ELIZABETH TEODOROV

COMPORTAMENTO MATERNAL E O PAPEL DOS RECEPTORES OPIÓIDES NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATAS LACTANTES

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Farmacologia)..

São Paulo

2008

ELIZABETH TEODOROV

COMPORTAMENTO MATERNAL E O PAPEL DOS RECEPTORES OPIÓIDES NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATAS LACTANTES

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio

São Paulo

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elizabeth Teodorov.

Título da Tese: Comportamento maternal e o papel dos receptores opióides na substância cinzenta periaquedutal de ratas lactantes.

Orientador(a): Luciano Freitas Felício.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **112** nas fls. **9** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Luciano de Freitas Felício, Coordenador da Linha de Pesquisa "***Comportamento maternal e o papel dos receptores opióides na região periaquedutal de ratas lactantes***" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Elizabeth Teodorov**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **16.12.2004.**

São Paulo, 20 de dezembro de 2004.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, chefe do Departamento de Patologia da FMVZ-USP pela amizade e confiança em permitir a utilização das dependências de seu laboratório;

Ao Dr. Heidge Fukumasu, pela paciência e disposição em me auxiliar nos experimentos, principalmente na co-orientação de alunos de iniciação científica;

Aos meus queridos amigos do biotério da FMVZ-USP, especialmente à Cláudia e Herculano, pelo cuidado e por tolerar e compreender essa aluna semi-histérica preocupada com o bem-estar de seus animais;

Às queridas amigas da secretaria de pós-graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Departamento de Farmacologia, Selminha e Julieta. Obrigada pela paciência, por repetir indefinidamente as datas de depósito de tese, pela simpatia sempre presente.....vocês transformam um dia chuvoso e tenebroso (principalmente depois de perder um experimento inteiro) em um dia maravilhoso de sol!!!!!

Às minhas colegas do Laboratório de Biologia Molecular em Neurociências e Comportamento por todas as horas agradáveis de trabalho, discussão e sobretudo, pelas animadas festas, sempre necessárias;

Aos meus alunos de graduação e de iniciação científica.....vocês me mostram a cada dia que realmente fiz a escolha certa em me dedicar de corpo de alma ao sacerdócio do magistério;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por financiarem esse projeto;

Obrigada a todos que contribuíram para que minha paciência fosse exercitada e se elevasse aos níveis que se espera de um cientista brasileiro. Obrigada aqueles que não foram mencionados somente porque minha memória ficou pequena diante da quantidade de pessoas que me foram (e são) importantes. Meus sinceros agradecimentos!!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Profa. Dra. Rosana Camarini, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela amizade, pelas valiosas contribuições no meu exame de qualificação e sobretudo, pela sempre disposição em ouvir e ajudar;

Profa. Dra. Antonia Gladys Nasello, da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo pela contribuição no exame de qualificação, pelas idéias, pela amizade e sobretudo, por ser um exemplo a ser seguido de determinação e amor pela pesquisa e ensino;

Profa. Dra. Débora Rejane Fiori-Chadi, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP pela gentileza em permitir que eu realizasse todos os experimentos de Western Blot em seu laboratório.....sem sua ajuda e paciência, certamente o trabalho não seria finalizado com tanto primor;

Profa. Dra. Merari Ramires de Fátima Ferrari, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP pela amizade, paciência, disponibilidade e didática.....Mera, você foi uma pessoa decisiva em muitos experimentos, e é um exemplo de profissional competente e ser humano ímpar.

AGRADECIMENTOS ETERNOS

Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio, simplesmente por tudo.....pela amizade, companheirismo, confiança, troca de idéias, por me ensinar a ensinar.....obrigada por permitir o convívio com você e sua família, por ser um estopim para meu sucesso profissional, por me mostrar como é maravilhoso ser mais humana na sua total essência.....muito obrigada por ser um paizão!!!!!;

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi, afinal você foi o começo de tudo.....entrei no departamento de Patologia da FMVZ em 1997 quase muda e hoje, onze anos depois o sucesso de meu trabalho compartilho com você.....obrigada pela amizade, carinho, confiança e pelo apoio sempre presente na UNIP;

Prof. Dr. José Luis Avanzo.....meu amigo Zé, o chefinho!!! Obrigada pelo apoio de sempre, pelo empenho em sanar minhas dúvidas, por ser meu braço direito e também o esquerdo!!!! Obrigada pela confiança na pós-graduação na UNIP, sua amizade é uma dádiva de Deus;

Profa. Ms. Soraya Ferreira Habr.....minha querida amiga, companheira de alegrias e tristezas, festas e crises existenciais, loucura com os alunos, finalização de tese e chás da tarde.....muito obrigada pelo privilégio de compartilhar sua amizade!!!!!

À minha família, principalmente minha mãe Marina.....caramba mãe, estou eu aqui de novo inundando o teclado só de lembrar todas as situações difíceis que você superou para que suas duas filhas pudessem estudar e cultivar o que é mais sagrado nesse mundo.....o amor e o conhecimento!!!!!!

À Deus, presente na minha vida a todo momento, por permitir minha vitória!

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda certificação experimental. Perceber fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira.”

Rui Barbosa

Frank & Ernest Bob Thaves

RESUMO

TEODOROV, E. **Comportamento maternal e o papel dos receptores opióides na substância cinzenta periaquedutal de ratas lactantes**. 2008. 190 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A estimulação opioidérgica decorrente do tratamento com morfina em fêmeas reprodutoras gera efeitos moleculares e comportamentais tardios diferenciados de acordo com o estado fisiológico no momento do tratamento. Trabalhos prévios têm demonstrado um importante papel da substância cinzenta periaquedutal (PAG) neste fenômeno. Assim, investigou-se a expressão dos receptores opióides centrais, por meio de estudos da atividade dos seus genes e da presença dos respectivos produtos protéicos. Possíveis modulações decorrentes do uso agudo e crônico de agonistas dos receptores de opióides na PAG durante os períodos de gestação ou lactação no comportamento maternal em ratas também foram investigadas. Os resultados mostraram que a expressão dos receptores opióides na PAG em fêmeas é modulada tanto pelo estado fisiológico como por desafios farmacológicos com possíveis implicações para o comportamento maternal.

Palavras-chave: Comportamento Maternal; Morfina; Substância cinzenta periaquedutal; Receptores opióides; Biologia molecular.

ABSTRACT

TEODOROV, E. **Maternal behavior and the role of opioid receptors on periaqueductal grey in female lactating rats**. 2008. 190 f. Doctor thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Morphine-induced opioidergic stimulation leads to tardive molecular and behavioral changes in female rats. Previous works have demonstrated a role for the periaqueductal grey (PAG) on opioid-mediated behavioral selection during lactation. This study was designed to investigate the maternal behavior and the physiological and pharmacological modulation of the expression of opioid receptors. The results showed that PAG opioid gene expression is modulated both by physiological status and pharmacological treatments. These data may have implications for maternal behavior.

Key words: Maternal behavior; Morphine; Periaqueductal grey; Opioid receptors; Molecular biology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 Sobre o comportamento maternal em roedores 18
1.2 Sobre a substância cinzenta periaquedutal – PAG 21
1.3 Opióides 24
1.4 Farmacologia molecular dos receptores opióides 27
1.5 Opióides e comportamento maternal em ratas..... 30
2 OBJETIVOS 34
2.1 Objetivo Geral 34
2.2 Objetivos Específicos 34
3 MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1 Animais 37
3.2 Drogas 37
3.3 Análise da expressão dos genes *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ respectivamente, na PAG, estriado e hipotálamo de ratas..... 38
3.3.1 Extração de RNA total (método TRIZOL) 38
3.3.2 Ensaio de transcrição reversa (RT-PCR)..... 39
3.3.3 Ensaio de PCR e análise semi-quantitativa de expressão dos genes *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ respectivamente, na PAG, estriado e hipotálamo de ratas..... 39
3.3.4 PCR em tempo real no ABIPrism® 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems)..... 41
3.3.5 Interpretação dos resultados obtidos no sistema de Real-Time PCR..... 44
3.3.5.1 Método comparativo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para quantificação relativa..... 44
3.3.5.2 Derivação da fórmula..... 44
3.4 Western Blot..... 47
3.4.1 Preparo das amostras 47
3.4.2 Quantificação das proteínas..... 47

3.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições denaturantes..... 48
3.4.4 Eletro-transferência das proteínas..... 48
3.4.5 Imunodetecção das proteínas de interesse..... 48
3.5 Avaliação do comportamento maternal em ratas lactantes..... 50
3.6 Análise Estatística..... 51
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS 53
4.1 Delineamento Experimental Geral..... 53
PARTE 1- AVALIAÇÕES SEMI-QUANTITATIVAS DE EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA RECEPTORES OPIÓIDES EM DIFERENTES REGIÕES CEREBRAIS DE RATAS..... 54
Experimento 1..... 55
Experimento 2 57
Experimento 3..... 61
PARTE 2- AVALIAÇÕES QUANTITATIVAS DE EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA RECEPTORES OPIÓIDES NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATAS E ESTUDOS COMPORTAMENTAIS..... 65
Experimento 4..... 66
Experimento 5..... 69
Experimento 6 71
Experimento 7..... 73
Experimento 8..... 75
Experimento 9..... 78
Experimento 10..... 80
Experimento 11..... 82
Experimento 12..... 84
Experimento 13..... 87
Experimento 14..... 89
Experimento 15..... 91
Experimento 16..... 93
Experimento 17..... 95
Experimento 18..... 97

Experimento 19.....;..... 103
Experimento 20..... 105
Experimento 21..... 107
Experimento 22..... 113
Experimento 23..... 115
5 DISCUSSÃO..... 118
6 CONCLUSÃO..... 138
REFERÊNCIAS..... 139
ANEXOS..... 154

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sobre o comportamento maternal em roedores

Em mamíferos, o conjunto de cuidados que a mãe oferece aos filhotes é denominado comportamento maternal (CM). O cuidado maternal é um comportamento complexo, espontâneo, instintivo e com características espécie-específicas determinadas por modificações fisiológicas que ocorrem pouco antes ou logo após o parto (NUMAN, 1994; MATTSON et al., 2001). Durante este período especial, a meta principal da fêmea é garantir a sobrevivência dela e de seus filhotes.

Os cuidados maternais**,** que se expressam desde o nascimento da prole e se mantêm por todo o período de lactação, se alteram ao longo do desenvolvimento desta. Durante os primeiros 10 dias após o parto as mães permanecem mais tempo na área do ninho e à medida que os filhotes crescem, aumentando sua independência em relação à mãe e desenvolvendo habilidades que assegurem sua própria sobrevivência, os cuidados maternos também tendem a decrescer e a mãe torna-se menos responsiva em relação aos filhotes. Esses dois fatores, agindo em conjunto, propiciam a ocorrência do desmame.

Alguns parâmetros típicos do CM em roedores são busca, recuperação, agrupamento, “grooming” de filhotes e postura de amamentação (Figura 1).

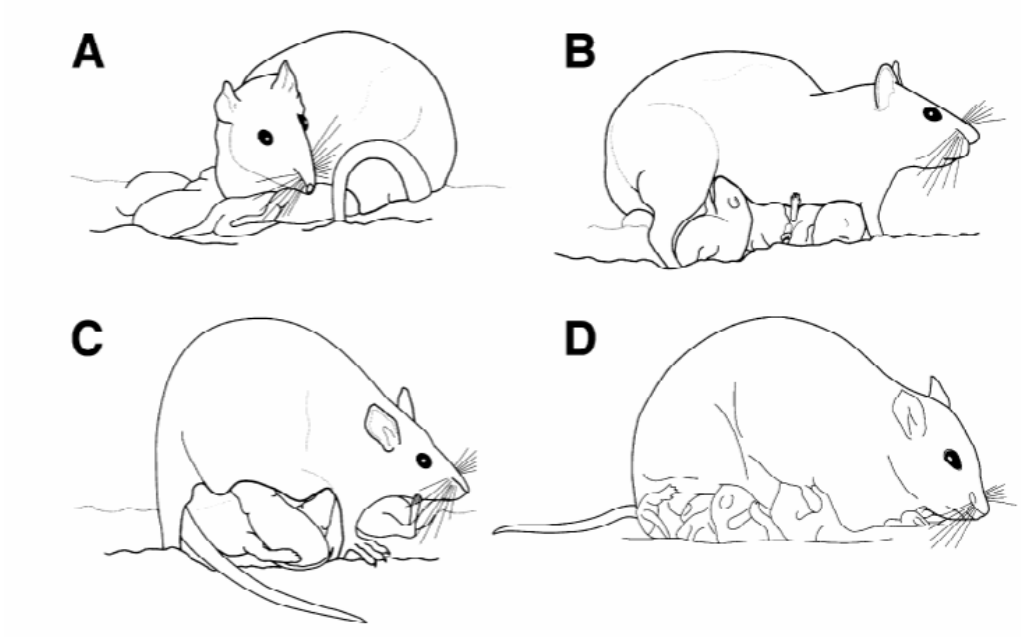


Figura 1 – Parâmetros do comportamento maternal em ratas. Agrupamento de filhotes (A), preparo da postura para amamentação (B), "crouching" ou cifose fisiológica (C) e comportamento maternal total (D).
Retirado de Numan (1994).

Diversos fatores ambientais, psicológicos, biológicos e neurais interagem para promover e manter o CM. Assim como mudanças hormonais internas geram respostas fisiológicas e comportamentais compensatórias, mudanças ambientais também levam a alterações hormonais (SCHULKIN, 1999).

Wiesner e Sheard (1933) foram os primeiros a sugerir que alterações internas que acontecem durante o final da gestação poderiam ser responsáveis pelo aparecimento do CM. Estes autores demonstraram que o início da responsividade materna em ratas coincidia com o nascimento dos filhotes, uma vez que logo após o parto a mãe cuidava não só de seus filhotes como também de filhotes adotivos. Fêmeas nulíparas prenhes (1 a 9 dias de gestação) e fêmeas virgens não cuidavam de filhotes adotivos. Em pesquisas consecutivas, esses mesmos pesquisadores verificaram que fêmeas virgens poderiam passar a cuidar de filhotes adotivos após alguns dias (4 a 7 dias) se estes passassem a viver no mesmo ambiente que o delas. Sheehan et al., 2000 verificaram que a contínua exposição aos filhotes, processo denominado concavenação, pode induzir mudanças hormonais em fêmeas virgens

nulíparas. Leblond (1940) já havia observado esse fenômeno em camundongos fêmeas virgens e o denominou sensibilização. Uma forma de interpretar esses achados é que os processos que inibem a responsividade materna seriam superados pelas alterações hormonais semelhantes às que ocorrem no parto, tendo por conseqüência o surgimento do CM (YIM JUNIOR, 2001).

Variações nos níveis séricos de estrógeno, progesterona, prolactina, ocitocina, vasopressina, colecistocinina e β-endorfina são importantes para que a fêmea cuide de seus filhotes adequadamente logo após o nascimento (SHAIKH, 1971; SANYAL, 1978; THORBURN; CHALLIS,1979; NUMAN, 1994).

A atuação cadenciada dos hormônios ao final da gestação e início da lactação, isto é, queda brusca de progesterona plasmática e aumento nos níveis séricos de estrógeno e prolactina é essencial para que ocorra o pronto início do CM concomitantemente ao nascimento dos filhotes (NUMAN, 1994). A secreção de ocitocina possui ações periféricas mediando a estimulação das contrações uterinas durante o trabalho de parto (SUMMERLEE et al., 1998), modulando o reflexo de ejeção do leite na lactação, além de promover o CM (PEDERSEN; PRANGE, 1979).

Moltz et al. (1970) demonstraram a indução do CM em ratas ovariectomizadas, após tratamento com estrógeno, seguido de aplicações de progesterona e prolactina. Em 48 horas de exposição aos filhotes as fêmeas submetidas ao tratamento hormonal completo expressam CM, enquanto fêmeas que receberam apenas dois destes hormônios não apresentaram o CM com a mesma intensidade, indicando que aquele padrão de alteração do perfil hormonal, com queda nas concentrações de progesterona e aumento nas de estrógeno e prolactina no final da gestação, é fundamental para a expressão otimizada do CM.

Acredita-se que todos estes hormônios interajam com diversos sítios neurais críticos para a expressão do CM, tais como a área pré-óptica medial (APOM) e a porção ventral do núcleo intersticial da estria terminal (NUMAN et al., 1977; BRIDGES et al., 1985; BRIDGES et al., 1990; BRIDGES; FREEMARK, 1995). Por exemplo, o implante de estrógeno na APOM reduz as latências para o CM, podendo interferir no aumento da motivação para o comportamento e facilitando o controle motor associado ao mesmo (NUMAN, 1974).

Ainda em relação à APOM, um dos principais substratos neuroanatômicos relacionados com o controle do CM, Numan et al., (1977) demonstrou que lesões nesta área em ratas primíparas inibem a expressão todos os parâmetros do CM, ou seja, a busca dos filhotes, a construção do ninho e a amamentação. Outra importante região é a área tegmental ventral (ATV), a qual possui diversas projeções ascendentes e descendentes (FALLON; MOORE, 1978; BECKSTEAD et al., 1979; SIMON et al., 1979), sendo que algumas projeções ascendentes alcançam o estriado, particularmente a porção ventral. Visto que as estruturas estriatais fazem parte do sistema motor extrapiramidal, que têm influência sobre os mecanismos corticais e prosencefálicos da função motora, as projeções APOM-ATV ganham acesso ao sistema motor e promovem processos relacionados ao CM via projeções ATV-estriado (CONRAD; PFAFF, 1976; SWANSON et al., 1984; YOUNG et al., 1984; HABER et al., 1985).

Trabalhos realizados por Miranda-Paiva (2003) e Miranda-Paiva et al. (2003) apontam a importância da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na inibição opioidérgica do CM, revelado tanto pela imunohistoquímica com proteína Fos, como por abordagens farmacológicas. Entretanto, a dinâmica funcional da PAG no que se refere aos processos comportamentais de fêmeas lactantes ainda é pouco conhecida.

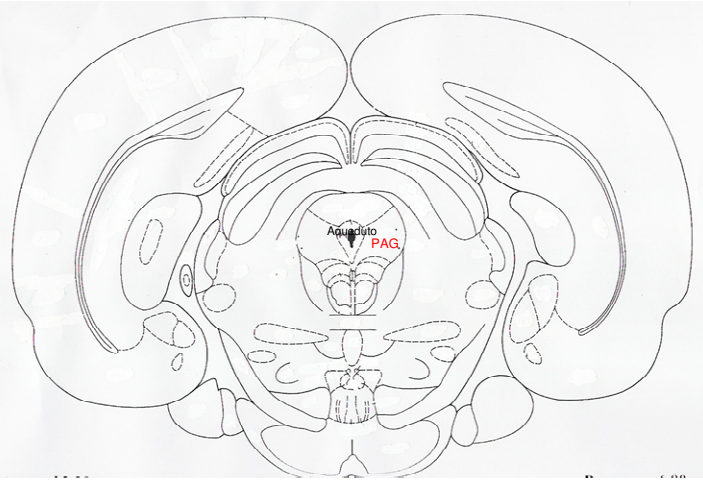
1.2 Sobre a substância cinzenta periaquedutal – PAG

A PAG é conhecida por desempenhar um importante papel na modulação da transmissão nociceptiva (BANDLER; SHIPEY, 1994).

Dada a sua posição estratégica no SNC, a PAG de um lado integra aspectos límbicos e de outro influencia a expressão de diversos comportamentos motivados (Figura 2)

.

(A)



(B)

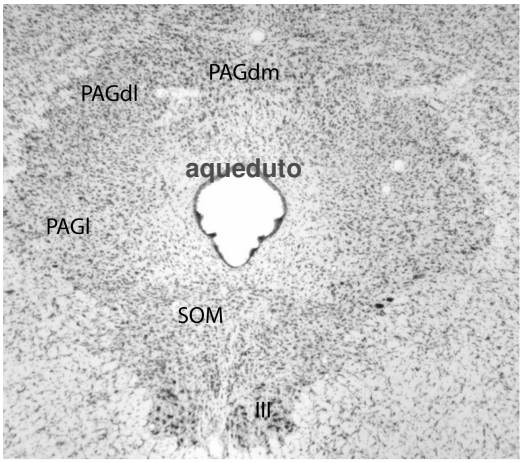


Figura 2 – Localização da PAG em corte de encéfalo (A), retirado de Paxinos; Watson (1996). Anatomia da PAG (B), evidenciando sua localização junto ao terceiro ventrículo, além de suas subsdivisões, sendo PAG dorso-ventral (PAGdm), PAG dorso-lateral (PAGdl), PAG lateral (PAGl) e núcleo supra oculomotor (SOM).
Retirado de Miranda-Paiva et al. (2003).

Sabe-se que essa região está intimamente envolvida com muitas funções como vocalização (HOLSTEGE, 1989), respostas ao medo (FANSELOW, 1991) e receptividade sexual (HENNESSEY et al., 1990). Lonstein e Stern (1997) observaram que a PAG está diretamente relacionada com comportamentos reprodutivos e de

defesa, bem como em induzir a posição de cifose fisiológica (permanência da fêmea sobre a ninhada na postura apropriada à amamentação) e agressividade materna em ratas lactantes.

A PAG parece estar envolvida no controle de vários aspectos do CM em ratas, porém sua participação têm sido pouco investigada. Alguns estudos têm mostrado que a expressão do CM mobiliza as regiões lateral e ventrolateral da parte caudal da PAG que estariam envolvidas particularmente na organização da cifose fisiológica (STERN, 1996; LONSTEIN; STERN, 1997). Demonstrou-se que a ativação opioidérgica da PAG lateral (PAGl) determina a inibição do CM em ratas lactantes permitindo a expressão de outros comportamentos como os de predação e forrageamento (COMOLI et al., 2003). Além disso, os resultados mostram que a integridade da PAGl é necessária para a inibição do CM. Estes dados são consistentes com o trabalho de Miranda-Paiva et al. (2003) que mostrou que o efeito inibitório da morfina sobre a resposta maternal foi bloqueado por uma injeção unilateral de naloxona na PAGl, mas não em regiões do núcleo reticular mesencefálico.

O estudo realizado por Comoli et al. (2003), demonstrou que o mesmo setor da PAG mobilizado durante a inibição opioidérgica do CM, também se apresenta igualmente mobilizado em animais que estavam procurando alimento ou água (forrageamento). Este resultado é consistente com o trabalho realizado por Miranda-Paiva et al. (2003), no qual foi confirmado em experimentos que o efeito inibitório da morfina sobre a resposta maternal foi bloqueado por uma injeção unilateral de naloxona na PAG lateral rostral.

Na PAG existe uma alta densidade de receptores opióides do tipo μ, enquanto que a densidade dos receptores κ e δ são significantemente menores (MANSOUR et al., 1995). Desta forma, é provável que este sítio neuronal ocupe uma posição crítica na circuitaria opioidérgica envolvida na inibição do CM. Todavia, em circunstâncias naturais, deve-se imaginar que um dado comportamento será inibido para favorecer a ocorrência de um outro de maior valor adaptativo. Neste sentido, é lícito admitir que a PAG poderia estar envolvida nesta comutação comportamental, na qual o CM seria inibido em determinados períodos para favorecer a ocorrência de outras respostas comportamentais.

1.3 Opióides

Na literatura, atribui-se o termo “opióide” a qualquer substância endógena ou sintética com efeitos semelhantes à morfina, enquanto que o termo “opiáceo”, mais antigo, refere-se aos fármacos sintéticos com estruturas não-peptídicas e de ações semelhantes à morfina.

O protótipo dos agonistas opióides, a morfina, é conhecida há muito tempo pela sua capacidade de aliviar a dor intensa com notável eficácia. A papoula constitui a fonte de ópio a partir do qual Serturner, em 1803, isolou o alcalóide puro morfina – que recebeu este nome em homenagem a Morpheu, o deus grego dos sonhos (WALDHOER et al., 2004).

A morfina continua sendo o padrão a partir do qual todas as drogas com acentuada ação analgésica são comparadas, sendo coletivamente conhecidas como “analgésicos opióides”. Estas incluem não somente os derivados alcalóides naturais e semi-sintéticos do ópio, como também substitutos sintéticos, outros agentes semelhantes aos opióides cujas ações são bloqueadas pelo antagonista não-seletivo naloxona e vários peptídeos endógenos. A estrutura química da morfina encontra-se representada na Figura 3.

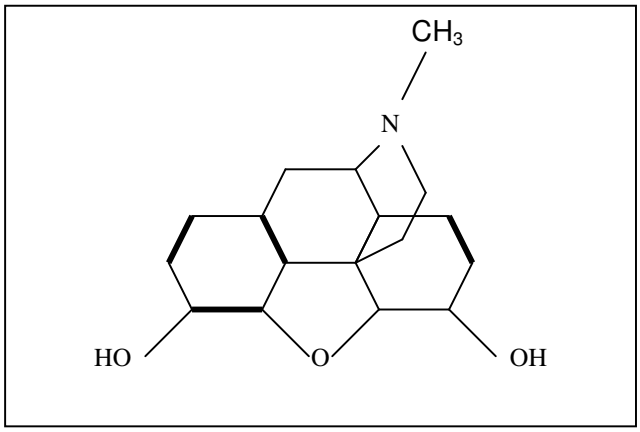


Figura 3- Estrutura química da morfina. As duplas ligações entre as moléculas de carbono encontram-se representadas em negrito.

Assim como os peptídeos opióides endógenos, a morfina exerce seus efeitos farmacológicos por meio de ligação com receptores endógenos, sendo que os trabalhos de Gilbert e Martin (1976) e Martin et al. (1976) foram os primeiros a relatar evidências farmacológicas definitivas que sustentaram a existência de receptores opióides endógenos. Os sítios de ligação dos receptores opióides foram localizados por técnicas auto-radiográficas, utilizando a ligação de radioligantes de alta afinidade com anticorpos dirigidos contra seqüências peptídicas específicas em cada receptor.

Gilbert e Martin (1976) relataram a existência de três tipos de receptores opióides com base nas ações farmacológicas observadas por estudos em cães. Assim, estes receptores foram denominados μ (mi) para o tipo morfina e κ (kappa) para ketociclozacina. Posteriormente, Lord et al. (1977) encontraram um receptor com alta afinidade para encefalinas em comundongos, o qual foi denominado δ (delta).

Com base nessas informações, Evans et al. (1992), Kieffer et al. (1992), Fukuda et al. (1993) e Abood et al. (1994), investiram na clonagem do cDNA do receptor opióide δ e identificaram suas estruturas, sendo que os clones de cDNAs de μ (CHEN et al. 1993a; FUKUDA et al., 1993; THOMPSON et al., 1993; WANG et al., 1993; MINAMI et al., 1994; BUNZÓW et al., 1995) e κ (YASUDA et al., 1993; CHEN et al., 1993b; LI et al., 1993; MENG et al., 1993; MINAMI et al., 1993b, NISHI et al., 1993) foram feitos com base em sua homologia ao receptor δ já clonado. Os receptores clonados em camundongos serviram como referência para a clonagem dos receptores em ratos.

A análise da seqüência de aminoácidos dos receptores opióides clonados indica que eles possuem sete domínios transmembrânicos, o que é característico da família de receptores ligados à proteína G, conforme modelo proposto para o receptor opióide μ, mas que se aplica aos demais receptores (Figura 4).

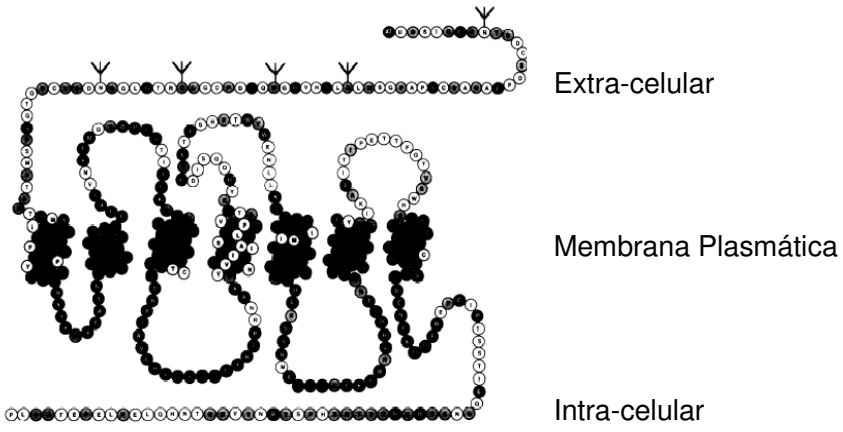


Figura 4- Modelo proposto para a topografia da membrana do receptor opióide μ em ratos. Os resíduos de aminoácidos do receptor opióide μ são conservados em ambos receptores opióides κ e δ (círculos pretos), ou ainda, não se expressam nesses receptores (círculos brancos). Adaptado de Pasternak e Standifer (1995).

Em nível intracelular, os receptores opióides estão ligados à inibição da adenilil-ciclase, através das proteínas G (G_i e/ou G_0). Em linhas gerais, a proteína G é composta de três subunidades (α, β e γ), sendo a subunidade α ligada ao nucleotídeo GDP (difosfato de guanosina). Alterações conformacionais no receptor geradas pela ligação do agonista, promovem a troca do GDP para o GTP (trifosfato de guanosina) na subunidade G_α, levando a dissociação do trímero as subunidades G_α e $G_{\beta\gamma}$. Nessas condições, ambas as subunidades podem associar-se com vários efetores (canais iônicos ou enzimas) para modular suas funções biológicas. No caso dos receptores opióides, a subunidade $G\alpha i$ inibe a enzima adenilil-ciclase que, por sua vez, reduz a produção do AMPc (monofosfato de adenosina cíclico). Neste sentido, a redução da produção do AMPc diminui a liberação de neurotransmissores, por reduzir a atividade da via AMPc – PKA (proteína quinase A), conforme esquematizado na Figura 5.

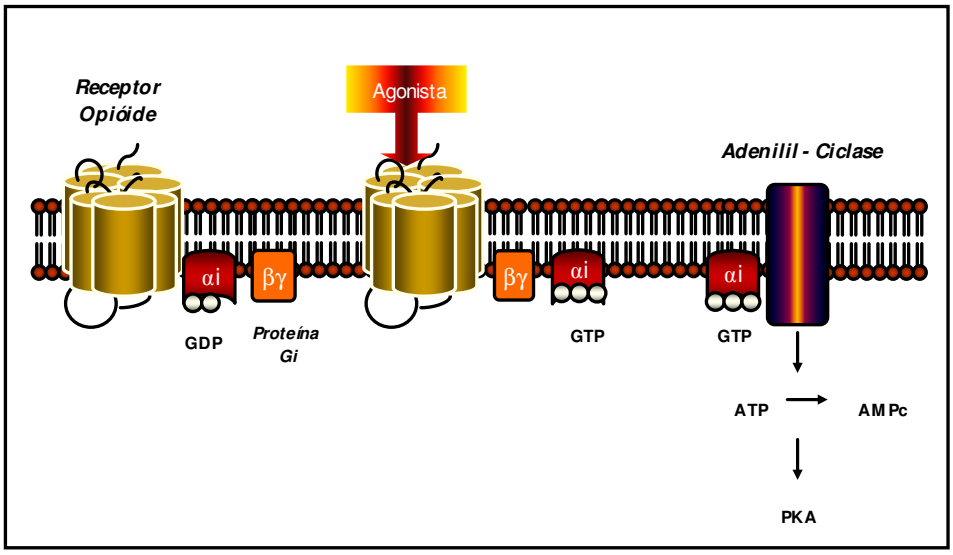


Figura 5- Representação esquemática da sinalização intracelular decorrente da ativação do receptor opióide. Alterações conformacionais no receptor decorrente da ligação do agonista, promove a troca do GDP pelo GTP ligado a subunidade αi da proteína G. Com a troca dos nucleotídeos, o trímero da proteína G se dissocia nas subunidades Gαi e Gβγ. Subseqüentemente, estas subunidades atuam na cascata de sinalização modulando diferentes funções biológicas, tais como: (1) Gαi - inibição da Adenilil-Ciclase (↓AMPc); (2) Gβγ - ativação da condutância ao potássio e inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem; (3) AMPc – inibição da liberação de neurotransmissores (↓ AMPc – PKA).
Adaptado de Katzung (2006).

Deste modo, os opióides reduzem a excitabilidade celular ao promover hiperpolarização da membrana pela ativação da condutância do potássio e inibição dos canais de cálcio (dependentes de voltagem). Ambos mecanismos sendo mediados pela subunidade $G_{\beta\gamma}$ da proteína G (EGUCHI, 2004).

1.4 Farmacologia molecular dos receptores opióides.

Em nível molecular, os receptores opióides formam uma família de proteínas que fisicamente se acoplam às proteínas G e, por meio desta interação, afetam a regulação de canais iônicos, modulam o processamento de Ca^{2+} e alteram a fosforilação de proteínas.

Conforme já citado, foram identificadas três classes principais de receptores opióides (μ, δ e κ) em vários locais do sistema nervoso central (SNC) e em outros tecidos como cardiovascular, gastrintestinal, renal, neuroendócrino entre outros.

Estudos sugerem a existência de subtipos destes receptores com base em critérios farmacológicos, entretanto, foram isolados genes que codificam apenas um subtipo de cada uma das famílias de receptores e que já foram bem caracterizados. Uma possível explicação é a de que os subtipos de receptores surgem de variantes de *splicing* alternativo de um gene comum.

O receptor opióide do tipo μ possui alta afinidade pela morfina, naloxona, DADLE e DAMGO. Estudos farmacológico revelam a presença de subtipos de receptores opióides μ, sendo μ1 e μ2 (PASTERNAK; WOOD, 1986). Os receptores do subtipo μ1 são caracterizados por sua alta afinidade para naloxonazina, por ligação irreversível, e muitas drogas opióides, incluindo morfina e DAMGO, sugerindo que esteja envolvido em muitos efeitos como analgesia supraespinal, sedação, euforia, miose, liberação de prolactina, diminuição do *turnover* de acetilcolina e indução de catalepsia (PASTERNAK; WOOD, 1986; PASTERNAK, 1988). Já os receptores do subtipo μ2 são caracterizados por baixa afinidade por morfina e DAMGO e podem estar envolvidos em mecanismos de depressão respiratória, diminuição do *turnover* dopaminérgico e prejuízos no trânsito do trato gastrointestinal induzidos por opióides (MINAMI; SATOH, 1995).

O receptor opióide do tipo δ possui alta afinidade por DADLE e pelos agonistas seletivos DPLPE e DPDPE, mas não pelo agonista μ1-seletivo DAMGO ou pelos agonistas κ-seletivos U50,488 e U69593. Estudos comportamentais e de *binding* sugerem a existência de subtipos de receptores δ (PORTOGHESE et al., 1992, 1993; SOFUOGLU et al., 1991a, 1991b). DPDPE, DPLPE e DADLE ligam-se em δ1 com alta afinidade, o qual é bloqueado pelo antagonista BNTX; dinorfina II se liga a δ2 com alta afinidade, o qual é bloqueado pelo antagonista NTB.

Evidências farmacológicas indicam que o receptor opióide δ é expresso no corno dorsal da medula espinal e áreas límbicas, o que atribui a este tipo de receptor ações como analgesia, depressão respiratória, comportamentos afetivo e de reforço e redução da motilidade gastrointestinal. Assim, observa-se que as respostas dos receptores μ e δ são muito semelhantes.

Finalmente, o receptor opióide do tipo κ possui alta afinidade por dinorfina A, um agonista endógeno, e por U50,488 e U69593; porém, não há ligação com agonista μ1-seletivo DAMGO ou com o agonista δ1-seletivo DPLPE. O receptor κ é bloqueado pelo antagonista nor-BNI (HERTZ, 1993).

Têm sido identificados subtipos de receptores opióides κ, sendo eles κ1, κ2 e κ3 (ZUKIN et al., 1988; CLARK et al., 1989). Clark et al. (1989) propõem ainda a existência de um subtipo κ3 que possui alta afinidade pela naloxona mas não para U50,488. U69593 se liga seletivamente ao subtipo κ1, e ainda não existe um agonista seletivo para κ2 e κ3. As principais ações dos receptores κ incluem analgesia, depressão respiratória, alucinações, miose, sedação e dependência física, e em certas áreas as ações destes receptores são anatagonistas das ações dos receptores μ.

Sabe-se que a seqüência de aminoácidos dos 3 tipos de receptores opióides é aproximadamente 65% idêntica (Figura 6), com alta similaridade na região dos poros transmembrânicos e *loops* intracelulares (REISINE; BELL, 1993; CHEN et al., 1993a).

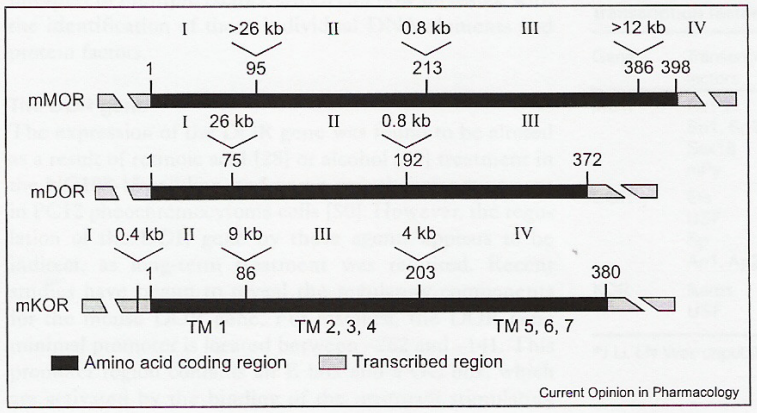


Figura 6- Alinhamento genômico dos genes de camundongo *mor* (mMOR), *dor* (mDOR) e *kor* (mKOR), equivalente aos genes *Oprm1*, Oprd*1* e *Oprk1* em ratos que codificam para os receptores opióides μ, δ e κ respectivamente. A região transcrita foi alinhada de acordo com a translação do códon de iniciação (número 1 acima de cada gene). Os sete domínios transmembrânicos (TM) são numerados e as barras interrompidas representam as porções 5´-UTR e 3´- UTR de cada gene.
Adaptado segundo Wei e Loh (2002).

Diante do exposto, observa-se que os opióides podem atuar com diferentes potências como agonista, agonista parcial ou antagonista em mais de uma classe ou subtipo de receptores, e deste modo, não surpreende que esses agentes exerçam diversos efeitos farmacológicos e comportamentais.

Assim, agonistas opióides representam um grupo de substâncias naturais, semi-sintéticas, ou sintéticas que agudamente induzem analgesia, depressão respiratória, miose, constipação, sensação de bem-estar, entre outras ações (BODNAR;

HADJIMARKOU, 2002). Entretanto, quando utilizados cronicamente, esses fármacos podem induzir tolerância ou sensibilização (tolerância reversa), fenômenos estes em que os efeitos iniciais do fármaco são alterados ao longo do tratamento (KORNETSKY, 2004; MOLLEREAU et al., 1994; WHISTLER et al., 1999).

Drogas de abuso psicoativas, especialmente morfina e cocaína, têm efeitos acentuados sobre áreas importantes do cérebro e as alterações decorrentes à dependência parecem ser permanentes (DE VRIES et al., 1996). De fato, administrações repetidas de opióides ou psicoestimulantes, produzem um aumento progressivo e durável na atividade locomotora de animais, resultante da liberação cálcio-dependente de dopamina, no núcleo accumbens e no corpo estriado (BABBINI; DAVIS, 1972; BARTOLETTI et al., 1983; CADONI; DI CHIARA, 1999; KURIBARA, 1996). Entretanto, estudos realizados por Vanderschuren et al. (2001) mostraram que ratos expostos por uma única vez à morfina (10 ou 30 mg/kg), apresentaram sensibilização comportamental permanente, associada a mecanismos neuroadaptativos.

1.5 Opióides e comportamento maternal em ratas

Os opióides são fortes inibidores da expressão do CM observado em roedores. A morfina, que é uma droga que pode causar dependência, tem sido muito estudada neste contexto comportamental (PRZEWLOCKI, 2004). Durante este período especial, o principal objetivo do comportamento da rata é garantir a sua sobrevivência e dos seus filhotes. Em função disso, muitos comportamentos são inibidos e a rata se dedica incondicionalmente à sua prole (YIM JÚNIOR, 2001). Por outro lado, num cenário de busca compulsiva por drogas de abuso, o único interesse está em procurar e consumir a droga enquanto que outros comportamentos, como o CM, se tornam irrelevantes (KINSLEY et al., 1994).

Ainda, estudos com a morfina, de acordo com a dose administrada, mostraram que esta pode inibir o CM enquanto que seu antagonista, naloxona, suprime essa inibição. Injeções subcutâneas de morfina retardam o início do CM em ratas com gestação interrompida (histerectomizadas-ovariectomizadas) ao 17º dia e inibem o

recolhimento dos filhotes colocados em labirinto em T (BRIDGES; GRIMM, 1982; GRIMM; BRIDGES, 1983; MIRANDA-PAIVA, 1999).

Injeções de morfina na APOM bloqueiam o CM tanto em ratas lactantes como em virgens ovariectomizadas e tratadas com estrógeno (RUBIN; BRIDGES. 1984). A β-endorfina, um opióide endógeno, quando injetada diretamente no ventrículo lateral de ratas lactantes logo após o parto, bloqueia o CM, sugerindo que alterações nos níveis endógenos de opióides são capazes de inibir o CM já estabelecido (FELICIO et al., 1991; MANN et al., 1995; MIRANDA-PAIVA; FELICIO, 1999).

Os opióides também podem influenciar o CM modulando as ações de neurotransmissores ou alterando a termorregulação, uma vez que podem induzir hipertermia nas ratas, o que reduziria o contato delas com seus filhotes (GRIMM; BRIDGES, 1983). Os opióides também podem atuar no bulbo olfatório e produzir aversão aos odores dos filhotes (KINSLEY; BRIDGES, 1990).

A morfina, que também é uma droga que pode causar dependência, tem sido muito estudada neste contexto (PRZEWLOCKI, 2004). Miranda-Paiva et al. (2001, 2003) verificaram que o tratamento materno com morfina no final da prenhez exacerba o efeito inibitório desta droga sobre o CM durante a lactação. Curiosamente, esse efeito foi específico para o CM, pois não houve aumento da locomoção dos animais. Assim, os autores propõem que esse fenômeno tenha algumas similaridades com a sensibilização clássica como, por exemplo, padrões de neuroplasticidade induzidos pelos tratamentos prolongados com drogas de abuso que levam a exacerbação determinadas respostas. Por outro lado, o resultado obtido com a morfina no CM parece estar relacionado com o status hormonal da mãe no final da prenhez (MIRANDA-PAIVA et al., 2001, 2002).

Todos os estudos até agora conhecidos na esfera do CM de ratas e a ação dos opióides neste contexto podem também ser analisados em relação ao papel de cada subtipo de receptor opióide, aplicando-se para tanto as ferramentas de biologia molecular na tentativa de explicar fenômenos nos quais não somente a farmacologia e a fisiologia animal estão atuando para que o CM seja alterado/modulado. Estudos moleculares relatam que foram detectados receptores opióides μ em alta densidade na PAG, tálamo, núcleo do trato solitário, núcleo ambíguo e na área postrema.

De fato, resultados obtidos com os experimentos de Miranda-Paiva (2003) alertam para o fato do sistema opioidérgico estar relacionado com as alterações comportamentais observadas em ratas lactantes sensibilizadas à morfina. Estudos recentes apontam que lesões na PAG inibem o CM de ratas lactantes tratadas com morfina durante o terço final da gestação, e que ainda, esses animais preferem caçar ao cuidar dos filhotes (SUKIKARA et al., 2006). Ainda, estudos desenvolvidos por Yim Junior et al. (2006) mostram que o tratamento no período de pré-acasalamento com morfina prejudica alguns parâmetros do comportamento maternal e que ainda aumenta o *turnover* dopaminérgico.

A literatura ainda é escassa no que diz respeito ao comportamento dos receptores opióides durante períodos críticos na vida do animal, onde alterações fisiológicas importantes ocorrem para que o organismo se adeque a situação para o qual é exigido. Sabe-se que durante a expressão do CM normal em ratas lactantes, os níveis séricos de opióides e o número de receptores opióides na APOM encontram-se reduzidos, enquanto que situação inversa é observada durante o período gestacional (HAMMER; BRIDGES, 1987). Não é claramente conhecido como esses receptores se expressam em ratas virgens e durante determinados períodos críticos da gestação e lactação em ratas, e no caso da PAG esses dados não são conhecidos.

Assim, fica clara a importância da modulação opioidérgica do CM em ratas lactantes, bem como a necessidade de investigação molecular do papel dos receptores opióides na PAG no contexto desse comportamento.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar comparativamente a expressão dos genes *Oprm1, Opkr1* e *Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ respectivamente e seus produtos protéicos na PAG de ratas, bem como o comportamento maternal de ratas lactantes tratadas com morfina ou agonistas opióides seletivos ao final da gestação e desafiadas durante a lactação.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar de modo semi-quantitativo a expressão dos genes *Oprm1, Oprd1 e Oprk1* que codificam para os receptores opióides μ, κ e δ respectivamente, na PAG, estriado e hipotálamo de ratas virgens e adultas:

- tratadas agudamente com sulfato de morfina;
- tratadas prolongadamente com sulfato de morfina.

2.2.2 Avaliar em tempo real a expressão dos genes *Oprm1, Oprd1 e Oprk1* que codificam para os receptores opióides μ, κ e δ respectivamente, bem como seus produtos protéicos na PAG de ratas:

- em diferentes fases do ciclo estral;
- jovens e idosas;
- em diferentes fases da gestação;
- em diferentes fases da lactação;
- primíparas e multíparas;
- virgens tratadas agudamente com sulfato de morfina ou U69593;
- virgens tratadas prolongadamente com sulfato de morfina ou U69593;
- tratadas agudamente com sulfato de morfina ou U69593 ao 5º dia de lactação;
- tratadas prolongadamente no terço final da gestação com sulfato de morfina ou U69593 e desafiadas ao 5º dia de lactação.

2.2.3 Avaliar o CM de ratas:

- tratadas agudamente com sulfato de morfina ou U69593 ao 5º dia de lactação;
- tratadas prolongadamente no terço final da gestação com sulfato de morfina ou U69593 e desafiadas ao 5º dia de lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas em todos os experimentos ratas, *Rattus norvegicus*, Wistar, com aproximadamente 90 dias de idade e peso corporal entre 180 e 200 g no início dos experimentos, excetuando-se aqueles usados em experimentos com idades diferentes. Esses animais foram obtidos do biotério do Departamento de Patologia, setor de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As ratas foram alojadas em gaiolas de polipropileno (33 x 40 x 18 cm) com uma camada de maravalha (3 cm), em grupos de 4 animais/gaiola. Todas as gaiolas foram mantidas em sala com temperatura controlada (22 ºC ± 2 ºC) por meio de aparelhos de ar condicionado e com ciclo de luz de 12h (06:00-18:00h). Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todos os procedimentos experimentais.

3.2 Drogas

- Sulfato de Morfina - Cristália®
-(+-(5α,7α,8β)-N-metil-N[7-(1-pirroldinil)-1-oxaspiro[4,5]dec-8il]benzeneacetamida- **U69593** (agonista seletivo κ) - Sigma-Aldrich®
- Cloridrato de ketamina 5% - König®
- Cloridrato de xilazina 2% - König®

As drogas foram preparadas em soluções que permitiam injetar um volume de 1,0 $ml.kg^{-1}$ de peso corporal. Para as ratas do grupo tratado agudamente foram administradas soluções de sulfato de morfina (3,5 mg/kg) ou U69593 (0,1 mg/kg) e para o grupo controle foi administrada solução salina a 0,9% (não superior a 1 ml/kg). No experimento com tratamento crônico foram administradas soluções de sulfato de morfina (3,5 mg/kg) ou U69593 (0,15 mg/kg). Todas as drogas e a solução salina a

0,9% foram administradas por via s.c na região dorsal dos animais. Os anestésicos foram administrados por via i.p. de acordo com o peso corporal dos animais (1:1).

3.3 Análise da expressão dos genes *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ respectivamente, na PAG, estriado e hipotálamo de ratas.

3.3.1 Extração de RNA total (método TRIZOL)

A extração e manipulação do RNA exigem um preparo diferenciado de todo o material, assim como de todas as soluções a serem utilizadas. Toda a água ultrafiltrada empregada no preparo de soluções, na lavagem de materiais e no processo de extração foi submetida ao tratamento com dietil pirocarbonato (DEPC). Assim, a água ultrafiltrada foi mantida a 37°C por 16 horas na presença de 0,01% de DEPC (Sigma®), sendo posteriormente esterilizada em autoclave (120 ºC, 30 minutos). O tratamento visa eliminar eventuais moléculas de RNAse.

Os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação; o encéfalo foi retirado e lavado em água tratada com DEPC. Em seguida, as áreas de interesse foram retiradas com bisturi, mergulhadas em 500 μl de solução de TRIZOL (Gibco BRL®) e mantidas em gelo, seguindo-se as especificações do fabricante. As PAGs, estriados direitos e hipotálamos foram acondicionados em tubos de microcentrífuga e mantidos em freezer -80ºC, para posterior extração do RNA. Essas regiões foram dissecadas com base nas coordenadas obtidas no Atlas de Paxinos; Watson (1986).

Para análise quantitativa do RNA total, foram retiradas duas alíquotas de 10 μl cada. À uma das alíquotas foi adicionado 3,5 μl de água DEPC e 1,5 μl de corante loading buffer dye 10x (Invitrogen®) e essa mistura foi submetida a eletroforese em gel de agarose 1,5% e tampão TAE ½ x, em voltagem de 80V por 60 minutos para verificação da qualidade de extração. À outra alíquota foi adicionado 40 μl de água DEPC e submetida à leitura de absorbância em 260 nm. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição 1:5.

As amostras de RNA total analisadas foram tratadas com DNAse I. Para tal, a um volume contendo 1 μg de RNA total foi adicionado DNAse I reaction buffer 10x

(Invitrogen®) na concentração final de 1x, 1 U de DNAse I (Invitrogen®), 1 U de RNAseOUT (Invitrogen®) e água DEPC para completar um volume final de 20 µl. Essa mistura foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida incubada por 5 minutos a 75 °C e depois colocada imediatamente em gelo.

3.3.2 Ensaio de transcrição reversa (RT-PCR)

A expressão dos genes *Opmr1, Oprk1* e *Oprd1* foi investigada por meio de RT-PCR, utilizando-se o Superscript™ II RNAse H- Reverse Transcriptase (Invitrogen®). As condições de reação foram estabelecidas de acordo com as indicações do fabricante.

Aos tubos de microcentrífuga contendo 1 µg de RNA total tratado com DNAse I, foram adicionados 1 µl de oligo DT e 1 µl de dNTPs (mistura de 10 mM de cada dNTP Invitrogen®) e água ultrapura até completar um volume de 24 µl. Essa reação foi incubada por 10 minutos a 65 ºC e depois transferida para gelo. Então foram acrescentados às amostras Superscript buffer 1 x (Superscript II - Invitrogen®), 4 µl de DTT 1M (Invitrogen®), 2 µl de RNAseOUT e 2 µl de enzima Superscript II, incubando-se a 42 ºC por 50 minutos em seguida por 15 minutos a 70 ºC. Resfriou-se as amostras em gelo e as mesmas foram acondicionadas em – 20 ºC até o momento da amplificação.

3.3.3 Ensaio de PCR e análise semi-quantitativa de expressão dos genes *Opmr1*, *Oprk1* e *Oprd1* dos receptores opióides µ, κ e δ respectivamente, na PAG, estriado e hipotálamo de ratas.

Os primers confeccionados foram (5´- 3´):

Primer µ-opióide sense- ACC TGG CTC CTG GCT CAA CTT

Primer µ-opióide antisense - TGG ACC CCT GCC TGT ATT TTG

Primer κ-opióide sense – TTC CTG GTG GGA CCT CTT CAT

Primer κ-opióide antisense - GCA CAG CTG TCC TCT CTA GCT

Primer δ-opióide sense - GCT GTG CTC TCC ATT GAC TAC

Primer δ-opióide antisense - GAT GTC CAC CAG CGT CCA GAC

Primer β-actina sense – ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG

Primer β-actina antisense – CTC TCA GCT GTG GTC GTC AA

Os primers desenhados para os receptores opióides μ e δ estão de acordo com o trabalho descrito por Buzás; Cox (1997). Os primers para β-actina e κ foram desenhados em nosso laboratório, por meio do programa Primer Imput3. Assim, os primers foram descongelados, bem como o buffer 10 x, $MgCl_2$, dNTPs, água estéril por sistema milli-Q e o cDNA resultante da etapa anteriormente descrita, sendo os procedimentos realizados em capela de fluxo laminar. Uma mistura com volume final de reação de 40 μl foi preparada para cada amostra de cDNA a ser analisada, contendo: buffer 1 x, 3 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen®), 0,4 mM de dNTPs (Invitrogen®), 0,2 pmol de primer sense (IDT®), 0,2 pmol de primer antisense (IDT®), 0,04 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), água ultrapura e estéril e 100 ng/μl de cDNA.

Em um ciclador térmico (Mastercycle Gradient – Eppendorf®) foram determinados os seguintes ciclos:

Para *β*-actina: 1º ciclo: 95 ºC, 3 minutos; 2º ciclo: 95 ºC, 30 segundos; 3º ciclo: 51 ºC, 1:30 minutos; 4º ciclo: 72 ºC, 1 minuto; 5º ciclo: voltar ao ciclo 2 por 34 vezes; 6º ciclo: 72 ºC, 7 minutos. Para *Oprm1*: 1º ciclo: 95 ºC, 3 minutos; 2º ciclo: 95 ºC, 30 segundos; 3º ciclo: 67 ºC, 1:30 minutos; 4º ciclo: 72 ºC, 1 minuto; 5º ciclo: voltar ao ciclo 2 por 34 vezes; 6º ciclo: 72 ºC, 7 minutos. Para *Oprk1:* 1º ciclo: 95 ºC, 3 minutos; 2º ciclo: 95 ºC, 30 segundos; 3º ciclo: 55 ºC, 1:30 minutos; 4º ciclo: 72 ºC, 1 minuto; 5º ciclo: voltar ao ciclo 2 por 34 vezes; 6º ciclo: 72 ºC, 7 minutos. Para *Oprd1*: 1º ciclo: 95 ºC, 3 minutos; 2º ciclo: 95 ºC, 30 segundos; 3º ciclo: 67 ºC, 1:30 minutos; 4º ciclo: 72 ºC, 1 minuto; 5º ciclo: voltar ao ciclo 2 por 44 vezes; 6º ciclo: 72 ºC, 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e tampão TAE ½ x para realização de análise semi-quantitativa da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1* e *Oprd1* dos receptores para opióide μ, δ e κ respectivamente, medindo-se a densidade da banda de cDNA em relação a de um gene de expressão constitutiva (β-actina), utilizando-se para tal um software específico.

3.3.4 PCR em tempo real no ABIPrism® 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems)

Após a transcrição reversa (RT), foram realizados experimentos utilizando-se o PCR em Tempo Real (Real Time PCR) no aparelho ABIPrism® 7000 (Figura 6A). Neste sistema, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador comum, uma vez que o ABIPrism 7000 é um termociclador acoplado há uma câmera CCD (Figura 7F). A diferença é que a amplificação da seqüência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers (Figuras 7B, C, D e E). A quantificação relativa da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho (Figura 7F).

À medida que a reação de amplificação se processa (Figura 7E), um gráfico é construído (Figura 7G). Neste gráfico, a ordenada corresponde ao número de cópias e a abscissa ao número de ciclos. Diferentemente do sistema tradicional de amplificação, onde o que se observa é o número de cópias final (Figura 7G, círculo vermelho), a amplificação é detectada onde as condições "ótimas" para o PCR são mantidas, ou seja, na fase exponencial. Neste período, os substratos para a amplificação ainda estão presentes nas concentrações ideais, o que no sistema end-point não se observa. Pelas características do sistema, no PCR real time é possível determinar este perfil de amplificação (Figura 7H), o que representa uma das vantagens metodológicas. O ponto na abscissa correspondente ao início do trecho linear é chamado de Ct (*cycle threshold* = limiar de corte) e este valor é utilizado para a comparação relativa da expressão gênica: quanto menor o Ct, teoricamente mais expressa é determinada mensagem, ou seja, a diferença de 1 Ct, representa o dobro de expressão.

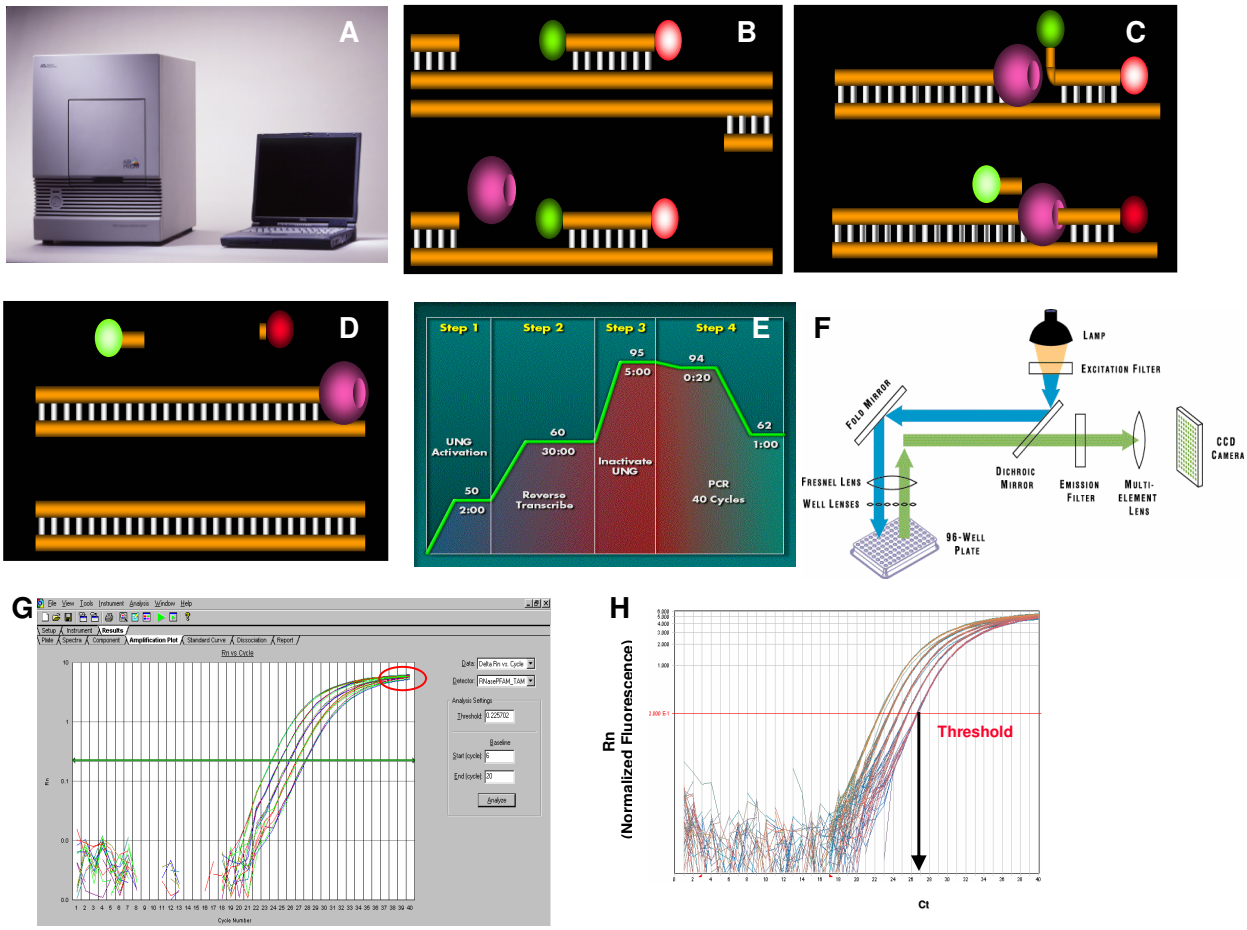


Figura 7- Esquema geral do PCR em Tempo Real. **A.** Equipamento ABI Prism® 7000. **B.** Observa-se os componentes principais da reação em tempo real, os primers ligados, as sondas ligadas a seus respectivos reporter e quencher e a taq polimerase. *Para que não seja amplificado DNA genômico é aconselhado pelo fabricante que os mesmos sejam desenhados em éxons diferentes, embora, isto não seja uma regra.* **C.** Início da reação de amplificação, com a extensão dos primers e atividade 5' exonuclease da taq, com liberação do reporter. **D.** Extensão completa com a liberação completa do reporter. **E.** Apresentação das etapas do PCR em tempo real. Step 1: ativação da UNG; Step 2: primeira extensão; Step 3: inativação da UNG; Step 4: Desnaturação da dupla fita, ligação da sonda a 70ºC e dos primers a 60ºC com extensão dos produtos de PCR. **F.** Funcionamento do sistema óptico de detecção da fluorescência. **G.** Resultado de uma titulação de PCR. **H.** Esquema mostrando o limiar de corte, posicionado na fase exponencial e os seus respectivos Cts (número de ciclos).
Adaptado de manual da Applied Biosystems (2005).

O sistema adotado para a detecção da expressão gênica de *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* foi o sistema TaqMan. Neste sistema, além do par de primers, foi necessária a utilização de uma sonda que, por ter um Tm mais alto (cerca de 10ºC de diferença), se hibridiza de forma específica com a fita template antes do par de primers. A sonda é composta na sua extremidade 5' por fluoróforo R (reporter dye) cuja fluorescência,

quando a sonda está integra, é capturada pelo Quencher (NFQ) acoplado ao MGB. O MGB é a substância que permite a construção da sonda com a diferença de 10ºC em relação ao primer (Figura 8).

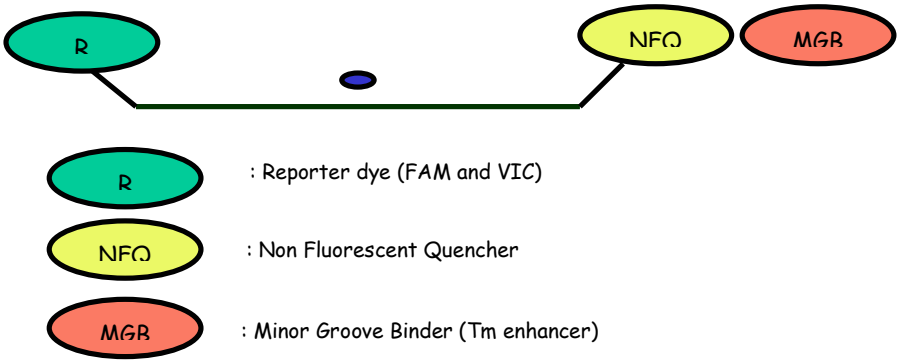


Figura 8- Esquema representando a sonda fluorescente do sistema TaqMan®. Segundo os critérios da Applied Biosystems, o melhor local para a construção da sonda é a junção éxon-éxon. Portanto, sempre que possível este critério foi adotado. No entanto, isto é mais indicado quando não se faz o tratamento com DNAse I. Enquanto unidos, a fluorescência emitida pelo repórter é capturada pelo quencher. Durante a reação a probe é clivada ocorrendo à separação do floróforo e do quencher. Neste instante a fluorescência emitida é registrada pelo equipamento.
Adaptado de manual da Applied Biosystems (2005).

Através da atividade corretiva 5' exonuclease da Taq polimerase, o flouróforo é clivado e a fluorescência emitida é captura pela câmera CCD do equipamento. Assim, durante o processo de extensão iniciado pelo par de primers, a sonda se separa da fita template, e nesse momento ocorre à liberação do fluoróforo. Em cada fase de anelamento, o fluoróforo se intercala na dupla fita, liberando a fluorescência que é, portanto, proporcional ao número de cópias.

As seqüências utilizadas para a confecção dos primers foram aquelas depositadas no banco público do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), sendo as mesmas utilizadas para os ensaios de PCR semi-quantitativos. A empresa Applied Biosystems comercializou os primers e probes, sendo assim denominados: Rn00565144_m1 para *Oprm1*; Rn00567737_m1 para *Oprk1*; RN00561699_m1 para *Oprd1* e 4319413E para o gene constitutivo 18S ribossomal. Optou-se por não utilizar o gene padrão GAPDH, pois

trabalhos recentes têm demonstrado que tratamentos farmacológicos podem alterar o padrão de expressão desse gene.

As condições de PCR utilizadas foram aquelas consideradas as condições universais ótimas da reação pelo fabricante do aparelho, sendo: etapa 1: 50°C, 2 min.; etapa 2: 95°C, 10 min.; etapa 3: 95°C, 15 seg.; etapa 4: 60°C, 1 min.; etapa 5: voltar a etapa 3 por 35 vezes.

3.3.5 Interpretação dos resultados obtidos no sistema de Real Time PCR

3.3.5.1 Método comparativo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN; 2001)

A quantidade do target, normalizada a um controle endógeno e relativo a um calibrador é dada por:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.3.5.2 Derivação da fórmula

A equação que descreve a amplificação exponencial do PCR é:

$$X_n = X_o \times (1 + E_x)^n$$

Onde:

X_n = número de moléculas alvo no ciclo n
X_o = número inicial de moléculas alvo
E_x = eficiência de amplificação de gene alvo
n = número de ciclos

O ciclo de corte (Ct) ou threshold (Figura 1H) indica o ciclo no qual a quantidade do gene target amplificado atinge um threshold fixado. Assim,

$$X_T = X_o \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_x$$

Onde:

$\mathbf{X_T}$ = número do ciclo de corte das moléculas alvo
$\mathbf{C_{T,X}}$ = ciclo de corte para o amplicom alvo
$\mathbf{K_x}$ = constante

Uma equação similar para o controle endógeno da reação é;

$$R_T = R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

Onde:

$\mathbf{R_T}$ = número do limiar de corte das moléculas referências
$\mathbf{R_o}$ = número inicial das moléculas referências
$\mathbf{E_R}$ = eficiência da amplificação da referência
$\mathbf{C_{T,R}}$ = ciclo de corte da amplificação da referência
$\mathbf{K_R}$ = constante

Dividindo-se Xt por Rt resulta na seguinte expressão:

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_o \times (1 + E_x)^{C_{T,X}}}{R_o \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_x}{K_R} = K$$

O exato valor de Xt e Rt dependem de um número de fatores, incluindo:

- Reporter dye utilizado na probe;
- O efeito do contexto da seqüência sobre as propriedades de fluorescência da probe;
- Eficiência de clivagem da probe;
- Pureza da probe;

- Ajuste do threshold.

Além do mais, a constante K não deve ser igual a 1. Assumindo que a eficiência do target e da referência sejam os mesmos:

$$E_x = E_R = E, \qquad \frac{X_o}{R_o} \times (1 + E)^{C_{T,,X}} - C_{T,X} = K$$

ou

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

Onde,

$\mathbf{X_N}$ = Xo/Ro quantidade normalizada do alvo
$^{\Delta C}{}_{T}$ =CT,X – CT,R diferença entre o número de ciclos do alvo e da referência

Rearranjando os dados, têm-se a seguinte expressão:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

O passo final é dividir o X_N por uma das amostras (q) pelo X_N do calibrador (cb):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta CT,cb}} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_T}$$

Onde: $\Delta\Delta CT = \Delta CT,q - \Delta CT,cb$

Para os amplicons desenhados e otimizados de acordo com o fabricante (tamanho do amplicon < 150 pb), a eficiência é próxima de 1. Por conseguinte, a quantidade do target, normalizado a um controle endógeno e a um calibrador relativo é dada por:

$$\mathbf{2^{-\Delta\Delta Ct}}$$

3.4 WESTERN BLOT

3.4.1 Preparo das amostras

Imediatamente após as análises comportamentais nos experimentos específicos, os animais foram sacrificados por decapitação e as PAGs retiradas, sendo que metade dos animais foi utilizada para análises de expressão gênica e a outra para avaliações dos conteúdos protéicos. Após a extração da PAG, esta foi mergulhada em 50 µl de working solution (sample buffer 2 x, DTT 100 mM, PMSF 1 mM) e macerada com pistilos estéreis, sendo que mais 50 µl de sample buffer (SDS 4%, TRIS-HCl pH 6,8 120 Mm, glicerol 20%) foram adicionados posteriormente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm, 15 minutos a 4 ºC. O sobrenadante das amostras foi retirado cuidadosamente e colocado em tubos de microcentrífuga, sendo armazenado em freezer – 80 ºC até o momento das análises.

3.4.2 Quantificação de proteínas

Para a quantificação de proteínas, utilizou-se curva padrão em relação a concentrações conhecidas de albumina com o reagente Bradford. As amostras foram acondicionadas em placas elisa e seguiu-se a quantificação em software específico (SoftMax PRO).

3.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições denaturantes

As frações protéicas foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida na presença de SDS, com o auxílio de mini cubas verticais (Bio Rad®). Os lisados celulares foram solubilizados em um tampão de amostras (TRIS-Base 60 mM, glicerol 25%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, β-mercaptoetanol 14,4M), de

maneira a depositar a quantidade desejada de proteínas (10 μg) em um volume final de 20 μl por pocinho.

A migração foi iniciada em um gel de aproximadamente 1,5 cm de altura (TRIS-Base 1,5M, pH 8,8; SDS 10%; acrilamida 40%, persulfato de amônia 10% e TEMED), sob potencial de 110 V. A eletroforese prosseguiu em um gel de separação (TRIS-Base 1M, pH 8,8; SDS 10%; acrilamida 40%, persulfato de amônia 10% e TEMED), sob voltagem de 110 V, por 1 hora. A eletroforese foi conduzida em Tampão de Migração (Tris-Base 250 mM; SDS 10%; glicina 960 mM).

3.4.4 Eletro-transferência das proteínas

A eletroforese foi interrompida quando a fronte de migração, visualizada graças ao uso do marcador kaleidoscopio (Bio Rad®), atingiu a porção de coloração violeta, correspondente a 40 Kda, correspondente a anidrase carbônica. As proteínas do gel então foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio Rad®). Para isso, o gel foi colocado em um tampão de transferência (TRIS-Base 25 mM; glicina 190 mM, metanol 10%), assim como a membrana e o *blotting paper* (Bio Rad®). Um "sanduíche" foi produzido da seguinte maneira: uma folha de *boltting paper*, o gel de poliacrilamida, a membrana de nitrocelulose, uma outra folha de *blotting paper*. A transferência ocorreu a 100 V durante 1 hora a 4 ºC e sob agitação.

3.4.5. Imunodetecção das proteínas de interesse

Após o tempo estabelecido para a transferência, a membrana foi lavada em TTBS (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 a 0,05%) por 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada durante 1 hora em solução de TTBS acrescida de leite desnatado 5% (p/vol), temperatura ambiente e agitação constante. Finalmente, a membrana foi incubada com anticorpos primários policlonais anti-rabbit para os receptores opióides MOR (anti-μ, 1:750, Santa Cruz®), KOR (anti-κ, 1:1000, Santa

Cruz®), DOR (anti-δ, 1:500, Santa Cruz®) diluídos em leite 3%, permanencendo sob agitação constante a 4°C e por um período de 18 horas.

No dia seguinte, a membrana foi lavada 2 vezes com TTBS por 10 minutos cada e os anticorpos secundários anti-mouse monoclonais (Santa Cruz®) diluídos na proporção 1:10.000 (MOR, DOR e KOR) e 1:6.000 (α-TUBULINA) foram aplicados e a membrana incubada durante 1 hora em temperatura ambiente, em agitação constante. Os anticorpos secundários foram removidos e a membrana lavada 2 vezes com TTBS durante 10 minutos e uma lavagem final com TBS por 10 minutos.

Em seguida procedeu-se a reação de quimioluminescência com kit ECL (Perkin Elmer®) para detecção das proteínas para posterior quantificação. A membrana então foi colocada em solução do kit por 1 minuto para reagir (volumes especificados pelo fabricante), e em seguida rapidamente transferida para um cassete (Amersham®) para revelação. O tempo de exposição no filme aproriado para ECL (Amersham®) foi de 2 minutos para avaliação dos produtos protéicos de genes que codificam para os receptores opiódies e de 25 segundos para a α-TUBULINA, seguindo-se de revelação por 5 minutos, lavagem em água por 30 segundos e fixação por 10 minutos. Em seguida, os filmes foram lavados em água corrente por 10 minutos, aguardando-se o tempo para secagem.

As membranas depois foram tratadas com *erasing buffer* (TRIS-HCl 1M, pH 6,8, SDS 10%, β-mercaptoetanol 1%), para retirada dos anticorpos para receptores opióides e nova incubação com anticorpo anti-mouse monoclonal α-TUBULINA. Assim, as membranas foram incubadas em leite 5% em TTBS por 10 minutos, secas em papel absorvente por 5 minutos e novamente incubadas em *erasing buffer* por 18 minutos a 57ºC e sob agitação. Transcorrido o período as membranas foram lavadas 2 vezes em TTBS, temperatura ambiente por 10 minutos, e bloqueadas com leite 5% TTBS, por 1 hora em temperatura ambiente. Incubou-se o anticorpo primário α-TUBULINA (anti-α-TUB, 1:30.000, Sigma®) diluído ou soro fetal bovino a 1%(BSA) por 1 hora em temperatura ambiente e sob agitação constante. Lavou-se as membranas 2 vezes em TBT-T por 5 minutos cada e incubou-se o anticorpo secundário anti-mouse 1/6.000 monoclonal (Sigma®) por 45 minutos em temperatura ambiente e agitação. Finalmente, as membranas foram lavadas 2 vezes em TTBS por 10 minutos, seguida de lavagem

final com TBS por 10 minutos. Procedeu-se a reação ECL e fotografia das membranas como anteriormente descrito.

Após a obtenção dos filmes, as bandas foram quantificadas por densitometria em um software específico (M4 Imaging Analysis®) e depois realizada a normalização em relação à proteína constitutiva.

3.5 Avaliação do comportamento maternal em ratas lactantes

O teste comportamental foi realizado ao dia 5 de lactação, respeitando-se o tratamento com sulfato morfina (3,5 mg/kg) ou agonista seletivo U69593 (0,15 mg/kg) do dia 17 ao 21 de gestação. Inicialmente foi anotada a posição dos filhotes e da mãe na gaiola moradia, aproximadamente às 9:00 horas. De acordo com a apresentação do ninho, atribuiu-se escores para classificá-lo como fraco, razoável, bom e ótimo. Logo após, a ninhada foi retirada da gaiola, sendo colocada em uma outra gaiola sem maravalha e por onde permaneceu por 1 hora. Trinta minutos após a retirada dos filhotes, a rata recebeu uma injeção aguda de sulfato de morfina (3,0 mg/kg), agonista seletivo para receptor opióide tipo κ (0,10 mg/kg) ou solução salina a 0,9% (até 1 ml/kg). A observação do comportamento maternal foi realizada medindo-se:

- latência (s) para busca dos 8 filhotes colocados nos lados opostos ao ninho dentro da gaiola (REC);
- latência (s) para agrupar esses filhotes dentro do ninho (AGRUP);
- latência (s) para a rata ficar sobre a ninhada em posição apropriada à amamentação (″CROUCHING″);
- latência (s) para o comportamento maternal total (CMT), o que significa ficar em posição de amamentação sobre os filhotes por pelo menos 2 minutos consecutivos.

O CMT foi observado continuadamente até 30 minutos e depois checado aos 45 e 60 minutos. Ratas que não apresentaram o CM durante os 10 primeiros minutos de teste foram retiradas do experimento.

Segue o esquema dos tratamentos e desafios com agonistas opióides (Figura 9).

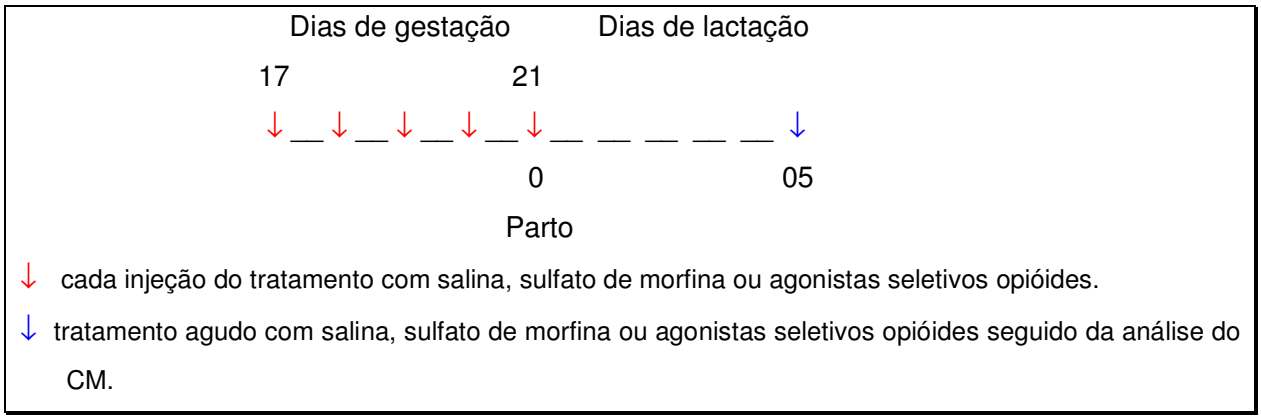


Figura 9- Esquema de tratamento dos animais.

3.6 Análise Estatística

Foi utilizada a prova de Análise de Variância (ANOVA) para avaliar as diferenças entre os tratamentos/períodos reprodutivos e o teste de Tukey para comparações grupo a grupo nos estudos de expressão gênica. Para a avaliação do comportamento maternal foi utilizada o teste de Kruskal-Wallis para avaliar as diferenças entre os tratamentos/períodos reprodutivos e teste de Dunn para comparações grupo a grupo. O teste de Fischer foi utilizado para comparações entre os grupos em relação ao escore atribuído ao ninho. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes sempre que $p < 0,05$.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

4.1 Delineamento Experimental Geral

Foram utilizadas 620 ratas adultas Wistar. Os experimentos foram divididos em duas partes iguais, sendo uma com análises moleculares semi-quantitativas em diferentes regiões cerebrais e a segunda com análises moleculares quantitativas limitando-se à PAG, além de experimentos comportamentais. Os experimentos envolvendo ratas adultas foram realizados quando as mesmas apresentaram 90 dias de idade. Para a coleta do encéfalo, tanto os animais não tratados quanto aqueles submetidos a tratamentos agudo ou crônico foram anestesiados, decapitados e o cérebro dissecado para retirada das regiões de interesse. Os tratamentos consistiram em injeções de solução salina a 0,9%, sulfato de morfina (3,5 mg/kg ou 20,0 mg/kg) e agonista seletivo para receptores opióides tipo κ U69593 (0,15 mg/kg). A seguir, procedeu-se com todos os experimentos envolvendo técnicas de biologia molecular. Os animais tratados cronicamente e desafiados com solução salina a 0,9%, sulfato de morfina (3,5 mg/kg ou 3,0 mg/kg) ou U69593 (0,15 mg/kg ou 0,10 mg/kg) receberam injeções por 5 dias consecutivos, foram avaliados quanto aos aspectos de CM e em seguida foram decapitados, a PAG retirada e realizadas as análises moleculares.

PARTE 1 – AVALIAÇÕES SEMI-QUANTITATIVAS DE EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA RECEPTORES OPIÓIDES EM DIFERENTES REGIÕES CEREBRAIS DE RATAS.

Experimento 1- Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1* e *Oprd1* na PAG, estriado e hipotálamo de ratas virgens adultas.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 10 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais não sofreram qualquer tipo de tratamento farmacológico antes das análises moleculares. Os animais foram previamente anestesiados, decapitados e as regiões de interesse retiradas para obtenção do RNA total. Foram feitos os ensaios de transcrição reversa para análise semi-quantitativa por densitometria da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ respectivamente.

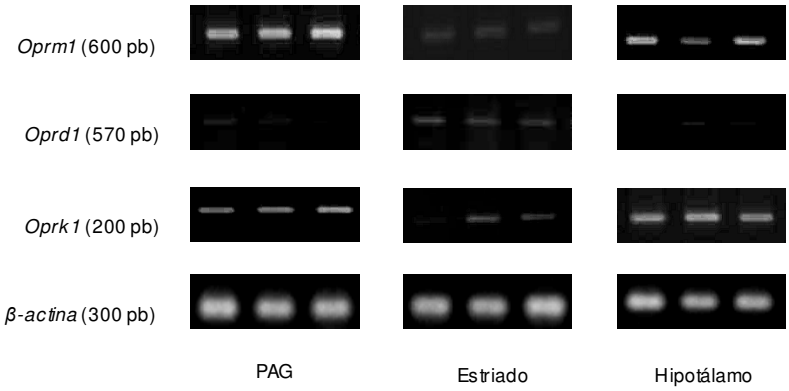
Justificativa:

Embora a literatura seja abundante no tocante ao papel dos receptores opióides no SNC principalmente para os sistemas relacionados à dor, bem como os níveis de expressão de RNAm de genes desses receptores em alguns sítios cerebrais, não há trabalhos que descrevam a expressão dos mesmos em animais que não sofreram nenhum tipo de tratamento. Daí a importância da obtenção desses dados para comparações com animais que foram submetidos a tratamentos farmacológicos. O ensaio visa investigar se o tratamento farmacológico ou ainda, o estado reprodutivo, podem interferir na expressão dos genes.

Resultados:

Os dados da PAG mostram *Oprm1*>*Oprk1*>*Oprd1* em ordem decrescente de expressão quando comparados os valores relativos das densidades das bandas de cDNA. Em relação aos dados do estriado observa-se padrão decrescente de densidade *Oprd1*>*Oprm1*>*Oprk1* enquanto que no hipotálamo observa-se uma ordem decrescente de densidade *Oprk1*>*Oprd1*>*Oprm1* (Figura 10). Esse grupo foi considerado o branco em nível de comparação de expressão gênica para todos os demais experimentos com ratas virgens adultas.

(A)



(B)

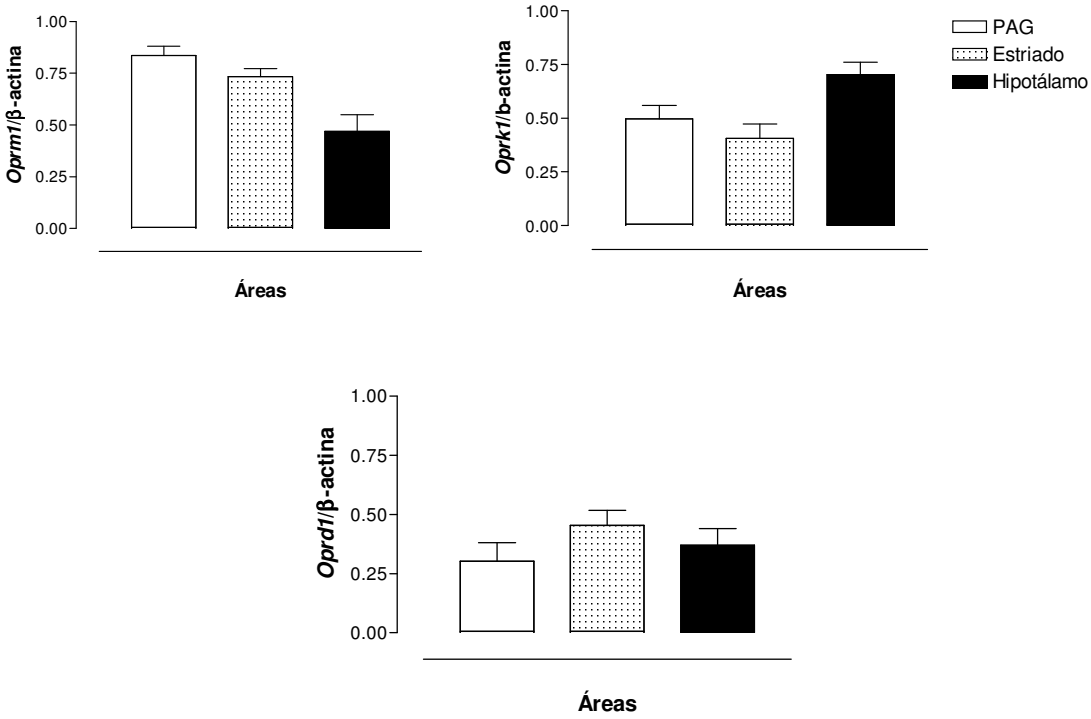


Figura 10 – Produtos de RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG, estriado e hipotálamo de ratas virgens adultas que não sofreram nenhum tipo de tratamento. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, TAE 1/2X (A). Os gráficos em barras (B) representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de RT-PCR correspondentes para β-actina e em relação às densidades do grupo branco. São apresentadas as médias e erros-padrão (n=10). $p > 0,05$. ANOVA.

Experimento 2 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG, estriado e hipotálamo de ratas virgens adultas tratadas agudamente com sulfato de morfina.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 40 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em quatro grupos iguais: um branco, um controle e dois tratados. Ao grupo controle foi administrado solução salina (até 1 ml/kg) e aos grupos tratados administrou-se sulfato de morfina (3,5 mg/kg e 20,0 mg/kg), sendo que animais do grupo branco não sofreram nenhum tratamento. Após 30 minutos, os animais foram previamente anestesiados, decapitados e a PAG, estriado e hipotálamo retirados para obtenção do RNA total e realizados os ensaios de transcrição reversa para análise semi-quantitativa por densitometria da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ respectivamente.

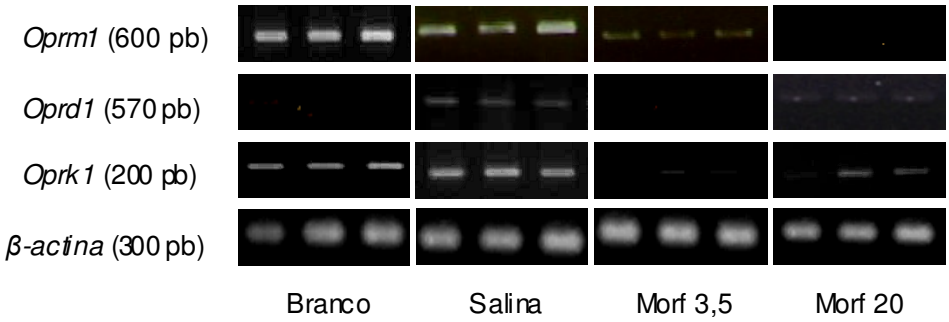
Justificativa:

O tratamento agudo com sulfato de morfina em animais experimentais tem sido foco de estudos sobre a dor. Assim sendo, é importante avaliar os aspectos moleculares do tratamento agudo com diferentes doses deste opióide em animais que não receberam nenhum outro tipo de tratamento. Trata-se de testar a hipótese de se o tratamento agudo seria suficiente para alterar os padrões de expressão dos genes que codificam para os receptores envolvidos. Possíveis alterações nessa expressão poderiam, por sua vez, promover mudanças na fisiologia da resposta desses receptores.

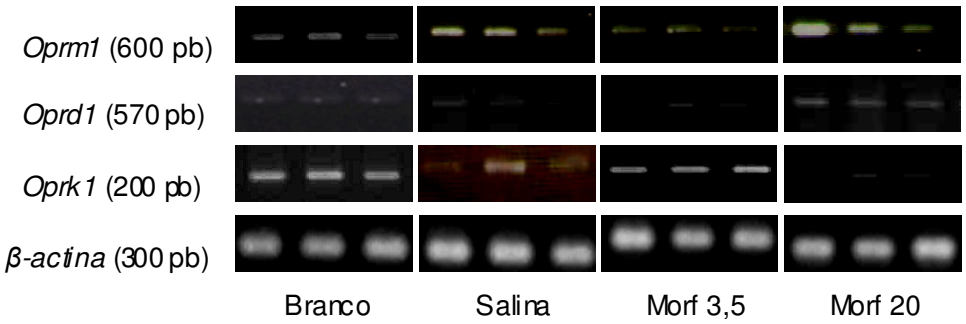
Resultados:

Observou-se que os tratamentos com solução salina e morfina 3,5 mg/kg não promoveram alterações na expressão dos três genes avaliados, quando comparadas as densidades relativas das bandas tanto na PAG, quanto estriado e hipotálamo (Figura 11). Porém, observou-se pequena redução na expressão do gene *Oprm1* na PAG de animais tratados com morfina 20,0 mg/kg ($F_{(3/36)}$=12,66, $p < 0,05$).

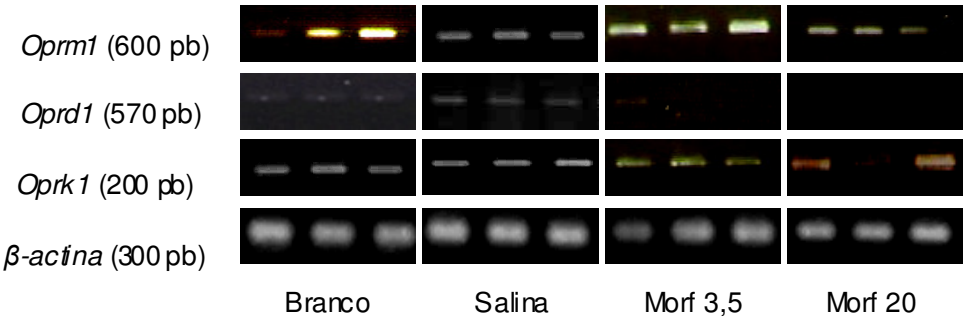
(A)


Oprm1 (600 pb)
Oprd1 (570 pb)
Oprk1 (200 pb)
β-actina (300 pb)
Branco
Salina
Morf 3,5
Morf 20

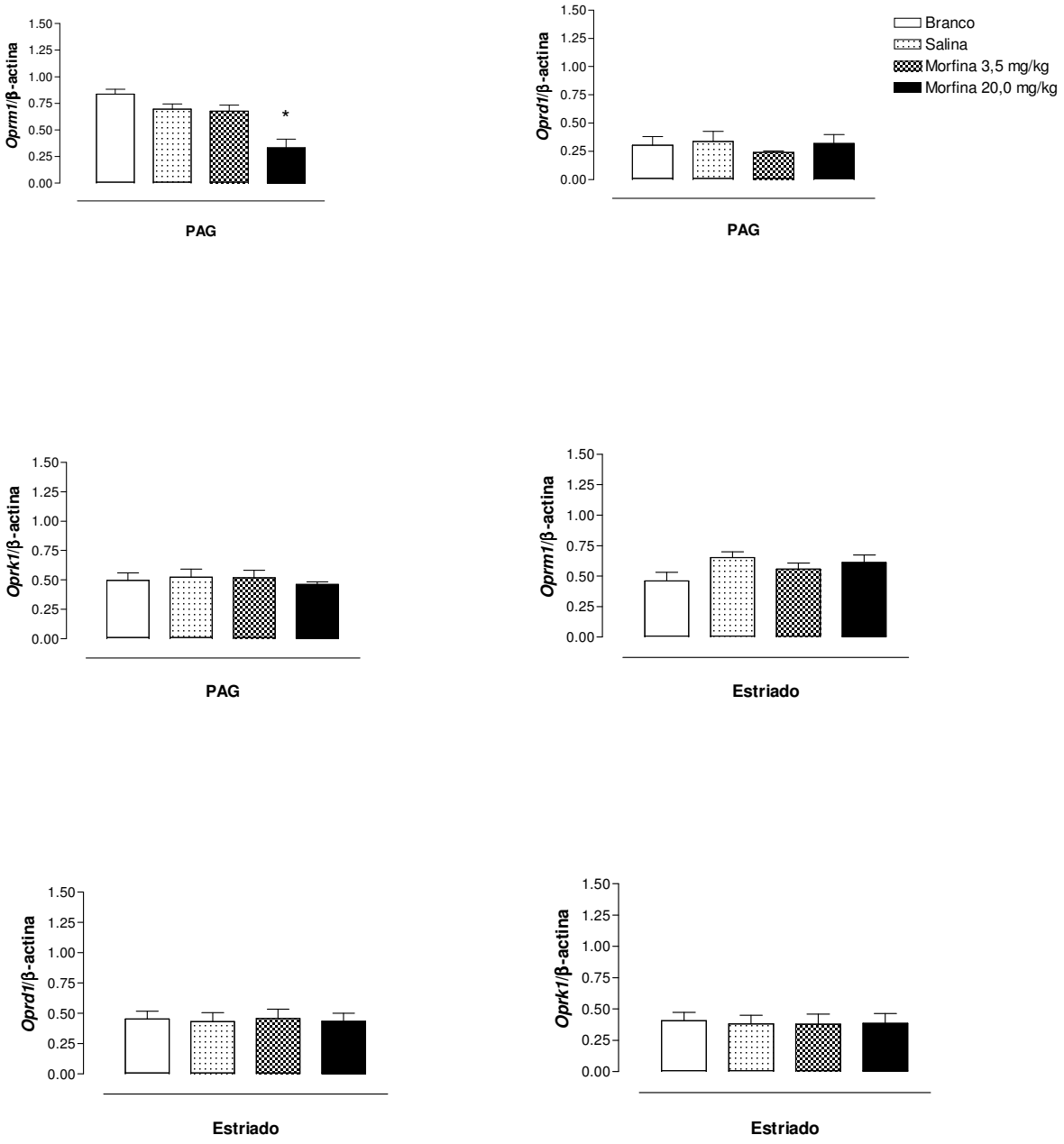
(B)


Oprm1 (600 pb)
Oprd1 (570 pb)
Oprk1 (200 pb)
β-actina (300 pb)
Branco
Salina
Morf 3,5
Morf 20

(C)


Oprm1 (600 pb)
Oprd1 (570 pb)
Oprk1 (200 pb)
β-actina (300 pb)
Branco
Salina
Morf 3,5
Morf 20

(D)


Oprm1/β-actina
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
*
PAG
Oprd1/β-actina
Branco
Salina
Morfina 3,5 mg/kg
Morfina 20,0 mg/kg
PAG
Oprk1/β-actina
PAG
Oprm1/β-actina
Estriado
Oprd1/β-actina
Estriado
Oprk1/β-actina
Estriado

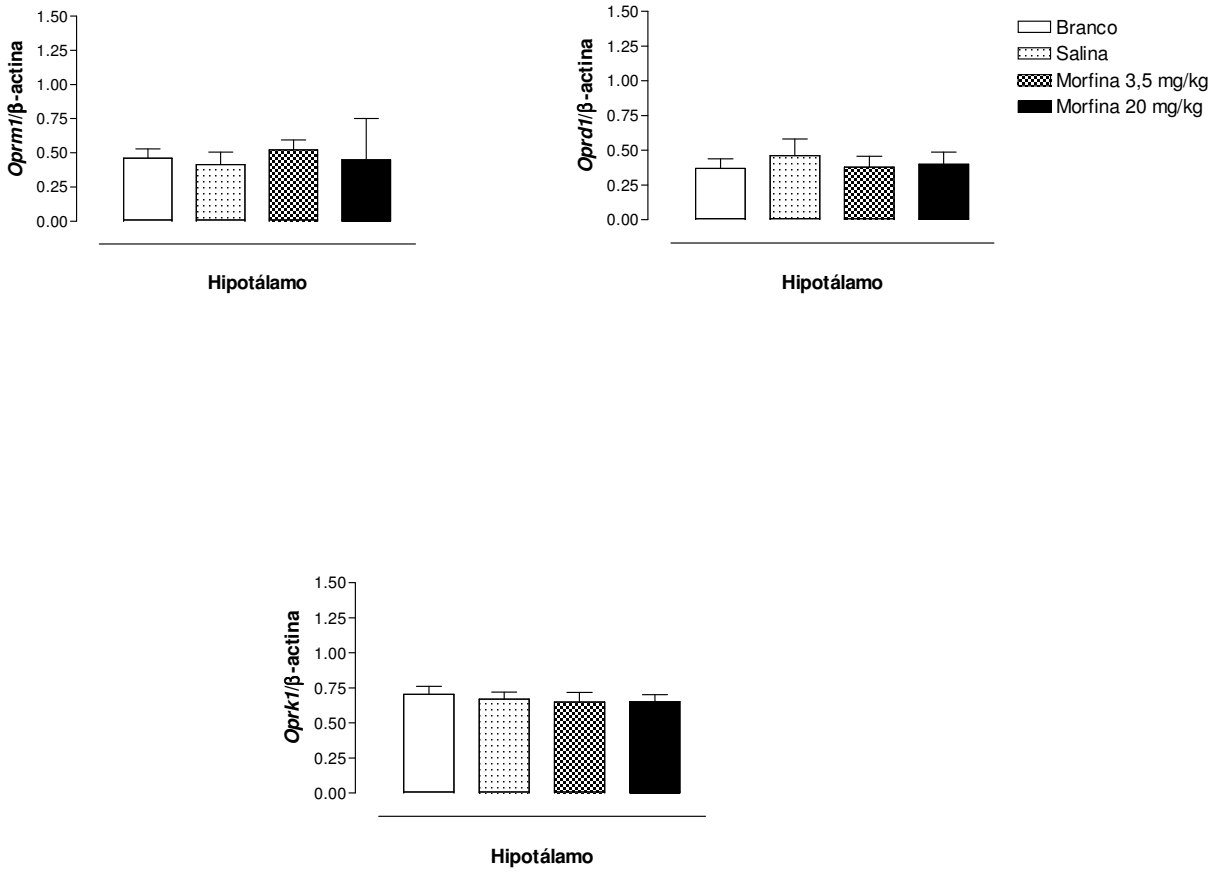


Figura 11– Produtos de RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG (A), estriado (B) e hipotálamo (C) de ratas virgens adultas tratadas agudamente com morfina 3,5 mg/kg, morfina 20 mg/kg ou solução salina. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, TAE 1/2X Os gráficos em barras (D) representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de RT-PCR correspondentes para β-actina e em relação às densidades do grupo branco. São apresentadas as médias e erros-padrão (n = 10). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 3 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG, estriado e hipotálamo de ratas virgens adultas tratadas por 5 dias consecutivos com sulfato de morfina.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 20 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em dois grupos iguais: um controle e um experimental. Ao grupo controle foi administrado solução salina (até 1 ml/kg) e ao grupo tratado administrou-se sulfato de morfina (3,5 mg/kg), s.c., por 5 dias consecutivos, sendo o grupo branco o mesmo do Experimento 1. Ao 5° dia de tratamento os animais foram previamente anestesiados, decapitados, a PAG, estriado e hipotálamo retirados para obtenção do RNA total e realizados os ensaios de transcrição reversa para análise semi-quantitativa por densitometria da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ respectivamente.

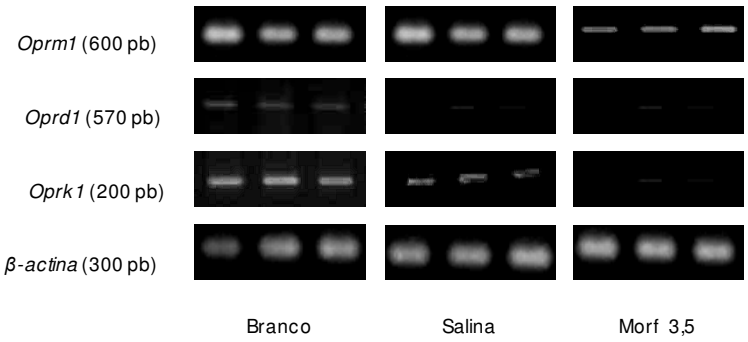
Justificativa:

Sabe-se que o tratamento prolongado com drogas de abuso pode promover efeitos de tolerância e sensibilização. Neste experimento avaliou-se se o tratamento prolongado com morfina poderia promover alteração nos padrões de expressão dos genes que codificam para os receptores opióides conhecidos.

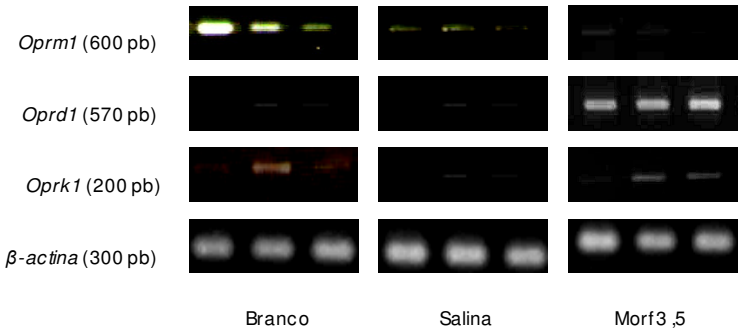
Resultados:

O tratamento prolongado com morfina promoveu diminuição no padrão de expressão dos genes *Oprm1* ($F_{(2/27)}$=8,39, p=0,01; $F_{(2/27)}$=6,98, p=0,03) e *Oprk1* ($F_{(2/27)}$=5,70, p=0,08; $F_{(2/27)}$=5,05, p=0,01) na PAG e estriado respectivamente, porém nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada quanto à expressão desses mesmos genes no hipotálamo (Figura 12).

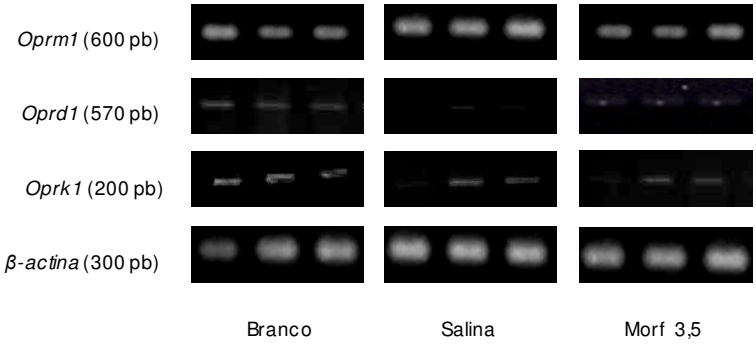
(A)


Oprm1 (600 pb)
Oprd1 (570 pb)
Oprk1 (200 pb)
β-actina (300 pb)
Branco
Salina
Morf 3,5

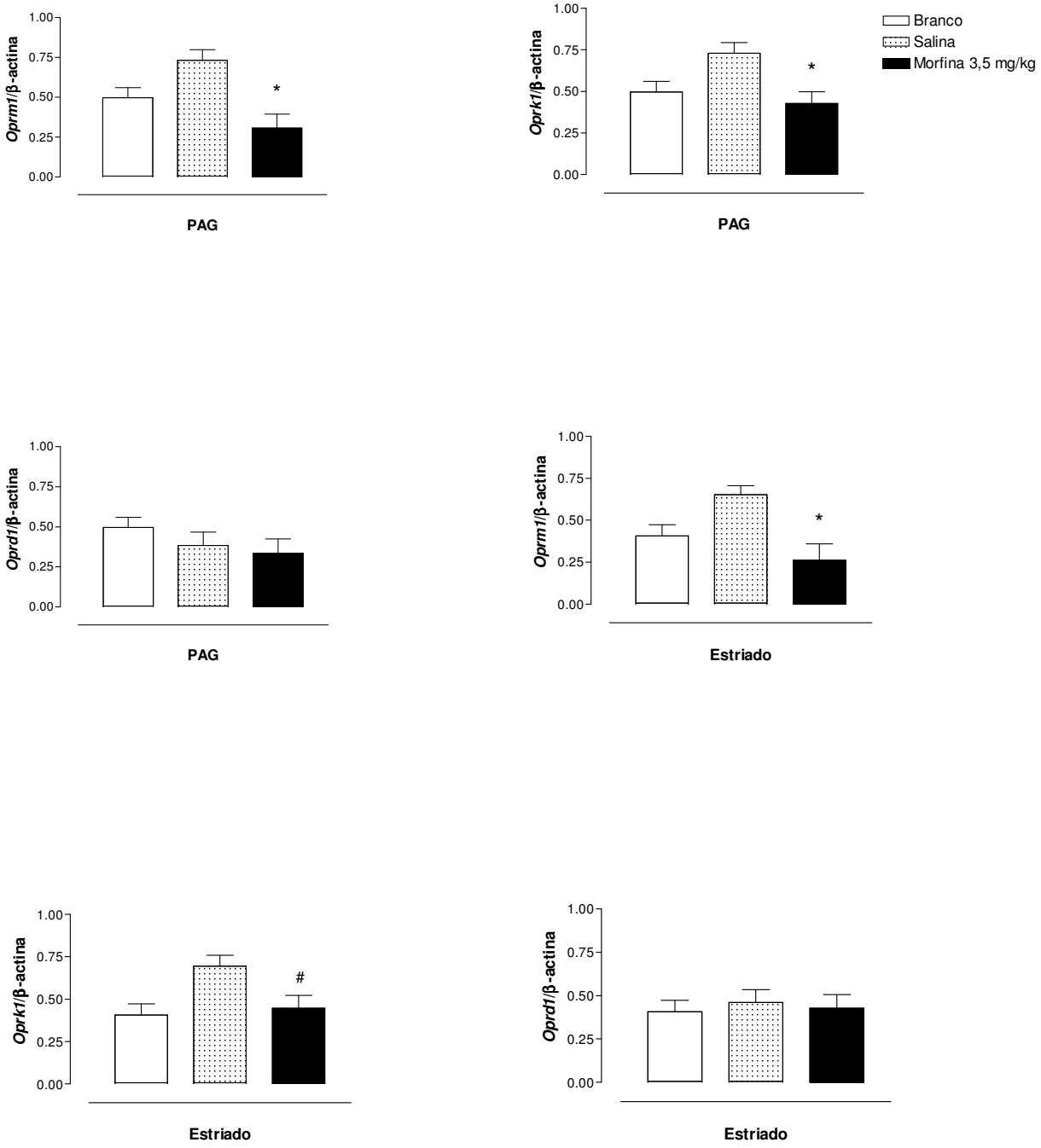
(B)


Oprm1 (600 pb)
Oprd1 (570 pb)
Oprk1 (200 pb)
β-actina (300 pb)
Branco
Salina
Morf3 ,5

(C)


Oprm1 (600 pb)
Oprd1 (570 pb)
Oprk1 (200 pb)
β-actina (300 pb)
Branco
Salina
Morf 3,5

(D)


Branco
Salina
Morfina 3,5 mg/kg
Oprm1/β-actina
Oprk1/β-actina
Oprd1/β-actina
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
*
#
PAG
Estriado

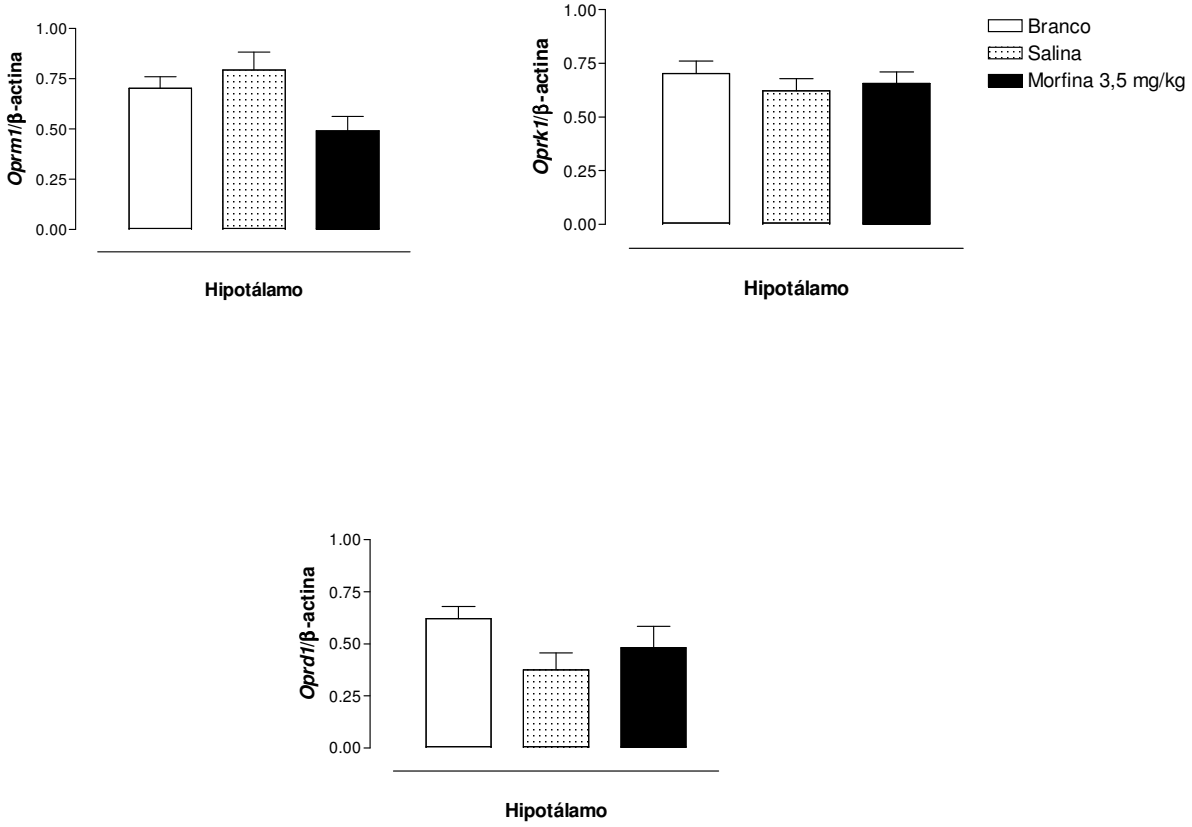


Figura 12- Produtos de RT-PCR de 1 µg de RNA total extraídos da PAG (A), estriado (B) e hipotálamo (C) de ratas virgens adultas que receberam cronicamente injeções de sulfato de morfina (3,5 mg/kg) ou solução salina. Os gráficos em barras (D) representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de RT-PCR correspondentes para β-actina e em relação às densidades do grupo branco. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão (n = 10). * $p < 0,01$ em relação aos demais grupos; # $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. ANOVA seguido de teste de Tukey.

PARTE 2 – AVALIAÇÕES QUANTITATIVAS DE EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM PARA RECEPTORES OPIÓIDES NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DE RATAS E ESTUDOS COMPORTAMENTAIS.

Experimento 4 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas adultas virgens nas diferentes fases do ciclo estral.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 28 ratas adultas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, divididas em 4 grupos iguais. Esses animais foram avaliados quanto à fase do ciclo estral por meio de lavado vaginal para análise de citologia. Assim, diariamente às 7h30m, os lavados foram obtidos e, de acordo com a fase do ciclo estral seja proestro, estro, metaestro e diestro, os animais foram separados em gaiolas. Os animais então foram previamente anestesiados, decapitados e a PAG foi retirada para obtenção do RNA total. A seguir foram feitos os ensaios de transcrição reversa para análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR. A expressão foi considerada como os valores de expressão do gene de interesse em relação a expressão do gene constitutivo 18S.

Justificativa:

Segundo dados da literatura**,** as avaliações da expressão dos genes que codificam para os receptores opióides mostram diferenças de acordo com a fase do ciclo estral em que as ratas se encontram, já que nas fases de proestro e estro a rata encontra-se em fase sexualmente receptiva e importante para que o acasalamento ocorra com sucesso. Assim, realizou-se este experimento para conhecer os padrões básicos de expressão dos genes conforme o ciclo estral dos animais, para futuras comparações entre as expressões gênicas em diferentes padrões reprodutivos.

Resultados:

A Figura 13 mostra os resultados obtidos quanto à expressão dos genes *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* na PAG de ratas em diferentes fases do ciclo estral. A análise estatística demonstrou que houve alterações em relação à expressão dos genes *Oprm1* ($F_{(3/24)}$=10,74, $p<0,001$) e *Oprk1* ($F_{(3/24)}$=4,25, $p=0,007$) quando comparados com os demais grupos nos períodos de metaestro e estro respectivamente. Já *Oprd1*

($F_{(3/24)}$=6,69, p=0,006) mostrou-se com expressão elevada somente na fase de estro. Para todos os demais experimentos de avaliações de genes animais sem manipulações farmacológicas, adultas, virgens e em fase de diestro serão denominados de grupo branco.

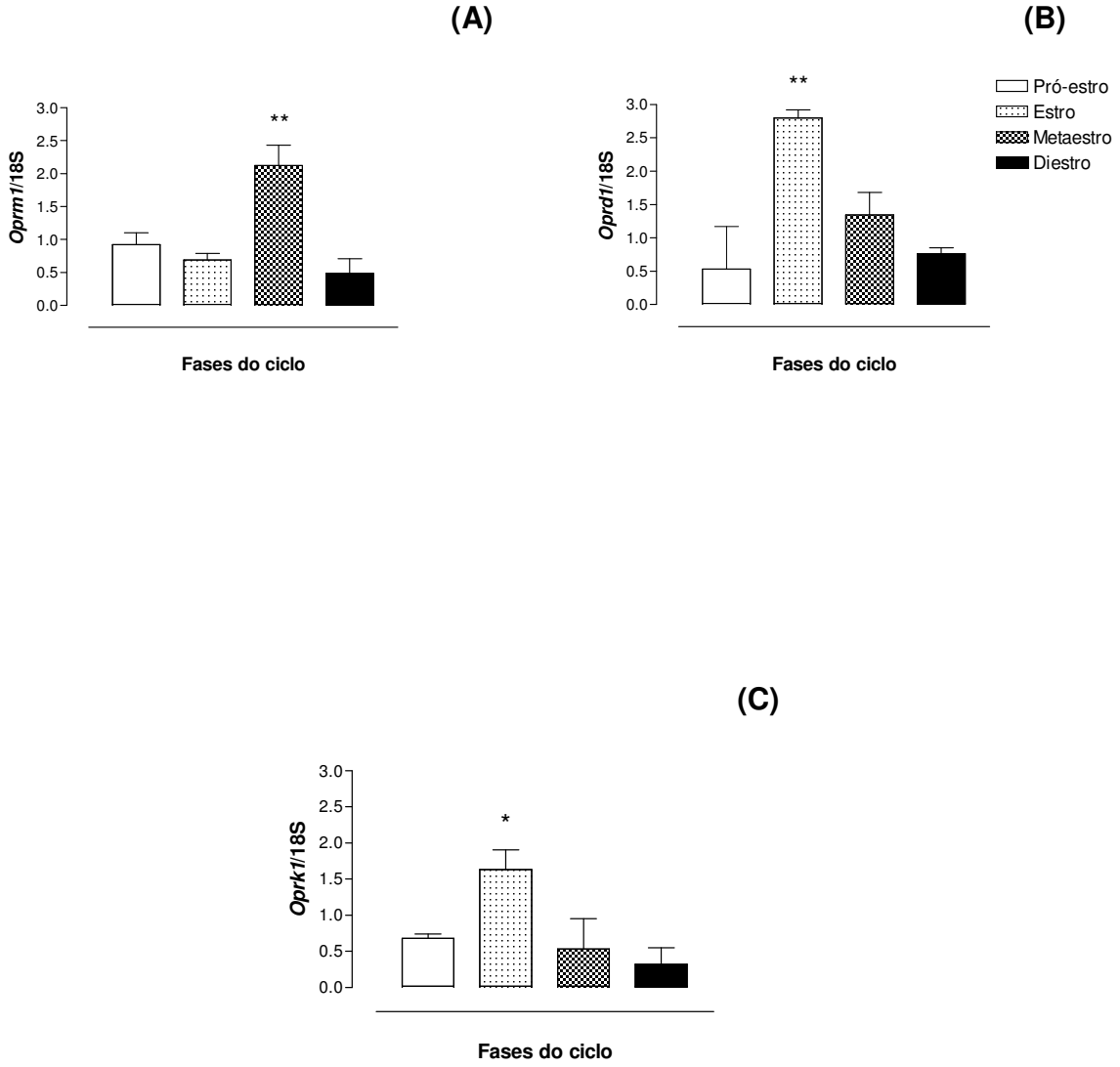


Figura 13- Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas em diferentes períodos do ciclo estral. (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo diestro. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n = 7). * $p < 0,01$ em relação ao demais grupos; ** $p < 0,001$ em relação aos demais grupos; em relação aos demais grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 5 - Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas adultas nas diferentes fases do ciclo estral.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 28 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em 4 grupos iguais. Os animais foram previamente avaliados por citologia vaginal para verificação da fase do ciclo estral em qua se encontravam, sendo pró-estro, estro, metaestro e diestro. Em seguida, os mesmos foram levemente anestesiados, decapitados e suas PAGs retiradas para as avaliações de proteínas.

Justificativa:

Como os estudos de avaliação da expressão dos genes que codificam para receptores opióides não apresentaram nenhuma alteração em relação às fases do ciclo estral, procurou-se determinar se os conteúdos protéicos poderiam sofrer alguma modulação/alteração nas fases de recepção/ não-recepção da rata para o acasalamento.

Resultados:

As análises estatísticas demonstraram que não ocorreram alterações significativas nos conteúdos protéicos MOR, DOR e KOR, independentemente da fase do ciclo estral da rata ser indicativo de receptividade sexual ou não (Figura 14).

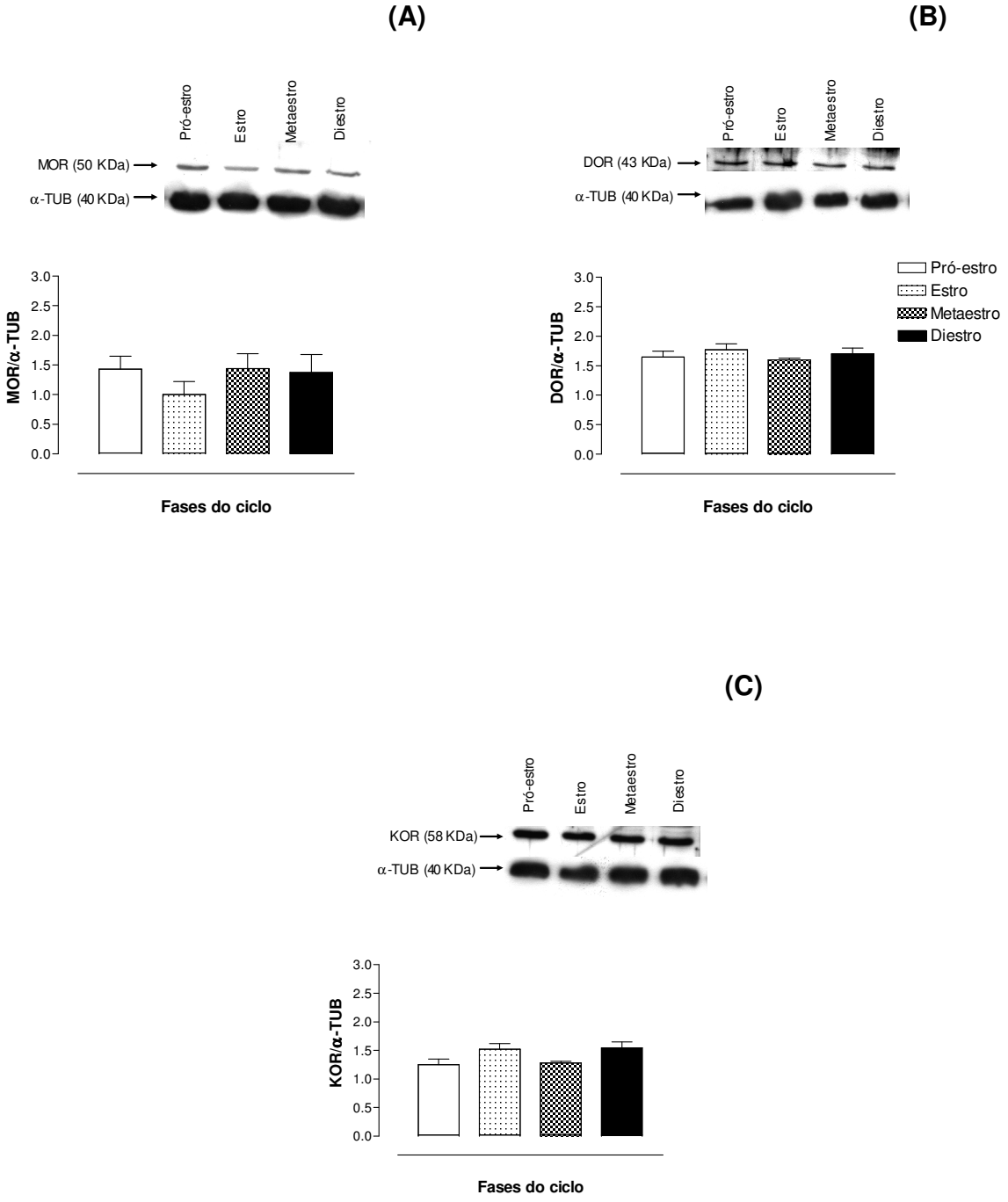


Figura 14- Western blot de amostras de PAG de ratas em diferentes fases do ciclo estral para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C). Padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n=7). $p > 0,05$; ANOVA.

Experimento 6 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas jovens e idosas.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 49 ratas divididas em 7 grupos iguais, respeitando-se as idades a serem estudadas, sendo 21, 45, 60, 90, 120, 240 e 360 dias. As ratas foram previamente anestesiadas, decapitadas e a PAG retirada para obtenção do RNA total. O grupo de 90 dias foi considerado o grupo branco e todas as ratas encontravam-se em diestro. A seguir foram feitos os ensaios de transcrição reversa para análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR.

Justificativa:

Segundo dados da literatura**,** as avaliações da expressão dos genes que codificam para os receptores opióides mostram diferenças de acordo com a idade em que o animal se encontra. Aliado ao estado fisiológico, esses padrões possivelmente também podem alterar-se. Assim, realizou-se este experimento para conhecer os padrões básicos de expressão desses genes conforme a idade dos animais.

Resultados:

A Figura 15 mostra os resultados obtidos quanto à expressão dos genes *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* separadamente na PAG de ratas de varia idades. A análise estatística demonstrou que houve aumento na expressão de *Oprm1* nas ratas com idades 21 e 240 dias ($F_{(6/42)}$=10,73, p<0,001). Já a expressão do gene *Oprd1* ($F_{(6/42)}$=10,73, p=0,001) mostrou-se significantemente elevada em ratas com 21 dias quando comparadas com os demais grupos. Finalmente, a expressão do gene *Oprk1* ($F_{(6/42)}$=5,36, p=0,003) mostrou-se elevada somente em animais com 21 dias.

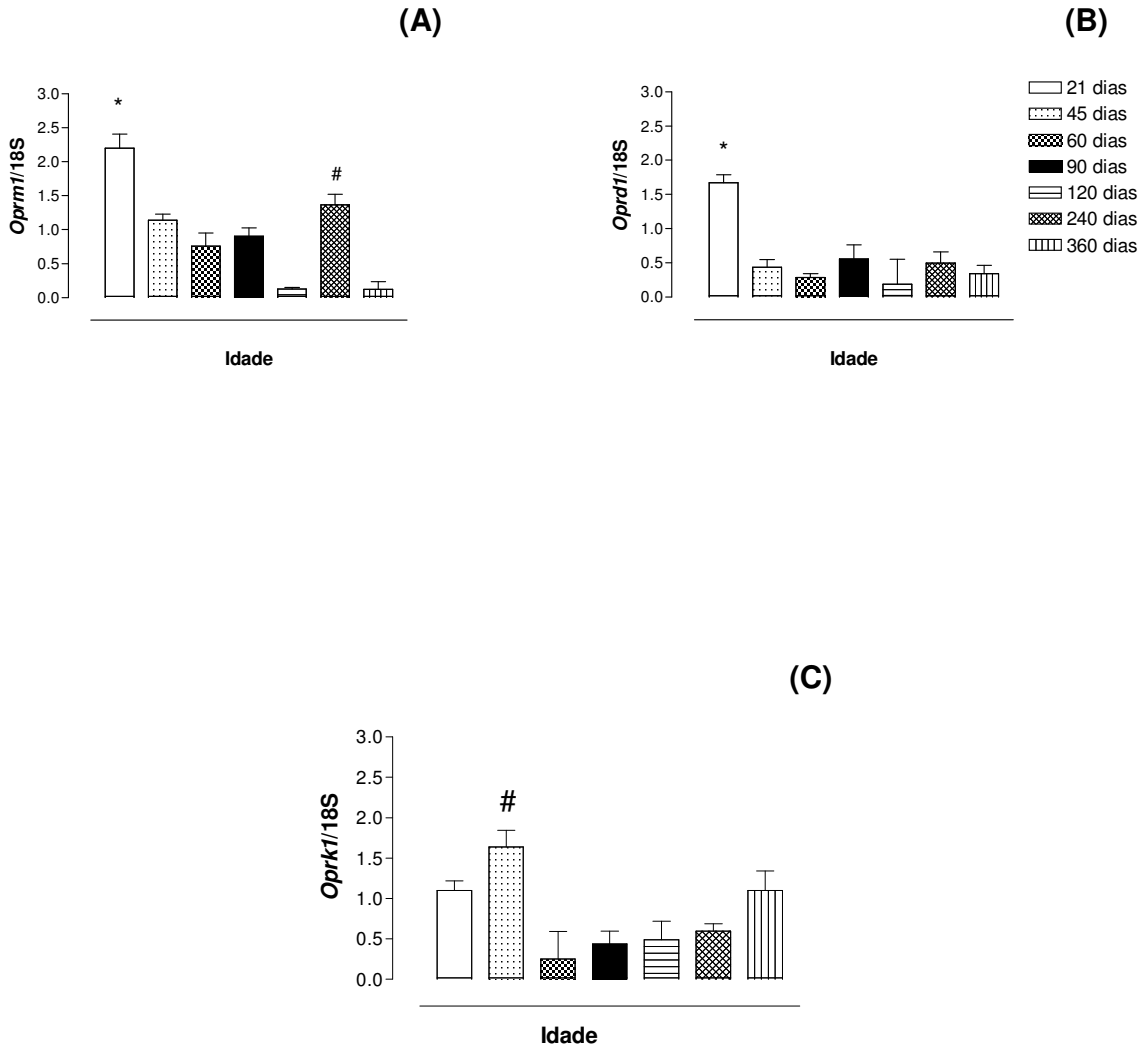


Figura 15 - Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas jovens e idosas. (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo branco (90 dias). São apresentadas as médias ± erros-padrão (n = 7). # $p < 0,05$, * $p < 0,001$ em relação a todos os grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 7 - Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas jovens e idosas.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 49 ratas divididas em 7 grupos iguais respeitando-se as idades a serem estudadas, sendo 21, 45, 60, 90, 120, 240 e 360 dias. As ratas foram previamente anestesiadas, decapitadas, a região de interesse retirada e a seguir foram feitos os procedimentos para extração de proteínas e visualização por Western Blot.

Justificativa:

Após as análises de expressão gênica por Real Time RT-PCR, que informa sobre atividade genica, este experimento foi realizado para verificar se as alterações na expressão gênica se refletem na expressão das respectivas proteínas. A avaliação mostrou que aos 21 dias de idade todos os genes que codificam para os receptores opióides encontram-se com expressão aumentada, fato que ainda é observado para *Oprm1* aos 240 dias. Assim, interessante verificar que existe também aumento nos produtos protéicos consistente e possivelmente causado pelo aumento da expressão gênica.

Resultados:

Conforme demonstrado na Figura 16, não foram observadas diferenças significantes em termos de conteúdo protéico nas idades avaliadas.

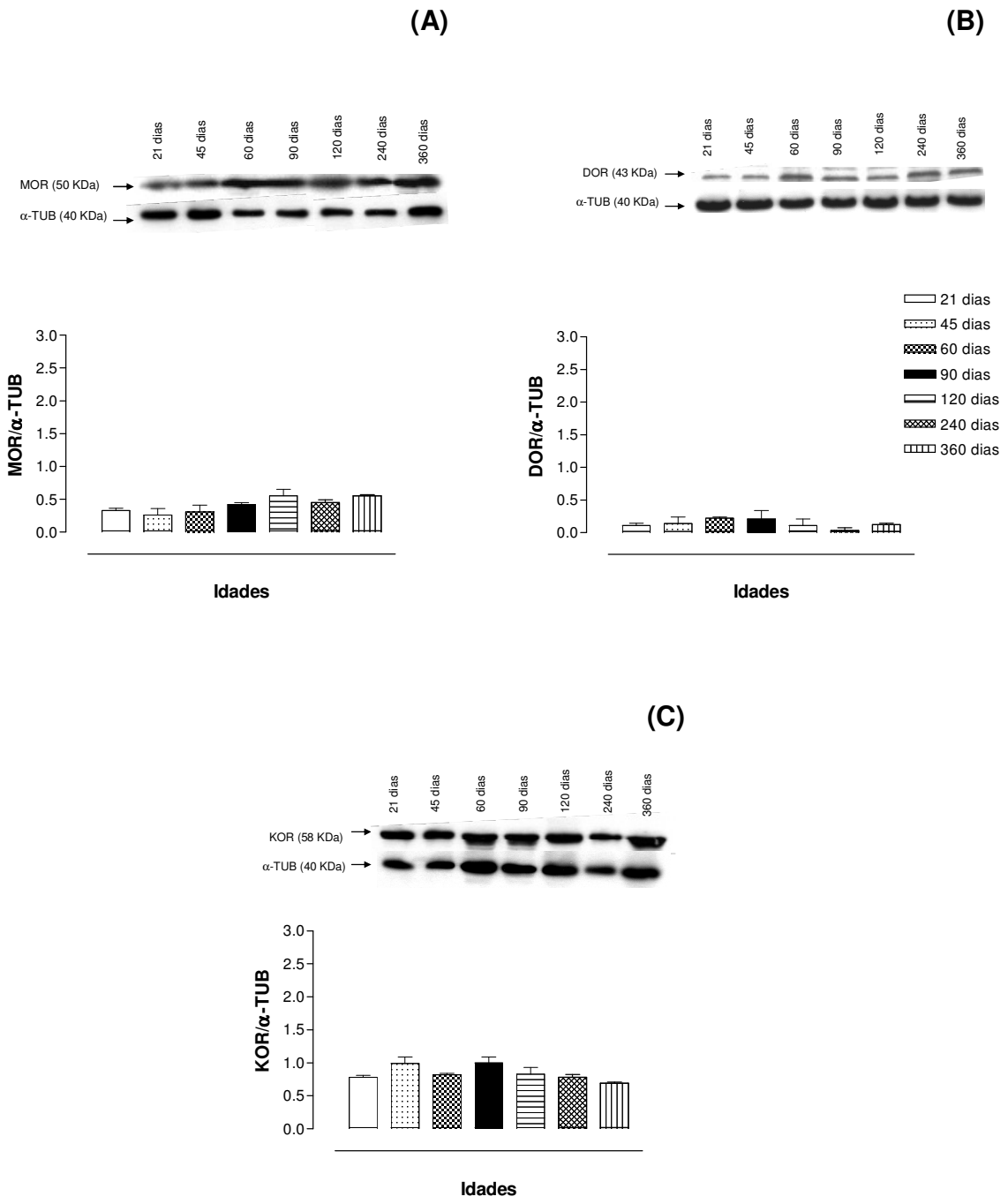


Figura 16- Western blot de amostras de PAG de ratas em diferentes idades para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C). Padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n=7). $p > 0,05$; ANOVA.

Experimento 8 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas em diferentes períodos da gestação.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 35 ratas adultas com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, divididas em 5 grupos iguais. Esses animais foram pareados com ratos sexualmente experientes conforme o item 3.5. de Material e Métodos. O 1º dia de gestação foi determinado por análise da citologia vaginal e então os animais foram previamente anestesiados, decapitados e a PAG retirada para obtenção do RNA total aos 2, 7, 14 e 21 dias de gestação. Os animais considerados do grupo branco tinham 90 dias de idade, virgens e estavam em diestro. A seguir foram feitos os ensaios de transcrição reversa para análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR.

Justificativa:

As alterações fisiológicas características da gestação poderiam influenciar a expressão gênica dos receptores de opióides na PAG? Esses receptores poderiam ter sua expressão alterada como parte dos processos fisiológicos da gestação? Com os dados semi-quantitativos apresentados nos experimentos anteriores em relação à expressão dos três genes que codificam para os receptores opióides e em diferentes regiões do cérebro, é interessante analisar como está a expressão desses genes particularmente na PAG em diferentes etapas que compõem o período reprodutivo como um todo. O objetivo é a obtenção de um melhor entendimento do funcionamento do sistema opioidérgico durante as mais diversas fases reprodutivas, bem como tentar correlacionar esses dados com aqueles nos estudos comportamentais.

Resultados:

A Figura 17 mostra os resultados obtidos quanto à expressão dos genes *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* na PAG de ratas nos diferentes períodos da gestação. A análise estatística demonstrou que não houve alterações em relação à expressão de *Oprm1* e *Oprd1* nos diferentes períodos avaliados. Já a expressão do gene *Oprk1* mostrou-se significantemente elevada no 21º dia de gestação ($F_{(4/30)}=16,46$, $p<0,01$) quando comparada aos demais períodos.

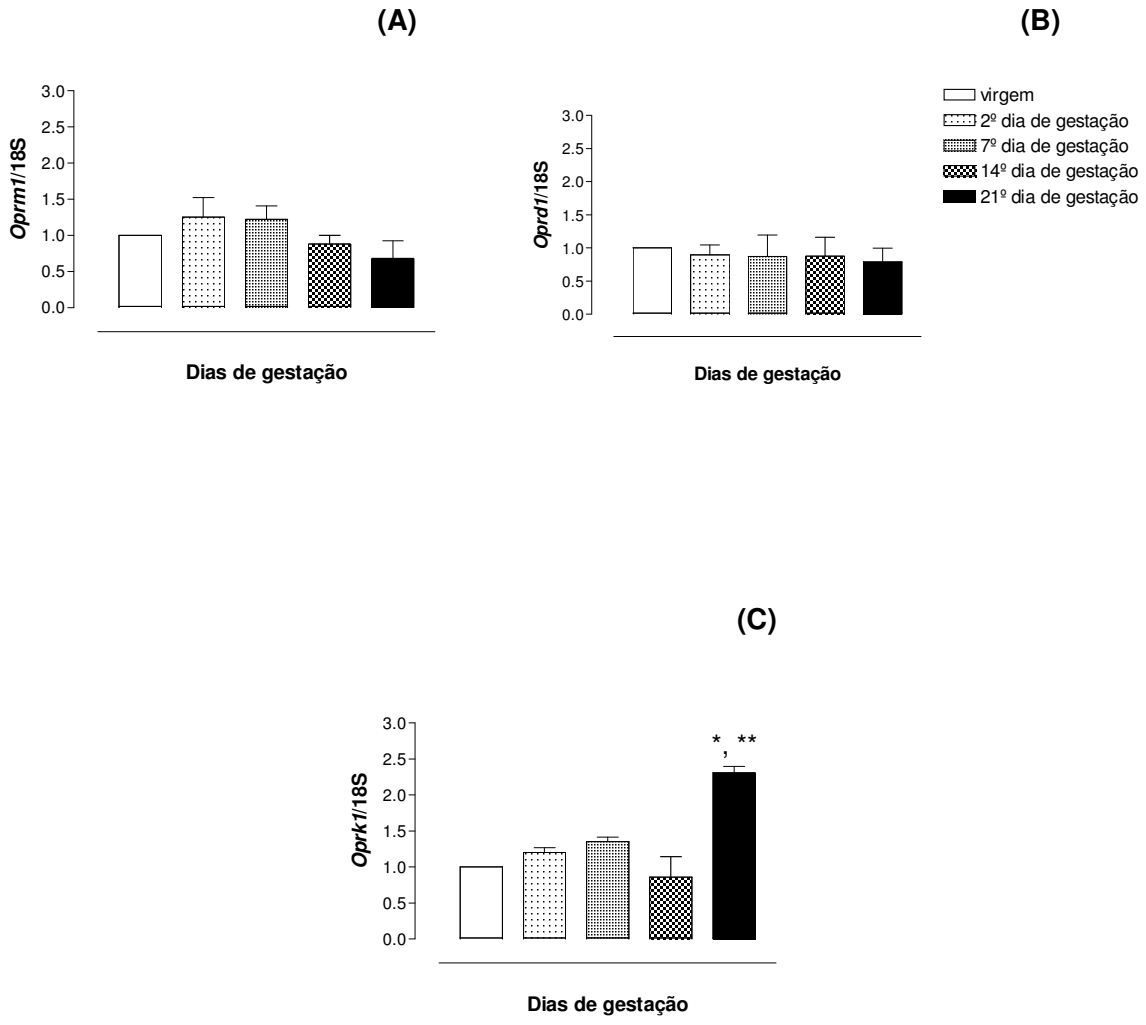


Figura 17- Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas em diferentes períodos da gestação. (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo virgem São apresentadas as médias e erros-padrão (n = 7). * $p < 0,05$ em relação a todos os grupos; ** $p < 0,01$ em relação ao 14º dia de gestação. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 9 - Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas adultas observadas em diferentes períodos da gestação.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 35 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em 5 grupos iguais. Esses animais foram previamente acasalados conforme descrito no item 3.5. de Material e Métodos. A prenhez foi confirmada por meio de lavado vaginal com presença de espermatozóides na manhã seguinte ao acasalamento. Assim, os animais foram levemente anestesiados, decapitados e suas PAGs retiradas para as avaliações de proteínas aos dias 2, 7, 14 e 21 de gestação, além do grupo virgens.

Justificativa:

Como os dados de expressão dos genes somente constataram aumento de expressão de *Oprk1* ao 21° dia de lactação, resolveu-se pesquisar as proteínas para conhecer se a aproximação do parto poderia influenciar na quantidade de determinados produtos protéicos.

Resultados:

Embora os dados de expressão gênica tenham apontado um aumento da expressão de *Oprk1* no último dia de gestação, as análises moleculares não revelaram nenhuma alteração nos produtos protéicos codificados pelos genes opioidérgicos analisados nesse estudo (Figura 18).

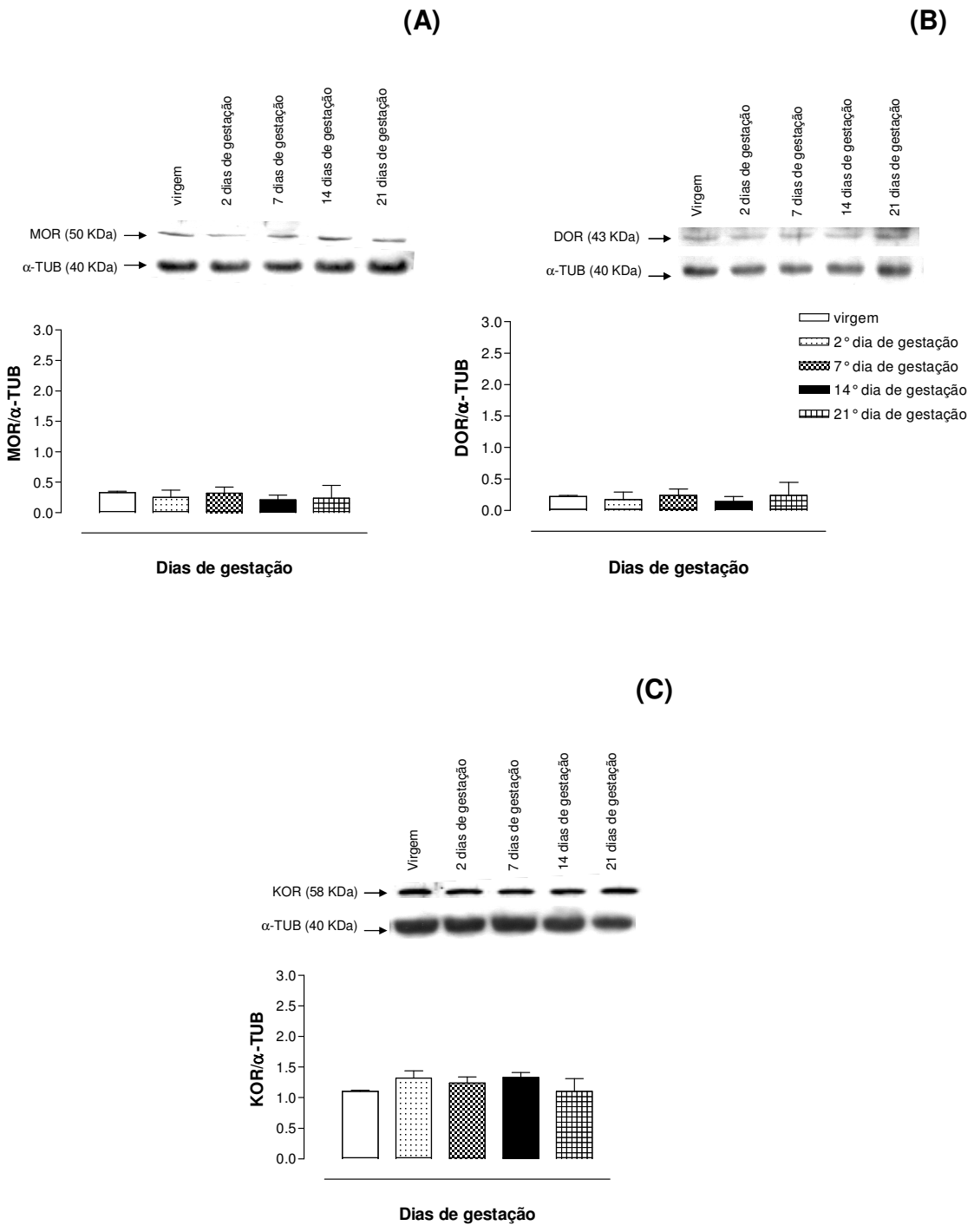


Figura 18- Western blot de amostras de PAG de ratas em diferentes períodos da gestação para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C). Padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n=7). $p > 0,05$; ANOVA.

Experimento 10 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas em diferentes períodos da lactação.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 28 ratas adultas com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, divididas em 4 grupos iguais. Esses animais foram pareados com ratos sexualmente experientes conforme o item 3.5. de Material e Métodos. O 1º dia de gestação foi determinado por análise da citologia vaginal e quando do parto, este foi considerado dia zero de lactação. Então os animais foram previamente anestesiados, decapitados e a PAG retirada para obtenção do RNA total aos 2, 7, 14 e 21 dias de lactação, sendo o grupo virgem o mesmo utilizado no experimento 8. A seguir foram feitos os ensaios de transcrição reversa para análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR.

Justificativa:

Com os dados semi-quantitativos apresentados quanto à expressão dos três genes que codificam para os receptores opióides durante diferentes períodos da gestação, é interessante analisar como está a expressão desses genes particularmente na PAG em diferentes períodos da lactação, dispondo assim de dados moleculares que permitem comparar as etapas que compõem o período reprodutivo como um todo.

Resultados:

A Figura 19 mostra os resultados obtidos quanto à expressão dos genes *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* na PAG de ratas nos diferentes períodos da lactação. A análise estatística demonstrou que não houve alterações em relação à expressão de *Oprm1* e *Oprd1* nos diferentes períodos avaliados. Já a expressão do gene *Oprk1* mostrou-se significantemente elevada no 21º dia de lactação ($F_{(4/30)}$=38,91, p=0,01) quando comparada aos demais períodos.

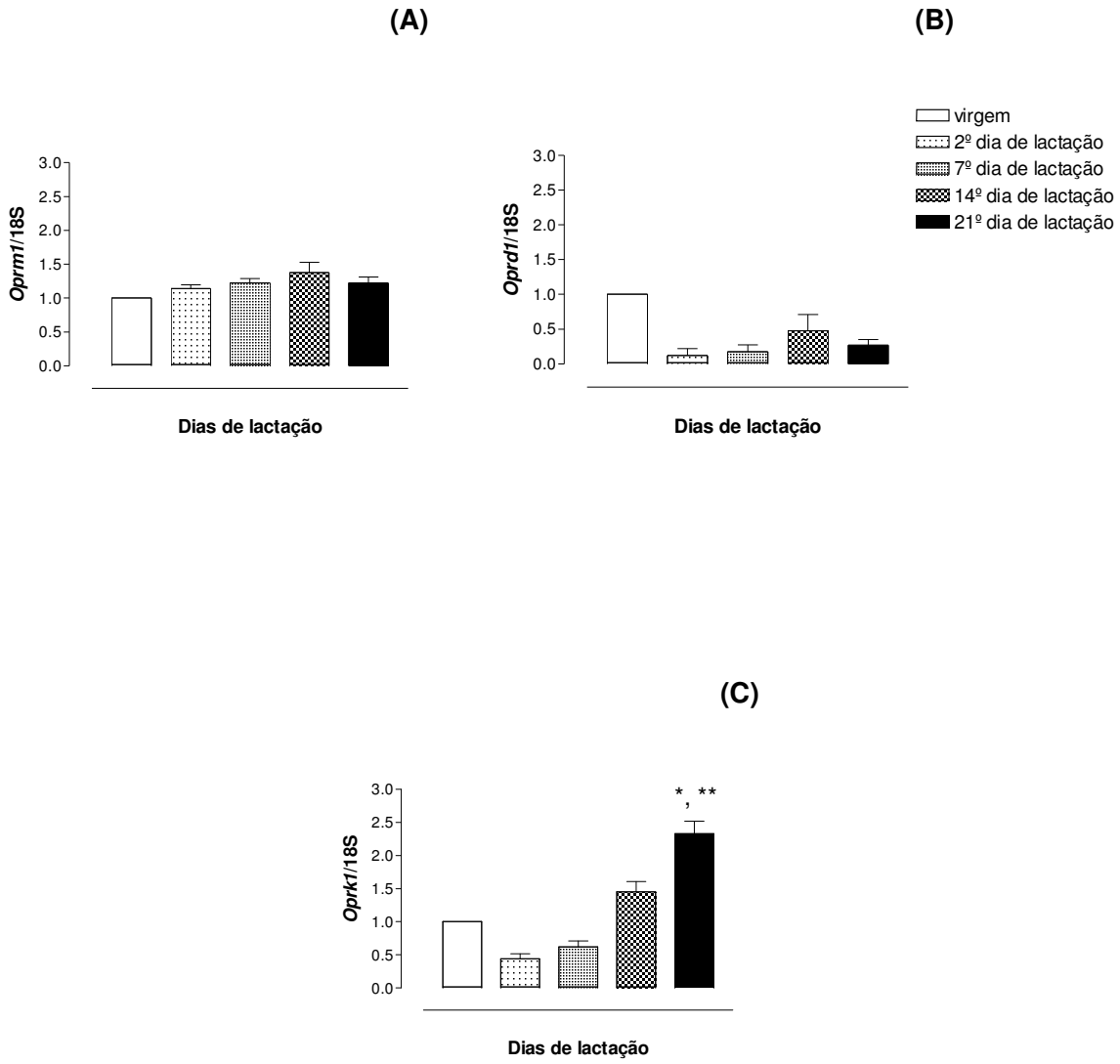


Figura 19- Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas em diferentes períodos da lactação. (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo virgem. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n = 7). * $p < 0,01$ em relação a todos os grupos; ** $p < 0,05$ em relação ao grupo 14 dias de lactação. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 11 - Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas adultas observadas em diferentes períodos da lactação.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 28 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em 4 grupos iguais. Esses animais foram previamente acasalados conforme descrito no item 3.5. de Material e Métodos. A prenhez foi confirmada por meio de lavado vaginal com presença de espermatozóides na manhã seguinte ao acasalamento. Quando da lactação, os animais foram analisados aos 2, 7 14 e 21 dias, sendo o grupo virgem o mesmo utilizado no experimento 9. Assim, os animais foram levemente anestesiados, decapitados e suas PAGs retiradas para as avaliações de proteínas.

Justificativa:

Em relação aos dados de expressão dos genes somente foi constatado aumento de expressão de *Oprk1* aos 14º e 21° dias de lactação. Assim, resolveu-se pesquisar os conteúdos protéicos para conhecer se a aproximação do desmame, além de alterações hormonais que ocorrem ao final da lactação, poderia influenciar na quantidade de determinados produtos protéicos.

Resultados:

A Figura 20 ilustra os dados de conteúdos protéicos avaliados em ratas durante períodos da lactação. A análise estatística revelou que houve aumento nos níveis de KOR ao 21º dia de lactação ($F_{(4/30)}$=17,57, $p<0,01$), enquanto que não foram observadas alterações para os produtos MOR e DOR.

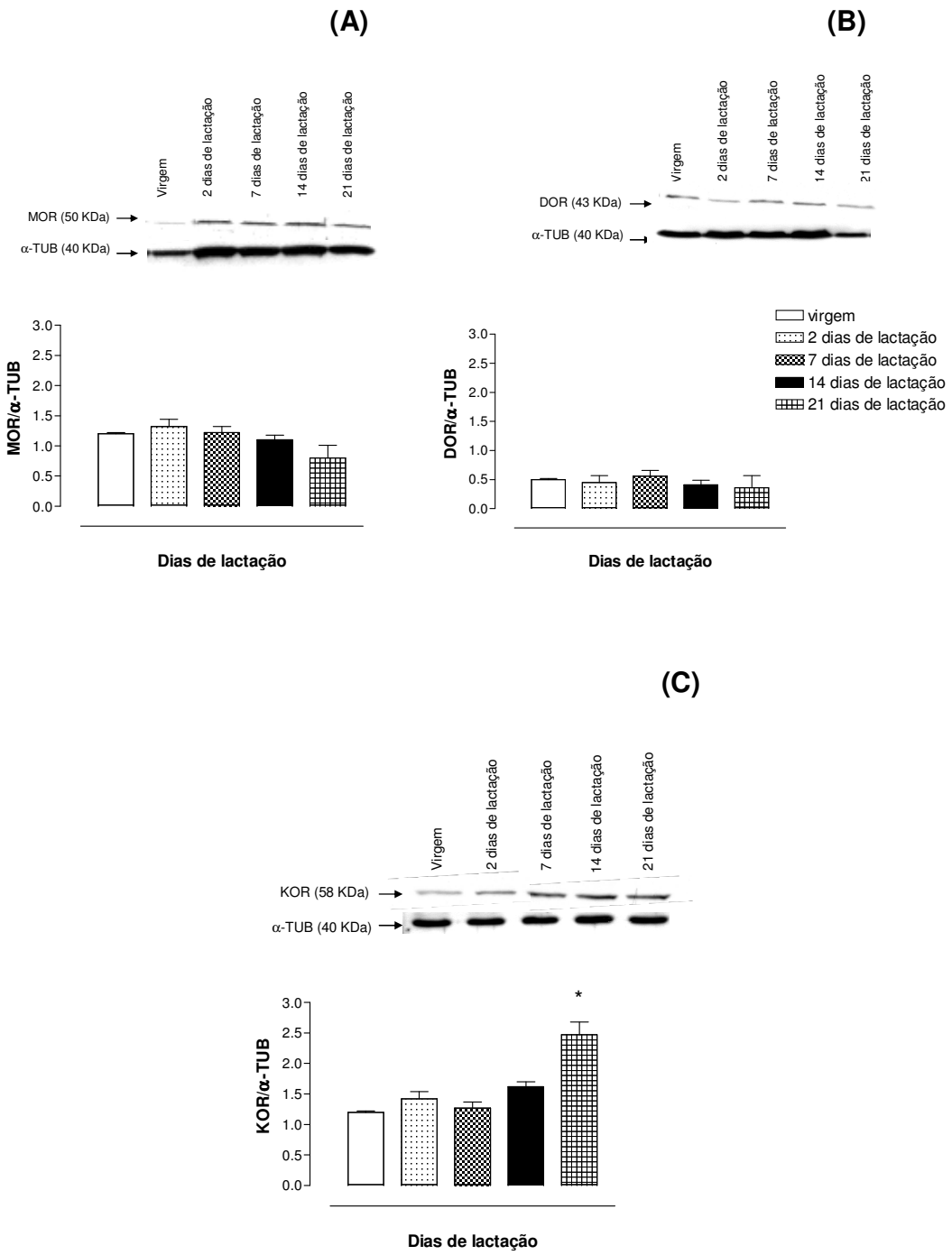


Figura 20- Western blot de amostras de PAG de ratas em diferentes períodos da lactação para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C). Padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n=7). * $p < 0,01$ em relação a todos os grupos; ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 12 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas adultas primíparas e multíparas.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 21 ratas adultas com 90 dias de idade no início do experimento e 200 gramas de peso corporal, divididas em 3 grupos iguais. Esses animais foram pareados com ratos sexualmente experientes conforme o item 3.5. de Material e Métodos. Ratas com apenas uma gestação foram denominadas primíparas, enquanto que ratas com 3 ou 5 gestações foram denominadas multíparas. As ratas dos grupos multíparas, respeitado o período de lactação e desmame, foram novamente pareadas com ratos sexualmente experientes. Todos os animais tinham aproximadamente a mesma idade daquelas do respectivo grupo virgem no momento do sacrifício. As ratas foram previamente anestesiadas, decapitadas, a PAG retirada para obtenção do RNA total e a seguir foram feitos os ensaios de transcrição reversa para análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR.

Justificativa:

Seguindo-se as avaliações de expressão gênica dos receptores opióides em relação a diferentes estágios reprodutivos, é interessante obter dados moleculares correlacionados à experiência reprodutiva. Muitos trabalhos têm mostrado que os níveis de transcritos para esses receptores caem proporcionalmente ao número de gestações da rata. Assim, realizou-se esse delineamento para verificar como estaria a expressão de *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* em ratas com uma gestação, 3 ou 5 gestações, comparando-as com ratas virgens.

Resultados:

A Figura 21 mostra os resultados obtidos quanto à expressão dos genes *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* na PAG de ratas com ou sem experiência reprodutiva. A análise estatística demonstrou que não houve alterações em relação à expressão de *Oprd1* nos diferentes períodos avaliados. Já a expressão dos genes *Oprm1* ($F_{(3/24)}$=156,20, $p<0,001$) e *Oprk1* ($F_{(3/24)}$=12,86, $p<0,001$) mostrou-se significantemente elevada em ratas com 5 gestações quando comparadas àquelas com 3 gestações e com as primíparas.

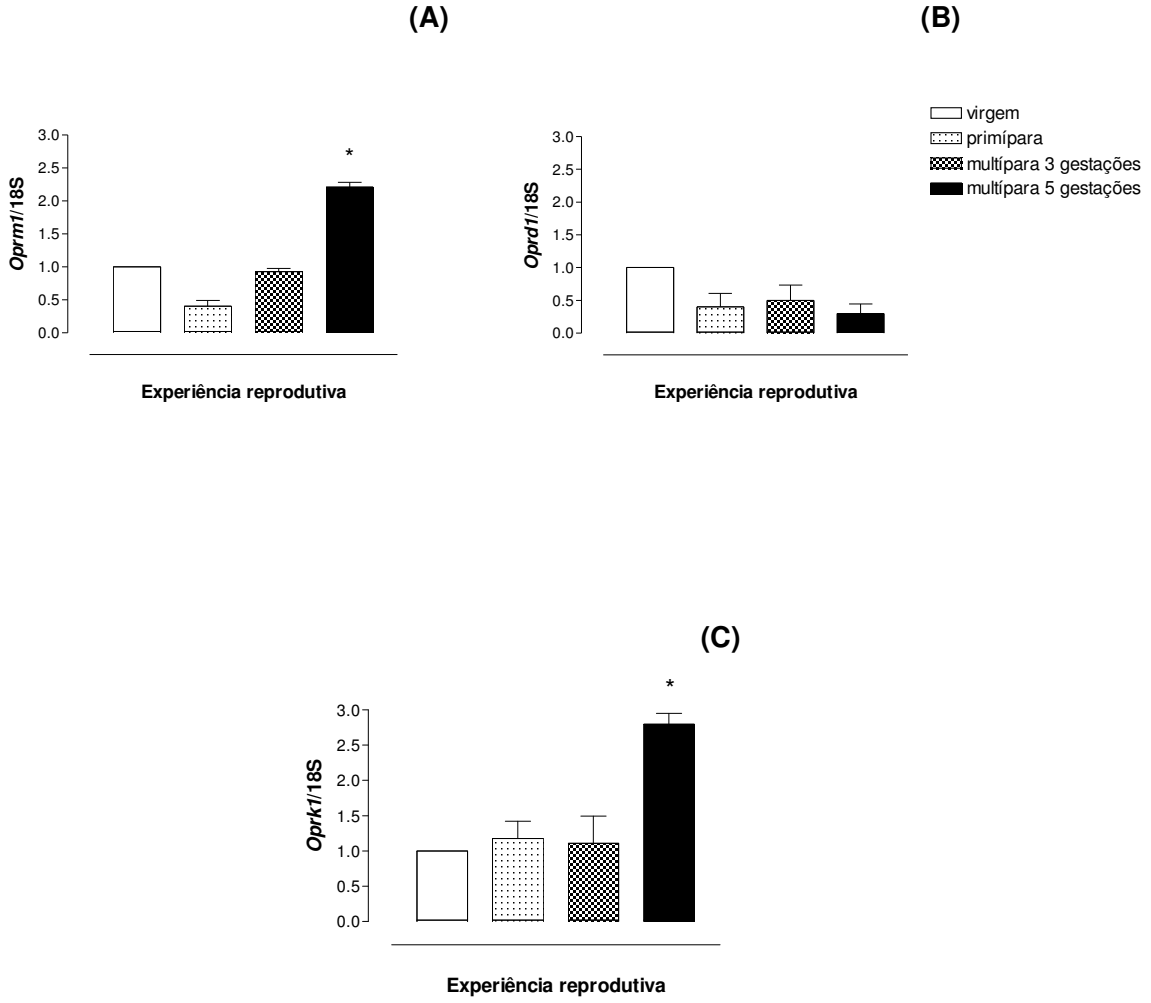


Figura 21- Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas primíparas ou com múltiplas gestações. (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo virgem. São apresentadas as médias e erros-padrão (n = 7). * $p < 0,001$ em relação a todos os grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 13 - Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas adultas primíparas ou multíparas.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 21 ratas virgens com 90 dias de idade no início do experimento e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em grupos iguais. Esses animais foram previamente acasalados conforme descrito no item 3.5. de Material e Métodos, sendo que ratas com 3 e 5 gestações foram comparadas com ratas virgens de mesma idade. Em todos os casos o parto foi considerado como dia zero de lactação e após 21 dias foi realizado o desmame, para então as ratas pertencentes aos grupos multíparas serem novamente acasaladas. Depois os animais foram decapitados e suas PAGs retiradas para as avaliações de proteínas.

Justificativa:

É importante a avaliação do produto protéico para detectar se existem diferenças significantes entre alterações nos padrões de expressão gênica e que se refletem nas proteínas traduzidas. Em relação à expressão gênica, os estudos apontam que houve aumento da expressão de *Oprm1* e *Oprk1* somente em ratas multíparas com 5 gestações.

Resultados:

As análises estatísticas demonstraram que houve redução do conteúdo protéico de DOR, normalizado em relação à α-TUBULINA, em ratas primíparas, porém essa diminuição é ainda mais acentuada quando comparadas as de múltiplas gestações em relação às virgens ($F_{(3/24)}$=25,74, p<0,001), como demonstrado na Figura 22. Em relação a MOR observou-se aumento em primíparas ($F_{(3/24)}$=1,96, p=0,17) e em multíparas com 5 gestações, enquanto que para KOR somente ocorreu aumento nos conteúdos em multíparas com 5 gestações ($F_{(3/24)}$=2,99, p=0,07).

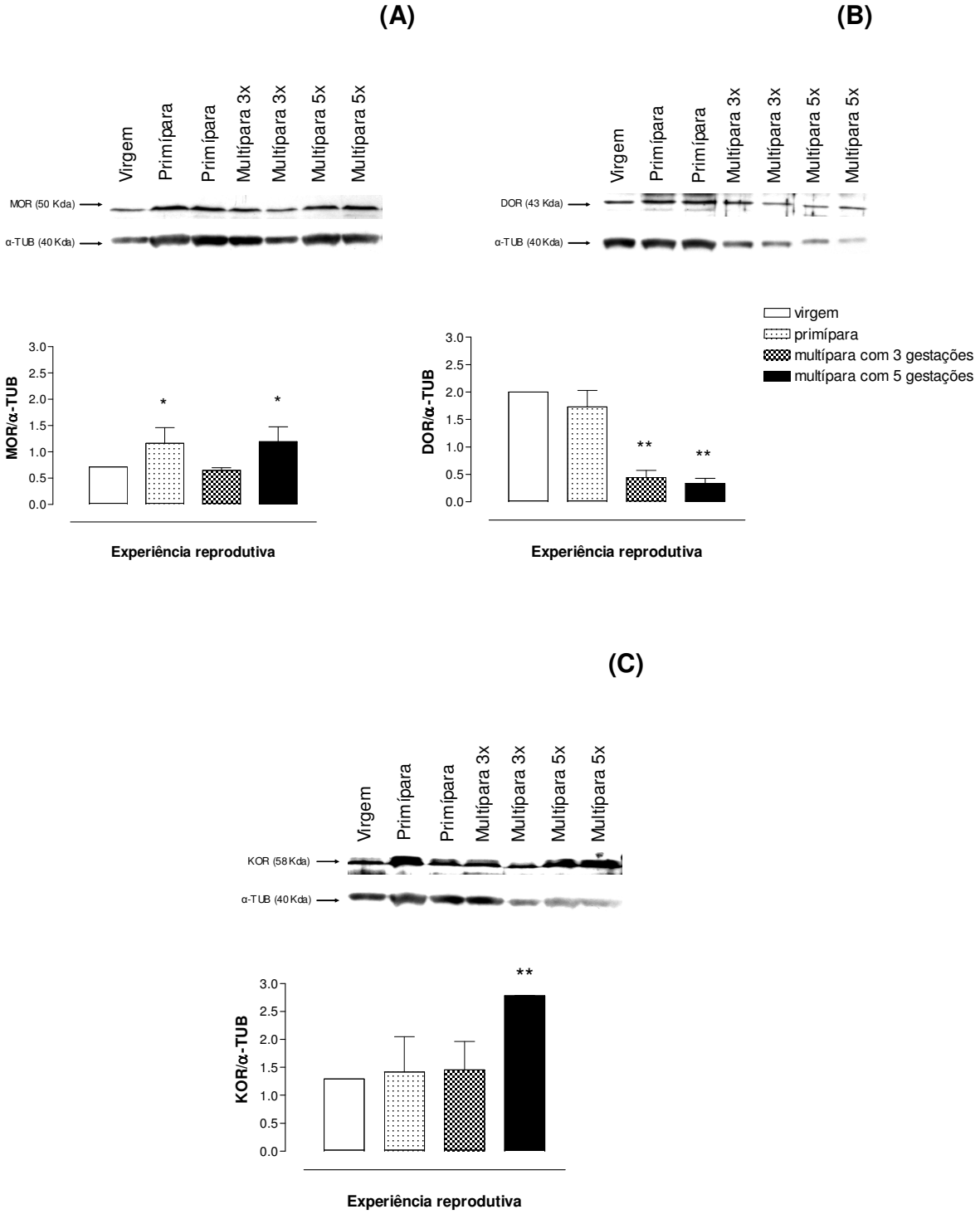


Figura 22- Western blot de amostras de PAG de ratas virgens, primíparas, multíparas com 3 gestações e multíparas com 5 gestações para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C). Padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n=7). * $p < 0,05$ em relação ao grupo virgens; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo virgens. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 14 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas adultas e virgens tratadas agudamente com sulfato de morfina ou U69593.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 28 ratas adultas e virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, divididas em 4 grupos iguais. Os animais receberam uma única injeção via s.c. de salina, sulfato de morfina (3,5 mg/kg ou 20,0 mg/kg) ou U69593 (0,15 mg/kg) e após uma hora foram anestesiados, decapitados e a PAG retirada para obtenção do RNA total. Os animais do grupo branco foram ratas virgens em diestro, com 90 dias e que não sofreram nenhum tipo de tratamento farmacológico, utilizadas no Experimento 6. A seguir foram feitos os ensaios de transcrição reversa para análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR.

Justificativa:

Para que se conheça a real ação dos receptores opióides no CM de ratas lactantes e que foram desafiadas com fármacos, torna-se necessária primeiramente a avaliação dos genes que codificam para estes receptores em ratas virgens para que seja possível a avaliação somente do fármaco na modulação da expressão dos genes e não alterações possíveis decorrentes do estado reprodutivo.

Resultados:

A Figura 23 mostra os resultados obtidos quanto à expressão dos genes *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* na PAG de ratas virgens e adultas tratadas agudamente com agonistas de receptores opióides. A análise estatística demonstrou que não houve alterações em relação à expressão de *Oprd1*. Já a expressão dos genes *Oprm1 e Oprk1* mostrou-se significantemente diminuída em ratas tratadas agudamente com sulfato de morfina na maior dose ($F_{(3/30)}$=3,23, p=0,01), enquanto que os níveis de *Oprk1* aumentaram em animais tratados com U69593 ($F_{(3/30)}$=435,30, p<0,001).

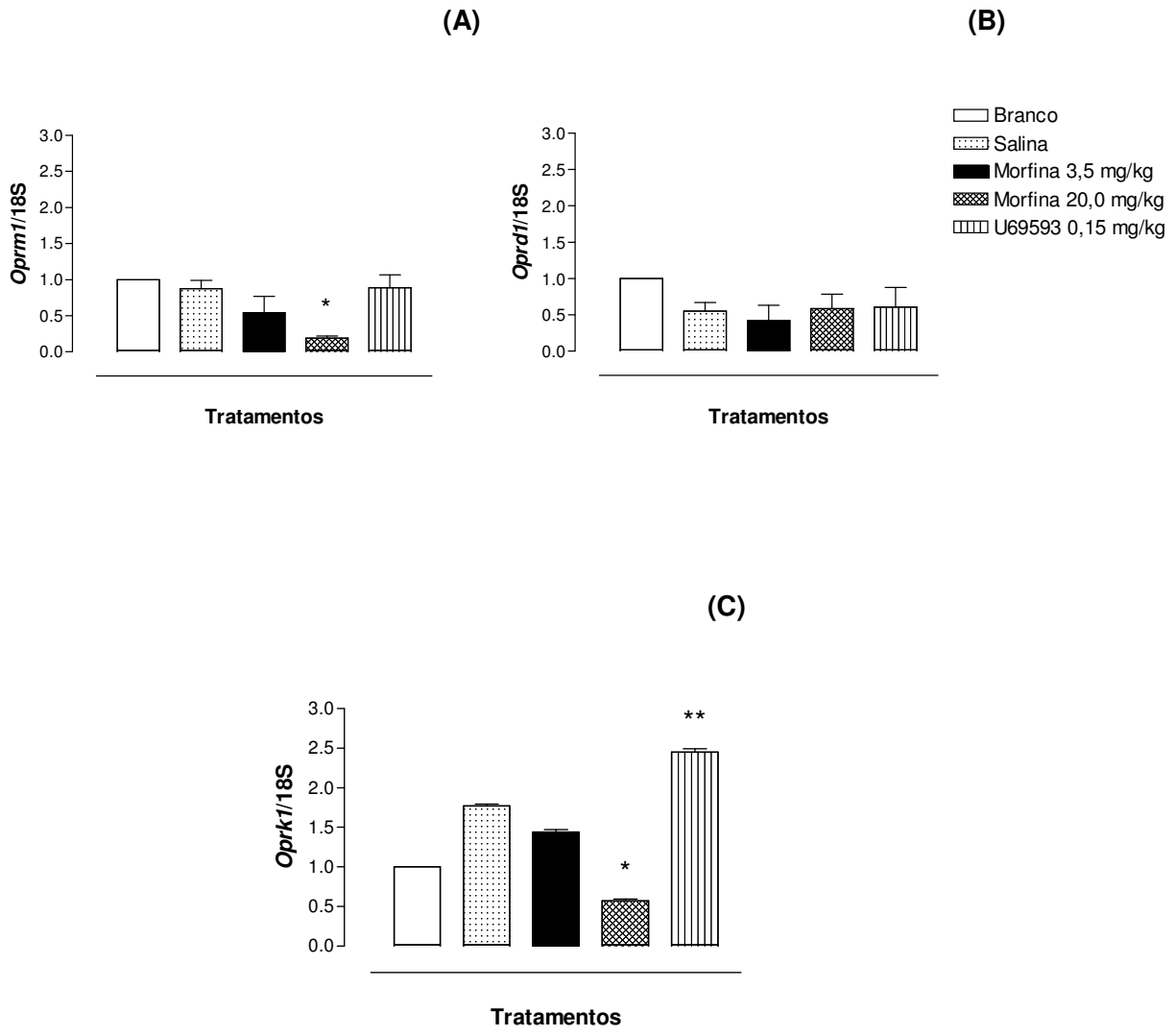


Figura 23- Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas tratadas com morfina ou U69693. (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo branco. São apresentadas as médias e erros-padrão (n = 7). * $p < 0,05$ em relação a todos os grupos; ** $p < 0,01$ em relação ao grupo morfina 20 mg/kg. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 15 - Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas adultas virgens tratadas agudamente com sulfato de morfina ou U69593.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 28 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em 4 grupos iguais. Esses animais foram tratados com uma única injeção de agonistas seletivos ou não de receptores opióides nas mesmas doses utilizadas no Experimento 14 e após uma hora foram decapitados e suas PAGs retiradas para as avaliações de proteínas. O grupo branco foi formado pelos mesmos animais do Experimento 7.

Justificativa:

Como os próximos experimentos avaliaram a possível ação modulatória dos opióides no CM, foi necessário descartar qualquer alteração nos conteúdos protéicos decorrentes do estado fisiológico. Assim, coube o estudo das proteínas em animais virgens e submetidos a tratamentos farmacológicos para que existam dados para comparação.

Resultados:

As análises estatísticas demonstraram que não ocorreram alterações nos padrões de expressão de proteínas nos animais avaliados (Figura 24).

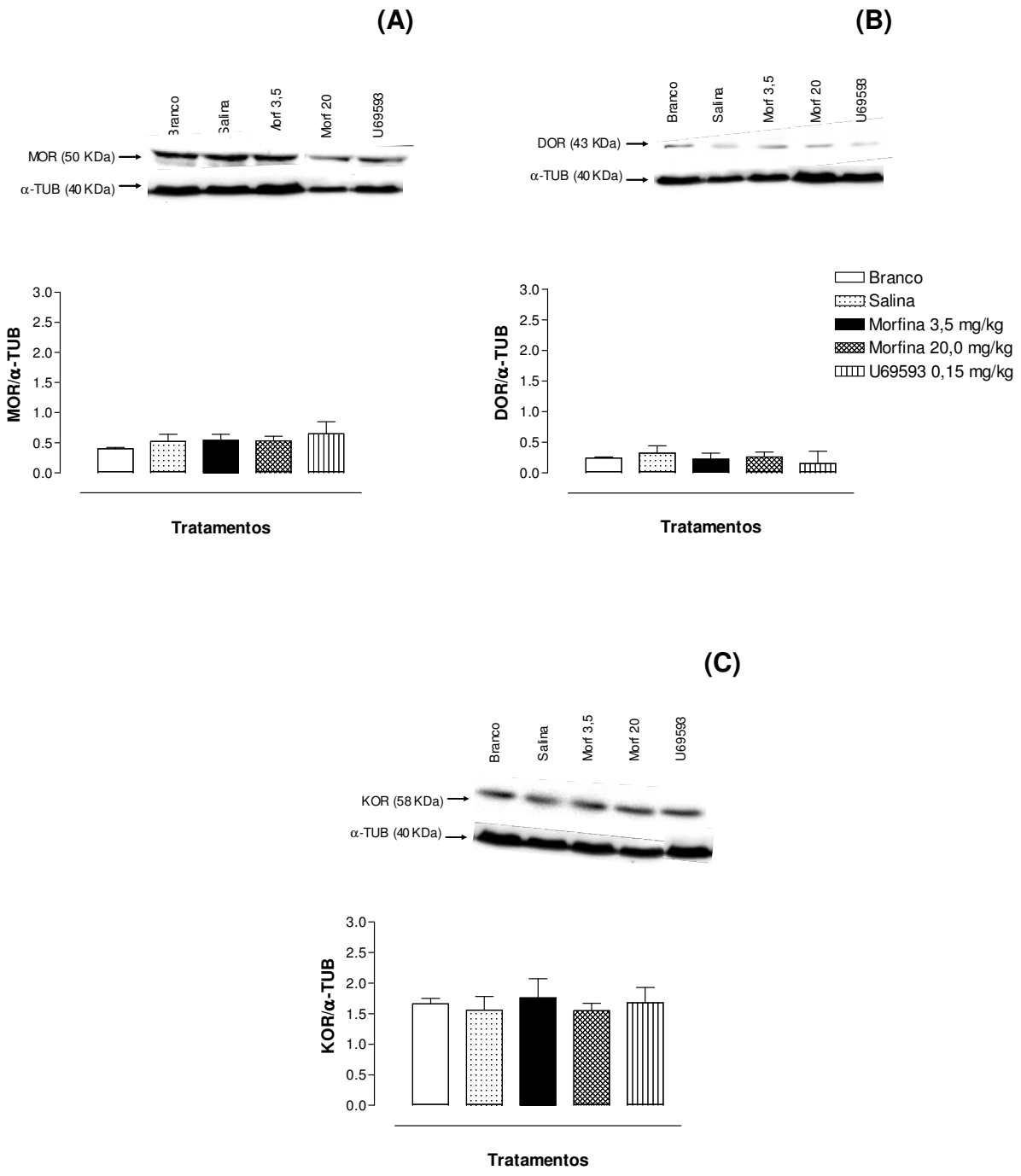


Figura 24- Western blot de amostras de PAG de ratas virgens submetidas a tratamento agudo com drogas opioidérgicas para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C). Padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n=7). $p > 0,05$; ANOVA.

Experimento 16- Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas adultas e virgens tratadas prolongadamente com sulfato de morfina ou U69593.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 21 ratas adultas e virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, divididas em 3 grupos iguais. Os animais receberam por 5 dias consecutivos uma injeção via s.c. de salina, sulfato de morfina (3,5 mg/kg) ou U69593 (0,15 mg/kg) e após uma hora foram anestesiados, decapitados e a PAG retirada para obtenção do RNA total. O grupo branco foi o mesmo utilizado no Experimento 6. A seguir foram feitos os ensaios de transcrição reversa para análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR.

Justificativa:

Após as análises da expressão de genes que codificam para os receptores opióides em animais virgens tratados agudamente com fármacos agonistas opioidérgicos é interessante saber se o tratamento prolongado com essas drogas poderia modular a expressão dos genes.

Resultados:

A Figura 25 mostra os resultados obtidos quanto à expressão dos genes *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* na PAG de ratas virgens submetidas a tratamento farmacológico prolongado com agonistas opioidérgicos seletivos ou não. A análise estatística revelou que os tratamentos com U69593 e morfina aumentaram a expressão de *Oprk1* ($F_{(3/24)}$=452,80, $p<0,01$) quando comparada aos demais grupos.

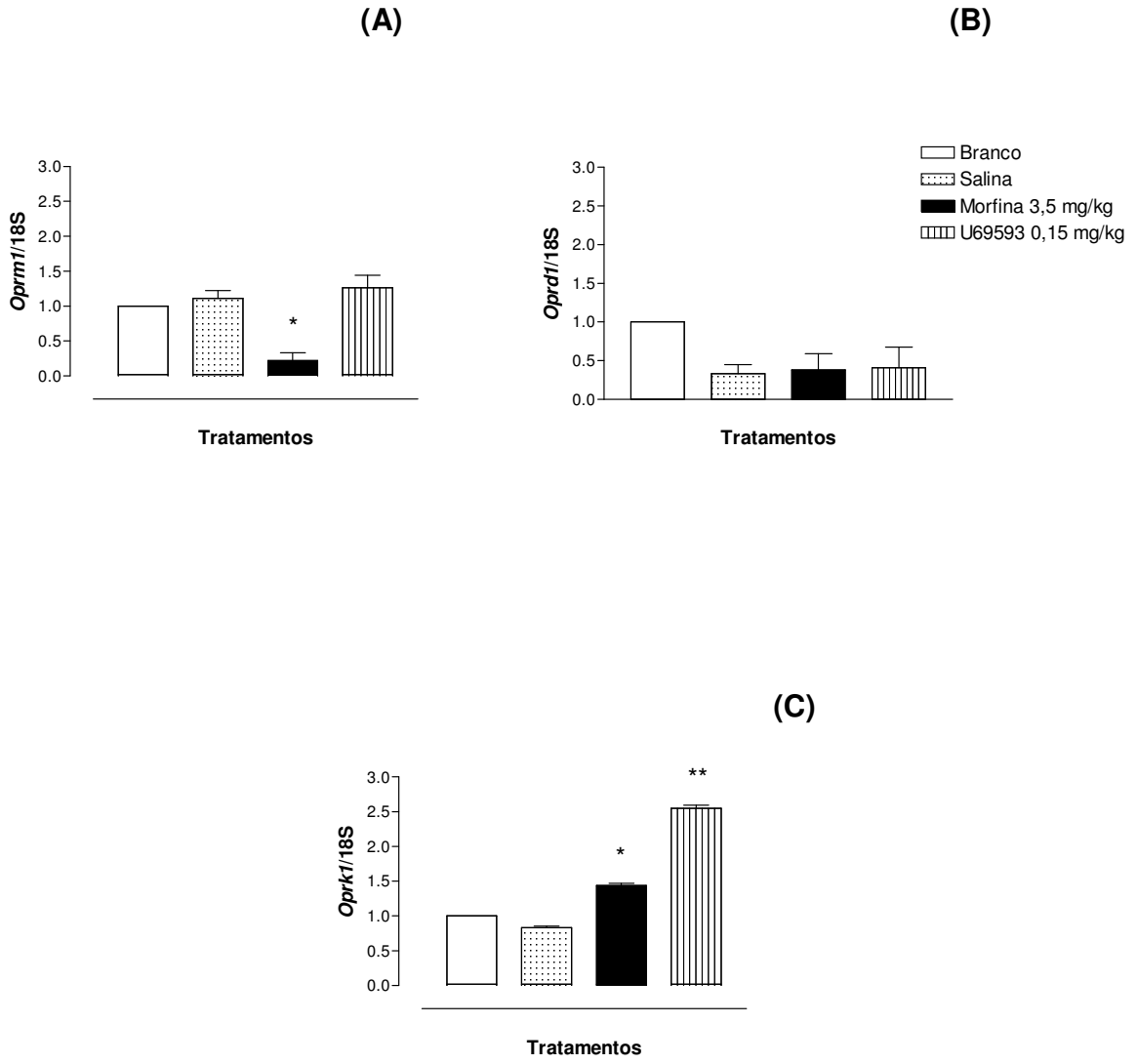


Figura 25- Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas tratadas cronicamente com morfina ou U69593. (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo branco. São apresentadas as médias e erros-padrão (n = 7). *$p < 0,05$ em relação a todos os grupos; ** $p < 0,01$ em relação a todos os grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 17 - Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas adultas virgens tratadas prolongadamente com sulfato de morfina ou U69593.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 21 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em 3 grupos iguais. Esses animais foram tratados, pela manhã, com uma injeção de agonistas de receptores opioidérgicos por 5 dias consecutivos nas mesmas doses utilizadas no Experimento 16. Finda a última administração, aguardou-se uma hora e em seguida os animais foram levemente anestesiados, decapitados e suas PAGs retiradas para as avaliações de proteínas. Os animais do grupo branco foram os mesmos utilizados no Experimento 7.

Justificativa:

Trata-se de avaliar se opióides administrados por período prolongado modulariam a expressão protéica, já que em termos gênicos observou-se que o tratamento com morfina diminuiu a expressão de *Oprm1*, enquanto que U69593 e também morfina aumentaram a expressão de *Oprk1.*

Resultados:

Conforme observado na Figura 26, não houve alterações estatisticamente significantes nos conteúdos protéicos MOR, DOR e KOR decorrente do tratamento farmacológico prolongado.

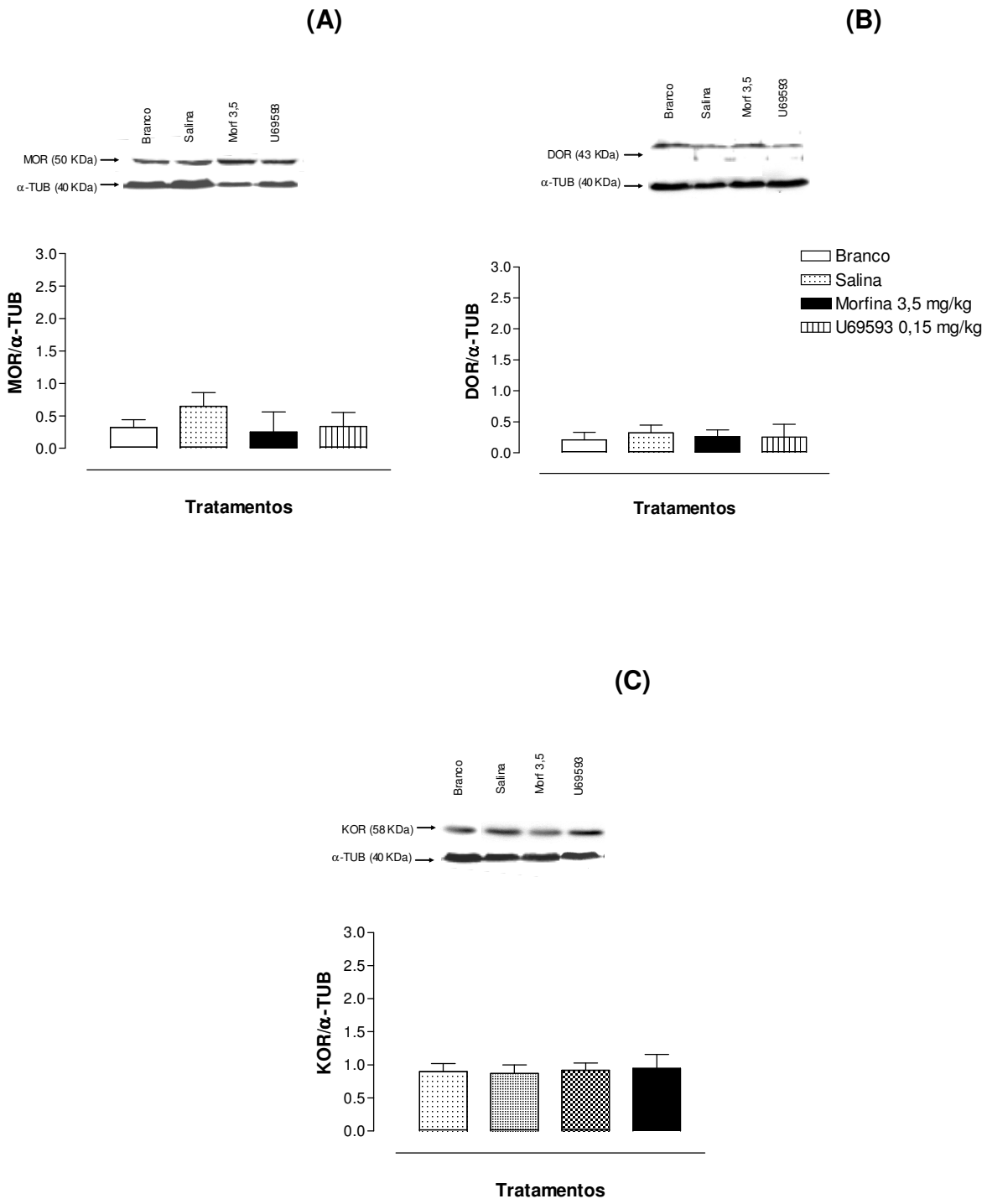


Figura 26- Western blot de amostras de PAG de ratas virgens submetidas a tratamento prolongado com drogas opioidérgicas para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C). Padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n=7). $p > 0,05$; ANOVA.

Experimento 18 – Análise do comportamento maternal de ratas adultas tratadas agudamente com sulfato de morfina ou U69593 ao 5º dia de lactação.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 40 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em 4 grupos iguais. Esses animais foram previamente acasalados conforme descrito no item 3.5. de Material e Métodos. O parto foi considerado como dia zero de lactação, sendo que ao 5° dia de gestação foram formados os seguintes grupos: branco (sem manipulações experimentais), salina (tratado com solução salina, s.c.), sulfato de morfina (tratado com 3,5 mg/kg, s.c.) ou U69593 (tratado com 0,15 mg/kg s.c.). Trinta minutos após as injeções os animais foram avaliados quanto ao CM e logo após, metade dos animais de cada grupo foi utilizada para avaliações de expressão gênica e a outra metade para avaliações protéicas.

Justificativa:

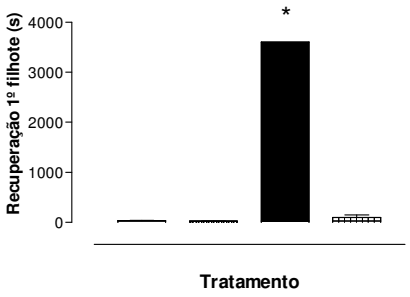
Neste experimento avaliou-se se o tratamento agudo com morfina (agonista não seletivo para receptores opioidérgicos) ou U69593, (agonista seletivo para receptores κ) poderia promover alteração no CM desses animais. Trabalhos prévios têm mostrado que a administração de morfina inibe o CM, porém não são conhecidos os efeitos de agonistas seletivos sobre esse comportamento. Desse modo, investigou-se a importância dos receptores opióides no CM, avaliando-se qual deles tem maior ou menor influência nesta inibição.

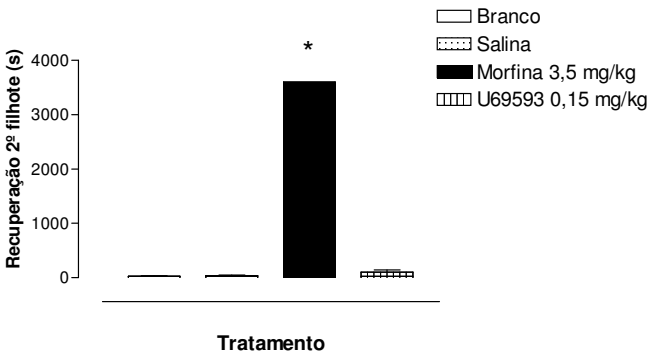
Resultados:

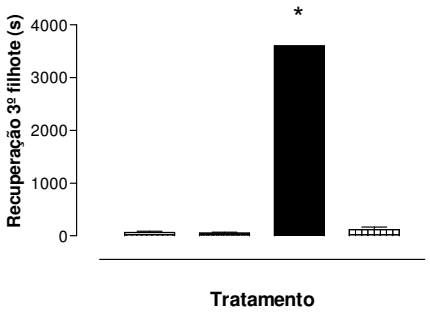
As análises estatísticas demonstraram na Figura 27 que o tratamento agudo com sulfato de morfina ao 5º dia de lactação inibiu completamente o CM ($K_{(3/39)}$=342,60, $p<0,0001$). Observou-se também que o tratamento com U69593 prejudicou quase todos os parâmetros do CM, aumentando as latências para recuperação dos 7º ($K_{(3/39)}$=847,50, $p=0,01$) e 8º filhotes ($K_{(3/39)}$=530,90, $p<0,01$), agrupamento

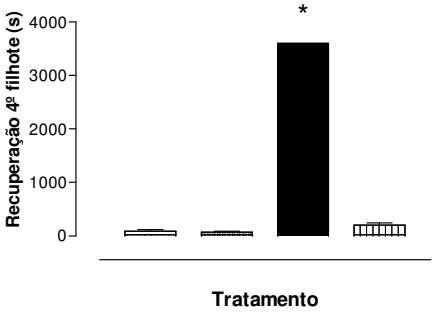
($K_{(3/39)}$=362,40, p<0,001), “crouching” ($K_{(3/36)}$=956,30, p<0,001) e comportamento maternal total ($K_{(3/39)}$=384,70, p<0,001).

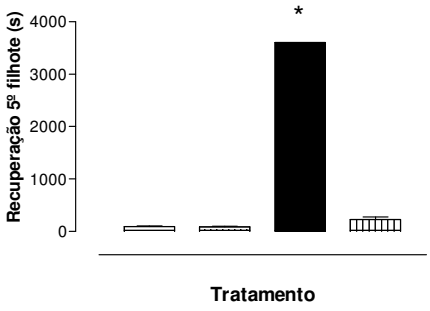
A Tabela 1 mostra os escores atribuídos aos ninhos dos animais avaliados. Esses ninhos foram observados antes da injeção aguda de salina, sulfato de morfina ou U69593. A análise estatística revelou que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. A Tabela 2 apresenta os resultados de auto-limpeza e limpeza dos filhotes, observando-se ausência de limpeza dos filhotes no grupo tratado com morfina. A Tabela 3 mostra os resultados da avaliação do CM observado aos 45 e 60 minutos, onde o mesmo é computado caso a rata estivesse sobre os filhotes, no ninho e em posição de amamentação, e no qual observou-se prejuízo em animais tratados com morfina.

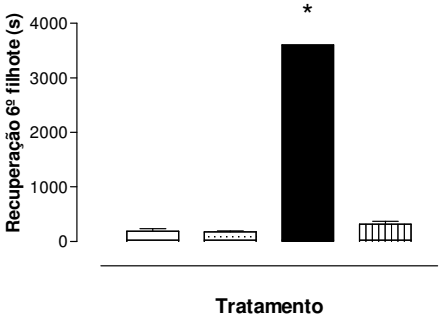

Recuperação 1º filhote (s)
4000
3000
2000
1000
0
*
Tratamento


Branco
Salina
Morfina 3,5 mg/kg
U69593 0,15 mg/kg
Recuperação 2º filhote (s)
4000
3000
2000
1000
0
*
Tratamento


Recuperação 3º filhote (s)
4000
3000
2000
1000
0
*
Tratamento


Recuperação 4º filhote (s)
4000
3000
2000
1000
0
*
Tratamento


Recuperação 5º filhote (s)
4000
3000
2000
1000
0
*
Tratamento


Recuperação 6º filhote (s)
4000
3000
2000
1000
0
*
Tratamento

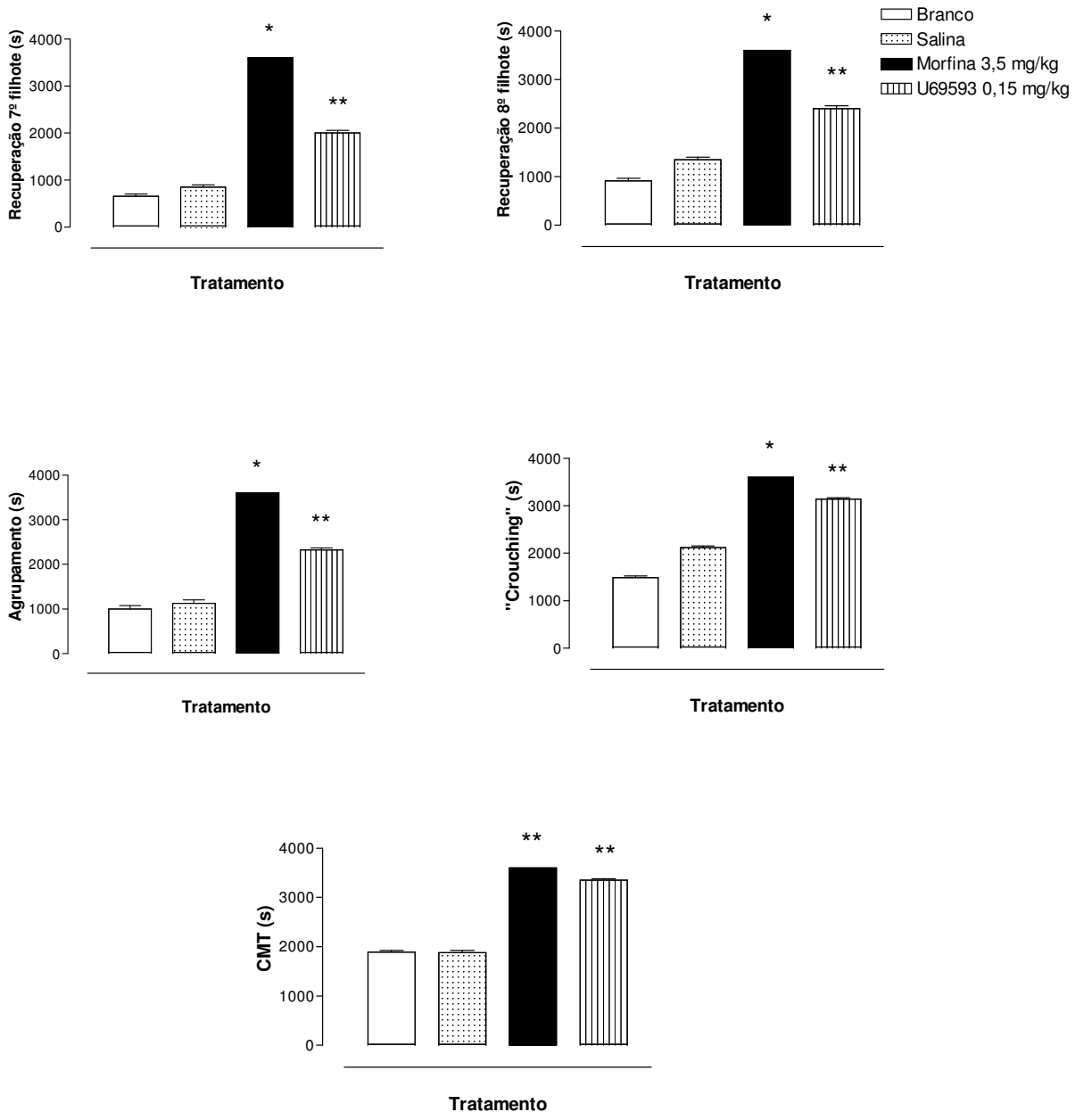


Figura 27- Parâmetros do comportamento maternal de ratas tratadas agudamente ao 5º dia de lactação com solução salina, sulfato de morfina (3,5 mg/kg) ou U69593 (0,15 mg/kg). São apresentadas as médias ± respectivos erros-padrão (n = 10). * $p < 0,001$ em relação a todos os grupos; ** $p < 0,05$ em relação ao grupo branco. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn.

Tabela 1 – Classificação de ninho observado ao 5° dia de lactação. O nome dos grupos refere-se aos tratamentos com salina, sulfato de morfina ou U69593.

Grupos/ Parâmetros	SALINA (n = 10)	MORFINA (n = 10)	U69593 (n = 10)
ÓTIMO	9/10	8/10	8/10
BOM	1/10	2/10	2/10
RAZOÁVEL	0/10	0/10	0/10
FRACO	0/10	0/10	0/10

$p > 0,05$ - Teste de Fischer.

Tabela 2 – Avaliação de ocorrência de auto-limpeza materna ou limpeza dos filhotes observada ao 5° dia de lactação. O nome dos grupos refere-se aos tratamentos com salina, sulfato de morfina ou U69593.

Grupos/ Parâmetros	SALINA (n = 10)	MORFINA (n = 10)	U69593 (n = 10)
Auto-limpeza	7/10	9/10	8/10
Limpeza filhotes	9/10	0/10 *	9/10

* $p < 0,05$ - Teste de Fischer.

Tabela 3 – Avaliação do comportamento maternal de ratas, observado aos 45 e 60 minutos. O nome dos grupos refere-se aos tratamentos com salina, sulfato de morfina ou U69593.

Grupos/ CM	SALINA (n = 10)	MORFINA (n = 10)	U69593 (n = 10)
45 min.	10/10	4/10 *	10/10
60 min.	10/10	5/10 *	10/10

* $p < 0,05$ - Teste de Fischer.

Experimento 19 - Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas adultas tratadas agudamente com sulfato de morfina ou U69593 ao 5º dia de lactação.

Delineamento Experimental:

Foi utilizada aleatoriamente metade dos animais do Experimento 18. Assim, os animais pertencentes aos grupos branco (sem manipulações experimentais), salina, sulfato de morfina (tratado com 3,5 mg/kg) ou U69593 (tratados com 0,15 mg/kg) foram avaliados quanto ao CM e imediatamente após foram anestesiados, decapitados e a PAG foi retirada para obtenção do RNA total seguida das análises da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR.

Justificativa:

Neste experimento avaliou-se se os tratamentos agudos com sulfato de morfina ou U69593 podem promover alteração nos padrões de expressão dos genes que codificam para os receptores opióides conhecidos. Ainda, foi verificado se o estado fisiológico, a lactação e o próprio CM, promoveriam alguma alteração na atividade desses genes.

Resultados:

A análise estatística mostrou que os tratamentos com morfina e U69593 promoveram aumento de expressão apenas de *Oprk1* ($F_{(3/24)}=27,44$, $p<0,01$). Em relação a *Oprm1* e *Oprd1*, nenhuma diferença foi observada (Figura 28).

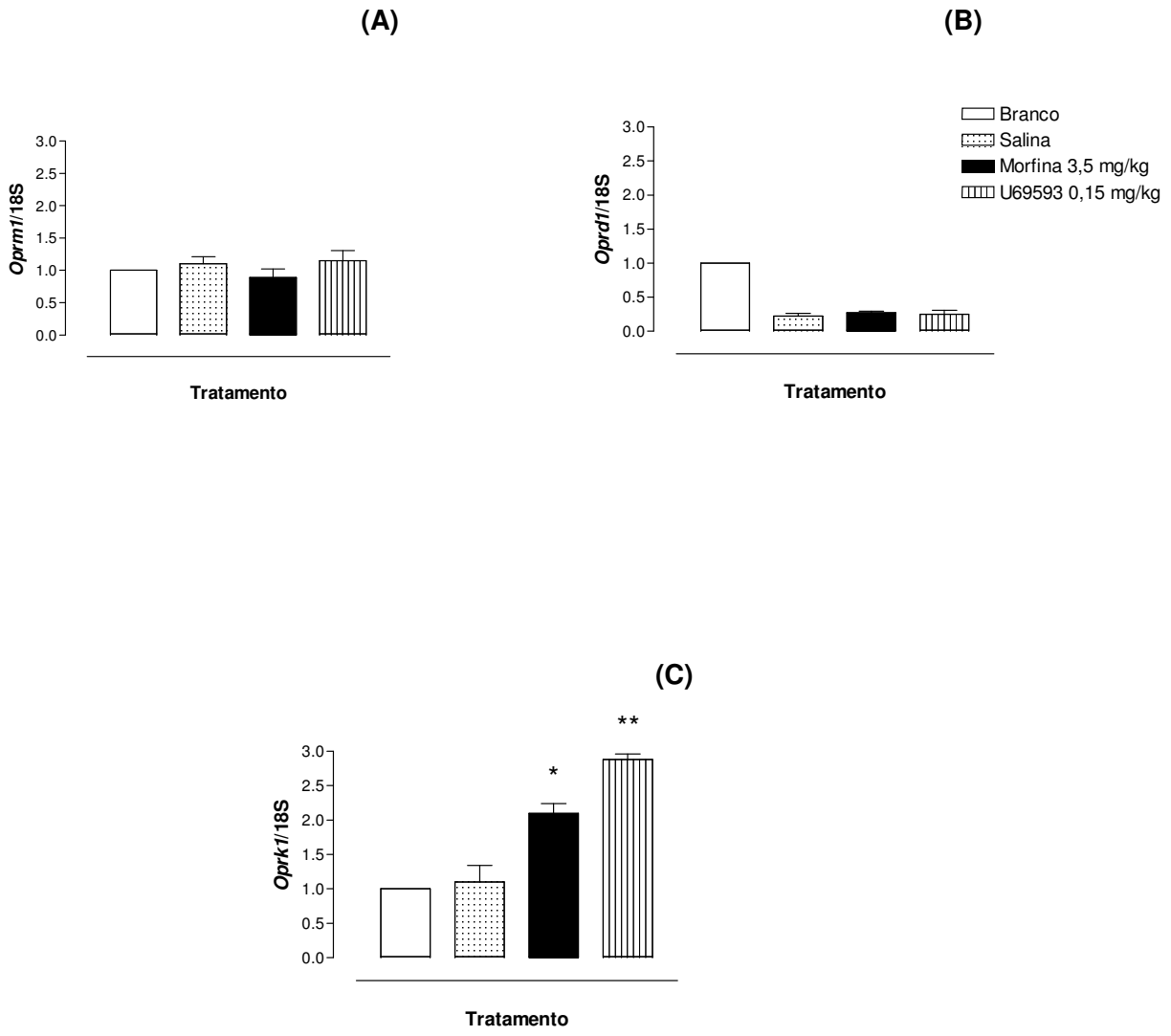


Figura 28- Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas tratadas agudamente ao 5º dia de lactação com salina, sulfato de morfina (3,5 mg/kg) ou U69593 (0,15 mg/kg). (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo branco. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n = 6). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos; ** $p < 0,01$ em relação aos demais grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 20 - Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas adultas tratadas agudamente com sulfato de morfina ou U69593 ao 5º dia de lactação.

Delineamento Experimental:

Foi utilizado aleatoriamente metade dos animais do Experimento 18. Assim, os animais pertencentes aos grupos branco (sem manipulações experimentais), salina, sulfato de morfina (tratado com 3,5 mg/kg) ou U69593 (tratados com 0,15 mg/kg) foram avaliados quanto ao CM e imediatamente após foram anestesiados, decapitados e a PAG foi retirada para as avaliações de proteínas.

Justificativa:

Todos os trabalhos envolvendo avaliação de atividade gênica por meio de Real Time RT-PCR devem ser validados por meio de análise do conteúdo protéico. Isso porque, caso um gene esteja com aumento na sua expressão não necessariamente ocorre aumento paralelo na quantidade de proteínas traduzidas. Assim, como a avaliação da expressão dos genes que codificam para receptores opióides demonstrou aumento de expressão de *Oprk1* em ratas tratadas agudamente com sulfato de morfina e U69593, é interessante verificar como é o comportamento das proteínas.

Resultados:

As análises estatísticas demonstraram que o tratamento agudo com agonistas seletivos ou não para os subtipos de receptores opióides é capaz de promover alterações nos padrões de conteúdo protéico (Figura 29). Assim, o tratamento agudo com sulfato de morfina ao 5º dia de lactação foi capaz de aumentar a expressão de *Oprm1* ($F_{(3/24)}$=4,82, p=0,09) somente. Em relação à expressão de *Oprk1* ($F_{(3/24)}$=26,36, p<0,01), mostrou-se diminuída em animais tratados com morfina.

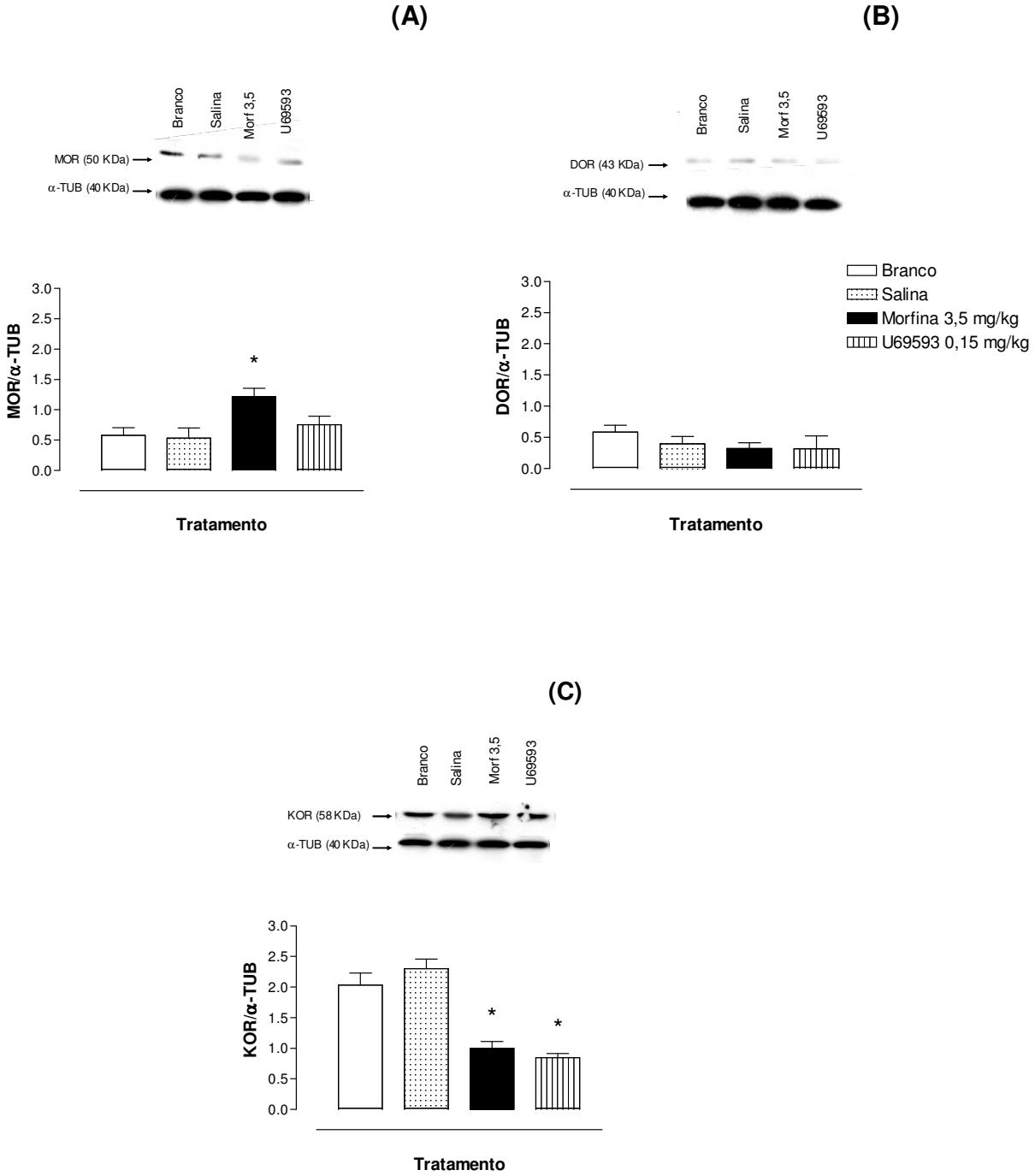


Figura 29- Western blot de amostras de PAG de ratas tratadas agudamente ao 5º dia de lactação com sulfato de morfina (3,5 mg/kg) ou U69593 (0,15 mg/kg), para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C).) padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão. (n =7) * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 21 - Análise do comportamento maternal de ratas adultas tratadas prolongadamente com sulfato de morfina ou U69593 durante a gestação e desafiadas ao 5º dia de lactação.

Delineamento Experimental:

Foram utilizadas 90 ratas virgens com 90 dias de idade e 200 gramas de peso corporal, as quais foram divididas em 9 grupos iguais, sendo os animais do grupo branco os mesmos do Experimento 18. Esses animais foram previamente acasalados conforme descrito no item 3.5. de Material e Métodos. O parto foi considerado como dia zero de lactação, sendo que ao 5° dia de gestação, foram formados grupos conforme a Tabela 4 abaixo. Trinta minutos após as injeções desafio, os animais foram avaliados quanto ao CM.

Tabela 4 – Esquema de tratamento durante a gestação e desafio ao 5º dia de lactação.

Pré-tratamento	Desafio	Grupo
Salina	Salina	SS
Salina	Morfina	SM
Salina	U69593	Sk
Morfina	Salina	MS
Morfina	Morfina	MM
Morfina	U69593	kM
U69593	Salina	kS
U69593	Morfina	kM
U69593	U69593	Kk

Justificativa:

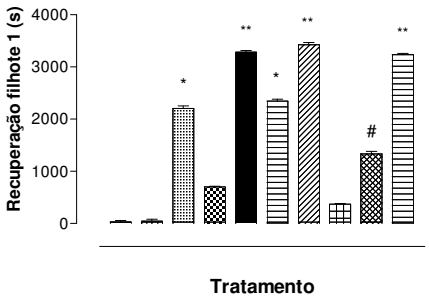
Neste experimento pretendeu-se avaliar se o tratamento crônico com sulfato de morfina ou U69593 poderia promover alteração no CM desses animais. E acordo com resultados prévios encontrados neste trabalho e já descrito por outros autores a administração de morfina inibe o CM, porém não são conhecidos os efeitos de agonistas seletivos de receptores opióides sobre esse comportamento.

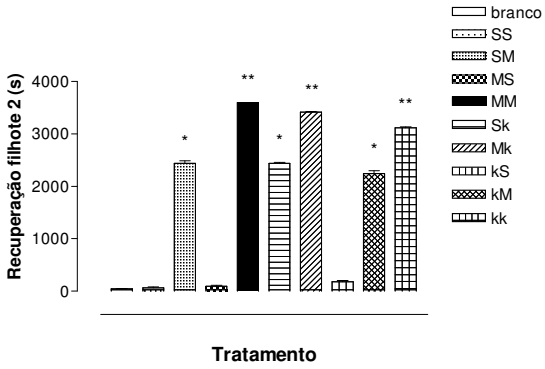
Resultados:

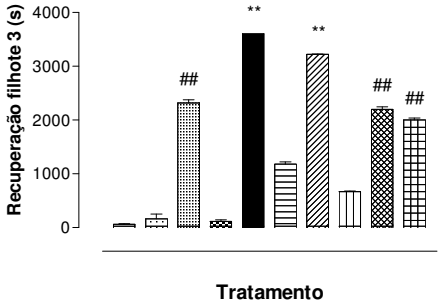
As análises estatísticas demonstraram que o tratamento crônico com sulfato de morfina ao 5º dia de lactação foi capaz de inibir completamente o CM dessas mães ($K_{(9/90)}$=1.417,0 p<0,0001), quando estas foram desafiadas com morfina na dose de 3,0 mg/kg (Figura 30). Observa-se tendência de ocorrer prejuízo do CM quando o desafio é feito com morfina, independentemente do tratamento prévio. Em relação ao tratamento com U69593 os resultados mostram que somente o pré-tratamento durante a gestação com esse agonista seletivo não é capaz de prejudicar o CM, porém o desafio agudo, tanto com morfina ($K_{(9/90)}$=286,10, p<0,001) quanto U69593 ($K_{(9/90)}$=1.019,10, p<0,001), prejudicou principalmente o início dos parâmetros de recuperação dos filhotes.

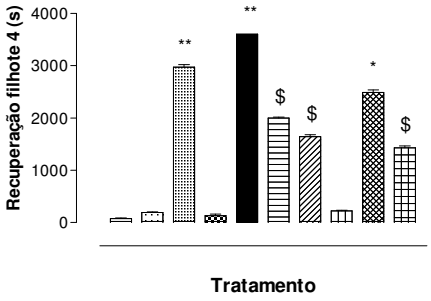
A Tabela 5 mostra os escores atribuídos aos ninhos dos animais avaliados. Esses ninhos foram observados antes da injeção desafio em mães previamente sensibilizadas de acordo com o tratamento. A análise estatística revelou que não houve diferenças significantes entre os grupos.

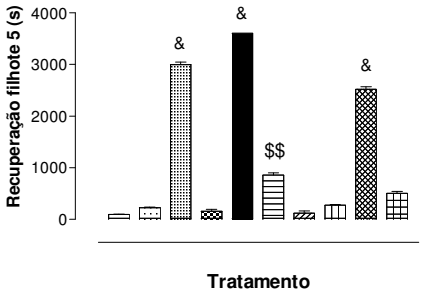
A Tabela 6 apresenta os resultados de auto-limpeza e limpeza dos filhotes, observando-se ausência de limpeza dos filhotes no grupo tratado com sulfato de morfina, enquanto que a Tabela 7 mostra os resultados da avaliação do CM observado aos 45 e 60 minutos, onde o mesmo é computado caso a rata estivesse sobre os filhotes, no ninho e em posição de amamentação.

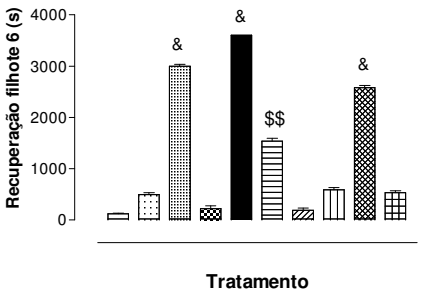

Recuperação filhote 1 (s)
4000
3000
2000
1000
0
*
**
*
**
#
**
Tratamento


Recuperação filhote 2 (s)
4000
3000
2000
1000
0
*
**
*
**
*
**
Tratamento
branco
SS
SM
MS
MM
Sk
Mk
kS
kM
kk


Recuperação filhote 3 (s)
4000
3000
2000
1000
0
##
**
**
##
##
Tratamento


Recuperação filhote 4 (s)
4000
3000
2000
1000
0
**
**
$
$
*
$
Tratamento


Recuperação filhote 5 (s)
4000
3000
2000
1000
0
&
&
$$
&
Tratamento


Recuperação filhote 6 (s)
4000
3000
2000
1000
0
&
&
$$
&
Tratamento

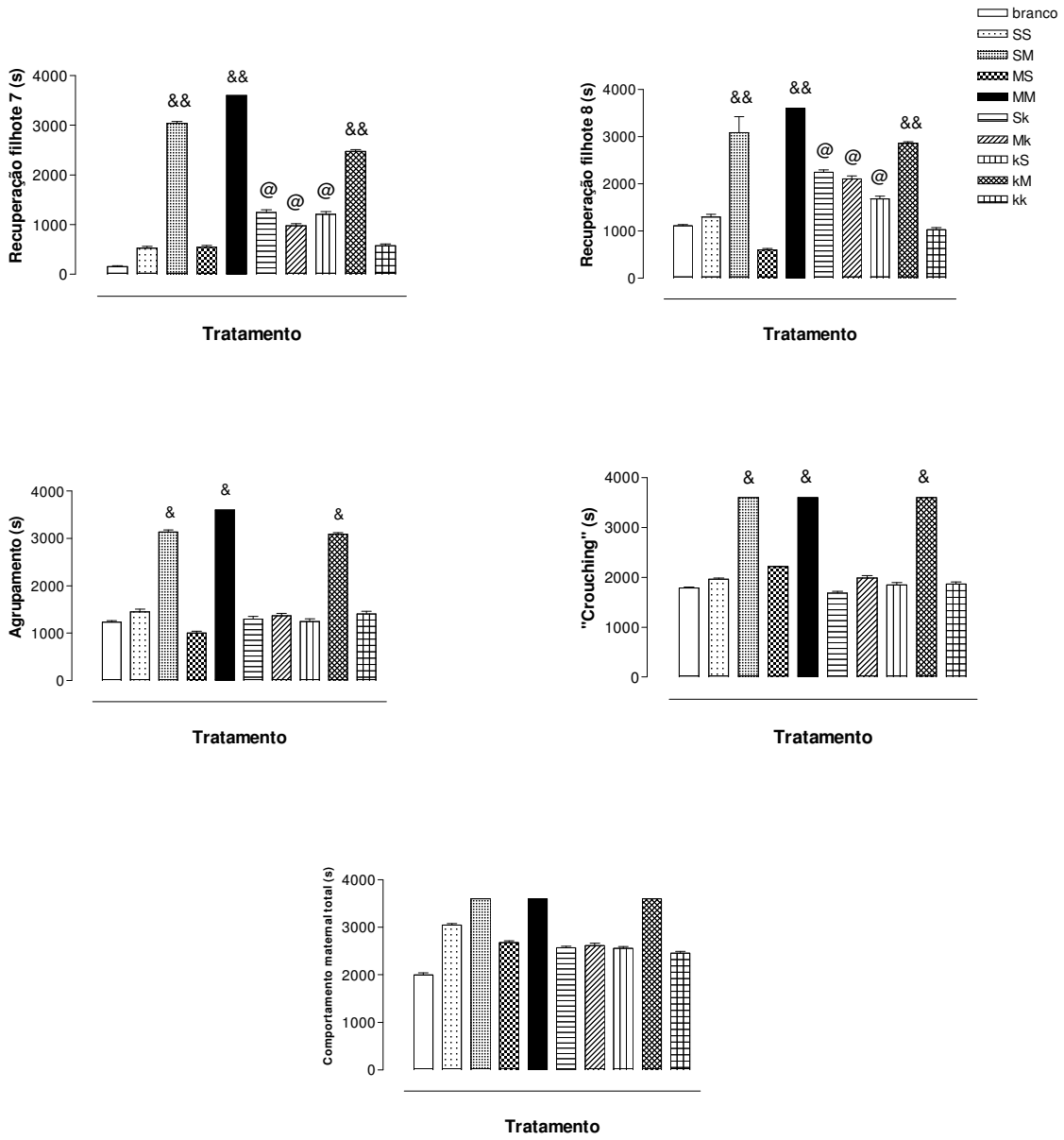


Figura 30- Parâmetros do comportamento maternal de ratas tratadas prolongadamente durante a gestação e desafiadas ao 5º dia de lactação com solução salina, sulfato de morfina (3,5 mg/kg e 3,0 mg/kg) ou U69593 (0,15 mg/kg e 0,10 mg/kg). São apresentadas as médias ± respectivos erros-padrão (n = 10). * p < 0,0015 em relação aos grupos branco, SS, MS e uS; **p < 0,001 em relação aos grupos branco, SS, MS e uS; # p < 0,05 em relação aos grupos branco, SS, MS e uS; ## p < 0,001 em relação aos grupos branco, SS, MS, Su e uS; $ p < 0,01 em relação aos grupos branco, SS, MS e uS; $$ p < 0,05 em relação aos grupos branco, SS, MS, Um, uS e uu; & p < 0,001 em relação aos demais grupos; && p < 0,01 em relação aos grupos branco, SS, MS e uu; @ p , 0,05 em relação aos grupos branco, SS, MS e uu. Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn.

Tabela 5 – Classificação de ninho observado ao 5° dia de lactação. O nome dos grupos refere-se aos tratamentos com salina, sulfato de morfina ou U69593 (n = 10).

Grupos/ Parâmetros	SS	SM	Sk	MS	MM	kM	kS	kM	kk
ÓTIMO	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10	8/10	10/10	10/10	10/10
BOM	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	2/10	0/10	0/10	0/10
RAZOÁVEL	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
FRACO	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

$p > 0,05$ - Teste de Fischer.

Tabela 6 – Avaliação de ocorrência de auto-limpeza materna ou limpeza dos filhotes observada ao 5° dia de lactação. O nome dos grupos refere-se aos tratamentos com salina, morfina ou U69593 (n = 10).

Grupos/ Parâmetros	SS	SM	Sk	MS	MM	Mk	kS	kM	kk
Auto-limpeza	10/10	10/10	10/10	9/10	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10
Limpeza dos Filhotes	10/10	10/10	10/10	6/10	3/10*	6/10	10/10	10/10	10/10

* $p < 0,05$ - Teste de Fischer.

Tabela 7 – Avaliação do comportamento maternal de ratas, checado aos 45 e 60 minutos. O nome dos grupos refere-se aos tratamentos com salina, morfina ou U69593 (n = 10).

Grupos/ Parâmetros	SS	SM	Sk	MS	MM	Mk	kS	kM	kk
45 min.	10/10	10/10	10/10	9/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10
60 min.	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10

$p > 0,05$ - Teste de Fischer.

Experimento 22- Análise da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* na PAG de ratas adultas tratadas prolongadamente com sulfato de morfina ou U69593 durante a gestação e desafiadas as 5º dia de lactação.

Delineamento Experimental:

Foi utilizado aleatoriamente metade dos animais do experimento 21. Assim, os animais foram avaliados quanto ao CM e imediatamente após foram anestesiados, decapitados e a PAG foi retirada para obtenção do RNA total seguida das análises da expressão dos genes *Oprm1, Oprk1 e Oprd1* dos receptores opióides μ, κ e δ por Real Time-PCR.

Justificativa:

Neste experimento avaliou-se se o tratamento prolongado com agonista seletvo espacífico para receptor opióide do tipo κ poderia alterar os padrões de expressão de genes que codificam para os receptores avaliados.

Resultados:

A análise estatística mostrou que a expressão de *Oprm1* ($F_{(9/60)}$=295,10, $p<0,001$) apresenta-se diminuída nos animais pré-tratados com morfina e que foram desafiado com morfina ou U69593. Por outro lado, observou-se aumento na expressão de *Oprk1* ($F_{(9/60)}$=12,04, $p<0,001$) nos animais pré-tratados e desafiados com sulfato de morfina (Figura 31).

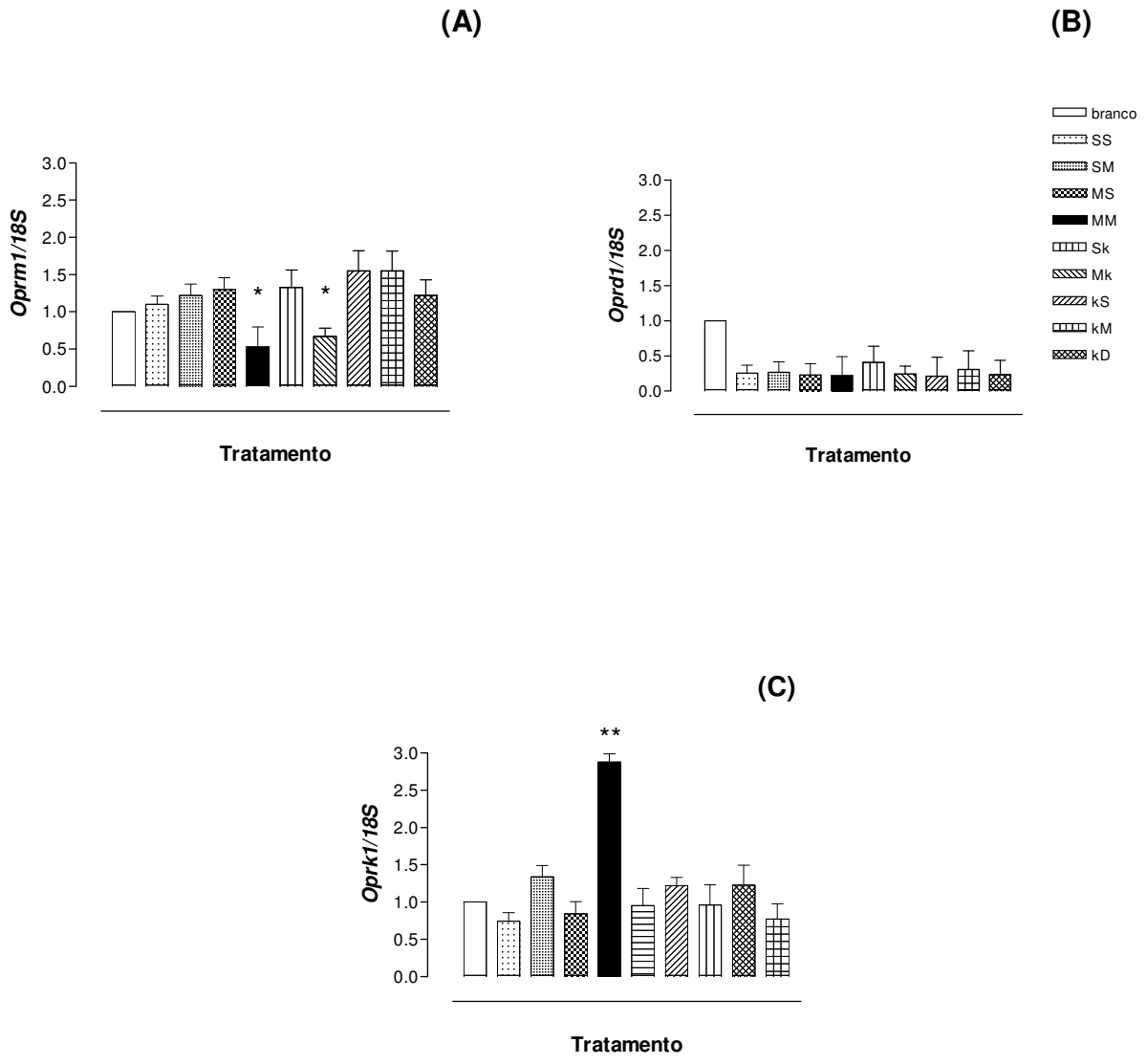


Figura 31- Produtos de Real Time RT-PCR de 1 µg de RNA total extraído da PAG de ratas tratadas agudamente ao 5º dia de lactação com salina, sulfato de morfina (3,5 ou 3,0 mg/kg) e U69593 (0,15 ou 0,10 mg/kg). (A) *Oprm1*, (B) *Oprd1* e (C) *Oprk1*. Os gráficos em barras representam os valores de densidade óptica relativa para *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1*, sendo os valores normalizados pelos produtos de Real Time RT-PCR correspondentes para 18S e em relação às densidades do grupo branco. São apresentadas as médias ± erros-padrão (n = 10). * $p < 0,05$ em relação aos demais grupos; ** $p < 0,001$ em relação aos demais grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey.

Experimento 23- Análise dos produtos protéicos MOR, KOR e DOR de ratas adultas tratadas prolongadamente com sulfato de morfina ou U69593 durante a gestação e desafiadas ao 5º dia de lactação.

Delineamento Experimental:

Foi utilizado aleatoriamente metade dos animais do Experimento 21. Assim, após as análises comportamentais os animais foram imediatamente anestesiados, decapitados e suas PAGs retiradas para as avaliações de proteínas.

Justificativa:

Todos os trabalhos envolvendo avaliação de atividade gênica por meio de Real Time RT-PCR devem ser validados por meio de análise do conteúdo protéico. Isso porque, caso um gene esteja com aumento na sua expressão não necessariamente ocorre aumento paralelo na quantidade de proteínas traduzidas. Pretende-se observar o comportamento dos genes que apresentam-se sob influência do estado reprodutivo bem como do tratamento farmacológico

Resultados:

A Figura 32 mostra os resultados obtidos em relação às análises protéicas de animais tratados com agonista seletivo ou não para receptor opióide do tipo κ. A análise estatística demonstra que houve diminuição no conteúdo de MOR ($F_{(9/60)}$=1,810,0, $p<0,001$) nos animais pré-tratados com salina e morfina e desafiados com morfina.

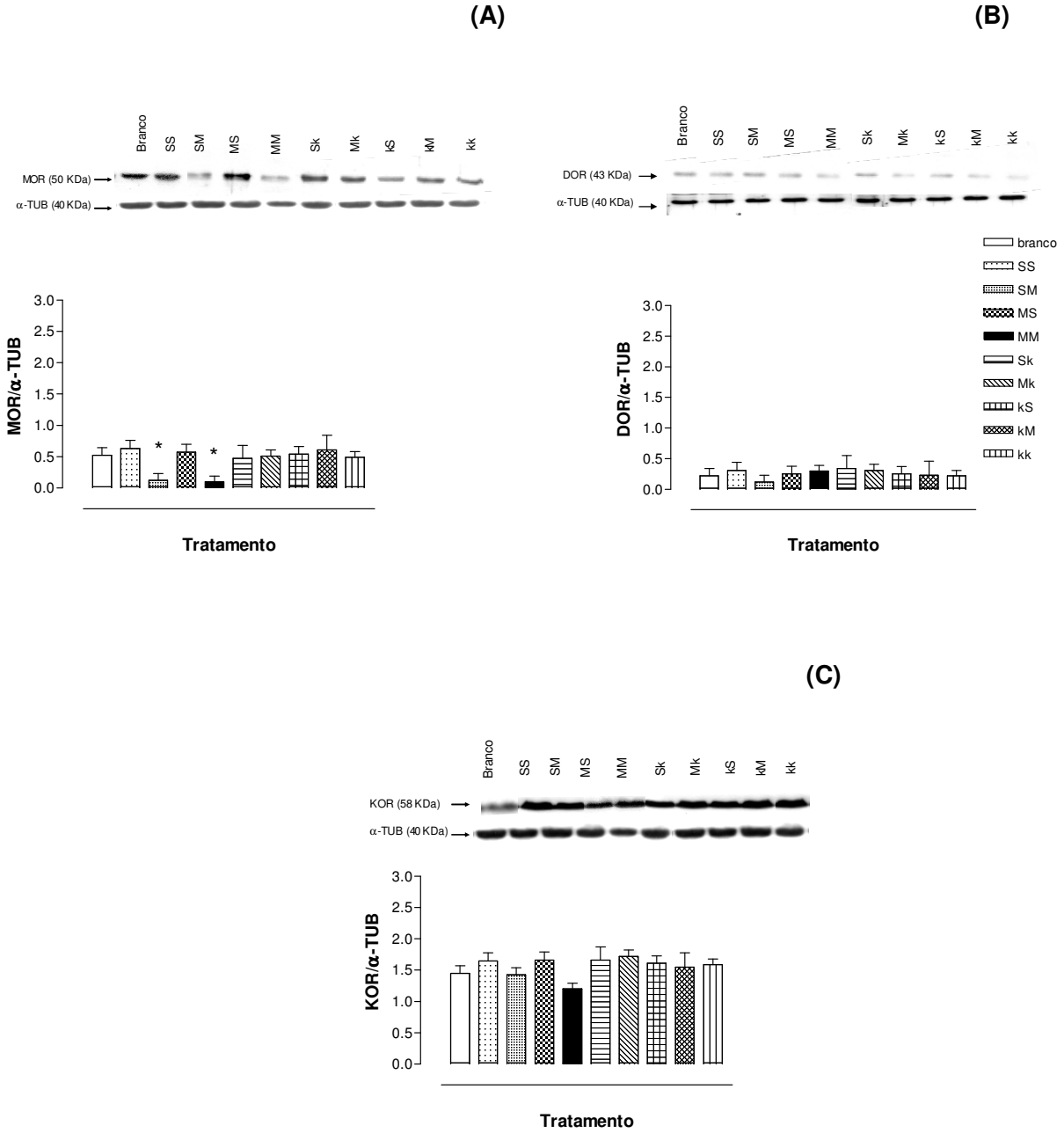


Figura 32- Western blot de amostras de PAG de ratas tratadas cronicamente com morfina ou U69593 e desafiadas ao 5º dia de lactação para as proteínas MOR (A), DOR (B) e KOR (C). Padrão de bandas em gel, seguido de reação ECL e revelação, sendo os dados normalizados em relação à α-TUBULINA. São apresentadas as médias ± erros-padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina; ANOVA seguido de teste de Tukey.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O cuidado maternal é um comportamento complexo, espontâneo, instintivo e com características espécie-específicas determinado por modificações fisiológicas que ocorrem pouco antes ou logo após o parto (NUMAN, 1994; MATTSON et al., 2001). Durante este período especial, o principal objetivo do comportamento da rata é garantir a sua sobrevivência e dos seus filhotes. Em função disso, muitos comportamentos são inibidos e a rata se dedica incondicionalmente à sua prole (YIM JÚNIOR, 2001). Por outro lado, num cenário de busca compulsiva por drogas de abuso, o único interesse está em procurar e consumir a droga enquanto que outros comportamentos se tornam irrelevantes (KINSLEY et al., 1994).

A morfina, que também é uma droga que pode causar dependência, tem sido muito estudada neste contexto (PRZEWLOCKI, 2004). Miranda-Paiva e colaboradores (2001, 2003) verificaram que o tratamento materno com morfina no final da prenhez exacerba o efeito inibitório desta droga sobre o CM durante a lactação. Curiosamente, esse efeito foi específico para o CM, pois, não houve aumento da locomoção dos animais. Assim, os autores propõem que esse fenômeno tenha algumas similaridades com a sensibilização clássica como, por exemplo, padrões de neuroplasticidade induzidos pelos tratamentos prolongados com drogas de abuso que levam a exacerbação determinadas respostas. Por outro lado, o resultado obtido com a morfina no CM parece estar relacionado com o status hormonal da mãe no final da prenhez (MIRANDA-PAIVA et al., 2001, 2002).

O papel dos receptores opióides no CM tem sido pouco estudado. Alguns trabalhos mostram que a expressão do CM mobiliza a coluna ventrolateral da parte caudal da PAG, que estaria envolvida na organização da cifose fisiológica. Esta é induzida pelo amamentar e consiste na permanência da rata sobre a ninhada na postura apropriada à amamentação, modulação da agressão maternal (LONSTEIN; STERN, 1997, 1998) e estratégias de sobrevivência envolvendo situações de estresse (PAVESI et al., 2007). Além disso, a PAG também parece modular comportamentos como o de defesa (CARRIVE, 1993), sexual (SAKUMA; PFAFF, 1979) e alimentar (VAN ERP et al., 1993). Já o estriado, particularmente a porção dorsal, é um componente do sistema motor extrapiramidal que influencia os mecanismos motores do tronco cerebral e do córtex motor (CONRAD; PFAFF, 1976; MOGENSON et al., 1983; SWANSON et

al., 1984) enquanto que o hipotálamo recebe vias eferentes laterais da APOM, área esta que é sítio de ação de hormônios esteroidais para a indução do CM (NUMAN et al., 1977; CHIBA; MURATA, 1985).

O presente trabalho iniciou-se com o estudo de expressão gênica dos receptores de opióides em regiões cerebrais distintas. O estudo envolveu os tratamentos agudo e prolongado com duas doses de morfina. Tal abordagem farmacológica permitiu a avaliação dos efeitos da estimulação simultânea dos vários tipos de receptores opióides do ponto de vista semi-quantitativo (Parte 1). Os resultados encontrados no Experimento 1 servem como referência do *status* desses receptores, avaliando sua atividade em um ambiente livre de tratamentos farmacológicos ou agentes estressantes. Comparando o nível de expressão da *β*-actina, considerado como o gene de expressão constitutiva, na PAG tem-se a densidade das bandas dos genes *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd11* em ordem de grandeza decrescente. No estriado observa-se a densidade em ordem decrescente em *Oprd1*, *Oprm1* e *Oprk1*, enquanto no hipotálamo observa-se densidade de *Oprk1*, *Oprd1* e *Oprm1*. Estes resultados são consistentes com os descritos na literatura, pois sabe-se que na PAG de ratas há um grande número de receptores opióides do tipo μ, seguido dos receptores κ e δ em menor número e ainda, há menor densidade desses receptores no estriato e hipotálamo quando comparados com a PAG (MANSOUR et al., 1994). Desse modo, os resultados obtidos para o padrão de expressão poderiam sugerir que, se um gene tem maior expressão em situação normal, possivelmente transcreve RNAm em maior quantidade o qual é traduzido em proteínas e que reverte em maior quantidade de receptores formados.

Também foi interessante obter resultados confrontando a expressão gênica dos receptores opióides em animais que receberam agudamente sulfato de morfina ou solução salina. Não se conhecia até o momento se a administração sistêmica e aguda de morfina seria suficiente para promover algum tipo de alteração na expressão gênica desses receptores.

Os resultados apresentados no Experimento 2 refletem que o tratamento agudo dos animais com sulfato de morfina a 3,5 mg/kg não foi suficiente para promover diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e evidenciou a diferença entre as três regiões analisadas. Assim, constatou-se que há maior densidade de RNAm para receptores μ na PAG, seguido de estriado e hipotálamo, maior densidade de receptores δ no estriado, seguido de PAG e hipotálamo e densidade significativa de

receptores κ no hipotálamo, seguido de PAG e estriado (MANSOUR et al., 1994). Esses conhecimentos fornecem indícios de que, provavelmente, a quantidade de RNAm nessas regiões seja maior de acordo com o tipo de receptor que é mais abundante e isso poderia revelar maior quantidade de transcritos caso o gene seja ativado pelo tratamento farmacológico.

A morfina é um agonista opióide que possui afinidade 1000 vezes maior para o receptor μ quando comparado com os outros dois tipos de receptores. Consistentemente os resultados do Experimento 2 com o tratamento na dose de 20 mg/kg, evidenciam uma pequena diminuição na expressão do gene *Oprm1* na PAG, embora também ocorra certo grau de interação com os receptores κ e δ, porém não o suficiente para promover diminuição da expressão dos genes que codificam para esses receptores. A não ocorrência de alterações no padrão de expressão de *Oprk1* e *Oprd1* pode decorrer do fato de que o tempo estabelecido entre injeção e decapitação não teria sido suficiente para promover tais diferenças ou simplesmente porque apenas uma injeção aguda não teria a capacidade de alterar de modo claro a resposta desses receptores.

Os resultados do Experimento 3 sugerem que o tratamento crônico com 3,5 mg/kg de sulfato de morfina promoveu diminuição na expressão dos genes *Oprm1* e *Oprk1* na PAG e estriado. Sabe-se que o tratamento repetido com drogas opioidérgicas leva a um processo de down-regulation de receptores e posteriormente à up-regulation, característica do período de abstinência em que o organismo busca a droga (CASTELLI et al., 1997; PAK et al., 1999). O fenômeno de down-regulation geralmente é caracterizado por diminuição do padrão de expressão de certos genes, já que não são transcritos os RNAms que levariam à formação dos receptores. A princípio esta poderia ser a explicação para a diminuição no padrão de expressão dos genes referidos.

Conhecendo-se agora um pouco mais sobre os padrões de expressão dos genes alvo e sabendo-se que o tratamento com sulfato de morfina pode promover alterações de expressão em certos distritos cerebrais, os experimentos seguintes foram desenhados com o objetivo de avaliar a expressão dos referidos genes na PAG durante períodos críticos determinados ao longo da gestação e lactação. Essa abordagem permitiu que fosse testada a hipótese de que o estado fisiológico das fêmeas envolveria a modulação da expressão dos genes que codificam para os diferentes tipos de receptores opióides. Esses estudos foram conduzidos utilizando-se técnicas e

equipamentos mais modernos para a avaliação expressão gênica em tempo real, aliados ainda a estudos quantitativos de cada proteína resultante da ativação de respectivo gene (Parte 2).

Assim, investigou-se inicialmente o padrão de expressão do genes *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1* na PAG de ratas em diferentes estados fisiológicos. O Experimento 4 foi feito para avaliar como esses genes se comportam durante as fases do ciclo estral. Não se observou alteração na expressão de nenhum dos genes tanto durante o proestro como no diestro, embora um significativo aumento de *Oprm1* tenha sido observado no metaestro. O gene *Oprd1* mostra-se com expressão elevada principalmente na fase de estro, parecendo que o aumento no número deste receptor seja fundamental para que ocorra aumento na expressão de *Oprk1* na mesma fase. Parece então que esses dois genes são importantes para a fase sexualmente receptiva nesses animais. Porém, nenhuma alteração nos conteúdos de MOR, KOR e DOR foram observados nas quatro fases que compreendem o ciclo estral, o que pode sugerir que a expressão dessas proteínas não apresenta relação com as alterações citológicas usadas como indicadoras das diversas fases do ciclo.

Conhecendo-se os padrões de expressão gênica dos receptores opióides nas fases do ciclo estral, partiu-se então para verificar como estes se comportam em animais com diferentes idades. Assim, no Experimento 6 os dados mostram que ratas jovens têm aumento nos níveis de expressão de *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1*, porém quando essas estão com 45, 60, 90, 120, 240 ou 360 os níveis voltam aqueles considerados basais, excetuando-se ratas com 240 dias nas quais observou-se elevação de expressão de *Oprm1*. O fato da expressão de *Oprm1* estar aumentada nas fases não receptivas, como em ratas muito jovens (21 dias, logo após o desmame) e aos 240 dias, idade na qual as fêmeas não são mais acasaladas em condições de biotério, sugere uma possível relação do aumento de expressão deste gene com mecanismos inibitórios da função reprodutiva. Também aos 21 dias foi observado um aumento na expressão dos genes *Oprk1* e *Oprd1*. O desenho experimental não permite avaliar se a alteração da atividade desses genes seria típica da idade ou conseqüência de estímulos externos, pois aos 21 dias os animais são desmamados o que significa um fator estressante. Os dados proteicos (Experimento 7) não revelam diferenças significantes entre os grupos, o que mostra realmente que pode se tratar de alterações no padrão de expressão desses genes de modo pontual e limitante.

Dados na literatura mostram que a quantidade de receptores opióides em ratos jovens varia em relação aos adultos. Os níveis de receptor opióide tipo μ diferem muito quando comparados ratos recém-nascidos com os adultos, sendo que nos primeiros ocorre expressão elevada no estriado (STOLLER et al., 2007). Ainda, sabe-se que o receptor opióide do tipo μ alcança seu pico máximo de densidade entre os 14 e 21 dias em ratos lactantes nas regiões talâmicas e hipotalâmicas (TEMPEL; ESPINOZA, 1992). Esses achados corroboram com este estudo, o qual encontrou grande expressão de *Oprm1* na PAG aos 21 dias de vida.

Em relação aos receptores opióides do tipo κ e δ, sabe-se que estão completamente desenvolvidos e funcionais após o 17º e 21º dias de vidas respectivamente (PETRILLO et al., 1987), fato que também poderia explicar o aumento observado nas expressões dos genes que codificam para esses receptores aos 21 dias de vida.

Uma vez feita a constatação de que o padrão de expressão dos receptores opióidérgicos não se altera aos 90 dias, idade qual ratas são geralmente acasaladas no biotério, foi feito um experimento para investigar se os períodos de gestação ou lactação podem interferir no padrão de expressão desses genes, bem como de seus produtos proteicos. Durante a gestação, o número de receptores opióides tipo μ na APOM aumenta, enquanto que durante a lactação esse número é reduzido (HAMMER; BRIDGES, 1987). Ainda, não existem dados sobre a atividade desses receptores na PAG de roedores, bem como o padrão de expressão dos genes que codificam para esses receptores. Assim, no Experimento 8 foram avaliados os níveis de expressão dos três genes em diferentes fases da gestação. Sabe-se que durante os primeiros dias de gestação, qualquer alteração no ambiente hormonal materno pode elevar a porcentagem de perda pós-implantação. Por volta do 14º dia de gestação, essas alterações fisiológicas nas mães podem acarretar em prejuízos físicos nos filhotes, já que durante essa fase ocorre a maturação dos órgãos internos, incluindo todos os sistemas, bem como o desenvolvimento completo de membros. Finalmente, nos dias finais que antecedem o parto, ocorre a maturação do SNC, que se inicia por volta do 17º dia gestacional e se estende até 10 dias pós-parto (HARBISON, 1975).

Desse modo, qualquer alteração na mãe pode acarretar em prejuízos para a prole, os quais muitas vezes são detectados apenas na idade adulta, como é o caso dos efeitos tardios de algumas drogas de ação central sobre o comportamento sexual

das proles. Alterações no ambiente materno durante o terço final da gestação podem prejudicar a sensibilização do hipotálamo em fetos machos devido ao bloqueio da primeira grande liberação de testosterona e, conseqüentemente, prejudicar o comportamento sexual na idade adulta. O mesmo pode ocorrer para as proles femininas (TEODOROV et al., 2002, 2005, 2006).

Em relação à expressão de *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1*, os dados mostram que ocorre um aumento da expressão de *Oprk1* particularmente no 21º dia de gestação. Observou-se um aumento, embora não estatisticamente significante, também foi observada no 14º dia gestacional. Assim, comparado aos demais genes, o aumento da expressão de *Oprk1* parece ser característico do terço final da gestação. A observação atenta de *Oprm1*, o qual é tido na literatura como sendo o principal gene do sistema opioidérgico envolvido com os aspectos fisiológicos da gestação e lactação, bem como com o CM propriamente dito, não revelou alterações nos níveis de expressão.

A estrutura aqui estudada, a PAG, é conhecidamente relacionada aos sistemas de dor. Deve-se atentar para o fato do sistema opioidérgico ser principalmente um sistema de antinocicepção, ou seja, envolvido diretamente com processos de bloqueio de dor, os quais ocorrem naturalmente como conseqüência do parto. Assim, é curioso verificar uma tendência a diminuição gradual de *Oprm1*, a qual se acentua particularmente no 21º dia gestacional, praticamente no dia do parto. Esses dados possuem similaridade com os achados para APOM (HAMMER; BRIDGES, 1987). De acordo com os autores a diminuição de receptores μ na APOM antes do parto poderia ser parte do processo de indução do CM nas fêmeas. Como a estimulação opioidérgica na PAG facilita a expressão do comportamento de caçar em substituição ao de cuidar dos filhotes (SUKIKARA et al., 2006) talvez a tendência a reduzir a expressão do gene que codifica para o receptor tipo μ na PAG antes do parto também faça parte do conjunto de ajustes do sistema opioidérgico para permitir a expressão do CM.

Uma interpretação alternativa desses resultados é a de que o aumento de *Oprk1* funcionaria como um sistema compensatório de modo a corrigir a diminuição de *Oprm1*, durante o período em que o parto se aproxima. Isso faria com que a rata tivesse um aumento do limiar de dor sem prejuízo do CM. Os dados de conteúdos protéicos revelaram não existir diferenças entre os mesmos.

Os experimentos que avaliaram a expressão de *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* durante diferentes períodos da gestação mostraram que ocorre um aumento da expressão de

Oprk1 particularmente no 21º dia de gestação. Interessante, portanto, saber como estaria a expressão desses genes durante a lactação, conforme delineado no Experimento 10.

Curiosamente, o único gene com expressão aumentada foi *Oprk1* e particularmente ao final da lactação (14º e 21º dia). Sabe-se que após o desmame a rata costuma tornar-se receptiva sexualmente. Assim, o aumento de *Oprk1* observado ao desmame é consistente com os achados do Experimento 4, onde embora não se tenha observado aumento de nenhum gene durante a fase de proestro, houve um significativo aumento de *Oprk1* na fase de estro, período no qual ocorre a atividade sexual.

Desse modo, os resultados obtidos para o padrão de expressão poderiam sugerir que, se um gene tem maior expressão em situação normal, possivelmente transcreve RNAm em maior quantidade, o qual é traduzido em proteínas o que resulta em maior quantidade de receptores formados. Neste caso, esta hipótese foi confirmada por Western Blot (Experimento 11), no qual observou-se elevação no conteúdo de KOR quando comparados aos demais produtos.

Considerando-se as fases da vida da rata e levando-se em consideração principalmente fatores fisiológicos e reprodutivos, foi desenhado um experimento para avaliar o efeito da experiência reprodutiva nos padrões de expressão gênica de *Oprm1*, *Oprd1* e *Opk1*.

No Experimento 12 foram analisadas as diferenças de expressão dos genes em ratas com uma gestação (primíparas) ou com 3 e 5 gestações (multíparas) comparadas com ratas virgens. Ocorreu um aumento da expressão de *Oprm1* e *Oprk1* nas multíparas com 5 gestações, sugerindo que a experiência reprodutiva altera o padrão de expressão dos genes que codificam para os receptores opióides. A princípio esses dados são conflitantes com alguns descritos na literatura, onde se aponta para diminuição de expressão de genes opioidérgicos durante a lactação. Porém, cabe lembrar que esses resultados foram obtidos não se levando em conta o período lactacional, e sim, o número de gestações e os padrões de expressão na PAG. Estes dados podem estar relacionados com diferenças funcionais que resultariam aumento do limiar de dor de acordo com a experiência reprodutiva. Assim, uma hipótese a ser testada futuramente seria a de um envolvimento da adaptação dos receptores opióides

na PAG no contexto de quanto maior a experiência reprodutiva, maior o limiar para dor nesses animais.

Levando-se em conta os achados de expressão gênica anteriormente encontrados, observa-se que ratas multíparas com 5 gestações têm aumento na expressão dos genes *Oprm1* e mais significativamente em *Oprk1*, enquanto que em *Oprd1* encontra-se relativa diminuição de expressão, embora não estatisticamente significante. Pode-se considerar, portanto, que quanto mais experiência reprodutiva o animal tem, maior é a expressão de genes ligados a aspectos comportamentais, particularmente *Oprk1*; neste cenário parece que o aumento de expressão de *Oprm1* concomitantemente à pequena diminuição de *Oprd1* mostra-se mais como um efeito modulador e compensatório entre esses dois receptores, enquanto que *Oprk1* é altamente ativado nessas situações. O padrão protéico (Experimento 13) seguiu a mesma orientação, na qual houve diminuição significativa do conteúdo DOR, sendo que quanto mais experiente em termos reprodutivos a rata é, maior a diminuição dessa proteína. O aumento observado em KOR é esperado, porém, interessante foi o aumento de MOR em situações extremas, sendo em primíparas ou em multíparas com 5 gestações, em níveis praticamente semelhantes. Acredita-se que esses receptores sejam importantes como moduladores do comportamento, inclusive do maternal. Assim, talvez o aumento observado seja apenas modulador em relação à diminuição de DOR.

Uma vez concluídos os experimentos com ênfase na modulação fisiológica dos padrões de expressão dos genes dos receptores, o estudo teve seqüência com uma série de experimentos que visou avaliar o papel de fármacos e sua capacidade em alterar os padrões moleculares, além dos comportamentais.

Não se conhecia até o momento se administrações sistêmicas aguda ou crônica de agonistas seletivos ou não para receptores opióides seriam suficientes para promover algum tipo de alteração na expressão gênica. Assim, nos Experimentos 14 e 15 observou-se esse padrão em ratas adultas e virgens, para que fossem descartadas possíveis alterações provenientes do estado reprodutivo.

É conhecido que a morfina é um agonista opioidérgico que se liga preferencialmente aos receptores μ, embora também se ligue aos outros receptores opioidérgicos. Já o U69593 é um agonista seletivo para receptores opióides tipo κ e não promove reações de ligação cruzada com os demais receptores. Importante salientar

que, embora existam agonistas seletivos para receptores opióides tipo μ e δ, sendo respectivamente DAMGO e DPLPE conforme relatado na introdução deste trabalho, optou-se por não apresentar os dados com esses agonistas pois os mesmos não atravessam a barreira hematoencefálica, o que poderia comprometer a discussão dos resultados e o real papel dos fármacos em aspectos moleculares e, principalmente, no tocante ao CM.

Assim, esse experimento foi realizado a fim de se entender melhor como a ativação de um só tipo de receptor opióide sendo κ, ou a ativação concomitante também dos demais μ e δ pelo tratamento com morfina, poderia modular a expressão gênica e os níveis proteicos, para comparação destes mesmos estudos em ratas no período da lactação.

Observa-se que somente o tratamento agudo com sulfato de morfina na dose de 20,0 mg/kg foi capaz de diminuir a expressão de *Oprm1* e *Oprk1*, enquanto que a administração de U69593 aumentou os padrões de expressão de *Oprk1* (Experimento 14), sem alterações nos conteúdos proteicos, o que poderia ser explicado justamente pelo tratamento agudo, não sendo oferecido tempo suficiente para que qualquer alteração fosse promovida (Experimento 15). Por outro lado, observa-se que o tratamento prolongado com sulfato de morfina foi capaz de diminuir a expressão de *Oprm1*, enquanto que o mesmo tratamento com morfina e também U69593 promoveu aumento de expressão de *Oprk1* (Experimento 16). Não foram detectadas alterações nos conteúdos proteicos (Experimento 17) nesses casos. Desta maneira, os dados negativos em termos proteicos podem ser devido ao período de administração não promover ainda fenômenos moleculares.

Sabe-se que o tratamento repetido com drogas opioidérgicas leva a um processo de down-regulation de receptores e posteriormente à up-regulation, característica do período de abstinência em que o organismo busca a droga (CASTELLI et al., 1997; PAK et al., 1999). O fenômeno de down-regulation geralmente é caracterizado por diminuição do padrão de expressão de certos genes, já que não são transcritos os RNams que levariam à formação dos receptores. Porém nestes experimentos, foram avaliados os resultados de exposições às drogas, o que acarretou em aumento dos níveis de expressão gênica, mas não necessariamente em aumento na quantidade de proteína traduzida para formar cada tipo de receptor, fortalecendo a hipótese de uma

relação causal de aumento de expressão gênica com aumento do número de receptores.

Já que são agora conhecidos os dados moleculares em ratas virgens, seguiu-se com os experimentos que levam em consideração o estado reprodutivo (a lactação), além também de avaliações comportamentais. Partiu-se dos estudos de Mann et al. (1991), que injetaram intracerebroventricular (i.c.v.) agonistas seletivos para cada tipo de receptor opióide em ratas lactantes e observaram que somente os agonistas para o receptor μ foram capazes de inibir o CM, enquanto que os efeitos sobre os demais receptores opióides não foram investigados .

Não se conhecia até o momento se a administração sistêmica e aguda de agonistas seletivos ou não para receptores opióides seria suficiente para promover algum tipo de alteração no CM. Assim, de acordo com os dados do Experimento 18, pode-se observar que antes dos tratamentos agudos, não houve alterações em relação ao padrão de ninho entre os animais (Tabela 1). Isso é importante, pois se parte do princípio de que todos os animais se enquadravam em padrões comportamentais similares. Caso algum animal não estivesse cuidando dos filhotes, o mesmo teria sido descartado para que não houvesse interferências nos resultados. Assim, qualquer alteração comportamental observada foi interpretada como sendo decorrente do tratamento farmacológico.

Os dados referentes à avaliação dos parâmetros do CM mostraram que o tratamento agudo com morfina bloqueou o CM no período total de avaliação, enquanto que os agonistas seletivos para μ, δ e κ foram eficientes apenas em prejudicar o CM nos parâmetros finais. Isso mostra que, uma vez iniciado o CM, os agonistas seletivos para esses receptores não conseguem bloquear todos os parâmetros do CM. Observa-se apenas uma tendência sem significância estatística de que essa droga começa a aumentar as latências para busca do 7° e do 8° filhote, bem como agrupamento, “crouching” e comportamento materno total (CMT). Já a morfina inibe o CM como um todo (Tabela 3), inclusive prejudicando a auto-limpeza e a limpeza dos filhotes (Tabela 2), sabidamente importante para os padrões sexuais secundários e liberações hormonais dos neonatos.Esse fenômeno pode dever-se ao fato dessa droga se ligar aos três tipos principais de receptores opioidérgicos.

Também é verdade que não se conhecia até o momento se a administração sistêmica e aguda de agonistas seletivos ou não para receptores opióides seria

suficiente para promover algum tipo de alteração na expressão gênica. Esses estudos foram então melhor avaliados no Experimento 19, onde observou-se os níveis de expressão dos genes *Oprm1*, *Oprk1* e *Oprd1* em mães que foram tratadas agudamente no 5º dia de lactação com salina, morfina ou U69593.

Os dados mostraram que em relação ao tratamento com morfina, esse foi eficiente apenas em promover aumento de expressão de *Oprk1*. Assim, mais uma vez o gene *Oprk1* mostra-se mais sensível ao tratamento farmacológico aliado ao estado reprodutivo, aqui no caso o lactacional + CM, dados mais robustos quando os animais são tratados com U69596. Muitos estudos da literatura apontam o processo de heterodimerização para explicar dados similares. Gomes et al. (2004) estudaram processos da formação de dímeros de receptores opióides μ e δ no aumento da analgesia promovida pela morfina.

Esses dados apontam que ocorre a formação desses dímeros quando os receptores encontram-se na superfície das células, e que a ligação de morfina no receptor δ potencializou os efeitos analgésicos de μ. Porém, quando da internalização desses complexos, ocorria rápida degradação e novos receptores eram formados. Até o momento não são conhecidos os processos que levam a formação de homo ou heterodímeros. Desse modo, pode-se interpretar os resultados obtidos em nosso experimento como uma possível ocorrência de heterodimerização de receptores μ e κ, o que acarretaria em aumento nos níveis de expressão de *Oprk1* quando do tratamento com uma droga mais seletiva para μ, no caso a morfina.

No experimento 20 foi avaliado a qualidade/quantidade protéica de animais que sofreram tratamento agudo com salina, sulfato de morfina ou U69593 ao 5º dia de lactação. Como apresentado no Experimento 19 o tratamento com morfina e U69593 fez aumentar a expressão de *Oprk1*. Na avaliação de proteínas por meio da técnica de western blot, verificou-se que o tratamento com sulfato de morfina foi capaz de aumentar o conteúdo protéico de MOR e diminuir o de KOR, sem alterações nos níveis de DOR. Esses achados são interessantes e conflitantes e algumas hipóteses podem ser aqui formuladas.

O fato de ocorrer aumento de conteúdo protéico de MOR, proteína traduzida a partir do transcrito de *Oprm1*, somente nos animais tratados com sulfato de morfina poderia indicar que realmente esse agonista não específico. Como já descrito, sabe-se que a morfina se liga com maior afinidade em receptores opióides do tipo μ, e isso

poderia alterar o padrão de ativação em cascata dos processos de transcrição e tradução, já que os dados de expressão gênica apontaram que o tratamento agudo com a morfina aumentou a expressão deste gene mas sem diferenças estatisticamente significantes. Assim, pode-se questionar se a ativação gênica promovida por morfina não foi detectada devido ao tempo transcorrido entre administração do fármaco, análises comportamentais seguida das análises moleculares, sendo esse efeito observado apenas no produto proteico.

Esses resultados podem então ser interpretados como uma ação aguda e marcante do tratamento com sulfato de morfina, porém com efeitos muito rápidos, já que somente foi possível observação de alterações proteicas. Talvez um tratamento mais prolongado poderia refletir diretamente na ocupação dos receptores opióides, também explicando a diminuição de atividade gênica no sentido de produzir novos receptores.

Por outro lado, a expressão gênica de *Oprd1* não foi alterada com nenhum tratamento farmacológico agudo. A ativação farmacológica parece ser no sentido de aumento da leitura do transcrito, já que este provavelmente deve ser de vida longa.Assim, um RNAm transcrito a partir de *Oprd1* pode ser inúmeras vezes lido pelos ribossomos e uma quantidade significante de proteínas (receptores) ser produzidas, sem no entanto produzir ativação gênica. Outro fato que conta em favor dessa hipótese é de que os tratamentos com U69593 (agonista seletivo para receptor opióide do tipo κ) e sulfato de morfina diminuíram a quantidade de DOR, provavelmente sendo ativados outros receptores mais ligados a comportamentos reprodutivos.

Ainda, a diminuição do produto KOR somente pelo tratamento com morfina refletem os achados de expressão gênica de *Oprk1*, na qual todos os tratamentos promoveram ativação do mesmo. O aumento de expressão de *Oprk1* promovido por morfina e U69593 parece ser um efeito compensatório e auto-limitante, assim o produto KOR nesses casos apresenta-se diminuído.

Todos os resultados obtidos até o momento são importantes para que se conheça melhor como os genes que codificam para os receptores opióides na PAG alterariam essa expressão de acordo com o estado fisiológico, respondem diferentemente a determinados tratamentos farmacológicos. Além disso, procurou-se correlacionar as diferenças de expressão gênica com aspectos comportamentais. Desse modo, poderia-se especular se a modulação molecular em nível de pré-tradução

reverteria os dados encontrados até o momento tanto no âmbito de expressão gênica quanto comportamental para os tratamentos com agonistas seletivos. A partir de então, foram delineados experimentos que aliaram tratamentos crônicos e desafios com sulfato de morfina ou U69593 para investigação de possíveis fenômenos de sensibilização, bem como seu papel no CM e biologia molecular dos receptores.

Assim, no Experimento 21 foram avaliados os efeitos do tratamento crônico com sulfato de morfina ou U69593 no CM ao 5º dia de lactação, principalmente estudando-se o cenário da sensibilização comportamental, já que esses animais sofreram tratamento com as drogas do 17º ao 21º dia de gestação, passaram por um período de abstinência e, ao 5º dia de lactação receberam uma dose desafio (menor que aquela administrada durante a sensibilização).

A morfina tem sido considerada como o protótipo do estimulante opioidérgico. Seus efeitos envolvem as esferas fisiológica, bioquímica e farmacológica, com implicações terapêuticas e toxicológicas (BODNAR; HADJIMARKOU, 2002). O estímulo opioidérgico parece alterar sistemas sensoriais com importantes conseqüências comportamentais na reprodução de mamíferos (MANN et al., 1995; MIRANDA-PAIVA, 2003, YIN JUNIOR, 2001). Neste contexto, sua interação com outros peptídeos é de alta relevância (FELICIO et al., 1991; MIRANDA-PAIVA; FELICIO, 1999; MIRANDA-PAIVA et al., 2002). Além disso, um fenômeno do tipo sensibilização foi descrito para inibição do comportamento maternal pela morfina (MIRANDA-PAIVA et al., 2001, 2003). A interação multi-peptidérgica também se mostrou relevante no contexto da sensibilização à morfina em camundongos (FELICIO et al., 2001).

Um fator crucial para o desenvolvimento da sensibilização comportamental é o regime temporal de aplicação do fármaco (VANDERSCHUREN et al., 1997). Assim, administrações repetidas de morfina em intervalos menores do que 12 horas podem induzir tolerância. Porém, estudos mostram que a administração crônica de sulfato de morfina (3,5 mg/kg) e U69593 (0,15 mg/kg), nessas doses são suficientes para promover aumento de atividade locomotora em ratas adultas, sem promover estereotipia sendo, portanto, essas as doses escolhidas para o estudo (TEODOROV et al., 2008). Ainda, no contexto do CM, essas mesmas doses foram eficientes em alterar o CM de ratas no 5º dia de lactação, porém o tratamento com os agonistas seletivos ou não para os receptores opióides foi realizado antes do acasalamento. Assim, não se

conhecia ao certo os efeitos dos tratamentos com as doses descritas durante o terço final da gestação.

Assim, nos resultados do Experimento 21 mostram mais uma vez que a morfina é suficiente para inibir o CM, independente do tratamento prévio, mas outros resultados foram interessantes. O pré-tratamento seguido de desafio com U69593 (grupo kk) promoveu prejuízo no CM similar aos encontrado no grupo MM, porém quando do desafio com morfina esse efeito foi parcialmente revertido, sendo esse prejuízo somente observado nos parâmetros iniciais do CM. Corrobora com esses resultados o fato do pré-tratamento com agonista para receptor do tipo κ seguido do desafio com salina não apresentar alterações de comportamento.

Também em relação aos cuidados com os filhotes, observou-se que as mães do grupo MM apresentaram prejuízo nos parâmetros de lamber a área ano-genital (Tabela 6), porém não foram observadas alterações na formação de ninho (tabela 5), o qual antecede a administração de dose desafio. Assim, possivelmente quando da observação do parâmetro construção de ninho, o efeito das drogas já havia terminado, por processos de metabolização e excreção urinária, dados comprovados pela ocorrência de comportamento maternal total em todos os grupos avaliados (Tabela 7).

Esses resultados parecem revelar que a morfina, independentemente do pré-tratamento, prejudica substancialmente o CM, e que ainda evidencia a necessidade de ativação dos 3 subtipos de receptores opióides para o bloqueio completo do CM.

A expressão gênica revelou que os animais dos grupos MM e Mk apresentaram redução nos níveis de *Oprm1*, enquanto que aumento significativo foi observado em animais MM em relação aos níveis de *Oprk1* (Experimento 22). Já em relação aos produtos protéicos, o Experimento 23 revelou mais uma vez que os níveis de MOR encontram-se reduzidos nos animais SM e MM.

Parece então que de fato os fatores tratamento prolongado x desafio x lactação são imprescindíveis para os resultados moleculares observados até o momento, e que a morfina tem se mostrado importante em animais que recebem agonistas seletivos no pré-tratamento. Tomados em conjuntos, os dados referentes à biologia molecular dos genes *Oprm1*, *Oprd1* e *Oprk1* na PAG de ratas, podem também ser explicados em outros paradigmas.

Décadas de pesquisa têm focado em estudos para compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos do uso de drogas como a morfina

a longo-prazo, o que auxilia no desenvolvimento de analgésicos mais eficientes e seguros para o tratamento de dores crônicas. A tolerância e a dependência são respostas fisiológicas complexas que envolvem a adaptação em muitos níveis do SNC bem como em tecidos periféricos. Entretanto, muitas destas adaptações são eliciadas pela ativação de receptores opioidérgicos por ação da morfina (MARTINI; WHISTLER, 2007). Nos experimentos comportamentais não foram observados processos de sensibilização, já que parece que apenas uma dose aguda de morfina, independentemente do tratamento prévio, resultou em prejuízo do CM. Observa-se que o tratamento com U69593 prejudicou o CM nos parâmetros finais, enquanto que o tratamento com morfina inibe completamente o CM.

Os receptores opióides são expressos na membrana celular e convertem as mensagens de ligantes extracelulares em sinais intracelulares. A magnitude da transdução de sinal de um complexo “receptor-ligante” é controlada por muitos fatores que incluem propriedades do próprio ligante como afinidade, potência, eficácia, biodisponibilidade e tempo de meia-vida. Juntos, esses fatores constituem a chamada atividade relativa (MARTINI; WHISTLER, 2007). Ainda, a magnitude da sinalização através do receptor-ligante também parece ser controlada pelo tempo no qual o receptor opióide permanece acoplado à proteína G e pode ser regulada pelo nível de desensibilização e por processos de endocitose.

Muitas kinases se mostram implicadas na desensibilização dos receptores opióides mediada por ligantes, como a proteína kinase C (PKC), proteína kinase A (PKA), tirosina kinase e proteína G ligada a receptor kinase (GRKs). Os receptores fosforilados pela GRK recrutam beta-arrestinas e essa ação possui múltiplas funções como desacoplamento do receptor da proteína G, padrões de transdução de sinal e facilitação de processos de endocitose dos receptores (ou tolerância). Interessante notar que receptores fosforilados pela PKC tornam-se resistentes aos processos de endocitose/tolerância.

Estudos mostram que a desensibilização dos receptores opioidérgicos, particularmente do tipo μ, ocorre rapidamente após administrações repetidas de doses analgésicas, ou ainda, após uma dose aguda de morfina (GÁRZON et al., 2002). Os receptores opióides, quando ligados a drogas agonistas, são inativados por proteínas G regulatórias. Esta inativação envolve proteína G ligada a receptor kinase (GRK) que fosforila resíduos de serina/treonina no receptor. Esta modificação capacita as beta-

arrestinas de se ligarem a estes resíduos, levando aos processos de endocitose (LEFKOWITZ; SHENOY, 2005). Estes achados explicariam a diminuição nos níveis de expressão gênica de *Oprm1* bem como a diminuição nos conteúdos de MOR em todos os experimentos que aliaram também as avaliações comportamentais

Ligantes opióides endógenos, as encefalinas e endorfinas, possuem grande potência e eficácia na formação de complexos com os receptores, porém são induzidos os processos de endocitose e desensibilização. Não está ainda bem esclarecido como a maquinaria de endocitose funcionaria, mas estudos mostram que possivelmente uma certa quantidade de subunidades Gβγ serem liberadas das proteínas Gαi para efetivamente recrutar os processos de endocitose.

Assim, cada vez que uma droga opióide é utilizada, muitas propriedades de receptores-ligantes parecem ser alteradas. Cada uma dessas propriedades tem uma contribuição diferente para atingir o sinal transmitido para a célula, com ligantes endógenos, presumivelmente proporcionando um equilíbrio de cada um dos componentes.

Ainda não é claro como a morfina não promove a completa desensibilização do receptor, bem como a retirada desta droga causa sinais de dependência, uma clara identificação de que a transdução de sinal do receptor está acontecendo na presença da droga. Além disso, é pouco compreendido como a morfina induz forte tolerância, já que a mesma falha em promover significantes processos de internalização de receptores. Foi observado em cultura de células que a morfina produz um transporte de membrana de receptores do tipo μ nos dendritos do núcleo accumbens (HABERSTOCK-DEBIC et al., 2003), e que ocorreu uma internalização mais expressiva deste mesmo tipo de receptor opióide em neurônios da PAG após repetidas administrações.

Também é conhecido que o tratamento crônico com morfina produz um up-regulation compensatório dos níveis de AMPc, superexpressando-o em várias regiões cerebrais como locus coeruleus, VTA, núcleo accumbens e amígdala (TERWILLIGER et al., 1991; AVIDOR-REISS et al., 1996; NESTLER, 1996; BONCI; WILLIAMS, 1997). Alterações celulares que ocorrem durante a superativação de AMPc incluem aumento da expressão de certas adenilil ciclases, PKA e CREB (NESTLER 2001; WILLIAMS et al., 2001) e que a endocitose dos receptores pode reduzir este up-regulation compensatório (FINN; WHISTLER, 2001).

Bilecki et al. (2000) mostraram em estudo *in vitro* utilizando DPLPE que este tratamento aumentou marcantemente a fosforilação de CREB na posição 133 da serina, mostrando que receptores opióides do tipo μ e δ são mais eficientes nestes padrões de fosforilação, caso não observado para o receptor do tipo κ (KIEFFER; GAVÉRIAUX-RUFF, 2002). Estes dados podem explicar o por que de em todos os experimentos os níveis de *Oprk1* e os conteúdos de KOR estarem significantemente aumentados.

Em neurônios da PAG, que é sabidamente uma importante estrutura para a analgesia mediada por opióides (YAKSH et al., 1976), os receptores opióides estão associados com uma série de reguladores das proteínas G sinalizadoras (RGS) como a RGS4. Rodriguez-Munoz et al. (2007) mostraram que RGS4 controla a fosforilação e internalização de receptores opióides tipo μ na PAG de ratos que receberam morfina i.c.v. e neste mesmo estudo os autores revelaram que a associação de receptor opióide μ e beta-arrestinas foi diminuída com o tratamento com morfina, dados que corroboram com os achados neste estudo.

É importante que ocorra a reciclagem dos receptores que foram internalizados na membrana plasmática após a ligação com seu agonista, já que é necessária a volta da resposta às sucessivas administrações de agonistas. Entretanto, o equilíbrio entre a fração daqueles receptores que sofreram endocitose dos que são efetivamente degradados por enzimas proteolíticas nos lisossomos, além daqueles que são novamente sintetizados poderiam determinar efetivamente a resposta da droga agonista (TANOWITZ; VON ZASTROW, 2003). Isso explicaria os dados dos experimentos agudos, nos quais foram poucas as alterações nos níveis de expressão gênica. Assim, os processo de regulação dos receptores opióides por endocitose serviriam como papel protetor na redução do desenvolvimento de tolerância as drogas opióides, especificamente por que esses mecanismos que regulam a sinalização celular voltam rapidamente aos seus padrões iniciais (HE et al., 2002).

Porém, cabe lembrar que os processo de endocitose para receptores opióides na presença de morfina somente ocorrem após superexpressão das beta-arrestinas. Talvez estudos que avaliem os conteúdos de beta-arrestina na PAG pudessem elucidar essa questão.

Finalmente, os receptores opióides são altamente recicláveis, portanto recrutam as arrestinas e sofrem os processos de endocitose, porém são rapidamente resintetizados. Assim, essa situação é transitória. Explica-se, portanto, que o

tratamento com a morfina, independentemente do pré-tratamento, prejudica o CM, diminui a expressão de *Oprm1* e MOR e aumenta substancialmente a expressão de *Oprk1*, o que teria um papel fisiológico/modulatório importante na PAG. Assim, é possível que a ação de μ encontre-se inibida para que κ possa atuar. Ainda, a ativação do receptor tipo κ mostra ser importante para comportamentos não diretamente ligados aos filhotes, como construção de ninho e forrageamento (PERREAULT et al., 2007), mas que quando excessivamente ativado, acaba comprometendo o sucesso do CM.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

1- Os padrões de expressão gênica e conteúdos protéicos dos receptores opióides μ, δ e κ na PAG alteram-se de acordo com o estado fisiológico e reprodutivo de ratas;

2- Em ratas virgens, a morfina administrada aguda ou cronicamente foi capaz de alterar os padrões de expressão gênica de receptores opióides μ e κ, sem no entanto alterar os conteúdos protéicos;

3- Em ratas lactantes, o tratamento agudo com morfina inibiu totalmente o CM, além de alterar os padrões moleculares;

4- Em ratas lactantes, o desafio com morfina inibiu completamente o CM, bem como alterou os padrões de expressão gênica e conteúdos protéicos, independentemente do tratamento prolongado prévio com agonistas para receptores opióides.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ABOOD, M.E.; NOEL, M.A.; FARNSWORTH, J.S.; TAO, Q. Molecular cloning and expression of a delta-opioid receptor from rat brain. **J. Neurosci. Res**., v., 37, p.714-719, 1994.

AVIDOR-REISS, T.; NEVO, I.; LEVY, R.; PFEUFFER, T.; VOGEL, Z. Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Ggammabeta. J**. Biol. Chem**., v.271, p.21309-21315, 1996.

BABBINI, M.; DAVIS, W.M. Time-dose relationships for locomotion activity effects of morphine after acute or repeated treatment. **Br. J. Pharmacol**., v. 46, p. 213-224, 1972.

BANDLER, R.; SHIPEY, M.T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trends. Neurosci**., v. 17, p. 379-389, 1994.

BARTOLETTI, M.; GAIARDI, M.; GUBELLINI, G.; BACCHI, A.; BABBINI, M. Long-term sensitization to the excitatory effects of morphine. A motility study in post-dependent rats. **Neuropharmacol.**, v. 22, p. 1193-1196,1983.

BECKSTEAD, R.M.; DOMESICK, V.B.; NAUTA, W.J.H. Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. **Brain Res**., v.175, p.191-217, 1979.

BILECKI, W.; HÖLLT, V.; PRZELOCKI, R. Acute delta-opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG108-15 cells. **Eur. J. Pharmacol**., v. 390, p. 1-6, 2000.

BODNAR, R.J.; HADJIMARKOU, M.M. Endogenous opiates and behavior: 2001. **Peptides**, v. 23, p. 2307-2365, 2002.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BONCI, A.; WILLIAMS, J.T. Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. **J. Neurosci**, v. 17, p. 796-803, 1997.

BRIDGES, R.S.; GRIMM, C.T. Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. **Science**, v.218, p.166-168, 1982.

BRIDGES, R.S.; DIBIASE, R.; LOUNDES, D.D.; DOHERTY, P.C. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. **Science**, v. 15, p. 782-784, 1985.

BRIDGES, R.S.; NUMAN, M.; RONSHEIM, P.M.; MANN, P.E.; LUPINI, C.E. Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated nulliparous female rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 8003-8007, 1990.

BRIDGES, R.S.; FREEMACK, M.S. Human placental lactogen infusions into the medial preoptic area stimulate maternal behavior in steroid-primed, nulliparous female rats. **Horm. Behav**., v. 29, p. 216-226, 1995.

BÚZÁS, B.; COX, B.M. Quantitative analysis of mu and delta opioid receptor gene expression in rat brain and peripheral ganglia using competitive polymerase chain reaction. **Neuroscience**, v. 76, p.479-489, 1997.

BUNZÓW, J.R.; ZHANG, G.; BOUVIER, C.; SAEZ, C.; RONNEKLEIV, O.K.; KELLY, M.J.; GRANDY, D.K. Characterization and distribution of a cloned rat μ-opioid receptor. **J. Neurochem**., v. 64, p.14-24, 1995.

CADONI, C.; DI CHIARA, G. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. **Neuroscience**, v. 90, p. 447-455, 1999.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neural organization. **Behav. Brain Res**., v. 58, p.27-47, 1993.

CASTELLI, M.P.; MELIS, M.; MAMELI, M.; FADDA, P.; DIAZ, G.; GESSA, G.G. Chronic morphine and naltrexone fail to modify μ-opioid receptor mRNA levels in the rat brain. **Mol. Brain Res**., v. 45, p.149-153, 1997.

CHEN, Y.; MESTEK, A.; LIU, J.; YU, L. Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. **Biochem. J**., v. 295, p.625-628, 1993a.

CHEN Y.; MESTEK, A.; LIU, J.; HURLEY, J.A.; YU, L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. **Mol. Pharmacol**., v. 44, p.8-12, 1993b.

CHIBA, T.; MURATA, Y. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. **Brain Res. Bull**., v.14, p.261-272, 1985.

CLARK, J.A.; LIU, L.; PRICE, M.; HERSH, B.; EDELSON, M.; PASTERNAK, G.W. Kappa opiate receptor multiplicity: evidence fot two U50,488-sensitive kappa 1 subtypes and a novel kappa 3 subtype. **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 251, p.461-468, 1989.

COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behav. Brain Res**., v. 138, p. 17-28, 2003.

CONRAD, L.C.A.; PFAFF, D.W. Autoradiographic tracing of nucleus accumbens efferents in the rat. **Brain Res**., v. 113, p. 589-596, 1976.

DE VRIES, L.; ELENKO, E.; HUBLER, L.; JONES, T.L.; FARQUHAR, M.G. GAIP is membrane-anchored by a almitoylation and interacts with the activated (GTP-bound) form of Galpha I subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 15203-15208, 1996.

EGUCHI, M. Recent advances in selective opioid receptor agonists and antagonists. **Med. Res. Rev**., v. 24, p.182-212, 2004.

EVANS, C.J.; KEITH, Jr, D.E.; MORRISON, H.; MAGENDZO, K.; EDWARDS, R.H. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. **Science***,* v. 258, p.1952-1955, 1992.

FALLON, J.H.; MOORE, R.Y. Catecholamine innervation of the basal forebrain. **J. Comp. Neurol**., v. 180, p. 545-580, 1978.

FANSELOW, M.S. The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (Eds.) **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: functional, anatomical, and neurochemical Organization**. New York: Plenum Press, 1991.

FELICIO, L.F.; MANN, P.E.; BRIDGES, R.S. Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphin induced disruption of maternal behavior. **Pharmacol. Biochem. Behav**., v. 39, p. 201-204, 1991.

FELICIO, L.F.; MAZZINI, B.K.; CACHEIRO, R.G.; CRUZ, T.N.; FLORIO, J.C.; NASELLO, A.G. Stimulation of either cholecystokinin receptor subtype reduces while antagonists potentiate or sensitize a morphine-induced excitatory response. **Peptides,** v. 22, p. 1299-1304, 2001.

FINN, A.K.; WHISTLER, J.L. Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. **Neuron**, v. 6, p. 829-839, 2001.

FUKUDA, K.; KATO, S.; MORI, K.; NISHI, M.; TAKESHIMA, H. Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ-and μ-subtypes. **FEBS**., v. 327, p.311-314, 1993.

GÁRZON, J.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; LÓPEZ-FANDO, A.; GARCÍA-ESPAÑA, A.; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P. Glycosylated phosducin-like protein long regulates opioid receptor function in mouse brain. **Neuropharmacology,**, v. 42, p. 813-828, 2002.

GILBERT P.E.; MARTIN, W.R. Sigma effects of nalorphine in the chronic spinal dog. **Drug Alcohol Depend**., v. 1, p.373-376, 1976.

GOMES, I.; GUPTA, A.; FILIPOVSKA, J.; SZETO, H.H.; PINTAR, J.E.; DEVI, L.A.; A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. **Proc. Natl., Acad. Sci. USA**, v. 101, p. 5135-5139, 2004.

GRIMM, C.T.; BRIDGES, R.S. Opiate regulation of maternal behavior in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav**., v. 19, p.609-616, 1983.

HABER, S.N.; GROENEWEGEN, H.J.; GROVE, E.A. & NAUTA, W.J.H. Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato-pallidorugal pathway. **J. Comp. Neurol**., v. 235, p. 322-335, 1985.

HABERSTOCK-DEBIC, H.; WEIN, M.; BARROT, M.; COLAGO, E.E.; RAHMAN, Z.; NEVE, R.L.; PICKEL, V.M.; NESTLER, E.J.; VON ZASTROW,, M.; SVINGOS, A.L. Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. **J. Neurosci**., v. 23, p. 4324-4332, 2003.

HAMMER, R.P.Jr.; BRIDGES, R.S. Preoptic area opioids and opiate receptors increase during pregnancy and decrease during lactation. **Brain Res**., v. 420, p.48-56, 1987.

HARBISON, R.D. Parathion-induced toxicity and Phenobarbital-induced protection against parathion during prenatal development. **Toxicol. Appl. Pharmacol**., v. 32, p. 482-493, 1975.

HE, L.; FONG, J.; VON ZASTROW, M.; WHISTLER, J.L. Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. **Cell,** v. 108, p. 271-282, 2002.

HENNESSEY, A.C.; CAMAK, L.; GORDON, F.; EDWARDS, D.A. Connections between the pontine central gray and the ventromedial hypothalamus are essential for lordosis in female rats. **Behav. Neurosci**., v. 104, p.477-488, 1990.

HERTZ, D.G. Bio-psycho-social consequences of migration stress: a multidimensional approach. **Isr. Psych. Relat. Sci**., v. 30, p. 20-212, 1993.

HOLSTEGE, G. Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. **J. Comp. Neurol**., v. 284, p.242-252, 1989.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica & Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

KIEFFER, B.L.; BEFORT, K.; GAVERIAUX-RUFF, C.; HIRTH, C.G. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**., v. 89, p.12048-12052, 1992.

KIEFFER, B.L.; GAVÉRIAUX-RUFF, C. Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult male odors in female rats. **Dev. Psychobiol**., v. 23, p. 331-347, 1990.

KINSLEY, C.H.; BRIDGES, R.S. Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult male odors in female rats. **Dev. Psychobiol**., v. 23, p.331-347, 1990.

KINSLEY, C.H.; TURCO, D.; BAUER, A.; BEVERLY, M.; WELLMAN, J.; GRAHAM, A.L. Cocaine alters the onset and maintenance of maternal behavior in lactating rats. **Pharmacol. Biochem. Behav**., v. 4, p.857-864, 1994.

KORNETSKY, C. Brain-stimulation reward, morphine-induced oral stereotypy, and sensitization: implications for abuse. **Neurosci. Biobehav. Rev**., v. 27, p. 777-786, 2004.

KURIBARA, H. Effects of interdose interval on ambulatory sensitization to methamphetamine, cocaine and morphine in mice. **Eur. J. Pharmacol**., v. 28, p. 1-5, 1996.

LEFKOWITZ, R.J.; SHENOY, S.K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. **Science,** v. 308, p. 512-517, 2005.

LI, S.; ZHU, J.; CHEN, C.; CHEN, Y.W.; DERIEL, J.K.; ASHBY, B.; LIU-CHEN, L.Y. Molecular cloning and expression of a rat kappa opioid receptor. **Biochemistry**., v. 295, p. 629-633, 1993.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT). **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONSTEIN, J.S.; STERN, J.M. Somatosensory contributions to c-fos activation within the caudal periaqueductal gray of lactating rats: effects of perioral, rooting, and suckling stimuli from pups. **Horm. Behav**., v. 32, p.155-166, 1997.

LONSTEIN, J.S.; STERN, J.M. Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. **Brain Res**., v. 804, p.21-35, 1998.

LORD, J.A.H.; WATERFIELD, A.A.; HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H.W. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. **Nature**, v. 267, p.495-499, 1977.

MANSOUR, A.; FOX, C.A.; BURKE, S.; MENG, F.; THOMPSON, R.C.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. **J. Comp. Neurol**., v. 350, p.412-438, 1994.

MANSOUR, A.; FOX, C.A.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. **Neuroscience,** v. 18, p.22-29, 1995.

MANN, P.E.; KINSLEY, C.H.; BRIDGES, R.S. Opioid receptor subtype involvement in maternal behavior in lactating rats. **Neuroendocrinology**, v. 53, p.487-492, 1991.

MANN, P.E.; WEI, Y.Z.; RUBIN, B.S. Detection of Pomc neurons in the arcuate nucleus of rats in situ hybridization histochemistry using digoxigenin-labelled riboprobes. **An. Meet. Soc. Neurosci**., v. 21, p.361, 1995.

MARTIN, W.; BELL, J.; GILBERT, P.; SLOAN, J.; THOMPSON, J. The effects of naltrexone in the chronic spinal dog and acute spinal cat; possible interaction with naturally occurring morphine-like agonists. **NIDA Res. Monogr**., v. 9, p.27-30, 1976.

MARTINI, L.; WHISTLER, J.L. The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. **Cur. Op. Neurobiol**., v. 17, p. 556-564, 2007.

MATTSON, B.J.; WILLIAMS, S.; ROSENBLATT, J.S.; MORRELL, J.I. – Compararion of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. **Behavioral Neurosci**., v. 115, p.683-694, 2001.

MENG, F.; XIE, G.X.; THOMPSON, R.C.; MANSOUR, A.; GOLDSTEIN, A.; WATSON, S.J.; AKIL, H. Cloning and pharmacological characterizationof a rat kappa opioid receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p.9954-9958, 1993.

MINAMI, M.; TOYA, T.; KATAO, Y.; MAEKAWA, K.; NAKAMURA, S.; ONOGI, T.; KANEKO, S.; SATOH, M. Cloning and expression of a cDNA for the kappa-opioid receptor. **FEBS Lett**., v. 329, p.291-295, 1993b.

MINAMI, M.; ONOGI, T.; TOYA, T.; KATAO, Y.; HOSOI, Y.; MAEKAWA, K.; KATSUMATA, S.; YABUUCHI, K.; SATOH, M. Molecular cloning and in situ hybridization histochemistry for rat μ-opioid receptor. **Neurosci. Res**., v. 18, p.315-322, 1994.

MINAMI, M; SATOH, M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. **Neurosci. Res**. v. 23, p.121-145, 1995.

MIRANDA-PAIVA, C.M. **Interação da morfina com bloqueadores de subtipos de receptores de colecistocinina no comportamento maternal de ratas.** 130 f. Tese (Mestrado em Neurociências e Comportamento) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MIRANDA-PAIVA, C.M.; FELICIO, L.F. Differential role of cholecystokinin receptor subtypes in opioid modulation of ongoing maternal behavior. **Pharmacol. Biochem. Behav**., v. 64, p.165-169, 1999.

MIRANDA-PAIVA, C.M.; NASELLO, A.G.; YIN, A.J.; FELICIO, L.F. Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. **Brain Res. Bull**., v. 55, p.501-505, 2001.

MIRANDA-PAIVA, C.M.; NASELLO, A.G.; YIN, A.J.; FELICIO, L.F. Puerperal blockade of cholecystokinin (CCK1) receptors disrupts maternal behavior in lactanting rats. **J. Mol. Neurosci**., v. 18, p.97-103, 2002.

MIRANDA-PAIVA, C.M.; RIBEIRO-BARBOSA, E.R.; CANTERAS, N.S.; FELICIO, L.F. A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behaviour. **Eur. J. Neurosci**., v. 18, p.667-674, 2003.

MIRANDA-PAIVA, C.M. **Relação colecistocinina-opióides no controle do comportamento maternal.** 150 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Comportamento) - Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2003.

MOGENSON, G.J.; SWANSON, L.W.; WU, M. Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. **J. Neurosci**., v. 3, p.189-202,1983.

MOLLEREAU, C.; PARMENTIER, M.; MAILLEUX, P.; BUTOUR, J.L.; MOISNAD, C.; CHALON, P.; CAPUT, D.; VASSART, G.; MEUNIER, J.C. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. **FEBS Lett**., v. 341, p. 33-38, 1994.

MOLTZ, H.; LUBIN, M.; LEON, M.; NUMAN, M. Hormonal induction of maternal behavior in the ovariectomized nulliparous rat. **Physiol. Behav**., v. 5, p. 1373-1377, 1970.

NESTLER, E.J. Under siege: The brain opiates. **Neuron**, v. 16, p. 897-900, 1996.

NESTLER, E.J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 119-128, 2001.

NISHI, M.; TAKESHIMA, H.; FUKUDA, K.; KATO, S.; MORI, K. cDNA cloning and pharmacological characterization of an opioid receptor with high affinities for kappa-subtype-selective ligands. **FEBS Lett**., v.330, p.77-80, 1993.

NUMAN, M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. **J. Comp. Physiol. Psychol**., v. 87, p. 746-759, 1974.

NUMAN, M.; ROSENBLATT, J.S.; KOMISARUK, B.R. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. **J. Comp. Physiol. Psychol**., v. 91, p.146-164, 1977.

NUMAN, M. Maternal behavior, In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds.) **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994.

PAK, Y.; O´DOWD, B.F.; WANG, J.B.; GEORGE, S.R. Agonist-induced, G protein-dependent and –independent down-regulation of the μ-opioid receptor. **J. Biol. Res**., v. 274, p.27610-27616, 1999.

PASTERNAK, G.W.; WOOD, P.J. Minireview: multiple opiate receptors, **Life Sci**., v. 38, p.1889-1898, 1986.

PASTERNAK, G.W. Multiple morphine and enkephalin receptors and the relief of pain. **JAMA**, v. 259, p.1362-1367, 1988.

PASTERNAK, G.W.; STANDIFER, K.M. Mapping of opioid receptors using antisense oligodeoxynucleotides: correlating their molecular biology and pharmacology. **TIPS**, v. 16, p.344-350, 1995.

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

PEDERSEN, C.A.; PRANGE, A.J.Jr. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 76, p.6661-6665., 1979.

PERREAULT, M.L.; GRAHAM, D.; SCATTOLON, S.; WANG, Y.; SZECHTMAN, H.; FOSTER, J.A. Cotreatment with the kappa opioid agonist U69593 enhances locomotor sensitization to the D2/D3 dopamine agonist quinpirole and alters dopamine D2 receptor and prodynorphin mRNA expression in rats. **Psychopharmacology**, v. 194, p. 485-496, 2007.

PETRILLO, P.; TAVANI, A.; VEROTTA, D.; ROBSON, L.E.; KOSTERLITZ, H.W. Differential postnatal development of mu-, delta- and kappa-opioid binding sites in rat brain. **Brain Res**., v. 428, p. 53-58, 1987.

PORTOGHESE, P.S.; SULTANA, M.; NELSON, W.L.; KLEIN, P.; TAKEMORI, A.E. Delta opioid antagonist activity and binding studies of regioisomeric isothiocyanate derivatives of naltrindole: evidence for delta receptor subtypes. **J. Med. Chem**., v. 35, p.4086-4091, 1992.

PORTOGHESE, P.S.; MOE, S.T.; TAKEMORI, A.E. A selective delta 1 opioid receptor agonist derived from oxymorphone. Evidence for separate recognition sites for delta 1 opioid receptor agonists and antagonists. **J. Med. Chem**., v. 36, p.2572-2574, 1993.

PRZEWLOCKI, R. Opioid abuse and brain gene expression. **Eur. J. Pharmacol**. V. 500, p.331-349, 2004.

REISINE, T.; BELL, G.I. Molecular biology of opioid receptors. **Trends. Neurosci**., v. 16, p.506-510, 1993.

RODRIGUES-MUÑOZ, M.; DE LA TORRE-MADRID, E.; SANCHEZ-BLASQUEZ-, P.; GARZON, J. Morphine induces endocitosis of neuronal mu-opioid receptors through the sustained transfer of Galpha subunits to RGSZ2proteins. **Mol. Pain**, v. 3, p. 19, 2007.

RUBIN, B.S.; BRIDGES, R.S. Disruption of ongoing maternal responsiveness in rats by central administration of morphine sulfate. **Brain Res**., v. 307, p.91-97, 1984.

SANYAL, M.K. Secretion of progesterone during gestation in the rat. **J. Endocrinol**., v. 79, p.179-190, 1978.

SAKUMA, Y.; PFAFF, D.W. Facilitation of female reproductive behavior from mesensephalic central gray in the rat. **Am. J. Physiol**., v. 237, p.278-284, 1979.

SCHULKIN, J. In: **The neuroendocrine regulation of behavior**. London: Cambridge University Press, 1999.

SHAIKH, A.A. Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. **Biol. Reprod**., v. 5, p.297-307, 1971.

SHEEHAN, T.P.; CIRRITO, J.; NUMAN, M.J.; NUMAN, M. Using c-Fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. **Behav. Neurosci**., v. 114, p. 337-352, 2000.

SIMON, H.; LE MOAL, M.; CALAS, A. Efferents and afferents of the ventral tegmental-A10 region studied after local injection of [^{3}H]-leucine and horseradish peroxidase. **Brain Res**., v. 178, p.17-40, 1979.

SOFUOGLU, M.; PORTOGHESE, P.S.; TAKEMORI, A.E. Cross-tolerance studies in the spinal cord of beta-FNA-treated mice provides further evidence for delta opioid receptor subtypes. **Life Sci**., v. 49, p.1153-1156, 1991a.

SOFUOGLU, M.; PORTOGHESE, P.S.; TAKEMORI, A.E. Differential antagonism of delta opioid agonists by naltrindole and its benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for delta opioid receptor subtypes. **J. Pharmacol. Exp. Therap**., v. 257, p.676-680, 1991b.

STERN, J.M. Trigeminal lesions and maternal behavior in Norway rats. II. Disruption of parturition. **Physiol. Behav**., v. 60, p. 187-190, 1996.

STOLLER, D.C.; SIM-SELLEY, L.J.; SMITH, F.L. role of kappa and delta opioid receptors in mediating morphine-induced antinociception in morphine-tolerant infant rats. **Brain Res**., v. 1142, p. 28-36, 2007.

SUKIKARA, M. H.; MOTA-ORTIZ, S. R.; BALDO, M. V.; FELICIO, L. F.; CANTERAS, N. S. A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. **J. Neurosci.,** v. 26, p. 2582-2589, 2006.

SUKIKARA, M.H.; PLATERO, M.D.; CANTERAS, N.S.; FELICIO, L.F. Opiate regulation of behavioral selection during lactation. **Pharmacol. Biochem. Behav**., v. 87, p. 315-320, 2007.

SUMMERLEE, A.J.; O´BYRNE, K.T.; POTERSKI, R.S. Relaxin inhibits the pulsatile release of oxytocin but increases basal concentrations of hormone in lactating rats. **Biol. Reprod**., v. 58, p.977-981, 1998.

SWANSON, L.W.; MOGENSON, G.J.; GERFEN, C.R.; ROBINSON, P. Evidence for a projection from the lateral preoptic area and substantia innominata to the mesencephalic locomotor region in the rat. **Brain Res**., v. 295, p.161-178, 1984.

TANOWITZ, M.; VON ZASTROW, M. A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 45978-45986, 2003.

TEMPEL, A.; ESPINOZA, K. Morphine-induced downregulation of mu-opioid receptors and peptide synthesis in neonatal rat brain. **Ann. N. Y. Acad. Sci**., v. 654, p. 529-530, 1992.

TEODOROV, E.; TOMITA, A.T.; BANON, G.P.R.; GIL, I. G.; BERNARDI, M.M>; FELICIO, L.F. Behavioral effects of acute stimulation of kappa-opioid receptors during lactation. **Pharmacol. Biochem. Behav**., 2008. In press.

TEODOROV, E.; HABR-ALENCAR, S.F.; SIDER, L.H.; FELICIO, L.F.; VAROLI, F.M.F.; BERNARDI, M.M. Prenatal treatment with picrotoxin promotes heterotypical sexual behavioral and neurochemical changes in male rat offspring. **Brain Res**., v. 1069, p. 113-119, 2006.

TEODOROV, E.; MORAES, A.P.; FELICIO, L.F.; VAROLLI, F.M.; BERNARDI, M.M. Perinatal maternal exposure to picrotoxin: Effects on sexual behavior in female rat offspring. **Pharmacol. Biochem. Behav**., v.81, p. 935-942, 2005.

TEODOROV, E.; SALZGEBER, A.S.; FELICIO, L.F.; VAROLLI, F.M.F.; BERNARDI, M.M. Effects of perinatal picrotoxin and sexual experience on heterosexual and homosexual behavior in male rats. **Neurotoxicol. Teratol**., v.24, p. 235-245, 2002.

TERWILLIGER, R.Z.; BEITNER-JOHSON, D.; SEVARINO, K.A.; CRAIN, S.M.; NESTLER, E.J. A general role for adpations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. **Brain Res**., v. 548, p. 100-110, 1991.

THOMPSON, R.C.; MANSOUR, A.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Cloning and pharmacological characterization of a rat μ-opioid receptor. **Neuron***,* v. 11, p.903-913, 1993.

THORBURN, G.D.; CHALLIS, J.R. Endocrine control of parturition. **Physiol. Rev**., v. 59, p.863-918, 1979.

VANDERSCHUREN, L.J.; TJON, G.H.; NESTBY, P.; MULDER, A.H.; SCHOFFELMEER, A.N.; DE VRIES, T.J. Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of thepretreatment regimen. **Psychopharmacology**, v. 131, p. 115-122, 1997.

VANDERSCHUREN, L.J.; DE VRIES, T.J.; WARDEH, G.; HOGENBOOM, F.; SCHOFFELMEER, A.N. A single exposure to morphine induces long-lasting behavioural and neurochemical sensitization in rats. **Eur. J. Neurosci**., v. 14, p. 1533-1538, 2001.

VAN ERP, A.M.; KRUK, M.R.; MEELIS, W.; VEENING, J.G. Periaqueductal gray lesions do not affect grooming, induced electrically in the hypothalamic paraventricular area in the rat. **Behav. Brain Res**., v. 59, p.95-101, 1993.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S.E.; WHISTLER, J.L. Opioid receptors. **Annu. Rev. Biochem**., v. 73, p. 953-990, 2004.

WANG, J.B.; IMAI, Y.; EPPIER, C.M.; GREGOR, P.; SPIVAK, C.E.; UHI, G.R. μ-opioid receptor: cDNA cloning and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**., v. 90, p.10230-10234, 1993.

WEI, L.; LOH, H.H. Regulation of opioid receptor expression. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 2, p.69-75, 2002.

WHISTLER, J.L.; CHUANG, H.H.; CHU, P.; JAN, L.Y.; ZASTROW, M. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of tolerance and addiction. **Neuron**, v. 23, p. 737-746, 1999.

WILLIAMS, J.T.; CHRISTIE, M.J.; MANSONI, O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. **Physiol. Rev**., v. 81, p. 299-343, 2001.

YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Chronic Cathterization of the Spinal Subarachnoid Space. **Physiol. Behav**., v. 17, p. 1031-1036, 1976.

YASUDA, K.; RAYNOR, K.; KONG, H.; BREDER, C.D.; TAKEDA, J.; REISINE, T.; BELL., G.I. Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA.**, v. 90, p.6736-6740, 1993.

YIM JUNIOR, A. **Efeitos do pré-tratamento com morfina em parâmetros de comportamento, neuroquímicos e endócrinos de ratas.** 100 f. Tese (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

YIM, A.J.; MIRANDA-PAIVA, C.M.; FLORIO, J.C.; OLIVEIRA, C.A.; NASELLO, A.G.; FELICIO, L.F. A comparative study of morphine treatment regimen prior to mating and during late pregnancy. **Brain Res. Bull**., v. 68, p. 384-391, 2006.

YOUNG, W.C.; ALHEID, G.F.; HEIMER, L. The ventral pallidal projection to the mediodorsal thalamus: a study with fluorescent retrograde tracers and immunohistofluorescence. **J. Neurosci**., v. 4, p.1629-1638, 1984.

ZUKIN, R.S.; EGHBALI, M.; OLIVE, D.; UNTERWALD, E.M.; TEMPEL, A. Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 85, p.4061-4065, 1988.

ANEXOS

Neuroscience 141 (2006) 1225–1231

PRELIMINARY STUDY OF THE EFFECTS OF MORPHINE TREATMENT ON OPIOID RECEPTOR GENE EXPRESSION IN BRAIN STRUCTURES OF THE FEMALE RAT

E. TEODOROV, C. C. MODENA, M. H. SUKIKARA AND L. F. FELICIO*

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitaria, 05508-900 São Paulo, Brazil

Abstract—Opioid receptors play an important role in female physiology. They modulate directly and indirectly neuroendocrine phenomena that influence pregnancy maintenance, pain threshold, parturition, lactation, maternal behavior, rewarding and addiction. Thus understanding the gene expression levels of the three major opioid receptors, μ, δ and κ in different brain regions is essential for investigating dynamic mechanisms of opioidergic transmission. Adult virgin female rats were treated acutely with morphine sulfate (3.5 mg/kg or 20 mg/kg s.c.) or chronically for 5 days (3.5 mg/kg). Rats were killed 1 h after the last injection. In the acute treatment, expression levels for the encoded μ-opioid receptor *Oprm1*, as detected by reverse transcription–polymerase chain reaction, were significantly decreased in the periaqueductal gray. In chronic treatment, both *Oprk1* and *Oprm1* expression levels, that encoded κ and μ-opioid receptor respectively, showed significant decreases in the periaqueductal gray and striatum. Regional changes in opioid receptor gene expression levels might reflect highly specialized roles for these receptors with possible functional meaning for the plasticity of the opioidergic transmission. **© 2006 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.**

Key words: opioids, opioidergic stimulation, gene expression, PAG, peptides.

Opioid receptors play an important role in female physiology. Endogenous opiates are known to be involved in the regulation of various events such as parturition and subsequent lactation and maternal behavior (Gintzler, 1980; Bridges and Grimm, 1982; Rosenblatt et al., 1988; Kinsley and Bridges, 1988; Felicio et al., 1991; Miranda-Paiva and Felicio, 1999). Surprisingly there is a scarceness of studies investigating the expression of opioid receptor genes in the female brain. Such literature bias may be due to the perception that, differently from males, estrous cycle and reproductive state may interfere with the establishment of a basal pattern of gene expression. Nevertheless, changes in opioid receptor expression may have a relevant physiological meaning for female reproduction. Some of such changes can be revealed by pharmacological treatments with morphine the classical opioid receptor agonist. Treatments with low doses of morphine or with cholecystokinin antagonists during late pregnancy sensitize the rat to opioid-induced inhibition of maternal behavior (Miranda-Paiva et al., 2001; Miranda-Paiva and Felicio, 2002). Opioidergic stimulation of the lateral periaqueductal gray induces a functional meaningful neuronal activation revealed by an increase in fos protein expression (Miranda-Paiva et al., 2003; Yim et al., 2006). Such an activation pattern inhibits maternal behavior by stimulating predatory hunting (Sukikara et al., 2006). Opioid receptors' role in both sensitization and the behavioral switch phenomena remains unknown.

Opioid receptors belong to the large superfamily of seven transmembrane-spanning G protein-coupled receptors (GPCRs). As a class, GPCRs are of fundamental physiological importance mediating the actions of the majority of known neurotransmitters and hormones. Opioid receptors are particularly intriguing members of this receptor family (Waldhoer et al., 2004). They are activated both by endogenously produced opioid peptides and by exogenously administered opioid drugs, such as morphine, which are not only among the most effective analgesics known but also highly addictive drugs of abuse. Pharmacological studies have defined three major GPCRs, μ, κ and δ, which are stimulated by a family of opioid peptides (Kieffer, 1995), preferentially bind to morphine, enkephalins and dynorphins respectively (Kieffer et al., 1992; Minami et al., 1993; Paterson et al., 1994; Uhl et al., 1994).

The genes encoding the cDNAs of μ, δ and κ-opioid receptors were subsequently isolated from different species and their structures were determined. These studies showed that the three opioid receptor genes share a common genomic structure and their distribution in animal tissues and the expression patterns have also been extensively examined with the aid of different techniques and molecular probes (Fowler and Fraser, 1994; Elde et al., 1995; Mansour et al., 1995a,c,d). Expression of opioid receptors is mainly observed in the CNS, as well as intensively expressed in the peripheral nervous system (Mansour et al., 1995a; Bausch et al., 1995; Minami and Satoh, 1995).

This study was designed to analyze differences in expression of genes that encode for opioid receptors in the periaqueductal gray (PAG), striatum and hypothalamus of nulliparous female rats. Thus, this work is a first step in understanding the role of acute and chronic morphine treatments on modulation of opioid gene expression in adult nulliparous female rats. These results are important

*Corresponding author. Tel: +55-11-3091-7934; fax: +55-11-3091-7829. E-mail address: lfelicio@usp.br (L. F. Felicio).

Abbreviations: GPCR, G protein-coupled receptor; OVX, ovariectomized; PAG, periaqueductal gray; PCR, polymerase chain reaction.

0306-4522/06$30.00+0.00 © 2006 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2006.04.071

because they can indicate possible pharmacologically-induced alterations in the pattern of opioid gene expression.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Female Wistar rats weighing 200–250 g at the beginning of the study obtained from the Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo were used. The animals were housed in polypropylene cages (32×40×18 cm; three animals per cage) under controlled temperature (22±2 °C), with a 12 light–12 dark schedule (lights on at 06:00 h) and had free access to food and water during the experimental procedure. The animals used in this study were maintained in accordance with the guidelines from the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources, National Research Council, USA. All experiments conformed to the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo guidelines on the use of animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Morphine sulfate treatment and tissue sampling

Sixty adult female rats were randomly divided into six groups with 10 animals per group. Morphine sulfate (3.5 mg/kg or 20 mg/kg; Cristália, São Paulo, Brazil) for i.p. injection was diluted with 0.9% NaCl, formed the following groups as described in Table 1. The injections were administered at 08:00 h. Chronic morphine sulfate administrations occurred once a day for five consecutive days. Both acute treatment and first injection of chronic treatment were always done on the day of vaginal estrous as determined by vaginal smears. Once treatment with morphine or saline was finished, the animals were deeply anesthetized with ketamine and xylazine (1:1) i.p. and then killed. Animals were decapitated 1 h after the last injection of drug. Their brains were removed and chilled rapidly on ice. The PAG, hypothalamus and right striatum were dissected according to Paxinos and Watson (1986). Tissue was rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at −70 °C until use.

Table 1. Specification of groups according the acute or chronic treatment with morphine sulfate

Groups	Treatment	Cerebral area
BP	Intact	PAG
ASP	Acute saline 0.9%	PAG
AMP	Acute morphine 3.5 mg/kg	PAG
AM2P	Acute morphine 20 mg/kg	PAG
BS	Intact	Striatum
ASS	Acute saline 0.9%	Striatum
AMS	Acute morphine 3.5 mg/kg	Striatum
AM2S	Acute morphine 20 mg/kg	Striatum
BH	Intact	Hypothalamus
ASH	Acute saline 0.9%	Hypothalamus
AMH	Acute morphine 3.5 mg/kg	Hypothalamus
AM2H	Acute morphine 20 mg/kg	Hypothalamus
CSP	Chronic saline 0.9%	PAG
CMP	Chronic morphine 3.5 mg/kg	PAG
CSS	Chronic saline 0.9%	Striatum
CMS	Chronic morphine 3.5 mg/kg	Striatum
CSH	Chronic saline 0.9%	Hypothalamus
CMH	Chronic morphine 3.5 mg/kg	Hypothalamus

RNA extraction and polymerase chain reaction (PCR).

Total RNA was extracted from each individual brain tissue sample by the Trizol reagent (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). Thus, the regions (weighing approximately 40 mg each) were suspended in 1 ml of ice cold Trizol, and total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. The final RNA pellets were resuspended in 50 μl diethyl-pyrocarbonate-treated water. The total RNA concentrations were measured spectrophotometrically at 260 nm and the integrity of RNA samples was analyzed on a 1.5% agarose gel (Sigma, St. Louis, MO, USA) containing ethidium bromide (0.5 μg/ml). RNA was stored at −80 °C until further analysis.

RT-PCR was performed using Superscript™ II RNAse H-Reverse Transcriptase (Invitrogen®) according to the manufacturer's instructions. A semiquantitative PCR method was used and each PCR reaction was carried out using selective forward and reverse primers for β-actin (as an internal standard), *Oprm1*, *Oprd1* or *Oprk1*. The sequences of primers used were: *Oprm1* forward 5′ACC TGG CTC CTG GCT CAA CTT 3′ reverse 5′TGG ACC CCT GCC TGT ATT TTG 3′ which should amplify a 600 bp fragment; *Oprk1* forward 5′TTC CTG GTG GGA CCT CTT CAT 3′(200 bp fragment) and reverse 5′GCA CAG CTG TCC TCT CTA GCT 3′ (200 bp fragment); *Oprd1* forward 5′GCT GTG CTC TCC ATT GAC TAC 3′ and reverse 5′GAT GTC CAC CAG CGT CCA GAC 3′ (570 bp fragment) and β-actin forward 5′ACC GTG AAA AGA TGA CCC AG 3′ and reverse 5′CTC TCA GCT GTG GTC GTC AA 3′ (300bp fragment). β-Actin was used as an internal control for the amplification. The following conditions were selected for PCR in a volume of 50 μl: RT products from 50 ng of RNA, 2.5 U Platinum *Taq* Polymerase (Invitrogen), 35 cycles of amplification for *Oprm1*, *Oprk1* and β-actin genes, and 40 cycles for the *Oprd1* gene. Amplification was carried out using an initial denaturing cycle at 95 °C for 2 min and subsequent cycles as follows: denaturation, 1 min at 95 °C; annealing 1 min at 60 °C or 55 °C (β-actin), and extension, 1 min at 72 °C. The PCR primers were designed on the basis of published rat cDNA sequences in GenBank. PCR products (10 μl per lane) were electrophoresed using 1.5% agarose gel and colored with ethidium bromide (0.5 μg/ml). The gel was subjected to ultraviolet light and photographed. The bands intensities were measured using a software package (ImageMaster DElite, Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, USA).

Statistics

Differences in scores between more than two groups were assessed by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test. For comparisons of two groups, a Student's *t*-test was used.

RESULTS

Ethidium bromide staining of PCR products showed a single band of the expected size: 600 bp for *Oprm1*, 570 bp for *Oprd1*, 200 bp for *Oprk1* and 300 bp for β-actin. The possibility of the presence of contaminating genomic DNA was ruled out by DNAse OUT (Invitrogen) which caused no DNA amplification and the design of primers was made in different exons.

Semiquantitative PCR technique was used to estimate *Oprm1*, *Oprd1* and *Oprk1* gene expression levels in tissue samples, normalized to an internal standard (β-actin). Data from intact (non-manipulated animals) and saline-treated animals were used as a control group.

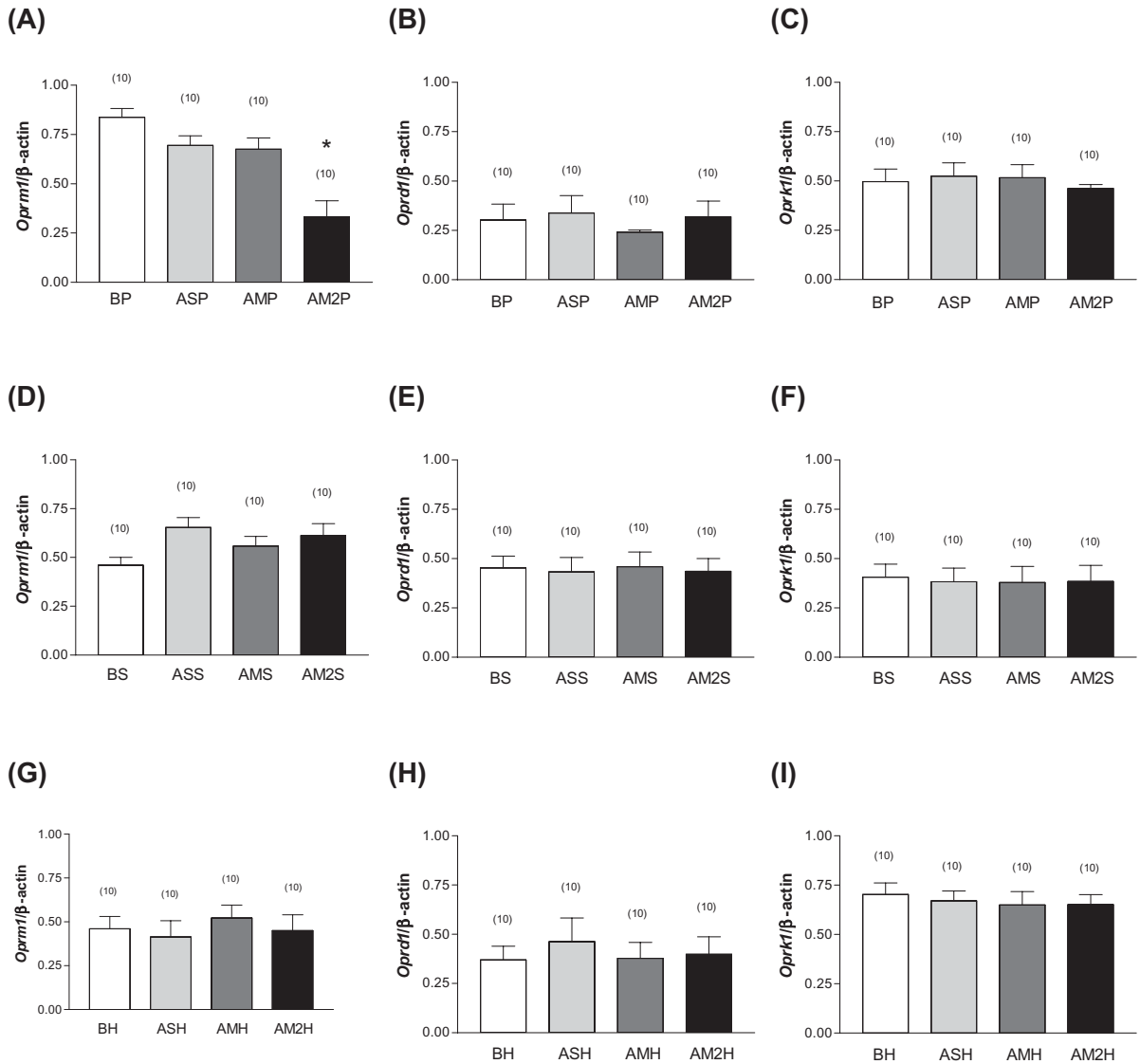


Fig. 1. Representative RT-PCR products of 1 μg total RNA extracted from PAG (A), (B) and (C), striatum (D), (E) and (F) and hypothalamus (G), (H) and (I) of nulliparous female rats acutely treated with morphine sulfate. Electrophoresis in agarose gel 1.5%, TAE ½× (A). The graphs show the relative optical density values of *Oprm1*, *Oprd1* and *Oprk1* bands obtained from different groups, compared with the control group (blank+saline). Values were normalized by corresponding RT-PCR products for β-actin, used as the internal control. Values are expressed as means±S.E.M. Sample size is in parentheses. * $P<0.001$ (ANOVA followed by Tukey test).

Compared with the control group, acute administration of 3.5 mg/kg morphine sulfate did not change the gene expression in PAG, hypothalamus and striatum, but at the 20 mg/kg dose, the expression of *Oprm1* ($P<0.001$ vs. control) decreased in PAG after treatment but not in other regions (Fig. 1). The gene expression analysis showed differences among the cerebral areas. Thus, the *Oprm1* expression was most evident in PAG, and existence of a degree of lower density expression was observed in striatum and hypothalamus. The *Oprk1* expression was most evident in hypothalamus, and existence of a degree of lower density expression was observed in PAG and striatum, respectively. Finally, the *Oprd1* expression was most evident in striatum, and lower density expression was observed in hypothalamus and PAG.

Chronic administration of 3.5 mg/kg morphine sulfate did not change *Oprd1* gene expression in any brain areas. The expressions of both *Oprm1* and *Oprk1* were decreased in PAG ($P<0.001$ vs. control) and striatum ($P<0.001$ vs. control) (Fig. 2).

DISCUSSION

Since the early 1970s, when specific binding sites for opiates were first described, there has been a vast literature on opiate receptors, their subtypes, and the multiplicity of these subtypes (Fowler and Fraser, 1994). Thus, opioid receptors have been the focus of intense research with the hopes of elucidating their roles in various physiological and pathological processes such as motivated and consumma-

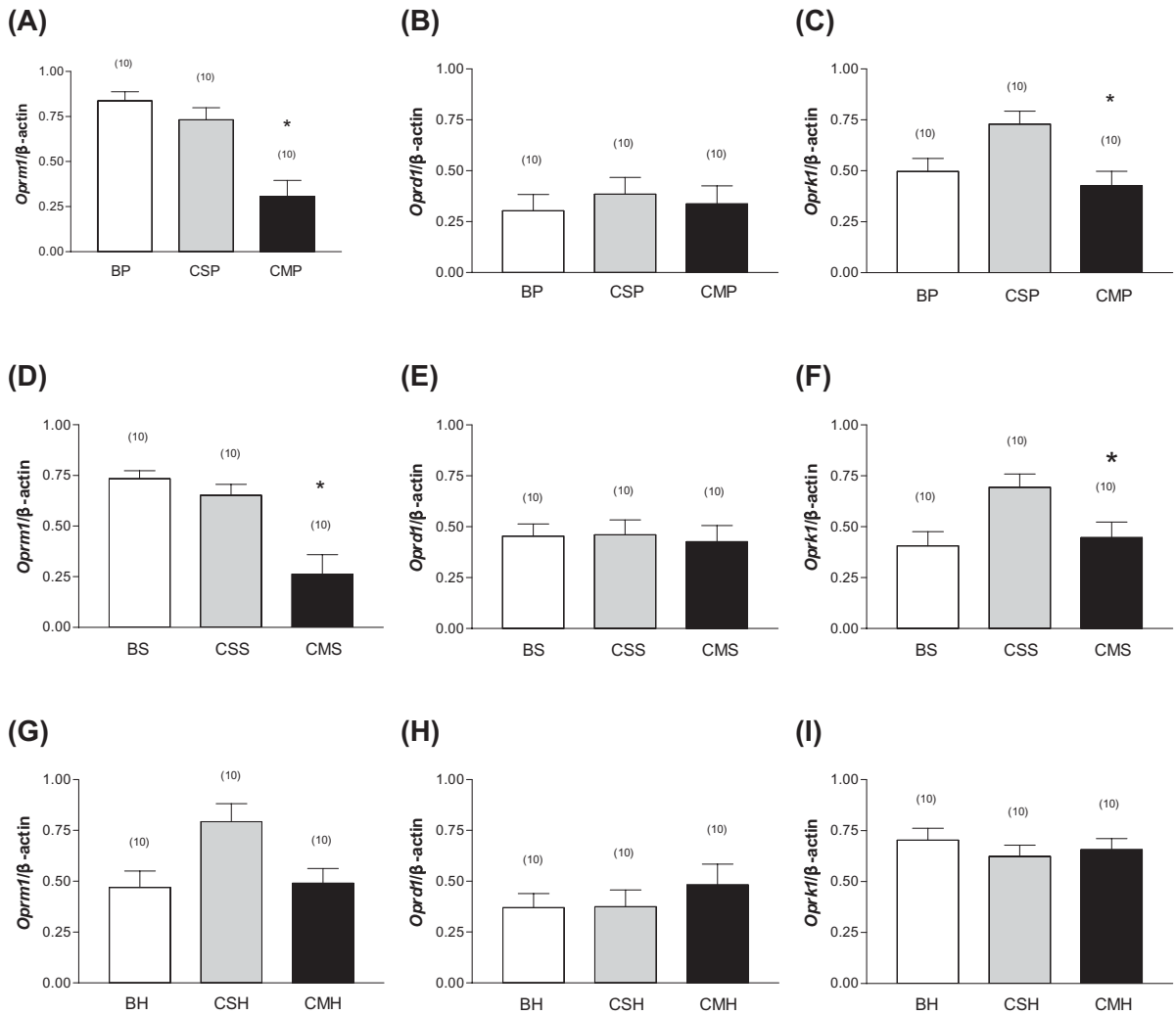


Fig. 2. Representative RT-PCR products of 1 μg total RNA extracted from PAG (A), (B) and (C), striatum (D), (E) and (F) and hypothalamus (G), (H) and (I) of nulliparous female rats chronically treated with morphine sulfate. Electrophoresis in agarose gel 1.5%, TAE ½× (A). The graphs show the relative optical density values of *Oprm1*, *Oprd1* and *Oprk1* bands obtained from different groups, compared with the control group (blank+saline). Values were normalized by corresponding RT-PCR products for β-actin, used as the internal control. Values are expressed as means±S.E.M. Sample sizes are in parentheses. * $P<0.001$ (Student's *t*-test).

tory behaviors, learning and memory, analgesia and addiction. The studies have identified three types of receptors, referred to as μ, κ and δ (Mansour et al., 1995a,b). With the development of selective agonists and antagonists, it has become clear that each type of opioid receptor has unique pharmacological properties and is differentially distributed in the CNS (Mansour et al., 1995a,b). This latter finding is consistent with the data reported in the present study.

Recent studies using real time RT-PCR detected differences in gene expression in culture cells as well as cerebral tissues. In the current study, we used an accepted technique, the reverse transcriptase reaction (RT) followed by PCR. The regular PCR technique used in these experiments was sensitive enough to reveal differences in gene expression on the CNS microregions analyzed. Thus, it was considered as a dependable approach even for studying such genes that are members of the ever-growing family of seven transmembrane GPCRs.

By screening a rat brain cDNA library using a cloned μ opioid receptor cDNA as probe, a clone was identified that is very similar to both the μ and δ opioid receptor sequences (Chen et al., 1993). Analysis of sequence similarities among these opioid receptors, between opioid receptors and other GPCRs, has revealed regions of sequence conservation that may underlie the ligand-binding and functional specificities of opioid receptors (Chen et al., 1993).

The aim of this study was to analyze differences in expression of genes that encode opioid receptors in the PAG, striatum and hypothalamus of nulliparous female rats. The results of this study demonstrate that it is possible to identify differences in opioid gene expression density in the PAG, striatum and hypothalamus of nulliparous female rats. The total RNA extraction did not show contaminations, as well as primers designs were correct. This is evidenced by μ, δ, κ and β-actin fragment products ob-

tained after PCR assay. The blast and alignment for these cDNAs confirmed this concept and a digestion with restriction enzymes was not necessary.

In intact and saline animals, *Oprm1*, the gene the encode μ-opioid receptor, showed higher expression in the PAG than in other brain regions investigated. In this area, there was a rank order of gene expression in which *Oprm1* was more expressed, followed by *Oprk1* and *Oprd1*. In the striatum, *Oprd1* was the most expressed gene, followed *Oprm1* and *Oprk1*. Finally, in the hypothalamus, *Oprk1* was most expressed, following *Oprm1* and *Oprd1* gene expression. This analysis demonstrated that mRNA of genes which encode opioid receptors are expressed in a regionally specific manner in rat brain (Minami et al., 1993). Other authors have shown that the opioid gene expression in the adult male rat presents a quite similar pattern to the one observed in the present study for nulliparous female rats. This finding indicates that the opioid receptor genes expression patterns are similar in both male and virgin female adult individuals. Moreover, further studies evaluating the effects of morphine treatment on opioid gene expression of male rats in the same brain regions can be made.

In the acute treatment with the 20 mg/kg dose of morphine sulfate, only the μ-opioid receptor gene expression was decreased in PAG. No changes were observed in striatum and hypothalamus. This suggests that μ-opioid gene expression is more sensitive to opioidergic stimulation than genes which encode for the other opioid receptors in nulliparous female rats. Consistently, recent reports suggest that the classical morphine-induced inhibition on maternal behavior may depend on a particular physiological state in which the dams become more sensitive to this drug (Yim et al., 2006).

These results also indicate that morphine-induced stimulation of opioid receptors can lead to changes in μ-opioid receptor gene activity. Since the basal expression of this gene was higher than the other opioid genes, the inhibitory effects induced by morphine treatment were most easily revealed. Alternatively, “receptor reserve” is a concept that arises from inactivation experiments that examined the effects of pharmacological manipulations. If, after inactivating some receptors, concentration-response curves display full efficacy with no depression of the maximal responses, receptor reserve is present. In addition, the superstimulation of the μ-opioid system in PAG can promote a compensatory response in the short term. Such a compensatory response, in this case, was a decrease in μ-opioid gene expression.

Pharmacological approaches have suggested that the μ-opioid receptor serves as a principal site for morphine actions in inducing behavioral reward (Di Chiara and North, 1992; Pasternak, 1993; Wise, 1996), locomotion (Stevens et al., 1986), analgesia (Porreca and Burks, 1993), tolerance (Aghajanian, 1978) and physical dependence (Johnson and Fleming, 1989). Thus, the μ-opioid receptor signaling is activated by several drugs of abuse (opioid and non-opioid) and therefore represents a potential target for the therapeutics of addiction (Narita et al., 2001; Kieffer and Gaveriaux-Ruff, 2002).

For decades, research has been using animal models to identify and understand the neurobehavioral problems that might be encountered in children, adolescents, and young adults who were exposed to neuroactive substances such as opiates during fetal ontogeny as a result of maternal drug use. Opiates can cross the blood–barrier, penetrate the developing CNS, interact with brain receptor, and influence some behavior (Zagon and McLaughlin, 1992; Vathy et al., 2003).

Slamberová et al. (2002) have demonstrated that prenatal morphine exposure on gestation days 11–18 sex-specifically alters μ-opioid receptor density in seizure-controlling brain regions such as substantia nigra, superior colliculus and subthalamic nucleus of adult male and female rats, and that this effect of prenatal morphine exposure depends on gonadal hormones. Ovariectomized (OVX) female rats whose mothers were treated with morphine during gestation, show an increase in μ-opioid receptor density in the substantia nigra, but a decrease in this density was observed in subthalamic nucleus (Slamberová et al., 2005). These results show the importance of gonadal hormones in modulation of the opioid gene expression.

Regarding female ovarian hormones, Slamberová et al. (2005) demonstrate that saline exposed, OVX and estradiol benzoate-treated females have higher μ-opioid receptor density relative to OVX females which received the same prenatal treatment with morphine during gestation. Quinones-Jenab et al. (1997) showed that estrogen treatment increases the μ-opioid receptor mRNA in the ventromedial nucleus of hypothalamus. Thus, in this context, the prenatal morphine exposure alters μ, κ and δ-opioid receptor in several brain regions (Rimanóczy et al., 2001; Vathy et al., 2003; Slamberová et al., 2003a,b) of male and female offspring, but the gene level expression of the dams that received morphine treatment is not studied. The present study was designed to investigate opioid gene expression in virgin female rats. For the chronic treatment animals were treated with a relatively low dose of morphine (3.5 mg/kg). Even so, there is a chance that morphine-induced endocrine changes would have indirectly influenced these results. This possibility will be investigated in future studies.

The results obtained with chronic treatment suggest that lower doses administered for a long-term are more effective in modification of μ and κ opioid gene expression, then acute treatment. This result showed that morphine effects on μ-opioid gene expression in the PAG in both acute and chronic treatments are the same.

On the other hand, after chronic treatment with morphine, κ opioid receptor expression was decreased in both PAG and striatum. This suggests that κ expression is more sensitive to chronic than to acute treatment. This study did not reveal morphine-induced alterations in δ opioid gene expression, possibly due to a lack of a morphine effect on the expression of this receptor in the brain areas analyzed.

Indeed, the hypothalamus was the unique microregion in brain in that neither opioid gene was expressed differentially when compared with other regions when challenged with morphine. Consistently, classical studies have shown that acute and chronic morphine treatments were not able to modify neuronal activity in the hypothalamus, and neither RNA nor ATP was modified in any case (Nasello et al., 1973).

CONCLUSION

Taken together, these considerations could be of importance for design of therapeutic regimens that might minimize addictive, and maximize the therapeutic properties of opiates. More studies are necessary to understand the dynamic adaptation of opioid genes that are likely to contribute to the different aspects of opioidergic transmission in female reproduction. These genes can now have their regulation evaluated, individually and in groups, to determine the important roles they play in morphine-induced molecular and behavioral plasticity in female brain.

Acknowledgments—This research was supported by funds from CNPq, Conselho Nacional (grant number 141121/2004-1) and FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grant number 2005/54696-0). The authors thank Prof. Dr. Craig Kinsley (University of Richmond) and Ms Maria Isabel Roth de Carvalho Freitas for technical support.

REFERENCES

Aghajanian GK (1978) Tolerance of locus coeruleus neurons to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. Nature 276:186–188.

Bausch SB, Patterson TA, Appleyard SM, Chavkin C (1995) Immunocytochemical localization of delta opioid receptors in mouse brain. J Chem Neuroanat 8:175–189.

Bridges RS, Grimm CT (1982) Reversal of morphine disruption of maternal behavior by concurrent treatment with the opiate antagonist naloxone. Science 218:166–168.

Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L (1993) Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. Biochem J 295:625–628.

Di Chiara G, North RA (1992) Neurobiology of opiate abuse. Trends Pharmacol Sci 13:185–193.

Elde R, Arvidsson U, Riedi M, Vulchanova L, Lee JH, Dado R, Nakano A, Charkrabarti S, Zhang X, Loh HH (1995) Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. Ann N Y Acad Sci 757:390–404.

Felicio LF, Mann PE, Bridges RS (1991) Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphin-induced disruption of maternal behavior. Pharmacol Biochem Behav 39:201–204.

Fowler CJ, Fraser GL (1994) Mu-, delta-, kappa-opioid receptors and their subtypes. A critical review with emphasis on radioligand binding experiments. Neurochem Int 24:401–426.

Gintzler AR (1980) Endorphin-mediated increases in pain threshold during pregnancy. Science 210:193–195.

Johnson SM, Fleming WW (1989) Mechanisms of cellular adaptative sensitivity changes: applications to opioid tolerance and dependence. Pharmacol Rev 41:435–488.

Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux RC, Hirth CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. Proc Natl Acad Sci U S A 89:12048–12052.

Kieffer BL (1995) Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. Cell Mol Neurobiol 15:615–635.

Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. Prog Neurobiol 66:285–306.

Kinsley CH, Bridges RS (1988) Parity-associated reductions in behavioral sensitivity to opiates. Biol Reprod 39:270–278.

Mansour A, Fox CA, Watson SJ (1995a) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. Trends Neurosci 18:22–29.

Mansour A, Watson SJ, Akil H (1995b) Opioid receptors: past, present and future. Trends Neurosci 18:69–70.

Mansour A, Hoversten MT, Taylor LP, Watson SJ, Akil H (1995c) The cloned mu, delta and kappa receptors and their endogenous ligands: evidence for two opioid peptide recognition cores. Brain Res 700:89–98.

Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ (1995d) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. J Chem Neuroanat 8:283–305.

Minami M, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Nakamura S, Onogi T, Kaneko S, Satoh M (1993) Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. FEBS Lett 329–295.

Minami M, Satoh M (1995) Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. Neurosci Res 23:121–145.

Miranda-Paiva CM, Felicio LF (1999) Differential role of cholecystokinin receptor subtypes in opioid modulation of ongoing maternal behavior. Pharmacol Biochem Behav 64:165–169.

Miranda-Paiva CM, Yim A, Nasello AG, Felicio LF (2001) Morphine pretreatment increases opioid inhibitory effects on maternal behavior. Brain Res Bull 55:501–505.

Miranda-Paiva CM, Felicio LF (2002) Puerperal blockade of cholecystokinin (CCK1) receptors disrupts maternal behavior in lactating rats. J Mol Neurosci 18:97–104.

Miranda-Paiva CM, Ribeiro-Barbosa ER, Canteras NS, Felicio LF (2003) A role for the periaqueductal grey in opioidergic inhibition of maternal behavior. Eur J Neurosci 18:667–674.

Narita M, Funada M, Suzuki T (2001) Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. Pharmacol Ther 89:1–15.

Nasello AG, Depiante R, Tannhauser M, Izquierdo I (1973) Effect of morphine on the RNA and ATP concentration of brain structures of the rat. Pharmacology 10:56–59.

Pasternak GW (1993) Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. Clin Neuropharmacol 16:1–18.

Paterson SJ, Robson LE, Kosterlitz HW (1994) Molecular neuroscience. In: The peptides, Vol. 6 (Udenfriend S, Meienhofer J, eds), pp 147–189. Orlando: Academic Press.

Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press.

Porreca F, Burks TF (1993) Supraspinal opioid receptors in antinociception. In: Opioids II: Handbook of experimental pharmacology (Herz A, ed), pp 21–52. Berlin: Springer-Verlag.

Quinones-Jenab V, Jenab S, Ogawa S, Inturrisi C, Pfaff DW (1997) Estrogen regulation of mu-opioid receptor mRNA in the forebrain of female rats. Brain Res Mol Brain Res 47:134–138.

Rimanóczy A, Slamberová R, Vathy I (2001) Prenatal morphine exposure alters estrogen regulation of kappa receptors in the cortex and POA of adult female rats but has no effects on these receptors in adult male rats. Brain Res 894:154–156.

Rosenblatt JS, Mayer AD, Giordano AL (1988) Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. Psychoneuroendocrinology 13:29–46.

Slamberová R, Rimanóczy A, Riley MA, Schindler CJ, Vathy I (2002) Mu-opioid receptors in seizure-controlling brain structures are altered by prenatal morphine exposure and by male and female gonadal steroids in adult rats. Brain Res Bull 58:391–400.

Slamberová R, Rimanóczy A, Schindler CJ, Vathy I (2003a) Cortical and striatal μ-opioid receptors are altered by gonadal hormone

treatment but not by prenatal morphine exposure in adult male and female rats. Brain Res Bull 62:47–53.

Slamberová R, Rimanóczy A, Bar N, Schindler CJ, Vathy I (2003b) Density of μ-opioid receptors in the hippocampus of adult male and female rats is altered by prenatal morphine exposure and gonadal hormone treatment. Hippocampus 13:461–471.

Slamberová R, Rimanóczy A, Cao D, Schindler CJ, Vathy I (2005) Alterations of prenatal morphine exposure in μ-opioid receptor density in hypothalamic nuclei associated with sexual behavior. Brain Res Bull 65:479–485.

Stevens KE, Mickley GA, McDermott LJ (1986) Brain areas involved in production of morphine-induced locomotor hyperactivity of the C57B1/6J mouse. Pharmacol Biochem Behav 24:1739–1747.

Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felicio LF, Canteras NS (2006) A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. J Neurosci 26:2583–2589.

Uhl GR, Childers S, Pasternak G (1994) An opiate-opioid gene family reunion. Trends Neurosci 17:89–93.

Vathy I, Slamberová R, Rimanóczy A, Riley MA, Bar N (2003) Autoradiographic evidence that prenatal morphine exposure sex-dependently alters mu-opioid receptor densities in brain regions that are involved in the control of motivated, and reinforcing or rewarding behaviors and drugs of abuse. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27:381–393.

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL (2004) Opioid receptors. Annu Rev Biochem 73:953–990.

Wise RA (1996) Neurobiology of addiction. Curr Opin Neurobiol 6: 243–251.

Yim AJ, Miranda-Paiva CM, Florio JC, Oliveira CA, Nasello AG, Felicio LF (2006) A comparative study of morphine treatment regimen prior to mating and during late pregnancy. Brain Res Bull 68: 384–391.

Zagon TS, McLaughlin PJ (1992) Maternal exposure to opioids and the developing nervous system: laboratory findings. In: Maternal substance abuse and the developing nervous system (Zagon IS, Slotkin TA, eds), pp 241–282. San Diego, CA: Academic Press.

(Accepted 28 April 2006)
(Available online 6 June 2006)