EMERSON MAGNO FERNANDES DE ANDRADE

**Efeito da estimulação elétrica do córtex motor sobre
neurotransmissores na substância cinzenta periaquedutal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Erich Talamoni Fonoff

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Chacon Ruiz
Martinez

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Andrade, Emerson Magno Fernandes de
Efeito da estimulação elétrica do córtex motor
sobre neurotransmissores na substância cinzenta
periaquedutal / Emerson Magno Fernandes de
Andrade. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientador: Erich Talamoni Fonoff.

Coorientadora: Raquel Chacon Ruiz Martinez.

Descritores: 1.Córtex motor/fisiologia 2.Dor
3.Substância cinzenta periaquedutal
4.Neurotransmissores 5.Estimulação elétrica
6.Microdiálise 7.Modelos animais

USP/FM/DBD-176/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

DEDICATÓRIA

À minha esposa Priscilla, meu grande amor e eterna companheira, pelo seu apoio incondicional e por suportar a minha ausência.

Ao meu filho Heitor, cujo nascimento e leitura das primeiras palavras ocorreram durante a elaboração dessa tese, por seu carinho diário e por me lembrar que a inocência das primeiras perguntas é a base da curiosidade científica.

Aos meus pais Firmo e Geralda, meus maiores exemplos de superação, agradeço por todo o cuidado e zelo em minha criação.

Aos meus irmãos Ednara, Eritson e Evelyne pelo incentivo constante e por compartilharmos uma família unida e feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao Prof. Dr. Erich Talamoni Fonoff, a quem tenho grande admiração, pela confiança, motivação e oportunidade de iniciar esse projeto, assim como por todos os ensinamentos em neurocirurgia funcional e pesquisa.

A Profa. Dra. Raquel Chacon Ruiz Martinez, a quem sou profundamente grato, por sua amizade, paciência, compreensão e, sobretudo, pela orientação constante desde as primeiras etapas desse projeto.

A Profa. Dra. Rosana Pagano por seu apoio e gentileza desde meus primeiros dias de laboratório, além de suas valiosas sugestões e colaborações durante todos os experimentos.

Ao Prof. Dr. Ivo Lebrum, Dra. Aline Auada e funcionários do Laboratório de Biofísica e Bioquímica do Instituto Butantan pela imprescindível colaboração na realização desse projeto.

Ao Prof. Dr. Egberto Reis Barbosa por sua generosidade e compromisso na orientação desse trabalho.

À Patrícia Lopes, Daniela de Assis, Ana Carolina e Flávia Gouveia pela pronta disponibilidade e inestimável ajuda durante os experimentos.

As alunas de iniciação científica Talita Santos, Amanda Paschoa e Marina Castro pela disposição em ajudar.

A todos os estagiários, pesquisadores, funcionários e dirigentes do Laboratório de Neuromodulação e Dor Experimental do Hospital Sírio Libanês, instituição onde uma parte significativa desse projeto foi realizada, e que forneceu todo suporte com insumos e instalações para que esse trabalho fosse possível.

Ao Prof. José Pinhata Otoch e a Sra. Junko Takano Osaka do Laboratório Médico de Investigação 26 (LIM 26), Departamento de Técnica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos amigos Miguel San Martín, Jairo Angelos e todos demais estagiários pelo companheirismo e cumplicidade durante a especialização em neurocirurgia funcional no Hospital das Clínicas da FMUSP.

Aos membros do Departamento de Neurocirurgia, e da Pós-graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, representados pelo Prof. Dr. Manoel Jacobsen Teixeira e Prof. Dr. Eberval Gadelha.

À banca de qualificação, pela atenção e sugestões oportunas para continuação desse trabalho.

À Thais Figueira, pela disponibilidade no esclarecimento de minhas dúvidas e questionamentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Guedes-Pinto (*in memorian*), ao Eduardo Guedes-Pinto (*in memorian*), e a Ana Célia, pela hospitalidade, acolhimento e todas as palavras de incentivo.

Ao grande arquiteto do universo, e a todos que torceram de forma sincera para que esse projeto se concretizasse.

“After sleeping through a hundred million centuries we have finally opened our eyes on a sumptuous planet, sparkling with color, bountiful with life. Within decades we must close our eyes again. Isn’t it a noble, an enlightened way of spending our brief time in the sun, to work at understanding the universe and how we have come to wake up in it?”

Richard Dawkins

(Unweaving the Rainbow: Science,
Delusion and the Appetite for Wonder)

Normatização adotada

Essa tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptador de *International Comittee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação e dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abrevitatura dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 Mecanismo de modulação da dor	13
3.2 Substância cinzenta periaquedutal (PAG)	27
3.3 Neurotransmissores envolvidos no processamento da dor	34
3.3.1 Glicina	41
3.3.2 GABA	48
3.3.3 Glutamato	56
3.3.4 Monoaminas	63
3.3.5 Noradrenalina	63
3.3.6 Dopamina	65
3.3.7 Serotonina	68
3.3.8 Histamina	70
3.3.9 Acetilcolina	71

3.3.10 Neuropeptídeos.....	72
3.3.11 Canabinóides	74
3.4 Estimulação do córtex motor	80
4 MÉTODOS	99
4.1 Animais.....	101
4.2 Avaliação comportamental	102
4.2.1 Avaliação do limiar nociceptivo	102
4.3 Indução da dor neuropática.....	104
4.4 Procedimento cirúrgico para implante dos eletrodos de estimulação	105
4.5 Cirurgia para implante das cânulas de infusão ou cânulas guia de microdiálise	108
4.6 Estimulação elétrica do córtex motor	110
4.7 Microdiálise <i>in vivo</i>	111
4.8 Determinação da concentração dos neurotransmissores.....	115
4.9 Drogas – antagonistas.....	117
4.10 Procedimento de micro-infusão na PAG	117
4.11 Histologia.....	118
4.12 Delineamento do experimento I.....	119
4.13 Delineamento do experimento II.....	123
4.14 Análise estatística	126
5 RESULTADOS	127
5.1 Resultados do experimento I.....	129
5.1.1 Distribuição dos animais entre os grupos	129
5.1.2 Localização das sondas de microdiálise	130
5.1.3 Efeito da estimulação do córtex motor no limiar nociceptivo	133
5.1.4 Efeito da ECM sobre os níveis de glicina na PAG.....	135
5.1.5 Efeito da ECM sobre os níveis de GABA na PAG.....	138

5.1.6 Efeito da ECM sobre os níveis de glutamato na PAG	141
5.1.7 Relação entre o posicionamento das cânulas e níveis de neurotransmissores	144
5.1.7.1 Relação entre a PAGvl e níveis de neurotransmissores em animais do grupo CCI	146
5.1.7.2 Relação entre a PAGl/dl e níveis de neurotransmissores em animais do grupo CCI	150
5.2 Resultados do experimento II	154
5.2.1 Distribuição dos animais entre os grupos	154
5.2.2 Localização das cânulas de micro-injeção	156
5.2.3 Grupo 1 – Salina	158
5.2.3 Grupo 2 – Estricnina	160
5.2.3 Grupo 3 – Bicuculina	163
5.2.4 Grupo 4 – Estricnina + Bicuculina	166
5.2.5 Comparativo entre os grupos	169
6 DISCUSSÃO	173
7 CONCLUSÕES	193
8 REFERÊNCIAS	197
Apêndices.....	229

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-araquidonil-glicerol
5-HT	serotonina
7-Cl-KYNA	ácido 7-clorocinurénico
Δ^9 -THC	delta-9-tetrahidrocanabinol
A β	fibras A-beta
A δ	fibras A-beta
AP	anteroposterior
AC	adenilil ciclase
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
ANOVA	análise de variância
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
AVE	acidente vascular encefálico
BOLD	sinais dependentes da concentração de oxigênio no sangue
CB	canabinóide
CCA	córtex do cíngulo anterior
CCI	constricção crônica do nervo ciático
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CGRP	peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
COVL	córtex orbital ventrolatera
CM	núcleo talâmico centro mediano
CPF	córtex pré-frontal
CPME	substância cinzenta do corno posterior da medula espinal
DAG	diacil-glicerol

DV	dorsoventral
DP	desvio padrão
E	período de estimulação
et. al	e colaboradores
ECM	estimulação do córtex motor
E.P.M.	erro padrão da média
FLC	fosfolipase C
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo
GABA	ácido gama-aminobutírico
GAD	ácido glutâmico descarboxilase
Gli	glicina
Glu	glutamato
HA-966	1-hidroxi-3-aminopirrolidona-2
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IASP	International Association for the Study of Pain
IC	intervalo de confiança
iGluRs	receptores ionotrópicos do glutamato
IR-Fos	imunorreatividade para Fos
KYNA	ácido cinuménico
LB	período de linha de base
MCS	motor cortex stimulation
MAO-A	monoamino oxidase-A
mGluRs	receptor metabotrópicos de glutamato
ML	mediolateral
mPET	micro-tomografia por emissão de pósitron
M1	córtex motor primário

n	número da amostra
Nor	noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR	núcleo magno da rafe
NO	óxido nítrico
NPY	neuropeptídeo Y
NTET	núcleo do trato espinhal trigeminal
NTS	núcleo do trato solitário
PAG	substância cinzenta periaquedutal
PAGdl	coluna dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal
PAGl	coluna lateral da substância cinzenta periaquedutal
PAGvl	coluna ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal
PB	solução tampão-fosfato
PD	pata direita
PE	período pós-estimulação
PEES	potenciais evocados somato-sensitivos
PEA	palmitoiletanolamida
Pf	núcleo talâmico parafascicular
PFvl	córtex pré-frontal ventrolateral
PFdm	córtex pré-frontal dorsomedial
PFVm	córtex pré-frontal ventromedial
PVG	substância cinzenta periventricular
RMf	ressonância magnética funcional
RVM	bulbo rostral ventromedial
SG	substância gelatinosa do corno dorsal da medula
SNC	sistema nervoso central

SNP	sistema nervoso periférico
SP	substância P
TMS	estimulação magnética transcraniana
Vc	núcleo talâmico ventro-caudal
VIP	polipéptido intestinal vasoativo
VPI	núcleo talâmico ventral póstero-inferior
VPL	núcleo talâmico ventral póstero-lateral
VPM	núcleo talâmico ventral póstero-medial
ZI	zona incerta

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
cm	centímetro
g/s`	grama por segundo
Hz	ciclos por segundo
mg	miligrama
min	minuto
mm	milímetro
ms	milésimos de segundos
m/s	metros por segundo
pmole	picomoles
V	volt
mA	miliampere
μM	microampere
μM	micromolar
μg	micrograma
μs	microsegundo
μl	microlitro
[+]	aumento na liberação
[-]	diminuição na liberação
°C	graus Celsius
%	porcento

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho esquemático mostrando estruturas supra-segmentares e segmentares que formam os circuitos modulatórios da dor. [Adaptado de Alho e Heinsen (São Paulo-Würzburg Electronic Atlas of Human Brain Project), 2018] 15
- Figura 2** - Desenho esquemático mostrando a anatomia do giro pré-central do lobo frontal. B- Visão superior do crânio com identificação da sutura coronária e delimitação da craniotomia bilateral para exposição do giro pré-central. C- A linha 1 corresponde à distância entre a sutura coronária e o início do sulco central na linha média e a linha 2 corresponde à mesma distância em localização paramediana. [Modificado de Sarmiento et al. (2006; 2008)] 21
- Figura 3** - Sistema descendente inibidor da dor. PAG = substância cinzenta periaquedutal, RVM = bulbo rostral ventromedial, CPME = corno posterior da medula espinhal, + = ativação, - = inibição 22
- Figura 4** - Teoria do controle do portão da dor. Os interneurônios inibitórios (amarelos) localizados na substância gelatinosa (SG) do corno dorsal da medula permite ou inibe a entrada do estímulo nociceptivo oriundo da periferia para áreas mais rostrais do SNC onde ocorre a consciência da dor. [Modificado de Zheilhofer et al. (2012)] 24
- Figura 5** - Ilustração esquemática da divisão da PAG em colunas longitudinais. As porções lateral e dorsolateral da PAG estão relacionadas a estratégias ativas de sobrevivência e analgesia não mediada por opióides, enquanto a PAG ventrolateral é associada a comportamento passivo e analgesia mediada por opióides. dl = dorsolateral, dm = dorsomedial, l = lateral, vl = ventrolateral. [Modificado de Linnman et al. (2012) e Bandler et al. (2000)] 28
- Figura 6** - Ilustração esquemática das principais conexões da PAG. Córtex PFvl = córtex pré-frontal ventrolateral, Córtex PFdm = córtex pré-frontal dorsomedial, Córtex PFvm = córtex pré-frontal ventromedial, CCA = córtex do cíngulo anterior, N. accumbens = núcleo accumbens, C. somatossentivo = córtex somatossensitivo. [Modificado de Linnman et al. (2012)] 33

Figura 7 -	A- Estrutura química da glicina. B- Reconstrução tridimensional da molécula de glicina. C- Estrutura química da estriquina. D- Dendograma dos receptores estriquina-sensíveis da glicina. [Modificado de Zeiholfert et al. (2012) e https://en.wikipedia.org/wiki/Glycine].....	42
Figura 8 -	A- Estrutura química de GABA. B- Reconstrução tridimensional da molécula de GABA. C- Estrutura química da bicuculina. D- Dendograma dos subtipos dos receptores GABA. [Modificado de: Zeiholfert et al. (2012); https://en.wikipedia.org/wiki/GABA].....	50
Figura 9 -	A- Estrutura química do glutamato. B- Reconstrução tridimensional da molécula de glutamato. C- Estrutura química das moléculas NMDA, AMPA e Cainato [Adaptado de: Zeiholfert et al. (2012); https://en.wikipedia.org/wiki/Glutamic_acid].....	57
Figura 10 -	Ilustração esquemática do efeito da estimulação cortical sobre marcadores dos neurotransmissores no circuito de modulação da dor, de acordo com revisão da literatura. PAGvl = substância cinzenta periaquedutal ventrolateral, RVM = bulbo rostral ventromedial, CPME = corno posterior da medula espinhal, 5-HT = serotonina, ↑ = aumento na ação, ↓ = diminuição na ação, ⊕ = via inibitória, ⊕ = via de estimulação	97
Figura 11 -	Foto ilustrativa do teste de pressão da pata para avaliação do limiar nociceptivo.....	103
Figura 12 -	A- Exposição do nervo ciático. B- Ligadura do nervo ciático para indução de dor neuropática.....	104
Figura 13 -	A- Rato posicionado em aparelho estereotático. B- Trepanação com broca elétrica. C- Implante dos eletródios de estimulação	106
Figura 14 -	A- Representação das áreas do córtex cerebral relacionadas às regiões do corpo do rato de acordo com a resposta motora à estimulação elétrica cortical epidural. B- Destaque para a superfície óssea do crânio do rato e pontos craniométricos. PP = pata posterior, PA = pata anterior, O = olhos, C = cauda, V = vibrissas, e P = musculatura cervical, ⊗ = local de implante dos eletródios de estimulação, ⊙ = local de implante da cânula-guia de microdiálise, ◇ = bregma. [Adaptado de Fonoff et al (2009)].....	107

Figura 15 - A- Eletródio de estimulação confeccionado no laboratório. B- Conector do eletródio ao estimulador epidural. C- Estimulador portátil utilizado (Medtronic, Mineapolis, MI, USA). D- Cânulas guias feitas de aço inoxidável	107
Figura 16 - A- Imagem do posicionamento do eletródio de estimulação e da cânula de microdiálise durante coleta, permitindo o acoplamento de cabos para estimulação e conexão do sistema de microdiálise de forma adequada e simultânea. B- Desenho mostrando a relação dos eletródios (1), conexão de coleta (2) e perfusão (3) da sonda de microdiálise com o córtex motor (M1) e PAG	109
Figura 17 - A- Estimulação elétrica do córtex motor com animal acordado utilizando estimulador elétrico portátil. B- Avaliação do limiar nociceptivo na pata posterior direita na vigência da estimulação elétrica.....	110
Figura 18 - Cânula de microdiálise utilizada durante o procedimento, a membrana exposta apresentava 1 mm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro. Em detalhe o processo de diálise através da membrana semipermeável que permite passagem de substâncias com limite de 20.000 daltons. [Adaptado de: http://www.microdialysis.se/us/products/probes/cma-12].	112
Figura 19 - Visão panorâmica do posicionamento dos animais anestesiados para realização da microdiálise e estimulação cortical.....	112
Figura 20 - Protocolo de coleta do dialisado e estimulação elétrica. Após período de 90 minutos para estabilização dos neurotransmissores, o dialisado foi coletado a cada 10 minutos (3 coletas) durante a linha de base, após 15 minutos de início da estimulação cortical e em intervalos de 10 minutos (3 coletas) após o fim da estimulação	113
Figura 21 - Desenho esquemático do sistema de microdiálise <i>in vivo</i> [Modificado de Nandi (2009)]	114
Figura 22 - A- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) - (Shimadzu, UFLC Prominence). B- Detalhe da coluna C18 utilizada para análise dos aminoácidos [Fonte: http://analyticalinstrument.com/chromatography/shimadzu-prominence-hplc-system-detail].	115
Figura 23 - Cromatogramas mostrando os picos dos neurotransmissores no dialisado após a derivatização. A abscissa representa o tempo após a injeção da amostra (min)	116

Figura 24 - Imagem da bomba de infusão e do rato durante procedimento de micro-infusão na PAG.....	118
Figura 25 - A- Cérebro do rato após fixação com solução de sucrose e tampão-fosfato mostrando o local do implante da cânula-guia (seta). B e C- Cortes histológicos mostrando trajeto da cânula em relação à PAG e aqueduto (Aq).....	119
Figura 26 - Delineamento geral do experimento I mostrando a divisão dos grupos e procedimentos de implante de eletródios de estimulação e microdiálise	121
Figura 27 - Sequência temporal dos procedimentos realizados no experimento I	122
Figura 28 - Delineamento geral do experimento II mostrando a divisão dos grupos e procedimentos de micro-infusão de antagonistas na PAG	124
Figura 29 - Sequência temporal dos procedimentos realizados no experimento II	125
Figura 30 - Distribuição dos ratos entre os grupos do experimento I e motivos de exclusão.....	130
Figura 31 - Localização histológica dos locais de microdiálise na PAG em cortes coronais do cérebro do rato em quatro níveis rostrocaudais representativos da PAG. [Modificado de Paxinos e Watson (1998)].....	131
Figura 32 - Sequência temporal dos procedimentos realizados no experimento II	155
Figura 33 - Representação gráfica da localização das extremidades das cânulas de microdiálise na PAG. Os cortes coronais estão organizados em relação anteroposterior ao bregma com distância em milímetros (mm). ●, localização das cânulas quando a salina foi injetada (n = 5); ■, localização das cânulas quando a estricnina foi injetada (n = 4); ▲, localização das cânulas quando a bicuculina foi injetada (n = 6); ◆, localização das cânulas quando a estricnina e bicuculina foram injetadas simultaneamente (n = 4). [Modificado de Paxinos e Watson (1998)].....	157

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Revisão dos estudos com microdiálise <i>in vivo</i> mostrando os principais neurotransmissores liberados na PAG após diferentes tipos de estimulação	35
Quadro 2 - Principais características dos estudos de ECM em modelos animais.....	82
Quadro 3 - Revisão dos parâmetros de estimulação e características dos eletrodos em modelos animais de ECM.....	85
Quadro 4 - Localização das sondas de microdiálise em relação as regiões da PAG nos animais analisados.....	132
Quadro 5 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo para o Grupo 1 (Salina)	158
Quadro 6 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo para o Grupo 2 (Estricnina)..	161
Quadro 7 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo para o Grupo 3 (Bicuculina)	164
Quadro 8 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo para o Grupo 4 (Estricnina + Bicuculina).....	167
Quadro 9 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo entre os grupos (Salina, Estricnina, Bicuculina, Estricnina + Bicuculina)	170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados do padrão de distribuição dos diferentes tipos de neurotransmissores nos grupos de animais estudados	145
Tabela 2 -	Análise de correlação entre o posicionamento da sonda de microdiálise na localização “PAGvl” e o aumento dos neurotransmissores no grupo de animais “CCI”	146
Tabela 3 -	Análise de correlação entre o posicionamento da sonda de microdiálise na localização “PAGl e dl” e o aumento dos neurotransmissores no grupo de animais “CCI”	150
Tabela 4 -	Análise descritiva do Grupo 1 (Salina).....	159
Tabela 5 -	Análise de variância para o limiar nociceptivo entre os componentes Grupo 1 (Salina)	160
Tabela 6 -	Análise descritiva do Grupo 2 (Estricnina).....	162
Tabela 7 -	Análise de variância para o limiar nociceptivo entre os componentes do Grupo 2 (Estricnina).....	163
Tabela 8 -	Análise descritiva do Grupo 3 (Bicuculina).	165
Tabela 9 -	Análise de variância para o limiar nociceptivo entre os componentes Grupo 3 (Bicuculina).	166
Tabela 10 -	Análise descritiva do Grupo 4 (Estricnina + Bicuculina)	168
Tabela 11 -	Análise de variância para o limiar nociceptivo entre os componentes do Grupo 4 (Estricnina + Bicuculina)	169
Tabela 12 -	Análise descritiva do comparativo entre os grupos.	171
Tabela 13 -	Análise de variância para o limiar nociceptivo na comparação entre os grupos.....	172

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - ECM e resposta nociceptiva. O limiar nociceptivo foi avaliado nas patas traseiras direita dos ratos sem procedimento cirúrgico (branco, n = 7), submetidos apenas a exposição do nervo ciático (Falso-operado, n = 11) e com neuropatia periférica (CCI, n = 13). Ligadura do nervo ciático ou cirurgias simuladas foram realizadas nas patas direitas, e os eletrodos corticais foram implantados nos hemisférios esquerdos de todos os animais. O teste nociceptivo foi realizado 1) antes da cirurgia (medida inicial, MI), 2) 14 dias após a cirurgia (medida final 1, MF) e 3) durante a estimulação do córtex motor (ECM). A ECM não afetou significativamente o limiar nociceptivo em animais brancos e falso-operados, enquanto os animais CCI apresentaram diminuição no limiar nociceptivo, que foi facilmente revertido pela ECM 134
- Gráfico 2** - Variação na concentração de glicina na PAG dos animais separada por grupo 136
- Gráfico 3** - Comparação entre os grupos dos níveis relativos de glicina na linha de base (LB1-3), ECM (E) e após estimulação (PE1-3) para os grupos branco (n = 5), falso-operado (n = 5) e CCI (n = 8) de acordo com as amostras de microdiálise na PAG 137
- Gráfico 4** - Variação na concentração de GABA na PAG dos animais separada por grupo 139
- Gráfico 5** - Comparação entre os grupos dos níveis relativos de GABA na linha de base (LB1-3), ECM (E) e após estimulação (PE1-3) para os grupos branco (n = 5), falso-operado (n = 5) e CCI (n = 8) de acordo com as amostras de microdiálise na PAG 140
- Gráfico 6** - Variação na concentração de glutamato na PAG dos animais separada por grupo 142
- Gráfico 7** - Comparação entre os grupos dos níveis relativos de glutamato na linha de base (LB1-3), ECM (E) e após estimulação (PE1-3) para os grupos branco (n = 5), falso-operado (n = 5) e CCI (n = 8) de acordo com as amostras de microdiálise na PAG 143
- Gráfico 8** - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de Glicina a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGvl no grupo “CCI” 147

Gráfico 9 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de GABA a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGvl no grupo “CCI”	148
Gráfico 10 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de Glutamato a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGvl no grupo “CCI”	149
Gráfico 11 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de Glicina a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGl e dl no grupo “CCI”	151
Gráfico 12 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de GABA a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGl e dl no grupo “CCI”	152
Gráfico 13 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de Glutamato a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGl e dl no grupo “CCI”	153
Gráfico 14 - Distribuição gráfica dos valores obtidos para o limiar nociceptivo no Grupo 1 (Salina)	159
Gráfico 15 - Distribuição gráfica dos valores obtidos para o limiar de dor no Grupo 2 (Estricnina)	162
Gráfico 16 - Distribuição gráfica dos valores obtidos para o limiar de dor no Grupo 3 (Bicuculina).....	165
Gráfico 17 - Distribuição gráfica dos valores obtidos para o limiar nociceptivo no Grupo 4 (Estricnina + Bicuculina)	168
Gráfico 18 - Distribuição gráfica entre os os grupos dos valores obtidos para o limiar nociceptivo após administração intra-PAG (Salina, Estricnina, Bicuculina, Estricnina + Bicuculina).....	171

Andrade EMF. *Efeito da estimulação elétrica do córtex motor sobre neurotransmissores na substância cinzenta periaquedutal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Introdução. A estimulação do córtex motor (ECM) tem sido utilizada para o tratamento de pacientes com síndromes neuropáticas dolorosas crônicas e resistentes a tratamentos farmacológicos convencionais. O córtex motor primário pode ser a estrutura mais rostral do neuroeixo relacionada ao sistema de modulação da dor, e a ECM provoca ativação neuronal na substância cinzenta periaquedutal (PAG). A PAG é um dos principais centros do sistema descendente supressor de dor e recebe aferências de diferentes regiões do encéfalo. Esse estudo investiga o efeito da estimulação do córtex motor sobre a liberação de neurotransmissores na PAG em modelo de dor neuropática, com o objetivo de investigar os mecanismos neuroquímicos responsáveis pelo efeito terapêutico. **Métodos.** No primeiro experimento, ratos Wistar machos foram aleatoriamente divididos em três grupos. No primeiro grupo, os animais foram submetidos à indução de dor neuropática através da constrição crônica do nervo ciático, no segundo grupo, os animais foram submetidos apenas à exposição do nervo ciático e no terceiro grupo, nenhuma intervenção para indução de dor neuropática foi realizada. Todos os animais foram submetidos a implante unilateral epidural de eletródios de estimulação sobre a área do córtex motor correspondente a pata posterior e implante de cânula guia direcionada à PAG utilizando coordenadas estereotáticas. Os animais foram avaliados no teste de hiperalgesia mecânica e uma sonda de microdiálise foi introduzida em direção a PAG. As amostras de microdiálise foram coletadas e a análise dos neurotransmissores foi feita em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). No segundo experimento, ratos Wistar machos com dor neuropática induzida na pata posterior foram submetidos a implante estereotático de cânula guia direcionada à PAG, e foi realizada micro-injeção de antagonista de glicina e/ou GABA na PAG, previamente a ECM, para avaliar a influência desses antagonistas no efeito analgésico induzido pela estimulação cortical. **Resultados.** Animais submetidos à indução de dor neuropática apresentaram reversão da hiperalgesia mecânica após ECM. A estimulação cortical induziu um aumento significativo nos níveis de glicina durante (aumento de 153%) e após MCS (134%). A concentração de GABA aumentou 145% durante a estimulação epidural. Os níveis de glutamato não mostraram alteração no microdialisado da PAG após ECM. Houve uma correlação estatisticamente significativa entre o posicionamento da sonda de microdiálise nas colunas lateral e dorsolateral da PAG e o aumento na liberação do neurotransmissor glicina nos animais do grupo CCI. A administração de antagonista de glicina na PAG reverteu o efeito antinociceptivo da estimulação cortical. A micro-injeção de antagonista de GABA na PAG reverteu parcialmente o efeito da ECM. **Conclusões.** Nossos resultados sugerem que os neurotransmissores glicina e GABA, liberados na PAG durante ECM, contribuem para o efeito antinociceptivo da via analgésica descendente. Os resultados desse projeto poderão contribuir para a elucidação dos mecanismos do efeito antinociceptivo da ECM.

Descritores: córtex motor/fisiologia; dor; substância cinzenta periaquedutal; neurotransmissores; estimulação elétrica; microdiálise; modelos animais.

SUMMARY

Andrade EMF. *Role of the motor cortex stimulation on neurotransmitter in the periaqueductal gray area* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Introduction. Motor cortex stimulation (MCS) has been used for the treatment of patients with chronic neuropathic pain syndromes that are resistant to conventional pharmacological treatment. The motor cortex may be the most rostral structure in the neuroaxis responsible for pain modulation, and MCS increase the neuronal activation of periaqueductal gray (PAG). The PAG is one of the main subcortical centers of the descending pain suppressor system, and receives inputs from several brain areas. This study investigates the effects of MCS on the release of neurotransmitters in the PAG in neuropathic pain model, in order to investigate the possible neurochemical mechanisms responsible for this effect. **Methods.** In the first experiment, Wistar male rats were randomly subdivided into three surgical groups. In the first group, induction of neuropathic pain was performed through chronic constriction injury of the right sciatic nerve, in the second group, the animals were submitted just to exposure of the sciatic nerve and in the third group, no intervention for induction of neuropathic pain was performed. All the rats underwent implantation of unilateral epidural electrodes on the motor area corresponding to the right hind paw. The animals were evaluated for mechanical hyperalgesia test and a microdialysis guide cannula was stereotaxically implanted into the PAG. The microdialysate samples were collected and the neurotransmitters analysis was performed by a high- performance (HPLC). In the second experiment, animals with induced neuropathic pain in the hind paw were submitted to a stereotaxic implantation of a guidewire directed to PAG, and a microinjection of glycine and/or GABA antagonist in the PAG before the ECM was performed, to evaluate the influence of these antagonists on the analgesic effect induced by the cortical stimulation. **Results.** Animals subjected to induction of neuropathic pain showed reversal of mechanical hyperalgesia after motor cortex stimulation. Cortical stimulation induced a significant increase in glycine levels during (153 % increase) and after MCS (134%). The GABA concentration increases 145 % during transdural stimulation. Glutamate levels showed no change in PAG microdialysate after MCS. There was a statistically significant correlation between the positioning of the microdialysis probe in the lateral and dorsolateral columns of the PAG and the increase in the release of the neurotransmitter glycine in the animals of the CCI group. Administration of glycine antagonist in PAG reversed the antinociceptive effect of cortical stimulation. Microinjection of GABA antagonist in PAG partially reversed the effect of MCS. **Conclusions.** Our results suggest that the neurotransmitters glycine and GABA, released in PAG during MCS, contribute to descending antinociceptive actions. The results of this project will contribute for the elucidation of the mechanisms of the antinociceptive effect of MCS, a phenomenon that has not been fully understood currently.

Descriptors: motor cortex/physiology; pain; periaqueductal gray; neurotransmitter agents; electrical stimulation; microdialysis; models, animal.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Desde o trabalho pioneiro de Tsubokawa et al. (1991) que demonstrou que a estimulação do cortex motor produz analgesia em paciente com dor talâmica após acidente vascular encefálico (AVE), este tratamento tem obtido notoriedade no tratamento de síndromes de dor neuropática crônicas (Tsubokawa et al., 1991, 1993; Meyerson et al., 1993).

Atualmente, a ECM tem sido cada vez mais utilizada para o tratamento de pacientes com dor crônica refratária ao tratamento farmacológico convencional, apesar da falta de compreensão completa dos mecanismos subjacentes ao seu efeito antinociceptivo (Saitoh; Yoshimine, 2007; Garcia-Larrea; Peyron, 2007; Fontaine et al., 2008; Monsalve, 2012).

As síndromes dolorosas tratadas com ECM incluem dor neuropática trigeminal, dor de membro fantasma, neuralgia pós-herpética, dor pós-AVE, síndrome de dor regional complexa, dor secundária a esclerose múltipla e dor após lesão nervosa traumática cerebral e periférica (Nguyen et al., 1999; Velasco et al., 2002; Fontaine et al., 2008; Pereyra et al., 2010; Ali et al., 2011; Fagundes- Fonoff et al., 2011; W. O. Lopez et al., 2016; Parravano et al., 2018).

Um grande número de estudos demonstrou que a PAG desempenha um papel fundamental no sistema inibidor nociceptivo descendente (Meller; Dennis, 1991; Vanegas; Schaible, 2004; Sillery et al., 2005; Hadjipavlou et al., 2006; Coulombe et al., 2016). Além do mais, a ECM exerce um efeito antinociceptivo substancial e seletivo através da inibição dos neurônios sensoriais talâmicos e

pela desinibição dos neurônios no PAG, agindo com o envolvimento do sistema opióide (Fonoff et al., 2009a; Lü et al., 2010; Mendes-Gomes et al., 2011; Linnman et al., 2012; Pagano et al., 2012). A ECM induz a ativação e liberação de opióides endógenos na PAG que atuam principalmente através do bulbo rostral ventromedial (RVM) para inibir os neurônios nociceptivos presentes no corno posterior da espinhal (CPME) (Basbaum; Fields, 1984; Bandler; Shipley, 1994; Lü et al., 2010; Mendes-Gomes et al., 2011; Linnman et al., 2012).

A PAG recebe aferências de várias áreas do encéfalo, como tálamo, hipotálamo, bulbo, medula espinhal, e por sua vez atua através do RVM, um importante intermediário na modulação da dor, que se projeta diretamente no CPME (Beitz, 1982; An et al., 1998; Linnman et al., 2012).

O sistema motor aparenta estar fortemente conectado a PAG, uma vez que o córtex motor envia projeções para as divisões ventral e ventrolateral da PAG (Beitz, 1982; França et al., 2013). Além disso, dados experimentais demonstraram que o córtex motor pode ser a estrutura mais rostral no sistema nervoso central (SNC) responsável pela modulação da dor (Fonoff et al., 2009a, 2009b; Pagano et al., 2011; França et al., 2013).

Os opióides endógenos e os canabinóides podem regular a transmissão nociceptiva modulando a liberação de neurotransmissores na PAG (Sherman; Gebhart, 1974; Urca et al., 1980; Basbaum; Fields, 1984; Depaulis et al., 1987; Fürst, 1999; Monhemius et al., 2001; Renno et al., 2008; Lau; Vaughan, 2014). A primeira descrição de que aminoácidos desempenhem papel importante na modulação da dor na PAG foi publicado por Sherman e Gebhart em 1974, onde observaram através de cromatografia que o estímulo nociceptivo induz uma redução significativa nos níveis de glutamato na PAG.

Há evidências de que os aminoácidos excitatórios e inibitórios exerçam funções importantes na PAG e em outros centros encefálicos envolvidos na modulação nociceptiva (Basbaum; Fields, 1984; Cui et al., 1999; Murotani et al., 2010; Lau; Vaughan, 2014). Embora estudos clínicos e experimentais demonstrem que esses aminoácidos estão envolvidos na transmissão e modulação nociceptiva (Barbaresi et al., 1997; Renno, 1998; Cui et al., 1999; Pagano et al., 2012; Tuma et al., 2013), o mecanismo subjacente ao efeito analgésico da ECM na liberação de neurotransmissores na PAG permanece desconhecido, e muito pouco se conhece sobre as funções dos neurotransmissores no sistema modulador de dor presente na PAG (Beart et al., 1990; Lau; Vaughan, 2008; Murotani et al., 2010; Tobaldini et al., 2017).

Considerando que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, enquanto o GABA e glicina atuam como os principais aminoácidos inibitórios no SNC, a caracterização dinâmica desses neurotransmissores é especialmente valiosa para a compreensão do sistema de modulação da dor (Barbaresi, 2005; Martins et al., 2008; Morgan et al., 2009).

A justificativa para realização do presente trabalho é baseada na observação que, apesar dos neurotransmissores glutamato, GABA e glicina exercerem um papel crucial no processamento da dor na PAG, até o presente momento nenhum estudo foi realizado com o objetivo de investigar o efeito da ECM na liberação desses aminoácidos na PAG *in vivo*. Outrossim, permanece desconhecido o efeito da analgesia induzida pela ECM sobre as porções dorsal e ventral da PAG. Posto isto, realizamos experimentos utilizando ECM, teste comportamental de dor, análise de liberação de neurotransmissores por meio de microdiálise *in vivo* e micro-injeção de antagonistas desses aminoácidos na

PAG, a fim de investigar os possíveis mecanismos neuroquímicos envolvidos no efeito analgésico da ECM.

Os resultados deste projeto podem contribuir para a elucidação dos mecanismos subjacentes ao efeito analgésico da ECM, um fenômeno que até o presente momento não foi totalmente compreendido.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Investigar o efeito da estimulação elétrica do córtex motor sobre os principais neurotransmissores inibitórios e excitatório presentes na PAG de ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da estimulação elétrica do córtex motor sobre o limiar nociceptivo em ratos com dor neuropática.
- Investigar o efeito da estimulação do córtex motor sobre a liberação dos neurotransmissores glicina, GABA e glutamato na PAG de ratos com dor neuropática induzida, utilizando microdiálise *in vivo*.
- Examinar o posicionamento das sondas de microdiálise nas colunas ventrolateral e lateral/dorsolateral da PAG sobre a liberação dos neurotransmissores glicina, GABA e glutamato.
- Avaliar o efeito da microinjeção de antagonistas de receptores de GABA e/ou glicina na PAG sobre a analgesia induzida pela ECM em modelo de dor neuropática.

3 REVISÃO DA LITERATIURA

3 REVISÃO DA LITERATIURA

3.1 Mecanismo de modulação da dor

A dor neuropática é definida como a dor que surge como uma consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, seja no nível periférico ou central (Haanpää et al., 2011). A estimativa da incidência e prevalência da dor neuropática é difícil devido à ausência de critérios diagnósticos simples, porém estima-se que ela afeta cerca de 7 a 10% da população, apresentando múltiplas causas. A incidência da dor neuropática tende a aumentar devido ao envelhecimento da população, aumento da incidência de diabetes melitos e de vítimas de acidentes automobilísticos e por arma de fogo, além do avanço na sobrevida de pacientes com câncer (Colloca et al., 2017).

Os mecanismos responsáveis pelo processamento do estímulo nociceptivo envolve a interação de diferentes estruturas nervosas periféricas e centrais. A nocicepção é um fenômeno que ocorre quando o estímulo doloroso térmico, mecânico ou químico é transmitido para o sistema nervoso central (SNC), após a ativação de receptores nervosos especializados chamados de nociceptores (Fürst, 1999). Os nociceptores são terminações nervosas livres e estão amplamente distribuídos pela pele, músculos, articulações e vísceras, sendo classificados de acordo com suas respostas aos estímulos (Fürst, 1999). Após o estímulo nocivo os nociceptores geram potenciais de ação que são conduzidos ao corno posterior da medula espinhal (CPME), ou ao núcleo do

trato espinhal trigeminal (NTET) quando o estímulo tem origem no segmento cefálico (Gebhart, 2004). Existem três classes de fibras aferentes primárias, que são classificadas de acordo com seu diâmetro, velocidade de condução e presença de mielina (Fürst, 1999). As fibras A-beta ($A\beta$) são mielinizadas, apresentam um grande diâmetro e maior velocidade de condução, sendo responsáveis pela transmissão da pressão e do tato fino (Gebhart, 2004). As fibras que transmitem o estímulo nociceptivo são as fibras A-delta ($A\delta$) e C. As fibras $A\delta$ são pouco mielinizadas, possuem uma alta velocidade de condução (5 a 20 m/s) e sua ativação provoca uma sensação dolorosa aguda, intensa e bem localizada, conhecida como “primeira dor” (Fürst, 1999). As fibras C são amielínicas, de pequeno diâmetro e apresentam velocidade de condução menor que 2,0 m/s. A ativação das fibras C está associada a uma dor de início lento, em queimação e pouco localizada (Millan, 2002). A transmissão dolorosa ocorre após ativação de nociceptores que transmitem a informação dolorosa para as camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal e tronco cerebral (Heinricher et al., 2011). O sinal nociceptivo é então retransmitido para o tálamo e sistema límbico e regiões do córtex cerebral como o córtex somatosensitivo primário e secundário, córtex parietal posterior, região posterior da ínsula e córtex do cíngulo anterior, onde ocorre a discriminação, percepção e consciência da dor (Fürst, 1999).

Várias estruturas encefálicas, como o córtex motor, córtex somatosensitivo primário e secundário, córtex préfrontal, córtex do cíngulo anterior (CCA), córtex insular, hipotálamo e amígdala estão envolvidas na modulação nociceptiva (Heinricher et al., 2009). A modulação da transmissão nociceptiva é realizada através de sistemas modulatórios inibidores

descendentes que atuam sobre o CPME (Millan, 2002). Esse sistema de controle descendente também é regulado por regiões cerebrais mais rostrais, levando em consideração a sobrevivência do animal e o contexto da dor (Millan, 2002). Algumas destas estruturas se conectam diretamente ao sistema formado pela PAG, RVM e corno posterior da medula espinhal (CPME) formando o sistema modulador descendente da dor (Gebhart, 2004), como ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Desenho esquemático mostrando estruturas supra-segmentares e segmentares que formam os circuitos modulatórios da dor. [Adaptado de Alho e Heinsen (São Paulo-Würzburg Electronic Atlas of Human Brain Project), 2018].

O RVM corresponde ao núcleo magno da rafe e núcleos adjacentes da formação reticular ventrais ao núcleo reticular gigantocelular e desempenham um papel muito importante no processamento nociceptivo (Heinricher et al., 2011). Esses núcleos recebem projeções oriundas da PAG, hipotálamo posterior, núcleos noradrenérgicos do bulbo e ponte (Fürst, 1999). O RVM realiza um controle bidirecional das informações nociceptivas, exercendo um efeito prónociceptivo ou antinociceptivo, dependendo da situação e processamentos cognitivos e emocionais (Heinricher et al., 2011). Duas classes de neurônios denominados “células-ON” e “células-OFF” são responsáveis pela modulação nociceptivo e pelo controle bidirecional exercido pelo RVM (Odeh et al., 2003). Um grupo restante de neurônios por exclusão foi denominado de “células-neutras” (Fields et al., 1991). As “células-ON” produzem um aumento na sensibilidade à dor na ausência de estímulo nociceptivo e são ativadas por estruturas centrais como o hipotálamo, além de aumentar a percepção dolorosa após lesão tecidual ou inflamação. As “células-OFF” possuem efeito antinociceptivo relacionado a situações comportamentais e de estresse e medeiam a ação analgésica de receptores opióides (Fields et al., 1991). Ou seja, as “células-OFF” inibem a transmissão nociceptiva no CPME, enquanto as “células-ON” facilitam a nocicepção (Odeh et al., 2003). O RVM recebe aferências da PAG que através do funículo dorsolateral envia projeções principalmente para as lâminas superficiais e lâmina V do CPME, exercendo influência no processamento doloroso. O controle inibitório do sistema PAG-RVM preferencialmente suprime as informações nociceptivas mediadas por fibras C e não interfere na transmissão tátil e discriminativa carregadas por fibras β (Gebhart, 2004; Millan, 2002).

Embora não seja normalmente associado ao processamento da dor, o hipotálamo apresenta muitas conexões com estruturas relacionados ao componente emocional e cognitivo da dor, além de interações com a PAG, RVM e núcleo do trato solitário (NTS) (Millan, 1999). A estimulação do hipotálamo anterior inibe os neurônios de variação dinâmica ampla (WDR) presentes no CPME, e a estimulação do hipotálamo lateral provoca efeito antinociceptivo através do sistema modulador descendente formado pela PAG/RVM. O núcleo parabraquial está localizado no tegmento pontomesencefálico dorsolateral do tronco cerebral, e recebe aferências nociceptivas do CPME. Assim como o hipotálamo, o núcleo parabraquial está envolvido nas dimensões emocionais e cognitivas da dor (Millan, 2002).

O tálamo é uma importante região envolvida no processamento da dor, e recebe conexões de várias regiões encefálicas. A região lateral do tálamo é mais relacionada ao aspecto sensitivo e discriminativo da dor, enquanto a região medial talâmica é mais envolvida como processamento emocional da dor. A região lateral do tálamo recebe projeções diretas do trato espinotalâmico oriundas do CPME, além de aferências do cerebelo e tronco cerebral, sendo considerada a porção sensoriomotora do tálamo. O tálamo lateral é formado pelo núcleo ventral póstero-inferior (VPI), ventral póstero-medial (VPM) e ventral póstero-lateral (VPL), esses dois últimos sendo descritos em conjunto como núcleo ventro-caudal (Vc). Outros núcleos talâmicos mediais, como centro mediano (CM) e parafascicular (Pf) também estão envolvidos na modulação nociceptiva, porém esses núcleos parecem estar relacionados com o processamento emocional da dor (Romanelli; Esposito, 2004; Heinricher; Cleary, 2011). Em pacientes humanos, a estimulação do núcleo talâmico VPL

ou VPM produz antinocicepção em casos de dor crônica refratária a tratamento medicamentoso, como observado na dor de origem central após lesão talâmica, anestesia dolorosa e neuralgia pós-herpética (Turnbull et al., 1980; Romanelli; Esposito, 2004; Hamani et al., 2006; Nguyen et al., 2011).

O córtex pré-frontal (CPF), a região cerebral localizada anteriormente ao córtex motor, está envolvido em funções executivas, atenção, memória de trabalho e tomada de decisão (Krummenacher et al., 2010). Além dessas funções cognitivas superiores, o córtex pré-frontal também participa da modulação nociceptiva. A região dorsolateral do córtex pré-frontal tem sido associada à analgesia relacionada à expectativa sobre um tratamento, como ocorre no efeito placebo (Krummenacher et al., 2010). O córtex pré-frontal medial apresenta conexões diversas com a PAG. Regiões distintas do córtex pré-frontal medial enviam projeções para as colunas dorsolateral e ventrolateral da PAG, apoiando a hipótese de que o processamento cortical superior influencia diretamente o controle da dor (An et al., 1998). O córtex orbitofrontal lateral (COFL) está associado à tomada de decisão e ao processamento cognitivo. Estudos de neuroimagem em humanos mostram que áreas do córtex orbitofrontal são ativadas por estímulos diversos como o toque doloroso, paladar, olfato e por estímulos mais abstratos, como ganhar ou perder dinheiro (Rolls, 2004). O córtex orbitofrontal também pode está relacionado à influência do contexto na dor, onde um sistema de avaliação de dor absoluta e um sistema dependente da classificação pelo contexto da experiência dolorosa interagem para influenciar o processamento nociceptivo (Heinricher et al., 2011). Esse processamento segregado sugere que representações neurais distintas refletem aspectos sensoriais da dor e dependentes do contexto

(Winston et al., 2014). O predomínio deste último pode explicar os enigmáticos fenômenos vistos nos distúrbios de somatização (Winston et al., 2014).

O CCA está envolvido nos componentes afetivos e motivacionais da dor, agindo através do sistema supressor da dor ao nível da PAG. Foi demonstrado que a estimulação cerebral focal do CCA inibe a resposta dos neurônios do CPME à estimulação mecânica. A lesão cirúrgica do CCA, conhecida como cingulotomia, provoca uma diminuição da resposta afetiva a estímulos nociceptivos, porém sem interferir na localização topográfica do estímulo doloroso, sendo utilizada para o tratamento de dores de origem oncológicas de difícil controle (Fuchs et al., 2014; Pereira et al., 2014).

A ínsula é uma estrutura de forma triangular localizada profundamente a fissura silviana do cérebro (Peyron et al., 2000). Estudos com neuroimagem demonstraram que a ínsula participa do processamento nociceptivo (Peyron et al., 2000; Ostrowsky et al., 2002). Após estímulo nociceptivo, observou-se aumento do fluxo sanguíneo cerebral na ínsula, CCA, tálamo e córtex somatosensitivo secundário, e acredita-se que a ativação dessas estruturas esteja relacionada aos aspectos sensoriais-discriminativos do processamento nociceptivo (Peyron et al., 2000). A estimulação elétrica do córtex insular utilizando eletrodos de profundidade implantados estereotaxicamente em pacientes com epilepsia do lobo temporal refratária a drogas evoca sensações dolorosas na parte posterior superior do córtex insular, principalmente no hemisfério direito (Ostrowsky et al., 2002)

O córtex motor primário (M1) está localizado no lobo frontal, correspondendo anatomicamente ao giro pré-central ou área 4 de Brodmann (Sarmiento et al., 2006; Kandel et al., 2013), como ilustrado na Figura 2A. O

giro pré-central está limitado anteriormente pelo sulco pré-central e posteriormente pelo sulco central, e sua identificação na superfície cerebral pode ser possível através de referenciais anatômicos como a sutura coronária e o sulco central, ver Figura 2B e C (Sarmiento et al., 2008). A distância da sutura coronária para os sulcos pré-central e central é em média de 3,6 cm e 5,9 cm respectivamente, e o conhecimento destas medidas pode ser útil no planejamento de cirurgias que envolvam o córtex motor (Sarmiento et al., 2008). O córtex motor primário exerce um papel importante na iniciação dos movimentos voluntários, e existe uma representação somatotópica entre a superfície do córtex motor e as diferentes regiões corporais (Kandel et al., 2013). Esse mapa somatotópico é classicamente representado por um homúnculo motor, onde a área correspondente a perna está localizada próximo da linha média, dobrando a fissura longitudinal medial, e na convexidade lateral do córtex motor encontramos áreas que correspondem ao tronco, ombro, braço, mão, face e demais regiões corporais (Strominger et al., 2012). O córtex pré-motor está localizado anteriormente ao córtex motor primário e possui um papel importante no controle do movimento da região proximal dos membros e da musculatura axial, além de auxiliar no direcionamento dos membros em direção a um alvo específico (Strominger et al., 2012). A área motora suplementar, que corresponde a área 6 de Brodmann, desempenha um papel fundamental na programação de padrões e sequências de movimentos (Strominger et al., 2012; Kandel et al., 2013).

Figura 2 - A- Desenho esquemático mostrando a anatomia do giro pré-central do lobo frontal. B- Visão superior do crânio com identificação da sutura coronária e delimitação da craniotomia bilateral para exposição do giro pré-central. C- A linha 1 corresponde à distância entre a sutura coronária e o início do sulco central na linha média e a linha 2 corresponde à mesma distância em localização paramediana. [Modificado de Sarmento et al. (2006; 2008)]

Além de sua atividade no controle primário da motricidade, o córtex motor também exerce influência na modulação da dor. Dados experimentais demonstraram que o córtex motor pode ser a estrutura mais rostral do sistema modulador nociceptivo descendente, ver Figura 3 (Fonoff et al., 2009a, 2009b; Pagano et al., 2011; França et al., 2013). O córtex motor está fortemente

conectado as divisões ventral e ventrolateral da PAG, áreas importantes na analgesia mediada por opióides (Beitz, 1982; França et al., 2013).

Figura 3 - Sistema descendente inibidor da dor. PAG = substância cinzenta periaquedutal, RVM = bulbo rostral ventromedial, CPME = corno posterior da medula espinhal, + = ativação, - = inibição. [Adaptado de Fonoff ET, Tese FMUSP 2007].

Os potenciais somatossensoriais talâmicos e corticais foram verificados em macacos antes e durante o movimento de flexão do cotovelo, e verificou-se que existe uma supressão da transmissão somatossensitiva que ocorre antes e durante o movimento do membro (Chapman et al., 1988). Redes neurais que exercem o controle motor apresentam conexões importantes com o sistema modulador da dor e estudos neurofisiológicos demonstraram uma relação significativa entre o sistema motor e o controle nociceptivo (Chapman et al.,

1988; Fonoff et al., 2009a; Volz et al., 2015). Verificou-se que ativação do córtex motor observada durante a preparação para o movimento inibe o processamento cortical da dor, e que esse efeito possui correspondência topográfica com o membro em movimento (Kosek; Lundberg 2003; Fonoff et al., 2009a). Observou-se que em indivíduos saudáveis o limiar nociceptivo na mão esquerda aumentou após a movimentação da mão esquerda, enquanto que na mão direita, que não estava envolvida na realização do movimento, o limiar nociceptivo diminuiu (Volz et al., 2015). Esse efeito foi associado à diminuição da inibição intracortical no córtex motor primário, apoiando a associação entre controle motor e processamento da dor (Volz et al., 2015). Em termos evolutivos, a evocação de uma analgesia rápida e direcionada para os membros ativos durante a execução de um movimento pode ter um valor considerável no potencial de sobrevivência de uma espécie (Kandel et al., 2013). Durante situações de fuga e luta com outros predadores, busca de alimentos, ou mesmo na manipulação de instrumentos, o controle motor refinado e preciso está fortemente relacionado a ausência de restrições ao movimento dos membros, e para isso é fundamental o aumento do limiar nociceptivo (Pertovaara et al., 1992; Kandel et al., 2013).

A publicação da “Teoria da Comporta” em 1965 por Melzack e Wall (Figura 4) foi um marco no estudo do mecanismo fisiopatológico da dor e permitiu o desenvolvimento de sistemas de neuromodulação para o tratamento da dor crônica. Foi proposto que as vias aferentes dolorosas para o corno posterior da medula espinhal (CPME) podem ser moduladas por interneurônios inibitórios presentes na lâmina II do CPME através da estimulação de fibras de grosso calibre (A β) que transmitem informações sensitivas (Melzack; Wall,

1965). A descoberta de receptores para morfina presentes no SNC e medula espinhal abriu o caminho para o uso de analgésicos opióides no espaço epidural e intrarraquiano, e o desenvolvimento de sistemas de implantáveis de liberação de fármacos para tratamento de dores neuropáticas (Pert; Snyder, 1973).

Figura 4 - Teoria do controle do portão da dor. Os interneurônios inibitórios (amarelos) localizados na substância gelatinosa (SG) do corno dorsal da medula permite ou inibe a entrada do estímulo nociceptivo oriundo da periferia para áreas mais rostrais do SNC onde ocorre a consciência da dor. [Modificado de Zheilhofer et al. (2012)]

Segundo definição da "International Association for the Study of Pain (IASP), "a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão efetiva ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tal lesão". A dor crônica, ao contrário do que ocorre na dor aguda, é caracterizada por uma alteração nas vias fisiológicas normais que transmitem e

processam os estímulos dolorosos, podendo desencadear alodínea ou hiperalgesia. Por definição, alodínea é a sensação dolorosa para estímulos que normalmente não provocam dor (Haanpää et al., 2011). Na hiperalgesia ocorre o aumento da sensibilidade dolorosa para um estímulo que normalmente provoca dor, e envolve a sensibilização periférica dos terminais nervosos periféricos e a facilitação da transmissão nervosa no CPME (Fürst, 1999).

A dor neuropática é considerada um processo patológico caracterizado por uma dor crônica anormal, que ocorre devido a um processo de sensibilização periférica ou central decorrente de uma lesão nervosa (Colloca et al., 2017). Na dor neuropática existe um aumento da transmissão nociceptiva para os centros corticais envolvidos no processamento da dor, associado à perda do processamento discriminatório entre estímulos inócuos e nocivos (Haanpää et al., 2011). Esse aumento da transmissão dolorosa muitas vezes supera a capacidade inibitória do sistema descendente modulador da dor, contribuindo para a cronificação da dor (Fürst, 1999). A dor neuropática de origem central ocorre devido a uma lesão ou doença que afeta a medula espinhal ou cérebro, como ocorre nas doenças cerebrovasculares, neurodegenerativas e nas lesões da medula espinhal, a exemplo da siringomielia e esclerose múltipla (Honey et al., 2016). A dor neuropática de origem periférica envolve lesões que afetam as fibras C e as fibras A β e A δ . Exemplos de doenças que provocam dor neuropática de origem periférica incluem a diabetes mellitus, infecção por HIV e a síndrome de Guillain–Barré (Kremer et al., 2016). A causa principal da dor neuropática normalmente não é possível de ser tratada, sendo que o manejo da dor é centrado no tratamento dos sintomas. O tratamento de primeira-linha é feito com a combinação de

antidepressivos, como os tricíclicos e os inibidores de recaptação de noradrenalina-serotonina, e anticonvulsivantes (gabapentina e pregabalina) (Kremer et al., 2016). Os tratamentos de segunda e terceira-linha envolvem o uso de adesivos de lidocaína, capsaicina e opióides (Kremer et al., 2016; Colloca et al., 2017). Muitas terapias neuromoduladoras e intervencionistas também estão disponíveis para o tratamento da dor neuropática (Hamani et al., 2006; Hosomi et al., 2015; Honey et al., 2016). A estimulação medular epidural é baseada na teoria do portão (Melzack; Wall, 1965), e envolve a aplicação de um pulso elétrica de baixa intensidade, com frequência na faixa de 30 a 100 Hz, com o objetivo de estimular fibras A β mielinizadas para modular os sinais de dor transmitidos pelas fibras C não mielinizadas, resultando em parestesia na região dolorosa. A ECM também é utilizada para o tratamento da dor neuropática refratária e envolve a estimulação epidural do córtex motor com intensidade abaixo do limiar motor (Raslan et al., 2011; Monsalve, 2012; Fontaine et al., 2018). Além da ECM invasiva, outras opções não-invasivas incluem a estimulação magnética transcraniana (TMS) e estimulação transcraniana por corrente contínua (Hamani et al., 2006; Levy et al., 2010; Honey et al., 2016). A estimulação cerebral profunda da cápsula interna, tálamo, PAG, substância cinzenta periventricular, hipotálamo posterior e CCA também tem sido utilizada para o controle da dor neuropática refratária (Raslan et al., 2011). A infusão intratecal de fármacos também é uma opção para aplicação de medicamentos com dor crônica refratária. O uso de bombas de infusão com opióides e bupivacaina é uma opção terapêutica muito utilizada para o tratamento da dor neuropática (Hamani et al., 2006; Garcia-Larrea;

Peyron, 2007; Levy et al., 2010; Nguyen et al., 2011; Raslan et al., 2011; Monsalve, 2012; Hosomi et al., 2015; Honey et al., 2016; Colloca et al., 2017).

3.2 Substância cinzenta periaquedutal (PAG)

A PAG está envolvida na integração de funções essenciais para a sobrevivência que incluem a modulação da dor, o comportamento reprodutivo, de defesa, medo, ansiedade, regulação neurovegetativa, controle da função intestinal e vesical (Damasio et al., 2000; Linnman et al., 2012). Estudos com aminoácidos excitatórios, estimulação cerebral profunda e neuroimagem demonstram existir uma correspondência funcional e anatômica na PAG, onde as várias funções especializadas são representadas na forma de colunas neuronais longitudinais distintas, que se estendem ao longo do eixo rostrocaudal da PAG (An et al., 1998; Vianna; Brandão, 2003; Linnman et al., 2012).

A PAG recebe aferências de diferentes origens, tais como, hipotálamo, mediante fibras que trafegam na substância cinzenta periventricular PVG, córtex pré-frontal, córtex orbitofrontal medial, córtex motor, ínsula, amígdala, tálamo, loco cerúleo, formação reticular pontobulbar e CPME (Coulombe et al., 2016).

Embora a PAG humana não apresente uma definição anatômica baseada em sua citoarquitetura, em mamíferos foi proposto uma divisão em quatro colunas paralelas longitudinais distribuídas ao longo do aqueduto cerebral, a saber: PAG dorsomedial (PAGdm), dorsolateral (PAGdl), lateral (PAGl) e ventrolateral (PAGvl) (Carrive, 1993; Bandler; Shipley, 1994; Linnman

et al., 2012; Satpute et al., 2013), como ilustrado na Figura 5. Em ratos, a estimulação da PAG lateral e dorsolateral provoca estratégias de sobrevivência ativas descritas como comportamento de luta e fuga, hipertensão (associada ao aumento do fluxo sanguíneo para os membros e diminuição do fluxo para as vísceras e leitos sanguíneos extracranianos), taquicardia e analgesia não-opiíde (Bandler; Shipley, 1994). Em oposição, a estimulação ventrolateral da PAG provoca comportamentos passivos, tais como apatia, hiporreatividade a estímulos externos, hipotensão, bradicardia e analgesia mediada por opióides (Bandler; Shipley, 1994).

Figura 5 - Ilustração esquemática da divisão da PAG em colunas longitudinais. As porções lateral e dorsolateral da PAG estão relacionadas a estratégias ativas de sobrevivência e analgesia não mediada por opióides, enquanto a PAG ventrolateral é associada a comportamento passivo e analgesia mediada por opióides. dl = dorsolateral, dm = dorsomedial, l = lateral, vl = ventrolateral. [Modificado de Linnman et al. (2012) e Bandler et al. (2000)]

A distinção neuroanatômica e funcional entre os sistemas dorsal e ventral da PAG foi proposta baseada em relatos de que o antagonista opiíde

naloxona eleva o limiar de analgesia induzida pela estimulação da PAG ventral, mas não da PAG dorsal (Cannon et al., 1982). A estimulação repetida da PAG resulta na diminuição do efeito analgésico, assim como esse efeito pode ser revertido após um período de abstinência da estimulação, sugerindo um efeito similar a tolerância farmacológica (Nichols; Thorn, 1990). A tolerância cruzada entre a PAG dorsal e ventral foi descrita baseando na estimulação repetida de um dos dois alvos (Nichols; Thorn, 1990). Os sistemas descendentes inibitórios da dor na PAG podem não operar isolados um do outro, visto que, a tolerância cruzada à estimulação crônica pode ser induzida entre os sistemas (Nichols; Thorn, 1990). Além disso, a interação entre esses dois sistemas é aparentemente bidirecional e pode ser resultado da ativação conjunta de sistemas opióides e não-opióides produzida pela estimulação elétrica ou entre os sistemas dorsal e ventral do mesmo substrato neural (Nichols; Thorn, 1990).

Embora apresentem funções distintas e opostas, os sistemas formados pelas porções ventrolateral e dorsolateral da PAG não devem funcionar de forma isolada. Alguns estudos sugerem a existência de uma interação entre as subdivisões da PAG e seus sistemas descendentes (Nichols; Thorn, 1990; Vianna; Brandão, 2003; Coulombe et al., 2016).

A observação de que a estimulação elétrica da PAG no mesencéfalo de ratos produz analgesia profunda iniciou os estudos da modulação da dor como uma função específica do sistema nervoso e levou a descoberta de um circuito modulatório da dor no tronco cerebral (Reynolds, 1969). Foi postulado que o efeito analgésico produzido pela estimulação da PAG resulta de sua ação sobre o RVM e sobre os núcleos adrenérgicos A7 no bulbo, resultando na

diminuição da atividade dos neurônios das lâminas I e V do CPME (Millan, 2002).

A estimulação da parte dorsal e dorsolateral da PAG induz uma redistribuição do padrão de circulação que é direcionado das vísceras e pele para o sistema musculoesquelético, padrão semelhante ao que ocorre na preparação para o ataque, ou defesa frente a uma ameaça real ou potencial (Carrive; Bandler, 1991).

A estimulação da porção dorsal e lateral da PAG produz analgesia mediada por uma substância não-opiíde não identificada, ao contrário da estimulação da PAG ventral que produz analgesia mediada por opiídes. Os endocanabinóides podem ser mais uma das substâncias responsáveis pela analgesia relacionada à PAGdl e lateral. Assim como os opiídes, os canabinóides também produzem analgesia quando injetados na PAG, porém são efetivos quando administrados na PAG dorsal e lateral, mas não na porção ventral. O uso do antagonista canabinóide SR141716A também bloqueia o efeito analgésico produzido pela estimulação da PAG dorsal e lateral. Outra diferença entre o sistema opiíde e o canabinóide, além da localização anatômica, é o grau em que são tonicamente ativos. Os canabinóides endógenos podem regular o mecanismo tônico de supressão da dor e a disfunção desse sistema pode causar dor espontânea (Walker et al., 1999).

O sistema formado pela PAG e RVM integra funções corticais superiores que são importantes na cognição e emoção com informações aferentes do corno dorsal da medula espinhal. Esse circuito neural é essencial para a analgesia induzida por analgésicos opiídes e há evidências de que os opiídes presentes na PAG e RVM contribuam para a função moduladora da

dor, podendo existir porém uma diferenciação entre os sexos no efeito analgésico e antinociceptivo da morfina (Lloyd; Murphy, 2009).

A PAG nos seres humanos é uma estrutura pequena que apresenta a forma de um cilindro oco. Possui cerca de 10 a 14 mm de comprimento, diâmetro externo de 6 mm, e diâmetro interno de 2 a 3 mm (Linnman et al., 2012; Satpute et al., 2013). Ela não envolve completamente o aqueduto cerebral, apresentando uma descontinuidade em sua superfície ventromedial e se estende caudalmente da comissura posterior rostralmente ao nível do locus coeruleus (Linnman et al., 2012; Satpute et al., 2013).

Apesar de bem caracterizadas em ratos e outros animais, as subdivisões da PAG e suas conexões não são bem descritas em humanos. Técnicas de neuroimagem têm sido utilizadas para investigar a conexão da PAG com outras estruturas encefálicas, assim como determinar as funções relacionadas as sub-regiões da PAG em humanos. Um problema verificado nesse tipo de abordagem é a dificuldade de separar o sinal emitido pela PAG de outras estruturas, como o aqueduto cerebral e colículo superior, dado seu pequeno volume e proximidade com outros núcleos circundantes do tronco encefálico (Sillery et al., 2005; Linnman et al., 2012).

Diversas conexões eferentes e aferentes da PAG já foram identificadas em humanos. As regiões cerebrais que apresentam relações com a PAG incluem o córtex pré-frontal ventrolateral, o córtex pré-frontal dorsomedial e ventromedial, o giro do cíngulo anterior, núcleo accumbens, tálamo, hipotálamo, núcleos bulbares e pontinhos, e os giros pré e pós-central (Hadjipavlou et al., 2006), ver Figura 6.

A PAG integra informações oriundas das periferia de centros nervosos superiores, participando em várias funções neurobiológicas (Coulombe et al., 2016). Essas funções incluem a modulação descendente da dor, comportamento reprodutivo, processamento do medo, regulação cardiovascular, integração dos aspectos emocionais da regulação homeostática, funções respiratórias e relacionadas a micturação (Coulombe et al., 2016).

Um estudo com ressonância magnética (RM) funcional (RMf) observou a ativação da PAG em humanos enquanto os participantes permanenciam frente a imagens aversivas. O padrão de ativação enquanto os participantes assistiam passivamente às imagens negativas se estendia da PAGvl caudal até as porções rostrais da PAGl e e dorsomedial. A atividade nas sub-regiões distintas da PAG apresentou correlação com experiências emocionais distintas, indicando um papel da PAG na experiência emocional em humanos e sugerindo que cada sub-região da PAG esteja envolvida em circuitos funcionais distintos (Satpute et al., 2013).

Coulombe et al. (2016) utilizou RMf durante o repouso para investigar as conexões funcionais da PAG e a relação dessas conexões com as sub-regiões da PAG em humanos. Especificamente, a PAGvl apresentou conexões principalmente com regiões cerebrais associadas ao sistema modulador nociceptivo descendente como o córtex do cíngulo anterior e regiões superiores do bulbo e ponte. Enquanto a PAGdl e lateral apresentou conexões com regiões cerebrais relacionadas a funções executivas como o córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. O córtex motor, pré-motor e ínsula estavam mais conectados à PAGdl quando comparado à PAGl e ventrolateral.

Um estudo eletrofisiológico realizado através do registro de potencial elétrico de neurônios, utilizando eletrodos de estimulação cerebral profunda na PAG na substância cinzenta periventricular de humanos, evidenciou mecanismos distintos de analgesia relacionados às subdivisões da PAG (Pereira et al., 2013). A PAGdl induziu analgesia envolvendo aumento na liberação de opióides endógenos, considerando que o efeito analgésico foi bloqueado pela administração de naloxona. A ação antinociceptivo da PAGvl foi verificada através de mecanismos autonômicos, como o aumento da atividade parassimpática e das projeções vagais (Pereira et al., 2013).

Figura 6 - Ilustração esquemática das principais conexões da PAG. Córtex PFvl = córtex pré-frontal ventrolateral, Córtex PFdm = córtex pré-frontal dorsomedial, Córtex PFvm = córtex pré-frontal ventromedial, CCA = córtex do cíngulo anterior, N. accumbens = núcleo accumbens, C. somatossensitivo = córtex somatossensitivo. [Modificado de Linnman et al. (2012)]

3.3 Neurotransmissores envolvidos no processamento da dor

A transmissão sináptica no sistema nervoso central (SNC) é mediada pela liberação de neurotransmissores na fenda sináptica e na subsequente ativação de receptores pós-sinápticos (Jonas et al., 1998). Mais de 10 neurotransmissores ou moduladores, incluindo glicina, glutamato e GABA, foram identificados nas diferentes subdivisões de PAG, no entanto, não há informações sobre o envolvimento da glicina, glutamato e GABA na PAG durante a estimulação do córtex motor. Muitos desses neurotransmissores participam do controle da nocicepção na PAG. Entre esses, a glicina, o GABA, o glutamato e os opióides endógenos parecem desempenhar um papel importante (Moreau; Fields, 1986; Yuan B. Peng et al., 1996; Renno, 1998; Maione et al., 1999, 2000; Silva et al., 2000; Martins et al., 2008; Lü et al., 2010; Hahm et al., 2011; Pagano et al., 2012).

Através de extensa revisão da literatura, encontramos alguns estudos que utilizam a microdiálise para avaliar a liberação de neurotransmissores na PAG após estímulo doloroso, neuromodulação ou injeção de substâncias relacionadas ao sistema nociceptivo (Quadro 1). De uma maneira geral, pode-se observar que existe uma variação frente aos sítios de coleta nas diferentes colunas da PAG, nos modelos de estimulação e no padrão de liberação dos neurotransmissores, sugerindo um complexo sistema de modulação da resposta dolorosa.

Quadro 1 – Revisão dos estudos com microdiálise *in vivo* mostrando os principais neurotransmissores liberados na PAG após diferentes tipos de estimulação

Autor (ano)	Animais	Região da PAG	Modelo de estimulação	Neurotransmissores	Anestesia
Tuma et al. (2013)	Ratos	Não descrito	Injeção de Carragenina na pata traseira Injeção de Carragenina + paracetamol perioral	[+] glutamato [+] glicina, [-] GABA [-] glicina, [=] glutamato, [=] GABA	Não
Murotani et al. (2010)	Ratos Wistar	Dorsolateral e ventrolateral	Injeção de PFA na pata traseira Eleto-acupuntura + PFA na pata traseira Eleto-acupuntura + salina na pata traseira	[+] histamina, [+] dopamina, [=] noradrenalina [=] histamina, [=] dopamina, [+] noradrenalina [=] histamina, [=] dopamina, [=] noradrenalina	Não
Ohgami et al. (2010)	Ratos Sprague-Dawley	Não descrito	Antinocicepção induzida pela inalação de óxido nítrico	[+] β-endorfina	Não
Renno et al. (2008)	Ratos Sprague-Dawley	Lateral ventrocaudal	Injeção de Veratridine na PAG	[+] GABA, [+] glutamato, [+] taurina, [+] aspartato	Não
Fu e Longhurst (2009)	Ratos Sprague-Dawley	Ventrolateral	Eleto-acupuntura na pata traseira Eleto-acupuntura na pata traseira + injeção na PAG de antagonista do receptor CB1	[-]GABA, [=] glutamato [=] GABA, [=] glutamato	Não
Chen et al. (2009)	Ratos Sprague-Dawley	Não descrito	Injeção de formalina na pata traseira	[+] glutamato, [+] aspartato	Hidrato de cloral

Continua

Autor (ano)	Animais	Região da PAG	Modelo de estimulação	Neurotransmissores	Anestesia
Oliva et al. (2006)	Camundongos Swiss–Webster	Não descrito	Injeção intra-PAG de misoprostol Injeção de Formalina na pata traseira Injeção intra-PAG de misoprostol + formalina na pata	[+] glutamato, [+] GABA, [-] GABA [+] glutamato, [+] GABA, [-] GABA [+] glutamato, [+] GABA, [-] GABA	Não
Marabese et al. (2005)	Ratos Wistar	Não descrito	Perfusão intra-PAG de agonistas dos receptores mGlu III Perfusão intra-PAG de agonistas dos receptores mGlu8 III	[-] GABA, [+] glutamato [-] GABA, [+] glutamato	Não
Rosen et al. (2004)	Ratos Sprague-Dawley	Ventrolateral	Administração sistêmica de morfina	[+] substância P	Não
de Novellis et al. (2003)	Ratos Wistar	Ventrolateral	Perfusão intra-PAG de agonistas dos receptores mGlu 1 Perfusão intra-PAG de agonistas dos receptores mGlu 5	(+) GABA, (+) glutamato (+) GABA, (+) glutamato	Não
Le Guen et al. (2003)	Camundongos CD1 e ratos Sprague-Dawley	Não descrito	Injeção intraperitoneal de inibidor dual aminofosfínico (RB3007)	[+] encefalina	Não
de Novellis et al. (2002)	Ratos Wistar	Não descrito	Perfusão intra-PAG de agonistas dos receptores mGlu 1 Perfusão intra-PAG de agonistas dos receptores mGlu 2	[+] glicina [-] glicina	Não

Continua

Autor (ano)	Animais	Região da PAG	Modelo de estimulação	Neurotransmissores	Anestesia
Nietto et al. (2002)	Ratos Wistar	Não descrito	Injeção de naloxona Injeção intraperitoneal de morfina e indução de dependência física	(=) meta-enkefalina, (=) colecistocinina (+) meta-enkefalina, (-) colecistocinina	Não
Silva et al. (2000)	Ratos Wistar	Não descrito	Injeção de formalina na pata traseira	[+] glutamato, [+] arginina, [+] aspartato	Não
Maione et al. 2000	Ratos Wistar	Ventrolateral	Injeção de formalina na pata Injeção de formalina na pata e de tetrodotoxina na PAG Injeção de formalina na pata e de naloxona na PAG	[-] glicina, [-] glutamina [-] glicina, [=] glutamina [=] glicina, [=] glutamina	Não
Zhang et al. (2000)	Ratos Sprague-Dawley	Ventrolateral	Injeção de carragenina na pata traseira Carragenina + naloxona na PAG Carragenina + bicuculina na PAG	[+] serotonina, [+] 5-HIAA [-] serotonina, [-] 5-HIAA [+] serotonina, [+] 5-HIAA	Pentobarbital
Maione et al. 1999	Ratos Wistar	Não descrito	Injeção de Formalina na pata traseira Injeção de Formalina na pata traseira + naloxona Injeção de Formalina na pata traseira + tetrodotoxina	[-] GABA, [-] glutamato [=] GABA, [=] glutamato [-] GABA, [=] glutamato	Não

Continua

Autor (ano)	Animais	Região da PAG	Modelo de estimulação	Neurotransmissores	Anestesia
Li et al. (1999)	Ratos Sprague-Dawley	Ventrolateral	Eleto-acupuntura Eleto-acupuntura + Fenfluramina	[-] noradrenalina, [+] serotonina, [+] dopamina, [-] ácido homovalínico, [+] 5-HIAA [-] noradrenalina, [++] serotonina, [+] dopamina, [+] ácido homovalínico [++] 5-HIAA	Pentobarbital
Walker et al. (1999)	Ratos Sprague-Dawley	Não descrito	Estimulação elétrica da PAG I e d Injeção de formalina na pata traseira	[+] anandamida [+] anandamida	Uretane
Renno et al. (1999)	Ratos Sprague-Dawley	Ventrocaudal	Injeção de CFA na pata traseira	[-] GABA	Não
Renno et al. (1998)	Ratos Sprague-Dawley	Ventrocaudal	Injeção de CFA na pata traseira	[+] glutamato, [-] aspartato	Não
Maione et al. (1998)	Ratos	Não descrito	Perfusão intra-PAG de agonistas dos receptores mGlu II e III Estimulação dos receptores NMDA	[+] serotonina [-] serotonina	Não
Stiller et al. (1997)	Ratos Sprague-Dawley	Ventromedial	Injeção de morfina na PAG	[+] neurotensina	Não
Xin et al. (1997)	Ratos Sprague-Dawley	Não descrito	Estimulação dolorosa com frio	[+] substância P	Não

Continua

Autor (ano)	Animais	Região da PAG	Modelo de estimulação	Neurotransmissores	Anestesia
Stiller et al. (1996)	Ratos Sprague-Dawley	Medial	Injeção de Morfina na PAG	[-] GABA	Não
Williams et al. (1995)	Ratos Sprague-Dawley	Ventrolateral	Injeção de CFA na pata traseira Injeção sistêmica de morfina	[+] neurotensina, [+] meta-enkefalina [+] meta-enkefalina	Não
Stiller et al. (1995)	Ratos Sprague-Dawley	Ventrolateral	Estimulação medular epidural	[-] GABA, [-] glutamato, [=] serotonina, [=] substância P	Não
Mattos et al. (1995)	Ratos Sprague-Dawley	Não descrito	Administração de morfina intraperitoneal	[+] Morfina, [=] serotonina	Não
Barke et al. (1993)	Ratos	Não descrito	Injeção sistêmica de morfina	[+] Histamina	Não
Linderoth et al. (1993)	Ratos	Ventrolateral	Estimulação medular epidural em animais com dor neuropática	[-] GABA, [+] GABA, [=] serotonina, [=] substância P	Não

Continua

					Conclusão
Autor (ano)	Animais	Região da PAG	Modelo de estimulação	Neurotransmissores	Anestesia
Renno et al. (1992)	Ratos Sprague-Dawley (36)	Lateral e medial	<p>Injeção de veratridina na PAG</p> <p>Injeção sistêmica de morfina</p> <p>Injeção veratradina na PAG e sistêmica de morfina</p>	<p>[+] GABA, [+] aspartato, [+] glutamato, [+] glicina, [+] taurina, [+] ácido homocisteico</p> <p>[=] GABA, [=] aspartato, [=] glutamato, [=] glicina, [=] taurina, [=] ácido homocisteico</p> <p>[-] GABA (PAGl), [=] GABA (PAGm), [=] aspartato, [=] glutamato, [=] glicina, [=] taurina, [=] ácido homocisteico</p>	Não

[+] = aumentou a liberação, [=] = não alterou liberação, [-] = reduziu a liberação, CFA = adjuvante completo de Freund, 5-HIAA = ácido 5-hidroxi-indolacético

3.3.1 Glicina

A glicina (Figura 7A e B) é um aminoácido simples de ação rápida e um intermediário essencial em muitos processos metabólicos em todo o corpo, sendo considerado, juntamente com o GABA, um importante neurotransmissor inibitório no SNC (Renno et al., 2008). A glicina age através de receptores específicos que são seletivamente bloqueados pela estricnina (Figura 7C), um alcalóide derivado da planta *Strychnos nux vomica*, através da abertura de canais de cloreto, o que resulta em um aumento na permeabilidade de membrana e hiper-polarização de neurônios pós-sinápticos (Choi et al., 2013). A composição de subunidades dos receptores estricnina-sensíveis da glicina é pouco heterogênea, sendo limitada a quatro subunidades α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$) e uma subunidade β (Figura 7D) (Betz, 1991; Sato et al., 1991; Zeilhofer et al., 2012).

Figura 7 - A- Estrutura química da glicina. B- Reconstrução tridimensional da molécula de glicina. C- Estrutura química da estriquina. D- Dendograma dos receptores estriquina-sensíveis da glicina. [Modificado de Zeiholfert et al. (2012) e <https://en.wikipedia.org/wiki/Glycine>]

A glicina pode também agir como um co-agonista do receptor excitatório N-metil-D-aspartato (NMDA) que é estriquina-insensível (Sato et al., 1991; Renno et al., 2008; Zeilhofer et al., 2012; Tuma et al., 2013). Nos receptores NMDA, a glicina e a D-serina agem como co-agonistas do glutamato, e a presença da glicina é um pré-requisito necessário para que o neurotransmissor excitatório glutamato consiga ativar esses receptores (Berger et al., 1998; Zeilhofer et al., 2012). Foram descritos três diferentes antagonistas de glicina nos receptores NMDA, a saber, ácido 7-clorocinurénico (7-Cl-KYNA), ácido cinuménico (KYNA) e 1-hidroxi-3-aminopirrolidona-2 (HA-966). Esses três antagonistas possuem uma ação dose-dependente (Zeilhofer et al., 2012). O 7-Cl-KYNA é considerado o mais potente e seletivo antagonista de glicina

estricnina-insensível, enquanto que o KYNA atua tanto nos sítios de ligação da glicina, quanto do glutamato (Zeilhofer et al., 2012). Em contraste, o HA-966 parece atuar de acordo com um mecanismo distinto do 7-CI-KYNA (Zeilhofer et al., 2012).

O efeito da estricnina e da bicuculina, antagonistas da glicina e dos receptores GABA_A, respectivamente, na inibição induzida pelo PAG de células do trato espinotalâmico, foi avaliado no corno dorsal da medula espinal (Lin et al., 1994). A inibição das respostas dos neurônios do trato espinotalâmico aos estímulos mecânicos e térmicos cutâneos produzidos pela estimulação da PAG pode ser significativamente reduzida pela aplicação intra-espinal de estricnina ou bicuculina, com efeito dose-dependente (Lin et al., 1994). A infusão de agonistas de glicina ou GABA_A próximo a neurônios do trato espinotalâmico produziu efeito inibitório semelhante à inibição induzida pela PAG, sugerindo que glicina e GABA podem participar de antinocicepção induzida pela PAG (Lin et al., 1994).

O papel da estricnina e bicuculina no corno dorsal da medula espinal lombar de ratos foi avaliado através do registro de unidades extracelulares de neurônios do corno dorsal e da infusão de fármacos, após estimulação da PAG dorsal e dorsolateral utilizando eletrodo de aço inoxidável monopolar estereotaxicamente implantado (Peng et al., 1996). A infusão tanto de bicuculina quanto de estricnina aumentou o limiar frente à estimulação mecânica da pele dos ratos. Esses antagonistas também bloquearam significativamente a inibição induzida pela PAG das respostas aos estímulos mecânicos periféricos (Peng et al., 1996). Este experimento sugere que o mecanismo de inibição descendente induzida pela PAG na atividade dos

neurônios do corno dorsal da medula espinhal, envolve a liberação de GABA e de glicina e que há liberação tônica desses neurotransmissores inibitórios (Peng et al., 1996).

Enquanto receptores GABA_A são encontrados difusamente através do sistema nervoso de mamíferos, os receptores da glicina são distribuídos de forma mais restrita (Zeilhofer et al., 2012). A glicina é encontrada em maiores concentrações em nível medular do que em regiões supra-espinhais, sendo o principal neurotransmissor inibitório liberado por interneurônios da medula espinhal, enquanto o GABA predomina em níveis centrais (Elekes et al., 1986; Renno et al., 2008). Foi demonstrado que os interneurônios inibitórios constituem cerca de um terço da população neuronal total presente no corno dorsal da medula espinhal e são distribuídos principalmente nas lâminas I-IV do corno dorsal (Lin et al., 1994). Na porção superficial do corno dorsal, que corresponde a área de terminação dos nociceptores, a maioria dos neurônios inibitórios são puramente GABAérgicos, enquanto que nas porções mais profundas do corno dorsal os neurônios GABA e glicinérgicos co-existem (Todd; Sullivan, 1990; Zeilhofer et al., 2012; Foster et al., 2015).

Na medula espinhal e no tronco cerebral, tanto a glicina como GABA medeiam a transmissão sináptica inibitória. A imunorreatividade para glicina e GABA coexiste em subpopulações de interneurônios presentes na medula espinhal e subunidades de receptores estriknina-sensíveis da glicina e receptores GABA_A estão presentes em densidades pós-sinápticas, reforçando a hipótese que a glicina e o GABA podem ser liberados conjuntamente em neurônios da medula espinhal (Triller et al., 1987; Todd; Sullivan, 1990; Jonas et al., 1998). Jonas *et al.* (1998) investigaram a possibilidade de liberação

conjunto de glicina e GABA através de registros em neurônios localizados na região lâminar da medula espinhal. Correntes unitárias pós-sinápticas geradas nas sinapses entre interneurônios e moto-neurônios consistiram de um componente mediado por receptor de glicina estriquina-sensível, e um componente mediado por receptor de GABA, sensível à bicuculina. Esses resultados indicam que os interneurônios da medula espinhal liberam glicina e GABA para ativar receptores funcionalmente distintos em suas células alvo localizadas pós-sinápticamente (Jonas et al., 1998).

Poucho et al. (1992) avaliaram, em cérebro de ratos, a distribuição de neurônios com imunorreatividade para a glicina que estão envolvidos no processamento de informações somatosensoriais. A imunorreatividade para a glicina foi observada em vários centros somatosensoriais, incluindo a PAG, núcleo espinhal do trigêmeo, núcleo sensorial principal do trigêmeo, formação reticular, núcleos reticulares bulbar ventral e dorsal, núcleos reticulares bulbares gigantocelular, núcleos reticulares caudais da ponte e núcleos grácil e cuneiforme. Neurônios com imunorreatividade para glicina também foram encontrados no córtex cerebelar, núcleos cerebelares, córtex cerebral, hipocampo e outras áreas de integração sensorial. Essa distribuição da imunorreatividade em cérebros de ratos reforça o papel da glicina como um importante neurotransmissor no sistema sensorial, além de seu efeito bimodal em ambos receptores estriquina-sensível e estriquina-insensível (Pourcho et al., 1992).

Os níveis basais de glicina foram avaliados em ratos Sprague-Dawley adultos em três regiões do tronco cerebral envolvidas no processamento da dor. A quantificação dos neurotransmissores foi realizada utilizando técnicas de

microdiálise antes e após estimulação neuronal. As regiões avaliadas incluíam a PAG, o núcleo espinhal do trigêmeo (NET) e o núcleo magno da rafe (NMR). Os níveis basais mais altos de glicina foram observados no NMR, enquanto os níveis mais baixos foram quantificados na PAG. Após estimulação neuronal com uso da veratradina, um bloqueador do canal de cálcio, houve um significativo aumento nos níveis de glicina na PAG, NMR e NET, indicando que a glicina desempenha um papel importante como neurotransmissor inibitório nessas três regiões do tronco cerebral (Renno et al., 2008).

Cui et al. (1999) avaliaram o efeito da estimulação da PAG na liberação de serotonina (5-HT), noradrenalina (NE), glicina e GABA no corno dorsal da medula espinhal, e se a liberação desses neurotransmissores pela estimulação da PAG está associada a uma inibição nociceptiva duradoura. A PAG foi estimulada utilizando diferentes frequências (333 e 67 Hz), e as concentrações dos neurotransmissores no corno dorsal lombar foram medidas utilizando microdiálise em combinação com HPLC. Ambas faixas de estimulação produziram um aumento significativo na liberação de 5-HT, NE, glicina e aspartato no dialisado espinhal, porém o estímulo de baixa frequência foi mais potente na liberação de neurotransmissores. A concentração de GABA foi muito baixa para detecção pelo sistema utilizado. Esses resultados sugerem que a inibição duradoura induzida pela estimulação da PAG é mediada em parte pela liberação de 5-HT, NE e aminoácidos inibitórios na medula espinhal (Cui et al., 1999).

Um estudo utilizando microdiálise in vivo em ratos acordados avaliou o efeito da estimulação nociceptiva periférica na concentração extracelular de glicina liberada na PAG ventrolateral. A estimulação periférica com formalina na

pata reduziu a liberação de glicina durante a fase inicial e a fase tardia da hiperalgesia. No entanto, ao contrário do que foi observado previamente com GABA (Maione et al., 1999), a perfusão com naloxona não foi capaz de impedir a redução na concentração extracelular de glicina, nem modificou os valores basais desse aminoácido (Maione et al., 2000). Esses achados apoiam a hipótese de que, ao contrário do que foi demonstrado na medula espinhal (Jonas et al., 1998), glicina e GABA são liberados por diferentes populações de neurônios na porção ventrolateral da PAG. Além disso, a observação de que a naloxone não tem efeito sobre a diminuição dos níveis da glicina após estímulo nociceptivo periférico demonstra que os opióides endógenos não estão envolvidos. Os canabinóides endógenos possuem um papel na modulação nociceptiva na PAG, e podem ser os responsáveis pela modificação da concentração de glicina, embora o mecanismo preciso da diminuição dos níveis de glicina na PAG durante estímulo nociceptivo ainda permaneça desconhecido (Martin et al., 1993; Lichtman et al., 1996; Calignano et al., 1998; Maione et al., 1999, 2000).

A microinjeção de glicina na PAG dorsal induz hiponocicepção, avaliada através do aumento da latência no teste de retirada da cauda em ratos. Esse efeito é anatomicamente específico para a região dorsal da PAG, tendo em visto que a injeção de glicina em camadas profundas do colículo superior, aqueduto ou em porções mais ventrais como a PAG ventro-lateral não foi capaz de produzir hiponocicepção (Martins et al., 2008). Esse efeito é inibido quando a glicina é co-injectada com HA966, um antagonista dos receptores NMDA/glicina, sugerindo que esse aminoácido estava atuando nos receptores do tipo NMDA de glutamato. A hiponocicepção induzida pela glicina na PAG

dorsal é associada a um estado de ansiedade, medo e aumento da atenção para o ambiente (Martins et al., 2008).

3.3.2 GABA

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é amplamente distribuído em interneurônios inibitórios e neurônios de projeção do sistema nervoso central, sendo considerado um dos principais neurotransmissores inibitórios dos mamíferos (Figura 8A e B). Dada a sua ampla presença e concentrações relativamente elevadas no cérebro e na medula espinhal, é provável que o GABA desempenhe um papel importante na mediação ou modulação da maioria das funções do sistema nervoso central. Alguns estudos também demonstram que os agonistas do receptor GABA, assim como os inibidores da absorção e do metabolismo do GABA, apresentam atividade antinociceptiva significativa em modelos animais de dor aguda, inflamatória e neuropática (Fürst, 1999; Enna; McCarson, 2006; Hahm et al., 2011).

Três tipos de receptores GABA foram identificados com base em suas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas. O tipo predominante, denominado GABA_A, e um tipo GABA_C recentemente identificado, formam canais ligantes de cloreto, enquanto os receptores GABA_B ativam canais de cátions separados através da proteína G. Os receptores GABA_A e GABA_C são ionotrópicos, sendo formados por proteínas de membrana de múltiplas subunidades que se ligam ao GABA e que ativam a abertura de um canal iônico de cloreto intrínseco. Os receptores de GABA metabotrópicos (GABA_B)

são receptores acoplados à proteína G que ativam as correntes iônicas neuronais através de segundos mensageiros (Enz, 2001; Golan, 2009).

A ativação do receptor GABA_A aumenta a concentração neuronal de íon cloreto, hiperpolarizando a célula, de modo que a função desse receptor está sujeita a modulação por drogas que atuam em subunidades individuais ou combinações de subunidades dos receptores (Möhler et al., 2004; Enna; McCarson, 2006). Pelo menos 16 subunidades diferentes do receptor GABA_A já foram identificadas. Os sítios de ligações que formam a estrutura pentamérica do receptor GABA_A são compostos de subunidades α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π e θ , ver Figura 8D. Tendo em vista a estrutura pentamérica do receptor GABA_A e o número de subunidades descritos, existe uma numerosa quantidade de canais iônicos pentaméricos que podem ser formados pelas combinações dessas subunidades. No entanto, como apenas certas combinações de subunidades produzem uma resposta ao GABA, foram identificadas apenas cerca de 20 combinações diferentes de subunidades nos receptores GABA_A (Möhler et al., 2004; Enna; McCarson, 2006; Xing et al., 2008; Golan, 2009). O conhecimento dessas subunidades é importante, uma vez que determina a sensibilidade de um receptor particular de GABA_A a determinados agonistas ou antagonistas. O muscimol e o gaboxadol são os principais agonistas que ativam os receptores GABA_A através de sua ligação direta ao sítio de ligação do GABA. O muscimol é derivado de cogumelos da espécie *Amanita muscaria*, sendo um agonista integral em muitos subtipos de receptores. O gaboxadol em altas concentrações é um agonista parcial nos receptores GABA_A sinápticos. A bicuculina (Figura 8C) e a gabazina são antagonistas competitivos dos receptores GABA_A, enquanto a picrotoxina é um antagonista não-competitivo

dos receptores GABA_A, muitas vezes empregados para examinar a relação entre receptores GABA e dor. Os benzodiazepínicos e os barbitúricos são moduladores dos receptores GABA_A que atuam em sítios de ligação alostérica potencializando e aumentando o efeito do GABA, porém com potência e eficácia diferentes (Depaulis et al., 1987; Dickenson et al., 1997; Enz, 2001; Möhler et al., 2004; Enna; McCarson, 2006; Golan, 2009; Lau; Vaughan, 2014).

Figura 8 - A- Estrutura química de GABA. B- Reconstrução tridimensional da molécula de GABA. C- Estrutura química da bicuculina. D- Dendograma dos subtipos dos receptores GABA_A. [Modificado de: Zeiholfert et al. (2012); <https://en.wikipedia.org/wiki/GABA>]

O receptor ionotrópico GABA_A é um dos canais iônicos dependentes de ligantes que medeiam a ação do GABA. É formado por complexos de proteína oligomérica de cinco subunidades dispostos em arranjo pentamérico. Os receptores GABA_A são formados por uma nova classe de receptores GABA chamada ρ , que são classificadas em três subunidades (ρ_1 , ρ_2 e ρ_3). Eles apresentam distribuição restrita no SNC, sendo expressos principalmente na retina, e não aparentam ter influência no sistema modulatório somestésico. Recentemente, respostas aos receptores GABA_A também foram registradas em regiões superiores do encéfalo, como o colículo superior, onde parecem estar envolvidos na potencialização a longo prazo induzida por GABA. Até o presente momento, não existe nenhum fármaco disponível dirigido para os receptores GABA_A (Enna et al., 1998; Enz, 2001; Enna; McCarson, 2006; Golan, 2009).

Os receptores GABA_B ativam proteínas G que estão acopladas diretamente aos canais de K⁺ ou de Ca²⁺, ou ligadas a sistemas de segundos mensageiros, como a adenilil ciclase (AC) ou a fosfolipase C (FLC). O efluxo aumentado de K⁺ resulta em potenciais inibitórios pós-sinápticos lentos e de longa duração. A estrutura dos receptores GABA_B são semelhantes em estrutura e pertencem a mesma família dos receptores metabotrópicos do glutamato. Existem dois subtipos destes receptores, GABA_{B1} e GABA_{B2}. O baclofeno é um análogo do GABA que age como um agonista seletivo dos receptores GABA_B, sendo utilizado também como relaxante muscular. O CGP 44532 é um ácido fosfínico e agonista de receptor de GABA_B mais potente que, ao contrário do baclofeno, não apresenta tolerância relacionada a respostas antinociceptivas (Stiller et al., 1996; Enna et al., 1998; Enz, 2001; Dobrovitsky

et al., 2002; Enna; McCarson, 2006; Hyland; Cryan, 2010). Os receptores GABA_B possuem importância na modulação nociceptiva, considerando que estudos pré-clínicos demonstraram o efeito antinociceptivo do agonista GABA_B baclofeno em modelos de dor aguda e crônica. Na substância gelatinosa da medula espinal o baclofeno tem um efeito maior sobre as fibras C, sugerindo uma expressão preferencial de GABA_B em terminais aferentes desse tipo de fibra (Goudet et al., 2009).

Estudos anatômicos, farmacológicos e eletrofisiológicos sugerem que os neurônios GABAérgicos possuem um papel importante no circuito neuronal intrínseco da PAG relacionado a nocicepção e a outras funções vitais (Ogawa et al., 1994; Barbaresi et al., 1997; Maione et al., 2000; Renno et al., 2008). Sherman e Gebhart (1976) observaram que os níveis de GABA na PAG aumentaram após estímulos nociceptivos, o que implica que alguns circuitos neuronais GABAérgicos na PAG estão envolvidos em funções relacionadas à nocicepção. Sandner et al. (1981) detectaram um gradiente na concentração de GABA ao longo da região dorsolateral da PAG, com os níveis mais altos ocorrendo nas profundidades correspondentes ao aqueduto do mesencéfalo.

Há evidência de que os neurônios GABAérgicos compõem cerca de 50% da população total de neurônios presentes na PAG, estando localizados principalmente na PAG dorsal, ventrolateral e ventral (Depaulis; Bandler, 2012). Aproximadamente 40% dos terminais nervosos na PAG são GABAérgicos, e cerca de 50% dos neurônios PAG, marcadas de forma retrógrada do NMR, possuem imunorreatividade sináptica para o GABA em seus corpos e dendritos proximais (Reichling; Basbaum, 1990; Renno et al., 2008).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para identificar elementos neuronais GABAérgicos. Cada um desses métodos pode verificar diferentes estágios no ciclo de vida da molécula do GABA, desde sua síntese até sua degradação. Uma técnica utilizada para a pesquisa de elementos GABAérgicos centra-se na biossíntese da molécula GABA, isto é, por meio da detecção da descarboxilação do glutamato pela ácido glutâmico descarboxilase (GAD). Assim, a detecção imunocitoquímica da GAD rotula seletivamente apenas uma subpopulação de neurônios no SNC que sintetiza o GABA para uso como neurotransmissor (Saito et al., 1974; Depaulis; Bandler, 2012). Morgan et al. (2008) investigaram, utilizando anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico, se os neurônios GABAérgicos de projeção da PAG tinham como destino os neurônios reticuloespinhais do RVM. A avaliação imunocitoquímica com GAD67 revelou que os neurônios da PAG se projetam majoritariamente para os neurônios do RVM que se estendem para a medula espinhal. Cerca de 71% das fibras de projeção da PAG que contatam neurônios imunorreativos presentes no RVM, também continham imunorreatividade GAD67. Assim, há uma projeção inibitória de PAG para neurônios reticuloespinhais inibitórios do RVM.

Uma abordagem alternativa para identificar os neurônios GABAérgicos é o uso de anticorpos dirigidos contra a própria molécula de GABA. Ao nível do colículo inferior, os neurônios com imunorreatividade para o GABA representam aproximadamente 15% da população total de neurônios da PAG, e são mais densos no PAG ventrolateral e em uma região em forma de cunha na PAG dorsolateral (Reichling; Basbaum, 1990; Depaulis; Bandler, 2012).

Com o objetivo de localizar os elementos pós-sinápticos nas sinapses GABAérgicas, uma variedade de métodos pode ser utilizada para detectar receptores GABA na PAG. Entre elas, técnicas radiográficas, técnicas imunocitoquímicas utilizando anticorpos monoclonais contra o complexo receptor GABA_A/benzodiazepínico, e técnica de histoquímica de hibridação *in situ* utilizando uma sonda oligonucleotídica para mapear a subunidade $\alpha 1$ dos receptores GABA_A (Depaulis; Bandler, 2012). Os receptores GABA_A apresentam maior concentração na região dorsolateral da PAG rostral, e mais caudalmente no PAG dorsal e dorsolateral. Por outro lado, uma baixa concentração de receptores GABA_B foi detectada na PAG, com exceção de uma densidade moderada desses receptores que se encontram distribuídos na parte dorsolateral da PAG rostral. Igualmente, a distribuição de um neurotransmissor em uma região do SNC nem sempre está bem correlacionada com a distribuição de seu receptor (Hironaka et al., 1990; Depaulis; Bandler, 2012).

A microdiálise *in vivo* representa também uma ferramenta poderosa para estudar alterações nos níveis de GABA na PAG e em outras regiões do SNC associadas à modulação nociceptiva (Linderöth et al., 1993; Stiller et al., 1996; Renno, 1998; de Novellis et al., 2003; Nandi; Lunte, 2009). Linderöth et al. (1993) investigou, utilizando microdiálise, o efeito da estimulação medular na liberação de GABA no corno dorsal da medular espinhal e na PAG. A estimulação medular foi realizada utilizando parâmetros semelhantes aos utilizados na prática clínica com pacientes: 50 – 100 Hz; 0.2 ms e intensidade correspondente a $2/3$ do limiar motor. A estimulação induziu um aumento significativo na liberação de GABA no corno dorsal, principalmente após o

período de estimulação. Observou-se uma redução significativa da concentração de GABA na PAG ventrolateral, todavia um aumento nos níveis de GABA foi observado em alguns animais.

Renno et al. (2008) investigaram os níveis basais de GABA em três núcleos diferentes do tronco cerebral, incluindo a PAG, o núcleo magno da rafe e núcleo trigeminal espinhal. O nível basal mais alto de GABA foi observado no NMR ($0,73 \pm 0,23$ pmole), enquanto o nível mais baixo foi observado na PAG ($0,19 \pm 0,00$ pmole). Após a administração de veratridina, a maior liberação de GABA, cujo nível aumentou em $10,358 \pm 1,920\%$ em relação ao nível basal, ocorreu na PAG.

de Novellis et al. (2003) estudaram os efeitos de ligantes do receptor metabotrópicos de glutamato do grupo I (mGluR1) nas concentrações extracelulares de GABA e glutamato na PAG, utilizando microdiálise *in vivo*, em ratos em movimento livre e acordados. Demonstrou-se que os mGluR1 presentes na PAG podem modular a liberação de glutamato e GABA, tendo em vista que a infusão de agonistas desse receptor induziu uma maior liberação de glutamato e GABA na região PAG ventrolateral.

As concentrações dos neurotransmissores GABA, glicina e glutamato foram determinadas empregando técnica de eletroforese capilar na PAG. Os níveis basais de GABA, glicina e glutamato, após microdiálise na PAG ventrolateral, foram de 0,08, 4,7 e 0,8 μM respectivamente. A hiperalgesia induzida por carragenina reduziu os níveis de GABA e aumentou os níveis de glicina e glutamato presentes no microdialisato da PAG. A administração de paracetamol reduziu o aumento da concentração de glicina na PAG para o

nível basal, porém não teve efeito na liberação de GABA e glutamato (Túma et al., 2013).

Maione et al., (1999) investigou o efeito da injeção de formalina na pata de ratos, sobre a liberação de GABA e glutamato na PAG. A estimulação nociceptiva induziu uma diminuição do glutamato e do GABA na PAG, estando de acordo com outros estudos que mostram que os interneurônios GABAérgicos na PAG são inibidos por opióide (Stiller et al., 1996; Hahm et al., 2011). Considerando que a naloxona inibiu a redução na liberação de GABA e glutamato induzida por formalina, este estudo sugere que a estimulação nociceptiva pode ativar fibras opióides presentes na PAG.

Stiller et al. (1996) avaliaram o efeito da administração local de morfina em ratos acordados no nível extracelular de GABA na PAG. Nesse estudo utilizou-se eletroforese capilar com detecção de fluorescência induzida por laser em amostras de microdialisato obtidas a partir do PAG de ratos em movimento livre. A perfusão da sonda de diálise com morfina induziu uma diminuição significativa do nível de GABA, sendo que a infusão de naloxona reverteu o efeito da morfina e aumentou a concentração de GABA.

3.3.3 Glutamato

O glutamato é considerado um dos principais neurotransmissores excitatórios no SNC, sendo encontrado em metade de todas as sinapses do cérebro (Figura 9A e B). A distribuição dos receptores do glutamato no cérebro e tronco cerebral reforça o importante papel que esse neurotransmissor desempenha. Entre os vários neurotransmissores que participam do controle

da nocicepção, o glutamato desempenha um papel crucial no processamento da dor na PAG, seja estimulando diretamente as vias antinociceptivas descendentes ou modulando a liberação de outros neurotransmissores (Behbehani; Fields, 1979; Morgan et al., 1991; Jensen; Yaksh, 1992; Barbaresi et al., 1997; Maione et al., 1999; de Novellis et al., 2002).

Figura 9 - A- Estrutura química do glutamato. B- Reconstrução tridimensional da molécula de glutamato. C- Estrutura química das moléculas NMDA, AMPA e Cainato [Adaptado de: Zeiholfert et al. (2012); https://en.wikipedia.org/wiki/Glutamic_acid]

O glutamato atua principalmente em duas classes de receptores: ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos (iGluRs) quando ativados, abrem canais de membrana que permitem que os íons passem, enquanto os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) exercem seus

efeitos através de um complexo sistema de segundo mensageiro, e ativam indiretamente os canais iônicos na membrana plasmática através de uma cascata de sinalização que envolve proteínas G (Silva et al., 2000; Golan, 2009).

Existem três tipos de receptores ionotrópicos, que foram classificados de acordo com sua resposta a agonistas seletivos do glutamato: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), cainato e NMDA (Figura 9C). Cada um destes receptores é um tetrâmero, composto de combinações heteroméricas de quatro subunidades. Os receptores AMPA são compostos de: GluA1/GRIA1, GluA2/GRIA2, GluA3/GRIA3, GluA4/GRIA4; os receptores cainato são compostos de GluK1/GRIK1, GluK2/GRIK2, GluK3/GRIK3, GluK4/GRIK4, GluK5/GRIK5; e os receptores NMDA estão compostos por subunidades GluN1/GRIN1, GluN2A/GRIN2A, GluN2B/GRIN2B, GluN2C/GRIN2C, GluN2D/GRIN2D, GluN3A/GRIN3A e GluN3B/GRIN3B (Mayer, 2011; Miller et al 2011).

Existem oito tipos de receptores metabotrópicos de glutamato, a saber mGluR1-8, que são divididos em grupos I, II e III. O grupo I inclui os receptores mGluR1 e mGluR5; o grupo II os receptores mGluR2 e mGluR3; e ao grupo III pertencem os receptores mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8. Os receptores AMPA, cainato e metabotrópicos são conhecidos em conjunto como receptores não-NMDA (Coetman et al., 1987; Mayer 2011). A expressão dos receptores mGlu3 e mGlu5 já foi observada na PAG, e os receptores mGlu7 e mGlu8 possuem um papel importante na modulação descendente nociceptiva exercida pela PAG (Goudet et al., 2009).

Alguns estudos sugerem que a atividade neuronal em regiões da PAG está sob a influência do glutamato, tendo em vista que receptores de aminoácidos excitatórios e neurônios marcados com glutamato são encontrados difusamente na PAG (Albin et al., 1990; Beitz, 1990). Os sítios de ligação do glutamato foram localizados na subdivisão dorsolateral da PAG (Greenamyre et al., 1984).

Behbehani e Fields (1979) observaram que a atividade das células na PAG foi aumentada em decorrência da injeção de glutamato na porção ventrolateral da PAG. Após a microinjeção de glutamato foi avaliado o efeito sobre a atividade de células únicas no núcleo magno da rafe e sobre o reflexo de flexão da pata induzido por estímulo nociceptivo. Observou-se que o aumento na taxa de disparo das células da PAG está associado ao aumento no limiar nociceptivo que induz flexão da pata, assim como está correlacionado com um aumento na taxa de disparo na maioria das células no NMR. Esse efeito sobre o reflexo de flexão pode ser abolido por uma lesão do NRM e por injeção de naloxona previamente a infusão de glutamato na PAG (Behbehani; Fields, 1979).

O nível basal de glutamato foi determinado utilizando microdiálise em três núcleos diferentes do tronco encefálico, que incluíam a PAG, o núcleo magno da rafe e o núcleo espinhal do trigêmeo. O nível basal mais alto de glutamato foi observado no NMR, enquanto o nível mais baixo foi observado na PAG. Após estimulação neuronal com uso da veratridina, a maior liberação de glutamato foi observada na PAG, em comparação com os demais núcleos estudados (Renno et al., 2008).

Um estudo com microdiálise avaliou a liberação de aminoácidos excitatórios na PAG após estímulo com formalina na pata traseira de ratos acordados. Foi observado aumento extracelular dos níveis de arginina, aspartato e glutamato após estímulo com formalina, sugerindo que esses aminoácidos estão envolvidos na resposta da PAG a estimulação nociceptiva persistente (Silva et al., 2000). Os experimentos de controle onde foram realizadas manipulação, compressão ou a injeção de salina na pata traseira mostraram aumentos modestos ou não significantes no glutamato extracelular e na arginina no PAG, mostrando que esse fenômeno neuroquímico está relacionado à estimulação dolorosa e persistente em vez de estímulo ou estimulação nociva de curta duração (Silva et al., 2000) .

Ho et al. (2013) avaliaram as mudanças funcionais e celulares na PAG ventrolateral em ratos submetidos a um modelo de dor neuropática, para determinar se a alteração no sistema de inibição descendente nociceptivo produzido pela PAG estava envolvida com o desenvolvimento e/ou na manutenção da dor neuropática induzida por lesão nervosa. A ligadura de nervo espinhal resultou em redução bilateral da neurotransmissão glutamatérgica de longa duração na PAGvl devido à diminuição na liberação de glutamato e à resposta prejudicada nos receptores AMPA. Esta inibição na PAG da neurotransmissão glutamatérgica, que foi induzida pela lesão nervosa periférica, pode prejudicar a inibição nociceptiva descendente e contribuir para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (Ho et al., 2013).

O glutamato também pode desempenhar um papel na antinocicepção mediada por opióide na PAG. Vaughan e Christie (1997) demonstraram que os opióides agem através de receptores μ para inibir a transmissão sináptica dos

neurônios das regiões lateral e ventrolateral da PAG. Os opióides inibiram tanto a transmissão excitatória glutamatérgica quanto a inibitória GABAérgica (Vaughan; Christie, 1997). A co-localização dos receptores de opióides e glutamato, sugere que o glutamato também pode opor-se aos efeitos antinociceptivos da morfina, podendo contribuir para o desenvolvimento da tolerância aos opióides (Morgan et al., 2009). Trujillo e Akil (1991) demonstraram que o MK-801, um antagonista não competitivo do receptor NMDA, atenuou o desenvolvimento da tolerância ao efeito analgésico da morfina sem afetar a analgesia aguda induzida pela morfina. Além disso, o MK-801 atenuou o desenvolvimento da dependência da morfina conforme avaliado pelo uso da naloxona, sugerindo que os receptores de NMDA podem ser importantes no desenvolvimento de tolerância e dependência de opiáceos (Trujillo; Akil, 1991).

O glutamato também contribui para a modulação nociceptiva mediada pelos núcleos bulbares rostrais ventromediais. A ativação de um tipo de neurônio presente RVM chamado de “células-OFF” produz antinocicepção, e a microinjeção de antagonistas dos receptores NMDA no RVM inibe a ativação das “células-OFF” e da antinocicepção produzida pela administração de morfina. Levando em consideração que a antinocicepção gerada pela PAG é mediada pelos núcleos bulbares rostrais, o glutamato pode contribuir de forma diferente para a modulação nociceptiva na PAG e nos núcleos bulbares (Moreau; Fields, 1986; Morgan et al., 1998, 2009; Heinricher et al., 2009).

Em oposição a esses achados, Morgan et al. (2009) observaram que a microinjeção de antagonistas do receptor de glutamato na PAG ventral aumentou os efeitos anti-nociceptivos agudos da morfina, porém a

administração repetida de antagonistas dos receptores de glutamato não teve efeito no desenvolvimento da tolerância à morfina. A ausência de mudança na atividade nociceptiva após microinjeção de antagonistas dos receptores do glutamato na PAGv sugere que o glutamato não é tonicamente liberado, ou pode-se considerar que a sua liberação na PAG não module diretamente a nocicepção (Morgan et al., 2009).

Marabese et al. (2007) investigaram o envolvimento de receptores metabotrópicos do glutamato mGluR7 e mGluR8 presentes na PAG na modulação do RVM e nas atividades das “células-ON” e “células-OFF”. Eles demonstraram que um agonista do receptor mGluR8 no PAG, de forma semelhante aos opióides ou canabinoides, é capaz de inibir o tônus GABAérgico, levando a desinibição de neurônios antinociceptivos de saída de PAG que atua sobre os neurônios OFF presentes nos núcleos bulbares rostrais ventromediais. Em contraste, a estimulação dos receptores mGluR7 pode reduzir o controle excitatório tônico do glutamato nas vias antinociceptivas endógenas provenientes da PAG. Estes resultados mostram que a estimulação dos receptores mGluR8 ou mGluR7 presentes na PAG poderia aliviar ou piorar a percepção da dor, e esses efeitos opostos em relação a nocicepção correlacionam-se com os papéis opostos desempenhados pelo mGluR7 e mGluR8 na liberação de glutamato e GABA e atividades das “células-ON” e “células-OFF” presentes nos núcleos bulbares (Marabese et al., 2007) .

3.3.4 Monoaminas

As monoaminas atuam como neurotransmissores e neuromoduladores, e possuem em seus compostos um grupo amino conectado a um anel aromático por uma cadeia de dois carbonos. As monoaminas são derivadas de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina, triptofano pela ação de enzimas descarboxilase de aminoácidos aromáticos. As monoaminas clássicas incluem as catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina), a serotonina (5-HT) e a histamina. Os sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos são considerados um dos principais sistemas descendente de analgesia originários do tronco encefálico (Golan, 2009; Strominger et al., 2012).

3.3.5 Noradrenalina

A noradrenalina e a adrenalina são encontradas na PAG, principalmente em sua região ventrolateral. Embora existam poucos neurônios noradrenérgicos na PAG e RVM, há evidências de que os neurônios noradrenérgicos do tronco cerebral contribuam para a inibição da transmissão nociceptiva induzida pelo sistema PAG-RVM. Fibras com imunorreatividade para tirosina hidroxilase estão presentes na PAG ventrolateral (Farley; Hornykiewicz, 1977). Coincidente com a localização dessas fibras, estudos autorradiográficos *in vitro* também mostraram a presença de receptores α_2 -adrenérgicos na PAG ventrolateral (Pascual et al., 1992). Três classes principais de receptores adrenérgicos são reconhecidos: α_1 , α_2 e β . Os receptores α_2 -adrenérgicos e da noradrenalina estão presentes em grandes concentrações no CPME.

Semelhante ao observado com os opióides, a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos pode produzir sedação, analgesia e diminuição da atividade simpática central. Alguns estudos mostraram que a administração de clonidina, um agonista α_2 -adrenérgicos, além de induzir analgesia, potencializa a analgesia produzida pelos opióides (Fürst, 1999).

O controle nociceptivo endógeno é, em parte, mediado pela inibição descendente da nocicepção espinhal através da liberação da noradrenalina. A noradrenalina exerce um papel importante na modulação das projeções descendentes do tronco cerebral para o CPME. A noradrenalina excita diretamente os interneurônios inibitórios GABAérgicos da lâmina II do CPME, além de exercer um efeito inibitório em interneurônios excitatórios na região superficial do CPME. Ambos efeitos dessa monoamina formam uma sinergia na inibição descendente da informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (Gassner et al., 2009).

A inibição descendente produzida pela estimulação elétrica focal da PAG ou do núcleo magno da rafe é mediada, em parte, por receptores serotoninérgicos e α_2 -adrenérgicos. Foi demonstrado que a microinjeção de morfina na PAG produz um aumento da liberação de serotonina na medula espinhal. A inibição do reflexo de retirada da cauda produzida pela injeção de morfina na PAG é atenuada significativamente pela administração de antagonistas dos receptores noradrenérgicos e serotoninérgicos por via intratecal, com envolvimento principal dos receptores α_2 -adrenérgicos (Aimone et al., 1987).

O papel dos receptores α_2 -adrenérgicos presentes no CPME na inibição induzida pela PAG foi investigado por Peng et al. (1996). Os autores utilizaram

um sistema de microdiálise concomitante ao registro eletrofisiológico no CPME. A estimulação da PAG inibiu as respostas aos estímulos mecânicos aplicados na pele e administração de clonidina, um agonista receptores α_2 -adrenérgicos, diminui a atividade de fundo e as respostas aos estímulos mecânicos. Em contraste, a administração de antagonistas receptores α_2 -adrenérgicos aumentou as respostas das células aos estímulos mecânicos, sugerindo o envolvimento receptores α_2 -adrenérgicos no mecanismo de inibição induzida pelo PAG da atividade das células do corno dorsal (Peng et al., 1996).

3.3.6 Dopamina

A dopamina funciona no cérebro como um neurotransmissor, estando presente em maiores concentrações nos núcleos da base (Strominger et al., 2012). A dopamina pertence à família das catecolaminas, um grupo que reúne também a noradrenalina e adrenalina. Estudos farmacológicos identificaram cinco subtipos de receptores da dopamina: D₁ a D₅ (Neve, 2010). Todos eles funcionam como receptores metabotrópicos, exercendo suas ações através de um complexo de segundo mensageiro. Esses receptores podem ser divididos em duas classes, receptores do tipo D₁-like, que correspondem aos receptores D₁ e D₅, e do tipo D₂-like formado pelos receptores D₂, D₃ e D₄ (Neve, 2010). Os receptores D₁ são os mais numerosos no SNC. A dopamina pode exercer um efeito excitatório ou inibitório, dependendo de sua interação com esses receptores (Neve, 2010)

Tendo em vista que a PAG contém uma subpopulação significativa de neurônios dopaminérgicos tem sido observado que a dopamina exerce um papel importante na modulação da dor exercida pela PAG (Murotani et al.,

2010). Meyer et al. (2009) investigaram esta hipótese avaliando os efeitos eletrofisiológicos e comportamentais da injeção de agonistas e antagonistas dopaminérgicos na PAG ventrolateral. Observou-se que a dopamina inibe o sistema GABAérgico na PAG ventral similar ao que ocorre com os opióides. A modulação dopaminérgica da nocicepção na PAG está mais relacionada a fenômenos comportamentais complexos e abuso de drogas, sugerindo que a interação entre dopamina e opióides tem implicações tanto no tratamento da dor quanto da dependência por drogas (Meyer et al., 2009). Foi demonstrado que o uso da morfina aumenta a liberação de dopamina em diversas regiões do encéfalo, incluindo o córtex pré-frontal e núcleo accumbens (Di Chiara; Imperato, 1988) e que a injeção de antagonistas da dopamina diretamente na PAG ventral diminui o efeito antinociceptivo da administração sistêmica de morfina (Flores et al., 2004).

Chiou et al. (2013) observaram que a injeção de antagonista não específico dos receptores de dopamina na PAG bloqueou o efeito inibitório da ECM sobre córtex somatosensitivo primário após estímulo nociceptivo periférico. Para identificar o subtipo de receptor de dopamina envolvido no efeito inibitório da ECM, examinaram-se antagonistas específicos do receptor D₁ e D₂. Os resultados mostraram que a injeção prévia na PAG de um antagonista do receptor D₁ bloqueou o efeito da ECM, todavia esse efeito não foi exibido após a administração do antagonista de receptor D₂. A aplicação de um antagonista não específico do receptor de dopamina na PAG também bloqueou a inibição dos potenciais evocados somatosensitivos após ECM. Além do mais, a inibição dos potenciais evocados somatosensitivos após ECM foi bloqueada pela aplicação local de um antagonista do receptor D₁ na PAG,

mas não por um antagonista de D₂. Esses resultados sugerem que a PAG participa do efeito inibitório induzido pela ECM, e que esse efeito pode ser mediado pelos receptores D₁ da dopamina presentes na PAG (Chiou et al., 2013).

Com o intuito de investigar o papel dos receptores de dopamina na antinocicepção produzida pelos opióides, Tobaldini et al. (2017) observaram que a antinocicepção induzida por opióide na PAG foi bloqueada pela coadministração de antagonistas dopaminérgicos dos receptores *D₁-like* e *D₂-like*. Esse efeito antinociceptivo também foi bloqueado pela co-administração de um antagonista seletivo dos receptores do tipo *D₂-like*, bem como por um agonista dos receptores GABA_A ou por um antagonista do receptor de opióides. O efeito antinociceptivo da administração na PAG de um agonista seletivo dos receptores do tipo *D₁-like* induziu um menor efeito antinociceptivo, quando comparado a ativação dos receptores do tipo *D₂-like* (Tobaldini et al., 2017).

Murotani et al. (2010) estudaram os efeitos da acupuntura para tratamento da dor na liberação de neurotransmissores na PAG, utilizando microdiálise in vivo em ratos anestesiados. Observou-se que o estímulo nociceptivo aumenta a liberação de histamina e dopamina na PAG, porém esse efeito é abolido após eletroacupuntura (Murotani et al., 2010). O estímulo nociceptivo não teve efeito na liberação de noradrenalina, mas observou-se aumento na liberação deste neurotransmissor na PAG após eletroacupuntura. Os autores concluem que os sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e histamínico podem estar relacionados ao efeito antinociceptivo observado após acupuntura (Murotani et al., 2010).

3.3.7 Serotonina

A serotonina (5HT) foi identificada inicialmente no trato gastrointestinal, e posteriormente foi descoberto seu papel de neurotransmissor no SNC (Strominger et al., 2012)). A serotonina é degradada pela monoamino oxidase-A (MAO-A) e pela enzima aldeído desidrogenase em ácido 5-hidroxi-indoleacético. A serotonina está envolvida na modulação de funções fisiológicas importantes como medo, ansiedade, humor, dor e sono (Jeong et al., 2013a).

A serotonina está envolvida principalmente nas vias descendentes da dor com origem no núcleo magno da rafe e mesencéfalo que se projetam para a medula espinhal e prosencéfalo. A PAG, assim como o NMR, contém um denso plexo de terminais nervosos serotoninérgicos. Três diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos podem participar da modulação da dor do tronco cerebral sobre o CPME: 5-HT₁, 5-HT₂ e HT₃. Os receptores 5HT₁ foram subdivididos em quatro subtipos: 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1C} e 5HT_{1D}. Os neurônios e receptores 5-HT estão claramente envolvidos na transmissão nociceptiva. Os receptores 5-HT participam do mecanismo de inibição do CPME pelos núcleos bulbares, bem como da inibição nociceptiva induzida pelos agonistas opióides. Além disso, ocorre um aumento na liberação de 5-HT no CPME da medula espinal após a injeção de morfina na PAG de ratos (Hoyer et al., 1994; Millan et al., 1996; Fürst, 1999). Os receptores da serotonina são encontrados em concentração moderada na PAG de humanos, porém pouca variação regional é observada entre as diferentes colunas da PAG (Reddy et al., 1996)

No rato, as fibras nervosas quem contém serotonina são encontradas principalmente na PAG lateral. Uma menor concentração de fibras é observada

na PAG ventrolateral, sendo que as mesmas são raramente observadas na região dorsolateral e dorsomedial da PAG (Reddy et al., 1996; Carrive; Morgan, 2012).

A serotonina pode estar envolvida no mecanismo de tolerância cruzada entre a PAG dorsal e ventral. A tolerância na estimulação da PAG tem sido revertida pela administração de 5-HT em gatos e L-triptofano em humanos, sugerindo que a tolerância cruzada pode resultar na depleção da serotonina. Tendo em vista que a serotonina é utilizada tanto pelo sistema reversível pela naloxona quanto pelo não reversível, a depleção da serotonina encontrada na tolerância a estimulação pode ser responsável também pelo efeito da tolerância cruzada na estimulação (Nichols; Thorn, 1990).

A função inibitória da serotonina e da noradrenalina é evidenciada também pela observação clínica, e por estudos que demonstram a eficácia dos inibidores de recaptação desses neurotransmissores, como o antidepressivo duloxetine, no tratamento da dor neuropática (Kremer et al., 2016).

Um estudo celular utilizando o sumatriptano, um fármaco utilizado no tratamento da enxaqueca, demonstrou que esse fármaco desinibe as vias descendentes antinociceptivas da PAG por meio da ativação dos receptores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}. Essa desinibição ocorreria pela inibição generalizada da transmissão sináptica GABAérgica e glutamatérgica na PAG (Jeong et al., 2008). De forma semelhante, a estimulação elétrica e a microinjeção de naratriptano, um agonista dos receptores 5-HT₁, na PAG ventrolateral inibem seletivamente as respostas dos neurônios trigeminais à estimulação da dura-máter e ao seio sagital superior, indicando que os triptanos ativam as vias

descendentes antinociceptivas da PAG (Knight; Goadsby, 2001; Jeong et al., 2008).

Jeong et al. (2013) observaram que a ativação do receptor 5-HT_{2A/C} aumenta a transmissão sináptica mediada pelo receptor GABA_A em uma subpopulação de neurônios presentes na PAG lateral e dorsolateral. Esses resultado está em oposição a outros estudos, que descreveram uma inibição GABAérgica pré-sináptica induzida pela ativação dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B/D} que ocorre dentro da PAG (Jeong et al., 2013b).

3.3.8 Histamina

Além de participar do sistema imunológico, a histamina atua como neurotransmissor no cérebro e medula espinhal. Nos seres humanos, a histamina exerce suas funções principalmente pela ativação de receptores de histamina acoplados à proteína G, que são classificados como: H₁, H₂, H₃ e H₄. A histamina desempenha um papel no circuito neuroquímico de modulação nociceptiva presente na PAG (Thoburn et al., 1994). A liberação de histamina e a subsequente ativação de receptores H₂ na PAG podem ser consideradas componentes importantes da antinocicepção produzida pelos opióides. No entanto, embora a liberação de histamina não seja obrigatória para a antinocicepção produzida pelos diferentes tipos de opiáceos, sua ação na PAG pode funcionar como um mediador da antinocicepção dos opiáceos (Barke; Hough, 1993). O papel da histamina na antinocicepção foi demonstrado por vários estudos que mostram que a microinjeção de histamina na PAG de ratos provoca antinocicepção, e que a administração sistêmica ou intracerebral de

antagonistas do receptor H₂ bloqueia a antinocicepção induzida pela morfina (Hough; Nalwalk, 1992; Barke; Hough, 1992; 1993; Thoburn et al., 1994).

Um estudo com microdiálise *in vivo*, realizado por Barke e Hough (1991), avaliou o efeito da morfina nos níveis de histamina extracelular na PAG e formação reticular do mesencéfalo. A microinjeção de morfina aumentou significativamente, e de forma dependente da dose, os níveis extracelulares de histamina na PAG, enquanto nenhum efeito significativo foi observado na formação reticular mesencefálica. Além disso, a injeção de salina não produziu nenhuma alteração significativa nos níveis extracelulares de histamina na PAG (Barke; Hough, 1992).

3.3.9 Acetilcolina

A acetilcolina exerce efeito modulatório na nocicepção através de interações complexas envolvendo múltiplos receptores muscarínicos e nicotínicos (Kandel et al., 2013)). Existem cinco subtipos de receptores muscarínicos acoplados à proteína G. Esses incluem subtipos M₂ e M₄ que se acoplam através de proteínas G_{i/o} e os subtipos M₁, M₃ e M₅, que se acoplam através de proteínas G_q (Guimarães et al., 2000; Lau; Vaughan, 2008).

O sistema colinérgico pode estar envolvido na modulação nociceptiva através de sua influência nos neurônios da PAG, considerando que existe um denso plexo de terminais nervosos colinérgicos que se projetam de estruturas cerebrais, como o tegmento pontinho, para a PAG (Carrive; Morgan, 2012). A PAG também é rica em receptores muscarínicos e nicotínicos, sendo que os receptores muscarínicos estão localizados principalmente na PAG dorsolateral (Lau; Vaughan, 2008; Nakamura; Jang, 2010). A microinjeção de um agonista

colinérgico na PAG induz analgesia, sugerindo que os receptores colinérgicos contribuem para a modulação nociceptiva da PAG (Guimarães et al., 2000). Da mesma forma, um estudo mostrou que os receptores muscarínicos inibem a transmissão GABAérgica em neurônios da PAG, e que essa ação é mediada por endocanabinóides que ativam os receptores canabinóides CB₁ (Lau; Vaughan, 2008).

3.3.10 Neuropeptídeos

Os neuropeptídios também participam na transmissão de informações no sistema sensitivo e são envolvidos na inibição e na facilitação nociceptiva (Strominger et al., 2012)). Ao contrário dos demais neurotransmissores, que possuem ação rápida, os neuropeptídeos possuem início de efeito mais lento e duração mais prolongada após a liberação (Carrive; Morgan, 2012). Os peptídeos incluem opióides e não-opióides.

Existem três famílias de neuropeptídeos opióides: as encefalinas, as dinorfinas e as endorfinas. Na PAG predominam os neurônios encefalinérgicos, sendo também encontrados alguns neurônios dinorfinérgicos (Fürst, 1999). Em gatos, os neurônios encefalinérgicos predominam nas colunas ventrais e ventrolaterais da PAG. A dependência física induzida pela morfina aumenta os níveis extracelulares de meta-encefalina na PAG (Nieto et al., 2002). A liberação basal de meta-encefalina e neurotensina na PAG ventrolateral é aumentada por estímulo nociceptivo persistente, assim como pela injeção sistêmica de morfina e bicuculina, sugerindo que a liberação de encefalina na PAG induz uma maior excitabilidade dos neurônios descendentes de saída da PAG que são responsáveis pela antinocicepção (Williams et al., 1995).

Considerando que a microinjeção na PAG dos peptídeos endógenos meta-enkefalina e neurotensina produz analgesia profunda, foi proposto que esses peptídeos desempenham um papel ativo na modulação nociceptiva induzida pela PAG (al-Rodhan et al., 1991). Estudos anatômicos e neuroquímicos sugerem que os peptídeos opiáceos influenciam os neurônios excitatórios de projeção da PAG através de interneurônios GABAérgicos (Reichling; Basbaum, 1990; Renno et al., 2008). Assim, tem-se a hipótese de que os peptídeos opiáceos na PAG atuem liberando os neurônios descendentes de saída da PAG da inibição GABAérgica (Williams et al., 1995).

Os neurônios e fibras de substância P podem ser encontrados em alta concentração na PAG de humanos. A substância P desempenha um papel importante em várias funções sensoriais, principalmente através da sua interação com o receptor de neurocinina-1 (NK1) (Drew et al., 2009). Os receptores NK1 estão presentes em várias regiões cerebrais envolvidas no processamento de informações nociceptivas, incluindo a PAG (Commons; Valentino, 2002; Drew et al., 2009). As fibras relacionadas à substância P, embora sejam encontradas em toda PAG, são mais frequentes na região dorsolateral (Pioro et al., 1990). A injeção da substância P aumenta a frequência de potencial de ação dos neurônios da PAG, e suprime a transmissão GABAérgica em neurônios da PAG que fazem parte da via descendente PAG-RVM. A supressão da transmissão GABAérgica em neurônios de projeção PAG-RVM ocorre por ativação de receptores metabotrópicos de glutamato do grupo I e sinalização retrógrada dos endocanabinóides (Drew et al., 2009). Além disso, a substância P é liberada na PAG em resposta a estimulação periférica nociva, sugerindo que a substância

P endógena pode contribuir para a analgesia descendente mediada pela PAG (Xin et al., 1997).

Evidências fisiológicas sugerem que a neurotensina tem ações fisiológicas importantes na PAG e está envolvida na inibição nociceptiva (Behbehani et al., 1987). A neurotensina apresenta uma distribuição irregular entre as várias estruturas do sistema nervoso central (Mai et al., 1987). Na PAG de humanos, a neurotensina é encontrada em alta concentração, principalmente nas regiões medial e dorsomedial da PAG (Shipley et al., 1987).

A somatostatina (SST), galanina (GAL), polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) também estão presentes ao longo da extensão rostrocaudal da PAG (Smith et al., 1994).

3.3.11 Canabinóides

Vários estudos demonstram que os canabinóides produzem antinocicepção agindo em diferentes sítios localizados no cérebro e na medula espinhal (Martin et al., 1993; Lichtman et al., 1996; Calignano et al., 1998; Pertwee, 2001; Walker e Huang, 2002; Walker e Hohmann, 2005; Woodhams et al., 2017). As principais regiões envolvidas na antinocicepção induzida pelos canabinóides incluem o tálamo, a PAG, RVM, o corno dorsal da medula espinhal, o gânglio da raiz dorsal e os terminais nervosos periféricos (Pertwee, 2001).

Os mais importantes canabinóides endógenos são a anandamida, o 2-araquidonil-glicerol (2-AG) e a o 2-araquidonil-glicerol-éter. Esses canabinóides podem agir como neuromoduladores ou neurotransmissores (Pertwee, 2001). A

concentração desses canabinóides endógenos não é homogênea no sistema nervoso central, no entanto eles estão presentes em maiores concentrações no tronco cerebral, hipocampo e estriado (Walker; Huang, 2002). Os receptores canabinóides e seus agonistas endógenos juntos constituem o que agora é frequentemente referido como o "sistema endocanabinóide" (Lichtman et al., 1996). Muitas pesquisas sobre o efeito antinociceptivo dos canabinóides foram realizadas utilizando compostos prototípicos das quatro principais classes químicas de agonistas dos receptores de canabinóides, a saber: delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), CP55940, WIN55212 e anandamida (Pertwee, 2001). Análogos desses compostos como o delta-8-tetrahydrocannabinol, cannabinol, canabidiol e canabigerol também já foram investigados quanto a suas propriedades antinociceptivas (Pertwee, 2001). Dois tipos de receptores canabinóides foram identificados, o receptor canabinóide CB₁ e o CB₂, sendo que ambos são acoplados a proteína G (Beltramo, 2009). Os receptores CB₁ são encontrados particularmente em altas concentrações no sistema nervoso central, porém eles também estão presentes em alguns neurônios periféricos. Os receptores CB₂ são encontrados principalmente nas células do sistema imunológico, onde podem ter um papel importante do sistema imunossupressor (Pertwee, 2001).

Foi demonstrado que a anandamida atenua o efeito nociceptivo produzido por danos químicos ao tecido cutâneo ao interagir com os receptores canabinóides do tipo CB₁ localizados fora do SNC. O composto palmitoiletanolamida (PEA), um lipídeo que ocorre naturalmente em nosso organismo, e é liberado em conjunto com anandamida, exerce um efeito semelhante ao ativar receptores CB₂ periféricos. Calignano et al. (1998)

observaram que quando administrados em conjunto, os dois compostos atuam sinergicamente, reduzindo significativamente a resposta a dor, quando comparado ao efeito individual desses compostos. Além do mais, avaliação por cromatografia gasosa/espectrometria de massa mostraram que os níveis de anandamida e PEA na pele são suficientes para causar uma ativação tônica de receptores canabinóides locais. Esses resultados indicam que os receptores CB1 periféricos e CB2 participam da modulação inicial da percepção dolorosa, e que a anandamida e a PEA geradas localmente podem mediar esse efeito (Calignano et al., 1998).

Lichtman et al. (1996) investigaram regiões cerebrais que medeiam a antinocicepção induzida por canabinóides em ratos, avaliada através do teste de retirada da cauda. A administração intraventricular de Δ^9 -THC e CP55940 produziu antinocicepção, assim como efeitos hipotérmicos e catalépticos também foram observados após administração ventricular de CP55940, mas não de Δ^9 -THC. A microinjecção de CP55940 na PAG ventrolateral, na região dos núcleos dorsais da rafe, produziu antinocicepção associada a estado de catalepsia e hipotermia (Lichtman et al., 1996). A administração de CP55940 na região posterior da PAG dorsolateral ou na porção anterior da PAG ventrolateral não produziu efeito antinociceptivo. Esses resultados sugerem que a região posterior da PAG ventrolateral pode ser uma área cerebral importante na indução do efeito antinociceptivo dos canabinóides (Lichtman et al., 1996).

A ativação do CB₁ está relacionada a efeitos psicotrópicos, limitando o desenvolvimento de fármacos agonistas desses receptores para tratamento de quadros álgicos (Beltramo, 2009). Recentemente, tem sido estudado o uso de

fármacos seletivos ao CB₂ para tratamento da dor crônica. A vantagem dos agonistas seletivos CB₂ reside na possibilidade de indução do efeito analgésico sem os efeitos colaterais psicotrópicos. A evidência do efeito analgésico dos agonistas seletivos de CB₂ foi obtida em modelos de dor crônica inflamatória e neuropática (Beltramo, 2009).

O efeito antinociceptivo dos canabinóides e opiáceos ocorrem, em parte, devido a ativação da PAG. Assim como os opiáceos, os canabinóides induzem analgesia quando microinjetados na PAG. Algumas evidências sugerem que esta ativação ocorre através de mecanismos distintos, considerando que as sub-regiões anatômicas da PAG relacionadas ao efeito antinociceptivo dos canabinóides são diferentes daqueles mediada por opiáceos (Wilson et al., 2008). Os canabinóides agem principalmente nas regiões dorsal e lateral da PAG, tendo um efeito menos importante na PAG ventral (Martin et al., 1993).

Uma vez que os mecanismos antinociceptivos são distintos, então a tolerância cruzada entre opióides e canabinóides parece não ocorrer (Wilson et al., 2008). Wilson et al. (2008) investigaram esta hipótese medindo o efeito antinociceptivo da microinjeção de morfina na PAG ventrolateral de ratos pré-tratados com o canabinóide HU-210 durante dois dias. Ratos Sprague-Dawley machos foram injetados duas vezes ao dia durante dois dias consecutivos com morfina, HU-210 (ou morfina combinada com HU-210 na PAG ventrolateral. As injeções repetidas de morfina induziram uma tolerância no terceiro dia, no entanto, nenhuma tolerância foi observada em ratos tratados previamente com morfina combinada com HU-210 (Wilson et al., 2008). A aplicação isolada de HU-210 aumentou a antinocicepção provocada pela morfina. Este aumento foi bloqueado pelo pré-tratamento de ratos com o antagonista do receptor de

canabinóides AM-251. Não houve evidência de tolerância cruzada entre morfina e HU-210, e o pré-tratamento com canabinóides aumentou o efeito antinociceptivo da microinjeção de morfina na PAG ventrolateral. Os achados descritos sugerem que o tratamento com opióides, alternado com uso de canabinóides pode prevenir o desenvolvimento da tolerância e aumentar a antinocicepção da morfina (Wilson et al., 2008).

Outro estudo também avaliou o efeito da administração conjunta de opióides e canabinóides no aumento do limiar nociceptivo, mesmo quando administrado em dias diferentes (Wilson-Poe et al., 2013). A administração repetida de morfina mostrou aumentar o efeito antinociceptivo do tetrahydrocannabinol administrado 12 horas mais tarde, e a microinjeção repetida do agonista do receptor canabinóide HU-210 na PAG ventrolateral provocou um aumento no efeito antinociceptivo de morfina administrada 1 dia depois. Esses resultados complementam o estudo anteriormente descrito, mostrando que as interações entre a morfina e os canabinóides são bidirecionais e que a PAG ventrolateral desempenha um papel importante neste efeito (Wilson-Poe et al., 2013).

A estimulação elétrica da PAG dorsal e lateral produz analgesia mediada pelo receptor CB₁, acompanhada por um aumento na liberação de anandamida na PAG, sugerindo que esse canabinóide desempenha um importante papel no sistema de supressão da dor existente na PAG lateral e dorsal. A analgesia induzida pela estimulação elétrica dessas regiões da PAG é bloqueada pelo antagonista canabinóide SR141716A. Os canabinóides endógenos na PAG dorsal e lateral representam um componente importante do sistema de analgesia não-opióide. O entendimento desse sistema supressor canabinérgico

pode ser útil para o desenvolvimento de estratégias de controle da dor nos casos não responsivos aos opióides (Walker et al., 1999).

Martin et al. (1993) investigaram a contribuição de estruturas periventriculares no efeito antinociceptivo dos canabinóides utilizando técnicas de micro-injeção e o teste de retirada da cauda em ratos. As cânulas guia foram implantadas acima das seguintes estruturas periventriculares: a área septal medial, habênula lateral, área peri-hipotalâmica, núcleo arqueado do hipotálamo, o núcleo dorsal da rafe e região dorsolateral e ventrolateral da PAG. As microinjecções do agonista canabinóide WIN 55212-2 (5µg/0,5µl) na área septal medial, habênula lateral, área peri-hipotalâmica, núcleo arqueado e PAG ventrolateral não afetaram significativamente as latências no teste de retirada da cauda. Em contrapartida, as micro-injecções de WIN55212-2 na porção dorsolateral da PAG e na rafe dorsal aumentaram significativamente as latências de retirada da cauda, sugerindo que essas duas estruturas estejam envolvidas no efeito antinociceptivo dos canabinóides (Martin et al., 1995)

Assim como os opióides, os canabinóides podem induzir antinocicepção ao reduzir as influências inibitórias dos neurônios GABAérgicos que se projetam a partir da PAG e RVM. Esta hipótese baseia-se na evidência de que os canabinóides atuam nos receptores CB₁ pré-sinápticos dessas áreas do cérebro para inibir a liberação de GABA. No entanto, em contraste com os opióides, não foi demonstrada ação pós-sináptica direta dos canabinóides sobre os neurônios do RVM ou sobre a PAG (Vaughan et al., 1999, 2000). Ademais, o efeito antinociceptivo dos canabinóides pode estar relacionado à liberação de glutamato na medula espinhal, e depender, em certa medida, de uma desinibição indireta da liberação de dopamina nos receptores D₂, da

ativação pela noradrenalina dos $\alpha 2$ -adrenoceptores espinhais, e do efeito dos opióides nos receptores μ -cerebrais e κ presentes na coluna vertebral (Pertwee, 2001).

3.4 Estimulação do córtex motor

Os primeiros estudos em modelos animais sobre o efeito e mecanismos da ECM no tratamento da dor crônica (Rusina et al., 2005; Senapati et al., 2005b; Vaculín et al., 2008) só foram publicados muitos anos após o trabalho pioneiro de Tsubokawa et al. (1991).

Através de uma extensa revisão da literatura encontramos 16 artigos que avaliaram os efeitos da estimulação invasiva do cortex motor em modelos animais (Rusina et al., 2005; Senapati et al., 2005a; Shijo et al., 2008; Vaculín et al., 2008; Fonoff et al., 2009a; Viisanen; Pertovaara, 2010a, 2010b; Lucas et al., 2011; Viisanen et al., 2012; Pagano et al., 2011; 2012; Chiou et al., 2012; 2013; França et al., 2013; Jiang et al., 2014; Kim et al., 2015; Silva et al., 2015). Os quadros 3 e 4 descrevem as principais características dos estudos e os parâmetros de estimulação e eletrodos utilizados em modelos animais de ECM.

Para testar a teoria de que a ativação do córtex motor produz inibição dos neurônios do CPME, Senapati et al. (2005) registraram neurônios do corno dorsal da medula espinhal de ratos Sprague–Dawley em resposta à estimulação mecânica periférica durante MCS. Para isso, diferentes parâmetros de estimulação elétrica no córtex motor foram gradualmente aplicados (300 Hz, 0,1ms, a 10, 20 e 30 V). Em ratos, a ECM produziu inibição significativa das respostas dos neurônios presentes no CMPE aos estímulos

mecânicos, porém sem afetar sua resposta a um estímulo inócuo (Senapati et al., 2005b).

Estudos em humanos demonstraram que a estimulação elétrica do córtex sensitivo não produz inibição nociceptiva significativa (Tsubokawa et al., 1991; 1993). Em oposição a esses resultados, Senapati et al. (2005) relataram uma redução significativa da resposta neuronal induzida por estímulos mecânicos no corno dorsal da medula espinhal, durante a estimulação do córtex somatosensitivo em ratos (Senapati et al., 2005). Embora seja descrito que os neurônios do trato córtico-espinhal de ratos se originam não apenas do córtex motor, mas também do córtex somatosensitivo primário (Miller, 1987), outros estudos com ratos não demonstraram efeito antinociceptivo após estimulação elétrica do córtex somatosensitivo (Fonoff et al., 2009; Kuroda et al., 2000; França et al., 2013). Kuroda et al. (2000) observaram que a estimulação do córtex somatossensorial secundário produziu antinocicepção fraca após aplicação de formalina na pata de ratos, mas não teve efeito sobre estímulos nociceptivos térmicos ou mecânicos.

Quadro 2 - Principais características dos estudos de ECM em modelos animais

Autor (ano)	No. de animais	Espécie dos animais	Modelo de indução de dor neuropática	Método de avaliação do efeito da ECM	Avaliação da qualidade metodológica	
					Randomização	Estudo controlado
Senapati et al. (2005)	16	Ratos Sprague–Dawley	Não	Registro eletrofisiológico de neurônios do CPME	Não descrito	Não
Rusina et al. (2005)	32	Ratos Long Evans	Rizotomia de raízes dorsais (C5 - T1)	Limiar nociceptivo após desaferentação	Não descrito	Sim
Vaculín et al. (2007)	30	Ratos Wistar	Ligadura do nervo ciático	Limiar nociceptivo após indução de dor neuropática	Sim	Sim
Shijo et al. (2008)	20	Ratos Wistar	Não	Atividade neuronal utilizando imuno-histoquímica (c-fos)	Não descrito	Sim
Fonoff et al. (2009)	18	Ratos Wistar	Não	Limiar nociceptivo após indução de dor neuropática e influência da injeção da naloxona	Não descrito	Sim
Viisanen et al. (2010)	34	Ratos Hannover-Wistar	Ligadura das raízes de L5-L6	Limiar nociceptivo após indução de dor neuropática, e registro eletrofisiológico de neurônios do locus ceruleus	Não descrito	Sim

Continua

Autor (ano)	No. de animais	Espécie dos animais	Modelo de indução de dor neuropática	Método de avaliação do efeito da ECM	Avaliação da qualidade metodológica	
					Randomização	Estudo controlado
Viisanen et al. (2010)	15	Ratos Hannover-Wistar	Ligadura das raízes de L5-L6	Limiar nociceptivo após indução de dor neuropática, e influência da injeção de agonista GABA e antagonista 5-HT nos núcleos bulbares RVM	Não descrito	Sim
Pagano et al. (2011)	21	Ratos Wistar	Ligadura do nervo ciático	Limiar nociceptivo após indução de dor neuropática, avaliar atividade neuronal utilizando imuno-histoquímica (c-fos e Zif268)	Não descrito	Sim
Lucas et al. (2011)	26	Ratos Sprague-Dawley	Lesão medular - C7	Limiar nociceptivo após indução de dor neuropática e avaliação de diferentes parâmetros de estimulação. Influência da inibição e estimulação da zona incerta na ECM	Não descrito	Não
Chiou et al. (2012)	88	Ratos Long-Evans	Não	PEES do córtex somatossensitivo e influência da injeção da naloxona	Não descrito	Sim
Viisanen et al. (2012)	27	Ratos Hannover-Wistar	Ligadura das raízes de L5-L6	Limiar nociceptivo após indução de dor neuropática, e influência da injeção de antagonistas de receptores da dopamina	Não descrito	Sim
Pagano et al. (2012)	26	Ratos Wistar	Não	Perfil de ativação neuronal na PAG e tálamo através de registro eletrofisiológico e imuno-histoquímica (c-fos e Zif268)	Não descrito	Sim

Continua

Conclusão

Autor (ano)	No. de animais	Espécie dos animais	Modelo de indução de dor neuropática	Método de avaliação do efeito da ECM	Avaliação da qualidade metodológica	
					Randomização	Estudo controlado
Chiou et al. (2013)	24	Ratos Long-Evans	Não	PEES do córtex somatossensitivo e influência da injeção na PAG de bloqueadores de receptores da dopamina	Não descrito	Sim
França et al. (2013)	±48	Ratos Wistar	Não	Avaliação da somatotopia após estimulação, e perfil de ativação neuronal na PAG e CPME através de e imuno-histoquímica (fos e Egr-1)	Não descrito	Sim
Jiang et al. (2014)	20	Ratos Sprague-Dawley	Lesão medular - C6	Concentração de oxigênio no sangue em áreas corticais através de ressonância magnética funcional	Não descrito	Não
Silva et al. (2015)	43	Ratos Wistar	Ligadura do nervo ciático	Análises imuno-histoquímicas de células gliais (microglia e astrocitos), citocinas (TNF- α e IL-1 β), receptores de canabinóides (CB2), receptores μ -opioides e purinérgicos P2X4 no CPME	Não descrito	Sim
Kim et al. (2015)	47	Ratos Sprague-Dawley	Ligadura do nervo ciático	Análises imuno-histoquímica (c-fos, serotonina) mPET) no CPME; mPET no cerebelo tálamo e striatum; registros eletrofisiológicos no núcleo VPL do tálamo	Não descrito	Sim

No = número; CPME = corno posterior da medula espinhal; mPET = micro-tomografia por emissão de pósitrons; VPL = ventral posterolateral

Quadro 3 - Revisão dos parâmetros de estimulação e características dos eletrodos em modelos animais de ECM

Autor (ano)	Configuração dos eletrodos / Localização	Posicionamento dos eletrodos	Parâmetros de estimulação			Duração	Anestesia
			Freq	Pulso	Amp		
Senapati et al. (2005)	Bipolar / Intracerebral	A = 0.26 mm rostral ao bregma, 2.0 mm lateral a linha média	300 Hz	0.1 ms	10, 20, e 30 V	ND	Pentobarbital
Rusina et al. (2005)	Bipolar, fio de inox / subdural	(-) P = 1 mm e L = 3 mm; (+) A = 1 mm e L = 3.5 mm ao bregma	25 Hz	0.2 ms	80% indução de mioclonia	ND	Não
Vaculín et al. (2007)	Bipolar, fio de prata / subdural	(-) : 3 mm posterior e 3 mm lateral; (+) : 1 mm anterior e 2 mm lateral ao bregma	25 Hz	0.2 ms	1.4–3.2 V	10 / 60 min	Não
Shijo et al. (2008)	Quadripolar, 2 mm largura e 5 mm comprimento / epidural	Sutura coronal, 3.5 mm lateral a linha média	25 Hz	0.12 ms	2–5 V	3 hrs / 2 sem / 1 mês / 2 meses	Não
Fonoff et al. (2009)	Bipolar, cilindros de 0,8 mm de diâmetro de aço inoxidável / epidural	(-) : 1.5 mm caudal ao bregma; (+) : 1.0 mm rostral ao bregma e 0.5 mm lateral a linha média	60 Hz	210 µs	1 V	15 min	Não
Viisanen et al. (2010)	Bipolar, eletrodos concêntricos (Rhodes NE-100, David Kopf / intracerebral	1.7 mm anterior e 0.26 mm posterior ao bregma; 1–3 mm lateral a linha média	300 Hz	0.1 ms	30, 50, 70, 100, 120, e 140 µA	15 seg	Pentobarbital

Continua

Autor (ano)	Configuração dos eletrodos / Localização	Posicionamento dos eletrodos	Parâmetros de estimulação			Duração	Anestesia
			Freq	Pulso	Amp		
Viisanen et al. (2010)	Bipolar (C315G-MS303/2/SPC, PlasticsOne) / intracerebral	1.7 mm anterior e 0.26 mm posterior ao bregma; 1–3 mm lateral a linha média	300 Hz	0.1 ms	0, 50 μ A	15 seg	Pentobarbital
Pagano et al. (2011)	Bipolar, cilindros de 0,8 mm de diâmetro de aço inoxidável / epidural	(-): 1.5 mm caudal ao bregma; (+) : 1.0 mm rostral ao bregma e 0.5 mm lateral a linha média	60 Hz	210 μ s	1 V	15 min	Não
Lucas et al. (2011)	Bipolar, eletrodos de platina (diâmetro: 70 μ m, distância entre polos: 500 μ m) / epidural	1.8 mm anterior, 2 mm lateral ao bregma	0–75 Hz	300 μ s	0–75 μ A	0 - 90 min	Não
Chiou et al. (2012)	Bipolar, eletrodo concêntrico com 0.5 mm de diâmetro / epidural	0.5 mm anterior ao bregma e 1.5 mm lateral a linha média	10, 50, 100, and 200 Hz	0.2 ms	0.5, 1, 2, 5 e 8 V	15, 30, 45, e 60 seg	alfa-cloralose e urethane
Viisanen et al. (2012)	Bipolar, eletrodos concêntricos (Rhodes NE-100, David Kopf) / intracerebral	1.7 mm anterior e 0.26 mm posterior ao bregma; 1–3 mm lateral a linha média	300 Hz	0.1 ms	0 e 50 μ A	15 seg	Pentobarbital
Pagano et al. (2012)	Bipolar, cilindros de 0,8 mm de diâmetro de aço inoxidável / epidural	(-): 1.5 mm caudal ao bregma; (+) : 1.0 mm rostral ao bregma e 0.5 mm lateral a linha média	60 Hz	210 μ s	1 V	15 min	Não

Continua

Autor (ano)	Configuração dos eletrodos / Localização	Posicionamento dos eletrodos	Parâmetros de estimulação			Duração	Anestesia
			Freq	Pulso	Amp		
Chiou et al. (2013)	Bipolar, eletrodo concêntrico com 0.5 mm de diâmetro / epidural	0.5 mm anterior ao bregma e 1.5 mm lateral a linha média	5 / 50 Hz	0.2 / 2 ms	5mA / 5 V	30 seg	alfa-cloralose e urethane
França et al. (2013)	Bipolar, cilindros de 0,8 mm de diâmetro de aço inoxidável / epidural	PP: 0.5 rostral, 0.75 caudal, 1.25 mm lateral; PA: 1.5 rostral e 2.25 mm lateral / 1.5 rostral e 3.25 mm lateral; Cauda: 1.5 caudal e 0.5 mm lateral / 2.25 caudal e 0.5 mm lateral	60 Hz	210 µs	1 V	15 min	Não
Jiang et al. (2014)	Bipolar, eletrodos de platina (diâmetro: 70 µm, distância entre polos: 500 µm) / epidural	3.6 mm anterior, 2.8 mm lateral e 2.8 mm posterior ao bregma	50 Hz	300 ms	50 µA	30 min	isoflurano / alfa-cloralose
Silva et al. (2015)	Bipolar, cilindros de 0,8 mm de diâmetro de aço inoxidável / epidural	(-): 1.5 mm caudal ao bregma; (+): 1.0 mm rostral ao bregma e 0.5 mm lateral a linha média	60 Hz	210 µs	1 V	15 min	Não
Kim et al. (2015)	Bipolar / subdural	0.2 mm posterior a 1.8 mm anterior ao bregma e 0.5 a 2.5 mm lateral a linha média	130 Hz	60 µs	2.5 V	30 min	Isoflurano

No = número; Freq = frequência; Amp = amplitude; seg = segundos; min = minutos; sem = semanas; PP = pata posterior; PA = pata anterior; (+) = eletrodo positivo; (-) = eletrodo negativo

Rusina et al. (2005) investigaram o efeito da ECM no limiar nociceptivo em ratos normais, e em animais desaferentados após realização de rizotomia em raízes cervicais e torácicas. Tanto no grupo de animais normais quanto nos desaferentados houve um aumento no limiar nociceptivo, no membro contralateral correspondente, após ECM. O efeito da ECM desapareceu após 24 horas do término da estimulação e oscilou durante os testes. Os resultados descritos mostram um efeito semelhante da estimulação quando comparamos animais experimentais e humanos (Rusina et al., 2005).

Vaculín et al. (2007) foram os primeiros a avaliar o efeito da ECM utilizando a ligadura do nervo ciático como modelo de indução da dor neuropática em ratos. Em ratos controle, a ECM não alterou o limiar nociceptivo. Em contraste, a ECM, quando aplicada no córtex motor contralateral ao membro afetado, aumentou significadamente o limiar nociceptivo nos animais submetidos a ligadura do nervo ciático. O efeito antinociceptivo da ECM contralateral se manteve por pelo menos 1 hora após o término da estimulação, desaparecendo após 24 horas do final do estímulo (Vaculín et al., 2007).

A neuroplasticidade induzida pela estimulação do córtex sensoriomotor foi investigada experimentalmente utilizando a imunopositividade *c-Fos* como marcador da atividade neural (Shijo et al., 2008). Em ratos intactos, a expressão de *c-Fos* induzida pela estimulação crônica do córtex sensoriomotor revelou a ativação funcional de várias estruturas cerebrais corticais e profundas. A extensão da ativação neural aumentou após estimulação prolongada e muitas das áreas ativadas estão envolvidas no processamento da dor, como o tálamo e o giro do cíngulo (Shijo et al., 2008).

Para garantir que a ECM seja efetiva no aumento do limiar nociceptivo, os eletródios de estimulação devem ser implantados no espaço epidural do córtex motor relacionado topograficamente a área do corpo a ser tratada. O mapeamento do córtex motor de ratos foi descrito inicialmente utilizando estimulação intracortical. Fonoff et al. (2009) foram os primeiros a realizar o mapeamento funcional do córtex motor através de estimulação transdural em ratos Wistar. A estimulação epidural é menos invasiva quando comparada a estimulação subdural ou intracortical. Além do mais, uma vez que não há penetração no córtex cerebral, a estimulação transdural evita complicações possíveis, como meningite pós-operatória, hemorragia, necrose tecidual e outros danos ao córtex cerebral (Fonoff et al., 2009).

Através de investigações sobre o efeito da estimulação do córtex motor no limiar nociceptivo em ratos normais, foi sugerido que o córtex motor também está envolvido na modulação da resposta nociceptiva normal (Fonoff et al., 2009a). Observou-se que a estimulação do córtex motor provoca um importante efeito antinociceptivo seletivo para a região do corpo correspondente a área do córtex motor estimulada, e que esse fenômeno é mediado por opióides, visto que a aplicação de naloxona anulou o aumento do limiar antinociceptivo induzido pela estimulação. A estimulação do córtex somestésico e parietal posterior não desencadeou nenhuma mudança na resposta nociceptiva (Fonoff et al., 2009a).

Foi observado que a estimulação do córtex motor reverte o fenômeno de dor neuropática em ratos, semelhante ao que é observado em humanos, através da ativação do sistema descendente inibitório da dor e do sistema límbico (Pagano et al., 2011). O padrão de atividade neuronal, avaliado através

dos marcadores Fos e Zif268, foi investigado na medula espinhal e áreas cerebrais relacionadas à modulação da dor crônica (Pagano et al., 2011). Após estimulação do córtex motor foi observado que a imunorreatividade para Fos (IR-Fos) diminuiu no corno dorsal da medula espinhal e nos núcleos medial e ventral posterolateral do tálamo comparado a ratos com dor neuropática. Além disso, a estimulação aumentou a IR-Fos na PAG, núcleo basolateral da amígdala e córtex do cíngulo anterior (Pagano et al., 2011).

Pagano et al. (2012) investigaram os circuitos neuronais presentes nos núcleos talâmicos e na PAG envolvidos na antinocicepção induzida pela estimulação transdural do córtex motor de ratos. Foi observada uma inativação neuronal no tálamo em resposta a estimulação do córtex motor, detectada tanto através da diminuição na frequência de disparos neuronais no núcleo ventral posterolateral e centromediano-parafascicular, quanto na expressão dos marcadores Fos e Zif268. Na PAG, observou-se uma diminuição na expressão do Zif268, GABA e ácido glutâmico-descarboxilase (GAD), além do aumento na frequência de disparos neuronais e na IR-Fos, sugerindo uma inibição dos neurônios GABAérgicos da PAG. Esses achados sugerem que a inibição dos neurônios sensitivos no tálamo, e a desinibição dos neurônios na PAG com consequente ativação dos neurônios responsáveis pelo sistema de controle descendente inibitório da dor, desempenham papel importante no mecanismo de indução da antinocicepção pela estimulação do córtex motor (Pagano et al., 2012).

Lopes (2013) investigou o efeito da ECM sobre os principais núcleos envolvidos na via de analgesia descendente serotoninérgica. Ratos Wistar foram submetidos à ECM e a avaliação do limiar nociceptivo utilizando teste de

pressão da pata. Os tecidos do NDR, NMR e CPME foram avaliados utilizando imunorreatividade para um marcador de ativação neuronal (Egr-1), serotonina e substância P. A ECM induziu uma ativação dos neurônios serotoninérgicos no NDR e NMR, além de inibir os neurônios nociceptivos presentes no CPME. Os resultados obtidos sugerem que a ativação do sistema serotoninérgico descendente está envolvida no efeito antinociceptivo observado após ECM (Lopes, 2013).

Foi investigado o papel das projeções serotoninérgicas do RVM sobre o efeito antinociceptivo descendente induzido pela ECM em ratos com neuropatia periférica induzida (Viisanen; Pertovaara, 2010a). Para este propósito, avaliou-se a influência de um bloqueador reversível do RVM e de um antagonista do receptor 5-HT_{1A} presente na medula espinhal na antinocicepção espinhal induzida pela ECM. A antinocicepção espinhal induzida pela ECM foi reduzida após o bloqueio do RVM com injeção intramedular de um agonista do receptor GABA_A, assim como pela administração intratecal de um antagonista do receptor 5-HT_{1A}. Os resultados demonstram que o RVM e a via serotoninérgica descendente que atua no receptor 5-HT_{1A} da coluna vertebral desempenham um papel importante na antinocicepção induzida pela estimulação ECM em modelos de animais com dor neuropática (Viisanen; Pertovaara, 2010a).

O modelo de estimulação cortical em ratos foi utilizado para investigar o papel das vias noradrenérgicas presentes no locus coeruleus na antinocicepção induzida pela ECM (Viisanen; Pertovaara, 2010b). O *locus coeruleus* é uma estrutura presente na ponte que possui grande densidade de neurônios noradrenérgicos, e foi descrito que os receptores α_2 -adrenérgicos presentes na medula espinhal podem desempenhar um papel no sistema

descendente de modulação da dor (Pertovaara, 2006). Foram implantados eletrodos de estimulação epidural sobre o córtex motor de ratos Wistar submetidos a modelo de indução de dor neuropática por ligadura de nervo espinhal. Os resultados obtidos demonstraram que, embora a ECM ative neurônios presentes no locus coeruleus, a injeção de bloqueadores dos receptores α_2 -adrenérgicos na medula espinhal não conseguiu reverter a antinocicepção espinhal induzida pela estimulação (Viisanen; Pertovaara, 2010b). As vias noradrenérgicas descendentes, ou mesmo o locus coeruleus podem não desempenhar um papel importante no efeito antinociceptivo evocado pela ECM (Viisanen; Pertovaara, 2010b).

Diferentes parâmetros de estimulação cortical foram testados em um estudo utilizando modelos de dor central em ratos (Lucas et al., 2011). Em animais com hiperalgesia mecânica e térmica, a estimulação realizada de forma contínua, com duração de pelo menos 15 minutos, e utilizando os seguintes parâmetros: 50 μ A, 50 Hz e 300 μ s, foi descrita como eficiente para induzir efeito antinociceptivo em ratos (Lucas et al., 2011). Na literatura é descrito uma grande variedade de parâmetros utilizados na estimulação elétrica para tratamento de condições diversas que levam a dor neuropática. A duração do efeito antinociceptivo após a estimulação cessar pode variar de 5-10 minutos até pouco mais de 1 dia (Nguyen et al., 1999; Son et al., 2003; Lucas et al., 2011).

Lucas et al. (2011) investigou o papel da zona incerta (ZI) na mediação dos efeitos analgésicos da ECM. Foi descrito que o córtex motor envia projeções densas para a zona incerta (ZI), e que em modelos de ratos com dor central, a hiperalgesia estaria correlacionada com atividade reduzida no núcleo

inibitório zona incerta (ZI) que atua sobre o tálamo (Masri et al., 2009; Lucas et al., 2011). Em modelos animais de ratos submetidos à indução nociceptiva por lesão medular, a estimulação da ZI reproduziu o efeito antinociceptivo da ECM. A inativação reversível da ZI, através da administração de um agonista GABA_A, inibiu os efeitos da ECM, sugerindo a modulação da ZI pode ser um dos mecanismos responsáveis pela redução da hiperalgesia observada após ECM.

Chiou et al. (2012) utilizaram ECM em ratos para investigar a hipótese de que a atividade do córtex somatosensitivo poderia ser reduzida após ECM, e que este efeito seria mediado por opióides endógenos. Para testar essa hipótese, a ECM com diferentes parâmetros e o efeito da estimulação elétrica nos potenciais evocados somato-sensitivos (PEES) do córtex somatosensitivo primário foram avaliados. A ECM durante 30 segundos utilizando os parâmetros 5 V, 50 Hz e 0,2 ms inibiu os PEES obtidos no córtex somatosensitivo primário ipsilateral a estimulação. Esse feito pode ser mediado pelo sistema de opióides endógenos, considerando que aplicação de naloxona bloqueou completamente o efeito inibitório da ECM sobre os PEES do córtex somatosensitivo (Chiou et al., 2012).

Viisanen et al. (2012) investigaram o papel dos receptores de dopamina D₂ no controle nociceptivo descendente induzido pela ECM, utilizando ratos com dor neuropática induzida por ligadura de nervo espinhal. Com esse objetivo, um antagonista dos receptores D₂ foi administrado no estriado dorsal ou na medula espinhal para avaliar seu efeito na reversão da antinocicepção espinhal induzida pela ECM. Além disso, foi administrada lidocaína a fim de bloquear a ação do grupo neuronal hipotalâmico A11, principal fonte de dopamina espinhal. Os resultados obtidos demonstraram que os receptores D₂

presentes no estriado dorsal, assim como o grupo de neurônios dopaminérgicos A11 presentes no hipotálamo, estão envolvidos no controle nociceptivo descendente induzido pela ECM em animais com dor neuropática (Viisanen et al., 2012).

Há evidências de que a PAG participa do efeito inibitório induzido pela ECM sobre o córtex somatosensitivo primário, e que este efeito pode ser mediado pelo sistemas dopaminérgicos e opióides endógenos presentes na PAG (Chiou et al., 2013). Demonstrou-se que, em modelo animal utilizando ratos Long-Evans, a aplicação de um antagonista não específico do receptor de dopamina na PAG bloqueou a inibição dos PEES do córtex somatossensorial induzida pela ECM. A inibição dos PEES após ECM foi também bloqueada pela injeção na PAG de naloxona e pela aplicação na PAG de um antagonista específico do receptor D₁. No entanto nenhum efeito foi observado após administração de um antagonista seletivo do receptor D₂ (Chiou et al., 2013).

Em estudo utilizando modelo animal de ECM, França et al. (2013) reforçaram a hipótese de que o efeito antinociceptivo induzido pela ECM ocorre por uma ativação da via analgésica endógena através da PAG, que consequentemente inibe a transmissão de estímulos nocivos no CPME, e cujo efeito está topograficamente relacionado à área estimulada do córtex motor. Demonstrou-se que a ECM nas áreas correspondentes ao membro anterior e posterior aumentou a densidade de células com imunorreatividade de Fos e Egr-1 na PAG de ratos Wistar, quando comparado ao grupo controle. A ECM também diminuiu a imunorreatividade de Fos nas camadas superficiais CPME, sugerindo uma inibição das vias nociceptivas da medula espinhal (França et al., 2013).

Os mecanismos neuronais responsáveis pelo efeito antinociceptivo da ECM foram investigados avaliando as mudanças nos sinais dependentes da concentração de oxigênio no sangue (BOLD) (Jiang et al., 2014). Jiang et al (2013) utilizaram um modelo animal de dor neuropática crônica para testar a hipótese de que ECM reduzia o sinal BOLD em áreas corticais envolvidas no processamento nociceptivo. Observou-se, utilizando ressonância magnética funcional em ratos submetidos à ECM, que a estimulação elétrica suprime significativamente os sinais regionais do nível de oxigênio no sangue no córtex somatossensorial primário e no córtex pré-frontal, duas áreas fortemente envolvidas no processamento nociceptivo (Jiang et al., 2014).

Kim et al. (2015) investigaram, em modelos de animais experimentais, os mecanismos de ação da ECM na antinocicepção. Para este fim, utilizaram imuno-histoquímica, micro-tomografia por emissão de pósitron (mPET) e métodos eletrofisiológicos para observar as alterações nas vias de condução da dor resultantes da ECM. A dor neuropática diminuiu o metabolismo da glicose no cerebelo, no estriado e no tálamo, no entanto, durante a estimulação elétrica houve um aumento significativo na atividade dessas estruturas. A expressão de c-fos nas lâminas I-III do CPME aumentou na vigência da dor neuropática, porém diminuiu ligeiramente após início da estimulação elétrica. A imunorreatividade da serotonina aumentou de forma significativa durante a ECM, quando comparado ao grupo de animais com dor neuropática e sem estimulação. Em animais com dor neuropática a frequência de disparos neuronais estava aumentada no núcleo posterolateral ventral (VPL) do tálamo, todavia essa atividade foi suprimida pela ECM (Kim et al., 2015).

Silva et al. (2015) avaliaram o envolvimento da resposta inflamatória de células da glia presentes na medula espinhal, no mecanismo de analgesia induzida pela ECM. Ao mesmo tempo, estudaram o envolvimento do sistema canabinóide, opióide e purinérgico na eficácia da ECM. Ratos Wistar com neuropatia periférica foram submetidos a ECM e separados em dois grupos, a saber: ECM-responsivos e ECM-refratários. Além disso, avaliaram ratos com neuropatia não-estimulados e falso-operados. A investigação incluiu a injeção de um antagonista canabinóide (AM251), a análise imuno-histoquímica de células gliais, citocinas (TNF- α e IL-1 β), e dos receptores canabinóide (CB₂), μ -opióide e purinérgico (P2X₄) no CPME. A injeção prévia de AM251 inibiu o efeito antinociceptivo da ECM. A ECM inibiu a atividade das células da glia e dos receptores μ -opióides, aumentou a marcação dos receptores CB₂ e diminuiu a atividade dos receptores purinérgicos P2X₄ no corno dorsal da medula espinhal. Os resultados obtidos nessa investigação sugerem que a ECM induziu o efeito antinociceptivo através da ativação dos sistemas opióides e canabinóides, somado a um efeito anti-inflamatório medular. Os receptores CB₂ podem estar envolvidos nos casos refratários a ECM (Silva et al., 2015).

Apesar de não haver descrição na literatura de estudos que avaliam o efeito da ECM na liberação de neurotransmissores *in vivo* utilizando microdiálise, algumas pesquisas utilizam marcadores imunocitoquímicos e micro-injeção de agonistas e antagonistas para avaliar a dinâmica neuroquímica em regiões cerebrais envolvidas na transmissão nociceptiva frente a ECM, conforme demonstrado na Figura 10.

Nesse sentido, apesar de evidências clínicas e experimentais que os aminoácidos estejam envolvidos na transmissão da dor, os mecanismos

responsáveis por modular os efeitos analgésicos da ECM sobre a liberação de neurotransmissores permanece desconhecido, assim como as funções desses aminoácidos no sistema modulatório da PAG.

Figura 10 Ilustração esquemática do efeito da estimulação cortical sobre marcadores dos neurotransmissores no circuito de modulação da dor, de acordo com revisão da literatura. PAGvl = substância cinzenta periaquedutal ventrolateral, RVM = bulbo rostral ventromedial, CPME = corno posterior da medula espinhal, 5-HT = serotonina, ↑ = aumento na ação, ↓ = diminuição na ação, ⇩ = via inibitória, ⇧ = via de estimulação

4 MÉTODOS

4.1 Animais

No estudo foram utilizados 63 ratos Wistar machos, pesando entre 170-190, fornecidos pelo biotério da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (40 x 34 x 17 cm), em grupos de três ratos por gaiola, por ao menos uma semana antes do início dos experimentos. As caixas, contendo raspas de madeira, foram mantidas em ambiente isolado com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro (12/12 horas), e os animais tinham acesso livre à água e ração. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o guia para uso ético de animais em pesquisas envolvendo dor publicado pela *International Association for the Study of Pain* (Zimmermann, 1983), e conforme as diretrizes do *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE)* (Kilkenny et al., 2010). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Hospital Sírio-Libanês (CEUA, protocolo número 2012/25) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo número 009/13)

4.2 Avaliação comportamental

Todos os animais incluídos no estudo foram submetidos ao teste de pressão da pata traseira para determinação da resposta nociceptiva. Os animais foram testados antes da cirurgia de indução de dor neuropática, para estabelecer o limiar nociceptivo inicial de cada animal (medida inicial), no 14º dia após a cirurgia para confirmar a condição neuropática (medida final), e após 15 minutos da estimulação cortical, ainda sob o efeito da estimulação, para avaliar a eficácia estimulação (medida ECM). Os ratos brancos e falso-operados também foram avaliados nas mesmas condições e tempo que os ratos com dor neuropática induzida, para determinação do limiar nociceptivo.

4.2.1 Avaliação do limiar nociceptivo

A avaliação do limiar nociceptivo foi realizada utilizando o teste de pressão da pata. Esse teste foi utilizado conforme descrito por Randall e Selitto (1957). Neste teste, uma força em gramas de intensidade crescente (16g/s) é continuamente aplicada sobre o dorso das patas posteriores do animal utilizando equipamento específico para essa finalidade (EEF-440, Insight Ltda., São Paulo, Brasil) (Randall and Selitto, 1957), conforme mostrado na Figura 11. A resposta nociceptiva do animal é determinada pela reação de “retirada da pata” pressionada. O limiar nociceptivo é expresso em gramas de força necessária para induzir a reação de retirada da pata traseira. Foram realizadas medidas iniciais (antes dos procedimentos cirúrgicos), e medidas finais antes e durante estimulação cortical. Apenas a pata traseira direita foi testada. Os

resultados foram analisados comparando as medidas iniciais e as finais entre si. Todos os testes para avaliação da resposta nociceptiva dos animais foram realizados com o equipamento de pressão encoberto, desta maneira, o limiar nociceptivo de cada animal só era conhecido após o fim da avaliação. A antinocicepção foi definida como o aumento significativo na pressão necessária para induzir a retirada da pata durante o teste de pressão da pata quando comparado com a medida inicial do mesmo animal ou durante a estimulação.

Figura 11 - Foto ilustrativa do teste de pressão da pata para avaliação do limiar nociceptivo

4.3 Indução da dor neuropática

Para a indução de dor neuropática, foi realizada a constrição crônica (CCI) do nervo ciático, de acordo com um método previamente descrito (Bennett; Xie, 1988). Após a indução de anestesia com isoflurano (2,5%), foi feita uma incisão no meio da coxa direita, e por dissecção sem corte do músculo bíceps femoral, o nervo ciático foi exposto aproximadamente 7 mm proximal à sua trifurcação, conforme exibido na Figura 12A. O nervo ciático foi separado do tecido aderente, e 4 ligaduras frouxas foram colocadas ao redor do nervo usando fio 4-0 de *catgut* cromo com aproximadamente 1 mm de espaçamento, conforme exposto na Figura 12B. Atenção especial foi dada as ligaduras, de modo que o nervo ciático permanecesse apenas levemente constrito. As incisões cutâneas foram suturadas em camadas usando um fio 4-0 não absorvível de nylon. Nos animais do grupo falso-operado, o nervo ciático foi exposto conforma descrito, todavia nenhuma constrição foi realizada.

Figura 12 - A- Exposição do nervo ciático. B- Ligadura do nervo ciático para indução de dor neuropática

4.4 Procedimento cirúrgico para implante dos eletródios de estimulação

Uma semana após a indução da neuropatia periférica ou exposição do nervo ciático, os animais foram profundamente anestesiados através da administração intramuscular de quetamina (0.5 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (2.3 mg/kg), associado à anestesia local do escalpo com lidocaína 2% (0,5ml/animal). Se necessário, doses adicionais de quetamina foram administradas aos animais. Foi realizada uma incisão ao longo da linha média dorsal do escalpe dos animais com exposição da tábua óssea externa, permitindo a identificação da sutura coronal, bregma e lambda. Em ambiente estereotáxico, um par de eletródios padronizados para estimulação foi implantado através de duas pequenas trepanações localizadas sobre o córtex motor esquerdo (Figura 13), na área cortical funcionalmente correspondente a pata posterior direita (1.0 mm rostral e 1.5 mm caudal ao bregma, e 1.5 mm lateral a linha média), conforme protocolo já estabelecido (Fonoff et al, 2009b), (Figura 14). Os eletródios foram confeccionados em nosso laboratório com parafusos de aço inoxidável (0,8 mm de diâmetro e colocados lado a lado com capa isolante cobrindo a lateral de cada polo, conforme ilustrado nas Figuras 15A e B de modo que distanciassem 2,5 mm um do outro. Enquanto os animais estavam anestesiados, um parafuso de fixação com as mesmas dimensões dos eletródios também foi implantando, sem penetrar a tábua óssea interna do crânio, distando 5 a 6 mm do local da estimulação. Em todos os animais a integridade da dura-máter era uma condição exigida para o implante dos eletródios. Polímero de metil-metacrilato (Jet®) foi utilizado para garantir o isolamento elétrico dos eletródios e cobrir a superfície exposta do crânio. Os

contatos de cada polo dos eletródios foram inseridos em um micro-conector e fixados por sobre o crânio dos animais utilizando o polímero de metil-metacrilato, permitindo dessa forma o acoplamento e desacoplamento dos cabos de estimulação durante a realização dos experimentos comportamentais de forma ágil. Apenas durante as sessões de estimulação, o cabo de extensão era inserido nos conectores acoplado ao crânio dos animais para realização da estimulação utilizando um estimulador portátil (Medtronic, Mineapolis, MI, USA) (Figura 12C). Todos os procedimentos foram realizados com auxílio de uma lupa com aumento de 2.5x.

Figura 13 A- Rato posicionado em aparelho estereotáxico. B- Trepanação com broca elétrica. C- Implante dos eletródios de estimulação

Figura 14 - A- Representação das áreas do córtex cerebral relacionadas às regiões do corpo do rato de acordo com a resposta motora à estimulação elétrica cortical epidural. B- Destaque para a superfície óssea do crânio do rato e pontos craniométricos. PP = pata posterior, PA = pata anterior, O = olhos, C = cauda, V = vibrissas, e P = musculatura cervical, * = local de implante dos eletródios de estimulação, ● = local de implante da cânula-guia de microdialise, ◇ = bregma. [Adaptado de Fonoff et al (2009)]

Figura 15 - A- Eletródio de estimulação confeccionado no laboratório. B- Conector do eletródio ao estimulador epidural. C- Estimulador portátil utilizado (Medtronic, Mineapolis, MI, USA). D- Cânulas guias feitas de aço inoxidável

4.5 Cirurgia para implante de cânulas de infusão ou cânulas guia de microdiálise

Sob o mesmo protocolo anestésico, uma cânula guia de microdiálise foi implantada em ambiente estereotáxico, ver Figura 13A. Uma pequena trepanação foi realizada próximo ao lambda e, dependendo do experimento, uma cânula guia de microdiálise ou uma cânula de infusão de fármacos foi estereotaxicamente introduzida em direção a PAG utilizando as seguintes coordenadas: anteroposterior (AP): -7.8; mediolateral (ML): -0.7; dorsoventral (DV): -6.4 mm em relação ao bregma e a superfície do crânio, de acordo com o atlas estereotáxico do cérebro do rato (Paxinos; Watson, 1998). As cânulas guias de infusão foram confeccionados em nosso laboratório utilizando-se tubos de aço inoxidável (0,7 mm de diâmetro), ver Figura 15D. Ao final da cirurgia, a cânula foi fixada ao crânio dos animais utilizando-se polímero de metil-metacrilato. Para ancoramento foi fixado um parafuso em posição mais caudal em relação local de fixação dos eletrodos de estimulação, permitindo dessa forma o acoplamento dos cabos para estimulação e a inserção da cânula de microdiálise de forma adequada e simultânea (Figura 16).

Figura 16 - A- Imagem do posicionamento do eletródio de estimulação e da cânula de microdiálise durante coleta, permitindo o acoplamento de cabos para estimulação e conexão do sistema de microdiálise de forma adequada e simultânea. B- Desenho mostrando a relação dos eletródios (1), conexão de coleta (2) e perfusão (3) da sonda de microdiálise com o córtex motor (M1) e PAG

4.6 Estimulação elétrica do córtex motor

Após o procedimento de implante dos eletrodos de estimulação e guia da cânula de microdiálise, os ratos permaneceram em observação por um período de sete dias, em gaiolas com 3 animais, para recuperação. A estimulação foi realizada de acordo com parâmetros descritos previamente (Fonoff et al., 2009a). Os parâmetros de estimulação foram: amplitude 1,0V, frequência 60Hz, duração de pulsos 210 μ s, utilizando um estimulador elétrico isolado portátil (Medtronic, Mineapolis, MI, USA), ilustrado na Figura 17A. Esses parâmetros podem alterar o limiar de dor, porém sem interferir na função motora dos animais. A avaliação comportamental baseada nos testes de pressão de pata (Randall; Selitto, 1957) foi realizada logo antes, durante e 15 minutos após as sessões de estimulação que tinham a duração de 15 minutos (Figura 17B).

Figura 17 - A- Estimulação elétrica do córtex motor com animal acordado utilizando estimulador elétrico portátil. B- Avaliação do limiar nociceptivo na pata posterior direita na vigência da estimulação elétrica

4.7 Microdiálise *in vivo*

Para realização da microdiálise *in vivo* os animais foram anestesiados através da administração intramuscular de quetamina (0.5 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (2.3 mg/kg). Utilizamos uma sonda de microdiálise (CMA 12 Stockholm, Sweden) com membrana exposta apresentando 2 mm de comprimento e 0.5 mm de diâmetro (Figura 18). A membrana de diálise permitia a passagem de moléculas com até 20.000 daltons. A cânula de microdiálise foi introduzida em direção a PAG utilizando as seguintes coordenadas: AP: -7.8; LM: -0.7; DV: -6.4 mm em relação ao bregma e a superfície do crânio, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1990). As sondas foram irrigadas com líquido artificial (solução de ringer lactato) a uma taxa de 2.0 µl/minuto. Após 90 minutos de estabilização foi iniciada a coleta de neurotransmissores. Para uma visão geral do posicionamento dos animais durante microdiálise, ver Figura 19.

Figura 18 - Cânula de microdiálise utilizada durante o procedimento, a membrana exposta apresentava 2 mm de comprimento e 0,5 mm de diâmetro. Em detalhe o processo de diálise através da membrana semipermeável que permite passagem de substâncias com limite de 20.000 daltons. [Adaptado de: <http://www.microdialysis.se/us/products/probes/cma-12>]

Figura 19 - Visão panorâmica do posicionamento dos animais anestesiados para realização da microdiálise e estimulação cortical

Inicialmente foram coletadas 3 amostras em intervalos de 10 minutos, correspondentes à linha de base (LB1, LB2 e LB3) e essas amostras foram

utilizadas para determinar os níveis basais dos neurotransmissores GABA, glicina e glutamato na PAG. Após a coleta das amostras de base foi realizada a estimulação elétrica do córtex motor utilizando os parâmetros previamente descritos durante 15 minutos. Durante a estimulação foi coletada a amostra correspondente à estimulação (E). Após o período de estimulação foram coletadas mais 3 amostras, amostras pós-estimulação (PE) com intervalo de 10 minutos entre elas (PE1, PE2 e PE3), o resumo do protocolo está mostrado na Figura 20.

Figura 20 - Protocolo de coleta do dialisado e estimulação elétrica. Após período de 90 minutos para estabilização dos neurotransmissores, o dialisado foi coletado a cada 10 minutos (3 coletas) durante a linha de base, após 15 minutos de início da estimulação cortical e em intervalos de 10 minutos (3 coletas) após o fim da estimulação

As concentrações extracelulares dos neurotransmissores foram determinadas através do dialisado e expressas em $\mu\text{g/ml}$. Para uma visão geral do sistema, ver Figura 21. Para avaliação dos níveis de neurotransmissores liberados durante o procedimento, foram utilizadas sondas de microdiálise, as quais possuem membranas que possibilitavam a troca de moléculas entre o tecido nervoso da PAG e o meio interno da membrana (ocupado por solução

de ringer lactato). A sonda de microdialíse possui uma bifurcação na extremidade oposta à membrana, na qual foram inseridos o tubo de entrada (que se conecta a bomba de infusão e permite a entrada da solução de ringer) e o tubo de saída (por onde o dialisado é coletado). É importante salientar que a sonda não permite a passagem de volume, mas sim, apenas a troca de moléculas por diferença de concentração. No momento da coleta do dialisado, os tubos de polietileno da sonda de microdialíse foram conectados a um sistema de braços e comutadores, que permitiam a conexão desses tubos com uma seringa de microinfusão (entrada da solução de ringer) e um coletor de microfração (saída do dialisado) refrigerado a 4° C (Bicanalytical Systems - BAS - EUA). A perfusão com ringer (NaCl, 600.0; KCl, 30.0; CaCl₂, 20.0 e C₃H₅NaO₃, 310.0) foi realizada através de uma bomba de infusão, num fluxo contínuo de 2.0 µl/minuto. Após a coleta o dialisado foi mantido a -80 °C até a análise. Todas as amostras foram analisadas utilizando um aparelho de HPLC (Shimadzu, UFLC Prominence).

Figura 21 - Desenho esquemático do sistema de microdialíse *in vivo*. [Modificado de Nandi (2009)]

4.8 Determinação da concentração dos neurotransmissores

Os níveis de neurotransmissores foram quantificados utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) - (Shimadzu, UFLC Prominence), acoplado a uma coluna C18, fase reversa (ACE 3 C18-300, 150X3.0mm), com detector UV variável, ajustada no comprimento de onda de 254 nm, utilizando solução A e B (A: 470 ml sol./ 30 ml de acetonitrila; B: 400 ml de acetonitrila/ 100 ml de água pura / 100 μ L de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 1mg/ml com pH 8.0), ver Figura 22.

Figura 22 - A- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) - (Shimadzu, UFLC Prominence). B- Detalhe da coluna C18 utilizada para análise dos aminoácidos [Fonte: <http://analyticalinstrument.com/chromatography/shimadzu-prominence-hplc-system-detail>]

A análise dos aminoácidos foi realizada utilizando um padrão de 3 aminoácidos (glicina, GABA e glutamato) e também uma amostra contendo água pura e um reagente de derivatização (amostra branca). Após a passagem da amostra padrão e da branca, era injetada a amostra do dialisado a ser analisada. O padrão de 3 aminoácidos foi feito utilizando 100 μ L de uma solução mãe de 1 mg/ml de cada aminoácido. Desta solução padrão de 3

aminoácidos foram utilizados 15 μL para a reação. O reagente de derivatização após ser preparado permaneceu em repouso por período de 15 minutos. Após esse período de repouso, o reagente foi adicionado à amostra do dialisado, permanecendo em repouso novamente por período de 15 minutos. Após a realização dessa reação, com a amostra do dialisado já derivatizada, foi adicionado água pura para ajustar o volume final em 100 μL . Dessa solução, foram injetados 50 μL no aparelho de cromatografia líquida. Antes do início das análises, uma amostra do padrão e uma amostra branca foram analisadas. A amostra branca foi feita para observar o reagente enquanto que a amostra padrão foi produzida para análise dos aminoácidos e suas concentrações. A quantificação dos neurotransmissores foi feita através da comparação da área dos picos da amostra do dialisado em relação a um padrão interno conhecido (amostra padrão), como ilustrado na Figura 23.

Figura 23 - Cromatogramas mostrando os picos dos neurotransmissores no dialisado após a derivatização. A abscissa representa o tempo após a injeção da amostra (min)

4.9 Drogas - antagonistas

Um antagonista dos receptores de glicina (cloridrato de estricnina, Sigma) e um antagonista do receptor GABA_A (bicuculina, Sigma) foram utilizados neste estudo. A estricnina e a bicuculina foram diluídas em solução de líquor artificial a concentrações de 2 mM e 0,05 mM respectivamente. As doses utilizadas foram baseadas em trabalhos anteriores que demonstraram que essas concentrações induzem o bloqueio dos receptores de glicina e GABA_A (Lin et al., 1994; Peng et al., 1996; Viu et al., 1998).

4.10 Procedimento de micro-infusão na PAG

Os animais foram randomizados e separados em 4 grupos. Um grupo de animais recebeu infusão antagonista de GABA (bicuculina, 0,05 mM), em um segundo grupo foi infundido antagonista de glicina (estricnina, 2 mM), em um terceiro grupo foi co-administrado antagonistas de GABA e glicina (bicuculina, 0,05 mM e estricnina, 2 mM). No quarto grupo foi infundido apenas salina na PAG, sendo este o nosso grupo controle durante essa etapa. A administração direta intra-PAG dos antagonistas ou de solução salina foi realizada com os animais acordados e movimentando-se espontaneamente, conforme demonstrado na Figura 24. Para infusão utilizamos uma cânula de aço inoxidável conectada por um tubo de polietileno a uma agulha com 0,25mm de diâmetro (31-gauge) e a uma bomba de infusão (Harvard Apparatus Pump 11 Elite). A agulha foi inserida através da cânula guia e se prolongava 0,5 mm para além da ponta da cânula guia para atingir a PAG e conectada a uma micro-seringa. Volumes contendo 200 nl (100 nl/min) das soluções foram

injetados na PAG durante um período de 2 minutos, e a cânula foi suavemente removida 2 minutos após o fim da infusão. A avaliação do limiar nociceptivo foi realizada 5 minutos após a infusão na PAG, sob o efeito da estimulação cortical.

Figura 24 - Imagem da bomba de infusão e do rato durante procedimento de micro-infusão na PAG

4.11 Histologia

Após 1 hora dos procedimentos de microdiálise ou micro-infusão na PAG, os animais foram profundamente anestesiados com solução de xilazina, quetamina e morfina e então perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina 0.9%, seguido por paraformaldeído a 4% dissolvida em 0.1 M de

solução tampão-fosfato (PB, pH 7.4). Os cérebros dos animais foram retirados e fixados em formaldeído por 4 horas, seguido por crioproteção em solução de sucrose 30% em tampão-fosfato, permanecendo a 4°C por 48 horas, ver Figura 25A. Cortes histológicos coronais dos encéfalos com espessura de 30 µm foram realizados utilizando micrótomo congelado. Os cortes foram comparados ao atlas do cérebro dos ratos (Paxinos; Watson, 1996) para determinação dos trajetos e localização da sonda de microdiálise em relação a PAG, conforme mostrado na Figura 25B e 25C). Os animais nos quais as sondas estavam localizadas incorretamente foram excluídos do estudo e descartados.

Figura 25 - A- Cérebro do rato após fixação com solução de sucrose e tampão-fosfato mostrando o local do implante da cânula-guia (seta). B e C- Cortes histológicos mostrando trajeto da cânula em relação à PAG e aqueduto (Aq)

4.12 Delineamento do experimento I

Com intuito de avaliar os níveis dos neurotransmissores glicina, GABA e glutamato na PAG frente à estimulação do córtex motor, ratos adultos foram

anestesiados e os eletródios epidurais foram implantados sobre o córtex motor esquerdo correspondente a área da pata posterior, seguido da inserção de cânula guia na PAG para realização de microdialise *in vivo*. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos. No grupo A, os animais foram submetidos à estimulação cortical esquerda, na área correspondente à pata posterior, após indução de dor neuropática na pata posterior direita (CCI). No grupo B, os animais foram submetidos à exposição sem amarradura do nervo ciático direito (falso-operado) e estimulação do córtex motor esquerdo. No grupo C, nenhuma intervenção para indução de dor neuropática foi realizada (grupo branco), apenas os procedimentos de estimulação do córtex motor e aferição de neurotransmissores na PAG, semelhante aos outros grupos, como mostrado pela Figura 26. Todos os animais foram submetidos aos testes comportamentais de nocicepção antes da intervenção cirúrgica, que serviram como medidas do estado de base e foram utilizados posteriormente para se aferir a homogeneidade entre os grupos. O implante dos eletródios de estimulação e das cânulas de microdialise na PAG foram guiadas por estereotaxia utilizando coordenadas pré-estabelecidas. As sondas de microdialise foram irrigadas com líquido artificial e o dialisado coletado para quantificação dos neurotransmissores. Após o término dos experimentos, os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram removidos para realização de cortes histológicos, verificação do sítio de implante da sonda de microdialise e possível correlação com as subdivisões específicas da PAG. As amostras de microdialise foram coletadas antes (amostras de linha de base), durante (amostra de estimulação) e após (amostra pós-estimulação) a estimulação do córtex motor. O resumo deste delineamento está ilustrado na Figura 26.

Figura 26 - Delineamento geral do experimento I mostrando a divisão dos grupos e procedimentos de implante de eletródios de estimulação e microdialise

Figura 27 – Sequência temporal dos procedimentos do experimento I

4.13 Delineamento do experimento II

Essa segunda etapa do estudo teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com antagonista de glicina ou GABA na PAG sob a analgesia induzido pela estimulação cortical, como mostrado pela Figura 28. Semelhante ao experimento anterior, todos os animais foram submetidos ao implante dos eletródios de estimulação e das cânulas de infusão de fármacos direcionadas à PAG. A avaliação do limiar nociceptivo foi efetuada em quatro tempos distintos:

- 1- Antes da intervenção cirúrgica, que serviram como medidas do estado de base;
- 2- Após indução da dor neuropática;
- 3- Durante a estimulação cortical, para observação do efeito analgésico da ECM;
- 4- Após microinjeção na PAG e sob o efeito da ECM, na tentativa de reversão do efeito analgésico induzido pela estimulação cortical.

Para tanto, o experimento incluiu quatro grupos de animais:

- 1- Animais com dor neuropática e administração de salina 0,9% na PAG, 30 min antes da ECM;
- 2- Animais com dor neuropática e administração de antagonista de glicina na PAG, 30 min antes da ECM;
- 3- Animais com dor neuropática e administração de antagonista de GABA na PAG, 30 min antes da ECM;
- 4- Animais com dor neuropática e co-administração de antagonista de GABA e glicina na PAG, 30 min antes da ECM.

O grupo de animais com dor neuropática e submetidos à administração de salina na PAG foi o nosso grupo controle durante essa etapa. Além disso, as avaliações do limiar nociceptivo após infusão na PAG foram realizadas de forma cega, sem que o avaliador tivesse conhecimento de qual grupo pertencia

o animal. Após o término dos experimentos, os animais foram eutanasiados e os encéfalos foram removidos para realização de cortes histológicos, verificação do sítio de implante da sonda de microdiálise e correlação com as colunas dorsolaterais e laterais da PAG. O resumo deste delineamento está ilustrado na Figura 28.

Figura 28 - Delineamento geral do experimento II mostrando a divisão dos grupos e procedimentos de micro-infusão de antagonistas na PAG

Figura 29 - Sequência temporal dos procedimentos realizados no experimento II

4.14 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) para comparações entre os grupos. O teste de Tukey foi utilizado para detectar as diferenças das médias após a Análise de Variância. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a distribuição das amostras entre os grupos. A homogeneidade das variâncias foi verificada mediante o teste de Levene. A análise estatística foi realizada com a utilização do programa GraphPad Prism, versão 4.02 (San Diego, CA, EUA) ou do *software* IBM SPSS (21.0.)

Em todos os testes o índice de significância considerado foi de $p < 0,05$. O número de animais utilizados em cada grupo foi orientado pelos testes estatísticos já aplicados em experimentos semelhantes realizados de forma rotineira no laboratório, de forma que foi preconizada a inclusão do menor número possível de animais nos experimentos, de acordo com os preceitos da ética em pesquisa e experimentação em animais de laboratório.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do experimento I

5.1.1 Distribuição dos animais entre os grupos

No experimento I foi utilizado um total de 33 animais divididos igualmente entre três grupos, no entanto apenas 18 animais foram considerados na análise final da dosagem dos neurotransmissores. Os motivos de exclusão dos animais incluíram a perda dos implantes dos eletródios e cânulas guias durante o período de observação, a morte de animais durante procedimento anestésico ou de introdução das sondas de microdiálise, a presença de animais com dor neuropática não responsivos a ECM e o erro no alvo do implante estereotáxico das cânulas de microdiálise (PAG). A distribuição final entre os grupos está demonstrada na Figura 30.

Figura 30 - Distribuição dos ratos entre os grupos do experimento I e motivos de exclusão

5.1.2 Localização das sondas de microdiálise

Os cérebros de 24 animais foram analisados histologicamente para determinação da localização das sondas de microdiálise. Os cortes coronais dos encéfalos tinham espessura de 30 μm e foram comparados ao atlas do cérebro do rato (Paxinos; Watson, 1998), para determinação dos trajetos e localização da sonda de microdiálise em relação à PAG (Figura 31). Os animais nos quais as sondas estavam localizadas incorretamente ($n = 6$) foram excluídos do estudo e descartados. Quando analisamos o trajeto em relação às colunas da PAG, observamos que as sondas se estendiam predominantemente entre as porções laterais e dorsolaterais da PAG, ver Quadro 4. Em alguns

casos uma porção das sondas apresentava relação com a região ventrolateral da PAG.

Figura 31 - Localização histológica dos locais de microdiálise na PAG em cortes coronais do cérebro do rato em quatro níveis rostrocaudais representativos da PAG. [Modificado de Paxinos e Watson (1998)]

Quadro 4 - Localização das sondas de microdiálise em relação às regiões da PAG nos animais analisados

Amostra	Localização da sonda de microdiálise (%)	
	PAGvl	PAGl e dl
Branco 1	5,5	94,5
Branco 2	7,7	92,3
Branco 3	5,5	94,5
Branco 4	15,5	84,5
Branco 5	10,5	89,5
Falso-operado 1	0	100
Falso-operado 2	27	73
Falso-operado 3	6,9	93,1
Falso-operado 4	27,7	72,3
Falso-operado 5	33,3	66,7
CCI 1	0	100
CCI 2	0	100
CCI 3	11,0	89
CCI 4	0,0	100
CCI 5	14	86
CCI 6	7,0	93
CCI 7	18,5	81,5
CCI 8	10,0	90

PAGvl = PAG ventrolateral, PAGl e dl = PAG lateral e dorsolateral

5.1.3 Efeito da estimulação do córtex motor no limiar nociceptivo

Com o objetivo de avaliar o efeito da estimulação do córtex motor no limiar nociceptivo, todos os animais (branco, falso-operado e CCI) foram avaliados com o teste de pressão da pata posterior antes (medida inicial) e após (medida final) o procedimento e durante a ECM (ECM), como mostrado no Gráfico 1. Nos animais do grupo branco e falso-operado não houve alteração significativa do limiar nociceptivo em comparação com medida final e ECM. Nos ratos submetidos à ligadura do nervo ciático observou-se uma redução do limiar nociceptivo após procedimento cirúrgico (medida final) em comparação com a medida inicial caracterizando o fenômeno de neuropatia periférica. Ainda o grupo CCI apresentou um aumento significativo do limiar nociceptivo durante a ECM quando comparado as medidas finais, ($F_{(1,4)}=51.22$; $p < 0.05$). Em todos os grupos o limiar nociceptivo retornou aos valores basais quando o teste de pressão da pata foi repetido 15 minutos após o desligamento da estimulação cortical. Esses achados demonstraram que a ECM induziu uma antinocicepção verificada através do aumento do limiar nociceptivo, e que esse feito cessou quando a estimulação era desativada.

Gráfico 1 - ECM e resposta nociceptiva. O limiar nociceptivo foi avaliado nas patas traseiras direita dos ratos sem procedimento cirúrgico (branco, n = 7), submetidos apenas a exposição do nervo ciático (Falso-operado, n = 11) e com neuropatia periférica (CCI, n = 13). Ligadura do nervo ciático ou cirurgias simuladas foram realizadas nas patas direitas, e os eletrodos corticais foram implantados nos hemisférios esquerdos de todos os animais. O teste nociceptivo foi realizado 1) antes da cirurgia (medida inicial, MI), 2) 14 dias após a cirurgia (medida final 1, MF) e 3) durante a estimulação do córtex motor (ECM). A ECM não afetou significativamente o limiar nociceptivo em animais brancos e falso-operados, enquanto os animais CCI apresentaram diminuição no limiar nociceptivo, que foi facilmente revertido pela ECM

= $p < 0,05$ em comparação com a medida inicial de todos os outros grupos, * = $p < 0,05$, em comparação com a medida final

5.1.4 Efeito da ECM sobre os níveis de glicina na PAG

A concentração basal de glicina variou entre os grupos analisados durante o tempo de coleta em relação à estimulação cortical, ver Gráfico 2. No grupo branco (n = 5) a concentração média do aminoácido durante o período de linha de base foi de $5,502 \pm 0,63$ pg/ml, entre os animais falso-operados (n = 5) a concentração basal média foi de $4,373 \pm 1,52$ pg/ml, no grupo CCI (n = 8) a concentração colhida basal foi de $13,434 \pm 6,79$ pg/ml.

Quando considerados os grupos de maneira individual, não houve alteração dos níveis de glicina nos animais do grupo branco (Gráfico 2A) e falso-operado (Gráfico 2B). Com relação, ao grupo CCI (Gráfico 2C), a ECM resultou em um aumento significativo nos níveis de glicina no grupo CCI, quando comparado aos níveis basais.

Quando a comparação é realizada considerando-se todos os grupos (Gráfico 3), houve um aumento na liberação de glicina de no grupo CCI durante o período da estimulação (153%) e no pós-estimulação 3 (PE3 – 134%) em comparação aos níveis basais e na comparação com os grupos branco e falso-operado ($F_{(2,24)}=96,99$; $p < 0,05$).

Análise da correlação de Pearson foi realizada considerando a resposta nociceptiva individual de ratos do grupo CCI após ECM, e as mudanças nos níveis absolutos, percentuais e na concentração em pg de glicina, assim como na modificação em relação aos níveis basais (percentuais e absolutos). Houve uma correlação positiva considerando a resposta individual de ratos do grupo CCI submetidos a ECM, e as mudanças nos níveis de glicina ($r^2 = 0,30$).

Gráfico 2 - Variação na concentração de glicina na PAG dos animais separada por grupo

Os valores médios são apresentados como porcentagem da linha de base e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) LB1 = linha de base 1, LB2 = linha de base 2, LB3 = linha de base 3, S = estimulação, PE1 = pós-estimulação 1, PE2 = pós-estimulação 2, PE3 = pós-estimulação 3

Gráfico 3 - Comparação entre os grupos dos níveis relativos de glicina na linha de base (LB1-3), ECM (E) e após estimulação (PE1-3) para os grupos branco (n = 5), falso-operado (n = 5) e CCI (n = 8) de acordo com as amostras de microdialise na PAG

= p < 0,05 em comparação com o grupo falso-operado. * = p < 0,05 em comparação com o grupo branco

5.1.5 Efeito da ECM sobre os níveis de GABA na PAG

A concentração basal de GABA variou entre os grupos analisados durante o tempo de coleta em relação à estimulação cortical, ver Gráfico 4. No grupo branco (n = 5) a concentração média de GABA durante o período de linha de base foi de $1,517 \pm 0,22$ pg/ml, entre os animais falso-operados (n = 5) a concentração basal média foi de $3,777 \pm 0,38$ pg/ml, no grupo CCI (n = 8) a concentração colhida basal foi de $4,894 \pm 0,17$ pg/ml.

No grupo branco não houve alteração nos níveis de GABA ao longo do experimento, ver Gráfico 4A. No grupo falso-operado observamos uma variação gradual dos níveis do neurotransmissor GABA durante o período de estimulação e após o fim da estimulação, porém sem significância estatística ($p > 0,05$), ver Gráfico 4B. No grupo CCI a estimulação induziu um aumento significativo dos níveis de GABA, como mostrado no Gráfico 4C.

A comparação entre grupos, Gráfico 5, mostrou um aumento na concentração de GABA (145%) no grupo CCI comparado aos valores obtidos no período basal, e em comparação ao grupo branco e falso-operado ($F_{(2,24)}=106,65$; $p < 0,05$), conforme mostrado no Gráfico 5.

Análise da correlação de Pearson foi realizada considerando a resposta nociceptiva individual de ratos do grupo CCI após ECM, e as mudanças nos níveis absolutos, percentuais e na concentração em pg de GABA, assim como na modificação em relação aos níveis basais (percentuais e absolutos). Houve uma correlação positiva considerando a resposta individual de ratos do grupo CCI submetidos a ECM, e as mudanças nos níveis de glicina ($r^2 = 0,49$).

Gráfico 4 - Variação na concentração de GABA na PAG dos animais separada por grupo

Os valores médios são apresentados como porcentagem da linha de base e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). LB1 = linha de base 1, LB2 = linha de base 2, LB3 = linha de base 3, S = estimulação, PE1 = pós-estimulação 1, PE2 = pós-estimulação 2, PE3 = pós-estimulação 3

Gráfico 5 - Comparação entre os grupos dos níveis relativos de GABA na linha de base (LB1-3), ECM (E) e após estimulação (PE1-3) para os grupos branco (n = 5), falso-operado (n = 5) e CCI (n = 8) de acordo com as amostras de microdialise na PAG

= $p < 0,05$ em comparação com o grupo falso-operado. * = $p < 0,05$ em comparação com o grupo branco

5.1.6 Efeito da ECM sobre os níveis de glutamato na PAG

A concentração basal de glutamato variou entre os grupos analisados durante o tempo de coleta em relação à estimulação cortical, ver Gráfico 6. As amostras coletadas durante o período de trinta minutos antes da estimulação apresentaram concentrações do neurotransmissor glutamato foi de $1,110 \pm 0,22$ pg/ml, entre os animais falso-operados ($n = 5$) a concentração basal média foi de $5,218 \pm 0,23$ pg/ml, no grupo CCI ($n = 8$) a concentração colhida basal foi de $6,398 \pm 0,17$ pg/ml.

No grupo branco, ver Gráfico 6A, houve um aumento de 37,3% na concentração do glutamato durante a ECM ($p > 0.05$). No grupo falso-operado, Gráfico 6B, observamos um aumento de 65,5% nos níveis de glutamato durante a estimulação, com retorno para concentrações um pouco superior das observadas nos valores basais, porém sem significância estatística ($p > 0,05$). No grupo CCI, Gráfico 6C, não verificamos alterações significativas ao longo das coletas ($p > 0,05$).

Quando se considera todos os grupos juntos, ver Gráfico 7, não observamos diferença estatística entre os grupos estudados ($F_{(2,24)}=0,19$; $p > 0,05$). Análise da correlação de Pearson foi realizada considerando a resposta nociceptiva individual de ratos do grupo CCI após ECM, e as mudanças nos níveis absolutos, percentuais e na concentração em pg de glutamato, assim como na modificação em relação aos níveis basais (percentuais e absolutos). Não houve uma correlação positiva considerando a resposta individual de ratos do grupo CCI submetidos a ECM, e as mudanças nos níveis de glutamato ($r^2 = 0.00$).

Gráfico 6 - Variação na concentração de glutamato na PAG dos animais separada por grupo

Os valores médios são apresentados como porcentagem da linha de base e expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). LB1 = linha de base 1, LB2 = linha de base 2, LB3 = linha de base 3, S = estimulação, PE1 = pós-estimulação 1, PE2 = pós-estimulação 2, PE3 = pós-estimulação 3

Gráfico 7 - Comparação entre os grupos dos níveis relativos de glutamato na linha de base (LB1-3), ECM (E) e após estimulação (PE1-3) para os grupos branco (n = 5), falso-operado (n = 5) e CCI (n = 8) de acordo com as amostras de microdialise na PAG

= $p < 0,05$ em comparação com o grupo falso-operado. * = $p < 0,05$ em comparação com o grupo branco

5.1.7 Relação entre o posicionamento das cânulas e níveis de neurotransmissores

Os dados referentes ao aumento na liberação de glicina, GABA e glutamato, em cada um dos grupos de animais (Branco, Falso-Operado e CCI) foram correlacionados com os valores percentuais de extensão das sondas de microdiálise localizadas na PAGvl e PAGl/dl.

Anteriormente ao teste de correlação foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para a avaliação do padrão de distribuição dos valores de aumento dos níveis de glicina, GABA e glutamato em cada um dos grupos de animais (Branco, Falso-Operado e CCI). Os resultados para o teste de normalidade estão dispostos na Tabela 1.

Após a verificação do padrão de distribuição, o aumento da liberação de glicina, GABA e glutamato foi correlacionado com os valores percentuais de extensão da sonda de microdiálise localizados na PAGvl e PAGl/dl mediante os testes de correlação de Spearman (para as distribuições verificadas como não-normais) e de Pearson (para as distribuições verificadas como normais).

Tabela 1 - Resultados do padrão de distribuição dos diferentes tipos de neurotransmissores nos grupos de animais estudados

Grupo	Neurotransmissor	p-valor	Padrão de distribuição
Branco	Glicina	0,958	Normal
	GABA	0,106	Normal
	Glutamato	0,028	Não-normal
Falso-Operado	Glicina	0,278	Normal
	GABA	0,607	Normal
	Glutamato	0,965	Normal
CCI	Glicina	0	Não-normal
	GABA	0,008	Não-normal
	Glutamato	0,129	Normal

5.1.7.1 Relação entre a PAGvl e níveis de neurotransmissores em animais do grupo CCI

Da Tabela 2 infere-se que houve correlação estatisticamente significativa entre o posicionamento da sonda na PAGvl e o aumento na liberação de glicina em animais do grupo “CCI”. Observando-se que o valor dessa correlação é negativo, isso implica em dizer que essa correlação é negativa e que, quanto menor foi a extensão da sonda posicionada na PAGvl, maior foi o aumento na liberação do neurotransmissor, ver Gráfico 8. Além disso, essa é uma correlação negativa “forte”, em razão da proximidade do valor obtido do valor “mais forte” de correlação negativa (-1,0). Essa correlação foi negativa para GABA e glutamato, ver Gráficos 8 e 9.

Tabela 2 - Análise de correlação entre o posicionamento da sonda de microdiálise na localização “PAGvl” e o aumento dos neurotransmissores no grupo de animais “CCI”

Neurotransmissor	Correlação	Significância
Glicina	-0,927	0,001*
GABA	-0,11	0,795
Glutamato	-0,073	0,863

* = $p < 0,05$ (Teste de correlação de Spearman)

Gráfico 8 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de Glicina a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGvl no grupo “CCI”

Gráfico 9 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de GABA a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGvl no grupo “CCI”

Gráfico 10 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de Glutamato a depender da proximidade da sonda de microdialise com a localização PAGvl no grupo “CCI”

5.1.7.2 - Relação entre a PAGI/dl e níveis de neurotransmissores em animais do grupo CCI

Da Tabela 3 infere-se que houve correlação estatisticamente significativa entre o posicionamento da sonda na coluna lateral e dorsolateral da PAG e o aumento na liberação de glicina” nos animais do grupo “CCI”. Observando-se que o valor dessa correlação é positivo, isso implica em dizer que essa correlação é positiva e que, quanto maior foi a extensão da sonda posicionada na coluna lateral e dorsolateral da PAG, maior foi o aumento na liberação de glicina, ver Gráfico 11. Além disso, essa é uma correlação positiva “forte”, em razão da proximidade do valor obtido do valor “mais forte” de correlação positiva (1,0). Essa correlação não foi positiva para GABA e glutamato, ver Gráficos 12 e 13.

Tabela 3 - Análise de correlação entre o posicionamento da sonda de microdiálise na localização “PAGI e dl” e o aumento dos neurotransmissores no grupo de animais “CCI”

Neurotransmissor	Correlação	Significância
Glicina	0,927	0,001*
GABA	0,11	0,795
Glutamato	0,073	0,863

* = $p < 0,05$ (Teste de correlação de Spearman)

Gráfico 11 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de Glicina a depender da proximidade da sonda de microdiálise com a localização PAGI e dl no grupo “CCI”

Gráfico 12 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de GABA a depender da proximidade da sonda de microdialise com a localização PAGI e dl no grupo “CCI”

Gráfico 13 - Representação gráfica da distribuição dos valores para o aumento na liberação de Glutamato a depender da proximidade da sonda de microdialise com a localização PAGI e dl no grupo “CCI”

5.2 Resultados do experimento II

5.2.1 Distribuição dos animais entre os grupos

Baseado nos resultados obtidos no experimento de microdiálise, no experimento II utilizamos um total de 30 animais divididos aleatoriamente entre quatro grupos para receber a micro-injeção de antagonistas de GABA, glicina ou solução salina na PAG. No entanto, durante as várias etapas do experimento tivemos perda de ratos, e 19 animais foram considerados na análise final do efeito da micro-injeção na PAG no limiar nociceptivo. Os motivos de exclusão dos animais incluíram a perda dos implantes dos eletródios e cânulas guias durante o período de observação, a morte de animais durante procedimento anestésico, a presença de animais com dor neuropática não responsivos a ECM e o erro na trajetória do implante estereotáxico das cânulas de microdiálise em relação a PAG. A distribuição final entre os grupos está demonstrada na Figura 32.

Figura 32 - Distribuição dos ratos entre os grupos do experimento II e motivos de exclusão

5.2.2 Localização das cânulas de micro-injeção

Os cérebros dos animais selecionados após exclusão ($n = 20$) foram analisados histologicamente para determinação da localização das sondas de microdiálise. Os cortes coronais dos encéfalos tinham espessura de 30 μm e foram comparados ao atlas do cérebro do rato (Paxinos; Watson, 1998), para determinação dos trajetos e localização da sonda de microdiálise em relação a PAG. O animal no qual a sonda estava localizada incorretamente ($n = 1$) foi excluído do estudo e descartado. Quando analisamos o trajeto em relação às colunas da PAG, observamos que as cânulas estão localizadas majoritariamente nas divisões laterais e dorsais da PAG, conforme demonstrado na Figura 33.

Para cada um dos grupos de estudo (salina, estriçnina, bicuculina e estriçnina + bicuculina) foram realizadas análises descritivas e inferenciais. Inicialmente, foram realizados testes de normalidade (teste de Shapiro-Wilk), verificando-se tratarem-se todos de grupos com dados de distribuição normal ($p > 0,05$; para os testes realizados em todos os grupos). Sequencialmente verificou-se a homogeneidade das variâncias mediante o teste de Levene, e, em seguida avaliou-se a existência de diferença na distribuição dos valores para o limiar nociceptivo entre cada um dos componentes de cada um dos grupos de estudo, mediante o teste Anova-One Way. Identificada a existência de diferença entre os componentes de cada grupo, aplicou-se o pós-teste de Tukey com comparações múltiplas para identificar quais grupos foram diferentes entre si.

Figura 33 - Representação gráfica da localização das extremidades das cânulas de microdiálise na PAG. Os cortes coronais estão organizados em relação anteroposterior ao bregma com distância em milímetros (mm). ●, localização das cânulas quando a salina foi injetada (n = 5); ■, localização das cânulas quando a estricnina foi injetada (n = 4); ▲, localização das cânulas quando a bicuculina foi injetada (n = 6); ◆, localização das cânulas quando a estricnina e bicuculina foram injetadas simultaneamente (n = 4). [Modificado de Paxinos e Watson (1998)]

5.2.3 Grupo 1 - Salina

A micro-injeção de solução salina na PAG foi o grupo controle do experimento. Entre os animais ($n = 5$) selecionados aleatoriamente para administração de salina observamos que a ECM induziu um aumento de 94,2% no limiar nociceptivo na pata posterior quando comparado às medidas finais. A injeção de salina não alterou a eficácia da ECM na indução analgésica. Os resultados das médias e variações dos limiares nociceptivos da pata traseira está demonstrado no Quadro 5 e no Gráfico 14.

O pós-teste com comparações múltiplas para os componentes do Grupo 1 demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre as medidas iniciais e finais ($p=0,000$); entre as medidas finais e após ECM ($p=0,000$); e entre a medida final e verificada após injeção de salina ($p=0,000$), conforme exposto na Tabela 4.

O teste de homogeneidade das variâncias para o grupo 1 gerou o valor de 0,119, demonstrando homogeneidade ($p>0,05$), ver Tabela 5.

Quadro 5 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo para o Grupo 1 (Salina)

Medida	Média	DP	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
MI	70	1,22	70	69	71	68	71
MF	38,2	1,92	39	36,5	39,5	35	40
ECM	74,2	2,28	74	72,5	76	72	78
Salina	73,2	3,89	72	70	77	68	78

DP = desvio padrão, MI = medida inicial, MF = medida final, ECM = estimulação do córtex motor

Gráfico 14 - Distribuição gráfica dos valores obtidos para o limiar nociceptivo no Grupo 1 (Salina)

MI = medida inicial, MF = medida final 14 dias após a cirurgia, ECM = medida durante a estimulação do córtex motor, SALINA = medida após micro-injeção de salina, # = $p < 0,05$ em comparação com a medida inicial de todos os outros grupos, * = $p < 0,05$, em comparação com a medida final

Tabela 4 - Análise descritiva do Grupo 1 (salina)

Medida	n	Média	DP	Erro padrão	IC 95%		Mínimo	Máximo
					Inf.	Sup.		
MI	5	74,2	2,28	1,02	71,37	77,03	72	78
MF	5	38,2	1,924	0,86	35,81	40,59	35	40
ECM	5	70	1,225	0,548	68,48	71,52	68	71
Salina	5	73,2	3,899	1,744	68,36	78,04	68	78
Total	20	63,9	15,481	3,462	56,65	71,15	35	78

n = número, DP = desvio padrão, IC = índice de confiança, Inf = inferior, Sup = superior, MI = medida inicial, MF = medida final

Tabela 5 - Análise de variância para o limiar nociceptivo entre os componentes do Grupo 1 (salina)

Limiar nociceptivo			Soma dos quadrados	gl	Quadrados médios	F	Sig.
Entre os grupos	(Combinado)		4451,4	3	1483,8	231,844	0
	Termo linear	Contraste	207,36	1	207,36	32,4	0
		Desvio	4244,04	2	2122,02	331,566	0
Entre os grupos			102,4	16	6,4		
Total			4553,8	19			

gl = grau de liberdade, Sig. = significância

5.2.4 Grupo 2 - Estricnina

A micro-injeção do antagonista dos receptores da glicina estricnina na PAG foi realizada para avaliar seu efeito na inibição ou facilitação nociceptiva induzida pela ECM. Entre os animais ($n = 4$) selecionados aleatoriamente para administração de estricnina observamos que a ECM induziu um aumento de 93% no limiar nociceptivo na pata posterior quando comparado às medidas finais. A administração de estricnina reverteu o efeito antinociceptivo da estimulação cortical, provocando uma redução média de 52% no limiar nociceptivo quando comparado às medidas obtidas durante a ECM. Os resultados das médias e variações dos limiares nociceptivos da pata traseira está demonstrado no Quadro 6 e no Gráfico 15.

O pós-teste com comparações múltiplas para os componentes do Grupo 2 demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre as medidas iniciais e finais ($p=0,000$); entre as medidas iniciais após injeção de

estricnina ($p=0,000$); entre as medidas finais e após ECM ($p=0,000$); entre as medidas finais e após injeção de estricnina ($p=0,014$); e entre as medidas verificas após ECM e injeção de estricnina ($p=0,000$), conforme exposto na Tabela 6.

O teste de homogeneidade das variâncias para o grupo 2 gerou o valor de 0,324, demonstrando homogeneidade ($p>0,05$), ver Tabela 7.

Quadro 6 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo para o Grupo 2 (Estricnina)

Medida	Média	DP	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
MI	71,75	1,5	72	70,25	73	70	73
MF	39,75	1,5	40	38,25	41	38	41
ECM	74	1,41	73,5	73	75,5	73	76
Estricnina	35	2,58	35	32,5	37,5	32	38

DP = desvio padrão, MI = medida inicial, MF = medida final, ECM = estimulação do córtex motor

Gráfico 15 - Distribuição gráfica dos valores obtidos para o limiar de dor no Grupo 2 (Estricnina)

MI = medida inicial, MF = medida final 14 dias após a cirurgia, ECM = medida durante a estimulação do córtex motor, SALINA = medida após micro-injeção de salina, # = $p < 0,05$ em comparação com a medida inicial de todos os outros grupos, * = $p < 0,05$, em comparação com a medida final, ** = $p < 0,05$, em comparação com a medida ECM

Tabela 6 - Análise descritiva do Grupo 2 (Estricnina)

Grupos	n	Média	DP	Erro	IC 95%		Mínimo	Máximo
					Inf.	Sup.		
MI	4	71,75	1,5	0,75	69,36	74,14	70	73
MF	4	39,75	1,5	0,75	37,36	42,14	38	41
ECM	4	74	1,414	0,707	71,75	76,25	73	76
Estricnina	4	35	2,582	1,291	30,89	39,11	32	38
Total	16	55,13	18,504	4,626	45,27	64,98	32	76

n = número, DP = desvio padrão, IC = índice de confiança, Inf = inferior, Sup = superior, MI = medida inicial, MF = medida final

Tabela 7 - Análise de variância para o limiar nociceptivo entre os componentes do Grupo 2 (Estricnina)

Limiar nociceptivo			Soma dos quadrados	gl	Quadrados médios	F	Sig.
Entre os grupos	(Combinado)		5096,25	3	1698,75	516,076	0
	Termo linear	Contraste	1155,2	1	1155,2	350,947	0
		Desvio	3941,05	2	1970,525	598,641	0
Entre os grupos			39,5	12	3,292		
Total			5135,75	15			

gl = grau de liberdade, Sig. = significância

5.2.5 Grupo 3 - Bicuculina

A micro-injeção do antagonista do receptor GABA_A bicuculina na PAG foi realizada para avaliar seu efeito na inibição ou facilitação nociceptiva induzida pela ECM. Entre os animais (n = 6) selecionados aleatoriamente para administração de bicuculina observamos que a ECM induziu um aumento de 88,4% no limiar nociceptivo na pata posterior quando comparado as medidas finais. A administração de bicuculina reduziu cerca de 30% o efeito antinociceptivo quando comparado as medidas obtidas durante a ECM. Os resultados das médias e variações dos limiares nociceptivos da pata traseira está demonstrado no Quadro 7 e no Gráfico 16.

O pós-teste com comparações múltiplas para os componentes do Grupo 3 demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre as medidas iniciais e finais (p=0,000); medidas finais e após injeção de bicuculina (p=0,000); medidas finais e após ECM (p=0,000); e na comparação do limiar

nociceptivo após ECM e injeção de bicuculina ($p=0,000$), conforme exposto na Tabela 8.

O teste de homogeneidade das variâncias para o grupo 3 gerou o valor de 0,307, demonstrando homogeneidade ($p>0,05$), ver Tabela 9.

Quadro 7 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo para o Grupo 3 (Bicuculina)

Medida	Média	DP	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
MI	71	1,26	71,5	69,75	72	69	72
MF	38,83	2,13	39,5	37,25	40,25	35	41
ECM	73,17	1,16	73,5	72,5	74	71	74
Bicuculina	53,33	1,96	53	51,75	55,25	51	56

DP = desvio padrão, MI = medida inicial, MF = medida final, ECM = estimulação do córtex motor

Gráfico 16 - Distribuição gráfica dos valores obtidos para o limiar de dor no Grupo 3 (Bicuculina)

MI = medida inicial, MF = medida final 14 dias após a cirurgia, ECM = medida durante a estimulação do córtex motor, SALINA = medida após micro-injeção de salina, # = $p < 0,05$ em comparação com a medida inicial de todos os outros grupos, * = $p < 0,05$, em comparação com a medida final, ** = $p < 0,05$, em comparação com a medida ECM

Tabela 8 - Análise descritiva do Grupo 3 (Bicuculina)

Medida	n	Média	DP	Erro	IC 95%		Mínimo	Máximo
					Inf.	Sup.		
MI	6	71	1,265	0,516	69,67	72,33	69	72
MF	6	38,83	2,137	0,872	36,59	41,08	35	41
ECM	6	73,17	1,169	0,477	71,94	74,39	71	74
Bicuculina	6	53,33	1,966	0,803	51,27	55,4	51	56
Total	24	59,08	14,383	2,936	53,01	65,16	35	74

n = número, DP = desvio padrão, IC = índice de confiança, Inf = inferior, Sup = superior, MI = medida inicial, MF = medida final

Tabela 9 - Análise de variância para o limiar nociceptivo entre os componentes Grupo 3 (Bicuculina)

Limiar nociceptivo			Soma dos quadrados	gl	Quadrados médios	F	Sig.
Entre os grupos	(Combinado)		4700,833	3	1566,944	549,805	0
	Termo linear	Contraste	104,533	1	104,533	36,678	0
		Desvio	4596,3	2	2298,15	806,368	0
Entre os grupos			57	20	2,85		
Total			4757,833	23			

gl = grau de liberdade, Sig. = significância

5.2.6 Grupo 4 – Estricnina + Bicuculina

A coadministração de estricnina e bicuculina na PAG foi realizada para avaliar seu efeito conjunto na inibição ou facilitação nociceptiva induzida pela ECM. Entre os animais ($n = 4$) selecionados aleatoriamente para coadministração desses antagonistas observamos que a ECM induziu um aumento de 103% no limiar nociceptivo na pata posterior quando comparado as medidas finais. A coadministração dos antagonistas reduziu cerca de 30% o efeito antinociceptivo quando comparado as medidas obtidas durante a ECM. Os resultados das médias e variações dos limiares nociceptivos da pata traseira está demonstrado no Quadro 8 e no Gráfico 17.

O pós-teste com comparações múltiplas para os componentes do Grupo 4 demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre as medidas iniciais e finais ($p=0,000$); entre as medidas iniciais e após coadministração dos

antagonistas ($p=0,000$); entre as medidas finais a após ECM ($p=0,000$); entre as medidas finais e após injeção de estriknina + bicuculina ($p=0,002$); e após ECM e a coadministração dos antagonistas ($p=0,000$), conforme exposto na Tabela 10.

O teste de homogeneidade das variâncias para o grupo 4 gerou o valor de 0,215, demonstrando homogeneidade ($p>0,05$), ver Tabela 11.

Quadro 8 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo para o Grupo 4 (Stricnina + Bicuculina)

Medida	Média	DP	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
MI	71,75	0,95	71,5	71	72,75	71	73
MF	37,25	4,99	39	32	40,75	30	41
ECM	75,75	3,2	75,5	73	78,75	73	79
Estri + Bic	50,25	4,64	51	45,5	54,25	44	55

DP = desvio padrão, Estri = estriknina, Bic = bicuculina, MI = medida inicial, MF = medida final, ECM = estimulação do córtex motor

Gráfico 17 - Distribuição gráfica dos valores obtidos para o limiar nociceptivo no Grupo 4 (Estricnina + Bicuculina)

MI = medida inicial, MF = medida final 14 dias após a cirurgia, ECM = medida durante a estimulação do córtex motor, SALINA = medida após micro-injeção de salina, # = $p < 0,05$ em comparação com a medida inicial de todos os outros grupos, * = $p < 0,05$, em comparação com a medida final, ** = $p < 0,05$, em comparação com a medida ECM

Tabela 10 - Análise descritiva do Grupo 4 (Estricnina + Bicuculina)

Medida	N	Média	DP	Erro	IC 95%		Mínimo	Máximo
					Inf.	Sup.		
MI	4	71,75	0,957	0,479	70,23	73,27	71	73
MF	4	37,25	4,992	2,496	29,31	45,19	30	41
ECM	4	75,75	3,202	1,601	70,66	80,84	73	79
Estri + Bic	4	50,25	4,646	2,323	42,86	57,64	44	55
Total	16	58,75	16,619	4,155	49,89	67,61	30	79

n = número, DP = desvio padrão, IC = índice de confiança, Inf = inferior, Sup = superior, MI = medida inicial, MF = medida final, Estri = estricnina, Bic = bicuculina

Tabela 11 - Análise de variância para o limiar nociceptivo entre os componentes do Grupo 4 (Estricnina + Bicuculina)

Limiar nociceptivo			Soma dos quadrados	gl	Quadrados médios	F	Sig.
Entre os grupos	(Combinado)		3970	3	1323,333	91,792	0
	Termo Linear	Contraste	135,2	1	135,2	9,378	0,01
		Desvio	3834,8	2	1917,4	132,999	0
Entre os grupos			173	12	14,417		
Total			4143	15			

gl = grau de liberdade, Sig. = significância

5.2.7 Comparativo entre os grupos

Na comparação entre os grupos das medidas após injeção intra-PAG observamos que a administração de estricnina reverteu o efeito antinociceptivo da estimulação cortical, provocando uma redução média de 52% no limiar nociceptivo. A micro-injeção de bicuculina isoladamente ou coadministrada com estricnina reduziu o efeito antinociceptivo da estimulação cortical. A injeção de salina não alterou o efeito da ECM. Os resultados das médias e variações dos limiares nociceptivos da pata traseira está demonstrado no Quadro 9 e no Gráfico 18.

O pós-teste com comparações múltiplas do limiar nociceptivo entre os grupos demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre os componentes Salina e Estricnina ($p=0,000$); Salina e Bicuculina ($p=0,000$); Salina e Estricnina + Bicuculina ($p=0,000$); Estricnina e Bicuculina ($p=0,000$); e entre os grupos Estricnina e Estricnina + Bicuculina ($p=0,000$). Não se verificou

diferença entre os grupos Bicuculina e Estricnina + Bicuculina ($p=0,495$), conforme exposto na Tabela 12.

O teste de homogeneidade das variâncias na comparação entre os grupos gerou o valor de 0,418, demonstrando homogeneidade ($p>0,05$), ver Tabela 13.

Quadro 9 - Distribuição dos valores de média, desvio-padrão, mediana, 1º e 3º quartis, mínimo e máximo entre os grupos (Salina, Estricnina, Bicuculina, Estricnina + Bicuculina)

Grupo	Média	DP	Mediana	1º quartil	3º quartil	Mínimo	Máximo
Salina	73,2	3,89	72	70	77	68	78
Estricnina	35	2,58	35	32,5	37,5	32	38
Bicuculina	53,33	1,96	53	51,75	55,25	51	56
Estri + Bic	50,25	4,64	51	45,5	54,25	44	55

DP = desvio padrão, Estri = estricnina, Bic = bicuculina

Gráfico 18 - Distribuição gráfica entre os os grupos dos valores obtidos para o limiar nociceptivo após administração intra-PAG (Salina, Estricnina, Bicuculina, Estricnina + Bicuculina)

*** = $p < 0,05$, em comparação com a medida após micro-injeção de salina

Tabela 12 - Análise descritiva do comparativo entre os grupos

Grupo	N	Média	DP	Erro	IC 95%		Mínimo	Máximo
					Inf.	Sup.		
Salina	5	73,2	3,899	1,744	68,36	78,04	68	78
Estricnina	4	35	2,582	1,291	30,89	39,11	32	38
Bicuculina	6	53,33	1,966	0,803	51,27	55,4	51	56
Estri + Bic	4	50,25	4,646	2,323	42,86	57,64	44	55
Total	19	54,05	13,966	3,204	47,32	60,78	32	78

n = número, DP = desvio padrão, IC = índice de confiança, Inf = inferior, Sup = superior, MI = medida inicial, MF = medida final, Estri = estricnina, Bic = bicuculina

Tabela 13 - Análise de variância para o limiar nociceptivo na comparação entre os grupos

Limiar nociceptivo		Soma dos quadrados	gl	Quadrados médios	F	Sig.
Entre os grupos	(Combinado)	3346,064	3	1115,355	101,468	0
	Não ponderada	571,328	1	571,328	51,976	0
	Ponderada	748,714	1	748,714	68,113	0
	Desvio	2597,35	2	1298,675	118,145	0
Entre os grupos		164,883	15	10,992		
Total		3510,947	18			

gl = grau de liberdade, Sig. = significância

6 DISCUSSÃO

Embora a utilização da estimulação do córtex motor para indução de analgesia seja uma técnica neurocirúrgica bastante aplicada na medicina, e apesar do avanço de nossa compreensão acerca dos moduladores desse efeito analgésico da estimulação do córtex motor primário, pouco se sabe sobre os mecanismos que envolvem este efeito e muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas. Tendo em vista que os sistemas inibitórios descendentes são rotineiramente estudados utilizando-se estimulação elétrica focal, é de grande valia a realização de estudos correlatos que examinem os neurotransmissores relacionados à inibição produzida por esta estimulação.

O projeto atual seguiu uma linha de pesquisa sobre os mecanismos neurofisiológicos da antinocicepção induzida por estimulação do córtex motor (Fonoff et al., 2009a, 2009b; Pagano et al., 2011, 2012). Deste modo consideramos relevante o aprofundamento deste conceito com o estudo do efeito da estimulação cortical na liberação de neurotransmissores na PAG. Para tal, utilizamos estimulação elétrica do córtex em ratos submetidos ao modelo de dor neuropática e estudamos sua influência na liberação de diversos neurotransmissores na PAG utilizando microdiálise *in vivo*.

Ainda que o efeito antinociceptivo dos opióides na PAG já tenha sido descrito, muito pouco se sabe sobre a função de outros neurotransmissores no sistema modulatório da dor na PAG. O efeito da estimulação do córtex motor na liberação de neurotransmissores na PAG é um fenômeno que até o presente momento permaneceu não estudado.

Neste estudo, investigamos os possíveis mecanismos terapêuticos da ECM, através de microdiálise *in vivo*, com foco na liberação de aminoácidos. Nossos resultados sugerem que os neurotransmissores glicina e GABA na PAGl e PAGdl contribuíram para o efeito antinociceptivo da ECM. Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a avaliar o efeito da ECM na liberação de neurotransmissores usando a *microdiálise in vivo*. Além do mais, essa foi a primeira pesquisa que avaliou o efeito da micro-injeção de antagonistas na PAG sobre a analgesia induzida pela ECM.

Demonstramos que a ECM induziu antinocicepção em ratos com dor neuropática, observada pelo aumento do limiar nociceptivo. Esses achados estão de acordo com estudos prévios sobre o efeito de ECM em modelos experimentais (Fonoff et al., 2009a, 2009b; Vaculín et al., 2008; Pagano et al., 2011, 2012) e em pacientes com dor crônica (Nguyen et al., 1999; Saitoh; Yoshimine, 2007; Fagundes-Pereyra et al., 2010; Fonoff et al., 2011), reforçando a hipótese de que o córtex motor primário pode ser uma das estruturas mais rostrais no SNC relacionado ao sistema modulador da dor, e que a estimulação epidural induz antinocicepção na dor neuropática. No entanto, diferentemente de alguns estudos anteriores, não observamos na primeira etapa dos experimentos um efeito significativo da ECM em ratos sem dor neuropática. Uma possível explicação para essa aparente inconsistência é que os animais dos grupos controle do presente estudo não podem ser considerados completamente ingênuos. Embora estes animais não tenham sofrido indução de dor neuropática, eles receberam o implante da cânula de microdiálise no interior da PAG, que em nosso entendimento está altamente envolvido no mecanismo de controle da dor.

A PAG desempenha um papel crucial no sistema descendente inibidor da dor e está envolvida na integração de funções essenciais para a sobrevivência que incluem comportamento reprodutivo e de defesa, medo, ansiedade e regulação neurovegetativa (Beitz, 1982; Bandler; Shipley, 1994; Linnman et al., 2012). Dados obtidos através de estudos eletrofisiológicos e de neuroimagem sugerem que a PAG desempenha um papel fundamental na antinocicepção induzida pela ECM (Garcia-Larrea; Peyron, 2007; Pagano et al., 2012). A PAG recebe aferências de diversas regiões cerebrais, e há uma correspondência funcional e anatômica na PAG, onde várias funções especializadas são representadas na forma de colunas neuronais longitudinais distintas (Garcia-Larrea; Peyron, 2007; Fonoff et al., 2009a; Linnman et al., 2012; Pagano et al., 2012; Kim et al., 2015). Embora apresente funções distintas e opostas, uma vez que o antagonista de opióides naloxona eleva o limiar nociceptivo induzido pela estimulação da PAGvl, mas não da PAGdl, os sistemas formados por essas subdivisões da PAG devem funcionar em integração com outras regiões da PAG e seus sistemas descendentes (Nichols; Thorn, 1990; Behbehani, 1995; Mendes-Gomes et al., 2011). Semelhante ao sistema opióide, propôs-se a existência de um sistema modulador nociceptivo canabinérgico que se encontra presente na PAGdl e PAGl e é regulado pelos neurotransmissores GABA, glicina e glutamato (Walker et al., 1999; Drew; Vaughan, 2004).

Desde sua primeira descrição em 1966 por Bito et al. (Bito et al., 1966), a microdiálise tornou-se uma ferramenta valiosa para a medição de substâncias extracelulares e pode ser usada para monitorar continuamente os níveis de aminoácidos e neurotransmissores em diferentes regiões do SNC (Bito et al., 1966; Benveniste; Hüttemeier, 1990; Di Chiara, 1990; Renno et al., 2008;

Nandi; Lunte, 2009). Os neurotransmissores liberados após estimulação cortical têm que se difundir através do espaço extracelular antes de serem coletados pela sonda da cânula de microdiálise. As sondas utilizadas na microdiálise, semelhante ao que ocorre no capilar sanguíneo, permitem a troca de substâncias por difusão. Isso ocorre sem vazamento de fluido, uma vez que a perfusão do tubo de diálise forma um sistema de fluxo fechado, que é separado do tecido cerebral (Benveniste; Hüttemeier, 1990). Apesar da sua utilidade, existem alguns limites na técnica de microdiálise. Durante a difusão através do espaço extracelular, o metabolismo do receptor e a degradação dos neurotransmissores podem modificar a quantidade dessas substâncias que é coletada através do dialisado (Benveniste; Hüttemeier, 1990; Martinez et al., 2013; Lopez et al., 2016). Além disso, a área a ser analisada, o tamanho da cânula de microdiálise, as propriedades da membrana e os danos nos tecidos durante a inserção da cânula podem influenciar o resultado obtido e dificultar a interpretação dos dados (Benveniste; Hüttemeier, 1990; Di Chiara, 1990; de Lima Oliveira et al., 2014). No entanto, a microdiálise nos proporciona uma oportunidade única de monitoração dos neurotransmissores liberados em diferentes regiões cerebrais e da medula espinhal, com a vantagem de que pode ser realizada tanto em animais acordados quanto anestesiados (Westerink et al., 1987; Benveniste; Hüttemeier, 1990; Di Chiara, 1990; Westerink, 1995; Di Chiara et al., 1996; Timmerman; Westerink, 1997; Renno et al., 1998, 2008; Nandi e Lunte, 2009).

O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios no SNC (Morgan et al., 2009). Alguns estudos com microdiálise mostram que o glutamato está presente em concentrações basais significativas na medula

espinhal e em núcleos do tronco cerebral como a PAG e o RVM (Maione et al., 1999; Marabese et al., 2007; Renno et al., 2008). Além disso, diferentes receptores para o glutamato estão presentes significativamente na PAG (Clements et al., 1987; Jacquet, 1988; de Novellis et al., 2002; 2003; Marabese et al., 2007). Esta abundante distribuição é indicativa do papel crítico que o glutamato desempenha na modulação nociceptiva nessas áreas. Além disso, é possível que as variações nos níveis extracelulares desses aminoácidos e na distribuição dos subtipos dos sítios de ligação do glutamato na PAG possam resultar da complicada circuitaria neural exibida por essa área do mesencéfalo, e indica que o papel do glutamato na modulação nociceptiva da PAG é bastante complexo (Albin et al., 1990; de Novellis et al., 2003).

Em ratos com modelo de dor neuropática induzida por ligadura do nervo espinhal, observa-se uma diminuição em longo prazo da neurotransmissão glutamatérgica na PAGvl, que resulta tanto de mecanismos pré-sinápticos quanto pós-sinápticos. Esta modificação sináptica pode induzir uma redução persistente do sistema inibidor nociceptivo descendente, que por sua vez resulta em dor neuropática crônica (Ho et al., 2013). A ausência de efeito antinociceptivo após a microinjeção de antagonistas dos receptores de glutamato na PAG sugere que o glutamato pode não participar da modulação da nocicepção na PAG ou que este aminoácido não é liberado tonicamente (Morgan et al., 2009). A ativação de receptores de glutamato pode não ser necessária para ativar neurônios de saída da PAG, uma vez que esses neurônios podem ser ativados pela inibição da liberação de GABA produzida pela morfina (Drew; Vaughan, 2004; Marabese et al., 2007). Além disso, a microinjeção de antagonistas dos receptores de glutamato induz um aumento

no efeito antinociceptivo da morfina, indicando que o glutamato pode atuar contrapondo o efeito da morfina na PAG (Morgan et al., 2009). Esses dados estão em contraste com uma série de estudos sugerindo que as ações analgésicas glutaminérgicas desempenham um papel importante na antinocicepção opióide na PAG (Albin et al., 1990; Renno et al., 2008). De acordo com estas hipóteses, o glutamato ativa os neurônios de saída PAG, induzindo dessa forma uma inibição descendente do estímulo nociceptivo na medula espinhal (Albin et al., 1990; Renno et al., 2008). Outrossim, a microinjeção de aminoácidos excitatórios na PAG ativa a via inibitória nociceptiva descendente (Urca et al., 1980; Jacquet, 1988; Morgan et al., 1998; Silva et al., 2000). A analgesia produzida pelas microinjeções de glutamato na PAG ocorre tanto em ratos livres quanto anestesiados, e pode ser inibida por uma baixa dose de naloxona (Urca et al., 1980). Em contraste, a administração de altas doses de naloxona se mostrou ineficaz no bloqueio da analgesia induzida pelo glutamato, ou mesmo potencializou seu efeito analgésico (Urca et al., 1980).

Neste estudo, observamos que a transmissão de glutamato na PAG pode não ser crucial para a analgesia induzida pela ECM, embora o glutamato esteja presente em níveis basais. Esse achado pode estar relacionado à região de PAG analisada, considerando que o efeito antinociceptivo do glutamato é comumente descrito na PAGvl, e no presente estudo os alvos onde a microdiálise foi realizada estavam mais próximos das colunas laterais e dorsolaterais da PAG. Outra hipótese pode ser a ausência de influência direta da ECM no sistema glutaminérgico. Em face do exposto, o papel exato do glutamato na ativação ou inibição dos neurônios que ativam o sistema inibitório descendente na PAG após ECM ainda é conflitante, e mais pesquisas ainda

são necessárias para esclarecer o funcionamento do complexo sistema glutaminérgico na PAG.

A glicina é um aminoácido simples de ação rápida, encontrado em concentrações mais elevadas na medula espinhal, embora também desempenhe um papel fundamental na modulação nociceptiva em níveis supra-espinhais (Elekes et al., 1986; Shapiro, 1997; Fürst, 1999; Martins et al., 2008). Evidências obtidas de microdiálise *in vivo*, estudos de hibridização *in situ* e de imunorreatividade indicam que a glicina parece desempenhar um papel importante no processamento da dor na PAG (Graham et al., 1967; Campistron et al., 1986; Elekes et al., 1986; Betz, 1991; Pourcho et al., 1992; Maione et al., 2000; Renno et al., 2008; Tuma et al., 2013). Um estudo de microdiálise *in vivo* demonstrou que as concentrações basais da glicina na PAG e em outros núcleos do tronco encefálico são consideravelmente maiores quando comparadas as de outros aminoácidos (Renno, 1998; Renno et al., 2008). Alguns estudos foram realizados *in vivo* para avaliar a liberação de glicina após estimulação neuronal ou estimulação nociva periférica (Maione et al., 2000; Martins et al., 2008; Renno et al., 2008); no entanto, não havia informação se a liberação de glicina seria modulada na PAG pela ECM. A glicina exerce sua função inibitória através da ativação de um receptor pós-sináptico específico que é estricnina-sensível, e também pode atuar como um co-agonista do glutamato na ativação dos receptores NMDA, que é insensível à estricnina (Betz, 1991; Viu et al., 1998; Shin et al., 2003; Martins et al., 2008; Choi et al., 2013). Com base nisso, além de atuar como um neurotransmissor inibitório através de sua ação em receptores estricnina-sensíveis, a glicina também pode potencializar o efeito excitatório do glutamato nos receptores

NMDA (Pourcho et al., 1992). Em algumas áreas do SNC, foi proposto um transportador vesicular comum para glicina e GABA, que seria responsável por seus co-armazenamentos na mesma vesícula sináptica e subsequente co-liberação em sinapses mistas desses neurotransmissores inibitórios (Dumoulin et al., 1999; Maione et al., 2000; Renno et al., 2008). No entanto, ao contrário do que é observado com GABA, os opióides endógenos não parecem modular a atividade dos neurônios glicinérgicos na PAGvl (Maione et al., 2000). Conquanto, a observação de que a naloxona não tem efeito sobre a diminuição dos níveis de glicina após a indução nociceptiva com formalina reforça a hipótese de que GABA e glicina são liberados por populações distintas de interneurônios e não conjuntamente na PAG de ratos, sugerindo que o aumento da liberação de glicina pode ter um efeito antinociceptivo (Maione et al., 2000), o que estaria de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo. Embora os canabinóides endógenos possam estar envolvidos na modulação da glicina na PAG, o mecanismo preciso da diminuição dos níveis de glicina durante a estimulação nociceptiva persistente ainda é desconhecido (Maione et al., 2000). Uma vez que os receptores de glicina são encontrados principalmente na PAGdl, pode-se supor que os canabinóides endógenos estão envolvidos na diminuição dos níveis de glicina durante estímulos nociceptivos persistentes (Viu et al., 1998).

A micro-injeção de glicina na coluna dorsolateral da PAG induz hiponocicepção, avaliada pelo aumento da latência no teste de retirada da cauda em ratos. Este efeito é anatomicamente específico para PAGdl, uma vez que a injeção de glicina em camadas profundas do colículo superior ou outras regiões próximas a PAG não conseguiu produzir hiponocicepção (Martins et al.,

2008). Corroborando esses achados, observamos que a microinjeção de antagonistas de glicina nas colunas dorsolateral e lateral PAG reverte o efeito anti-nociceptivo da ECM em animais com dor neuropática. Um estudo com microdiálise mostrou que o estímulo nociceptivo induzido pela injeção de carragenina aumentou consideravelmente a concentração de glicina na PAG quando comparada com um controle, e que a liberação de glicina na PAG pode ser diminuída pela administração de paracetamol (Túma et al., 2009). Num recente estudo de microdiálise *in vivo* que analisou as concentrações de glicina, GABA e glutamato na PAG, realizado em ratos que se movem livremente, a hiperalgesia induzida por carragenina aumentou os níveis de glicina e glutamato e reduziu a liberação de GABA. No entanto, a analgesia induzida pelo paracetamol diminuiu a liberação de glicina e não teve efeito sobre GABA e glutamato (Túma et al., 2013). Choi et al. (2013) relatou que através de uma despolarização pré-sináptica, a ativação do receptor de glicina pré-sináptico aumenta a liberação espontânea de glutamato nos neurônios da PAG e, portanto, proporciona um papel fisiológico da glicina na função antinociceptiva mediada pela PAG. A microinjecção de glicina na PAG dorsal produziu hiperalgesia em doses mais baixas e antinocicepção em doses mais elevadas, em dois modelos de nocicepção persistente, e ambos os efeitos foram bloqueados quando a glicina foi co-injetada com antagonista do receptor NMDA ou antagonista dos receptores de glicina do tipo B. Este efeito é consistente com a proposta de que o receptor GLYB/NMDA desempenha um papel importante na modulação nociceptiva dor na PAG dorsal (Martins et al., 2010). Além disso, sugeriu-se que a ação da glicina através do receptor GLYB/NMDA na PAG dorsal pode produzir facilitação ou inibição da

nocicepção dependendo do contexto emocional em que a dor ocorreu (Martins et al., 2010). Em contraste com esses resultados, um estudo com ratos anestesiados demonstrou que a microinjeção de glicina, isoladamente ou em combinação com estricnina ou com um antagonista do receptor NMDA na PAGvl, exerce um efeito dependente da dose na atividade das células “ON” e “OFF” do RVM no limiar nociceptivo dos animais (Campistrone et al., 1986). No presente estudo, observamos um aumento na liberação de glicina durante o período de estimulação, sugerindo que a glicina pode estar envolvida no efeito antinociceptivo induzido pela ECM. Quando comparamos o aumento na liberação de glicina com a extensão das sondas de microdialise entre as colunas da PAG, verificamos que esse efeito foi relacionado às colunas lateral e dorsolateral, e não a coluna ventrolateral, suportando a teoria que essas colunas são entidades distintas (Carrive; Bandler, 1991). Esse dado reforça a hipótese de que as colunas lateral e dorsolateral da PAG são responsáveis pela liberação de glicina após ECM. Ademais, confirmando esses achados, demonstramos que a micro-injeção de estricnina, um antagonista dos receptores da glicina, nas colunas lateral e dorsolateral da PAG reverteu completamente o efeito antinociceptivo produzido pela ECM. Alguns estudos demonstraram que a ativação dos receptores de glicina aumenta a excitabilidade dos neurônios da PAG através da ampliação da transmissão excitatória glutamatérgica, porém não observamos um aumento associado à liberação de glutamato durante a ECM, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos. Estudos futuros envolvendo eletrofisiologia ou imunorreatividade podem ajudar a elucidar o papel da glicina na regulação da transmissão nociceptiva mediada pela PAG durante ECM.

O aminoácido GABA é um dos principais neurotransmissores inibitórios no SNC e desempenha um papel importante na regulação nociceptiva na PAG (Depaulis et al., 1987; Renno et al., 2008; Lau; Vaughan, 2014). Os interneurônios GABA estão presentes em toda a extensão rostrocaudal da PAG nas colunas ventrolateral e dorsolateral da PAG (Barbaresi, 2005). Um estudo que utilizou técnicas de imunocitoquímica e microscopia eletrônica para examinar a morfologia e as relações sinápticas dos terminais imunorreativos GABA na PAGvl mostrou que os terminais GABAérgicos compreendem quase 40% de todos os terminais axônicos na PAGvl (Reichling; Basbaum, 1990; Renno, 1998). Além disso, aproximadamente 50% dos neurônios da PAG marcados de forma retrógrada do RVM possuem aferências sinápticas com imunorreatividade para GABA em seus corpos ou dendritos proximais (Reichling; Basbaum, 1990; Renno et al., 1998, 2008). De acordo com a hipótese de "desinibição do GABA", os opióides ativam indiretamente a via descendente da PAG-RVM, suprimindo a influência inibitória dos interneurônios GABAérgicos locais (Basbaum; Fields, 1984; Maione et al., 1999; Lau; Vaughan, 2014). Foi proposto que os interneurônios GABAérgicos tonicamente ativos, presentes na PAG e RVM, liberam o neurotransmissor GABA que atua através de receptores GABA_A para inibir os neurônios eferentes que se projetam para o CPMEI (Basbaum; Fields, 1984; Maione et al., 1999; Lau; Vaughan, 2014). Esta hipótese é baseada em uma série de estudos eletrofisiológicos *in vivo* e neurofarmacológicos *in vitro*; No entanto, a grande maioria das evidências que apóiam esse modelo são indiretas (Basbaum; Fields, 1984; Maione et al., 1999; Barbaresi, 2005; Lau; Vaughan, 2014). A micro-injeção de agonistas de GABA na PAG de animais acordados impediu a

ação antinociceptiva induzida pela morfina injetada no mesmo local e, em oposição, a aplicação de antagonistas do receptor GABA_A induziu um efeito analgésico, além de aumentar a analgesia induzida pela morfina (Moreau; Fields, 1986; Depaulis et al., 1987; Behbehani, 1995; Barbaresi, 2005). Um estudo imunocitoquímico sugeriu que na PAG podem existir pelo menos duas categorias de neurônios GABAérgicos. O primeiro grupo produziria um controle tônico sobre os neurônios eferentes, e o segundo grupo atuaria sobre esses neurônios GABAérgicos que, por sua vez, manteria os neurônios eferentes sob inibição tônica (Barbaresi, 2005). Existe apenas um estudo publicado que aborda o efeito da ECM na atividade do GABA presente na PAG. Pagano et al. (2012) avaliaram a expressão GABA na PAGvl após ECM em ratos sem dor neuropática induzida. Demonstrou-se que a ECM aumenta a taxa de disparo neuronal e a imunorreatividade à proteína c-Fos na PAG ipsilateral e, além disso, diminui a expressão de GABA, Zif268 e GAD dentro da mesma região. Esses achados sugerem que a ECM induz uma inibição de interneurônios GABAérgicos da PAGvl que se projeta monosinápticamente para células “OFF” do RVM, que por conseguinte tem um efeito inibitório na nocicepção (Pagano et al., 2012). Diversas razões poderiam explicar a discrepância entre os estudos; diferenças devido a mudanças plásticas durante a indução de dor neuropática no circuito nociceptivo, devido ao tempo de avaliação e a abordagem técnica. A dor neuropática é caracterizada pela neuroplasticidade molecular e bioquímica que pode ocorrer nas vias ascendente e descendente (Boadas-Vaello et al., 2016). Considerando o tempo de avaliação das secções histológicas, Pagano et al. (2012) optaram por avaliar a expressão de GAD após uma hora com base nos picos de expressão das proteínas do fator de

transcrição (Herdegen e Leah, 1998), por outro lado, a microdiálise possibilita a coleta local e imediata da amostragem de GABA do espaço intersticial (Contreras-Lopez et al., 2016; Zhang et al., 2012). Analisando os aspectos técnicos, apesar de ambos os estudos analisarem a transmissão química cerebral, há diferenças no que deve ser medido quando comparamos a imunorreatividade ao GABA versus a microdiálise. Marcadores de imunocoloração marcariam os neurônios GABAérgicos, incluindo diferentes concentrações intracelulares, o GABA citoplasmático e vesicular (Waagepetersen et al., 2001; Watson, 1988). A coloração de GAD no cérebro avalia o reservatório inativo de GAD dos corpos celulares que poderiam ser ativados quando a síntese adicional de GABA é necessária (Itoh e Uchimura, 1981; Martin et al., 1991). Uma vantagem do uso de microdiálise é que este método prático avalia alterações dinâmicas no espaço extracelular, oferece dessa forma medições confiáveis de GABA influenciadas por aferências GABAérgicas (Lopez et al., 2016; Timmerman; Westerink, 1997).

Embora muitos estudos demonstrem que a morfina e outros agonistas opióides bloqueiam a ação inibitória GABAérgica dentro dos neurônios da PAG, foi demonstrado em ratos com dor neuropática que a analgesia modulada pela PAG ocorre em associação ao aumento da liberação pré-sináptica de GABA (Hahm et al., 2011). Existe outra hipótese para o modelo atualmente aceito de que os opióides atuam diretamente através da inibição de interneurônios GABAérgicos da PAG, que por sua vez inibem tonicamente os neurônios eferentes da PAG para o CPME (Depaulis et al., 1987). De acordo com essa hipótese, os opióides inibem o grupo de neurônios que mantém os neurônios eferentes da PAG tonicamente inibidos, enquanto que em uma via paralela, os

neurônios GABAérgicos também influenciam os neurônios de saída da PAG, formando um sistema modulador nociceptivo mais complexo que o modelo atualmente descrito (Depaulis et al., 1987). A observação do nosso estudo foi o aumento, em vez da diminuição, do nível de GABA durante a ECM, uma vez que a inibição de GABA é proposta como a responsável pela ativação dos neurônios descendente de saída da PAG. Não verificamos uma correlação significativa entre o aumento na liberação de GABA e o posicionamento da cânula de microdialise entre as colunas da PAG. Essa observação pode ser explicada pelo fato de que, tanto nas colunas dorsolaterais e laterais quanto na ventrolateral, existe um aumento na liberação de GABA induzido pela estimulação cortical. Demonstramos também que a micro-injeção de bicuculina, um do antagonista dos receptores GABA_A, isoladamente nas colunas dorsolateral e lateral da PAG reduziu significadamente o efeito analgésico da ECM. Todavia, essa redução ocorreu em menor proporção do que a verificada após administração de antagonista de receptores de glicina, ou mesmo de quando os antagonistas de glicina e GABA foram injetados conjuntamente. Desses resultados podemos inferir que o neurotransmissor GABA está envolvido no efeito analgésico da ECM, porém seu papel pode ser inferior quando comparado ao de glicina. Pesquisas adicionais são necessárias para explicar os mecanismos deste fenômeno e para esclarecer se o aumento nos níveis de GABA observados no dialisado é específico para as colunas laterais e dorsolaterais da PAG, se está relacionado a modificações no metabolismo deste aminoácido, ou resulta em uma ação paradoxal do GABA, constituindo um circuito mais complexo de neurotransmissores moduladores da nocicepção do que atualmente proposto.

No presente estudo, observamos que as sondas de microdiálise estavam localizadas principalmente na região das colunas lateral e dorsolateral da PAG, embora uma pequena parte das sondas estivesse em contato com a PAGvl. Devemos considerar que essas subdivisões da PAG apresentam funções distintas e opostas, conforme demonstrado por estudos neurofisiológicos e neuroquímicos (Carrive; Bandler, 1991; Marabese et al., 2007). Além disso, o mesmo neurotransmissor, como glicina e glutamato, pode apresentar ações contrárias, dependendo das regiões da PAG onde atuam (Carrive; Bandler, 1991; Maione et al., 2000; Marabese et al., 2007; Martins et al., 2008; Palazzo et al., 2009). Outra ponderação inclui o fato de que a coleta de neurotransmissores foi realizada com animais anestesiados com infusão contínua de quetamina e xilazina. Estes anestésicos podem interferir farmacologicamente na liberação dos neurotransmissores avaliados, bem como a ausência de interação com o meio ambiente também influencia o padrão de liberação dos neurotransmissores como demonstrado anteriormente.

Nossos resultados sugerem que os aminoácidos glicina e GABA liberados na PAG estão envolvidos na analgesia induzida por estimulação cortical em animais com dor neuropática. Além disso, os resultados obtidos de que a micro-injeção de antagonista da glicina reverteu completamente o efeito analgésico da ECM apoia a hipótese de que a glicina exerce um papel crucial na analgesia induzida pela estimulação cortical. Verificamos também que a administração de antagonista de GABA_A, isoladamente ou em associação com a estriquina reduz o efeito analgésico da ECM. Esses achados, somados a observação de que a ECM induz um menor aumento na liberação de GABA quando comparado à glicina, apoia a hipótese de que, embora ambos os

neurotransmissores inibitórios possuam um papel no efeito antinociceptivo da ECM, a glicina está majoritariamente relacionada a esse fenômeno.

Embora vários estudos sugerem que o glutamato também pode desempenhar um papel na modulação nociceptiva da PAG, não observamos um aumento significativo na liberação de glutamato após ECM. Dado o tempo limitado de estimulação durante os experimentos, contrariamente ao que pode ser observado fisiologicamente *in vivo*, pode ser necessário um período maior de latência após a coleta dos valores basais para induzir o aumento na liberação de glutamate na PAG após ECM. Outra explicação envolve a possibilidade que discretas alterações na liberação do glutamato após ECM não puderam ser detectadas em decorrência da menor resolução do HPLC para detecção do glutamato quando analisamos simultaneamente com outros aminoácidos.

As características do método utilizado podem também influenciar nossas observações atuais, uma vez que as medidas de GABA, glicina e glutamato realizadas através da microdiálise refletem mudanças nas concentrações *in vivo* de neurotransmissores presentes em vários grupamentos neuronais, enquanto que os estudos eletrofisiológicos e imuno-histoquímicos avaliam um grupo específico de neurônios que são ativados pela ECM. O implante cirúrgico dos eletrodos e cânulas guias, assim como a utilização de testes comportamentais e de avaliação nociceptiva também podem alterar os sistemas neuroquímicos de modulação da dor em estudo. Outrossim, a coexistência de diversos neurotransmissores nas subdivisões da PAG dificultam a análise individual da ação dessas substâncias e a determinação dos seus efeitos inibitórios ou excitatórios.

A compreensão do mecanismo terapêutico relacionada ao efeito analgésico da ECM, e sua influência sobre neurotransmissores é de grande relevância, pois propicia um melhor entendimento dos sistemas de modulação e transmissão da dor, e poderá nos ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos para condições de dor crônica.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. A estimulação do córtex motor aumentou o limiar nociceptivo dos animais com dor neuropática.
2. Os neurotransmissores glicina e GABA liberados na PAG parecem ser os mais importantes na mediação da analgesia induzida pela estimulação cortical em animais com dor neuropática.
3. Os níveis de glutamato não mostraram alterações significativas nas amostras de microdiálise da PAG após ECM.
4. Em animais com dor neuropática submetidos à estimulação cortical, o aumento da liberação de glicina foi significativo nas colunas lateral e dorsolateral da PAG, mas não na sua região ventrolateral.
5. Ocorreu reversão do efeito antinociceptivo da estimulação cortical após a administração de antagonista de glicina na PAG de animais com dor neuropática.
6. Houve reversão do efeito analgésico da ECM após microinjeção de antagonista dos receptores GABA_A isoladamente, ou coadministrado com antagonista de receptores de glicina.

8 REFERÊNCIAS

8- REFERÊNCIAS

Aimone LD, Jones SL, Gebhart GF. Stimulation-produced descending inhibition from the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus in the rat: mediation by spinal monoamines but not opioids. *Pain* 1987;31:123–36.

al-Rodhan NR, Richelson E, Gilbert JA, McCormick DJ, Kanba KS, Pfenning MA, et al. Structure-antinociceptive activity of neurotensin and some novel analogues in the periaqueductal gray region of the brainstem. *Brain Res* 1991;557:227–35.

Albin RL, Makowiec RL, Hollingsworth Z, Dure LS, Penney JB, Young AB. Excitatory amino acid binding sites in the periaqueductal gray of the rat. *Neurosci Lett* 1990;118:112–5.

Alho EJL, Alho ATDL, Grinberg L, Amaro E Jr., Dos Santos GAB, da Silva RE, et al. High thickness histological sections as alternative to study the three-dimensional microscopic human sub-cortical neuroanatomy. *Brain Struct Funct* 2018;223(3):1121-32

Ali M, Saitoh Y, Oshino S, Hosomi K, Kishima H, Morris S, et al. Differential efficacy of electric motor cortex stimulation and lesioning of the dorsal root entry zone for continuous vs paroxysmal pain after brachial plexus avulsion. *Neurosurgery* 2011;68:1252–7; discussion 1257-1258.

An X, Bandler R, Öngür D, Price J I. Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in Macaque monkeys. *J Comp Neurol* 1998;401:455–79.

Bandler R, Shipley MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci* 1994;17:379–89.

Barbaresi P. GABA-immunoreactive neurons and terminals in the cat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. *J Neurocytol* 2005;34:471–87.

Barbaresi P, Gazzanelli G, Malatesta M. Glutamate-positive neurons and terminals in the cat periaqueductal gray matter (PAG): a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 1997;383:381–96.

Barke KE, Hough LB. Simultaneous measurement of opiate-induced histamine release in the periaqueductal gray and opiate antinociception: an in vivo microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266:934–42.

Barke KE, Hough LB. Morphine-induced increases of extracellular histamine levels in the periaqueductal grey in vivo: a microdialysis study. *Brain Res* 1992;572:146–53.

Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 1984;7:309–38.

Beart PM, Summers RJ, Stephenson JA, Cook CJ, Christie MJ. Excitatory amino acid projections to the periaqueductal gray in the rat: A retrograde transport study utilizing d[3H]aspartate and [3H]GABA. *Neuroscience* 1990;34:163–76.

Behbehani MM. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 1995;46:575–605.

Behbehani MM, Shipley MT, McLean JH. Effect of neurotensin on neurons in the periaqueductal gray: an in vitro study. *J Neurosci.* 1987;7(7):2035-40.

Behbehani MM, Fields HL. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. *Brain Res* 1979;170:85–93.

Beitz AJ. Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphe magnus projection: analysis using immunocytochemistry and microdialysis. *J Histochem Cytochem* 1990;38:1755–65.

Beitz AJ. The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 1982;7:133–59.

Beltramo M. The cannabinoid system and pain: towards new drugs? *J Soc Biol* 2009;203:99–106.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33:87–107.

Benveniste H, Hüttemeier PC. Microdialysis--theory and application. *Prog Neurobiol* 1990;35:195–215.

Berger AJ, Dieudonné S, Ascher P. Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. *J Neurophysiol* 1998;80:3336–40.

Betz H. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci* 1991;14:458–61.

Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem* 1966;13:1057–67.

Calignano A, Rana GL, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998;394:277–81.

Campistron G, Buijs RM, Geffard M. Glycine neurons in the brain and spinal cord. Antibody production and immunocytochemical localization. *Brain Res* 1986;376:400–5.

Cannon JT, Prieto GJ, Lee A, Liebeskind JC. Evidence for opioid and non-opioid forms of stimulation-produced analgesia in the rat. *Brain Res* 1982;243:315–21.

Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 1993;58:27–47.

Carrive P, Bandler R. Control of extracranial and hindlimb blood flow by the midbrain periaqueductal grey of the cat. *Exp Brain Res* 1991;84:599–606.

Carrive P, Morgan MM. Chapter 10 - Periaqueductal Gray. In: Mai JK, Paxinos G, editors. *Hum. Nerv. Syst. Third Ed.*, San Diego: Academic Press; 2012, p. 367–400.

Chapman CE, Jiang W, Lamarre Y. Modulation of lemniscal input during conditioned arm movements in the monkey. *Exp Brain Res* 1988;72:316–34.

Chiou R-J, Chang C-W, Kuo C-C. Involvement of the periaqueductal gray in the effect of motor cortex stimulation. *Brain Res* 2013;1500:28–35.

Chiou R-J, Lee H-Y, Chang C-W, Lin K-H, Kuo C-C. Epidural motor cortex stimulation suppresses somatosensory evoked potentials in the primary somatosensory cortex of the rat. *Brain Res* 2012;1463:42–50.

Choi K-H, Nakamura M, Jang I-S. Presynaptic glycine receptors increase GABAergic neurotransmission in rat periaqueductal gray neurons. *Neural Plast* 2013;2013:954302.

Clements JR, Madl JE, Johnson RL, Larson AA, Beitz AJ. Localization of glutamate, glutaminase, aspartate and aspartate aminotransferase in the rat midbrain periaqueductal gray. *Exp Brain Res* 1987;67:594–602.

Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primer* 2017;3:17002.

Commons KG, Valentino RJ. Cellular basis for the effects of substance P in the periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 2002;447:82–97.

Coulombe M-A, Erpelding N, Kucyi A, Davis KD. Intrinsic functional connectivity of periaqueductal gray subregions in humans. *Hum Brain Mapp* 2016;37:1514–30.

Cui M, Feng Y, McAdoo DJ, Willis WD. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:868–76.

Damasio AR, Grabowski TJ, Bechara A, Damasio H, Ponto LL, Parvizi J, et al. Subcortical and cortical brain activity during the feeling of self-generated emotions. *Nat Neurosci* 2000;3:1049–56.

de Lima Oliveira M, Kairalla AC, Fonoff ET, Martinez RCR, Teixeira MJ, Bor-Seng-Shu E. Cerebral microdialysis in traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage: state of the art. *Neurocrit Care* 2014;21:152–62.

de Novellis V, Marabese I, Palazzo E, Rossi Francesca, Berrino L, Rodella L, et al. Group I metabotropic glutamate receptors modulate glutamate and γ -aminobutyric acid release in the periaqueductal grey of rats. *Eur J Pharmacol* 2003;462:73–81.

de Novellis V, Marabese I, Uliano R, Palazzo E, Scafuro A, sca Rossi F, et al. Type I and II metabotropic glutamate receptors modulate periaqueductal grey glycine release: interaction between mGlu2/3 and A1 adenosine receptors. *Neuropharmacology* 2002;43:1061–9.

Depaulis A, Bandler R. The Midbrain Periaqueductal Gray Matter: Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization. Springer Science & Business Media; 2012.

Depaulis A, Morgan MM, Liebeskind JC. GABAergic modulation of the analgesic effects of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res* 1987;436:223–8.

Di Chiara G. In-vivo brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:116–21.

Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5274–8.

Di Chiara G, Tanda G, Carboni E. Estimation of in-vivo neurotransmitter release by brain microdialysis: the issue of validity. *Behav Pharmacol* 1996;7:640–57.

Dickenson AH, Chapman V, Green GM. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *Gen Pharmacol Vasc Syst* 1997;28:633–8.

Dobrovitsky V, Pimentel P, Duarte A, Froestl W, Stellar JR, Trzcińska M. CGP 44532, a GABAB receptor agonist, is hedonically neutral and reduces cocaine-induced enhancement of reward. *Neuropharmacology* 2002;42:626–32.

Drew GM, Lau BK, Vaughan CW. Substance P Drives Endocannabinoid-Mediated Disinhibition in a Midbrain Descending Analgesic Pathway. *J Neurosci* 2009;29:7220–9.

Drew GM., Vaughan CW. Multiple metabotropic glutamate receptor subtypes modulate GABAergic neurotransmission in rat periaqueductal grey neurons in vitro. *Neuropharmacology* 2004;46:927–34.

Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, Henry JP, et al. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 1999;112:811–23.

Elekes I, Patthy A, Láng T, Palkovits M. Concentrations of GABA and glycine in discrete brain nuclei. Stress-induced changes in the levels of inhibitory amino acids. *Neuropharmacology* 1986;25:703–9.

Enna SJ, Harstad EB, McCarson KE. Regulation of neurokinin-1 receptor expression by GABA(B) receptor agonists. *Life Sci* 1998;62:1525–30.

Enna SJ, McCarson KE. The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol* 2006;54:1–27.

Enz R. GABA(C) receptors: a molecular view. *Biol Chem* 2001;382:1111–22.

Fagundes-Pereyra WJ, Teixeira MJ, Reyns N, Touzet G, Dantas S, Laureau E, et al. Motor cortex electric stimulation for the treatment of neuropathic pain. *Arq Neuropsiquiatr* 2010;68:923–9.

Farley IJ, Hornykiewicz O. Noradrenaline distribution insubcortical areas of the human brain. *Brain Res* 1977;126:53–62.

Fields HL, Heinricher MM, Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:219–45.

Flores JA, El Banoua F, Galán-Rodríguez B, Fernandez-Espejo E. Opiate antinociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D1 (not D2) dopamine receptors. *Pain* 2004;110:205–14.

Fonoff ET. *Efeitos da estimulação elétrica do córtex motor na modulação da dor: análise comportamental e eletrofisiológica em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Fonoff ET, Dale CS, Pagano RL, Paccola CC, Ballester G, Teixeira MJ, et al. Antinociception induced by epidural motor cortex stimulation in naive conscious rats is mediated by the opioid system. *Behav Brain Res* 2009a;196:63–70.

Fonoff ET, Hamani C, Ciampi de Andrade D, Yeng LT, Marcolin MA, Jacobsen Teixeira M. Pain Relief and Functional Recovery in Patients with Complex Regional Pain Syndrome after Motor Cortex Stimulation. *Stereotact Funct Neurosurg* 2011;89:167–72.

Fonoff ET, Pereira JF, Camargo LV, Dale CS, Pagano RL, Ballester G, et al. Functional mapping of the motor cortex of the rat using transdural electrical stimulation. *Behav Brain Res* 2009b;202:138–41.

Fontaine D, Hamani C, Lozano A. Efficacy and safety of motor cortex stimulation for chronic neuropathic pain: critical review of the literature. *J Neurosurg* 2008;110:251–6.

Foster E, Wildner H, Tudeau L, Haueter S, Ralvenius WT, Jegen M, et al. Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron* 2015;85:1289–304.

França NRM, Toniolo EF, Franciosi AC, Alves AS, de Andrade DC, Fonoff ET, et al. Antinociception induced by motor cortex stimulation: somatotopy of behavioral response and profile of neuronal activation. *Behav Brain Res* 2013;250:211–21.

Fuchs PN, Peng YB, Boyette-Davis JA, Uhelski ML. The anterior cingulate cortex and pain processing. *Front Integr Neurosci* 2014;8:35.

Fürst S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull* 1999;48:129–41.

Garcia-Larrea L, Peyron R. Motor cortex stimulation for neuropathic pain: From phenomenology to mechanisms. *NeuroImage* 2007;37, Supplement 1:S71–9.

Gassner M, Ruscheweyh R, Sandkühler J. Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. *Pain* 2009;145:204–10.

Gebhart GF. Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;27:729–37.

Golan DE. *Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

Goudet C, Magnaghi V, Landry M, Nagy F, Gereau IV RW, Pin J-P. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. *Brain Res Rev* 2009;60:43–56.

Graham LT, Shank RP, Werman R, Aprison MH. Distribution of some synaptic transmitter suspects in cat spinal cord: glutamic acid, aspartic acid, gamma-aminobutyric acid, glycine and glutamine. *J Neurochem* 1967;14:465–72.

Greenamyre JT, Young AB, Penney JB. Quantitative autoradiographic distribution of L-[3H]glutamate-binding sites in rat central nervous system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1984;4:2133–44.

Guimarães AP, Guimarães FS, Prado WA. Modulation of carbachol-induced antinociception from the rat periaqueductal gray. *Brain Res Bull* 2000;51:471–8.

Haanpää M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bennett M, Bouhassira D, et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. *Pain* 2011;152:14–27.

Hadjipavlou G, Dunckley P, Behrens TE, Tracey I. Determining anatomical connectivities between cortical and brainstem pain processing regions in humans: a diffusion tensor imaging study in healthy controls. *Pain* 2006;123:169–78.

Hahm E-T, Kim Y, Lee J-J, Cho Y-W. GABAergic synaptic response and its opioidergic modulation in periaqueductal gray neurons of rats with neuropathic pain. *BMC Neurosci* 2011;12:41.

Hamani C, Schwalb JM, Rezai AR, Dostrovsky JO, Davis KD, Lozano AM. Deep brain stimulation for chronic neuropathic pain: Long-term outcome and the incidence of insertional effect. *Pain* 2006;125:188–96.

Heinricher MM, Cleary DR. *Anatomy and Physiology of Pain*. Youmans Neurol. Surg. 6th ed, Philadelphia: Elsevier Saunders: 2011, p. 1731–9.

Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev* 2009;60:214–25.

Hironaka T, Morita Y, Hagiwara S, Tateno E, Kita H, Tohyama M. Localization of GABAA-receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the lower brainstem of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 1990;7:335–45.

Ho Y-C, Cheng J-K, Chiou L-C. Hypofunction of glutamatergic neurotransmission in the periaqueductal gray contributes to nerve-injury-induced neuropathic pain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2013;33:7825–36.

Honey CM, Tronnier VM, Honey CR. Deep brain stimulation versus motor cortex stimulation for neuropathic pain: A minireview of the literature and proposal for future research. *Comput Struct Biotechnol J* 2016;14:234–7.

Hosomi K, Seymour B, Saitoh Y. Modulating the pain network--neurostimulation for central poststroke pain. *Nat Rev Neurol* 2015;11:290–9.

Hough LB, Nalwalk JW. Inhibition of morphine antinociception by centrally administered histamine H₂ receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 1992;215:69–74.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994;46:157–203.

Hyland NP, Cryan JF. A Gut Feeling about GABA: Focus on GABA(B) Receptors. *Front Pharmacol* 2010;1:124.

Jacquet YF. The NMDA receptor: central role in pain inhibition in rat periaqueductal gray. *Eur J Pharmacol* 1988;154:271–6.

Jensen TS, Yaksh TL. The antinociceptive activity of excitatory amino acids in the rat brainstem: an anatomical and pharmacological analysis. *Brain Res* 1992;569:255–67.

Jeong H-J, Chenu D, Johnson EE, Connor M, Vaughan CW. Sumatriptan inhibits synaptic transmission in the rat midbrain periaqueductal grey. *Mol Pain* 2008;4:54.

Jeong H-J, Lam K, Mitchell VA, Vaughan CW. Serotonergic modulation of neuronal activity in rat midbrain periaqueductal gray. *J Neurophysiol* 2013a;109:2712–9.

Jeong H-J, Lam K, Mitchell VA, Vaughan CW. Serotonergic modulation of neuronal activity in rat midbrain periaqueductal gray. *J Neurophysiol* 2013b;109:2712–9.

Jiang L, Ji Y, Voulalas PJ, Keaser M, Xu S, Gullapalli RP, et al. Motor cortex stimulation suppresses cortical responses to noxious hindpaw stimulation after spinal cord lesion in rats. *Brain Stimulat* 2014;7:182–9.

Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 1998;281:419–24.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum AS, Hudspeth AJ. *Principles of neural science*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2013.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010;8:e1000412.

Kim J, Ryu SB, Lee SE, Shin J, Jung HH, Kim SJ, et al. Motor cortex stimulation and neuropathic pain: how does motor cortex stimulation affect pain-signaling pathways? *J Neurosurg* 2015:1–11.

Knight YE, Goadsby PJ. The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine? *Neuroscience* 2001;106:793–800.

Kosek E, Lundberg L. Segmental and plurisegmental modulation of pressure pain thresholds during static muscle contractions in healthy individuals. *European Journal of Pain* 2003;7: 251-58.

Kremer M, Salvat E, Muller A, Yalcin I, Barrot M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience* 2016;338:183–206.

Krummenacher P, Candia V, Folkers G, Schedlowski M, Schönbachler G. Prefrontal cortex modulates placebo analgesia. *PAIN* 2010;148:368–74.

Kuroda R, Kawabata A, Kawao N, Umeda W, Takemura M, Shigenaga Y. Somatosensory cortex stimulation-evoked analgesia in rats: potentiation by NO synthase inhibition. *Life Sci* 2000;66:PL271-276.

Lau BK, Vaughan CW. Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Curr Opin Neurobiol* 2014;29:159–64.

Lau BK, Vaughan CW. Muscarinic modulation of synaptic transmission via endocannabinoid signalling in the rat midbrain periaqueductal gray. *Mol Pharmacol* 2008;74:1392–8.

Levy R, Deer TR, Henderson J. Intracranial neurostimulation for pain control: a review. *Pain Physician* 2010;13:157–65.

Lichtman AH, Cook SA, Martin BR. Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence supporting periaqueductal gray involvement. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:585–93.

Lin Q, Peng Y, Willis WD. Glycine and GABAA antagonists reduce the inhibition of primate spinothalamic tract neurons produced by stimulation in periaqueductal gray. *Brain Res* 1994;654:286–302.

Linderorth B, Stiller CO, Gunasekera L, O'Connor WT, Franck J, Gazelius B, et al. Release of neurotransmitters in the CNS by spinal cord stimulation: survey of present state of knowledge and recent experimental studies. *Stereotact Funct Neurosurg* 1993;61:157–70.

Linnman C, Moulton EA, Barmettler G, Becerra L, Borsook D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: State of the field. *NeuroImage* 2012;60:505–22.

Lopes PS de S. *Estimulação do córtex motor e antinocicepção: envolvimento da via de analgesia serotoninérgica descendente* [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2013.

Lopez WO, Barbosa DC, Teixeira MJ, Paiz M, Moura L, Monaco BA, et al. Pain Relief in CRPS-II after Spinal Cord and Motor Cortex Simultaneous Dual Stimulation. *Pain Physician* 2016;19:E631-635.

Lopez WOC, Fonoff ET, Hamani C, Tierney TS, Alho E, Ghilardi MG dos S, et al. Optimizing microdialysis for deep brain stimulation. *Front Biosci Elite Ed* 2016;8:299–310.

Loyd DR, Murphy AZ. The Role of the Periaqueductal Gray in the Modulation of Pain in Males and Females: Are the Anatomy and Physiology Really that Different? *Neural Plast* 2009;2009.

Lü N, Han M, Yang Z-L, Wang Y-Q, Wu G-C, Zhang Y-Q. Nociceptin/Orphanin FQ in PAG modulates the release of amino acids, serotonin and norepinephrine in the rostral ventromedial medulla and spinal cord in rats. *Pain* 2010;148:414–25.

Lucas JM, Ji Y, Masri R. Motor cortex stimulation reduces hyperalgesia in an animal model of central pain. *Pain* 2011;152:1398–407.

Mai JK, Triepel J, Metz J. Neurotensin in the human brain. *Neuroscience* 1987;22:499–524.

Maione S, Marabese I, Oliva P, de Novellis V, Stella L, Rossi F, et al. Periaqueductal gray matter glutamate and GABA decrease following subcutaneous formalin injection in rat. *Neuroreport* 1999;10:1403–7.

Maione S, Marabese I, Rossi F, Berrino L, Palazzo E, Trabace L. Effects of persistent nociception on periaqueductal gray glycine release. *Neuroscience* 2000;97:311–6.

Marabese I, Rossi Francesca, Palazzo E, Novellis V de, Starowicz K, Cristino L, et al. Periaqueductal Gray Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 7 and 8 Mediate Opposite Effects on Amino Acid Release, Rostral Ventromedial Medulla Cell Activities, and Thermal Nociception. *J Neurophysiol* 2007;98:43–53.

Martin WJ, Lai NK, Patrick SL, Tsou K, Walker JM. Antinociceptive actions of cannabinoids following intraventricular administration in rats. *Brain Res* 1993;629:300–4.

Martin WJ, Patrick SL, Coffin PO, Tsou K, Walker JM. An examination of the central sites of action of cannabinoid-induced antinociception in the rat. *Life Sci* 1995;56:2103–9.

Martinez RCR, Hamani C, de Carvalho MC, de Oliveira AR, Alho E, Navarro J, et al. Intraoperative dopamine release during globus pallidus internus stimulation in Parkinson's disease. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc* 2013;28:2027–32.

Martins MA, Carobrez AP, Tonussi CR. Activation of dorsal periaqueductal gray by glycine produces long lasting hyponociception in rats without overt defensive behaviors. *Life Sci* 2008a;83:118–21.

Martins MA, De Castro Bastos L, Melo NEB, Tonussi CR. Dependency of nociception facilitation or inhibition after periaqueductal gray matter stimulation on the context. *Behav Brain Res* 2010;214:260–7.

Masri R, Quiton RL, Lucas JM, Murray PD, Thompson SM, Keller A. Zona incerta: a role in central pain. *J Neurophysiol* 2009;102:181–91.

Mayer ML. Emerging models of glutamate receptor ion channel structure and function. *Structure* 2011;19(10):1370–80.

Meller ST, Dennis BJ. Efferent projections of the periaqueductal gray in the rabbit. *Neuroscience* 1991;40:191–216.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150:971–9.

Mendes-Gomes J, Amaral VCS, Nunes-de-Souza RL. Ventrolateral periaqueductal gray lesion attenuates nociception but does not change anxiety-like indices or fear-induced antinociception in mice. *Behav Brain Res* 2011;219:248–53.

Meyer PJ, Morgan MM, Kozell LB, Ingram SL. Contribution of dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated antinociception. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;204:531–40.

Meyerson BA, Lindblom U, Linderöth B, Lind G, Herregodts P. Motor cortex stimulation as treatment of trigeminal neuropathic pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1993;58:150–3.

Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 2002;66:355–474.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57:1–164.

Millan MJ, Seguin L, Honoré P, Girardon S, Bervoets K. Pro- and antinociceptive actions of serotonin (5-HT)_{1A} agonists and antagonists in rodents: relationship to algesiometric paradigm. *Behav Brain Res* 1996;73:69–77.

Miller MW. The origin of corticospinal projection neurons in rat. *Exp Brain Res* 1987;67:339–51.

Möhler H, Fritschy J-M, Crestani F, Hensch T, Rudolph U. Specific GABA(A) circuits in brain development and therapy. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1685–90.

Monhemius R, Green DL, Roberts MHT, Azami J. Periaqueductal grey mediated inhibition of responses to noxious stimulation is dynamically activated in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2001;298:70–4.

Monsalve G. Motor cortex stimulation for facial chronic neuropathic pain: A review of the literature. *Surg Neurol Int* 2012;3:290.

Moreau J-L, Fields HL. Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. *Brain Res* 1986;397:37–46.

Morgan MM, Bobeck EN, Ingram SL. Glutamate modulation of antinociception, but not tolerance, produced by morphine microinjection into the periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 2009;1295:59–66.

Morgan MM, Gold MS, Liebeskind JC, Stein C. Periaqueductal gray stimulation produces a spinally mediated, opioid antinociception for the inflamed hindpaw of the rat. *Brain Res* 1991;545:17–23.

Morgan MM, Whitney PK, Gold MS. Immobility and flight associated with antinociception produced by activation of the ventral and lateral/dorsal regions of the rat periaqueductal gray. *Brain Res* 1998;804:159–66.

Murotani T, Ishizuka T, Nakazawa H, Wang X, Mori K, Sasaki K, et al. Possible involvement of histamine, dopamine, and noradrenalin in the periaqueductal gray in electroacupuncture pain relief. *Brain Res* 2010;1306:62–8.

Nakamura M, Jang I-S. Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors enhance GABAergic synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons. *Eur J Pharmacol* 2010;640:178–84.

Nandi P, Lunte SM. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review. *Anal Chim Acta* 2009;651:1–14.

Neve K, editor. *The Dopamine Receptors*. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2010.

Nguyen JP, Lefaucheur JP, Decq P, Uchiyama T, Carpentier A, Fontaine D, et al. Chronic motor cortex stimulation in the treatment of central and neuropathic pain. Correlations between clinical, electrophysiological and anatomical data. *Pain* 1999;82:245–51.

Nguyen J-P, Nizard J, Keravel Y, Lefaucheur J-P. Invasive brain stimulation for the treatment of neuropathic pain. *Nat Rev Neurol* 2011;7:699–709.

Nichols DS, Thorn BE. Stimulation-produced analgesia and its cross-tolerance between dorsal and ventral PAG loci. *Pain* 1990;41:347–52.

Nieto MM, Wilson J, Cupo A, Roques BP, Noble F. Chronic morphine treatment modulates the extracellular levels of endogenous enkephalins in rat brain structures involved in opiate dependence: a microdialysis study. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2002;22:1034–41.

Odeh F, Antal M, Zagon A. Heterogeneous synaptic inputs from the ventrolateral periaqueductal gray matter to neurons responding to somatosensory stimuli in the rostral ventromedial medulla of rats. *Brain Res* 2003;959:287–94.

Ogawa S, Kow LM, Pfaff DW. In vitro electrophysiological characterization of midbrain periaqueductal gray neurons in female rats: responses to GABA- and Met-enkephalin-related agents. *Brain Res* 1994;666:239–49.

Ostrowsky K, Magnin M, Ryvlin P, Isnard J, Guenot M, Mauguière F. Representation of Pain and Somatic Sensation in the Human Insula: a Study of Responses to Direct Electrical Cortical Stimulation. *Cereb Cortex* 2002;12:376–85.

Pagano RL, Assis DV, Clara JA, Alves AS, Dale CS, Teixeira MJ, et al. Transdural motor cortex stimulation reverses neuropathic pain in rats: a profile of neuronal activation. *Eur J Pain Lond Engl* 2011;15:268.e1-14.

Pagano RL, Fonoff ET, Dale CS, Ballester G, Teixeira MJ, Britto LRG. Motor cortex stimulation inhibits thalamic sensory neurons and enhances activity of PAG neurons: possible pathways for antinociception. *Pain* 2012;153:2359–69.

Palazzo E, Guida F, Migliozi A, Gatta L, Marabese I, Luongo L, et al. Intraperiaqueductal gray glycine and D-serine exert dual effects on rostral ventromedial medulla ON- and OFF-cell activity and thermoceptive threshold in the rat. *J Neurophysiol* 2009;102:3169–79.

Parravano DC, Ciampi DA, Fonoff ET, Monaco B, Navarro J, Yeng LT, et al. Quality of Life After Motor Cortex Stimulation: Clinical Results and Systematic Review of the Literature. *Neurosurgery* 2018 Mar 14. [Epub ahead of print]

Pascual J, del Arco C, González AM, Pazos A. Quantitative light microscopic autoradiographic localization of alpha 2-adrenoceptors in the human brain. *Brain Res* 1992;585:116–27.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; 1998.

Peng Yuan B., Lin Q, Willis WD. Effects of GABA and glycine receptor antagonists on the activity and PAG-induced inhibition of rat dorsal horn neurons. *Brain Res* 1996;736:189–201.

Peng Y. B., Lin Q, Willis WD. Involvement of alpha-2 adrenoceptors in the periaqueductal gray-induced inhibition of dorsal horn cell activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278:125–35.

Pereira EAC, Paranathala M, Hyam JA, Green AL, Aziz TZ. Anterior cingulotomy improves malignant mesothelioma pain and dyspnoea. *Br J Neurosurg* 2014;28:471–4.

Pereira EAC, Wang S, Peachey T, Lu G, Shlugman D, Stein JF, et al. Elevated gamma band power in humans receiving naloxone suggests dorsal periaqueductal and periventricular gray deep brain stimulation produced analgesia is opioid mediated. *Exp Neurol* 2013;239:248–55.

Pert CB, Snyder SH. Properties of Opiate-Receptor Binding in Rat Brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973;70:2243–7.

Pertovaara A, Kemppainen P, Leppänen H. Lowered cutaneous sensitivity to nonpainful electrical stimulation during isometric exercise in humans. *Exp Brain Res*. 1992;89(2):447-52.

Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol* 2006;80:53–83.

Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol* 2001;63:569–611.

Peyron R, Laurent B, García-Larrea L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. *Neurophysiol Clin Neurophysiol* 2000;30:263–88.

Pourcho R G, Goebel DJ, Jojich L, Hazlett JC. Immunocytochemical evidence for the involvement of glycine in sensory centers of the rat brain. *Neuroscience* 1992;46:643–56.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Thérapie* 1957;111:409–19.

Raslan AM, Nasser M, Bahgat D, Abdu E, Burchiel KJ. Motor Cortex Stimulation for Trigeminal Neuropathic or Deafferentation Pain: An Institutional Case Series Experience. *Stereotact Funct Neurosurg* 2011;89:83–8.

Reddy SC, Panigrahy A, White WF, Kinney HC. Developmental changes in neurotransmitter receptor binding in the human periaqueductal gray. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:409–18.

Reichling DB, Basbaum AI. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. *J Comp Neurol* 1990;302:370–7.

Renno WM. Microdialysis of excitatory amino acids in the periaqueductal gray of the rat after unilateral peripheral inflammation. *Amino Acids* 1998;14:319–31.

Renno WM, Alkhalaf M, Mousa A, Kanaan RA. A comparative study of excitatory and inhibitory amino acids in three different brainstem nuclei. *Neurochem Res* 2008;33:150–9.

Renno WM, Mullet MA, Williams FG, Beitz AJ. Construction of 1 mm microdialysis probe for amino acids dialysis in rats. *J Neurosci Methods* 1998;79:217–28.

Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 1969;164:444–5.

Rolls ET. The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn* 2004;55:11–29.

Romanelli P, Esposito V. The functional anatomy of neuropathic pain. *Neurosurg Clin N Am* 2004;15:257–68.

Rusina R, Vaculin S, Yamamotova A, Barek S, Dvorakova H, Rokyta R. The effect of motor cortex stimulation in deafferentated rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2005;26:283–8.

Saito K, Barber R, Wu J, Matsuda T, Roberts E, Vaughn JE. Immunohistochemical localization of glutamate decarboxylase in rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:269–73.

Saitoh Y, Yoshimine T. Stimulation of primary motor cortex for intractable deafferentation pain. *Acta Neurochir Suppl* 2007;97:51–6.

Sarmiento SA, de Andrade EM, Tedeschi H. Strategies for resection of lesions in the motor area: preliminary results in 42 surgical patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2006;64(4):963–70.

Sarmiento SA, Jácome DC, de Andrade EM, Melo AV, de Oliveira OR, Tedeschi H. Relationship between the coronal suture and the central lobe: how important is it and how can we use it in surgical planning? *Arq Neuropsiquiatr* 2008;66(4):868-71.

Sato K, Zhang J-H, Saika T, Sato M, Tada K, Tohyama M. Localization of glycine receptor $\alpha 1$ subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: An analysis using in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 1991;43:381–95.

Satpute AB, Wager TD, Cohen-Adad J, Bianciardi M, Choi J-K, Buhle JT, et al. Identification of discrete functional subregions of the human periaqueductal gray. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:17101–6.

Senapati AK, Huntington PJ, LaGraize SC, Wilson HD, Fuchs PN, Peng YB. Electrical stimulation of the primary somatosensory cortex inhibits spinal dorsal horn neuron activity. *Brain Res* 2005a;1057:134–40.

Senapati AK, Huntington PJ, Peng YB. Spinal dorsal horn neuron response to mechanical stimuli is decreased by electrical stimulation of the primary motor cortex. *Brain Res* 2005b;1036:173–9.

Shapiro S. Neurotransmission by neurons that use serotonin, noradrenaline, glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in the normal and injured spinal cord. *Neurosurgery* 1997;40:168–76; discussion 177.

Sherman AD, Gebhart GF. Pain-induced alteration of glutamate in periaqueductal central gray and its reversal by morphine. *Life Sci* 1974;15:1781–9.

Shijo K, Katayama Y, Yamashita A, Kobayashi K, Oshima H, Fukaya C, et al. c-Fos Expression After Chronic Electrical Stimulation of Sensorimotor Cortex in Rats. *Neuromodulation J Int Neuromodulation Soc* 2008;11:187–95.

Shin M-C, Jang M-H, Chang H-K, Lim S, Han S-M, Park H-J, et al. Modulation of Chelidonium herba on glycine-activated and glutamate-activated ion currents in rat periaqueductal gray neurons. *Clin Chim Acta* 2003;337:93–101.

Shipley MT, McLean JH, Behbehani MM. Heterogeneous distribution of neurotensin-like immunoreactive neurons and fibers in the midbrain periaqueductal gray of the rat. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1987;7:2025–34.

Sillery E, Bittar RG, Robson MD, Behrens TEJ, Stein J, Aziz TZ, et al. Connectivity of the human periventricular-periaqueductal gray region. *J Neurosurg* 2005;103:1030–4.

Silva E, Hernandez L, Contreras Q, Guerrero F, Alba G. Noxious stimulation increases glutamate and arginine in the periaqueductal gray matter in rats: a microdialysis study. *Pain* 2000;87:131–5.

Silva GD, Lopes PSS, Fonoff ET, Pagano RL. The spinal anti-inflammatory mechanism of motor cortex stimulation: cause of success and refractoriness in neuropathic pain? *J Neuroinflammation* 2015;12:10.

Smith GS, Savery D, Marden C, López Costa JJ, Averill S, Priestley JV, et al. Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and calcitonin gene-related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. *J Comp Neurol* 1994;350:23–40.

Son BC, Kim MC, Moon DE, Kang JK. Motor cortex stimulation in a patient with intractable complex regional pain syndrome Type II with hemibody involvement. *J Neurosurg* 2003;98:175–9. doi:10.3171/jns.2003.98.1.0175.

Stiller CO, Bergquist J, Beck O, Ekman R, Brodin E. Local administration of morphine decreases the extracellular level of GABA in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Neurosci Lett* 1996;209:165–8.

Strominger NL, Demarest RJ, Laemle LB. *Noback's human nervous system: structure and function*. 7th edn. New York: Springer; 2012.

Thoburn KK, Hough LB, Nalwalk JW, Mischler SA. Histamine-induced modulation of nociceptive responses. *Pain* 1994;58:29–37.

Timmerman W, Westerink BH. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synap N Y N* 1997;27:242–61.

Tobaldini G, Reis RA, Sardi NF, Lazzarini MK, Tomim DH, Lima MM s, et al. Dopaminergic mechanisms in periaqueductal gray-mediated antinociception. *Behav Pharmacol* 2018;29:225-33.

Todd AJ, Sullivan AC. Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 1990;296:496–505.

Triller A, Cluzaud F, Korn H. gamma-Aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *J Cell Biol* 1987;104:947–56.

Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 1991;251:85–7.

Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S. Chronic motor cortex stimulation in patients with thalamic pain. *J Neurosurg* 1993;78:393–401.

Tsubokawa T, Katayama Y, Yamamoto T, Hirayama T, Koyama S. Chronic motor cortex stimulation for the treatment of central pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1991;52:137–9.

Tůma P, Soukupová M, Samcová E, Štulík K. A determination of submicromolar concentrations of glycine in periaqueductal gray matter microdialyzates using capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *ELECTROPHORESIS* 2009;30:3436–41.

Tůma P, Šustková-Fišerová M, Opekar F, Pavlíček V, Málková K. Large-volume sample stacking for in vivo monitoring of trace levels of γ -aminobutyric acid, glycine and glutamate in microdialysates of periaqueductal gray matter by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Chromatogr A* 2013;1303:94–9.

Turnbull IM, Shulman R, Woodhurst WB. Thalamic stimulation for neuropathic pain. *J Neurosurg* 1980;52:486–93.

Urca G, Nahin RL, Liebeskind JC. Glutamate-induced analgesia: blockade and potentiation by naloxone. *Brain Res* 1980;192:523–30.

Vaculín S, Franek M, Yamamotová A, Rokyta R. Motor cortex stimulation in rats with chronic constriction injury. *Exp Brain Res* 2008;185:331–5.

Vanegas H, Schaible H-G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Brain Res Rev* 2004;46:295–309.

Vaughan CW, Christie MJ. Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. *J Physiol* 1997;498 (Pt 2):463–72.

Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol* 2000;57:288–95.

Vaughan CW, McGregor IS, Christie MJ. Cannabinoid receptor activation inhibits GABAergic neurotransmission in rostral ventromedial medulla neurons in vitro. *Br J Pharmacol* 1999;127:935–40.

Velasco M, Velasco F, Brito F, Velasco AL, Nguyen JP, Marquez I, et al. Motor Cortex Stimulation in the Treatment of Deafferentation Pain. *Stereotact Funct Neurosurg* 2002;79:146–67.

Vianna DML, Brandão ML. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica AI* 2003;36:557–66.

Viisanen H, Ansah OB, Pertovaara A. The role of the dopamine D2 receptor in descending control of pain induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat. *Brain Res Bull* 2012;89:133–43.

Viisanen H, Pertovaara A. Antinociception by motor cortex stimulation in the neuropathic rat: does the locus coeruleus play a role? *Exp Brain Res* 2010b;201:283–96.

Viisanen H, Pertovaara A. Roles of the rostroventromedial medulla and the spinal 5-HT(1A) receptor in descending antinociception induced by motor cortex stimulation in the neuropathic rat. *Neurosci Lett* 2010a;476:133–7.

Viu E, Zapata A, Capdevila JL, Fossom LH, Skolnick P, Trullas R. Glycine Site Antagonists and Partial Agonists Inhibit N-Methyl-D-aspartate Receptor-Mediated [³H]Arachidonic Acid Release in Cerebellar Granule Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:527–32.

Volz MS, Suarez-Contreras V, Portilla ALS, Illigens B, Bermpohl F, Fregni F. Movement observation-induced modulation of pain perception and motor cortex excitability. *Clin Neurophysiol Off J Int Fed Clin Neurophysiol* 2015;126:1204–11.

Waagepetersen HS, Sonnewald U, Gegelashvili G, Larsson OM, Schousboe A. Metabolic distinction between vesicular and cytosolic GABA in cultured GABAergic neurons using ¹³C magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci Res*. 2001;63(4):347-55.

Walker JM, Hohmann AG. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol* 2005:509–54.

Walker JM, Huang SM. Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther* 2002;95:127–35.

Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sañudo-Peña MC. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:12198–203.

Westerink BH. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. *Behav Brain Res* 1995;70:103–24.

Westerink BH, Damsma G, Rollema H, De Vries JB, Horn AS. Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci* 1987;41:1763–76.

Williams FG, Mullet MA, Beitz AJ. Basal release of Met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Res* 1995;690:207–16.

Wilson AR, Maher L, Morgan MM. Repeated cannabinoid injections into the rat periaqueductal gray enhance subsequent morphine antinociception. *Neuropharmacology* 2008;55:1219–25.

Wilson-Poe AR, Pocius E, Herschbach M, Morgan MM. The periaqueductal gray contributes to bidirectional enhancement of antinociception between morphine and cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav* 2013;103:444–9.

Winston JS, Vlaev I, Seymour B, Chater N, Dolan RJ. Relative Valuation of Pain in Human Orbitofrontal Cortex. *J Neurosci* 2014;34:14526–35.

Woodhams SG, Chapman V, Finn DP, Hohmann AG, Neugebauer V. The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology* 2017;124:105–20.

Xin L, Geller EB, Liu-Chen LY, Chen C, Adler MW. Substance P release in the rat periaqueductal gray and preoptic anterior hypothalamus after noxious cold stimulation: effect of selective mu and kappa opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1055–63.

Xing J, Li D-P, Li J. Role of GABA receptors in nitric oxide inhibition of dorsolateral periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology* 2008;54:734–44.

Zeilhofer HU, Wildner H, Yévenes GE. Fast Synaptic Inhibition in Spinal Sensory Processing and Pain Control. *Physiol Rev* 2012;92:193–235.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109–10.

APÊNDICE 1 - Carta de aprovação do protocolo de pesquisa pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/02/2013, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **009/13** intitulado: **“EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DO CÓRTEX MOTOR NOS NÍVEIS DE NEUROTRANSMISSORES NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL (PAG)”** que utilizará **36** animais da espécie **Ratos Wistar machos**, apresentado pelo **Departamento de NEUROLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Erich Talamoni Fonoff

Pesquisador (a) Executante: Emerson Magno Fernandes de Andrade

CEP-FMUSP, 05 de Março de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

APÊNDICE 2 - Carta de aprovação do protocolo de pesquisa pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Hospital Sírio-Libanês

De: Bruna Piassa Crestani <bruna.pcrestani@hsl.org.br>
Assunto: APROVAÇÃO CEUA 2012/25
Data: 14 de janeiro de 2013 16:41:59 BRST
Para: "erich.fonoff@gmail.com" <erich.fonoff@gmail.com>

Prezado Pesquisador,

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital Sírio-Libanês – CEUA analisou o protocolo cadastrado como **CEUA 2012/25**: “*Efeito da estimulação elétrica do córtex motor nos níveis de neurotransmissores na substância cinzenta periaquidutal (PAG)*”, sob responsabilidade do Dr. Erich Talamoni Fonoff, e **APROVOU** em reunião realizada no dia 14/01/2013 a realização do projeto.

Atenciosamente,

Bruna Piassa Crestani
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Hospital Sírio-Libanês
Fone:(11) 3155-8318
Fax : (11) 3155-8965
bruna.pcrestani@hsl.org.br
www.hospitalsiriolibanes.org.br

A Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio-Libanês é uma Instituição Filantrópica Brasileira que desenvolve ações integradas de assistência social, de saúde, de ensino e de pesquisa.

APÊNDICE 3 - Carta de aprovação do protocolo de pesquisa do experimento II pelo Comissão de Ética para o Uso de Animais do Hospital Sírio-Libanês

**INSTITUTO SÍRIO-LIBANÊS
DE ENSINO E PESQUISA**

São Paulo, 24 de novembro de 2016.

Ref. **CEUA-P 2012-25**: “Efeito da estimulação elétrica do córtex motor nos níveis de neurotransmissores na substância cinzenta periaquedutal (PAG)”.

Pesquisador Responsável: Dr. Erich T. Fonoff

O pesquisador solicitou emenda no projeto CEUA 2012/25 para inclusão de 36 animais, tendo como justificativa os resultados encontrados na primeira fase do estudo. A CEUA solicitou esclarecimentos sobre o novo desenho do estudo e possibilidade de redução do número de animais, excluindo os animais que receberiam solução salina. O pesquisador respondeu de forma adequada e justificou o número de animais devido ao procedimento esterotáxico ser complexo com perdas estimadas de 20%. O pesquisador modificou o desenho do estudo, sendo excluído o grupo falso-operado e incluídos 2 novos grupos que irão receber antagonista de glicina e GABA.

Solicitamos somente a correção de solicitação de animais para 30 (n =6) por grupo TOTAL 30.

“PROJETO APROVADO” pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Hospital Sírio Libanês.

Prof. Dr. André Luis Montagnini
Coordenador da CEUA

APÊNDICE 4 - Resumo de trabalho publicado na Stereotactic and Functional Neurosurgery, 2016 (doi: 10.1159/000455386)

Stereotact Funct Neurosurg. 2016;94 Suppl 2:1-77. doi: 10.1159/000455386. Epub 2017 Jan 16.

2016 Biennial Meeting of the American Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery, Chicago, IL, USA, June 18-21, 2016: Abstracts.

Role of the Motor Cortex Stimulation on Neurotransmitter Concentration in the Periaqueductal Gray Area (PAG)

Emerson Magno de Andrade, Raquel Martinez, Rosana Pagano, Patricia Lopes, Aline Auada, Ivo Lebrun, Manoel Teixeira, Erich T. Fonoff

Introduction

Subthreshold stimulation of the motor cortex is a relative new technique that has been used for the treatment of patients with chronic neuropathic pain syndromes that are resistant to conventional pharmacological treatment. The motor cortex may be the most rostral structure in the neuroaxis responsible for pain modulation, and recent results obtained by our group demonstrated that motor cortex stimulation (MCS) increases the neuronal activation of periaqueductal gray (PAG) in animal models of peripheral neuropathies. The PAG is one of the main subcortical centers of the descending pain suppressor system, and receives inputs from several brain areas.

Methods

Experiments were carried out on Wistar male rats, subdivided into three surgical groups. In the first group, the right sciatic nerve was tied, producing a chronic constriction injury (CCI), the second group was the sham-operated animals, and the third group was the control non-operated animals (naïve). All the rats underwent implantation of unilateral transdural electrodes on the motor area corresponding to the right hind paw. The animals were evaluated for mechanical hyperalgesia test and a chronic microdialysis guide cannula was stereotaxically implanted into the PAG, according to the Rat Brain Atlas. The microdialyzate samples were collected and the neurotransmitters analysis was performed by a high-performance liquid chromatography (HPLC).

Results

Animals subjected to CCI of the sciatic nerve showed reversal of mechanical hyperalgesia after MCS. MCS induced a significant increase in glycine levels during MCS (153 % increase) and after MCS (134%). The GABA concentration increases 145 % during transdural stimulation. Glutamate levels showed no change in PAG microdialysate after MCS.

Conclusion

Our results suggest that the neurotransmitters glycine and GABA, released in PAG during MCS, contribute to descending antinociceptive actions. The results of this project will contribute for the elucidation of the mechanisms of the antinociceptive effect of MCS, a phenomenon that has not been fully understood currently.

APÊNDICE 5 - Prêmio de melhor apresentação oral de trabalho científico - 2016 Biennial Meeting of the American Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery, Chicago, IL, EUA, 2016.