivo de imobilidade tônica (Coutinho e Menescal-de-Oliveira, 2010). Esse comportamento é emitido por algumas espécies, quando não existe mais a possibilidade de evitar o contato com o

predador e, quando emitido, pode ativar o sistema de analgesia endógena (Leite-Panissi et al, 2000). Desse modo o CCA parece também influenciar a estratégia comportamental no momento da situação aversiva. Podemos fazer um paralelo com esses dados para compreender a circuitaria neuroquímica envolvida no nosso modelo de vocalização. A condição em que o animal recebe a estimulação nociva limita seu repertório comportamental e o impossibilita de esquivar-se da fonte de estímulo. Nesse sentido, se extrapolarmos para uma situação na natureza, descargas excitatórias no CCA promovidas pela estimulação nociva, desencadearia as vocalizações, como uma reação inata de dor, que possivelmente alerta coespecíficos sobre um ataque predatório (Jürgens, 2009).

Nossos resultados reforçaram o papel funcional do CCA na modulação de processos nociceptivos com natureza distinta. A compreensão mais sensível do funcionamento dessa estrutura numa situação real requer a correlação dos dados experimentais, com os achados clínicos e epidemiológicos. No âmbito da pesquisa experimental, nota-se uma carência de trabalhos que realizem simultaneamente análises bioquímicas, eletrofisiológicas e comportamentais, para um mesmo modelo algesimétrico. Estudos com esse delineamento experimental permitem avaliar os mecanismos celulares e moleculares, subjacentes à estratégia comportamental emitida, fornecendo maiores subsídios às inferências.

Por meio dos modelos algesimétricos empregados no presente trabalho foi evidenciado que os sistemas de neurotransmissão do CCA interagem entre si, sendo o resultado final do funcionamento deste circuito, a elaboração e expressão de um comportamento coerente com o contexto ambiental e as necessidades internas do organismo (Devinsky et al, 1995). O sistema GABAérgico parece modular o substrato em condições fisiológicas e, mesmo com administração do

seu agonista, não foi capaz de alterar as reações comportamentais secundárias ao estresse nociceptivo agudo. Porém, a inibição desse sistema exacerba as respostas nociceptivas investigadas, possivelmente, devido à facilitação de descargas excitatórias no CCA. Além disso, a estimulação colinérgica do CCA reduziu a resposta nociceptiva de vocalização, sem interferir nos comportamentos induzidos pela formalina. Sugerimos que esse efeito tenha sido mediado pela ativação do sistema de opióides endógenos, tendo em vista a eficácia do naloxona em bloqueá-lo. A estimulação opióide neste substrato, com microinjeção de morfina, promove antinocicepção nos dois modelos algosimétricos investigados, sugerindo que sua ativação seja importante para mediar analgesia em situações de dor aguda e/ou tônica.

8. Conclusões

Evidenciamos que os padrões de comportamento se diferenciaram em função do tipo de estímulo nocivo aplicado (químico ou elétrico). Observamos também que os diferentes sistemas de neurotransmissão atuam em cada submodalidade da percepção de dor de maneira particular. Desse modo, verificamos que o bloqueio do tônus GABAérgico, com microinjeção de bicuculina no CCA, produziu pronocicepção evidenciada pelo aumento da expressão de dor nos dois modelos algésimétricos utilizados. Além disso, a administração exógena de muscimol não foi capaz de alterar as respostas nociceptivas avaliadas.

No que se refere ao envolvimento do sistema colinérgico, a microinjeção de carbacol no CCA promoveu uma redução na amplitude dos registros de vocalização induzida por estimulação nociva, sem alterar as respostas nociceptivas induzidas por formalina. O efeito antinociceptivo do carbacol sobre a resposta nociceptiva de vocalização foi bloqueado pela microinjeção prévia de atropina. A microinjeção do antagonista preferencial μ -opióide, naloxona, também bloqueou o efeito promovido pelo carbacol no mesmo teste algésimétrico, evidenciando que esta antinocicepção pode ter sido mediada pelo sistema de opióides endógenos no CCA.

Demonstramos ainda que a microinjeção de morfina no CCA foi capaz de promover antinocicepção nos dois modelos algésimétricos estudados, sendo esse efeito revertido pela administração prévia de naloxona. Assim, a neurotransmissão opióide no CCA possui propriedades analgésicas contundentes, que podem ser exploradas posteriormente com outras abordagens experimentais.

9. Referências Bibliográficas

Ballantine, Jr., H. T., Cassidy, W. L., Flanagan, N. B., Marino Jr., R. (1967) Stereotaxic anterior cingulotomy for neuropsychiatric illness and intractable pain. *J. Neurosurg.* 26, 488 – 495.

Borszcz, G. S. (1995). Increases in vocalization and motor reflex thresholds are influenced by the site of morphine microinjection: comparisons following administration into the periaqueductal gray, ventral medulla, and spinal subarachnoid space. *behav neurosci.* 109(3): 502-522.

Bozkurt, A., Zilles, K., Schleicher, A., Kamper, L., Arigita, E. S., Uylings, H. B. (2005). Distributions of transmitter receptors in the macaque cingulate cortex. *Neuroimage.* 25(1): 219-229.

Calejesan, A. A., Kim, S.J., Zhuo, M. (2000). Descending facilitatory modulation of a behavioral nociceptive response by stimulation in the adult rat anterior cingulate cortex. *Eur J Pain* 4(1): 83-96.

Chapman, C. R., Tuckett, R. P., Song, C. W. (2008). Pain and stress in a systems perspective: reciprocal neural, endocrine, and immune interactions. *J Pain.* 9(2): 122 - 145.

Comitê de taxonomia da International Association for the Study of Pain – IASP. In: Merskey, H., Bogduk N. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. *Classification of Chronic Pain.* (1994) IASP Press, Seattle 2ª Edition. p. 209 – 214.

Coutinho, M. R., Menescal de Oliveira, L. (2010). Role of homocysteic acid in the guinea pig (*Cavia porcellus*) anterior cingulate cortex in tonic immobility and the influence of NMDA receptors on the dorsal PAG. *Behav Brain Res.* 208(1): 237 – 242.

Dubuisson, D., Dennis, S.G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 4(2): 161 – 174.

Devinsky, O., Morrell, M. J., Vogt, B. A. (1995). Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain* 118 (Pt 1) 279-306.

Erel, U., Arborelius, L., Brodin, E. (2004). Increased cholecystokinin release in the rat anterior cingulate cortex during carrageenan-induced arthritis. *Brain Res.* 1022(1 – 2): (39-46).

Farr, S. A., Uezu, K., Creonte, T. A., Flood, J. F., Morley, J. E. (2000). Modulation of Memory Processing in the Cingulate Cortex of Mice. *Pharmacol Biochem and Behav.* 65(3): 363 – 368.

Favaroni-Mendes LA, Menescal-de-Oliveira L. (2008). Role of cholinergic, opioidergic and GABAergic neurotransmission of the dorsal hippocampus in the modulation of nociception in guinea pigs. *Life Sci.* 83(19-20): 644-50.

Fuchs, P. N., Balinsky, M., Melzack, R. (1996) Electrical stimulation of the cingulum bundle and surrounding cortical tissue reduces formalin-test pain in the rat. *Brain Res.* 743: 116–123

Gaykema, R.P., Luiten, P.G., Nyakas, C., Traber, J. (1990) Cortical projection patterns of the medial septum–diagonal band complex. *J Comp Neurol.* 293: 103–24.

Guimarães, A. P. C., Guimarães, F. S., Prado, W. A. (2000). Modulation of carbachol-induced antinociception from the rat periaqueductal Gray. *Brain Res Bull,* 51(6): 471 – 478.

Guimarães, A. P. C., Prado, W. A. (1999). Pharmacological evidence for a periaqueductal gray–nucleus raphe magnus connection mediating the antinociception induced by microinjecting carbachol into the dorsal periaqueductal gray of rats. *Brain Res.* 827: 152 – 159.

Hao, Y., Yang, J. Y., Guo, M., Wu, C. F., Wu, M. F. (2005). Morphine decreases extracellular levels of glutamate in the anterior cingulate cortex: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res.* 1040: 191 – 196.

Harte, S. E., Hoot, M. R., Borszcz, G. S. (2004). Involvement of the intralaminar parafascicular nucleus in muscarinic-induced antinociception in rats. *Brain Res.* 1019: 152 – 161.

Harte, S. E., Spuz, C. A., Borszcz, G. S. (2011). Functional interaction between medial thalamus and rostral anterior cingulate cortex in the suppression of pain affect. *Neuroscience.* 172: 460 – 473.

Hathway, G. J., Fitzgerald, M. F. The Development of Nociceptive Systems. In: Basbaum, A. I., Bushnell, M. C. *Science of pain.* Elsevier, (2009). p. 133 – 141.

Heinricher, M. M., Ingram, S. L. Evolutionary Aspects of Pain. In: Basbaum, A. I., Bushnell, M. C. *Science of pain.* Elsevier, (2009b). p. 593 – 626.

- Herz, A. (1997). Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology*. 129: 99 – 111.
- Higashi, H., Tanaka, E., Nishi, S. (1991). Synaptic Responses of Guinea Pig Cingulate Cortical Neurons In Vitro. *J Neurophysiol*. 65 (4): 822 – 833.
- Jasmin, L., Rabkin, S. D., Granato, A., Boudah, A., Ohara, P. T. (2003). Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature*. 424(17): 316 – 320.
- Johansen, J. P., Fields, H.L., Manning, B. H. (2001). The affective component of pain in rodents: direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(14): 8077-8082.
- Johansen, J. P., Fields, H.L. (2004). Glutamatergic activation of anterior cingulate cortex produces an aversive teaching signal. *Nat Neurosci*. 7(4): 398 – 403.
- Jürgens, U. (1998). Neuronal Control of Mammalian Vocalization, with Special Reference to the Squirrel Monkey. *Naturwissenschaften*. 85: 376 – 388.
- Jürgens, U. (2009). The Neural Control of Vocalization in Mammals: A Review. *J Voice*. 23(1): 01 – 10.
- Kender, R. G., Harte, S. E., Munn, E. M., Borszcz, G. S. (2008). Affective Analgesia following Muscarinic Activation of the Ventral Tegmental Area in Rats. *J Pain*. 2008 July ; 9(7): 597–605.
- LaGraize, S. C., Borzan, J., Peng, Y. B., Fuchs, P. N. (2006). Selective regulation of pain affect following activation of the opioid anterior cingulate cortex system. *Exp Neurol*. 197: 22 – 30.
- LaGraize, S. C., Fuchs, P. N. (2007). GABA_A but not GABA_B Receptors in the Rostral Anterior Cingulate Cortex Selectively Modulate Pain-Induced Escape/Avoidance Behavior. *Exp Neurol*. 204(1): 182 – 194.
- Lee, D. E., Kim, S. J., Zhuo M. (1999). Comparison of behavioral responses to noxious cold and heat in mice. *Brain Res*. 845: 117–121.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. W. (2001). Animals Models of Nociception. *Pharmacol Rev*. 53(4): 597–652.
- Leite-Panissi CR, Brentegani MR, Menescal-de-Oliveira L. (2004). Cholinergic-opioidergic interaction in the central amygdala induces antinociception in the guinea pig. *Braz J Med Biol Res*. 37(10): 1571-9.
- Leite-Panissi, C.R., Rodrigues, C.L., Brentegani, M. R., Menescal-de-Oliveira, L. (2000). Endogenous opiate analgesia induced by tonic immobility in guinea pigs. *Braz J Med Biol Res*. 34 (2): 245-250

- Lico, M. C., Hoffmann, A., Covian, M. R. (1974). Influence of some limbic structures upon somatic and autonomic manifestations of pain. *J. Neurobiol.* 12: 805-811.
- Malin, E. L., Ibrahim, D. Y., Tu, J. W., McGaugh, J. L. (2007). Involvement of the Rostral Anterior Cingulate Cortex in Consolidation of Inhibitory Avoidance Memory: Interaction with the Basolateral Amygdala. *Neurobiol Learn Mem.* 87(2): 295 – 302.
- McCormick, D. A., Prince, D. A. (1986). Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex *in vitro*. *J. Physiol.* 375: 169-194.
- Menescal de Oliveira, L., Lico, M. C. (1977). Pain modulation in the adrenergically stimulated area postrema in the alert guinea pig. *Physiol. Behav.* 19 (3): 359-364.
- Menescal de Oliveira, L., Lico, M. C. (1982). Pain reaction after topical NA and lesions of the obex region in the alert guinea pig. *Physiol Behav.* 28(3): 413 - 6.
- Menescal de Oliveira, L., Hoffmann, A. (1993). The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. *Behav Brain Res.* 56(2): 127 - 32.
- Menescal de Oliveira, L., Hoffmann, A. (1995). Temporal Modulation of Antinociception by Reciprocal Connections Between the Dorsomedial Medulla and Parabrachial Region. *Brain Res Bull.* 37(5): 467 – 474.
- Millan, M. (2002). Descending control of pain. *Progress Neurobiol.* 66: 355-474.
- Ortega - Legaspi, J. M., Avila, A. L., Coffeen, U., Angel, R., Pellicer, F. (2003). Scopolamine into the anterior cingulate cortex diminishes nociception in a neuropathic pain model in the rat: an interruption of “nociception-related memory acquisition”? *Eur J Pain.* 7: 425 – 429.
- Ortega-Legaspi, J. M., León-Olea, M., de Gortari, P., Amaya, M. I., Coffeen, U., Simón-Arceo, K., Pellicer, F. (2010). Expression of muscarinic M1 and M2 receptors in the anterior cingulate cortex associated with neuropathic pain. *Eur J Pain.* 14(9): 901-10.
- Palomero-Gallagher, N., Mohlberg, H., Zilles, K., Vogt, B. A. (2008). Cytology and Receptor Architecture of Human Anterior Cingulate Cortex. *The J. Comp. Neurol.*, 508(6): 906–926.
- Pastoriza, L. N., Morrow, T. J., Casey, K. L. (1996). Medial frontal cortex lesions selectively attenuate the hot plate response: possible nocifensive apraxia in the rat. *Pain* 64(1): 11-17.
- Rössner, W. (1965). *Stereotaktischen hirntees vom meerchweinchen*. Palla Velag, Munich.

Siegelbaum, S. A., Schwartz, J. H., Kandel, E. R. Modulação da transmissão sináptica: Segundos Mensageiros. In: Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M. Princípios da neurociência. Manole (2004). p. 229 – 251.

Sikes, R. W., Vogt, B. A. (1992). Nociceptive neurons in area 24 of rabbit cingulate cortex. *J. Neurophysiol.* 68: 1720–1731.

Tanaka, E., North, R. A. (1994). Opioid Actions on Rat Anterior Cingulate Cortex Neurons in vitro. *The J Neurosci.* 14(3): 1106 – 1113.

Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland J. H., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 51: 5 – 17.

Vogt, B. A., Willey, R. G., Jensen, E. L. (1995). Localization of μ and Delta opioid receptor to anterior cingulate afferents and projection neurons and input/output model of μ regulation. *Exp Neurol.* 135: 83-92.

Vogt, B. A., Vogt, L., Farber, N, B. Cingulate Cortex and Disease Models. In: Paxinos, G. The rat nervous system. Elsevier. (2004). p. 705 – 727.

Vogt, B. A. Regions and Subregions of the Cingulate Cortex. In: Vogt, B. A. Cingulate neurobiology and disease. Oxford. (2009). p. 5 – 26.

Vogt, B. A., Vogt, L. J. μ -opioid Receptor, Placebo Map, Descending Systems, and Cingulate – Mediated Control of Vocalization and Pain. In: Vogt, B. A. Cingulate neurobiology and disease. Oxford. (2009). p. 339 – 379.

Walters, E. T., (1994). Injury-related behavior and neuronal plasticity: An evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia, and analgesia. *Int Rev Neurobiol.* 36: 325-427.

Walters, E. T., (2009a). Chronic Pain, Memory, and Injury: Evolutionary Clues from Snail and Rat Nociceptors. *Int J Comp Psychol.* 22: 127-140

Walters, E. T. Evolutionary Aspects of Pain. In: Basbaum, A. I., Bushnell, M. C. Science of pain. Elsevier, (2009b). p. 175 – 182.

Wang, H., Ren, W. H., Zhang, Y. Q., Zhao, Z. Q. (2005). GABAergic disinhibition facilitates polysynaptic excitatory transmission in rat anterior cingulate cortex. *Biochem Biophys Res Commun.* 338: 1634 – 1639.

Wang, J. Y., Huang, J., Chang, J. Y., Woodward, D. J., Luo, F. (2009). Morphine modulation of pain processing in medial and lateral pain pathways. *Mol Pain.* 5 (60): 1-14.

Wheeler-Aceto, H., Cowan, A. (1991). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology*. 104(1): 35-44.

Xie, Y. F., Huo, F. Q., Tang, J. S. (2009). Cerebral cortex modulation of pain. *Acta Pharmacol Sin*. 30(1): 31 – 41.

Xu, H., Wu, L. J., Wang, H., Zhang, X., Vadakkan, K. I., Kim, S. S., Steenland, H. W., Zhuo, M. (2008) Presynaptic and postsynaptic amplifications of neuropathic pain in the anterior cingulate cortex. *J Neurosci*. 28(29): 7445 – 7453.

Yaksh, T. L., Dirksen, R., Harty, G. J. (1985). Antinociceptive Effects of Intrathecally Injected Cholinomimetic Drugs in the Rat and Cat. *Eur J Pharmacol*. 117: 81 – 88.

Yi, M., Zhang, H., Lao, L., Xing, G. G., Wan, Y. (2011) Anterior cingulate cortex is crucial for contra - but not ipsi-lateral electro-acupuncture in the formalin - induced inflammatory pain model of rats. *Mol Pain*. 7(61): 01 – 07.

Zhang, Z., Séguéla, P. (2010). Metabotropic induction of persistent activity in layers II/III of anterior cingulate cortex. *Cereb Cortex*. 20(12): 2948-57.

Zhang, L., Zhang, Y., Zhao, Z. Q. (2005). Anterior cingulate cortex contributes to the descending facilitatory modulation of pain via dorsal reticular nucleus. *Eur J Neurosci*. 22: 1141 – 1148.

Zubieta, J. K., Ketter, T. A., Bueller, J. A., Xu, Y., Kilbourn, M. R., Young, E. A., Koeppe, R. A. (2003). Regulation of human affective responses by anterior cingulate and limbic mu-opioid neurotransmission. *Arch Gen Psychiatry*. 60(11): 1145 - 53.

10. Apêndice

10.1 – Tabelas

Tabela I. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de salina (NaCL 0,9% / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	0	0,5	0,6	0,6	-0,3	0	0,5
2	0	0	0	0,1	-0,1	-0,3	0	0
3	0	-0,3	-0,4	-0,3	-0,7	-0,4	-0,3	-0,4
4	0	0	0,6	0,5	-0,5	0,1	0	0,6
5	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0	0,1
6	0	0	0	0	0,1	-0,1	0	0
7	0	-0,1	0	0	0	-0,3	-0,1	0
Média	0,00	-0,06	0,11	0,14	-0,07	-0,17	-0,06	0,11
DPM	0,00	0,11	0,34	0,31	0,43	0,21	0,11	0,34
EPM	0,00	0,04	0,13	0,12	0,16	0,08	0,04	0,13

Tabela II. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0,00	0,56	0,81	1,20	0,77	0,35	-0,15	-0,23
2	0,00	2,18	1,80	2,58	0,71	0,96	-0,56	-0,92
3	0,00	0,72	0,06	1,07	0,85	0,55	0,55	0,42
4	0,00	3,20	0,89	3,96	1,28	2,78	0,94	0,83
5	0,00	0,66	1,12	0,96	0,82	0,03	-0,50	-0,42
6	0,00	1,35	1,35	0,69	1,69	2,14	2,14	2,14
7	0,00	0,21	0,08	-0,26	-0,63	-1,00	-1,00	-1
8	0,00	3,37	2,21	4,14	5,43	3,85	2,97	0,34
Média	0,00	1,53	1,04	1,79	1,37	1,21	0,55	0,15
DPM	0	1,23	0,75	1,59	1,77	1,59	1,40	1,03
EPM	0	0,43	0,26	0,56	0,62	0,56	0,49	0,36

Tabela III. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de muscimol (1 nmol / 0,2 µl), seguido de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	-0,04	-0,3	-0,07	0,38	0,23	0,64	0,04
2	0	-0,13	0,1	-0,26	-0,27	-0,22	0,14	0,11
3	0	0,21	-0,21	0,02	0,33	-0,21	0,046	-0,3
4	0	0,06	0,01	0,07	-0,12	-0,13	-0,13	0,14
5	0	-0,12	0,06	-0,13	-0,11	-0,11	-0,1	0,22
6	0	0,008	-0,14	0,2	0,04	-0,14	-0,03	0,01
7	0	0,25	0,1	0,28	0,31	0,31	0,08	0,32
8	0	-0,01	-0,003	-0,13	0,07	0,45	0,03	-0,003
Média	0	0,02	-0,047	-0,002	0,078	0,0225	0,084	0,067
DPM	0	0,13	0,150	0,181	0,240	0,264	0,241	0,184
EPM	0	0,04	0,053	0,06	0,085	0,093	0,085	0,065

Tabela IV. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de muscimol (0,5 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0,00	0,00	-0,88	-1,00	-1,00	-1,00	-1	-0,01
2	0,00	-0,26	-0,62	-0,94	-1,00	-0,84	-0,96	0,03
3	0,00	0,02	-0,06	-0,72	-1,00	-0,72	-0,79	0
4	0,00	-0,36	-0,70	-0,02	-0,04	0,02	0,10	0,24
5	0,00	0,16	0,07	0,09	0,45	0,09	0,06	-0,11
6	0,00	-0,02	-0,24	-0,12	-0,13	-0,29	-0,96	-0,23
7	0,00	1,14	1,14	1,27	0,57	1,23	0,49	0,035
8	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	-0,22	-0,42
Média	0,0	0,1	-0,2	-0,2	-0,3	-0,2	-0,4	-0,1
DPM	0,0	0,5	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6	0,2
EPM	0,0	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,1

Tabela V. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de muscimol (1 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Animais	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	0,10	-0,08	-0,35	-0,13	-0,28	-0,81	-1,00
2	0	0,13	0,65	-0,66	-0,58	-0,21	-0,33	0,00
3	0	0,04	-0,57	-0,84	-1,00	-0,62	-0,75	0,25
4	0	-0,09	0,29	0,50	-0,35	-0,03	-0,35	-0,03
5	0	-0,57	-0,18	-0,52	0,06	-0,004	-0,13	-0,28
6	0	-0,71	-0,72	-0,22	0,16	-0,11	-0,39	-0,2
7	0	-0,22	-0,43	-0,27	-0,34	-0,5	-0,62	-0,55
8	0	0,4	0,27	0,19	0,1	0,28	0,1	0,05
Média	0,0	-0,1	-0,1	-0,3	-0,3	-0,2	-0,4	-0,2
DPM	0,0	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2
EPM	0,0	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabela VI. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de muscimol (2 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	-0,15	-0,41	0,11	-0,25	-0,13	-1	-0,3
2	0	-0,06	-0,04	-0,007	-0,41	-0,04	-0,51	-0,19
3	0	-1	0,21	0,33	-0,03	0,27	-0,17	0,1
4	0	0,35	0,25	0,21	0,21	-0,8	-0,16	-0,75
5	0	-0,1	-0,2	-1	-1	-1	-1	-1
6	0	0,05	-0,21	-0,01	-0,01	-0,22	-0,24	-0,52
Média	0	-0,15	-0,07	-0,06	-0,25	-0,32	-0,51	-0,44
DPM	0	0,45	0,26	0,48	0,43	0,48	0,40	0,40
EPM	0	0,18	0,11	0,20	0,17	0,20	0,16	0,16

Tabela VII. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de carbacol (2,7 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	0,6	-1	-1	-1	-0,67	-0,62	-0,93
2	0	-0,09	-0,25	-0,72	-0,43	-0,13	-0,01	-0,35
3	0	-0,63	-0,1	-0,61	-0,26	-1	-0,69	-0,84
4	0	1,5	-0,01	-0,02	-0,33	-0,33	-0,4	-0,3
5	0	0,8	0,77	0,03	-1	-0,74	-0,65	-0,69
6	0	-0,34	-0,34	-0,29	-0,26	-0,28	-0,4	-0,19
7	0	-0,03	0	-0,34	-0,01	0,33	0,33	0
8	0	-0,37	-0,23	-0,55	-0,35	-0,56	-0,86	-0,43
Média	0	0,18	-0,14	-0,43	-0,45	-0,42	-0,41	-0,46
DPM	0	0,72	0,49	0,35	0,36	0,41	0,39	0,33
EPM	0	0,25	0,17	0,12	0,12	0,14	0,13	0,11

Tabela VIII. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de atropina (0,7 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	0,08	0,32	0,17	0,36	0,33	0,10	-0,10
2	0	-0,15	-0,11	-0,01	-0,24	-0,27	-0,24	-0,36
3	0	0,23	-0,04	-0,63	0,10	-0,17	-0,35	0,06
4	0	0,18	-0,50	0,00	0,04	0,26	0,17	0,00
5	0	-0,42	0,29	0,21	0,71	0,75	0,52	0,65
6	0	-0,001	0,28	0,36	0,01	0,01	0,01	0,01
7	0	-0,15	-0,07	0,08	-0,37	-0,23	-0,3	-0,31
Média	0,0	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
DPM	0,0	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4
EPM	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0

Tabela IX. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de atropina (0,7 nmol / 0,2 µl), seguido de carbacol (2,7 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	-0,027	0,02	0,3	0,12	0,07	0,23	0,05
2	0	-0,036	-0,027	-0,027	-0,027	-0,027	-0,027	-0,01
3	0	-0,07	-0,07	-0,001	0,17	0,26	0,08	0,1
4	0	0,021	0,22	-0,027	-0,027	-0,027	-0,027	-0,1
5	0	-0,005	-0,01	-0,02	-0,005	0,004	0,16	0,16
6	0	-0,32	-0,44	-0,16	-0,32	-0,06	-0,04	-0,31
7	0	-0,07	0,03	0,25	-0,1	-0,1	-0,1	-0,05
8	0	-0,12	0,17	0,14	0,18	-0,09	-0,08	-0,07
9	0	-0,02	0,2	-0,02	-0,03	0,16	-0,01	0,2
Média	0	-0,071	0,010	0,048	-0,004	0,021	0,020	-0,003
DPM	0	-0,071	0,010	0,048	-0,004	0,021	0,020	-0,003
EPM	0	-0,023	0,003	0,016	-0,001	0,007	0,006	-0,001

Tabela X. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de naloxona (2,7 nmol / 0,2 µl), seguido de carbacol (2,7 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	-0,08	0,14	-0,12	0,15	-0,08	0,13	-0,08
2	0	-0,01	-0,07	-0,007	-0,01	-0,02	0,09	-0,09
3	0	-0,002	0,14	-0,02	0,05	-0,02	-0,02	-0,24
4	0	0,005	-0,002	-0,002	-0,01	0,24	0,24	0,13
5	0	-0,03	0,01	0,19	0,01	-0,06	0	-0,003
6	0	-0,005	0,032	-0,005	-0,005	-0,05	-0,04	-0,03
7	0	0,043	0,043	0,06	0,06	0,06	0,05	-0,01
8	0	0	0,09	0	-0,01	-0,02	-0,03	-0,03
Média	0	-0,009	0,047	0,012	0,029	0,006	0,052	-0,043
DPM	0	0,034	0,072	0,087	0,056	0,103	0,097	0,103
EPM	0	0,012	0,025	0,030	0,019	0,036	0,034	0,036

Tabela XI. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de morfina (4,4 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	-1	-1	-1	-0,71	0,25	-1	-0,56
2	0	0,4	-0,42	-1	-0,78	-0,93	-0,55	-0,85
3	0	-0,6	-0,22	-0,27	-0,6	-0,86	-0,6	-0,2
4	0	-1	-1	-1	-1	-0,78	-1	-1
5	0	-0,96	-0,77	-0,57	-0,38	-0,38	-0,15	-0,67
6	0	-0,6	-0,61	-0,62	-0,66	-0,78	-1	-1
7	0	-0,39	-0,57	-0,29	-1	-0,6	-1	-1
8	0	0,022	-0,89	-0,73	-0,66	-1	-1	-0,66
9	0	-0,35	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Média	0	-0,49	-0,72	-0,72	-0,75	-0,67	-0,81	-0,77
DPM	0	0,48	0,28	0,30	0,21	0,40	0,30	0,27
EPM	0	0,16	0,09	0,10	0,07	0,13	0,10	0,09

Tabela XII. Valores individuais do índice de vocalização durante a aplicação do estímulo nocivo periférico, nos diferentes tempos (minutos) após a microinjeção de naloxona (2,7 nmol / 0,2 µl), seguido de morfina (4,4 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	LB	2	5	15	30	45	60	75
1	0	0,03	0,06	0,07	0,06	0,07	0,07	0,08
2	0	-0,16	-0,28	-0,1	0,17	0,13	0,11	0,18
3	0	0,1	0,02	0,06	-0,23	0,04	0,04	-0,24
4	0	0,1	-0,17	-0,08	0	-0,08	-0,34	0,11
5	0	0,05	0,06	-0,05	-0,04	-0,6	-0,007	0,01
6	0	0,18	0,07	-0,08	-0,53	-0,09	-0,09	0,07
7	0	0,18	0,06	0,11	0,14	0,14	0,18	0,11
8	0	-0,56	-0,09	-0,31	-0,27	-0,23	0,07	0,06
Média	0	-0,01	-0,03	-0,04	-0,08	-0,07	0,00	0,04
DPM	0	0,24	0,13	0,13	0,23	0,24	0,16	0,12
EPM	0	0,08	0,04	0,04	0,08	0,08	0,05	0,04

Tabela XIII. Valores individuais do número de lambidas e sacudidas, após a administração de formalina (5% / 0,5 µl) na pata, medido em diferentes intervalos de tempo (minutos) após a microinjeção de salina (NaCl 0,9% / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	0 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 40	40 - 45	45 - 50	50 - 55	55 - 60
1	52	11	58	59	69	94	79	83	33	58	33	23
2	74	15	9	17	24	29	68	43	28	27	11	0
3	60	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	101	50	0	0	0	2	0	0	0	5	0	0
5	188	9	30	33	58	31	14	27	36	17	42	39
Média	95	17	19,6	21,8	30,2	31,2	32,2	30,6	19,4	21,4	17,2	12,4
DPM	55,22	19,24	24,62	24,91	32,17	37,99	38,33	34,58	17,93	23,00	19,33	17,89
EPM	22,54	7,85	10,05	10,17	13,13	15,51	15,64	14,12	7,32	9,39	7,89	7,30

Tabela XIV. Valores individuais do número de lambidas e sacudidas, após a administração de formalina (5% / 0,5 µl) na pata, medido em diferentes intervalos de tempo (minutos) após a microinjeção de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	0 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 40	40 - 45	45 - 50	50 - 55	55 - 60
1	85	118	167	135	135	136	102	89	101	79	75	70
2	276	90	26	59	27	25	65	71	20	72	81	75
3	245	82	74	41	33	33	1	60	39	34	22	28
4	180	68	52	106	15	14	55	19	23	18	38	28
5	163	0	0	34	55	31	0	34	43	21	33	31
6	93	29	3	99	104	2	17	62	43	48	52	37
7	134	26	21	27	8	4	0	5	7	3	6	0
8	121	13	53	24	42	56	18	74	127	84	104	64
Média	162,12	53,25	49,5	65,62	52,37	37,62	32,25	51,75	50,37	44,87	51,37	41,62
DPM	69,03	42,04	53,98	42,14	44,70	43,42	37,69	29,27	41,79	30,71	33,04	25,79
EPM	24,40	14,86	19,08	14,89	15,80	15,35	13,32	10,35	14,77	10,86	11,68	9,12

Tabela XV. Valores individuais do número de lambidas e sacudidas, após a administração de formalina (5% / 0,5 µl) na pata, medido em diferentes intervalos de tempo (minutos) após a microinjeção de muscimol (1 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	0 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 40	40 - 45	45 - 50	50 - 55	55 - 60
1	112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	73	0	0	0	0	0	32	29	17	12	7	3
3	81	0	0	0	0	0	0	20	23	6	1	2
4	106	8	0	11	26	0	0	0	0	7	7	5
5	79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	26	6	0	0	0	0	0	2	22	0	0	0
7	153	6	26	16	0	0	0	0	3	6	7	0
8	166	11	20	28	25	19	20	17	11	14	2	9
Média	99,5	3,87	5,75	6,87	6,37	2,37	6,5	8,5	9,5	5,62	3	2,37
DPM	45,27	4,42	10,76	10,57	11,80	6,71	12,45	11,68	10,07	5,44	3,38	3,24
EPM	35,17	1,37	2,03	2,43	2,25	0,83	2,29	3,00	3,35	1,98	1,06	0,83

Tabela XVI. Valores individuais do número de lambidas e sacudidas, após a administração de formalina (5% / 0,5 µl) na pata, medido em diferentes intervalos de tempo (minutos) após a microinjeção de muscimol (1 nmol / 0,2 µl), seguido de bicuculina (1 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	0 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 40	40 - 45	45 - 50	50 - 55	55 - 60
1	192	13	9	0	0	0	6	7	8	17	13	9
2	62	9	25	38	55	17	11	31	18	13	3	4
3	122	4	5	18	72	79	52	66	74	78	76	68
4	158	4	2	11	3	6	9	5	4	3	8	10
5	151	24	19	6	8	14	4	11	5	13	32	29
6	132	21	16	5	6	0	5	1	20	21	25	34
7	180	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
8	166	12	0	4	2	8	14	12	5	21	17	19
Média	145,37	10,87	9,5	10,25	18,37	15,5	12,62	16,62	16,75	20,75	21,75	21,62
DPM	40,82	8,42	9,48	12,68	28,33	26,46	16,49	22,18	24,15	24,37	24,41	22,16
EPM	14,43	2,97	3,35	4,48	10,01	9,35	5,83	7,84	8,54	8,61	8,63	7,83

Tabela XVII. Valores individuais do número de lambidas e sacudidas, após a administração de formalina (5% / 0,5 µl) na pata, medido em diferentes intervalos de tempo (minutos) após a microinjeção de carbacol (2,7 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	0 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 40	40 - 45	45 - 50	50 - 55	55 - 60
1	65	9	3	11	10	16	11	6	20	39	31	28
2	96	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	110	32	12	8	10	15	16	2	6	15	25	14
4	140	0	13	7	4	2	3	4	48	25	17	9
5	167	54	7	11	19	20	20	18	11	13	9	15
6	139	173	5	16	3	0	0	2	7	6	21	23
7	149	30	45	67	47	49	37	29	16	57	55	54
8	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	112	38	10,62	15	11,62	12,75	10,875	7,62	13,5	19,37	19,75	17,87
DPM	46,44	57,73	14,72	21,71	15,64	16,84	13,14	10,41	15,62	20,07	18,13	17,62
EPM	39,59	13,43	3,75	5,30	4,11	4,50	3,84	2,69	4,77	6,85	6,98	6,31

Tabela XVIII. Valores individuais do número de lambidas e sacudidas, após a administração de formalina (5% / 0,5 µl) na pata, medido em diferentes intervalos de tempo (minutos) após a microinjeção de atropina (0,7 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	0 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 40	40 - 45	45 - 50	50 - 55	55 - 60
1	172	33	36	14	29	25	17	33	18	10	47	30
2	110	2	5	9	36	48	35	34	31	19	6	3
3	109	84	34	45	26	12	30	26	28	43	20	28
4	109	15	2	0	2	18	12	12	13	18	12	10
5	175	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
6	150	37	33	37	44	58	51	43	38	34	36	42
7	169	12	0	33	78	83	65	41	51	22	30	19
8	150	5	7	0	0	22	27	22	21	12	4	0
Média	143	23,5	14,62	17,25	26,87	33,25	29,62	26,87	25	19,75	19,37	16,5
DPM	29,37	28,01	16,50	18,43	26,88	27,48	21,01	13,71	15,69	13,61	16,89	15,76
EPM	10,38	9,90	5,83	6,51	9,50	9,71	7,43	4,84	5,54	4,81	5,97	5,57

Tabela XIX. Valores individuais do número de lambidas e sacudidas, após a administração de formalina (5% / 0,5 µl) na pata, medido em diferentes intervalos de tempo (minutos) após a microinjeção de morfina (4,4 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	0 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 40	40 - 45	45 - 50	50 - 55	55 - 60
1	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	38	0	0	3	6	5	4	11	6	8	7	8
4	27	0	0	1	0	0	2	1	2	5	2	1
5	5	0	0	1	3	16	2	0	0	0	0	0
6	25	0	0	0	3	0	0	0	0	0	4	3
7	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	34	0	0	0,62	1,5	2,62	1	1,5	1	1,62	1,62	1,5
DPM	14,92	0	0	1,06	2,26	5,68	1,51	3,85	2,13	3,11	2,61	2,82
EPM	5,27	0	0	0,37	0,80	2,00	0,53	1,36	0,75	1,10	0,92	1

Tabela XX. Valores individuais do número de lambidas e sacudidas, após a administração de formalina (5% / 0,5 µl) na pata, medido em diferentes intervalos de tempo (minutos) após a microinjeção de naloxona (2,7 nmol / 0,2 µl), seguido de morfina (4,4 nmol / 0,2 µl) no CCA.

Cobaia	0 - 5	5 - 10	10 - 15	15 - 20	20 - 25	25 - 30	30 - 35	35 - 40	40 - 45	45 - 50	50 - 55	55 - 60
1	85	24	7	9	40	42	6	9	21	24	29	29
2	131	8	0	0	0	0	0	0	0	0	8	4
3	115	23	19	9	8	33	40	51	45	42	21	18
4	107	1	7	17	7	19	12	16	16	19	27	22
5	125	1	0	0	0	0	16	23	21	19	3	21
6	93	4	16	8	19	22	27	25	24	23	25	12
7	112	18	15	16	28	30	18	24	17	19	28	27
8	114	29	14	28	31	32	31	27	25	19	16	12
Média	110,25	13,5	9,75	10,87	16,62	22,25	18,75	21,85	21,12	20,62	19,62	18,12
DPM	15,27	11,30	7,32	9,32	15,15	15,40	13,29	14,97	12,43	11,40	9,76	8,40
EPM	5,40	3,99	2,58	3,29	5,35	5,44	4,70	5,29	4,39	4,03	3,45	2,97