**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica**

***Envolvimento de receptores opióides e serotoninérgicos nos processos
antinociceptivos induzidos por substância doce***

Elce Cristina Côrtes Rebouças

Dissertação apresentada à área de Pós-graduação
do Departamento de Neurologia Psiquiatria e
Psicologia Médica da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

Ribeirão Preto

2004

*“...Em muita sabedoria há muita aflição;
quem aumenta o saber aumenta a dor.”*

Eclesiastes 1, 8

Para *Acil*,
Sem o qual não teria alcançado êxito
nessa minha trajetória.
Pelo seu carinho e paciência.
Seu apoio e colaboração foram
fundamentais

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra**, pelo voto de confiança ao aceitar-me como orientanda e pela orientação.

À **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB)**, pela oportunidade

A **Renato Leonardo**, pela colaboração inestimável neste trabalho, pela solicitude em ensinar-me as técnicas utilizadas em nosso laboratório. Sobretudo agradeço pela amizade.

À **Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi** e à **Profa. Dra. Valéria Fazan** pelas considerações apresentadas para a finalização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Cássio Reis**, pela valiosa contribuição na análise estatística dos dados aqui apresentados.

Aos amigos **Sandro, Ricardo, Célio e Rithelie**, por toda ajuda no aprimoramento das técnicas utilizadas no laboratório, pela amizade estabelecida com a convivência e pelos cafezinhos nos finais de tarde.

À **Sandra**, pela amizade, pelo apoio em as todas etapas desse mestrado, pelas sugestões e colaborações para conclusão deste trabalho.

Aos amigos **Patrícia, Pierre, Sérgio, Rogério e Kiyoko**, pelo apoio, carinho e pelo “pedacinho” da Bahia que constituíram aqui em Ribeirão Preto, que certamente aplacou a saudade de casa.

Aos colegas de laboratório, **Valéria, Daoud, Tati Felippotti, Andressa, Raquel, Tati Snake, Lissandra, Fabrício, Walter, Ramon e Nélon**, pela colaboração e amizade e pelo ambiente agradável no laboratório, fator de suma importância para um bom trabalho.

Aos funcionários da limpeza, de forma especial a **Carlinha**, pela alegria e pelo cuidado com a limpeza do nosso ambiente de trabalho.

Às funcionárias do biotério do Departamento de Farmacologia **Inês** e **Eliana**, sempre prontas a ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Neurologia, Psiquiatria e Psicologia Médica, principalmente à **Beth** e **Sílvia**, por toda ajuda e atenção.

Aos docentes da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, que contribuíram para minha formação acadêmica. De forma especial à **Prof. Dra. Leda Menescal de Oliveira**, pelo carinho e solicitude, uma pessoa que inspira carinho e confiança.

À **minha família** cuja, confiança inabalável em mim depositada faz com que eu alce vôos mais altos do que me creio capaz. Ao belo **Elízio**, meu pai, e à minha mãe, **Nice**, uma senhora de van guarda, pelo amor e carinho incondicionais, pelo sacrifício em pró dos filhos. Este trabalho é mais um fruto desse sacrifício. Agradeço pelo exemplo de vida que são e por suas presenças constantes em minha vida, principalmente nos momentos que mais preciso, rindo ou chorando comigo, creio que, por mecanismos ainda desconhecidos, pais e filhos apresentam-se “conectados”, pois os pais parecem capazes de “sentir” as nossas dores e alegrias. Aos meus irmãos, **Júnior**, **Tecosa**, **Lecinha** e **Elisinho** (meu sobrinho-filho-irmão), que apesar de geograficamente distantes estiveram sempre presentes, apoiando, incentivando e dando-me carinho e amor. Sobretudo peço, a todos, desculpas pelos momentos que precisaram de mim e eu estava ausente.

À **SAEB** pelo auxílio financeiro.

Índice

Introdução	1
Vias neurais da dor	2
Modulação da nocicepção.....	8
Opióides endógenos e controle antinociceptivo	16
Sistema serotoninérgico.....	20
Antinocicepção induzida por substância doce.....	23
Objetivos.....	26
Objetivo geral.....	27
Objetivos específicos	27
Materiais e Métodos	28
1. Animais	29
2. Dieta.....	29
3. Testes Antinociceptivos	30
4. Drogas	31
5. Procedimento	31
Experimento 1.....	31
Experimento 2.....	32
6. Análise Estatística.....	33
Resultados.....	34
Discussão.....	46
Conclusões	53
Resumo.....	55
Abstract	57
Referências Bibliográficas.....	59

Índice de Figuras

Figura 1 – Vias nociceptivas ascendentes. **A**, origem e localização dos tratos em diferentes níveis da medula espinal (cervical, torácica e lombar). **B**, sistema anterolateral, que contém os tratos espino-talâmico, espino-reticular e espino-mesencefálico. **A**: **1**- funículo posterior; **2**- fascículo dorsolateral; **3**- trato espino-cerebelar posterior; **4**- fibras nociceptivas Ad; **5**- fibras nociceptivas do tipo C; **6**- trato espino-cerebelar anterior; **7**- trato espino-reticular; **8**- trato espino-talâmico; **9**- núcleo torácico. **B**: **1**- fibras Ad; **2**- fibras C; **3**- trato ipsilateral; **4**- trato sistema anterolateral; **5**- tato neoespino-talâmico; **6**- trato paleoespino-talâmico; **7**- formação reticular; **8**- substância cinzenta periaquedutal; **9**- teto mesencefálico; **10**- grupo nuclear talâmico posterior; **11**- vias para o hipotálamo; **12**- complexo talâmico ventrobasal; **13**- núcleos talâmicos intralaminares; **14**- vias para o prosencéfalo; **15**- vias para áreas sensoriais; **16**- vias para o córtex parietal posterior; **a**- medula espinal; **b**- bulbo; **c**- ponte; **d**- mesencéfalo; **e**- diencéfalo. Segundo Nieuwenhuys *et al.*, 1988 (A) e Kelly, 1991 (B), modificado por Coimbra, 1995. 5

Figura 2 – Sistema endógeno de controle nociceptivo como proposto por Basbaum & Fields (1978). **A**: Nível mesencefálico. PAG, substância cinzenta periaquedutal (rica em encefalinas - E). **B**: Nível bulbar. NRM, núcleo magno da rafe, rico em serotonina (5-HT); Rmc, núcleo reticular magnocelular. Ambos recebem aferências excitatórias provenientes da PAG e enviam eferências à medula espinal. **C**: Nível espinal. Fibras eferentes que se originam no NRM e Rmc, avançam através do funículo dorsolateral (DLF) e controlam os impulsos nociceptivos que atingem as lâminas I e II do corno posterior da medula espinal. Os neurônios nociceptivos da substância gelatinosa (lâmina II), que são ativados por aferências sensitivas de pequeno diâmetro, ricas em substância P (SP), projetam-se a níveis supra-espinais e, indiretamente, via núcleo reticular gigantocelular (Rgc), ativa as células do sistema descendente de controle antinociceptivo da PAG e NRM, formando uma alça de retroalimentação negativa. Neurônios contendo catecolaminas do *locus coeruleus* (LC) e a região subcerúlea e parabraquial (SC-PB) também podem contribuir com o sistema de modulação da dor. (NE, norepinefrina)..... 11

Figura 3 - Fotografia de um animal durante a realização do teste de retirada de cauda.

.....30

Figura 4 - Efeito da ingestão crônica de água (controle) ou soluções de sacarose, em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L), como única fonte de líquido, no limiar nociceptivo de *Rattus norvegicus*. O efeito da substância doce foi avaliado por meio do teste de retirada de cauda, em animais mantidos agrupados (A) e individualmente (B). As colunas representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM), N=8. O símbolo * significa $p<0,05$, comparado com o controle, de acordo com o teste Duncan. O símbolo # representa diferença significativa quando comparado com solução de sacarose a 62,5g/L, de acordo com o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo + representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com solução de sacarose a 125g/L, de acordo com o teste Duncan, $p<0,05$35

Figura 5 – Volume (mL) de ingestão crônica de água ou solução de sacarose, em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L), como única fonte de líquido, por *Rattus norvegicus* (animais mantidos individualmente) ao longo dos dias. Os dados foram determinados como média $\pm$ EPM, N=8 (grupos independentes). O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle, segundo o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo + representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado com o grupo tratado com solução de sacarose a 125g/L, segundo o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo ★ representa diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo tratado com solução de sacarose a 250g/L, segundo o teste Duncan, $p<0,05$36

Figura 6 – Ingestão crônica de ração padrão de laboratório por *Rattus norvegicus* (mantidos individualmente ou em grupo de quatro por caixa) tratados com água ou solução de sacarose de 250g/L como única fonte de líquido em todo o tratamento. As colunas representam a média diária de consumo da ração e as barras, o EPM, N=8. O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo mantido individualmente e tratado com água, segundo o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo # representa diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo mantido individualmente e tratado com solução de sacarose de 250g/L, segundo o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo + representa diferença estatisticamente significativa

quando comparado com o grupo mantido conjuntamente e tratado com água, segundo o teste Duncan, $p<0,05$38

Figura 7 – Peso do corpo ao longo dos dias de *Rattus norvegicus* mantidos individualmente ou em grupo de quatro por caixa e submetidos à ingestão crônica de água ou solução de sacarose (250g/L) como única fonte de líquido. Os dados são média $\pm$ EPM, N=8 (grupos independentes). O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo de animais mantidos conjuntamente e tratados com água, de acordo com o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo # representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo tratado com solução de sacarose a 250g/L e mantidos individualmente, de acordo com o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo ★ representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo de animais mantidos individualmente e tratados com água, segundo o teste Duncan, $p<0,05$39

Figura 8 – Peso ganho após 14 dias de tratamento de *Rattus norvegicus* mantidos individualmente e submetidos à ingestão crônica de água ou solução de sacarose em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L), como única fonte de líquido. As colunas representam a média de peso ganho durante o tratamento e as barras o EPM, N=8. O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes, quando comparado com o grupo tratado com água, de acordo com o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo # representa diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com solução de sacarose de 62,5g/L, segundo o teste Duncan, $p<0,05$41

Figura 9 – Peso ganho após 14 dias de tratamento de *Rattus norvegicus* mantidos em grupo e submetidos à ingestão crônica de água ou solução de sacarose em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L) como única fonte de líquido. As colunas representam a média de peso ganho durante o tratamento e as barras o EPM, N=8; teste Duncan, $p<0,05$ em todos os casos.42

Figura 10 –Índice de Analgesia do pré-tratamento com salina (NaCl a 0,9% (p/v), controle), naltrexona (1mg/kg, 2mg/kg e 3mg/kg) (A) ou naloxonazina (10mg/kg, 20mg/kg ou 30mg/kg) (B) no limiar nociceptivo após ingestão crônica (14 dias) de água ou solução de sacarose (250g/L). As colunas representam médias e as barras o EPM, N=7 (naltrexona); N=8 (naloxonazina). O símbolo * representa diferença

estatisticamente significativo quando comparado ao controle, segundo o teste Duncan, $p < 0,05$43

Figura 11 –Índice de Analgesia do pré-tratamento com salina (NaCl a 0,9% (p/v), controle), metisergida (1mg/kg, 2mg/kg e 3mg/kg) (A) ou cetanserina (1mg/kg, 2mg/kg ou 3mg/kg) (B) no limiar nociceptivo após ingestão crônica (14 dias) de água ou solução de sacarose (250g/L). As colunas representam médias e as barras o EPM, N=7 (metisergida); N=8 (cetanserina). O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao controle, segundo o teste Duncan, $p < 0,05$44

Figura 12 –Índice de Analgesia do pré-tratamento com salina (NaCl a 0,9% (p/v)), naltrexona (3mg/kg), naloxonazina (30mg/kg), metisergida (3mg/kg) ou cetanserina (3mg/kg) no limiar nociceptivo. As colunas representam médias e as barras o EPM, N=8; $p < 0,05$ em todos os casos, segundo o teste Duncan.45

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Características da ração padrão de laboratório oferecida em todo o tratamento, *ad libitum*, para *Rattus norvegicus* submetidos à ingestão crônica de água (controle) ou solução de sacarose como única fonte de líquido.29

Tabela 2 – Volume (mL) de ingestão crônica de água (controle) ou solução de sacarose em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L), como única fonte de líquido, por *Rattus norvegicus* (quatro animais por caixa) ao longo dos dias. Os dados são a média do volume total consumido por cada animal.37

INTRODUÇÃO

VIAS NEURAIS DA DOR

Compreender a dor é preocupação que acompanha o homem ao longo do tempo. Aristóteles interpretou a dor como experiência oposta ao prazer, tipicamente desagradável, e sentida pelo coração.

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), adota a definição de dor proposta por Merskey como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial” (Merskey, 1986).

A idéia do coração como centro das sensações perdurou por muitos séculos e recebeu apoio de importantes pensadores. Por outro lado, também foi grande o número dos que defenderam a idéia do cérebro como centro das sensações. Estudos anatômicos e fisiológicos realizados por Descartes evidenciaram a existência de nervos capazes de receber informações sensoriais desde a periferia e levá-las até o cérebro (Melzack & Wall, 1965).

Sherrington denominou nocicepção como a percepção de estímulos nocivos. Portanto, a dor é uma experiência consciente composta pela interação de componentes discriminativos, afetivo-emocional e cognitivos, sendo a nocicepção o elemento sensorial da mesma. Cada componente da dor é mediado e modulado por mecanismos independentes e interativos do encéfalo atuando nos níveis espinal, do tronco encefálico e cerebral (Casey, 1999).

Sherrington, no fim do século XIX, postulou a existência de nociceptores, receptores sensoriais capazes de detectar lesão tecidual ou estímulos potencialmente nocivos. Após detecção do estímulo por estes nociceptores, a informação nociceptiva seria conduzida para o sistema nervoso central, onde seria interpretada. Posteriormente, constatou-se que a existência de nociceptores não seria apenas na pele, mas também em estruturas viscerais (McMahon & Koltzenburg, 1990).

Esses receptores periféricos, nociceptores não homogêneos, podem apresentar-se silenciosos ou ativos e são bastante dinâmicos em sua natureza, cujas funções estabelecem-se de acordo com a influência e necessidade do meio interno (Cervero & Janig, 1992; Schmidt *et al.*, 1994). Os corpos celulares dos neurônios, nos quais trafegam os impulsos nociceptivos, localizam-se nos gânglios da raiz dorsal dos nervos espinais e no gânglio trigeminal, gânglio do V par de nervos cranianos.

Os nociceptores podem ser definidos como receptores sensoriais que são ativados por estímulos nocivos e, apresentam-se como terminações nervosas livres do tipo Ad e C (Messlinger, 1997). Essas fibras nervosas são classificadas de acordo com seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução. As fibras do tipo C distribuem-se em tecidos profundos além da pele, onde são mais abundantes que as fibras Ad. As fibras mielinizadas Ad conduzem estímulos nocivos térmicos e mecânicos com uma velocidade em torno de 5 a 30 m/s. As fibras não mielinizadas C, de baixa velocidade de condução (<1 m/s), são conhecidas como nociceptores polimodais (PMN; *C-polymodal nociceptors*), pois respondem tanto a estímulos nocivos, mecânicos, térmicos (acima de 45°C) e químicos de alta intensidade, como a vários estímulos não nocivos (Willis, 1985). O conceito de nociceptores silenciosos surgiu posteriormente para terminações de fibras que não respondem a estímulo agudo mecânico ou térmico, mas “acordam” durante um processo inflamatório (McMahon & Koltzenburg, 1990).

Os nociceptores terminam de uma maneira altamente organizada no corno dorsal da medula espinal, após penetrarem na medula através da divisão lateral da raiz posterior dos nervos espinais. As fibras Ad e C bifurcam-se e avançam, ascendente ou descendente, de um a três segmentos espinais, contribuindo para a formação dos fascículos medulares. Os corpos celulares dos neurônios que recebem as primeiras aferências nociceptivas situam-se no corno dorsal da medula, zonas mais superficiais. As lâminas I e II de Rexed recebem fibras C e algumas fibras Ad. Outras fibras Ad penetram mais profundamente no corno dorsal (lâmina V). Essas fibras sensoriais de alto limiar ativam um grande número de interneurônios de segunda ordem e neurônios de projeção na medula espinal, alguns deles ativados exclusivamente por estímulos nocivos (denominados de neurônios nociceptivos específicos ou NS – *nociceptive-specific*) e outros são ativados por estímulos de alta ou baixa intensidade (denominados de faixa dinâmica ampla ou WDR – *wide-dynamic-range*). As células presentes nas lâminas I e V dão origem as principais vias de projeção do corno dorsal para o tálamo (Kandell *et al.*, 2000).

Os neurotransmissores envolvidos nas aferências nociceptivas primárias são diversos, particularmente, a substância P (Hökfelt *et al.*, 1975; Furst, 1999), somatostatina, colecistoquinina, glutamato (Jessel & Dodd, 1986), neurocinina-A e neurocinina-B. Estes parecem ser transmissores das aferências primárias ou facilitadores da expressão de estímulos nociceptivos (Furst, 1999). A atividade gerada

pelo nociceptor é transferida, após processamento complexo e ativo no corno dorsal, diretamente ou via núcleos do tronco encefálico ao tálamo ventrobasal e então para o córtex, onde a percepção da dor é gerada. Impulsos paralelos do corno dorsal passam para o corno ventral e ativam os neurônios motores flexores, os quais geram o reflexo flexor de retirada (Woolf, 1994).

Atualmente várias vias ascendentes da dor são conhecidas, tratos espino-talâmico, espino-mesencefálico, espino-reticular (Willis, 1985), espino-límbico, espino-cervical e coluna dorsal pós-sináptica (Willis & Westlund, 1997). Dentre elas, os tratos espino-talâmico, espino-reticular e espino-mesencefálico (Figura 1) têm sido considerados as vias mais importantes na transmissão aferente da informação nociceptiva. Estes tratos terminam em diversos núcleos do tálamo e da formação reticular do tronco encefálico (Willis, 1985). As fibras que participam da constituição dessas vias ascendem pelo funículo lateral da medula e se originam em grande parte dos neurônios da coluna posterior contralateral. Estas vias são denominadas coletivamente de sistema ou trato anterolateral da coluna.

A via espino-talâmica, filogeneticamente, compreende o feixe neo-espino-talâmico (mais recente) e a via espino-reticular compreende o feixe paleo-espino-talâmico (mais antigo). Há evidências de que as projeções dos tratos paleo-espino-talâmico e espino-reticular estejam mais envolvidas nos aspectos afetivos-emocionais da dor do que em seu caráter sensório-discriminativo (Price & Dubner, 1977). Estudos sugerem que os núcleos da base também podem estar envolvidos no aspecto sensório-discriminativo da dor e, ainda, na característica afetiva e nos aspectos cognitivos da dor, e na modulação de informação nociceptiva (Chudler & Dong, 1995).

Os neurônios da lâmina I de Rexed projetam-se aos núcleos talâmicos por meio do funículo dorso-lateral, contralateralmente, e a via espino-talâmica dorso-lateral compreende cerca de 25% das projeções que se fazem ao tálamo, proveniente de sítios medulares (Jones *et al.*, 1987; Hammond, 1989).

Muitos neurônios nociceptores localizados na lâmina I também se projetam à área parabraquial, formando parte do trato espino-mesencefálico (Menetrey *et al.*, 1982; Wiberg & Blomqvist, 1984; Panneton & Burton, 1985; Cechetto *et al.*, 1985), e ascende pelo funículo dorso-lateral (Hylden *et al.*, 1986). Alguns desses neurônios projetam-se ao núcleo submédio do tálamo, concomitantemente (Craig & Burton, 1981; Hylden *et al.*, 1985). Adicionalmente, neurônios nociceptores na lâmina I também enviam axônios para o núcleo pré-tectal anterior (Rees *et al.*, 1995).

Figura 1 – Vias nociceptivas ascendentes. **A**, origem e localização dos tratos em diferentes níveis da medula espinal (cervical, torácica e lombar). **B**, sistema anterolateral, que contém os tratos espino-talâmico, espino-reticular e espino-mesencefálico. **A**: 1- funículo posterior; 2- fascículo dorsolateral; 3- trato espino-cerebelar posterior; 4- fibras nociceptivas Ad; 5- fibras nociceptivas do tipo C; 6- trato espino-cerebelar anterior; 7- trato espino-reticular; 8- trato espino-talâmico; 9- núcleo torácico. **B**: 1- fibras Ad; 2- fibras C; 3- trato ipsilateral; 4- trato sistema anterolateral; 5- tato neoespino-talâmico; 6- trato paleoespino-talâmico; 7- formação reticular; 8- substância cinzenta periaquedutal; 9- teto mesencefálico; 10- grupo nuclear talâmico posterior; 11- vias para o hipotálamo; 12- complexo talâmico ventrobasal; 13- núcleos talâmicos intralaminares; 14- vias para o prosencéfalo; 15- vias para áreas sensoriais; 16- vias para o córtex parietal posterior; a- medula espinal; b- bulbo; c- ponte; d- mesencéfalo; e- diencéfalo. Segundo Nieuwenhuys *et al.*, 1988 (A) e Kelly, 1991 (B), modificado por Coimbra, 1995.

O complexo amigdalóide recebe conexões neurais provenientes da região parabraquial (Ma & Peschanski, 1988), a via espino-ponto-amigdalina pode constituir-se em uma relevante projeção que serve ao componente afetivo da dor. Os neurônios do corno dorsal da medula também se projetam diretamente ao hipotálamo lateral, núcleos septais e núcleo acumbens; além do complexo ventrobasal do tálamo que igualmente recebe conexões nociceptivas (Craig & Burton, 1981; Burstein *et al.*, 1987). Estas conexões evidenciam o envolvimento das vias espino-talâmica com o aspecto sensorio-discriminativo da dor, e a importância da ligação entre os neurônios da lâmina I da coluna dorsal da medula com estruturas do sistema límbico, para o estabelecimento do componente emocional dos processos nociceptivos (Hammond, 1989).

Funcionalmente, o gânglio trigeminal equivale aos gânglios das raízes dorsais dos nervos espinais e recebe as aferências mecanorreceptivas, termorreceptivas e nociceptivas da cabeça através das raízes sensitivas do nervo trigêmeo. Seus neurônios projetam-se para a formação reticular e/ou ao tálamo, assim como as fibras do funículo ântero-lateral da medula. A formação reticular constitui uma estação importante do sistema ascendente inespecífico. Ela dispõe de numerosas conexões aferentes, algumas destas subindo pelo feixe espino-reticular do cordão ântero-lateral, bem como, pelas vias correspondentes que provêm do núcleo espinal do nervo trigêmeo. Os impulsos aferentes da formação reticular procedem também de numerosas outras regiões do encéfalo, tais como o córtex motor e sensorial, tálamo e hipotálamo. As conexões eferentes também são múltiplas, descendo em direção à medula ou subindo através do tálamo, para o córtex cerebral para o hipotálamo, e para as demais estruturas do sistema límbico.

Vias para dor visceral e cutânea parecem ter um *locus* de projeção em comum na cápsula do complexo caudal ventrobasal do tálamo, para neurônios nociceptivos específicos (NS) e WDR que pode ser a ligação das vias da dor do corno dorsal e do homólogo trigeminal com o córtex somatossensorial (Yokota, 1989).

Segundo Laird & Cervero (1991), há uma íntima correlação entre injúria e dor, resultando em um estado de equilíbrio. No entanto mudanças ou oscilações induzidas por um impulso nociceptivo ou mudanças no meio ambiente podem resultar em avaliações na qualidade e na quantidade da percepção da dor produzida por um determinado estímulo nocivo. Assim, segundo estes autores a resposta de sistemas nociceptivos pode ocorrer em três condições distintas:

- Processamento de um estímulo nociceptivo momentâneo, constituindo um processo fisiológico de proteção contra lesões teciduais, sendo importante para o bem-estar e sobrevivência do indivíduo. Constitui uma dor fásica, cessando após o término do estímulo;
- diante de estímulos prolongados, com lesão tecidual e inflamação, ocorrendo sensibilização de nociceptores, estimulação de fibras silenciosas e dor tônica, persistente.
- estados anormais de dor, como dores neuropáticas e dor central, como dor do membro fantasma e neuralgia.

Por mais controverso que pareça, a dor possui um indiscutível papel biológico, é um fator de adaptação do indivíduo, uma vez que o permite perceber o dano tissular iminente podendo assim evitar a ameaça à sua sobrevivência. Segundo Brandão (2001), estudos realizados em indivíduos portadores de analgesia congênita ou que apresentam uma insensibilidade congênita à dor levaram a constatação de que a dor é um sinal de aviso à injúria potencial, uma vez que a análise destes indivíduos mostra que as suas expectativas de vida são reduzidas, morrendo prematuramente por causa de traumas ou infecções que não são reconhecidos ou detectados.

MODULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO

Um importante componente da resposta do organismo a situações de emergência é a redução da capacidade de perceber a dor. Com efeito, na exposição de um ser vivo a situações de perigo iminente, tais como aquelas que envolvem a presença de predadores, ou em que é imprescindível a mobilização de mecanismos de defesa, dominância ou de adaptação a situações ameaçadoras ambientais extremas, urge o recrutamento de algum sistema que as suprima, pois essas reações que seguem a percepção da dor seriam extremamente desvantajosas para a sobrevivência do animal. A dor normalmente promove um conjunto de reflexos de retirada, fuga, retraimento, entre outros comportamentos recuperativos. Seria mais razoável, portanto, que essas reações fossem suprimidas automaticamente em favor de respostas mais adaptativas. Se a resposta natural do organismo a situações de emergência inclui uma redução na sensibilidade a impulsos nociceptivos, parece plausível que esse sistema de inibição de dor seja recrutado em tais situações (Coimbra, 1995). Tais vias neurais eliciam a antinocicepção.

A antinocicepção induzida pelo medo tem sido considerada como parte integrante da reação de defesa. Sem a existência de um sistema de inibição dos impulsos nociceptivos, os animais, se levados em confronto com um predador, poderiam adquirir comportamentos de recuperação, induzidos pelo sofrimento, em vez de apresentarem postura defensiva, induzida pelo medo, traduzindo, assim, sua vulnerabilidade a futuras injúrias e sujeição à morte (Fanselow & Bolles, 1979).

Antinocicepção pode ser definida como redução na resposta do sistema sensorial para os estímulos nocivos (Basbaum & Fields, 1978). A sensação nociceptiva e os aspectos das respostas comportamentais da dor dependem de processamento neural de estímulos nocivos por estruturas superiores. Estas informações nociceptivas trafegam por meio dos funículos ântero-lateral e dorso-lateral da medula espinal ou através do lemnisco trigeminal e são dirigidos para o tálamo e para o giro pós-central (Surmeier *et al.*; 1989).

No corno dorsal da medula espinal a informação nociceptiva de vísceras, pele e outros órgãos é submetida a extenso processamento por uma diversidade de mecanismos, alguns dos quais aumentam e outros inibem essa transferência de informação sensorial para centros mais altos. Neste aspecto, uma rede de vias

descendentes projeta-se de estruturas encefálicas a sítios espinais para desempenhar um papel complexo e crucial. Vias centrífugas específicas suprimem (inibição descendente) ou potenciam (facilitação descendente) a passagem de mensagens nociceptivas para o encéfalo. (Millan, 2002). Hagbarth & Kerr (1954) registram as primeiras evidências de que estruturas encefálicas supra-espinais podiam controlar vias sensoriais descendentes, e Carpenter e colaboradores (1965), demonstraram o controle descendente de impulsos sensoriais para vias ascendentes.

Não apenas situação de estresse, assim como a hipoglicemia e outros estímulos não dolorosos, podem induzir antinocicepção reversível pela naloxona, um antagonista de receptores opióides (Amir & Amit, 1978; Bodnar *et al.*, 1979). Bolles & Fanselow (1982) demonstraram, ainda, que a antinocicepção sensível a naloxona pode ser produzida por um estímulo inócuo em condições em que este estímulo serve como uma pista de que o estímulo nocivo irá ocorrer, de modo que ratos expostos repetidamente a choques aversivos tornam-se hipoalgésicos quando expostos à mesma situação experimental, porém na ausência do choque. Nestas situações tem sido proposto que a antinocicepção é desencadeada pelo medo condicionado. Processos de inibição da dor também podem ser recrutados durante a evocação do medo inato (Coimbra *et al.*, 1992; Coimbra & Brandão, 1997).

Os opióides endógenos e monoaminas são fortes candidatos como neurotransmissores envolvidos nessa rede neural (Nichols *et al.*, 1989; Coimbra *et al.*, 1992). Com efeito, há evidências de que o estresse e o medo podem induzir tanto formas opióides como não-opióides de antinocicepção (Watkins & Mayer, 1982; Lewis *et al.*, 1982; Coimbra & Brandão, 1997). Estudos dos mecanismos neurais e hormonais têm apresentado provas do envolvimento de β -endorfina e encefalinas, além de corticotrofinas e corticosterona em algumas formas de antinocicepção (Basbaum & Fields, 1989; Miller, 1981; Jones *et al.*, 1992, 1994). Receptores opióides também estão presentes nos terminais aferentes primários das lâminas superficiais do corno dorsal sugerindo, assim, a participação dos polipeptídeos opióides endógenos no controle pré-sináptico da transmissão da mensagem nociceptiva (Lamotte *et al.*, 1976).

Outros neurotransmissores inibitórios também estão envolvidos na antinocicepção. Ao lado da serotonina (5-HT), destacam-se a dopamina, a noradrenalina e o GABA (Malcangio & Bowery, 1996). Células GABAérgicas foram identificadas no corno dorsal da medula formando sinapses axoaxônicas como aferentes primários sugerindo a sua participação na inibição pré-sináptica destes

neurônios (Barber *et al.*, 1978). Estudos recentes sugerem íntima interação entre os neurotransmissores GABA e serotonina na modulação da antinocicepção opióide (Nemmani & Mogil, 2003).

A estimulação elétrica de alguns sítios encefálicos elicia processos antinociceptivos pela provável ativação de vias centrífugas que inibem neurônios sensoriais na medula espinal. Tal sistema de inibição da dor pode ser ativado por alguns estímulos aversivos ambientais (Mayer & Liebeskind, 1974; Terman *et al.*, 1984), vindo a exercer importante função no controle de comportamentos afetivos e defensivos (Watkins & Mayer, 1986).

O processamento de estímulos nociceptivos pode ser modulado no prosencéfalo, na medula espinal, no tronco encefálico e no diencefalo (Casey, 1999). A transmissão nociceptiva ao nível espinal está sujeita a regulação por neurônios descendentes originados de diversas redes neurais encefálicas. Os corpos neuronais das fibras que formam esse sistema de controle inibitório descendente estão localizados em diferentes núcleos (Figura 2) incluindo substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe, formação reticular mesencefálica, núcleo dorsal da rafe (Prado & Faganello, 2000), núcleo reticular paragigantocelular, *locus coeruleus*, bulbo ventromedial rostral, amígdala (Bodnar, 2000), hipotálamo, tálamo, córtex somatossensorial e vários componentes do sistema límbico (Willis & Westlund, 1997). Estes sítios compreendem relevante sistema interconectado anatômica e fisiologicamente que medeia respostas antinociceptivas por meio de interações regionais (Bodnar, 2000). A estimulação do córtex cerebral ou do tálamo pode facilitar ou suprimir as respostas dos neurônios dos tratos espino-talâmico ou trigêmino-talâmico (Gerhart *et al.*, 1983; Yeziarski *et al.*, 1983).

O núcleo pré-tectal anterior também foi incluindo entre as estruturas supra-espinais que participam do processo de estímulos nocivos (Prado & Roberts, 1985; Foster *et al.*, 1989; Rees *et al.*, 1987; 1995; Wilson *et al.*, 1991; Brandão *et al.*, 1991). Há evidências de que essa participação do núcleo pré-tectal anterior no processo antinociceptivo pode ser devido a sua conexão com diversas estruturas. Como uma estação relé representada pelo núcleo dorsal da rafe (Rosa *et al.*, 1998; Prado & Faganello, 2000), ou através de suas conexões eferentes para o diencefalo e para o mesencéfalo (Terenzi *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1992), ou por suas conexões com o bulbo ventrolateral rostral (Terenzi *et al.*, 1991).

Figura 2 – Sistema endógeno de controle nociceptivo como proposto por Basbaum & Fields (1978). A: Nível mesencefálico. PAG, substância cinzenta periaquedutal (rica em encefalinas - E). B: Nível bulbar. NRM, núcleo magno da rafe, rico em serotonina (5-HT); Rmc, núcleo reticular magnocelular. Ambos recebem aferências excitatórias provenientes da PAG e enviam eferências à medula espinal. C: Nível espinal. Fibras eferentes que se originam no NRM e Rmc, avançam através do funículo dorsolateral (DLF) e controlam os impulsos nociceptivos que atingem as lâminas I e II do corno posterior da medula espinal. Os neurônios nociceptivos da substância gelatinosa (lâmina II), que são ativados por aferências sensitivas de pequeno diâmetro, ricas em substância P (SP), projetam-se a níveis supra-espinais e, indiretamente, via núcleo reticular gigantocelular (Rgc), ativa as células do sistema descendente de controle antinociceptivo da PAG e NRM, formando uma alça de retroalimentação negativa. Neurônios contendo catecolaminas do *locus coeruleus* (LC) e a região subcerúlea e parabraquial (SC-PB) também podem contribuir com o sistema de modulação da dor. (NE, norepinefrina).

Projeções do núcleo pré-tectal anterior para o bulbo rostroventral provêm uma via através da qual efeitos antinociceptivos do núcleo pré-tectal anterior para a medula espinal são mediados (Zagon *et al.*, 1995). Há evidências de que a inibição de respostas a estímulos nocivos de alto limiar seja devida à ação de projeções ascendentes, que têm origem na coluna dorsal da medula espinal que ativam células no núcleo pré-tectal anterior, as quais, por sua vez ativam a via de inibição descendente que trafega pelo funículo dorsolateral (Rees & Roberts, 1989).

A associação da substância cinzenta periaquedutal (SCP) com as vias de transmissão nociceptiva iniciou-se com estudos de Melzack *et al.*, em 1958. Estes autores descreveram que a lesão da formação reticular adjacente a SCP facilita a percepção de impulsos dolorosos, resultando em hiperalgesia. Tal resultado era indicativo de que a área lesada exercia controle tônico sobre a entrada de sinais nociceptivos. Em 1969, Reynolds demonstrou que a estimulação elétrica da SCP produzia potente antinocicepção em ratos, suficiente para permitir cirurgia sem o uso de agentes anestésicos. Os achados de Reynolds foram posteriormente confirmados em diferentes espécies animais, inclusive o homem, ficando amplamente estabelecido que a estimulação da SCP promove antinocicepção que perdura por tempo maior que o da estimulação. A estimulação elétrica da SCP dorsal produz reação de medo expressa por congelamento e respostas autonômicas, além de antinocicepção (Brandão *et al.*, 1988, 1990; Coimbra *et al.*, 1992; Castilho *et al.*, 2002). Na região ventral da SPC, a estimulação elétrica também gera antinocicepção (Nichols *et al.*, 1989). Estudos sugerem que esta antinocicepção é mediada por receptores opióides μ (Herz & Millan, 1990). Muito embora, mecanismos monoaminérgicos tenham sido recentemente implicados na antinocicepção induzida pelo medo (Coimbra *et al.*, 1992; Coimbra & Brandão, 1997).

Existem várias evidências demonstrando que o bulbo rostroventral representa o principal relé das influências modulatórias da dor, através de conexões com neurônios da SCP, via funículo dorsolateral. Assim, foi demonstrado que a inibição de respostas neuronais no corno dorsal à estimulação nociva produzida por ativação química ou elétrica da SCP pode ser bloqueada através de lesões ou da aplicação de anestésicos locais no bulbo rostroventral (Chung *et al.*, 1987). Opióides causam efeito direto nos neurônios de projeção SCP-Bulbo rostroventral através dos receptores opióides δ e μ (Wang & Wessendorf, 2002). Há evidências que interação de receptores opióides em

múltiplos sítios do encéfalo medeiam o efeito analgésico da morfina na SCP (Taylor & Basbaum, 2003).

Fisiologicamente, três classes distintas de neurônios podem ser identificadas no bulbo rostroventral (Fields *et al.*, 1988). As células ON, que parecem exercer uma ação facilitatória na transmissão nociceptiva. As células ON são inibidas pelos opióides. O segundo tipo celular que pode ser caracterizado são células OFF, ativadas pelos opióides e sua atividade tem um efeito inibitório na transmissão nociceptiva (Fields *et al.*, 1991). O terceiro tipo celular são as células neutras, as quais não apresentam mudanças na sua atividade após estímulos nocivos locais, aplicados por meio do teste de retirada de cauda. Os axônios das células ON e OFF projetam-se através do funículo dorsolateral para as lâminas I, II e V da medula espinal (Fields *et al.*, 1995). Bederson e colaboradores em 1990, observaram que após a reversão do efeito antinociceptivo da morfina pelo tratamento de ratos com naloxona, ocorria aumento da resposta nociceptiva (diminuição na latência de retirada da cauda comparada à latência basal antes do tratamento com morfina), e que esta responsividade aumentada estava associada à alta taxa de disparos das células ON. Em seguida, Kaplan & Fields, em 1991, demonstraram que essa resposta poderia ser atenuada ou revertida por meio da microinjeção de anestésico local no bulbo rostroventral. Estes dados demonstram que a diminuição da latência no teste de retirada de cauda após a administração de naloxona envolve a ativação de um neurônio excitatório do bulbo rostroventral, e não somente a remoção de um efeito inibitório descendente.

Quando a ativação de neurônios na SCP produz antinocicepção, peptídeo opióides endógenos são secretados no bulbo rostroventral e inibem seletivamente células ON. Esta ação parece ser crítica para a antinocicepção induzida pela morfina na SCP (Pan & Fields, 1996).

O fenômeno de antinocicepção induzida por estimulação central demonstrou, ainda, similaridades com a já conhecida antinocicepção por opióides. A observação de que os sítios supra-espinais onde a morfina era efetiva em produzir antinocicepção coincidiam com os sítios que produziam antinocicepção quando estimulados, indicam que a morfina era capaz de ativar vias descendentes inibitórias. A ativação dessas vias pela morfina parece ocorrer através da supressão da atividade de um interneurônio GABAérgico inibitório, que inibe a ativação das vias descendentes. Portanto, a ativação da via descendente inibitória pela morfina ocorre por um mecanismo de desinibição (Basbaum & Fields, 1979).

Estudos neurofisiológicos realizados na década de 60 demonstraram que a estimulação de fibras aferentes primárias, mielinizadas e de baixo limiar reduz a resposta dos neurônios do corno dorsal da medula espinal aos nociceptores não mielinizados, enquanto que o bloqueio da condução nas fibras mielinizadas aumenta a resposta dos neurônios do corno dorsal da medula espinal. A partir desta idéia foi introduzida a teoria de controle do portão. De acordo com essa teoria, os neurônios envolvidos na modificação dos impulsos dos neurônios do corno dorsal da medula espinal compreendem as fibras de baixo limiar Aα /Aβ mielinizadas e fibras C não mielinizadas, neurônios de projeção do corno dorsal que organizam e distribuem os sinais para o encéfalo, e interneurônios inibitórios, os quais inibem os neurônios de projeção. Os neurônios de projeção são diretamente ativados por fibras de baixo limiar mielinizadas e não mielinizadas. A diferença crucial nos impulsos dessas duas classes de fibras aferentes consiste no fato de que as fibras mielinizadas também ativam os interneurônios inibitórios, enquanto que as fibras não mielinizadas suprimem sua atividade. Então, quando fibras mielinizadas de baixo limiar são ativadas, a atividade dos neurônios de projeção e a percepção da dor ficam reduzidas (Melzack & Wall, 1965).

Sabe-se que dor de origem visceral e somática pode ser prontamente inibida com a estimulação estruturas periventriculares, que se estendem rostralmente em direção ao encéfalo. Não obstante, estudos em que se utilizaram neurotraçadores têm demonstrado profusas conexões partindo das áreas periventricular/periaquedutal, em direção ascendente e descendente permitindo o estabelecimento de sinapses, por exemplo, em núcleos da formação reticular, como o núcleo magno da rafe e núcleo reticular adjacente paragigantocelular (extensamente descritos na literatura especializada como sendo importantes sítios, cuja estimulação induz antinocicepção), os quais se projetam ao corno posterior da medula espinal.

Assim, pode-se resumir a proposta para o sistema endógeno de inibição de dor: há o mecanismo de controle na medula, onde as aferências podem ser inibidas por estimulação de fibras táteis ou por neurônios da via inibitória descendente (Melzack & Wall, 1965), composta por neurônios da substância cinzenta periaquedutal (rica em neurônios opioideérgicos) que se projetam para o núcleo magno da rafe, cujas fibras descem pelo funículo dorso lateral até a lâmina II do corno dorsal da medula espinal (Watkins & Mayer, 1982). Esses neurônios podem agir liberando serotonina, atuando em interneurônios que liberam opiéides, promovendo inibição pré- ou pós-sináptica.

Neurônios do *locus coeruleus* (que recebem aferências da substância cinzenta periaquedutal) também participam de tal mecanismo, liberando noradrenalina que, em receptores α_2 -adrenérgico inibem a transmissão sináptica (Furst, 1999). No entanto, deve-se lembrar que o controle da dor não é necessariamente apenas inibitório. A transmissão nociceptiva também está sujeita a modulação descendente facilitatória que pode favorecer o desenvolvimento de condições patológicas como alodinia (dor evocada por um estímulo não-nocivo) e hiperalgesia (maior intensidade da dor associada a um estímulo nocivo leve).

OPIÓIDES ENDÓGENOS E CONTROLE ANTINOCICEPTIVO

A preocupação com os neurotransmissores envolvidos na mediação de processos antinociceptivos tem despertado o interesse de muitos neurocientistas, sendo intensiva a investigação dos pontos do neuroeixo em que a percepção da dor pode ser eficientemente modulada. Nos últimos anos têm-se acumulado evidências sugestivas da ação de opióides em determinados sítios do sistema nervoso periférico e central. Receptores opióides foram identificados em terminais de pequeno diâmetro na medula espinal e sobre o corpo de neurônios localizados no gânglio da raiz dorsal do nervo espinal (Stein *et al.*, 1990). Sob uma vasta gama de condições experimentais e clínicas, uma série de opióides e seus antagonistas evidenciam efeitos analgésicos e algésicos periféricos (Russel *et al.*, 1987; Stein *et al.*, 1991; Czlankowski *et al.*, 1993).

Dois pentapeptídios que competem com drogas semelhantes à morfina pela sua ligação a receptores no encéfalo e que possuem ações farmacológicas estreitamente semelhantes às da própria morfina foram isolados do encéfalo em 1975, por Kosterlitz & Hughes. Esse trabalho esclareceu o modo de ação da morfina, que se baseava na sua capacidade de imitar as ações de uma família de mediadores endógenos, denominados então, peptídeos opióides por sua ação semelhante a dos opiáceos, como a morfina. Os peptídeos opióides são codificados por três genes distintos, sendo os seus produtos a pré-pró-opiomelanocortina, a pré-pró-enkefalina e pré-pró-dinorfina. Dentre os peptídeos endógenos, os mais conhecidos são as enkefalinas, (met-enkefalina e a leu-enkefalina), que são pentapeptídios; as endorfinas, como a β -endorfina (peptídio com 31 aminoácidos); e a dinorfina. Recentemente, foi descoberta uma quarta classe de peptídio opióide, a nociceptina (Henderson & McKnight, 1997).

Estudos em anfíbios, *Rana pipiens*, mostram que, tal como em mamíferos, o sistema opióide endógeno modula o processamento central de informações nocivas (Stevens, 1988).

Os receptores de peptídeos opióides foram descobertos em 1973 por estudos independentes realizados por Pert & Snyder, nos EUA, e por Terenius, na Suécia. A ligação de peptídeos endógenos com receptores específicos elicia antinocicepção. Peptídeos opióides têm importante envolvimento na dor, principalmente como substância analgésica, mas contrariamente alguns podem exercer função algésica por ação em receptores diferentes (Bennett, 1988).

São propostas três classes de receptores opióides definidas como: μ , δ e κ . Os receptores μ têm sido classificados em dois distintos subtipos μ_1 e μ_2 , os receptores δ em δ_1 e δ_2 . Os receptores κ estão divididos nos subtipos κ_1 , κ_2 ou κ_3 . Todos esses subtipos modulam a percepção da dor, com exceção do receptor κ_2 , que não tem sido adequadamente estudado. Sistemas supra-espinais têm sido descritos envolvendo os receptores μ_1 , enquanto μ_2 , κ_1 e δ_1 modulam a dor na região espinal. Além de possuírem capacidade de agir independentemente, os vários sistemas também interagem sinergicamente entre si. Assim, o alívio da dor envolve a complexa interação dos seis últimos sistemas receptores (Pasternak, 1993).

Adicionalmente às três classes de receptores supramencionadas é proposta uma quarta classe, os receptores opióides ϵ (Narita & Tseng, 1998), que ainda não se encontram totalmente caracterizados. Entretanto, a existência desse receptor tem sido controversa e o mesmo geralmente não é reconhecido como um membro da família de receptores de peptídeos opióides. Contudo, resultados de estudos farmacológicos, fisiológicos e de ligantes de receptores opióides indicam claramente a presença de receptores opióides ϵ , que são distintos dos receptores opióides μ , δ ou κ . O receptor ϵ é estimulado supra-espinalmente pelo peptídeo opióide endógeno beta-endorfina, que induz a liberação de meta-enkefalina, que, em retorno, age nos receptores opióides δ_2 para produzir antinocicepção (Tseng, 2001).

Receptores opióides estão distribuídos diferentemente na medula espinal. Os receptores μ localizam-se de forma altamente concentrada em camadas superficiais do corno dorsal em toda a medula espinal, os receptores δ estão mais difusamente distribuídos na substância cinzenta, principalmente localizados nas porções cervical e torácica, enquanto os receptores κ estão presentes em elevadas quantidades nas camadas superficiais da porção lombo-sacral e essas densidades diminuem nos níveis mais altos da medula espinal. Processo semelhante é observado com relação a localização dos peptídeos opióides derivados da pró-enkefalina e pró-dinorfina, enquanto pró-enkefalinas encontram-se preferencialmente localizados na porção sacral da medula pró-dinorfinas estão concentrados na medula espinal cervical (Quirion, 1984).

Os receptores opióides μ Parecem ser indiferentemente ativados por estímulos nocivos térmicos, por pressão e por estímulo visceral, os receptores δ provavelmente estão mais envolvidos com estímulos nociceptivos térmicos, enquanto sítios de ligação

de opióides ? estão associados a estímulos nociceptivos de dor visceral (Quirion, 1984).

Há evidência do envolvimento de receptores μ e δ na antinocicepção opióide induzida pelo estresse (Fanselow *et al.*, 1989 b) e os receptores δ estão envolvidos na antinocicepção induzida pelo medo (Fanselow *et al.*, 1989 a).

Estudos sugerem a participação de neurônios encefalinérgicos da substância gelatinosa no controle da transmissão nociceptiva, inibindo as aferências primárias A δ e C, através de projeções pré-sinápticas sobre o seu primeiro contato neural com células nociceptivas localizadas no núcleo espinal do nervo trigêmeo e, muito provavelmente, no corno posterior da medula espinal (Jessel & Iversen, 1977). Esse mecanismo tomaria como base o bloqueio do influxo de íon cálcio em terminais axônicos de células do gânglio da raiz dorsal, por onde trafegam impulsos nociceptivos, realizado por neurotransmissores opióides, como a encefalina e endorfinas (Mudge *et al.*, 1979). Há evidências do envolvimento de íons cálcio em processos nociceptivos e antinociceptivos, incluindo sua participação no efeito analgésico produzido por opióides (Prado, 2001).

O fato de que a microinjeção de opióides (Murfin *et al.*, 1976) ou a estimulação elétrica da SCP (Basbaum *et al.*, 1977) geram antinocicepção (por meio de vias que compõem o funículo dorsolateral) e hiperpolarizam alguns neurônios localizados no corno dorsal da medula espinal (Liebeskind *et al.*, 1973) estão em consonância com o ponto de vista de alguns autores segundo os quais antinocicepção opióide e induzida por estimulação elétrica da SCP possuem um substrato neural comum (Mayer & Liebeskind, 1974; Mayer & Hayes, 1975; Mayer & Price, 1976). O substrato anatômico dessas duas formas de antinocicepção pode, entretanto, não ser completamente similar. Em alguns estudos, encontrou-se que há sítios na SCP que são mais propensos a antinocicepção induzida por estimulação elétrica do que a eliciada por ativação de mecanismos estritamente opióides, pois esses efeitos podem ser antagonizados pela depleção de monoaminas (Tenen, 1968).

Tem sido sustentado que a substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPv) consiste em uma das mais importantes áreas na organização de respostas analgésicas no encéfalo (Reynolds, 1969; Mayer & Liebeskind, 1974). Há considerável evidência de que a antinocicepção induzida pela estimulação elétrica da SCPv primeiro ativa fibras contendo peptídeos opióides, as quais se projetam ao núcleo magno da rafe e a outras estruturas da formação reticular (Yaksh, 1979; Basbaum & Fields, 1984). As

fibras serotoninérgicas da rafe, por sua vez, projetam-se, por meio do funículo lateral, a neurônios do corno dorsal da medula espinal, produzindo efeito analgésico que não é reversível pela naloxona (Cannon *et al.*, 1980). Relatos na literatura sugerem que pelo menos parte dessa antinocicepção não opióide poderia ser mediada por mecanismos serotoninérgicos, pois é inibida por administrações sistêmicas de metisergida, um bloqueador inespecífico de receptores para serotonina (Nichols *et al.*, 1989).

Há evidências anatômicas de células da SPC que se projetam para o núcleo magno da rafe que contêm 5-HT. Este núcleo é a fonte de um sistema serotoninérgico descendente (Chance, 1980). Microinjeção de 5-HT no núcleo magno da rafe causa antinocicepção no teste de retirada de cauda, e tanto a microinjeção de um inibidor de recaptação de 5-HT como de um agente liberador de 5-HT causam antinocicepção. Além disso, os efeitos de estimulação elétrica na SCP são bloqueados por microinjeção de um antagonista de 5-HT dentro do núcleo magno da rafe (Roberts, 1984).

SISTEMA SEROTONINÉRGICO

A serotonina (5-HT) está envolvida em uma série de comportamentos (Wilkinson & Dourish, 1991). Acredita-se que esse neurotransmissor modula a atividade de muitas áreas do sistema nervoso central, interagindo com seus diversos subtipos de receptores, os quais apresentam propriedades distintas (Hen, 1992; Zifa & Fillion, 1992). A classificação elaborada por Bradley e colaboradores em 1986 dividia os receptores serotoninérgicos em três famílias: 5HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃, sendo que os receptores de 5HT₁ estariam subdivididos em quatro subtipos, assinalados de A a D. Contudo, evidências mais recentes indicam que há mais grupos que os anteriormente mencionados e que dentro de cada grupo há mais subtipos de receptores. O critério adotado para a nova classificação inclui informações operacionais (baseadas na ação de drogas), transacionais e estruturais. Por meio dessas investigações, foi possível distinguir receptores de 5-HT₁ a 5-HT₅, que são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G, excetuando-se os receptores 5-HT₃, que pertencem a uma superfamília de receptores ligados ao canal iônico (Humphrey *et al.*, 1993).

Os receptores serotoninérgicos foram classificados em: família 5-HT₁, que compreende os subtipos 5-HT_{1A} (Fargin *et al.*, 1988), 5-HT_{1B} (Maroteaux *et al.*, 1992), 5-HT_{1Da} e 5-HT_{1Bb} (Hartig *et al.*, 1992), 5-HT_{1E} (McAllister *et al.*, 1992; Zgombick *et al.*, 1992) e 5-HT_{1EB} ou 5-HT_{1F} (Amlaiky *et al.*, 1992; Adham *et al.*, 1993); superfamília 5-HT₂, que contém os subtipos 5HT₂ (Pritchett *et al.*, 1988), 5-HT_{1C} (Julius *et al.*, 1988), e um outro subtipo que se assemelha ao 5-HT₂ (Fouget *et al.*, 1992). Os receptores 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B}, clonados e caracterizados na década de 90, não pertencem às famílias 5-HT₁ ou 5-HT₂, devendo constituir um novo grupo (Plassat *et al.*, 1992; Mattes *et al.*, 1993). Sabe-se que as características operacionais dos receptores 5-HT₄, diferem daquelas apresentadas pelos receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ (Humphrey *et al.*, 1993).

O receptor 5HT_{1B} é expresso predominantemente nos núcleos da base sendo encontrados em certas espécies animais, de onde provavelmente excluem-se os seres humanos, nos quais sua ausência seria suprida por receptores 5HT_{1D} (Hoyer, 1988; Hoyer *et al.*, 1988, 1990). Esse fato levou à especulação de que os receptores 5-HT_{1D} seriam a contrapartida evolutiva dos receptores 5-HT_{1B} em animais que surgiram mais recentemente na escala evolutiva, onde aqueles são representados por múltiplas

populações (Middlemiss *et al.*, 1990). Também discute-se a presença de receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1Da} predominantemente em terminais axônicos, enquanto sua expressão estaria baixa ou ausente na região somato-dendrítica (Boschert *et al.*, 1994).

O termo 5-HT₂ foi proposto para os receptores D, que haviam sido descritos por Gaddum & Picarelli, em 1957. Esses receptores medeiam uma série de ações periféricas da serotonina e possuem alta afinidade por antagonistas serotoninérgicos, como a cetanserina, metisergida, mianserina e metergolina (Peroutka & Snyder, 1979; Motta *et al.*, 1992). Entretanto, de acordo com a nova classificação, a família 5HT₂ inclui os receptores 5-HT_{2A} (o clássico receptor 5-HT₂), 5-HT_{2B} (recentemente clonado) e 5HT_{2C} (anteriormente descrito como receptor 5HT_{1C}). Esses receptores ativam a fosfolipase C e a alta afinidade pela cetanserina não é mais considerada um critério absoluto para inclusão nesse grupo (Humphrey *et al.*, 1993).

O receptor 5HT_{1A} está envolvido em processos antinociceptivos (Buritova *et al.*, 2003). Está estabelecida a larga magnitude da ativação do receptor 5HT_{1A} como um novo mecanismo molecular de antinocicepção central profunda (Bardin *et al.*, 2003). Estudos indicam que o receptor 5-HT_{1A} está envolvido em profunda antinocicepção do nervo infraorbital após constrição crônica através da injeção intraperitoneal de F 13640, agonista do receptor 5-HT_{1A} (Deseure *et al.*, 2002).

Mecanismos monoaminérgicos estão envolvidos na antinocicepção induzida por estimulação de sítios ventrais na SCP, sendo esta facilitada por aplicações periféricas de dopamina e serotonina, e inibida por noradrenalina (Akil & Liebeskind, 1975). Mecanismos serotoninérgicos e opióides coexistem na SCP, mediando respostas antinociceptivas em diferentes sítios dessa estrutura (Nichols *et al.*, 1989), e tanto a serotonina quanto a noradrenalina medeiam, na medula espinal, os efeitos antinociceptivos resultantes da microinjeção de morfina em sítios da SCP (Yaksh, 1979); dados corroborados pelo antagonismo, exercido pela metisergida, da antinocicepção induzida por estimulação elétrica da SCP (Foong *et al.*, 1985). Há evidências de que a ativação dos receptores 5-HT₂ pode estar envolvida na antinocicepção induzida pela estimulação do tecto mesencefálico (Coimbra *et al.*, 1992; Coimbra & Brandão, 1997). Com efeito, evidências morfológicas e psicofarmacológicas da participação da serotonina na antinocicepção induzida pela estimulação encefálica aversiva no teto mesencefálico, especificamente da substância cinzenta periaquedutal dorsal e das camadas profundas do colículo superior são encontrados na literatura (Coimbra, 1995). A ativação dos receptores 5-HT₂/5-HT_{1C}

parece estar implicada na antinocicepção induzida pela estimulação do colículo inferior (Castilho & Brandão 2001).

Evidências sugerem que 5-HT, seus receptores, e suas interações com outros neurotransmissores são essenciais para a nocicepção e antinocicepção (Spath, 2002). Receptores serotoninérgicos influenciam o efeito antinociceptivo da droga antidepressiva mirtazapina por uma combinação com receptores opióides subtipo μ_3 (Schreiber *et al.*, 2002). A ativação de receptores 5-HT_{2A/2C} medeia antinocicepção em modelos de dor sustentada em ratos, tais como dor inflamatória e dor neuropática, e receptores também muscarínicos, na medula espinal, estão envolvidos nesta ação (Sasaki *et al.*, 2003).

ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA POR SUBSTÂNCIA DOCE

Há evidências que o consumo de substâncias doces produz antinocicepção em animais (Blass & Shide, 1994; Segato *et al.*, 1997; Anseloni *et al.*, 1999; Irusta *et al.*, 2001) e em humanos (Blass & Hoffmeyer, 1991; Abad *et al.*, 1996; Mercer & Holder, 1996). De fato, soluções concentradas de sacarose parecem reduzir o choro e outros comportamentos relacionados com a dor em bebês saudáveis, e a sacarose pode ser um analgésico útil e seguro para intervenções cirúrgicas de pequena magnitude em toda infância (Haouari *et al.*, 1995; Abad *et al.*, 1996; Skogsdal *et al.*, 1997). De fato, o uso de sacarose oral é recomendado em larga extensão em procedimentos dolorosos nas unidades de tratamentos intensivos neonatais (Mitchell & Walman, 2003).

Muitos registros indicam que mecanismos mediados por neurotransmissores opióides e não opióides mostram importante envolvimento na antinocicepção induzida por estimulação elétrica (Mayer & Price, 1976; Nichols *et al.*, 1989), antinocicepção induzida pelo medo (Coimbra *et al.*, 1992; Coimbra & Brandão, 1997), defesa (Coimbra *et al.*, 1996, 2000; Eichenberger *et al.*, 2002) e no consumo de comida, especialmente na ingestão de substâncias doces (Reid, 1985; Levine & Billington 1989). Em animais e em humanos, agonistas opióides, tais como endorfinas, e mesmo a morfina, aumentam a ingestão e a preferência por substâncias adocicadas e líquidas (Cooper *et al.*, 1985 a, b; Czirr & Reid, 1986), ao passo que antagonistas opióides, tais como naltrexona, produz o efeito oposto (Fantino *et al.*, 1986). Há evidências de que o inverso também ocorre, pois o consumo de substâncias doces aumenta a atividade de neurônios opióides no sistema nervoso de animais (Dum *et al.*, 1983), assim como a concentração de opióides endógenos no soro humano (Melchior *et al.*, 1991). O consumo de sacarose induz a liberação de opióides endógenos (Pomonis *et al.*, 2000; Marks-Kaufman *et al.*, 1989).

Foi demonstrado que substâncias doces podem, ainda, aumentar as propriedades analgésicas de opiáceos (Lieblich *et al.*, 1983; Marks-Kaufman *et al.*, 1988; Roane & Martin, 1990; Kanarek *et al.*, 1991, 1997; D'Anci *et al.*, 1996, 1997). Estudos recentes confirmam essa hipótese, sendo que a ingestão de alimentos e fluidos doces age no sistema nervoso central mediando a ação de drogas opióides (Kanarek *et al.*, 2001). De fato, substâncias agradáveis, como sacarose e sacarina podem interagir com sistema opióide, modificando a sensibilidade à dor (Davis *et al.*, 1956; Lieblich *et al.*, 1983;

Blass & Fitzgerald, 1988; Marks-Kaufman, 1988; Klein & Green, 1988; Roane & Martin, 1990). A administração oral de sacarose pode ativar o sistema opióide endógeno (Mitchell & Waltman, 2003).

A relação bidirecional entre opióides endógenos e ingestão de substâncias doces tem motivado muitos pesquisadores a examinar a possível ligação entre a ingestão dessas substâncias e antinocicepção. Alguns estudos mostraram que a ingestão de soluções doces (tipo sacarose, glicose, frutose ou dextrose-sacarina) aumenta a latência de retirada de pata no teste de placa quente (Blass *et al.*, 1987; Holder, 1988; Blass & Shide, 1994). Esta antinocicepção induzida por substâncias doces é revertida por doses mínimas de naltrexona, sugerindo o envolvimento de opióides endógenos neste processo (Blass *et al.*, 1987). Uma recente descrição na literatura mostrou evidências da modulação de receptores opióides μ e δ , causado pela ingestão de alimento doce (Kanarek *et al.*, 1997).

Embora tenhamos que considerar muitas evidências que o consumo de soluções de sacarose ou a ingestão de uma dieta doce muda a sensibilidade nociceptiva pela ativação de mecanismos opióides (Davis *et al.*, 1956; Frye *et al.*, 1992, 1993), não descartamos a possibilidade do envolvimento de outros neurotransmissores, tais como serotonina e outros mediadores químicos, neste processo, ou mesmo a ação de conjunta de neurotransmissores nesse processo antinociceptivo como ocorre, por exemplo, com a antinocicepção induzida por morfina. Com efeito, a injeção intracerebral de serotonina aumenta a antinocicepção induzida por morfina (Dehpour *et al.*, 2000).

Mecanismos colinérgicos, mediados por receptor nicotínico, pode exercer um importante papel na elaboração da antinocicepção induzida por substâncias doces (Irusta *et al.*, 2001), além do sabido envolvimento do sistema opióide (Segato *et al.*, 1997). Relatos recentes na literatura indicam o envolvimento da serotonina, e de receptores 5-HT₂, nas reações antinociceptivas (Coimbra *et al.*, 1992; Coimbra & Brandão, 1997; Rosa *et al.*, 1998). Estas descobertas podem ser um indicativo para concentrarmos-nos no estudo do envolvimento da serotonina, além de neurotransmissores opióides, na mediação neural da antinocicepção induzida por substâncias doces.

A literatura é controversa quanto às alterações que a substância doce provoca no limiar nociceptivo. Roane & Martin (1990) sugerem que o consumo crônico de substâncias doces (sacarose a 20% (p/v)) diminui o limiar nociceptivo no rato adulto e aumenta a potência da morfina, enquanto Kanarek e colaboradores (1991) mostram

evidências de que consumo crônico de solução de sacarose a 32% (p/v) não diminui a sensibilidade à dor nos animais. Segundo um recente relato, fenômeno antinociceptivo induzido pela aplicação de sacarose diretamente na língua pode ser idade-dependente (Anseloni *et al.*, 1999), sendo verificado o aumento do limiar nociceptivo em filhotes de tenra idade. Contudo, a antinocicepção induzida pela ingestão crônica de substâncias doces já foi constatada em ratos adultos (Bergmann *et al.*, 1984; Segato *et al.*, 1997; Irusta *et al.*, 2001).

Estas descobertas justificam o interesse em direcionarmos os nossos estudos no envolvimento do sistema serotoninérgico e de neurotransmissores opióides na mediação da antinocicepção induzida por substância doce.

O teste de retirada de cauda, utilizado neste estudo, é uma variação simplificada do método usado em humanos por Hardy *et al.*, 1940. Estes investigadores também usaram essa técnica em ratos (Hardy *et al.*, 1953, 1957). A aplicação de estímulos na cauda do animal provoca a retirada da cauda por um movimento rápido e vigoroso (Smith *et al.*, 1943). As vantagens deste teste são a simplicidade e a pequena variabilidade entre os animais no tempo de resposta medida sob um dado conjunto de condições controladas (Le Bars *et al.*, 2001).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar os processos antinociceptivos após a ingestão crônica de substâncias doces, como a sacarose, através do teste de retirada de cauda, assim como suas bases psicofarmacológicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar o envolvimento de opióides endógenos e da serotonina na antinocicepção induzida pela ingestão de substâncias doces, através do teste de retirada de cauda, assim como o recrutamento de alguns subtipos de receptores opióides e serotoninérgicos específicos neste processo antinociceptivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram usados ratos Wistar, *Rattus norvegicus*, machos, pesando entre 200-230g, no início do tratamento, fornecidos pelo biotério central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os animais foram mantidos individualmente ou em grupo de quatro por caixa em sala climatizada a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo o início do período claro às 7h e tiveram livre acesso à comida e água em todo o experimento. A manutenção dos animais e todos os procedimentos experimentais obedeceram às normas internacionais que regulamentam o uso de animais em laboratórios.

2. Dieta

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para cada grupo de oito animais (N=8). Os animais de cada grupo tinham acesso à comida padrão de laboratório (tabela 1) e, como única fonte líquida, tinham acesso a água (N=8) ou a uma solução de sacarose na concentração de 62,5g/L (N=8), ou de 125g/L (N=8) ou de 250g/L (N=8). As concentrações de sacarose foram determinadas com o objetivo de investigar a relação da concentração da sacarose com a antinocicepção.

A comida era oferecida sobre a tampa das caixas e a fonte líquida era colocada em garrafas de vidro com tampas de borracha e bico de aço inoxidável. Os animais tiveram livre acesso à água e à comida em todo o experimento.

Tabela 1 – Características da ração padrão de laboratório fornecida em todo o tratamento, *ad libitum*, para *Rattus norvegicus* submetidos à ingestão crônica de água (controle) ou solução de sacarose como única fonte de líquido.

Composição Básica por kg					
Ácido Fólico	3mg	Vitamina A	24000UI	Proteína	mín. 22%
Colina	1200mg	Vitamina B1	8mg	Extrato etéreo	mín. 4%
Cobre	10mg	Vitamina B12	40mg	Cálcio	máx. 1,2%
Cobalto	1,5mg	Vitamina B2	30mg	Fósforo	mín. 0,8%
Ferro	50mg	Vitamina B6	14mg	Matéria fibrosa	máx. 10%
Iodo	2mg	Vitamina D	4000UI	Matéria mineral	máx. 10%
Magnésio	70mg	Vitamina E	60UI	Umidade	máx. 13%
Selênio	0,10mg	Vitamina K	6mg	Gordura	máx. 6,4%
Zinco	70mg	Pantetonato de cálcio	50mg		
		Niacina	80mg		
		Biotina	0,10mg		

3. Testes Antinociceptivos

Após três dias de habituação no biotério da FMRP-USP, os animais foram submetidos a um novo período de habituação, por outros três dias, ao contentor cilíndrico usado nos testes de antinocicepção. Os animais foram testados para antinocicepção, usando-se o teste de retirada de cauda, com analgesímetro desenvolvido pela Insight (Ribeirão Preto, Brasil). O animal era colocado em um tubo de acrílico (Stoelting, E.U.A.) e a sua cauda disposta transversalmente sobre um fio de níquel-cromo em espiral (Figura 3), o qual era aquecido pela passagem de uma corrente elétrica. A corrente aumentava a temperatura do fio de níquel-cromo na proporção de 9°C/s. Um pequeno ajuste da corrente era feito, se necessário, no início do experimento para assegurar que a latência basal de retirada de cauda fosse estabelecida entre 2,5 e 3,5s. As três medidas basais de latência de retirada de cauda eram tomadas em um intervalo de 5min. Se o animal não apresentasse reflexo de retirada de cauda após 6s, o aparelho era desligado e a cauda era removida para prevenir danos à pele (Prado & Roberts, 1985). Os testes nociceptivos foram realizados no início do ciclo claro, às 7h. Todas as latências de retirada de cauda foram normalizadas por um índice de analgesia (IA) usando a fórmula:

$$IA = \frac{(\overline{LRC}_{\text{teste}}) - (\overline{LRC}_{\text{controle}})}{6 - (\overline{LRC}_{\text{controle}})}$$

Figura 3 - Fotografia de um animal durante a realização do teste de retirada de cauda.

4. Drogas

Neste estudo foram utilizadas sacarose (Sigma), naltrexona (Sigma), naloxonazina (RBI), metisergida (RBI) e cetanserina (RBI). Os antagonistas farmacológicos foram diluídos em solução salina (NaCl a 0,9% (p/v)) (Sigma). A solução fisiológica usada como veículo para os antagonistas também foi usada como controle.

Imediatamente depois dos registros dos valores das linhas de base, os animais (grupos independentes) foram submetidos à ingestão de sacarose ou de água, e após o tratamento crônico (14 dias) foi-lhe administrado intraperitonealmente (i.p.) 1mg/kg, 2mg/kg ou 3mg/kg de naltrexona; 10mg/kg, 20mg/kg ou 30 mg/kg de naloxonazina; 1mg/kg, 2mg/kg ou 3mg/kg de metisergida; 1mg/kg, 2mg/kg ou 3mg/kg de cetanserina ou solução salina (NaCl a 0,9% (p/v)) (os antagonistas farmacológicos foram dissolvidos em salina fisiológica imediatamente antes do uso).

Os efeitos da administração das drogas na antinocicepção induzida por substâncias doces foram avaliados por meio de uma nova medida de latência de retirada de cauda feita 15min após a administração de naltrexona, metisergida, cetanserina ou salina, e 24h após o pré-tratamento de naloxonazina, tempo em que a naloxonazina bloqueia seletiva e irreversivelmente os receptores opióides μ_1 (Hahn & Pasternak, 1982; Johnson & Pasternak, 1984; Ling *et al.*, 1986). Como controle adicional, grupos independentes de animais foram tratados com água (14 dias) e receberam o pré-tratamento de salina, naltrexona, metisergida ou cetanserina nas doses maiores usadas nos experimentos prévios. As latências de retirada de cauda foram tomadas após o bloqueio de receptores opióides e/ou serotoninérgicos, como descrito acima, com o objetivo de investigar os mecanismos intrínsecos dos antagonistas farmacológicos usados neste trabalho no limiar de nociceptivo.

5. Procedimento

Experimento 1

Essa parte do experimento consistia na determinação da concentração mínima de sacarose capaz de induzir antinocicepção. Os animais foram distribuídos aleatoriamente e mantidos individualmente nas caixas.

Inicialmente, os animais foram submetidos a um período de habituação ao biotério da FMRP-SP por três dias. Depois disso, eles foram submetidos a um novo período de habituação à manipulação pelo pesquisador e ao contentor cilíndrico por outros três dias (5min/dia dentro do aparelho). Após este procedimento, eles foram submetidos a uma situação experimental, que consistia no acompanhamento da linha de base no teste de retirada de cauda, seguida da administração oral de água (grupo controle) ou de solução de sacarose, nas concentrações de 62,5g/L, 125g/L ou 250g/L, *ad libitum*, e comida padrão oferecida à vontade. Finalmente, foi realizada uma nova medida de latência de retirada de cauda no aparelho para teste de retirada de cauda para determinar o limiar nociceptivo após o consumo crônico (14 dias) das soluções de sacarose nas diferentes concentrações, ou de água. A concentração mais expressiva de sacarose (determinada pela curva dose-efeito) capaz de induzir antinocicepção foi padronizada para a realização de estudos subsequentes. Considerando o comportamento social dos ratos, outros experimentos foram realizados com animais agrupados (quatro por caixa).

As quantidades de ração e de líquido ingeridas pelos animais foram acompanhadas diariamente, assim como o ganho de peso.

Experimento 2

Esta etapa do trabalho consistiu em tratar cronicamente os animais (14 dias) com solução de sacarose na concentração capaz de induzir antinocicepção, determinada pela curva dose-efeito, para investigar o envolvimento de receptores opióides e serotoninérgicos na antinocicepção induzida por substância doce. Os animais foram distribuídos aleatoriamente e mantidos em grupo de quatro por cada caixa e submetidos a todos os procedimentos iniciais de habituação e determinação da linha basal. As drogas foram administradas i.p. em três concentrações diferentes para cada antagonistas e em grupos independentes. No décimo quarto dia foi realizada uma nova medida no aparelho para teste de retirada de cauda para determinação do limiar nociceptivo. Após esse procedimento seguiram-se os diferentes pré-tratamentos. Uma nova medida de latência de retirada de cauda foi feita 15min após a administração de naltrexona, metisergida, cetanserina ou salina e 24h após o pré-tratamento com naloxonazina.

6. Análise Estatística

Os dados experimentais para determinar a concentração de sacarose mais eficaz na antinocicepção e o envolvimento de opióides endógenos e da serotonina nas respostas antinociceptivas estudadas neste trabalho foram estatisticamente tratados pela análise de variância de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Duncan. Os dados obtidos em grupos independentes de animais foram analisados com o teste t para amostras não pareadas ou pela análise de variância (ANOVA), em caso de múltiplas comparações (Berquó *et al.*, 1981; Triola, 1997). Os testes de normalidade mostraram que os dados possuem distribuição de Gauss dentro dos intervalos estudados no presente trabalho em todos os casos. A distribuição gaussiana dos dados permitiu a utilização do teste paramétrico ANOVA para comparar simultaneamente as médias dos dados obtidos (Beiguelman, 1994). As análises estatísticas aqui descritas foram realizadas recorrendo-se aos programas SPSS (versão 6.0) e Sigma (versão 3.0).

RESULTADOS

A ingestão de sacarose induziu antinocicepção significativa em animais acomodados individualmente ou em grupo, a análise de variância mostrou diferenças significantes entre os grupos de animais mantidos conjuntamente [$F(2,28)=22,14$; $p<0,0001$] ou individualmente [$F(3,28)=9,15$; $p<0,001$]. A concentração de sacarose mais eficiente em causar efeito antinociceptivo foi a de 250g/L (teste Duncan; $N=8$; $p<0,05$) em ambos os experimentos. Essa concentração foi usada em outros estágios deste trabalho. A curva dose-efeito deste estudo preliminar é mostrada na figura 4, painéis A e B.

Figura 4 - Efeito da ingestão crônica de água (controle) ou soluções de sacarose, em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L), como única fonte de líquido, no limiar nociceptivo de *Rattus norvegicus*. O efeito da substância doce foi avaliado por meio do teste de retirada de cauda, em animais mantidos agrupados (A) e individualmente (B). As colunas representam a média e as barras o erro padrão da média (EPM), $N=8$. O símbolo * significa $p<0,05$, comparado com o controle, de acordo com o teste Duncan. O símbolo # representa diferença significativa quando comparado com solução de sacarose a 62,5g/L, de acordo com o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo + representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com solução de sacarose a 125g/L, de acordo com o teste Duncan, $p<0,05$.

É interessante observar nos animais acomodados individualmente que, embora, o efeito antinociceptivo significativo tenha sido verificado somente com o consumo de sacarose na solução mais concentrada (250g/L), a ingestão da solução de

sacarose nesta concentração foi menor do que nas soluções mais diluídas (62,5g/L e 125g/L) (Figura 5).

Figura 5 – Volume (mL) de ingestão crônica de água ou solução de sacarose, em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L), como única fonte de líquido, por *Rattus norvegicus* (animais mantidos individualmente) ao longo dos dias. Os dados foram determinados como média $\pm$ EPM, N=8 (grupos independentes). O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle, segundo o teste Duncan, $p < 0,05$. O símbolo + representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado com o grupo tratado com solução de sacarose a 125g/L, segundo o teste Duncan, $p < 0,05$. O símbolo ★ representa diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo tratado com solução de sacarose a 250g/L, segundo o teste Duncan, $p < 0,05$.

O consumo da solução de sacarose na concentração de 250g/L foi significativamente maior do que o de água pelo grupo controle. Houve efeito significativo do tratamento [$F(3,28)=24,44$; $p < 0,001$], assim como do tempo [$F(13,16)=6,16$; $p < 0,001$] e interação tratamento *versus* tempo no consumo das soluções [$F(39,44)=8,29$; $p < 0,001$]. A análise de variância mostrou efeito estatisticamente significativo do tratamento agudo (24h) e crônico (14 dias) após a ingestão de solução de sacarose, quando comparado com o grupo controle [$F(3,28)$ variando de 7,28 a 108,61; $p < 0,001$].

O teste *post hoc* mostrou diferenças entre os consumos diários das soluções de sacarose mais diluídas, quando comparadas com o consumo de água (teste Duncan; $p < 0,05$ em todos os casos); como mostra a figura 5. Houve diferenças estatisticamente significantes entre a ingestão diária da solução de sacarose na concentração de 250g/L em comparação com a ingestão de água após consumo agudo (24h) e crônico (48h e do 10º ao 14º dias de ingestão, de acordo com o teste Duncan; $p < 0,05$ em todos os casos). A ingestão da solução de sacarose 250g/L foi estatisticamente diferente da ingestão da solução de sacarose de 62,5g/L de 24h a 14 dias de consumo crônico (teste Duncan; $p < 0,05$ em todos os casos). Houve também diferenças estatisticamente significantes (aumento do consumo) entre a ingestão diária da solução de sacarose de 125g/L e água ao longo do tempo (teste Duncan; $p < 0,05$ em todos os casos). O consumo da solução de sacarose na concentração de 62,5g/L também aumentou em comparação com a ingestão da solução de sacarose de 125g/L de 24h, para o 6º dia e após o 8º e 11º dias de consumo (teste Duncan; $p < 0,05$ em todos os casos).

Esses dados indicam que o volume de ingestão de soluções de sacarose foi maior nas soluções menos concentradas para os animais acomodados individualmente. Dados confirmados pelo grupo com quatro animais acomodados por caixa e tratados cronicamente com soluções de sacarose em diferentes concentrações ou água, em que, também, foi menor o volume de ingestão de solução de sacarose nas mais altas concentrações (tabela 2).

Tabela 2 – Volume (mL) de ingestão crônica de água (controle) ou solução de sacarose em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L), como única fonte de líquido, por *Rattus norvegicus* (quatro animais por caixa) ao longo dos dias. Os dados são a média do volume total consumido por cada animal.

Tratamento	Dias													
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º	13º	14º
Água	43,75	33,75	41,25	36,25	38,75	37,50	38,75	45,25	43,75	47,50	46,25	43,75	43,75	47,50
Sacarose 62,5g/L	68,75	77,87	80,62	78,12	91,25	87,50	93,12	92,50	96,87	96,50	93,75	95,00	95,00	103,12
Sacarose 125g/L	56,25	51,25	75,00	58,12	93,12	86,87	93,75	70,62	72,50	71,87	80,00	80,00	77,50	75,00
Sacarose 250g/L	56,25	31,25	50,00	41,25	55,00	48,75	45,00	53,75	51,25	53,75	51,25	52,50	50,00	50,00

O estudo do consumo de ração padrão de laboratório (ver tabela 1) em animais tratados com substância doce mostrou que o efeito do tratamento foi significativo [F(3,28)=79,86; $p<0,001$], assim como do tempo [F(13,16)=7,22; $p<0,001$] e houve interação tratamento *versus* tempo [F(39,44)=4,78; $p<0,01$]. O teste *post hoc* mostrou diferenças entre o consumo diário de ração em animais tratados com sacarose (250g/L) em ambas as condições de acomodação, individualmente ou agrupados, quando comparado com o controle (ingestão de água) (Figura 6).

Figura 6 – Ingestão crônica de ração padrão de laboratório por *Rattus norvegicus* (mantidos individualmente ou em grupo de quatro por caixa) tratados com água ou solução de sacarose de 250g/L como única fonte de líquido em todo o tratamento. As colunas representam a média diária de consumo da ração e as barras, o EPM, N=8. O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo mantido individualmente e tratado com água, segundo o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo # representa diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo mantido individualmente e tratado com solução de sacarose de 250g/L, segundo o teste Duncan, $p<0,05$. O símbolo + representa diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo mantido conjuntamente e tratado com água, segundo o teste Duncan, $p<0,05$.

De fato, animais tratados com solução de sacarose comem quantidades menores de ração do que animais tratados com água (teste Duncan; $p < 0.05$ em todos os casos) como mostra a Figura 6. Esses dados foram confirmados pelo estudo da variação temporal do peso do corpo durante a ingestão crônica de substâncias doces (em concentrações diferentes) em animais mantidos individualmente ou agrupados nas caixas (Figura 7).

Figura 7 – Peso do corpo ao longo dos dias de *Rattus norvegicus* mantidos individualmente ou em grupo de quatro por caixa e submetidos à ingestão crônica de água ou solução de sacarose (250g/L) como única fonte de líquido. Os dados são média $\pm$ EPM, N=8 (grupos independentes). O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo de animais mantidos conjuntamente e tratados com água, de acordo com o teste Duncan, $p < 0,05$. O símbolo # representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo tratado com solução de sacarose a 250g/L e mantidos individualmente, de acordo com o teste Duncan, $p < 0,05$. O símbolo ★ representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo de animais mantidos individualmente e tratados com água, segundo o teste Duncan, $p < 0,05$.

A comparação entre roedores mantidos individualmente ou em grupos tratados com água ou solução de sacarose mostrou que o consumo da solução de sacarose a 250g/L causou um menor aumento do peso do corpo em animais acomodados em grupo do que nos acomodados individualmente, considerando o período de tratamento crônico com substância doce do quarto ao décimo quarto dia de ingestão (teste Duncan; $p < 0,05$ em todos os casos). Houve efeito significativo do tratamento [$F(3,28)=5,36$; $p < 0,01$], do tempo [$F(13,16)=126,98$; $p < 0,001$] e da interação tratamento *versus* tempo [$F(39,44)=6,07$; $p < 0,001$]. A análise de variância mostrou efeito significativo do tratamento de 48h ao 14º dia após a ingestão de água ou de sacarose [$F(3,28)$ variando de 4,40 a 12,11; $p < 0,05$]. O teste *post hoc* mostrou diferenças entre os pesos dos corpos em roedores agrupados após consumo diário de sacarose 250g/L quando comparado com a ingestão de água do 2º ao 9º dia de tratamento (teste Duncan; $p < 0,05$ em todos os casos).

Comparando o peso do corpo de ratos mantidos individualmente com ratos mantidos em grupo, tratados com solução de sacarose de 250g/L, o grupo de animais mantidos individualmente apresentou um maior peso corpóreo do 4º ao 14º dia de tratamento crônico com sacarose (teste Duncan; $p < 0,05$); não houve efeito significativo no peso do corpo de animais mantidos individualmente e tratados cronicamente com solução de sacarose a 250g/L, quando comparado com animais cronicamente e individualmente tratados com água de 24h ao 13º dia de tratamento (teste Duncan; $p < 0,05$ em todos os casos). A ingestão crônica de solução de sacarose de 250g/L por animais acomodados individualmente causou um significativo aumento no peso do corpo somente após os quatorze dias de consumo, quando comparado com o grupo tratado com água (Figura 7).

No estudo do ganho total de peso dos roedores após os quatorze dias de tratamento, em outros grupos de animais mantidos em grupo ou individualmente, a análise de variância mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de animais mantidos individualmente [$F(3,28)=9,53$; $p < 0,0005$] (Figura 8). Nos animais tratados com as soluções de sacarose mais concentradas (125g/L e 250g/L) foi significativo o efeito do tratamento (teste Duncan; $N=8$; $p < 0,05$, em ambos os casos), comparando com o grupo controle e com a solução de sacarose na concentração de 62,5g/L.

Figura 8 – Peso ganho após 14 dias de tratamento de *Rattus norvegicus* mantidos individualmente e submetidos à ingestão crônica de água ou solução de sacarose em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L), como única fonte de líquido. As colunas representam a média de peso ganho durante o tratamento e as barras o EPM, N=8. O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes, quando comparado com o grupo tratado com água, de acordo com o teste Duncan, $p < 0,05$. O símbolo # representa diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com solução de sacarose de 62,5g/L, segundo o teste Duncan, $p < 0,05$.

Entretanto, nos animais mantidos em grupos, a análise de variância não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [$F(3,28)=1,04$; $p > 0,05$], e não houve efeito do tratamento no ganho de peso dos roedores (teste Duncan; N=8; $p < 0,05$, em todos os casos) (Figura 9).

Figura 9 – Peso ganho após 14 dias de tratamento de *Rattus norvegicus* mantidos em grupo e submetidos à ingestão crônica de água ou solução de sacarose em diferentes concentrações (62,5g/L, 125g/L e 250g/L) como única fonte de líquido. As colunas representam a média de peso ganho durante o tratamento e as barras o EPM, N=8; teste Duncan, $p<0,05$ em todos os casos.

O estudo do envolvimento de opióides endógenos na antinocicepção induzida por substâncias doces foi feito por meio de bloqueadores farmacológicos de receptores opióides com naltrexona. A análise de variância mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [$F(3,26)=9,23$; $p<0,001$]. A administração i.p. de naltrexona antagonizou a antinocicepção induzida por substância doce, nas doses de 1mg/kg (teste Duncan; N=7; $p<0,05$), 2mg/kg (teste Duncan; N=7; $p<0,05$) e 3mg/kg (teste Duncan; N=7; $p<0,05$) (Figura 10 A).

Esses dados foram corroborados pelo pré-tratamento com o bloqueador do receptor opióide μ_1 , naloxonazina. A análise de variância mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos [$F(3,27)=16,43$; $p<0,0001$]. A naloxonazina reduziu a antinociceção induzida por substância doce nas doses de 10mg/kg (teste Duncan; $N=8$; $p<0,05$), 20mg/kg (teste Duncan; $N=8$; $p<0,05$) e 30mg/kg (teste Duncan; $N=8$; $p<0,05$). Esses dados seguem uma curva dose-efeito e sugerem o envolvimento de peptídeos opióides endógenos neste processo antinociceptivo. O receptor opióide μ_1 parece estar criticamente envolvido na antinociceção induzida pela ingestão crônica de substâncias doces (Figura 10 B).

Figura 10 –Índice de Analgesia do pré-tratamento com salina (NaCl a 0,9% (p/v), controle), naltrexona (1mg/kg, 2mg/kg e 3mg/kg) (A) ou naloxonazina (10mg/kg, 20mg/kg ou 30mg/kg) (B) no limiar nociceptivo após ingestão crônica (14 dias) de água ou solução de sacarose (250g/L). As colunas representam médias e as barras o EPM, $N=7$ (naltrexona); $N=8$ (naloxonazina). O símbolo * representa diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle, segundo o teste Duncan, $p<0,05$.

O estudo do envolvimento do sistema serotoninérgico neste processo foi feito com o pré-tratamento com metisergida, um antagonista não-específico da serotonina, ou com cetanserina, um antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT₂, em diferentes doses.

O bloqueio dos receptores serotoninérgicos diminuiu a latência no teste de retirada de cauda. A análise de variância de uma via mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [$F(3,26)=29,85$; $p<0,001$]. A metisergida antagonizou a antinocicepção induzida pela ingestão crônica de sacarose nas doses de 1mg/kg (teste Duncan; $N=7$; $p<0,05$), 2mg/kg (teste Duncan; $N=7$; $p<0,05$) e 3mg/kg (teste Duncan; $N=7$; $p<0,05$) (Figura 11 A). Estes dados foram confirmados com o pré-tratamento com cetanserina (Figura 11 B).

A análise de variância mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [$F(3,28)=9,94$; $p<0,001$]. O teste *post hoc* mostrou que o bloqueio de receptores serotoninérgicos diminuiu a antinocicepção induzida por substância doce com o pré-tratamento com cetanserina nas doses de 1mg/kg (teste Duncan; $N=8$; $p<0,05$), 2mg/kg (teste Duncan; $N=8$; $p<0,05$) e na dose maior de 3mg/kg (teste Duncan; $N=8$; $p<0,05$). Estes dados sugerem o envolvimento do sistema serotoninérgico e de receptores 5-HT₂/5-HT_{1C} na antinocicepção induzida pela ingestão crônica de sacarose.

Figura 11 –Índice de Analgesia do pré-tratamento com salina (NaCl a 0,9% (p/v), controle), metisergida (1mg/kg, 2mg/kg e 3mg/kg) (A) ou cetanserina (1mg/kg, 2mg/kg ou 3mg/kg) (B) no limiar nociceptivo após ingestão crônica (14 dias) de água ou solução de sacarose (250g/L). As colunas representam médias e as barras o EPM, $N=7$ (metisergida); $N=8$ (cetanserina). O símbolo * representa diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao controle, segundo o teste Duncan, $p<0,05$.

A administração periférica de naltrexona, naloxonazina, metisergida ou cetanserina nas doses maiores usadas nos experimentos, em que os roedores foram tratados com água não mostrou nenhum efeito significativo na linha de base (teste Duncan, $p < 0,05$ em todos os casos), como mostra a figura 12. Não foi observada nenhuma alteração motora nos animais submetidos aos antagonistas farmacológicos usados neste trabalho.

Figura 12 –Índice de Analgesia do pré-tratamento com salina (NaCl a 0,9% (p/v)), naltrexona (3mg/kg), naloxonazina (30mg/kg), metisergida (3mg/kg) ou cetanserina (3mg/kg) no limiar nociceptivo. As colunas representam médias e as barras o EPM, N=8; $p < 0,05$ em todos os casos, segundo o teste Duncan.

DISCUSSÃO

O presente trabalho foi conduzido com o intuito de investigar a neurotransmissão envolvida em processos antinociceptivos eliciados pela ingestão crônica de substâncias doces, como a sacarose, em *Rattus norvegicus* adultos. Na primeira etapa buscamos determinar a concentração da solução de sacarose mais eficiente para eliciar antinocicepção e as possíveis alterações que a ingestão crônica desta solução poderia causar no comportamento alimentar e ganho de peso desses animais durante o tratamento. A segunda etapa foi direcionada para o estudo dos neurotransmissores envolvidos nesse modelo antinociceptivo.

Os resultados apresentados sugerem que a ingestão crônica de substâncias doces, tais como sacarose, induz claramente um significativo efeito analgésico, e essas descobertas estão de acordo com a literatura (Bergmann *et al.*, 1985; Segato *et al.*, 1997; Irusta *et al.*, 2001). De forma interessante, nossos dados apontam para um significativo efeito antinociceptivo após ingestão de sacarose na solução mais concentrada (250g/L), comparada com as outras soluções menos concentradas usadas neste trabalho tanto em animais mantidos individualmente como mantidos em grupos de quatro por caixa (Figura 4). Esses dados indicam que, embora, tenha sido menor o consumo das soluções mais concentradas (Figura 5 e Tabela 2), a concentração de moléculas de sacarose na solução ingerida pode ser crucial para elevação dos limiares nociceptivos neste modelo experimental de antinocicepção.

Em ambos os grupos, o consumo de fonte líquida contendo sacarose foi inversamente proporcional à concentração da solução de sacarose, embora a antinocicepção induzida por substância doce tenha sido mais forte após a ingestão da solução mais concentrada. Esses dados sugerem, como observado por Bergmann e colaboradores em 1984, que não é o maior volume ingerido de solução doce *per se* o fator responsável por esse processo antinociceptivo.

Apesar do consumo das soluções de sacarose ter sido maior nas concentrações mais diluídas, Adicionalmente, os animais tratados com a solução de sacarose a 250g/L mostraram uma diminuição no consumo de ração padrão em relação ao grupo tratado com água, isso em ambos os grupos. Esse fenômeno pode ser devido à relação bidirecional entre peptídeos opióides endógenos e ingestão de substâncias doces, já que pesquisas indicam que estes peptídeos aumentam a ingestão de alimentos doces (Reid, 1985; Levine & Billington, 1989) e que o consumo de substâncias doces aumenta a atividade destes peptídeos no cérebro de rato (Dum *et al.*, 1983) e no plasma humano (Melchior *et al.*, 1991). Este efeito também pode estar relacionado com a propriedade

dos carboidratos de aumentar a liberação de serotonina, agindo via secreção de insulina e aumento na proporção de triptofano no plasma, sendo que a serotonina está envolvida em funções como controle do humor e no controle do comportamento alimentar em mamíferos (Lieberman & Wurtman, 1986; Wurtman, 1986; Wurtman & Wurtman, 1995).

Considerando que soluções mais concentradas de sacarose foram mais eficientes em aumentar o limiar nociceptivo do que o volume total da solução ingerida, é possível que o efeito antinociceptivo da substância doce seja parcialmente devido ao mecanismo gustatório evocado pelo contato da substância doce com os receptores gustatórios na língua dos roedores. Este ponto de vista é abordado em trabalhos anteriores por Blass & Fitzgerald em 1988, tendo estes autores realizado o estudo com outro modelo experimental (usando o teste de placa quente) e um protocolo em que o contato com a substância doce foi feito sem uma ingestão *per se*. Os autores gotejaram substância doce na língua dos ratos, que também mostram evidências de antinocicepção induzida por substância doce. O fato é que a ingestão crônica de substâncias doces altamente concentradas parece ser crucial para o aumento do limiar nociceptivo em nosso modelo de antinocicepção.

Outra possível explicação para as diferenças entre a intensidade da antinocicepção induzida pela substância doce ao longo dos dias pode ser a ocorrência de um provável desequilíbrio dos receptores que agem como mediadores durante a elaboração da antinocicepção induzida por substância doce. A ingestão crônica de soluções concentradas de sacarose altera a atividade do sistema opióide endógeno (Kanarek *et al.*, 2000), induzindo a liberação dos mesmos (Pomonis *et al.*, 2000) podendo causar mudanças transitórias no número e/ou na afinidade de opióides e/ou receptores monoaminérgicos no corno dorsal da medula espinal e nos núcleos da circuitaria endógena inibitória da dor localizados no tronco encefálico. De fato trabalhos anteriores têm demonstrado dependência da antinocicepção induzida por substâncias doces de receptores opióides (Davis *et al.*, 1956; Lieblich *et al.*, 1983; Blass & Fitzgerald, 1988). Este ponto de vista é confirmado por um estudo recente que mostra evidências interessantes da dependência da idade na antinocicepção induzida por sacarose devido ao desenvolvimento de mudanças nos mecanismos analgésicos endógenos já que nos primeiros dias pós-natal o processo antinociceptivo não foi observado, provavelmente por falta de maturação de circuitos descendentes de inibição da dor do tronco encefálico como de imaturidade do sistema opióide ao nascimento

(Anseloni *et al.*, 2002). Em trabalhos anteriores foi mostrado que a alta afinidade dos sítios de ligação dos receptores opióides ? na medula espinal pode triplicar em ratos de dois a quatorze dias de idade pós-natal, com a maioria deste aumento ocorrendo por volta do quinto dia (Zhang & Pasternak, 1981). Modificações no sistema opióide podem explicar alterações na modulação antinociceptiva.

Os resultados obtidos na investigação do consumo de nutrientes não adocicados indicam que o mesmo é reduzido em animais cronicamente tratados com substâncias doces. No entanto, não existe uma clara relação entre antinocicepção e o consumo de ração padrão. Foi possível constatar por meio da análise de variância para medidas repetidas, uma flutuação nas curvas obtidas de animais mantidos individual ou agrupadamente e submetidos a uma solução de sacarose de 250g/L, mostrando que a partir do terceiro dia de tratamento houve um consumo significativamente menor de ração pelos animais tratados com solução de sacarose. Além disso, o consumo de ração padrão pelos animais mantidos individualmente foi menor do que pelos animais mantidos em grupo para ambos tratamentos, como mostra a figura 6. Esses dados sugerem que a ingestão de soluções adocicadas pode afetar o consumo de nutrientes não-doces por parte dos animais. E, ainda, que a exposição a agentes estressores, como o isolamento social, também pode diminuir a ingestão de alimentos pelos animais, o que está em consonância com a literatura (Dess *et al.*, 1988; Konarska *et al.*, 1990; Harro *et al.*, 2001).

Shide & Blass (1989) sugerem que o estresse causa liberação opióide e que essa liberação, por sua vez, leva a um aumento preferencial por alimento doce. De fato, na análise do consumo das soluções doces entre os grupos de animais mantidos individualmente e os mantidos conjuntamente pode se verificar um maior consumo de soluções doces por parte dos animais mantidos sob isolamento (Figura 5 e tabela 2).

De forma interessante, o peso do corpo foi maior (e mais expressivo) nos animais acomodados individualmente do que nos mantidos agrupados, isso tanto para os animais tratados com solução de sacarose a 250g/L como para os tratados com água. Contudo, para ambos os grupos (mantidos individualmente ou agrupados), o peso do corpo ao final do tratamento foi maior nos roedores que consumiram solução de sacarose a 250g/L, como mostra a figura 7. Esse fato está de acordo com resultados obtidos por Kanarek e colaboradores em 1997.

O peso ganho após o décimo quarto dia de tratamento para os animais mantidos individualmente foi maior para as soluções de sacarose nas concentrações maiores.

Esse fato foi verificado também nos animais agrupados, contudo nesses a diferença não foi estatisticamente significativa (Figuras 8 e 9).

Com base nos resultados obtidos e expostos anteriormente, a solução de sacarose de 250g/L se mostrou a mais eficiente em induzir processo antinociceptivo em *Rattus norvegicus* adulto. Fato observado tanto em animais mantidos individualmente como em grupo. Além disso, paulatinamente a ingestão da solução de sacarose nessa concentração como nas outras utilizadas neste trabalho, os animais apresentaram ganho de peso progressivo, assim como um consumo contínuo de ração e das próprias soluções de sacarose, sugerindo que os mesmos se mantinham saudáveis durante o tratamento. Portanto, a concentração de 250g/L foi usada nos estudos subsequentes, que visavam investigar a neurotransmissão na antinocicepção induzida por substância doce em roedores adultos.

Nós mantivemos os animais agrupados, quatro por caixa, para evitar o efeito do longo tempo de isolamento social na neurotransmissão e organização da rede neural possivelmente envolvida na elaboração de reações de antinocicepção e estresse (Lapiz *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003). De fato, um estudo recente mostrou evidências de que a exposição crônica a situação estressante exerce influência no comportamento alimentar, reduzindo a ingestão de alimento doce, e também a neurotransmissão monoaminérgica onde foi observado decréscimo na atividade dopaminérgica no hipotálamo (Gamaro *et al.*, 2003).

Na investigação dos neurotransmissores envolvidos na antinocicepção induzida por substância doce, nossos achados mostraram que a naltrexona, um antagonista mais potente que a naloxona, embora também com efeito não específico, foi capaz de antagonizar a antinocicepção induzida por substância doce (Figura 10 A), confirmando experimentos anteriores que sugerem o envolvimento de opióides neste processo antinociceptivo (Blass *et al.*, 1987; Segato *et al.*, 1997). Contudo, o presente trabalho avança neste campo, pois teve como intuito investigar a relevância de quais os subtipos de receptores opióides envolvidos nas respostas antinociceptivas induzidas pela ingestão crônica de sacarose. De fato, o antagonismo induzido pela administração periférica de naloxonazina na antinocicepção induzida pela substância doce consiste na primeira evidência farmacológica na literatura para o envolvimento do receptor opióide μ_1 na antinocicepção induzida pela ingestão crônica de substância doce (Figura 10 B). Em consonância com estes resultados, um estudo mostrou evidência da modulação do receptor opióide, causada pela ingestão de alimento doce (Kanarek *et al.*, 1997). Esta

descoberta não indicou quais os receptores e mesmo se a totalidade dos subtipos de receptores opióides podem estar envolvidos na antinocicepção induzida por substâncias doces em situações de consumo crônico. De fato, ratos diabéticos parecem ser seletivamente hiporresponsivos ao efeito antinociceptivo farmacológico, mediado pelo receptor opióide μ , mas não mediado pelo receptor opióide κ (Kamei *et al.*, 1992 a, b; 1994 a, b; 1995).

Os resultados por nós obtidos indicam que os receptores opióides μ_1 estão crucialmente envolvidos na antinocicepção induzida pela ingestão de solução doce, embora nós consideremos a possibilidade do envolvimento de outros mecanismos opióides na elaboração da antinocicepção induzida pela ingestão de substância adocicada, tais como mediado pelo receptor orfanina, cuja ativação periférica produz, por exemplo, antinocicepção térmica em primatas com ação intrínseca independente da antinocicepção produzida pelos receptores opióides μ , δ ou κ (Ko *et al.*, 2002).

Embora haja muitas evidências na literatura sugerindo o envolvimento de opióides endógenos na antinocicepção induzida pela ingestão de substâncias doces, também não podemos descartar a possibilidade do envolvimento de algum outro mecanismo neural no controle da dor durante ou após a ingestão de soluções e alimentos doces. De fato, o presente trabalho mostra evidências inéditas do envolvimento de serotonina e dos receptores 5-HT₂/5-HT_{1C} na antinocicepção induzida por substância doce, já que o aumento do limiar nociceptivo causado pela ingestão crônica de sacarose foi antagonizada pela administração periférica de metisergida e de cetanserina (Figura 11 painéis A e B). Em concordância com estes resultados, alguns estudos têm sugerido que sensações dolorosas em neuropatia diabética podem ser atenuadas pela ativação central indireta dos receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ (Takeshita & Yamaguchi, 1995; Takeshita *et al.*, 1995) e que a via antinociceptiva 5-hidroxitriptaminérgica é amplamente afetada pela diabete (Takeshita & Yamaguchi, 1995). De fato, considerando que a metisergida, um antagonista serotoninérgico não específico, mostrou um efeito mais potente em antagonizar a antinocicepção induzida por substância doce do que a cetanserina, um bloqueador de receptor serotoninérgico 5-HT₂/5-HT_{1C}. Isto indicia que, eventualmente, outros subtipos de receptores serotoninérgicos estejam envolvidos de forma contundente na elaboração deste tipo de antinocicepção, além da família 5-HT₂.

O antagonismo da antinocicepção induzida por substância doce, causada pelos antagonistas farmacológicos usados neste trabalho não é devido a um possível efeito

hiperalgésico destas drogas no limiar nociceptivo, porque a administração periférica destas drogas nas doses maiores usadas neste experimento não mostrou nenhum efeito significativo no teste de retirada de cauda (Figura 12).

O estudo dos mecanismos neuroquímicos subjacentes à elaboração de antinocicepção pode oferecer nova compreensão dos mecanismos de inibição da dor e pode estabelecer as bases neurais e psicofarmacológicas do envolvimento da circuitaria endógena inibitória da dor no controle da antinocicepção induzida por substância doce em roedores adultos. Esta investigação será capaz de gerar novos conhecimentos para o desenvolvimento de drogas efetivas para o controle da dor crônica.

O estudo dos neurotransmissores envolvidos na antinocicepção induzida pela ingestão de alimento doce pode conduzir à elucidação dos mecanismos neurais que controlam a ingestão compulsiva de alimentos e sua relação com a eliciação de antinocicepção, também esclarecendo quais mediadores neurais são recrutados neste fenômeno compulsivo e analgésico. Uma aplicação direta em clínica cirúrgica dos avanços nesta área consiste, por exemplo, na proposta de um novo procedimento (inócuo) em anestesiologia, em recém-nascidos submetidos a intervenções cirúrgicas de pequena magnitude. A administração oral de 1mL de glicose a 30% (p/v) em recém-nascidos reduz consideravelmente sensações dolorosas e pode ser usada como protocolo seguro de anestesia (Skogsdal *et al.*, 1997).

As aplicações de novos conhecimentos nessa área, como a descrita no parágrafo anterior, encoraja-nos a prosseguir na investigação das bases neuropsicofarmacológicas dos mecanismos inibitórios da dor.

CONCLUSÕES

_ A ingestão crônica de solução de sacarose na concentração de 250g/L induz processo antinociceptivo em *Rattus norvegicus* adultos.

_ O consumo de soluções de sacarose é inversamente proporcional à concentração da solução. Quanto menor a concentração da solução maior é o consumo da mesma pelos animais.

_ O consumo de nutrientes não adocicados é afetado pela ingestão de solução de sacarose, sendo menor o consumo de ração padrão de laboratório pelos animais cronicamente tratados com solução de sacarose.

_ Animais mantidos individualmente apresentam maior aumento no peso do corpo do que os mantidos em grupo.

_ Receptores opióides μ_1 participam da antinocicepção induzida pela ingestão de substâncias doces, como a sacarose.

_ A serotonina e receptores 5HT₂/5-HT_{1C} estão envolvidos na antinocicepção induzida por substância doce.

RESUMO

Bases: A antinocicepção induzida por substâncias doces tem sido largamente estudada. Contudo, a investigação dos neurotransmissores envolvidos nesse processo antinociceptivo ainda carece de mais estudos, pois é de extrema importância entender o envolvimento desses neurotransmissores no sistema neural que controla este tipo de antinocicepção. *Objetivo:* O objetivo deste estudo é clarificar o envolvimento dos sistemas opióide e serotoninérgico na antinocicepção induzida por substância doce. *Método:* O presente trabalho foi realizado em modelo animal (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*), objetivando investigar se a ingestão crônica de solução de sacarose é seguida de antinocicepção. A latência de retirada de cauda após a aplicação de estímulo nocivo térmico foi medida antes e após esse tratamento no teste de retirada de cauda (provavelmente um reflexo espinal). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de linha basal dos diferentes grupos e foi calculado um índice de analgesia da latência de retirada de cauda antes e depois do tratamento. O envolvimento de opióides endógenos e de serotonina neste processo antinociceptivo foi pesquisado com fármacos antagonistas específicos e não-específicos dos receptores opióides e serotoninérgicos. *Resultados:* O efeito analgésico da ingestão de sacarose depende da concentração da solução de sacarose e do tempo de duração do consumo da mesma. Naltrexona e metisergida diminuíram a antinocicepção induzida por substâncias doce (após 14 dias de ingestão da sacarose). Estes efeitos foram corroborados pela administração periférica de naloxonazina e cetanserina. *Conclusões:* Os resultados sugerem o envolvimento de opióides endógenos e serotonina no processo antinociceptivo atualmente estudado. Tudo apontando para a participação de receptores opióides μ e serotoninérgicos 5HT₂ na regulação central da antinocicepção induzida por substâncias doces.

Palavras-chave: antinocicepção; ingestão de sacarose; teste de retirada de cauda; opióides endógenos; receptor opióide μ_1 ; serotonina; receptor serotoninérgico 5-HT₂.

ABSTRACT

Rationale: Sweet substance-induced antinociception has been widely studied, and the investigation of the neurotransmitters involved in the antinociceptive process is an important way for understanding the involvement of neural system controlling this kind of antinociception. *Objective:* The aim of this study is to investigate the involvement of opioid and serotonergic system in the sweet substance-induced antinociception. *Methods:* the present work was made in animal model (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Muridae*); with the aim of investigating if the chronic intake of sweet substance, such as sucrose, is followed by antinociception. Their tail withdrawal latencies in the tail-flick test (probably a spinal reflex) were measured before and immediately after this treatment. As there was not statistic significant differences between baseline values of different groups, an analgesia index was calculated from the withdrawal latencies before and after treatment. The involvement of endogenous opioid and serotonin in the antinociceptive process was investigated with specific and non-specific pharmacological antagonism on opioid and serotonergic receptors. *Results:* The analgesic effect of sucrose intake depends on the concentration of sucrose solution and on the time during which the solution is consumed. Naltrexone and methysergide decreased the sweet substance-induced antinociception (post 14 days of sucrose intake). These effects were corroborated by peripheral administration of naloxonazina and ketanserin. *Conclusions:* The present results suggest the involvement of endogenous opioids and serotonin in the antinociceptive process presently studied. μ_1 -opioid and 5HT₂ serotonergic receptors may be involved in the central regulation of the sweet substance-produced antinociception.

Keywords: antinociception; sucrose intake; Tail-flick test; endogenous opioids. μ_1 -opioid receptor; serotonin; 5HT₂ serotonergic receptor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, F.; DIAZ, N.M.; DOMENECH, E.; ROBAYNA, M.; RICO, J. Oral sweet solution reduces pain-related behavior in preterm infants. **Acta. Paediatr.**, 85: 854-858, 1996.
- ADHAM, N.; KAO, H.T.; SCHECTER, L.E.; BARD, J.; OLSEN, M.; URQUHART, D.; DURKIN, M.; HARTIG, P.R.; WEINSHANK, R.L.; BRANCHEK, T.A. Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): a fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. **Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.**, 90(2): 408-12, 1993.
- AKIL, H.; LIEBESKIND, J.C. Monoaminergic mechanisms of stimulation-produced analgesia. **Brain Res.**, 94(2): 279-96, 1975.
- AMLAIKY, N.; RAMBOZ, S.; BOSCHERT, U.; PLASSAT, J.L.; HEN, R. Isolation of a mouse "5HT_{1E}-like" serotonin receptor expressed predominantly in hippocampus. **J. Biol. Chem.**, 267(28): 19761-4, 1992.
- AMIR, S.; AMIT, Z. Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties of pain related behavior in rats. **Life Sci.**, 23(11): 1143-51, 1978.
- ANSELONI, V.C.Z.; WENG, H.R.; TERAYAMA, R.; LETIZIA, D.; DAVIS, B.J.; REN, K.; DUBNER, R.; ENNIS, M. Age-dependency of analgesia elicited by intraoral sucrose in acute and persistent pain models. **Pain**, 97:93-103, 2002.
- ANSELONI, V.Z.; DAVIS, B.J.; ENNIS, M. C-fos immunoreactivity and analgesia by intraoral sucrose infusion in 10-day-old rats. **Soc. Neurosci.**, 25:1678, 1999.
- BARBER, R.P.; VAUGHN, J.E.; SAITO, K.; MCLAUGHLIN, B.J.; ROBERTS, E. GABAergic terminals are presynaptic to primary afferent terminals in the substantia gelatinosa of the rat spinal cord. **Brain Res.**, 141(1): 35-55, 1978.

- BARDIN, L.; TARAYRE, J.P.; Malfetes, N.; KOEK, W.; COLPAERT, F.C. Profound, non-opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT(1A) agonist F 13640 in the formalin model of tonic nociceptive pain. **Pharmacol.**, 67(4): 182-94, 2003.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Ann. Neurol.**, 4(5): 451-62, 1978.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control mechanisms. In: **Textbook of Pain**, P.D. Wall e R. Melzack (eds.). 2. ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1989.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.**, 7: 309-38, 1984.
- BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. **J. Comp. Neurol.**; 187(3): 513-31, 1979.
- BASBAUM, A.I.; MARLEY, N.J.; O'KEEFE, J.; CLANTON, C.H. Reversal of morphine and stimulus-produced analgesia by subtotal spinal cord lesions. **Pain**, 3(1): 43-56, 1977.
- BEDERSON, J.B.; FIELDS, H.L.; BARBARO, N.M. Hyperalgesia during naloxone-precipitated withdrawal from morphine is associated with increased on-cell activity in the rostral ventromedial medulla. **Somatosens. Mot. Res.**, 7(2): 185-203, 1990.
- BENNETT, A. The role of biochemical mediators in peripheral nociception: bone pain. **Cancer Surv.**, 7(1): 55-67, 1988.
- BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. 3. ed. Ribeirão Preto: R.B.G., 1994.

- BERGMANN, F.; LIEBLICH, I.; COHEN, E.; GANCHROW, JR. Influence of intake of sweet solutions on the analgesic effect of a low dose of morphine in randomly bred rats. **Behav. Neural. Biol.**, 44: 347-353, 1985.
- BERGMANN, F.; COHEN, E.; LIEBLICH, I. Biphasic effects of chronic saccharin intake on pain responses of healthy and diabetic rats of two genetically selected strains. **Psychopharmacol.**, 82: 248-251, 1984.
- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P. de; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestística** 2. ed. São Paulo: E.P.U., 1981.
- BLASS, E.M.; FITZGERALD, E. Milk-induced analgesia and comforting in 10-day-old rats: Opioid mediation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 29: 9-13, 1988.
- BLASS, E.M.; FITZGERALD, E.; KEHOE, P. Interactions between sucrose, pain and isolation distress. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 26: 483-489, 1987.
- BLASS, E.M.; HOFFMEYER, L.B. Sucrose as an analgesic for newborn infants. **Pediatrics**, 87: 215-218, 1991.
- BLASS, E.M.; SHIDE, D.J. Some comparisons among the calming and pain-relieving effects of sucrose, glucose, fructose and lactose in infant rats. **Chem. Senses.**, 19: 239-249, 1994.
- BODNAR, R.J. Supraspinal circuitry mediating opioid antinociception: antagonist and synergy studies in multiple sites. **J. Biomed. Sci.**, 7(3): 181-94, 2000.
- BODNAR, R.J.; KELLY, D.D.; GLUSMAN, M. 2Deoxy-D-glucose analgesia: influences of opiate and non-opiate factors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 11(3): 297-301, 1979.
- BOLLES, R.C.; FANSELOW, M.S. Endorphins and behavior. **Annu. Rev. Psychol.**, 33:87-101, 1982.

- BOSCHERT, U.; AMARA, D.A.; SEGU, L.; HEN, R. The mouse 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor is localized predominantly on axon terminals. **Neurosci.**, 58(1): 167-82, 1994.
- BRADLEY, P.B.; ENGEL, G.; FENIUK, W.; FOZARD, J.R.; HUMPHREY, P.P.; MIDDLEMISS, D.N.; MYLECHARANE, E.J.; RICHARDSON, B.P.; SAXENA, P.R. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. **Neuropharmacol.**, 25(6): 563-76, 1986.
- BRANDÃO, M.L.; COIMBRA, N.C.; LEÃO-BORGES, P. C. Effects of morphine and midazolam on reactivity to peripheral noxious and central aversive stimuli. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 14: 495-499, 1990.
- BRANDÃO, M.L. **Psicofisiologia: as bases fisiológicas do comportamento**, 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2001.
- BRANDÃO, M.L.; REES, H.; WITT, S.; ROBERTS, M.H. Central antiaversive and antinociceptive effects of anterior pretectal nucleus stimulation: attenuation of autonomic and aversive effects of medial hypothalamic stimulation. **Brain Res.**, 542(2): 266-72, 1991.
- BRANDÃO, M.L.; TOMAZ, C.; LEÃO-BORGES, P.C.; COIMBRA, N.C.; BAGRI, A. Deference reaction induced by microinjections of bicuculine into the inferior colliculus. **Physiol. Behav.**, 44: 361-365, 1988.
- BURITOVA, J.; TARAYRE, J.P.; BESSON, J.M.; COLPAERT, F. The novel analgesic and high-efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist, F 13640 induces c-Fos protein expression in spinal cord dorsal horn neurons. **Brain Res.**, 974(1-2): 212-21, 2003.
- BURSTEIN, R.; CLIFFER, K.D.; GIESLER, G.J. JR. Direct somatosensory projections from the spinal cord to the hypothalamus and telencephalon. **J. Neurosci.**, 7(12): 4159-64, 1987.

- CANNON, J.G.; PEREZ, J.A.; PEASE, J.P.; LONG, J.P.; FLYNN, J.R.; RUSTERHOLZ, D.B.; DRYER, S.E. Comparison of biological effects of N-alkylated congeners of beta-phenethylamine derived from 2-aminotetralin, 2-aminoindan, and 6-aminobenzocycloheptene. **J. Med. Chem.**, 23(7): 745-9, 1980.
- CARPENTER, D.; ENGBERG, I.; LUNDBERG, A. Differential supraspinal control of inhibitory and excitatory actions from the FRA to ascending spinal pathways. **Acta Physiol. Scand.**, 63: 103-110, 1965.
- CASEY, K.L. Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 96(14): 7668-74, 1999.
- CASTILHO, V.M.; BRANDÃO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5HT_{2A} receptors in rats. **Psychopharmacol.**, (Berl), 155(2): 154-62, 2001.
- CASTILHO, V.M.; MACEDO, C.E.; BRANDÃO, M.L. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. **Psychopharmacol.**, 165 (1): 77-85, 2002.
- CECHETTO, D.F.; STANDAERT, D.G.; SAPER, C.B. Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. **J. Comp. Neurol.**, 240(2): 153-60, 1985.
- CERVERO, F.; JANIG, W. Visceral nociceptors: a new world order? **Trends Neurosci.**, 15(10): 374-8, 1992.
- CHANCE, W.T. Autoanalgesia: opiate and non-opiate mechanisms. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 4(1): 55-67, 1980.
- CHUDLER, E.H.; DONG, W.K. The role of the basal ganglia in nociception and pain. **Pain**, 60(1): 3-38, 1995.

CHUNG, R.Y.; MASON, P.; STRASSMAN, A.; MACIEWICZ, R. Suppression of the jaw-opening reflex by periaqueductal gray stimulation is decreased by paramedian brainstem lesions. **Brain Res.**, 403(1): 172-6, 1987.

COIMBRA, N.C. Identificação de neurônios opióides e serotoninérgicos do teto mesencefálico e seu papel na analgesia induzida por estimulação intracerebral aversiva. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.

COIMBRA, N.C.; BRANDÃO, M.L. Effect of 5HT₂ receptor blockade on fear-induced analgesia elicited by electrical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray. **Behav. Brain Res.**, 87: 97-103, 1997.

COIMBRA, N.C.; EICHENBERGER, G.C.D.; GORCHINSKI, R.T.; MAISONNETTE, S. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. **Brain Res.**, 736: 348-352, 1996.

COIMBRA, N.C.; OSAKI, M.Y.; EICHENBERGER, G.C.D.; CISCATO, JR. J.G.; JUCA, C.E.B.; BIOJONE, C.R. Effects of opioid receptor blockade on defensive behavior elicited by electrical stimulation of the aversive substrates of the inferior colliculus in *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). **Psychopharmacol.**, 152: 422-430, 2000.

COIMBRA, N.C.; TORNAZ, C.; BRANDÃO, M.L. Evidence for the involvement of serotonin in the antinociception induced by electrical or chemical stimulation of the mesencephalic tectum. **Behav. Brain Res.**, 50: 77-83, 1992.

COOPER, S.J.; JACKSON, A.; KIRKHAM, T.C. Endorphins and food intake: Kappa opioid receptor agonists and hyperphagia. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 23: 889-901, 1985 a.

- COOPER, S.J.; JACKSON, A.; MORGAN, R.; CARTER, R. Evidence for opiate receptor involvement in the consumption of a high palatability diet in non-deprived rats. **Neuropepti.**, 5: 345-348, 1985 b.
- CRAIG, A.D. JR.; BURTON, H. Spinal and medullary lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus: a possible pain center. **J. Neurophysiol.**; 45(3): 443-66, 1981.
- CZIRR, A.S.; REID, L.D. Demonstrating morphine's potentiating effects on sucrose intake. **Brain Res. Bull.** 17: 639-642, 1986.
- CZLONKOWSKI, A.; STEIN, C.; HERZ, A. Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. **Eur. J. Pharmacol.**, 242(3): 229-35, 1993.
- D'ANCI, K.E.; KANAREK, R.B. MARKS-KAUFMAN, R. Duration of sucrose availability differentially alters morphine-induced analgesia in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 54(4): 693-7, 1996.
- D'ANCI, K.E.; KANAREK, R.B.; MARKS-KAUFMAN, R. Beyond sweet taste: saccharin, sucrose, and polycose differ in their effects upon morphine-induced analgesia. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 56(3): 341-5, 1997.
- DAVIS, W.M.; MIYA, T.S.; EDWARDS, L.D. The influence of glucose and insulin pretreatment upon morphine analgesia in the rat. **J. Am. Pharm. Assoc.** 45: 60-62, 1956.
- DEHPOUR, A.R.; SADEGHIPOUR, H.R.; NOWROOZI, A.; AKBARLOO, N. The effect of the serotonergic system on opioid withdrawal-like syndrome in a mouse model of cholestasis. **Hum. Psychopharmacol.**, 15(6): 423-428. 2000.
- DESEURE, K.; KOEK, W.; COLPAERT, F.C.; ADRIAENSEN, H. The 5-HT(1A) receptor agonist F 13640 attenuates mechanical allodynia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.**, 5; 456(1-3): 51-7, 2002.

- DESS, N.K.; RAIZER, J.; CHAPMAN, C.D.; GARCIA J. Stressors in the learned helplessness paradigm: effects on body weight and conditioned taste aversion in rats. **Physiol. Behav.**, 44(4-5):483-90, 1988.
- DUM, J.; GRAMSCH, C.; HERTZ, A. Activation of hypothalamic beta-endorphin pools by reward induced by highly palatable food. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 18: 443-447, 1983.
- EICHENBERGER, G.C.D.; RIBEIRO, S.J.; OSAKI, M.Y.; MARUOKA, R.Y.; RESENDE, G.C.C.; CASTELLAN-BALDAN, L.; CORREA, S.A.L.; DASILVA, L.A.; COIMBRA, N.C. Neuroanatomical and psychopharmacological evidence for interaction between opioid and GABAergic neural pathways in the modulation of fear and defense elicited by electrical and chemical stimulation of the deep layers of the superior colliculus and dorsal periaqueductal gray matter. **Neuropharmacol.**, 42: 48-59, 2002.
- FANSELOW, M.S.; BOLLES, R.C. Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, 93(4): 736-44, 1979.
- FANSELOW, M.S.; CALCAGNETTI, D.J.; HELMSTETTER, F.J. Delta opioid antagonist, 16-Me cyprenorphine, selectively attenuates conditional fear- and DPDPE-induced analgesia on the formalin test. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 32(2): 469-73, 1989 a.
- FANSELOW, M.S.; CALCAGNETTI, D.J.; HELMSTETTER, F.J. Role of mu and kappa opioid receptors in conditional fear-induced analgesia: the antagonistic actions of nor-binaltorphimine. and the cyclic somatostatin octapeptide, Cys2Tyr3Orn5Pen7-amide. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 250(3): 825-30, 1989 b.
- FANTINO, M.J.; HOSOTTE, J.; APFELBAUM, M. An opiate antagonist, naltrexone, reduces preference for sucrose in humans. **Am. J. Physiol.**, 251: R91-96, 1986.
- FARGIN, A.; RAYMOND, J.R.; LOHSE, M.J.; KOBILKA, B.K.; CARON, M.G.; LEFKOWITZ, R.J. The genomic clone G-21 which resembles the β -

- adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. **Nature**, 335: 358-360, 1988.
- FIELDS, H.L.; BARBARO, N.M.; HEINRICHER, M.M. Brain stem neuronal circuitry underlying the antinociceptive action of opiates. **Prog. Brain. Res.**, 77: 245-57, 1988.
- FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.**, 14: 219-45, 1991.
- FIELDS, H.L.; MALICK, A.; BURSTEIN, R. Dorsal horn projection targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla. **J. Neurophysiol.**, 74(4): 1742-59, 1995.
- FOONG, F.W.; TERMAN, G.; DUGGAN, A.W. Methysergide and spinal inhibition from electrical stimulation in the periaqueductal grey. **Eur. J. Pharmacol.**, 116(3): 239-48, 1985.
- FOSTER, G.A.; SIZER, A.R.; REES, H.; ROBERTS, M.H. Afferent projections to the rostral anterior pretectal nucleus of the rat: a possible role in the processing of noxious stimuli. **Neurosci.**, 29(3): 685-94, 1989.
- FOUGET, M.; HOYER, D.; PARDO, L.A.; PAREKH, A.; KLUXEN, F.W.; KALKAMAN, H.O.; STÜHMER, W.; LÜBBERT, H. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. **EMBO J.**, 11:3487, 1992.
- FRYE, .C.A.; CUEVAS, C.A.; KANAREK, R.B. Diet and estrous cycle influence pain sensitivity in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 45: 255-260, 1993.
- FRYE, C.A.; BOCK, B.C.; KANAREK, R.B. Hormonal milieu affects tail-flick latency in female rats and may be attenuated by access to sucrose. **Physiol. Behav.**, 52: 699-706, 1992.
- FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.**, 48(2): 129-41, 1999.

- GADDUM, J.H.; PICARELLI, Z.P. Two kinds of tryptamine receptor. **Br J Pharmacol.**, 12(3): 323-8, 1957.
- GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochem. Int.**, 42(2): 107-14, 2003.
- GERHART, K.D.; YEZIERSKI, R.P.; FANG, Z.R.; WILLIS, W.D. Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by stimulation in ventral posterior lateral (VPLc) thalamic nucleus: possible mechanisms. **J. Neurophysiol.**, 49(2): 406-23, 1983.
- HAGBARTH, K.E.; KERR, D.I. Central influences on spinal afferent conduction. **J. Neurophysiol.**, 17: 295-307, 1954.
- HAHN, E.F.; PASTERNAK, G.W. Naloxonazine, a potent, long-lasting inhibitor of opiate binding sites. **Life Sci.**, 31(12-13): 1385-8, 1982.
- HAMMOND, D.L. New insights regarding organization of spinal cord pain pathways. **News Physiol. Sci.**, 4: 98-101, 1989.
- HAOUARI, N.; WOOD, C.; GRIFFITHS, G.; LEVENE, M. The analgesic effect of sucrose in full term infants: a randomised controlled trial. **BJM**, 310: 1498-1500, 1995.
- HARDY, J.D.; JACOBS, I.; MEIXNER, M.D. Thresholds of pain and reflex contraction as related to noxious stimulation. **J. Appl. Physiol.**, 5: 725-739, 1953.
- HARDY, J.D.; STOLL, A.M.; CUNNINGHAM, D.; BENSON, W.M.; GREENE, L. Responses of the rat to thermal radiation. **Am. J. Physiol.**, 189: 1-5, 1957.
- HARDY, J.D.; WOLFF, H.G.; GOODELL, H. Studies on pain. A new method for measuring pain threshold: observation on spatial summation of pain. **J. Clin. Invest.**, 19: 649-657, 1940.

- HARRO, J.; TONISSAAR, M.; ELLER, M.; KASK, A.; ORELAND, L. Chronic variable stress and partial 5-HT denervation by parachloroamphetamine treatment in the rat: effects on behavior and monoamine neurochemistry. **Brain Res.**, 899(1-2):227-39, 2001.
- HARTIG, P.R.; BRANCHEK, T.A.; WEINSHANK, R.L. A subfamily of 5-HT1D receptor genes. **Trends Pharmacol. Sci.**, 13(4): 152-9, 1992.
- HEN, R. Of mice and flies: commonalities among 5-HT receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, 13(4): 160-5, 1992.
- HENDERSON, G.; McKNIGHT, A.T. The orphan opioid receptor and its endogenous ligand-nociceptin/orphanin FQ. **Trends Pharmacol. Sci.**, 18(8): 293-300, 1997.
- HERZ, A.; MILLAN, M.J. Opioids and opioid receptors mediating antinociception at various levels of the neuraxis. **Physiol. Bohemoslov.**, 39(5): 395-401, 1990.
- HÖKFELT, T.; KELLERTH, J.O.; NILSSON, G.; PERNOW, B. Substance p: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. **Sci.**, 190(4217): 889-90, 1975.
- HOLDER, M.D. Responsivity to pain in rats changed by the ingestion of flavoured water. **Behav. Neural. Biol.** 49: 45-53, 1988.
- HOYER, D. Functional correlates of serotonin 5HT1 recognition sites. **J. Recept. Res.**, 8(1-4): 59-81, 1988.
- HOYER, D.; SCHOEFFTER, P. 5-HT1D receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in calf substantia nigra. **Eur. J. Pharmacol.**, 147(1): 145-7, 1988.
- HOYER, D.; SCHOEFFTER, P.; WAEBER, C.; PALACIOS, J.M. Serotonin 5-HT1D receptors. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 600: 168-81, 1990.

- HUMPHREY, P.P.; HARTIG, P.; HOYER, D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, 14(6): 233-6, 1993.
- HYLDEN, J.L.; HAYASHI, H.; BENNETT, G.J. Lamina I spinomesencephalic neurons in the cat ascend via the dorsolateral funiculi. **Somatosens. Res.**, 4(1): 31-41, 1986.
- HYLDEN, J.L.; HAYASHI, H.; BENNETT, G.J.; DUBNER, R. Spinal lamina I neurons projecting to the parabrachial area of the cat midbrain. **Brain Res.**, 336(1): 195-8, 1985.
- IRUSTA, A.E.C.; SAVOLDI, M.; KISHI, R.; REZENDE, G.C.C.; FREITAS, R.L.; CARVALHO, A.D.; COIMBRA, N.C. Psychopharmacological evidences for the involvement of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors on sweet substance-induced analgesia in *Rattus norvegicus*. **Neurosci. Lett.**, 305:115-118. 2001.
- JESSEL, T.M.; DODD, J. Neurotransmitters and differentiation antigens in subsets of sensory neurons projecting to the spinal dorsal horn. In: **Neuropeptides in Neurologic and Psychiatric Disease**, J.B. MARIN and J.D. BARCHES (eds.). New York: Raven Press, 1986.
- JESSEL, T.M.; IVERSEN, L.L. Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. **Nature**, 268: 549-551, 1977.
- JOHNSON, N.; PASTERNAK, G.W. Binding of [3H]naloxonazine to rat brain membranes. **Mol. Pharmacol.**, 26(3): 477-83, 1984.
- JONES, M.W.; APKARIAN, A.V.; STEVENS, R.T.; HODGE, C.J. JR. The spinothalamic tract: an examination of the cells of origin of the dorsolateral and ventral spinothalamic pathways in cats. **J. Comp. Neurol.**, 260(3): 349-61, 1987.
- JONES, R.B.; SATTERLEE, D.G.; RYDER, F.H. Fear and distress in Japanese quail chicks of two lines genetically selected for low or high adrenocortical response to immobilization stress. **Horm. Behav.**, 26(3): 385-93, 1992.

- JONES, R.B.; SATTERLEE, D.G.; RYDER, F.H. Fear of humans in Japanese quail selected for low or high adrenocortical response. **Physiol. Behav.**, 56(2):379-83, 1994.
- JULIUS, D.; MACDERMOTT, A.B.; AXEL, R.; JESSELL, T.M. Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. **Sci.**, 241(4865): 558-64, 1988.
- KAMEI, J.; IWAMOTO, Y.; HITOSUGI, H.; MISAWA, M.; NAGASE, H.; KASUYA, Y. Streptozocin-induced diabetes selectively reduces antinociception mediated by μ 1-opioid receptors, but not that mediated by μ 2-opioid receptors. **Neurosci. Lett.**, 165(1-2): 141-3, 1994 a.
- KAMEI, J.; KAWASHIMA, N.; KASUYA, Y. Role of spleen or spleen products in the deficiency in morphine-induced analgesia in diabetic mice. **Brain Res.**, 576(1): 139-42, 1992 a.
- KAMEI, J.; OHHASHI, Y.; AOKI, T.; KAWASHIMA, N.; KASUYA, Y. Streptozocin-induced diabetes selectively alters the potency of analgesia produced by mu-opioid agonists, but not by delta and kappa-opioid agonists. **Brain Res.**, 571(2): 199-203, 1992 b.
- KAMEI, J.; OHSAWA, M.; MISAWA, M.; NAGASE, H.; KASUYA, Y. Effects of diabetes on the morphine-induced Straub tail reaction in mice. **Neurosci. Lett.**, 178(1): 66-8, 1994 b.
- KAMEI, J.; SUZUKI, T.; MISAWA, M.; NAGASE, H.; KASUYA, Y. Antinociceptive effect of dihydroetorphine in diabetic mice. **Eur. J. Pharmacol.**, 275: 109-113, 1995.
- KANAREK, R.B.; HOMOLESKI, B.A.; WIATR, C. Intake of a palatable sucrose solution modifies the actions of spiradoline, a kappa opioid receptor agonist, on analgesia and feeding behavior in male and female rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 65(1): 97-104, 2000.

- KANAREK, R.B.; MANDILLO, S.; WIATR, C. Chronic sucrose intake augments antinociception induced by injections of mu but not kappa opioid receptor agonists into the periaqueductal gray matter in male and female rats. **Brain Res.**, 920(1-2): 97-105, 2001.
- KANAREK, R.B.; PRZYPEK, J.; D'ANCI, K.E.; MARKS-KAUFMAN, R. Dietary modulation of mu and kappa opioid receptor-mediated analgesia. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 58(1): 43-9, 1997.
- KANAREK, R.B.; WHITE, E.S.; BIEGEN, M.T.; MARKS-KAUFMAN, R. Dietary influences on morphine-induced analgesia in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 38: 681-684, 1991.
- KANDELL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. **Principle of Neural Science**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 2000.
- KAPLAN, H.; FIELDS, H.L. Hyperalgesia during acute opioid abstinence: evidence for a nociceptive facilitating function of the rostral ventromedial medulla. **Neurosci.**, 11(5): 1433-9, 1991.
- KELLY, D. D. *Central representations of pain and analgesia*. In: **Principles of Neural Science**, E. R. Kandel e J. H. Schwartz (eds.). 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1991.
- KLEIN, S.P.; GREEN, K.F. Tolerance to morphine analgesia from brief exposure to a palatable solution. **Brain Res. Bull.**, 21: 963-965, 1988.
- KO, M.C.H.; NAUGHTON, N.N.; TRAYNOR, J.R.; SONG, M.S.; WOODS, J.H.; RICE, K.C.; MCKNIGHT, A.T. Orphanin FQ inhibits capsaicin-induced thermal nociception in monkeys by activation of peripheral ORL1 receptors. **Br. J. Pharmacol.**, 135: 943-950, 2002.
- KONARSKA, M.; STEWART, R.E.; MCCARTY, R. Predictability of chronic intermittent stress: effects on sympathetic-adrenal medullary responses of laboratory rats. **Behav. Neural. Biol.**, 53(2):231-43, 1990.

- KOSTERLITZ, H.W.; HUGHES, J. Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand. **Life Sci.**, 17(1): 91-6, 1975.
- LAIRD, J.M.; CERVERO, F. Signalling of a step-like intensity change of noxious mechanical stimuli by dorsal horn neurones in the rat spinal cord. **J. Physiol.**, 434: 561-75, 1991.
- LAMOTTE, C.; PERT, C.B.; SNYDER, S.H. Opiate receptor binding in primate spinal cord: distribution and changes after dorsal root section. **Brain Res.**, 112(2): 407-12, 1976.
- LAPIZ, M.D.; FULFORD, A.; MUCHIMAPURA, S.; MASON, R.; PARKER, T.; MARSDEN, C.A. Influence of post weaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. **Neurosci. Behav. Physiol.**, 33(1): 13-29, 2003.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.**, 53(4): 597-652, 2001.
- LEVINE, A.S.; BILLINGTON, C.J. Opioids: Are they regulators of feeding? **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 575: 209-220, 1989.
- LEWIS, J.W.; TORDOFF, M.G.; SHERMAN, J.E.; LIEBESKIND, J.C. Adrenal medullary enkephalin-like peptides may mediate opioid stress analgesia. **Sci.**, 217(4559): 557-9, 1982.
- LIEBERMAN, H.R.; WURTMAN, R.J. Foods and food constituents that affect the brain and human behavior. **Food Technol.**, 139-141, 1986.
- LIEBESKIND, J.C.; GUILBAUD, G.; BESSON, J.M.; OLIVERAS, J.L. Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons. **Brain Res.**, 50(2): 441-6, 1973.
- LIEBLICH, L.; COHEN, E.; BLASS, E.M.; BERGMANN, F. Morphine tolerance in genetically selected rats induced by chronically elevated saccharine intake. **Sci.**, 221: 871-873, 1983.

- LING, G.S.F.; SIMANTOV, R.; CLARK, J.A.; PASTERNAK, G.W. Naloxonazine action in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, 129: 33-38, 1986.
- MA, W.; PESCHANSKI, M. Spinal and trigeminal projections to the parabrachial nucleus in the rat: electron-microscopic evidence of a spino-ponto-amygdalian somatosensory pathway. **Somatosens. Res.**, 5(3): 247-57, 1988.
- MALCANGIO, M.; BOWERY, N.G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends Pharmacol. Sci.**, 17(12): 457-62, 1996.
- MARKS-KAUFMAN, R.; HAMM, M.W.; BARBATO, G.F. The effects of dietary sucrose on opiate receptor binding in genetically obese (ob/ob) and lean mice. **J. Am. Coll. Nutr.**, 8(1): 9-14, 1989.
- MARKS-KAUFMAN, R.; KANAREK, R.B.; DELANTY, S.N. Sweet-tasting solutions modify the analgesic properties of morphine in rats. **FASEB J.**, 2: A1567, 1988.
- MAROTEAUX, L.; SAUDOU, F.; AMLAIKY, N.; BOSCHERT, U.; PLASSAT, J.L.; HEN, R. Mouse 5HT_{1B} serotonin receptor: cloning, functional expression, and localization in motor control centers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 89(7): 3020-4, 1992.
- MATSUMOTO, K.; NOMURA, H.; MURAKAMI, Y.; TAKI, K.; TAKAHATA, H.; WATANABE, H. Long-term social isolation enhances picrotoxin seizure susceptibility in mice: up-regulatory role of endogenous brain allopregnanolone in GABAergic systems. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 75(4): 831-5, 2003.
- MATTES, H.; BOSCHERT, U.; AMLAIKY, N.; GRAILHE, R.; MUSCATELLI, F.; MATTEI, M.G.; HEN, R. The mouse 5-HT_{5A} and 5-HT_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression and chromosomal localization. **Molec. Pharmacol.**, 43: 313-319, 1993.
- MAYER, D.J.; HAYES, R.L. Stimulation-produced analgesia: development of tolerance and cross-tolerance to morphine. **Sci.**, 188(4191): 941-3, 1975.

- MAYER, D.J.; LIEBESKIND, J.C. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. **Brain Res.**, 15; 68(1): 73-93, 1974.
- MAYER, D.J.; PRICE, D.D. Central nervous system mechanisms of analgesia. **Pain**, 2: 379-404, 1976.
- McALLISTER, G.; CHARLESWORTH, A.; SNODIN, C.; BEER, M.S.; NOBLE, A.J.; MIDDLEMISS, D.N.; IVERSEN, L.L.; WHITING, P. Molecular cloning of a serotonin receptor from human brain (5HT1E): a fifth 5HT1-like subtype. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**; 89(12): 5517-21, 1992.
- McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci.**, 13(6): 199-201, 1990.
- MELCHIOR, J.C.; RIGAUD, D.; COLAS-LINHART, N.; PETIET, A.; GIRARD, A. Immunoreactive beta-endorphin increases after an aspartame chocolate drink in healthy human subjects. **Physiol. Behav.**, 50: 941-944, 1991.
- MELZACK, R.; STOTLER, W.A.; LIVINGSTON, W.K. Effects of discrete brainstem lesions in cats on perception of noxious stimulation. **J. Neurophysiol.**, 21(4): 353-67, 1958.
- MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Sci.**, 150(699): 971-9, 1965.
- MENETREY, D.; CHAOUCH, A.; BINDER, D.; BESSON, J.M. The origin of the spinomesencephalic tract in the rat: an anatomical study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. **J. Comp. Neurol.**, 206(2): 193-207, 1982.
- MERCER, M.E.; HOLDER, M.D. Antinociceptive effects of palatable sweet ingesta on human responsivity to pressure pain. **Physiol. Behav.**, 61: 311-318, 1996.
- MERSKEY, H. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**, Suppl. 3: S1-S225, 1986.

- MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, 46(2): 142-53, 1997.
- MIDDLEMISS, D.N.; SUMAN-CHAUHAN, N.; SMITH, S.M.; PICTON, C.; SHAW, D.; BEVAN, Y. Subpopulations of 5-HT_{1D} recognition sites in guinea pig, rabbit, dog, and human cortex. **Sec. IUPHAR Sat. Meet. Ser.**, [abstr.], Basel, Switzerland, p. 49, 1990.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, 66(6): 355-474, 2002.
- MILLER, R.J. Peptides as neurotransmitters: focus on the enkephalins and endorphins. **Pharmacol. Ther.**, 12(1): 73-108, 1981.
- MITCHELL, A.; WALTMAN, P.A. Oral sucrose and pain relief for preterm infants. **Pain Manag. Nurs.**, 4(2): 62-9, 2003.
- MOTTA, V.; MAISONNETTE, S.; MORATO, S.; CASTRECHINI, P.; BRANDÃO, M. L. Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT_{1A} receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. **Psychopharmacol.**, (Berl), 107(1): 135-9, 1992.
- MUDGE, A.W.; LECMAN, S.F.; FISCHBACH, G.D. Enkephalin inhibits release of substance P from sensory neurons in culture and decreases action potential duration. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 76: 526-530, 1979.
- MURFIN, R.; BERNNETT, J.; MAYER, D.J. The effect of dorsolateral cord (DLC) lesions on analgesia from morphine microinjected into the periaqueductal gray of the rat. **Neurosci. Abstr.**, 2: 949, 1976.
- NARITA, M.; TSENG, L.F. Evidence for the existence of the β -endorphin-sensitive "δ-opioid receptor" in the brain: the mechanisms of ϵ -mediated antinociception. **Jpn. J. Pharmacol.**, 76, 233-253, 1998.
- NEMMANI, K.V.; MOGIL, J.S. Serotonin-GABA interactions in the modulation of mu- and kappa-opioid analgesia. **Neuropharmacol.**, 44(3): 304-10, 2003.

- NICHOLS, D.S.; THORN, B.E.; BERNTSON, G.G. Opiate and serotonergic mechanisms of stimulation-produced analgesia within the periaqueductal gray. **Brain Res. Bull.**, 22(4): 717-24, 1989.
- NIEUWENHUYNS, R.; VOOGD, J.; van HUIJZEN, C. **The Human Central Nervous System: A Synopsis and Atlas**. R. Nieuwenhuys; J. Voogd e van Huijzen (eds.). 3. ed. Berlin: Springer Verlag, 1988.
- PAN, Z.Z.; FIELDS, H.L. Endogenous opioid-mediated inhibition of putative pain-modulating neurons in rat rostral ventromedial medulla. **Neurosci.**, 74(3): 855-62, 1996.
- PANNETON, W.M.; BURTON H. Projections from the paratrigeminal nucleus and the medullary and spinal dorsal horns to the peribrachial area in the cat. **Neurosci.**, 15(3): 779-97, 1985.
- PASTERNAK, G.W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. **Clin Neuropharmacol.**, 16(1): 1-18, 1993.
- PEROUTKA, S.J.; SNYDER, S.H. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. **Mol. Pharmacol.**, 16(3): 687-99, 1979.
- PERT, C.B.; SNYDER, S.H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. **Sci.**, 179(77): 1011-4, 1973.
- PLASSAT, J. L.; BOSCHERT, U.; AMLAIKY, N.; HEN, R. The mouse 5HT₅ receptor reveals a remarkable heterogeneity within the 5HT_{1D} receptor family. **EMBO J.**, 11(13):4779-86, 1992.
- POMONIS, J.D.; JEWETT, D.C.; KOTZ, C.M.; BRIGGS, J.E.; BILLINGTON, C.J.; LEVINE, A.S. Sucrose consumption increases naloxone-induced c-Fos immunoreactivity in limbic forebrain. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 278(3): R712-9, 2000.
- PRADO, W.A. Involvement of calcium in pain and antinociception. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34(4): 449-61, 2001.

- PRADO, W.A.; FAGANELLO, F.A. The anterior pretectal nucleus participates as a relay station in the glutamate-, but not morphine-induced antinociception from the dorsal raphe nucleus in rats. **Pain**, 88(2): 169-76, 2000.
- PRADO, W.A.; ROBERTS, M.H.T. An assessment of the antinociceptive and aversive effects of stimulating sites in the rat brain. **Brain Res.**, 340: 219-228, 1985.
- PRICE, D.D.; DUBNER, R. Neurons that subserve the sensory-discriminative aspects of pain. **Pain**, 3(4): 307-38, 1977.
- PRITCHETT, D.B.; BACH, A.W.; WOZNY, M.; TALEB, O.; DAL TOSO, R.; SHIH, J.C.; SEEBURG, P.H.. Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. **EMBO J.**, 7(13): 4135-40, 1988.
- QUIRION, R. Pain, nociception and spinal opioid receptors. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.**, 8(4-6): 571-9, 1984.
- REES, H.; PRADO, W.A.; RAWLINGS, S.; ROBERTS, M.H. The effects of intraperitoneal administration of antagonists and development of morphine tolerance on the antinociception induced by stimulating the anterior pretectal nucleus of the rat. **Br. J. Pharmacol.**, 92(4): 769-79, 1987.
- REES, H.; ROBERTS, M.H. Antinociceptive effects of dorsal column stimulation in the rat: involvement of the anterior pretectal nucleus. **J. Physiol.**, 417: 375-88, 1989.
- REES, H.; TERENCE, M.G.; ROBERTS, M.H. Anterior pretectal nucleus facilitation of superficial dorsal horn neurones and modulation of deafferentation pain in the rat. **J. Physiol.**, 489: 159-69, 1995.
- REID, L.D. Endogenous opioid peptides and regulation of drinking and feeding. **Am. J. Clin. Nutr.**, 42: 1099-1132, 1985.
- REYNOLDS, D.V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Sci.**, 164(878): 444-5, 1969.

- ROANE, D.S.; MARTIN, R.J. Continuous sucrose feeding decreases pain threshold and increases morphine potency. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 35: 225-229, 1990.
- ROBERTS, M.H. 5-Hydroxytryptamine and antinociception. **Neuropharmacol.**, 23(12B): 1529-36, 1984.
- ROSA, M.L.N.M.; OLIVEIRA, M.A.; VALENTE, R.B.; COIMBRA, N.C.; PRADO, W.A. Pharmacological and neuroanatomical evidence for the involvement of the anterior pretectal nucleus in the antinociception induced by stimulation of the dorsal raphe nucleus in rats. **Pain**, 74: 171-179, 1998.
- RUSSEL, N.J.W.; SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Opiates inhibit the discharges of fine afferent units from inflamed knee joint of the cat. **Neurosci. Lett.**, 76: 107-112, 1987.
- SASAKI, M.; OBATA, H.; SAITO, S.; GOTO, F. Antinociception with intrathecal alpha-methyl-5-hydroxytryptamine, a 5-hydroxytryptamine 2A/2C receptor agonist, in two rat models of sustained pain. **Anesth. Analg.**, 96(4): 1072-8, table of contents, 2003.
- SCHMIDT, R.F.; SCHAIBLE, H.G.; MEBLINGER, K.; HEPPELMANN, B.; HANESCH, U.; PAWLAK, M. Silent and active nociceptors: structure, functions and clinical implications. In: **Proceedings of the 7th World Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management**, G.F. GEBHART; D.L. HAMMOND e T.S. JENSEN (eds.), vol. 2. Seattle: IASP Press, 1994.
- SCHREIBER, S.; RIGAI, T.; KATZ, Y.; PICK, C.G. The antinociceptive effect of mirtazapine in mice is mediated through serotonergic, noradrenergic and opioid mechanisms. **Brain Res. Bull.**, 58(6): 601-5, 2002.
- SEGATO, F.N.; CASTRO-SOUZA, C.; SEGATO, E.M.; MORATO, S.; COIMBRA, N.C. Sucrose ingestion causes opioid analgesia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30: 981-984, 1997.

- SHIDE, D.J.; BLASS, E.M. Opioidlike effects of intraoral infusions of corn oil and polycose on stress reactions in 10-day-old rats. **Behav. Neurosci.**, 103(6): 1168-1175, 1989.
- SKOGSDAL, Y.; ERIKSSON, M.; SCHOLLIN, J. Analgesia in newborns given oral glucose. **Acta Paediat.**, 86: 217-220, 1997.
- SMITH, D.L.; D'AMOUR, M.C.; D'AMOUR, F.E. The analgesic properties of certain drug and drug combinations. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 77:184-193, 1943.
- SPATH, M. Current experience with 5-HT₃ receptor antagonists in fibromyalgia. **Rheum. Dis. Clin. North Am.**, 28(2): 319-28, 2002.
- STEIN, C.; COMISEL, K.; HAIMERL, E.; YASSOURIDIS, A.; LEHRBERGER, K.; HERZ, A.; PETER, K.N. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. **Engl. J. Med.**, 325(16): 1123-6, 1991.
- STEIN, C.; HASSAN, A.H.; PRZEWLOCKI, R.; GRAMSCH, C.; PETER, K.; HERZ, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 87(15): 5935-9, 1990.
- STEVENS, C.W. Opioid antinociception in amphibians. **Brain Res. Bull.**, 21(6): 959-62, 1988.
- SURMEIER, D.J.; HONDA, C.N.; WILLIS, W.D. Patterns of spontaneous discharge in primate spinothalamic neurons. **J. Neurophysiol.**, 61(1): 106-15, 1989.
- TAKESHITA, N.; OHKUBO, Y.; YAMAGUCHI, I. Tiapride attenuates pain transmission through an indirect activation of central serotonergic mechanism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 275: 23-30, 1995.
- TAKESHITA, N.; YAMAGUCHI, I. Meta-chlorophenylpiperazine attenuates formalin-induced nociceptive responses through 5-HT_{1/2} receptors in both normal and diabetic mice. **Br. J. Pharmacol.**, 116: 3133-3138, 1995.

- TAYLOR, B.K.; BASBAUM, A.I. Systemic morphine-induced release of serotonin in the rostroventral medulla is not mimicked by morphine microinjection into the periaqueductal gray. **J. Neurochem.**, 86(5): 1129-41, 2003.
- TENEN, S.S. Antagonism of the analgesic effect of morphine and other drugs by p-chlorophenylalanine, a serotonin depletor. **Psychopharmacol.**, 12(4): 278-85, 1968.
- TERENIUS, L. Stereospecific interaction between narcotic analgesic and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, 32 (5): 317-20, 1973.
- TERENZI, M.G.; REES, H.; MORGAN, S.J.; FOSTER, G.A.; ROBERTS, M.H. The antinociception evoked by anterior pretectal nucleus stimulation is partially dependent upon ventrolateral medullary neurones. **Pain**, 47(2): 231-9, 1991.
- TERENZI, M.G.; ZAGON, A.; ROBERTS, M.H. Efferent connections from the anterior pretectal nucleus to the diencephalon and mesencephalon in the rat. **Brain Res.**, 701(1-2): 183-91, 1995.
- TERMAN, G.W.; SHAVIT, Y.; LEWIS, J.W.; CANNON, J.T.; LIEBESKIND, J.C. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. **Sci.**, 14; 226(4680): 1270-7, 1984.
- TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística** 7.ed. Belo Horizonte:L.T.C. Editora, 1999.
- TSENG, L.F. Evidence for epsilon-opioid receptor-mediated beta-endorphin-induced analgesia. **Trends Pharmacol. Sci.**, 22(12): 623-30, 2001.
- WANG, H.; WESSENDORF, M.W. Mu- and delta-opioid receptor mRNAs are expressed in periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla. **Neurosci.**, 109(3): 619-34, 2002.

- WANG, X.M.; YUAN, B.; HOU, Z.L. Role of the deep mesencephalic nucleus in the antinociception induced by stimulation of the anterior pretectal nucleus in rats. **Brain Res.**, 577(2): 321-5, 1992.
- WATKINS, L.R.; MAYER, D.J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Sci.**, 216(4551): 1185-92, 1982.
- WATKINS, L.R.; MAYER, D.J. Multiple endogenous opiate and non-opiate analgesia systems: evidence of their existence and clinical implications. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 467: 273-99, 1986.
- WIBERG, M.; BLOMQVIST, A. The projection to the mesencephalon from the dorsal column nuclei. An anatomical study in the cat. **Brain Res.**, 311(2): 225-44, 1984.
- WILKINSON, L.O.; DOURISH, C.T. Serotonin and animal behavior. In: **Serotonin Receptor Subtypes: Basic and Clinical Aspects**, S.J. Perouka (ed.). New York: Wiley-Liss, 1991.
- WILLIS, W.D. Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, 308(1136): 253-70, 1985.
- WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol.**, 14(1): 2-31, 1997.
- WILSON, D.G.; REES, H.; ROBERTS, M.H. The antinociceptive effects of anterior pretectal stimulation in tests using thermal, mechanical and chemical noxious stimuli. **Pain**, 44(2): 195-200, 1991.
- WOOLF, C.J. A new strategy for the treatment of inflammatory pain. Prevention or elimination of central sensitization. **Drugs**, 47 Suppl. 5: 19; discussion 46-7, 1994.
- WURTMAN, R.J. Ways that foods can affect the brain. **Nut. Reviews**, Suppl: 2-6, 1986.

- WURTMAN, R.J.; WURTMAN, J.J. Brain serotonin, carbohydrate-craving, obesity and depression. **Obes. Res.**, Suppl. 4, 477S-480S, 1995.
- YAKSH, T.L. Direct evidence that spinal serotonin and noradrenaline terminals mediate the spinal antinociceptive effects of morphine in the periaqueductal gray. **Brain Res.**, 160(1): 180-5, 1979.
- YEZIERSKI, R.P.; GERHART, K.D.; SCHROCK, B.J.; WILLIS, W.D. A further examination of effects of cortical stimulation on primate spinothalamic tract cells. **J. Neurophysiol.**, 49(2): 424-41, 1983.
- YOKOTA, T. Thalamic mechanism of pain: shell theory of thalamic nociception. **Jpn. J. Physiol.**, 39(3): 335-48, 1989.
- ZAGON, A.; TERENCE, M.G.; ROBERTS, M.H. Direct projections from the anterior pretectal nucleus to the ventral medulla oblongata in rats. **Neurosci.**, 65(1): 253-72, 1995.
- ZGOMBICK, J.M.; SCHECHTER, L.E.; MACCHI, M.; HARTIG, P.R.; BRANCHEK, T.A.; WEINSHANK, R.L. Human gene S31 encodes the pharmacologically defined serotonin 5-hydroxytryptamine_{1E} receptor. **Mol. Pharmacol.**, 42(2): 180-5, 1992.
- ZHANG, A.Z.; PASTERNAK, G.W. Ontogeny of opioid pharmacology and receptors: high and low affinity site differences. **Eur. J. Pharmacol.**, 73: 29-40, 1981.
- ZIFA, E.; FILLION, G.O. 5-Hydroxytryptamine receptors. **Pharmacol. Rev.**, 44(3): 401-58, 1992.