

Editorial	3
Neurobiologia da Dor: Mecanismos de Transmissão e Modulação da Informação Nociceptiva	5
Papel Central da Substância Cinzenta Periaqueductal no Controlo da Dor: Como Conciliar os Últimos Avanços dos Estudos Clínicos e Básicos?	20
Regulação do Sistema Noradrenérgico na Dor Crónica: Papel do <i>Locus Coeruleus</i> na Inflamação Articular e no Desenvolvimento de Transtornos Afetivo-Emocionais	25
Estudos de Terapia Génica para Controlo da Dor Crónica: Presente e Futuro	36



Director da revista

Sílvia Vaz Serra

Editores

Cristina Catana
Graça Mesquita
Ricardo Pestana
Rosário Alonso

Editorial Isaura Tavares	3
Neurobiologia da Dor: Mecanismos de Transmissão e Modulação da Informação Nociceptiva Isaura Tavares, Deolinda Lima e Armando Almeida	5
Papel Central da Substância Cinzenta Periaqueductal no Controlo da Dor: Como Conciliar os Últimos Avanços dos Estudos Clínicos e Básicos? Marta Louçano e Isaura Tavares	20
Regulação do Sistema Noradrenérgico na Dor Crónica: Papel do <i>Locus Coeruleus</i> na Inflamação Articular e no Desenvolvimento de Transtornos Afetivo-Emocionais Gisela Borges, Cristina Miguelez, Luisa Ugedo, Juan Antonio Micó, Esther Berrocoso e Fani Neto	25
Estudos de Terapia Génica para Controlo da Dor Crónica: Presente e Futuro Isabel Martins e Isaura Tavares	36

Ilustração da capa: Miriam Rodrigues



NORMAS DE PUBLICAÇÃO

1. A Revista «DOR» considerará, para publicação, trabalhos científicos relacionados com a dor em qualquer das suas vertentes, aguda ou crónica e, de uma forma geral, com todos os assuntos que interessem à dor ou que com ela se relacionem, como o seu estudo, o seu tratamento ou a simples reflexão sobre a sua problemática. A Revista «DOR» deseja ser o órgão de expressão de todos os profissionais interessados no tema da dor.

2. Os trabalhos deverão ser enviados em disquete, CD, DVD, ZIP o JAZZ para a seguinte morada:

Permanyer Portugal
Av. Duque d'Ávila, 92, 7.º Esq.
1050-084 Lisboa

ou, em alternativa, por e-mail:
permanyer.portugal@permanyer.com

3. A Revista «DOR» incluirá, para além de artigos de autores convidados e sempre que o seu espaço o permitir, as seguintes secções: ORIGINALS - Trabalhos potencialmente de investigação básica ou clínica, bem como outros aportes originais sobre etiologia, fisiopatologia, epidemiologia, diagnóstico e tratamento da dor; NOTAS CLÍNICAS - Descrição de casos clínicos importantes; ARTIGOS DE OPINIÃO - assuntos que interessem à dor e sua organização, ensino, difusão ou estratégias de planeamento; CARTAS AO DIRECTOR - inserção de

objecções ou comentários referentes a artigos publicados na Revista «DOR», bem como observações ou experiências que possam facilmente ser resumidas; a Revista «DOR» incluirá outras secções, como: editorial, boletim informativo aos sócios (sempre que se justificar) e ainda a reprodução de conferências, protocolos e novidades terapêuticas que o Conselho Editorial entenda merecedores de publicação.

4. Os textos deverão ser escritos configurando as páginas para A4, numerando-as no topo superior direito, utilizando letra Times tamanho 12 com espaços de 1.5 e incluindo as respectivas figuras e gráficos, devidamente legendadas, no texto ou em separado, mencionando o local da sua inclusão.

5. Os trabalhos deverão mencionar o título, nome e apelido dos autores e um endereço. Deverão ainda incluir um resumo em português e inglês e mencionar as palavras-chaves.

6. Todos os artigos deverão incluir a bibliografia relacionada como os trabalhos citados e a respectiva chamada no local correspondente do texto.

7. A decisão de publicação é da exclusiva responsabilidade do Conselho Editorial, sendo levada em consideração a qualidade do trabalho e a oportunidade da sua publicação.

Curriculum da autora da capa

Miriam Rodrigues nasceu no Porto. Terminou o curso de Estilista Modelista em 1983 e trabalhou como Estilista até 1991, participando também em ilustrações de moda em várias *Portex*, certames e no jornal *Primeiro de Janeiro*.

Frequentou *ateliers* particulares de pintura, cerâmica e joalheria, e também na Cooperativa *Árvore Porto* o curso livre de Pintura, o curso de Gravura e de Xilogravura. Já frequentou vários *workshops* com professores portugueses e estrangeiros, como o de Gravura com Dacos, de *Monoprint* e *Deep Etching* com Jules Maidoff, e de *Plywoodgraph* com Mizutani Norimasa. Curso de Desenho Científico no Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) (Universidade do Porto). Desde 1995, já participou em exposições na Malásia, Alemanha, Lituânia, Holanda, Espanha, Argentina, Colômbia, Itália, Japão, França, Canadá, Reino Unido, Polónia, Brasil e Portugal.

Está representada em diversos catálogos e livros e em várias colecções particulares, bem como no Museu do Douro (Portugal), no *Sakimi Art Museum* em Okinawa (Japão) e no *She Informationstechnologie* (Alemanha).

Sócia-fundadora do grupo Matriz (Associação de Gravura do Porto).

Prémio na Bienal de Gravura de Évora em 2007 (atribuído ao grupo Matriz).



© 2014 Permanyer Portugal

Av. Duque d'Ávila, 92, 7.º E - 1050-084 Lisboa
Tel.: 21 315 60 81 Fax: 21 330 42 96

ISSN: 0872-4814

Dep. Legal: B-17364/2000

Ref.: 1548AP144

Contacto em Portugal:

permanyer@permanyer.com



www.permanyer.com



Impresso em papel totalmente livre de cloro
Impressão: CPP – Consultores de Produções de
Publicidade, Lda.



Este papel cumpre os requisitos de ANSI/NISO
Z39-48-1992 (R 1997) (Papel Estável)

Reservados todos os direitos

Sem prévio consentimento da editora, não poderá reproduzir-se, nem armazenar-se num suporte recuperável ou transmissível, nenhuma parte desta publicação, seja de forma electrónica, mecânica, fotocopiada, gravada ou por qualquer outro método. Todos os comentários e opiniões publicados são da responsabilidade exclusiva dos seus autores.

Editorial

Isaura Tavares

É comum referir que o conhecimento da neurobiologia da dor tem progredido exponencialmente nos últimos anos. A título de exemplo, numa pesquisa realizada no *Pubmed*, em março de 2015, usando os termos «*Pain neurobiology*» encontra-se uma média anual de 36 artigos publicados na década na década de 1991-2000; 67 artigos na década de 2001-2010 e 145 artigos no triénio de 2011-2013. A comprovar esta tendência de crescimento no número de publicações científicas sobre a neurobiologia da dor verifica-se que, só no ano passado, o número de artigos publicados (257 artigos em 2014) ultrapassou o somatório do número de artigos publicados desde 1991 (248 artigos de 1991 a 2013). Devido a este crescimento exponencial no número de publicações científicas, na presente edição da revista *Dor* pareceu-nos adequado começar por rever alguns conhecimentos mais atuais acerca da neurobiologia da dor, tendo em consideração conhecimentos passados mais alicerçados. Deste modo, o primeiro artigo deste número da revista *Dor* é uma revisão sobre a neurobiologia da dor, que aborda aspetos fundamentais como as vias anatómicas de transmissão da informação nociceptiva, e passa por aspetos emergentes como o papel das células gliais na cronificação da dor. Este artigo resulta de uma colaboração estabelecida entre os dois grupos portugueses que se dedicam à investigação básica em dor: o grupo da Faculdade de Medicina do Porto/I3S, liderado pela professora Deolinda Lima, e o grupo do Instituto de Ciências da Vida e da Saúde da Universidade do Minho, liderado pelo professor Armando Almeida. Neste artigo, inicialmente concebido para ser um capítulo de livro, acompanha-se o trajeto percorrido pela informação nociceptiva desde a periferia, passando pela medula espinhal e chegando ao encéfalo. Um dos aspetos abordados no referido artigo diz respeito ao papel do encéfalo na modulação da dor, área que tem conhecido bastantes avanços nos últimos anos, não só devido a estudos em modelos animais mas, sobretudo, a estudos imagiológicos realizados em voluntários saudáveis e em doentes com diversos tipos de dor crónica. Os estudos em modelos animais e os estudos clínicos mostraram que o encéfalo tem a capacidade de diminuir ou potenciar a dor, podendo a cronificação da dor

ser devida à falta dos mecanismos inibitórios e/ou à exacerbação dos mecanismos facilitatórios. A substância cinzenta periaqueductal (PAG) desempenha um papel essencial na modulação descendente a partir do encéfalo, dado receber informação de áreas mais altas do neuroeixo, como o córtex pré-frontal, ínsula e a amígdala, que são responsáveis por aspetos tão diversos do controlo da dor como o estado cognitivo e afetivo. Por este motivo, a PAG merece um papel de destaque no segundo artigo publicado neste número da revista *Dor*. O artigo resulta de uma tese de mestrado de Bioquímica em Saúde, realizada pela primeira autora (Marta Louçano) sob orientação da segunda autora (Isaura Tavares), na Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto. Ainda no encéfalo, a modulação noradrenérgica desempenha um papel muito importante no controlo descendente da dor mas, também, como base neurobiológica de fenómenos de interação entre o estado afetivo e a dor. A principal estrutura noradrenérgica no encéfalo é o *locus coeruleus*, que é o principal alvo de análise no terceiro artigo incluído nesta edição da revista *Dor*. Este artigo demonstra que o *locus coeruleus* poderá mediar a associação da dor com o desenvolvimento de sintomas de ansiedade e depressão, aspeto com um claro interesse translacional. Convém salientar que este terceiro artigo representa vários anos de investigação em modelos animais de dor crónica, e contém resultados originais publicados em várias revistas científicas de considerável impacto na área da dor. O terceiro artigo resulta da adaptação dos resultados da tese de doutoramento de Gisela Borges, orientada pela professora Fani Neto (Faculdade de Medicina do Porto/I3S) e coorientada pela professora Ester Berrecoso (Universidade de Cadiz), recentemente defendida na Faculdade de Medicina do Porto, no âmbito de um doutoramento europeu no programa internacional de doutoramento em neurociências da Universidade do Porto (i-PDN-UP). O último artigo incluído no presente número da revista *Dor* analisa aspetos virados para o futuro: a aplicação de terapia génica no controlo da dor crónica. Partindo de resultados obtidos em modelos animais de dor crónica e usando vetores víricos não-replicativos para tratar a dor, as autoras Isabel Martins e Isaura Tavares (Faculdade de Medicina do Porto/I3S) apresentam os resultados

de ensaios clínicos de terapia génica em situações de dor oncológica. Embora provisórios, estes estudos mostram que é possível perspetivar novas formas de tratar a dor no futuro. A terapia génica é apenas uma das possibilidades que se afiguram mas outras abordagens poderiam ser analisadas no contexto de procurar alternativas para o futuro do tratamento da dor crónica.

Tendo por base a importância do investimento na investigação em dor, é com preocupação que se assiste à desertificação de jovens com talento e provas dadas na investigação da dor, de modo análogo a outras áreas de investigação científica. A aproximação de investigadores básicos e clínicos poderia atenuar esta tendência. Conseguirmos, todos juntos, os meios necessários para colocar estes jovens investigadores a fazerem investigação, preferencialmente orientada pelas questões trazidas para o laboratório

pelos clínicos, é um sonho impossível de concretizar? Seria simples se a afirmação «Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado» (Shinyashiki) fosse o título de um protocolo para concretizar aquele sonho. Um investigador básico sozinho é pouco, muito pouco, para se concretizar o sonho de apoiar os jovens investigadores na área da dor e realizar investigação que possa, efetivamente, contribuir para ajudar os doentes com dor crónica. Precisamos de usar espaços de partilha, como este da revista Dor, para colocar investigadores básicos e clínicos a debater estes temas. Mesmo (ou sobretudo?) em tempos de desânimo pela «ditadura economicista» que tenta reduzir, na investigação e na clínica, o valor individual e profissional a meros números. Como dizia o filósofo Sócrates «Procurai suportar com ânimo tudo aquilo que precisa ser feito».

Neurobiologia da Dor: Mecanismos de Transmissão e Modulação da Informação Nociceptiva

Isaura Tavares¹⁻³, Deolinda Lima¹⁻³ e Armando Almeida^{4,5}

Resumo

Os estudos da neurobiologia da transmissão, modulação e percepção da dor têm continuado a crescer exponencialmente nos últimos tempos. Deste modo, justifica-se rever alguns dos assuntos emergentes na neurobiologia da dor, partindo de conceitos estabelecidos há muitas décadas. Neste artigo, começa por se distinguir «dor» e «nociceção», descrever a constituição do sistema sensorial somático e visceral, e caracterizar os aferentes primários e os neurónios sensoriais da medula espinhal, tendo em conta critérios de natureza estrutural, funcional e neuroquímica. Descrevem-se as principais vias neuroanatômicas de transmissão de informação nociceptiva da medula espinhal para o encéfalo e analisam-se os mecanismos de controlo supraspinal da dor. Finalmente discutem-se os fatores que podem contribuir para que a dor se torne crónica e analisa-se o contributo atual dos estudos de ciências básicas para a obtenção de conhecimentos com perspetiva translacional.

Palavras-chave: Dor. Nociceção. Dor aguda. Dor crónica. Dor neuropática. Dor disfuncional. Nociceptores. Gânglios raquidianos. Medula espinhal. Córtex somatossensitivo. Complexo ventrobasal do tálamo. Amígdala. Córtex pré-frontal. Alodínia. Hiperalgesia. Sensibilização periférica. Sensibilização central. Substância cinzenta periaqueductal (PAG). Bolbo rostral ventromedial (RVM). Neurónios nociceptivo-específicos (NS). Neurónios convergentes (WDR). Corno posterior da medula espinhal. Aferentes primários.

Abstract

During the last decades the studies directed to the neurobiology of the transmission, modulation, and pain perception have increased substantially. This huge increase of new data demands an overall analysis of the emergent concepts about the neurobiology of pain, taking into account the best established knowledge, such as anatomical data related to the somatosensory system. This paper distinguishes “pain” and “nociception”, and describes the somatosensory system, taking into consideration its somatic and visceral components. The paper also characterizes the primary afferents and the sensorial neurons located at the spinal cord, taking into account the more accepted structural, functional, and neurochemical criteria. We describe the main pathways devoted to the transmission of nociceptive information from the spinal cord to the brain. Besides this ascending component of the somatosensory system, we also analyze the mechanisms of pain control from the brain. Finally we discuss the mechanisms that can lead to pain “chronification”. Due to the fact that the main advances in the neurobiology of pain derive considerably from studies in animal models, a discussion regarding the translational perspectives of pain research is also considered. (Dor. 2014;22(4):5-19)

Corresponding author: Isaura Tavares, isatav@med.up.pt

Key words: Pain. Nociception. Acute pain. Chronic pain. Neuropathic pain. Nociceptors. Dorsal root ganglia. Spinal cord. Somatosensory cortex. Ventrobasal complex of the thalamus. Amygdala. Pre-frontal cortex. Alodynia. Hyperalgesia. Peripheral sensitization. Central sensitization. Periaqueductal grey (PAG). Rostral ventromedial medulla (RVM). Nociceptive-specific neurons (NS). Wide-dynamic range neurons (WDR). Primary afferents.

¹Departamento de Biologia Experimental
Faculdade de Medicina

²Instituto de Investigação e Inovação em Saúde

³Instituto de Biologia Celular e Molecular (IBMC)
Universidade do Porto

⁴Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS)
Escola de Ciências da Saúde

Universidade do Minho, Braga

⁵ICVS/3B's – Laboratório Associado, Braga/Guimarães

E-mail: isatav@med.up.pt

Introdução

A associação internacional para o estudo da dor (IASP) define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita nos termos dessa lesão. A percepção da dor aguda é essencial à sobrevivência do organismo dado constituir um mecanismo de alerta. Indivíduos com mutações que originam insensibilidade à dor não têm percepção adequada das agressões potencialmente dolorosas ao organismo. Por não serem sinalizadas como dolorosas, tais agressões acabam por originar frequentemente lesões fatais. Uma das características mais marcadas da dor é a sua falta de adaptação. Enquanto um estímulo visual contínuo e uniforme leva à adaptação sensorial, após alguns minutos de estimulação dolorosa persistente mas moderada, a dor pode tornar-se insuportável. Também, ao contrário de funções orgânicas que, em caso de perturbação, entram em falência, a cronificação da dor e a desregulação dos mecanismos de percepção da dor podem levar à exacerbação dramática da dor. Quando a dor se torna crônica, pode ser difícil alcançar a sua cura total, sendo apenas possível controlar a sua intensidade. Nestes casos, a dor passa a constituir uma doença *per se*.

Sistema sensorial somático e visceral

O sistema sensorial é responsável pela receção da informação sensorial de todos os sentidos, sendo essencial à interação do organismo com o ambiente. O sistema somatossensitivo é a parte do sistema nervoso que processa as sensações do corpo, nomeadamente as relacionadas com o tato (pressão, vibração – com origem em mecanorreceptores cutâneos); a propriocepção (posição do corpo no espaço – com origem em recetores especializados localizados nos músculos, tendões e articulações); dor e temperatura (com origem em recetores superficiais e profundos na pele, músculos e articulações; Fig. 1). Um outro tipo de sistema sensitivo, o sistema viscerossensitivo, processa informação dos órgãos internos (Fig. 1). A dor somática está melhor estudada e apresenta características que, em muitos aspetos, a distinguem da dor visceral. Por exemplo, estímulos mecânicos e térmicos que desencadeiam respostas dolorosas somáticas, podem não induzir resposta quando aplicados às vísceras.

O sistema somatossensitivo é constituído por circuitos neuronais responsáveis por recolher informação sensorial à periferia através do sistema nervoso periférico (SNP) e transmiti-la ao sistema nervoso central (SNC), onde a informação vai sendo sucessivamente processada e, finalmente, integrada a nível superior com outros componentes (emocional, cognitivo) de avaliação dessa informação sensorial, de modo a ser executada uma resposta adequada por parte do sistema motor. As duas vias somatossensitivas são o sistema coluna dorsal – sistema lemniscal (sensibilidade epicrítica – mais discriminativa e precisa), responsável pela percepção da informação tátil discriminativa da vibração e da posição dos membros e

articulações (propriocepção), e o sistema anterolateral (sensibilidade protopática - pouco discriminativa e menos precisa), envolvido na percepção da nocicepção (dor), da temperatura e da informação tátil pouco discriminativa (toque leve).

A energia mecânica, térmica ou química aplicada ao corpo é transformada (i.e., transduzida) à periferia (p. ex.: pele, músculos, articulações, vísceras) num sinal elétrico pelas fibras sensitivas, que correspondem à parte periférica do axónio dos neurónios aferentes primários (neurónios de 1.^a ordem) cujos pericários se localizam: (i) nos gânglios raquidianos (informação tátil, proprioceptiva, nociceptiva e da temperatura proveniente de todo o corpo e do terço posterior da cabeça; Fig. 1); (ii) nos gânglios trigeminais (informação tátil, nociceptiva e da temperatura proveniente da face) ou (iii) no núcleo mesencefálico do trigémio (informação proprioceptiva proveniente da face). O sinal elétrico é transportado até à primeira sinapse no SNC, onde as fibras sensitivas comunicam com neurónios de 2.^a ordem. Estes segundos neurónios estão localizados principalmente: (i) no corno posterior da medula espinhal (informação nociceptiva, da temperatura e tátil pouco discriminativa proveniente de todo o corpo e do terço posterior da cabeça; Fig. 1); (ii) no corno posterior e no corno anterior da medula espinhal; nos núcleos da coluna dorsal (NCD) e no cerebelo (informação proprioceptiva de todo o corpo); (iii) no corno posterior do núcleo espinhal do trigémio (informação nociceptiva, da temperatura e tátil pouco discriminativa proveniente da face); (iv) no corno posterior do núcleo principal do trigémio (informação tátil discriminativa proveniente da face) e (v) nos núcleos da coluna dorsal (grácil e cuneiforme) do tronco cerebral (informação tátil discriminativa e proprioceptiva proveniente de todo o corpo e do terço posterior da cabeça).

A informação nociceptiva, da temperatura e do tato pouco discriminativo é depois transmitida para o encefalo pelos axónios de longo curso que derivam dos neurónios espinhais de projeção (vias espinhofugais ascendentes que percorrem o funículo anterolateral da medula) e cruzam para o lado contralateral da medula espinhal (Fig. 1), chegando pelo sistema lemniscal ao tálamo (complexo ventrobasal do tálamo – núcleo ventral posterior lateral (VPL), para a informação proveniente do corpo e porção posterior da cabeça e núcleo ventral posterior medial – (VPM), para a informação da face) onde fazem sinapse com neurónios de 3.^a ordem (Fig. 2) (Liivamma, 2009). No caso da informação tátil discriminativa e proprioceptiva do corpo e parte posterior da cabeça, os axónios dos neurónios dos núcleos NCD cruzam para o lado contralateral e ascendem superiormente através de um trato de fibras (lemnisco medial) até ao complexo ventrobasal do tálamo, enquanto os axónios trigeminais que transmitem informação da face cruzam para o lado contralateral e ascendem para o tálamo pelo lemnisco trigeminal. Os sinais elétricos sucessivamente transformados são finalmente transmitidos pelos neurónios talâmicos aos neurónios do córtex somatossensitivo primário (SI) e secundário (SII) (neurónios de 4.^a ordem; Fig. 2).

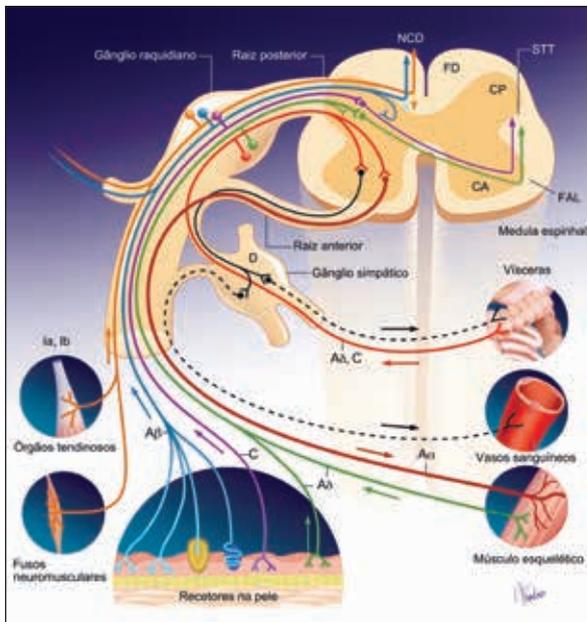


Figura 1. Esquema simplificado de um nervo espinhal e dos seus diferentes tipos de fibras e recetores sensoriais periféricos. Notar à periferia: 1: as fibras sensoriais com origem em pericários nos gânglios raquidianos (1.º neurónio) a inervarem os fusos neuromusculares e órgãos tendinosos de Golgi (fibras Ia e Ib; propriocepção) e os recetores capsulados da pele (fibras Aβ; tato, vibração, pressão); 2: as fibras sensoriais Aδ e C a terminarem sob a forma de ramificações nervosas livres na pele, músculos e vísceras (dor e temperatura); 3: as fibras motoras Aα, provenientes de neurónios motores (NM) com os pericários no corno anterior da medula espinhal, a inervarem os músculos esqueléticos; 4: as fibras autónomas B (pré-ganglionares com origem no corno intermédio da medula tóraco-lombar) e C (pós-ganglionares, inervam o músculo liso das vísceras). Já quanto à ramificação central das fibras sensitivas: 1: a maior parte das fibras Aα (Ia e Ib) e Aβ não terminam na medula espinhal, antes continuam pelo funículo dorsal (FD) para terminarem nos núcleos grácil e cuneiforme do bolbo raquidiano (NCD); 2: enquanto outras terminam na profundidade do CP da medula espinhal; 3: as fibras Aδ e C terminam principalmente na superfície do corno dorsal e, no caso das fibras Aδ, algumas penetram até ao corno anterior para ativarem os neurónios motores nos reflexos espinhais. Os axónios dos neurónios espinhotalâmicos da medula (2.º neurónio) cruzam para o lado oposto e ascendem ao encéfalo pelo funículo anterolateral (FAL). No que se refere a fibras motoras, as fibras Aα provenientes dos NM inervam os músculos estriados, enquanto que as fibras B provenientes da coluna intermediolateral (preganglionares) e as fibras C com origem nos gânglios da coluna simpática (posganglionares) controlam a atividade dos músculos viscerais. CA: corno anterior da medula; CP: corno posterior da medula espinhal; NCD: núcleos da coluna dorsal (grácil e cuneiforme); STT: trato espinhotalâmico (adaptado de Byers e Bonica, *Bonica's Management of Pain*, 3.ª Edição, Capítulo 3;2001).

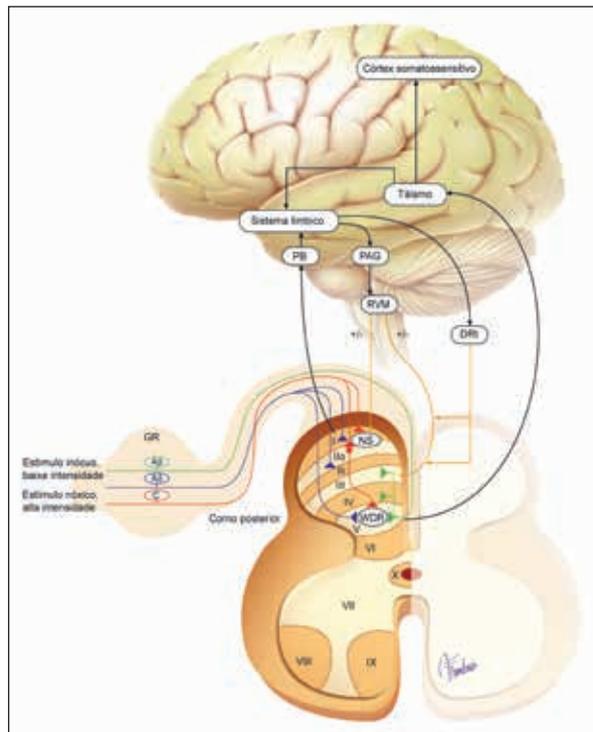


Figura 2. Vias de transmissão nociceptiva da periferia até ao encéfalo. As fibras aferentes primárias (fibras Aα, Aβ, Aδ e C) transmitem os impulsos gerados nas terminações à periferia através dos gânglios raquidianos (GR) até ao corno posterior (CP) da medula espinhal. As fibras C terminam nas lâminas I-II (setas vermelhas), as fibras Aδ nas lâminas I-II e V (setas azuis) e as fibras Aβ nas lâminas III-V (setas verdes). Os neurónios espinhais nociceptivo-específicos (NS) localizam-se principalmente no CP superficial (lâminas I-II), enquanto a maioria dos neurónios nociceptivos de largo espectro ou convergentes (WDR) se encontram no CP profundo (lâmina V). Os neurónios da lâmina I que projetam para o encéfalo (setas pretas) enviam axónios que terminam em áreas como os núcleos parabraquiais (PB) e a substância cinzenta periaqueductal (PAG), as quais são moduladas pelo sistema límbico (emocional). Destes centros supraspinais partem projeções axonais descendentes que ativam áreas do tronco cerebral como o bolbo rostral ventromedial (RVM) e o núcleo reticular dorsal (DRt), cujos neurónios por sua vez projetam para o CP da medula espinhal onde vão modular a transmissão nociceptiva da periferia para o SNC (setas amarelas), facilitando (+) ou inibindo (-) a passagem de informação dos aferentes primários para os neurónios espinhais. Os neurónios da lâmina V projetam principalmente para o tálamo através do trato espinhotalâmico (STT) e, daqui, para várias regiões do córtex cerebral (córtices somatossensitivo primário e secundário, insular, cíngulado anterior e pré-frontal) ativando uma «matriz da dor» (adaptado de D'Mello e Dickenson, *Spinal cord mechanisms of pain*, Br J Anaesth, 101:8-16;2008).

De notar que os axónios periféricos (fibras sensitivas) que terminam nos núcleos NCD estão sujeitos a organização somatotópica de acordo com a área do corpo inervada perifericamente e terminam ordenadamente nos núcleos grácil e cuneiforme. Os axónios

dos neurónios de 2.ª ordem dos núcleos grácil e cuneiforme cruzam anteriormente no bolbo raquidiano caudal, ascendem no lemnisco medial de forma somatotópica e terminam, também de forma somatotópica, no núcleo VPL do tálamo. O VPL recebe assim informação sensorial de fibras do lemnisco medial e do trato espinhotalâmico, e os seus neurónios de

3.^a ordem projetam axónios que terminam na lâmina IV do córtex somatossensitivo. O córtex sensorial somático consiste no córtex SI, córtex SII e córtex parietal posterior. A representação somatotópica da superfície do corpo nos córtices SI e SII denomina-se homúnculo, onde a área cortical representativa das regiões do corpo é proporcional à capacidade discriminativa dessas áreas.

Em relação ao sistema viscerossensitivo, existem muito menos neurónios sensitivos viscerais em comparação com os neurónios somatossensitivos que inervam a pele e as estruturas somáticas profundas, sendo um dos fatores que está na base da menor capacidade do organismo em determinar a localização precisa das sensações viscerais. As fibras aferentes primárias que transmitem a informação sensitiva das vísceras têm origem nos neurónios de 1.^a ordem localizados nos gânglios raquidianos e nos gânglios sensitivos associados com os nervos cranianos glossofaríngeo e vago; as fibras aferentes primárias terminam à periferia e possuem, por exemplo, recetores sensitivos sensíveis à pressão e estiramento (paredes do coração, bexiga e trato gastrointestinal). Os neurónios de 2.^a ordem que recebem informação visceral localizam-se: (i) no corno posterior da medula espinhal - estes neurónios também recebem informação somatossensitiva inócua ou nociceptiva da pele, músculos e articulações (são por isso neurónios viscerossomáticos); (ii) no núcleo do trato solitário (NTS) e (iii) nos núcleos NCD; algumas fibras viscerossensitivas primárias terminam (iv) no corno lateral da medula (região tóraco-lombar), onde se encontram neurónios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos que medeiam a atividade visceral reflexa. Os axónios espinhofugais destes neurónios de 2.^a ordem percorrem vias espinhomesencefálicas, espinhoreticulares e espinhotalâmicas, formando sinapses com neurónios de 3.^a ordem: (i) no complexo ventrobasal do tálamo (VPL e VPM); (ii) em centros visceromotores no tronco cerebral e (iii) em grande número, no NTS. O NTS contém neurónios cujos axónios inervam: (i) núcleos viscerais motores primários, como o núcleo motor dorsal do vago e o núcleo ambíguo; (ii) centros de integração superior, como a amígdala e hipotálamo e (iii) o núcleo parabraquial (PB). Os neurónios do PB transmitem por sua vez informação viscerossensitiva para o hipotálamo, a amígdala, o tálamo e os córtices prefrontal e insular, este último o local por excelência da representação viscerossensitiva somatotópica do corpo.

Nociceção e dor

A nociceção refere-se ao conjunto de fenómenos neuronais que transduzem e processam a estimulação nóxica aplicada ao organismo, transformando-a num sinal elétrico. As fibras responsáveis por esta sinalização são os nociceptores, neurónios aferentes primários (1.^o neurónio) cujas terminações à periferia do axónio apresentam recetores na membrana que transformam a energia mecânica, térmica ou química que atinge um nível nóxico e potencialmente agressivo ao organismo, num potencial de ação (sinal elétrico)

que é transmitido ao SNC. Após a aplicação de um estímulo nóxico, a ativação dos nociceptores e a formação nociceptiva resultante podem originar dor. No entanto, enquanto a nociceção resulta da ativação do sistema nociceptivo, a dor é a experiência pessoal que resulta do processamento da nociceção a níveis superiores do SNC, integrando as dimensões emocionais e cognitivas associadas a uma sensação desagradável. No entanto, nem a nociceção nem a dor são consequências obrigatórias da estimulação nociceptiva, podendo surgir sem estimulação nociceptiva. Em certas circunstâncias, os nociceptores são ativados mas mecanismos antinociceptivos do SNC bloqueiam a dor. Por outro lado, em situações fisiopatológicas, os impulsos de neurónios aferentes primários de limiar baixo (transmitem informação tátil) podem desencadear dor tipo queimadura, semelhante à causada normalmente por impulsos transmitidos por nociceptores ou após lesão dos tecidos. Também é importante reconhecer que podemos sentir atividade nociceptiva conscientemente, mas sem ter a ela associada uma experiência desagradável^{1,2}. Assim, a nociceção não é nem necessária nem suficiente para induzir uma sensação de dor. No entanto, quando a nociceção está associada a uma sensação desagradável, então a experiência sentida é dor – por outras palavras, as duas dimensões são necessárias em conjunto para produzir dor. Por outro lado, um sentido de ameaça inerente a um determinado contexto aprendido ao longo da vida e associado a memórias ou crenças pessoais (cognição), ou aspetos psicossociais familiares, económicos ou profissionais contribuem para a experiência dolorosa. A avaliação cognitiva é um componente integrado na dimensão afetiva-emocional da dor¹.

Da estimulação periférica à experiência da dor

Como vimos anteriormente, a ativação do sistema nociceptivo, responsável pela génese de um sinal elétrico e sua transmissão até aos níveis de processamento mais elaborados do córtex, está associada à modulação pelos centros de processamento emocional e cognitivo de que resulta, no final, a percepção da dor. Segue-se uma explicação mais detalhada das quatro etapas principais percorridas desde a nociceção até à dor.

Aferentes primários: transdução inócua e nociceptiva

Num nervo periférico encontram-se fibras sensitivas, fibras motoras e fibras do sistema nervoso autónomo (Quadro 1). Há três tipos de fibras sensitivas cutâneas, responsáveis pela transdução de diferentes tipos de estímulos aplicados à superfície externa do corpo: as fibras A β detetam estímulos inócuos mecânicos (táteis, de pressão ou vibração, através de recetores especializados como os corpúsculos de Meissner e Pacini, células de Ruffini e discos de Merkel), enquanto as fibras A δ e as fibras C correspondem aos dois tipos de fibras que formam terminações livres e detetam estímulos nóxicos, potencialmente

Quadro 1. Fibras sensitivas, motoras e autónomas presentes num nervo periférico							
Tipo de fibra nervosa	Tipo*	Tipo[†]	Diâmetro (µm)	Mielina	Condução (m/s)	Fibras musculares/ recetores sensitivos associados	Função motora/sensorial
Motora	α	Aα	13-20	Sim	80-120	– Fibras musculares extrafusos	– Controlo motor dos músculos esqueléticos
Motora	γ	Aγ	5-8	Sim	4-24	– Fibras musculares intrafusos	– Controlo motor das fibras dos fusos neuromusculares
Sensitiva	Ia	Aα	13-20	Sim	80-120	– Recetores primários dos fusos neuromusculares	– Propriocepção (dinâmica dos membros)
Sensitiva	Ib	Aα	13-20	Sim	80-120	– Órgãos tendinosos de Golgi	Propriocepção (posição estática dos membros)
Sensitiva	II	Aβ	6-12	Sim	33-75	– Recetores secundários dos fusos neuromusculares – Todos os mecanorreceptores (Corpúsculos de Meissner, Pacini, células de Ruffini e discos de Merkel)	– Propriocepção – Tato discriminativo
Sensitiva	III	Aδ	1-5	Fina	3-15	– Terminações nervosas livres de toque e pressão – Nociceptores do trato neoespinalâmico (epicrítico) – Termorreceptores do frio	– Tato e pressão não discriminativos – Dor – Temperatura
Sensitiva	IV	C	0,2-1,5	Não	0,5-2	– Nociceptores do trato paleoespinalâmico (protopático) – Recetores de temperatura (aquecimento) – Sensíveis à histamina – Toque agradável	– Dor – Temperatura – Prurido – Tato e pressão não discriminativos
Autónoma	PreGF	B	1-5	Sim	3-15	–	– Ativam neurónio pós-ganglionar
Autónoma	PostGF	C	0,2-1,5	Não	0,5-2	–	– Axónio enerva órgão efector

PreGF: fibras pré-ganglionares; PostGF: fibras pós-ganglionares.
 *classificação de Lloyd (1943).
 †classificação de Erlanger-Gasser.
 ‡fuso neuromuscular.

lesivos ao organismo e que, por isso, estão na base da génese da nocicepção, e ainda estímulos inócuos térmicos e do tato pouco discriminativo (Figs. 1 e 2).

A função dos neurónios nociceptivos aferentes primários é transduzir a energia química, térmica ou mecânica em potenciais de ação e também transmitir informação sobre a intensidade do estímulo nociceptivo. A pele é inervada por sistemas aferentes epicríticos e protopáticos (ver acima); o primeiro traduz-se num sinal que permite uma localização precisa do estímulo, com atividade que não ultrapassa a duração deste e a determinação do tipo e natureza do estímulo, enquanto o segundo é descrito como sendo um sinal menos preciso, que ultrapassa o período de estimulação e aumenta de intensidade com estimulação

repetida. Também se tornou claro que a dor depende de dois tipos de axónios periféricos: as fibras Aδ finalmente mielinizadas e as fibras C amielínicas, sendo que as primeiras conduzem muito mais rapidamente o sinal elétrico (3-30 e 0,5-2 metros/segundo para as fibras Aδ e para as fibras C, respetivamente). Determinou-se ainda que os axónios aferentes Aδ e C poderiam ser os responsáveis pela primeira dor e pela segunda dor, respetivamente, que resultam de um estímulo nódido agudo aplicado na mão ou no pé¹. De facto, se a atividade das fibras C for bloqueada seletivamente por um anestésico local e a atividade de todos os axónios mielínicos for bloqueada por compressão do nervo (as fibras mielínicas deixam de funcionar primeiro que as amielínicas), os resultados

na percepção da dor são drasticamente diferentes: o bloqueio das fibras C mantém intactas as capacidades de localização fina dos estímulos agudos e de duração curta, mas a dor mais prolongada e difusa, tipo queimadura, que resulta de estímulos de dor mais prolongada, como a inflamação provocada por uma picada de abelha, deixa de se sentir. Por outro lado, quando se bloqueiam todas as fibras mielínicas por compressão, a dor inflamatória difusa torna-se mais intensa. Da mesma maneira, a estimulação seletiva de fibras A δ produz a sensação de dor aguda, bem localizada e de curta duração mas, se estes axónios forem bloqueados, a estimulação seletiva de fibras C resulta numa dor difusa e pouco localizada que se torna progressivamente mais intensa, confirmando-se esta relação entre dor epicrítica e fibras A δ , e entre dor protopática e fibras C (Quadro 1). As fibras «inócuas» (táteis) A β , mielínicas grossas são, no entanto, essenciais à sobrevivência do organismo. A sua velocidade de transmissão elétrica superior (33-75 metros/segundo) e o facto de transmitirem diretamente pelo sistema coluna dorsal – lemnisco medial (ao contrário do sinal nociceptivo que, além de mais lento, passa ainda por uma «estação» no corno posterior da medula espinhal) permite que, quando a nocicepção atinge o SNC, a localização precisa do estímulo já esteja processada. De facto, qualquer estímulo doloroso, por mais intenso que seja, é, nos seus milionésimos de segundo iniciais, um estímulo inócua, o suficiente para ativar as fibras A β e determinar com precisão o local da dor que surgirá depois com a ativação dos nociceptores que inervam a pele e originam as fibras A δ e C. Existem duas classes principais de neurónios nociceptivos cutâneos A δ sensíveis ao calor, os nociceptores A δ do tipo I e II³. As fibras A δ do tipo I encontram-se presentes na pele glabra e com pelos, caracterizam-se por uma resposta rápida a estímulos nódicos mecânicos e químicos (limiar baixo a estímulos mecânicos agudos), mas apresentam uma latência prolongada ao estímulo calorífico agudo (limiar alto ao estímulo agudo com calor). As fibras A δ do tipo II, que parecem ocorrer apenas na pele com pelos, caracterizam-se por um limiar de resposta ao estímulo agudo de calor muito mais baixo do que as fibras do tipo I, mas que se adaptam rapidamente (logo, limiar muito alto a estímulos térmicos prolongados) e apresentam um limiar muito elevado à estimulação mecânica. Assim, os neurónios A δ do tipo II deverão estar na base da sensação associada à primeira dor e aos reflexos de fuga resultantes de uma estimulação nódica pelo calor agudo, enquanto os nociceptores A δ do tipo I estarão associados à sinalização da primeira dor e reflexos resultantes de uma estimulação nódica mecânica^{1,4}. No que diz respeito ao grupo de nociceptores C-polimodais, que respondem a estímulos nódicos mecânicos, térmicos e químicos, estes constituem a grande maioria dos aferentes cutâneos amielínicos (> 90% no homem) e são responsáveis pela segunda dor, difusa e de difícil localização. Um outro grupo de fibras C, muito menos numeroso, responde a estímulos nódicos térmicos mas é insensível a estímulos mecânicos. Estas fibras C são mais sensíveis a estímulos químicos, como a capsaicina ou histamina, sendo alguns

os responsáveis por mediar a comichão ou prurido⁴. Existem ainda fibras C que não são nociceptores – algumas respondem ao frio e outras respondem apenas ao toque inócua da pele com pelos, mas não ao calor ou a estímulos químicos, parecendo mediar a sensação de toque agradável⁵, uma forma de tato não discriminativo⁶.

Neurónios sensoriais na medula espinhal

A projeção central dos axónios dos aferentes primários termina no corno posterior da medula espinhal, o qual se encontra organizado em seis camadas nos alargamentos cervical e lombar (lâminas I-VI; Fig. 2). A atividade elétrica, que corresponde à informação nociceptiva, ao chegar aos botões axonais centrais das fibras A δ e C que formam sinapses com neurónios espinhais, origina a libertação de neurotransmissores excitatórios, o aminoácido glutamato e os neuropeptídeos substância P (SP) e peptídeo do gene relacionado com a calcitonina (CGRP), os quais despolarizam os neurónios espinhais pós-sinápticos e transmitem o sinal elétrico nociceptivo para o SNC⁷. A maioria dos nociceptores A δ e C terminam na zona mais superficial (lâminas I-II), e um pequeno número termina mais profundamente, principalmente na lâmina V, enquanto que algumas fibras A β que transmitem informação inócua (e não seguem diretamente para os NCD) terminam principalmente nas lâminas III-V (Figs. 2 e 3)⁸. Recentemente, verificou-se que as duas classes de nociceptores se podem dividir em grupos mais específicos e que a terminação destes na medula espinhal é ainda mais específica. Os nociceptores C estão divididos naqueles que são peptidérgicos (contêm SP e CGRP) e nos não-peptidérgicos⁹. As fibras nociceptivas peptidérgicas C e uma parte das fibras A δ terminam na zona mais superficial, fazendo sinapse com neurónios da lâmina I que projetam para o encéfalo e com interneurónios (neurónios de axónio curto, de modulação local) na zona mais externa da lâmina II (lâmina Ilo; Fig. 2). As fibras C não-peptidérgicas projetam especificamente para a porção mais interna da lâmina II (lâmina Ili; lâmina II interna), enquanto uma parte das fibras A δ projeta para os neurónios da lâmina V do corno dorsal profundo (Fig. 3). As fibras amielínicas A β que projetam para a medula espinhal terminam nas lâminas III-V. Deste modo, os nociceptores C projetam para as lâminas superficiais I-II, os nociceptores A δ projetam para a superfície e profundidade do corno dorsal e as fibras de limiar baixo (inócuas) A β só projetam para a profundidade (lâminas III-V). Assim, alguns neurónios da lâmina V recebem informação inócua (tátil) e nociceptiva de fibras A β e A δ ⁴. De acordo com estes dados anatómicos, verificou-se que dos dois tipos de neurónios nociceptivos espinhais de 2.^a ordem que projetam para o encéfalo, os de limiar alto (NS) predominam na lâmina I e só respondem a estimulação nódica, enquanto os neurónios convergentes ou de largo espectro (WDR) predominam na lâmina V e recebem informação nociceptiva das fibras A δ e inócua das fibras A β (Fig. 3). Os neurónios WDR, ao contrário dos neurónios NS, apresentam uma grande capacidade discriminativa

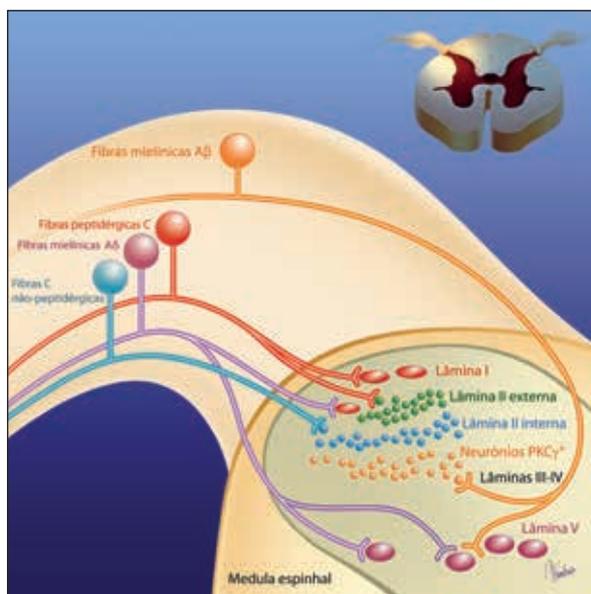


Figura 3. Terminação das fibras aferentes primárias no corno posterior (CP) da medula espinhal. A organização do corno dorsal em lâminas é muito precisa; diferentes subgrupos de fibras aferentes primárias contactam neurónios espinhais de lâminas específicas. As fibras nociceptoras amielínicas C peptidérgicas (vermelho) e as fibras A δ pouco mielinizados (roxo) terminam mais superficialmente, formando sinapses com os grandes neurónios de projeção (vermelho) da lâmina I e com os interneurónios (verde) localizados na porção externa da lâmina II. Os nociceptores amielínicos não-peptidérgicos (azul) contactam interneurónios (azul) da porção interna da lâmina II. Pelo contrário, a informação inócua (p. ex.: tátil) transportada pelas fibras grossas mielinícas A β (laranja) é transmitida principalmente para as lâminas III e IV do CP, que assim é preenchida por neurónios que respondem a estímulos inócuos; algumas fibras A β projetam também para interneurónios excitatórios da metade ventral da porção interna da lâmina II que expressam a isoforma gama da proteína cinase C PKC γ . Um segundo conjunto de neurónios espinhais de projeção para o encéfalo localiza-se na lâmina V do CP profundo (roxo) e recebe convergência de informação de fibras A δ e A β ; nesta lâmina predominam assim os neurónios convergentes, de largo espectro (WDR), enquanto na lâmina I predominam os neurónios nociceptivo-específicos (NS) (Fig. 3) (adaptado de Basbaum et al, Cellular and molecular mechanisms of pain, Cell, 139:267-284;2009).

da intensidade do estímulo aplicado ao seu campo recetivo na periferia, respondendo desde intensidades táteis inócuas até intensidades nociceptivas¹. Estes neurónios recebem ainda informação nociceptiva visceral e a convergência somática e visceral resultante contribui para a dor referida, fenómeno pelo qual um estímulo nóxico visceral (p. ex. na angina de peito) é localizado numa estrutura somática (o braço esquerdo, p. ex.). Outros tipos de neurónios no corno posterior da medula, recebem exclusivamente informação de fibras A α e/ou A β , são os neurónios proprioceptivos e os neurónios inócuos, ambos de limiar baixo, que só respondem a estímulos sensoriais inócuos, não nóxicos (tato, músculos e articulações).

Projeções da medula espinhal para o encéfalo – o trato espinhotalâmico

No encéfalo, os neurónios nociceptivos apresentam características semelhantes àqueles observados no corno posterior da medula espinhal, nomeadamente neurónios convergentes WDR e neurónios NS exclusivamente nociceptivos. Tal como na medula, existem áreas encefálicas que recebem informação quase integralmente a partir de neurónios WDR, enquanto outras são ativadas principalmente por neurónios NS. A via espinhoencefálica, que por excelência transmite informação nociceptiva sensitiva-discriminativa e afetiva-volitiva, é o trato espinhotalâmico (STT). No entanto, várias outras projeções espinhobulbares, espinhodiencéfálicas, espinhotelencefálicas e espinhotelencefálicas complementam a informação nociceptiva afetiva-volitiva que chega ao encéfalo¹⁰.

Em relação à transmissão nociceptiva pelo STT nos primatas, a informação sensitiva que permite discriminar a intensidade, a localização e as qualidades de um estímulo nociceptivo, tem origem principalmente em neurónios WDR das lâminas IV-V do corno posterior profundo¹. Os axónios destes neurónios cruzam para a substância branca do lado oposto da medula espinhal, percorrem o STT lateral pelo funículo anterolateral e terminam diretamente no tálamo lateral, mais propriamente no complexo ventrobasal do tálamo (núcleos VPL e VPM no macaco, que correspondem ao núcleo ventrocaudal – Vc, no homem) (via neoespinhotalâmica), numa área de terminação do tato discriminativo (via epicrítica coluna dorsal – lemnisco medial). Isto é confirmado pelo facto da estimulação antidrómica a partir do córtex somatossensitivo primário (S1) mostrar a existência de neurónios WDR e NS (neurónios de 3.^a ordem) no VPL. De notar, no entanto, que os neurónios do VPL que são ativados por estímulos inócuos são muito mais numerosos que os neurónios nociceptivos, estando estes últimos localizados numa região mais restrita do núcleo, na sua porção caudal (VPLc). Apesar disso, as terminações do STT lateral e do trato trigeminotalâmico lateral estão de acordo com a organização somatópica detalhada das terminações da via epicrítica coluna dorsal – lemnisco medial: os axónios do STT com informação nociceptiva craniofacial terminam no VPM; os axónios do STT com informação do braço e região superior do corpo projetam para o VPL medial e as terminações do STT com informação das pernas e da porção inferior do corpo localizam-se no VPL lateral¹¹.

Por outro lado, a informação correlacionada com a dimensão afetiva-volitiva do estímulo nociceptivo tem origem principalmente em neurónios NS da lâmina I¹, cruza para o lado oposto da medula, percorre a via STT pelo funículo anterolateral e termina no tálamo medial, nos núcleos centrolateral (CL), centromedial (CM), parafascicular (Pf), porção ventrocaudal do núcleo medial dorsal (MDvc – «medial dorsal ventrocaudal») e núcleo submédio (Sm); estes axónios colateralizam no tronco cerebral onde vão ativar uma série de projeções reticulotalâmicas que terminam também no tálamo medial (via paleoespinhotalâmica).

Em experiências que compararam a via sensitiva-discriminativa que termina no tálamo lateral (VPM – via trigeminal) com a via afetiva-volitiva que termina no tálamo medial (Pf e MDvc), verificou-se que os neurónios do VPM (neurónios de 3.^a ordem) eram exclusivamente WDR com campos recetivos pequenos (89%), enquanto os neurónios do Pf e MDvc (neurónios de 3.^a ordem) eram principalmente NS (88%) e tinham exclusivamente campos recetivos médios ou grandes que muitas vezes englobavam toda a face, bilateralmente. Este diferente envolvimento dos tálamos lateral e medial na dor foi reforçado quando se verificou que o bloqueio da atividade de neurónios do VPM com o anestésico local lidocaína em macacos acordados reduzía significativamente a capacidade de deteção precisa de um estímulo térmico nóxico aplicado à periferia. Por outro lado, os neurónios «afetivo-volitivos» do Pf-MDvc passavam a detetar com maior discriminação as alterações de estimulação térmica, de 47 para 48°, quando os macacos eram recompensados para detetarem essas alterações de temperatura, facto que não acontecia nos neurónios «sensitivo-discriminativos» do VPM¹. Finalmente, a estimulação elétrica no tálamo lateral (núcleo ventrocaudal – Vc, no homem, que corresponde ao VPLc noutros mamíferos) resulta em dor localizada no homem, sendo esta experiência desagradável (a este nível as conexões entre os sistemas lateral discriminativo e medial emocional deverão ser bastante numerosas) e a mesma estimulação mesmo ao lado, no VPM, provocava formigueiros e outras sensações inócuas mas não dor; por outro lado, a estimulação dos núcleos Cm-Pf, em pleno tálamo medial de humanos acordados, resultava em sensações difusas de desconforto e desagradabilidade, mas não em dor bem localizada ou de qualidade definida.

Processamento cortical da dor

Tal como seria de prever, os neurónios do tálamo lateral projetam para o córtex somatossensitivo e os do tálamo medial projetam para grandes áreas do córtex, o CL para zonas extensas do córtex parietal, o MDvc e o Pf para o córtex cingulado anterior (ACC). A estimulação nociceptiva à periferia ativa grandes áreas corticais, incluindo os córtices somatossensitivos SI e SII, a ínsula, o córtex parietal posterior, o córtex cingulado e partes do córtex préfrontal (PFC), e todas possuem neurónios NS e WDR^{1,12}. Estas áreas do córtex estão assim implicadas na génese da perceção dolorosa e da resposta para controlo da transmissão nociceptiva através dos centros de modulação descendente da dor. Esse controlo depende das outras funções em que essas áreas também estão implicadas, nomeadamente o processamento emocional, cognitivo, motor e autónomo que, no final, contribuem para a geração da experiência multidimensional que é a dor. O córtex SI recebe diretamente informação sensorial espinotalamocortical, principalmente do núcleo VPL. Os neurónios nociceptivos possuem campos recetivos pequenos, sugestivos de envolvimento na codificação discriminativa somatotópica da localização e da intensidade do estímulo nociceptivo. O

córtex SII recebe também informação espinotalamocortical nociceptiva com representação somatotópica, mas de outra área do complexo ventrobasal do tálamo (além do VPL e VPM), o núcleo ventroposteroinferior (VPI). O SII tem um papel no reconhecimento dos objetos pelo tato e na memória. A ínsula contém o córtex viscerossensitivo por excelência (ver atrás) e representa o estado do interior do corpo. Os neurónios do córtex parietal posterior (áreas 5 e 7 de Brodmann) são ativados, quer por estímulos nociceptivos agudos quer por estímulos visuais de objetos afiados dirigidos ao seu campo recetivo, e estão integrados na região do processamento tátil para onde converge a localização do estímulo com informação visual e a consequente geração de informação espacial para controlo motor. O córtex cingulado relevante para a dor inclui o ACC e o córtex cingulado médio, e está implicado no processamento emocional e na génese de respostas autónomas. Recebe naturalmente projeções do tálamo medial, dos núcleos MDvc e Pf e, tal como os neurónios desta zona, os seus neurónios nociceptivos apresentam campos recetivos que abrangem grandes áreas ou mesmo todo o corpo, pelo que não deverá estar implicado no processamento sensitivo-discriminativo da dor. No macaco, os neurónios do ACC são ativados durante o comportamento aversivo da dor, pelo que deverão estar implicados na dimensão afetiva-cognitiva da dor. O PFC envolve a maior parte do lobo frontal anterior ao córtex motor. Apesar de não receber projeções tálamo-corticais diretas, recebe informação corticocortical do ACC. O PFC está implicado na dimensão cognitiva-volitiva da dor e na génese do controlo descendente da dor.

Controlo supraspinal endógeno da dor

A perceção da dor é um fenómeno dinâmico que ocorre após a informação nociceptiva proveniente da periferia ser modulada em vários níveis do SNC. A modulação da transmissão nociceptiva desempenha um papel crucial na instalação de dor crónica. Esta modulação começa à periferia, continua na medula espinhal e decorre em estruturas corticais e subcorticais, algumas das quais se encontram envolvidas em aspetos cognitivos e emocionais da perceção da dor¹³. Após se ter estabelecido que a transmissão de informação nociceptiva podia ser inibida por estimulação de áreas do tronco cerebral, descobriu-se que também existia facilitação descendente, ou seja, potenciação da transmissão de informação nociceptiva após estimulação de áreas encefálicas. Na dor aguda há predominio da modulação inibitória, enquanto na dor crónica prevalece a facilitação. O conjunto das áreas encefálicas envolvidas na modulação da dor designa-se sistema supraspinal de controlo da dor^{14,15}.

A neuroquímica da modulação descendente é complexa mas assenta na libertação de serotonina e noradrenalina na medula espinhal¹⁶. Estes neurotransmissores podem exercer efeitos inibitórios ou excitatórios, dependendo dos recetores em que atuam na medula espinhal. As fibras provenientes dos centros de modulação encefálica podem atuar

pré-sinápticamente sobre aferentes primários, ou pós-sinápticamente sobre interneurónios ou neurónios de projeção localizados no corno posterior da medula espinhal. A comprovar a importância clínica da serotonina e da noradrenalina, recorde-se o valor analgésico dos antidepressivos que inibem a recaptção da serotonina e da noradrenalina da fenda sináptica.

Mecanismos descendentes inibitórios

A existência de mecanismos descendentes inibitórios foi postulada após se verificar que a estimulação elétrica da substância cinzenta periaqueductal (PAG; Fig. 2) induzia uma analgesia tão intensa que permitia efetuar laparoscopia em animais de laboratório, na ausência de anestésicos¹⁷. Estudos subsequentes mostraram que outras áreas encefálicas possuíam capacidades analgésicas semelhantes às da PAG¹⁸ e que se traduziam pela inibição de respostas comportamentais à dor durante a sua estimulação elétrica ou química. Simultaneamente, as respostas de neurónios nociceptivos da medula espinhal eram inibidas, indicando que estas áreas encefálicas bloqueiam a transmissão nociceptiva na medula espinhal. Em alguns casos, tal inibição é feita diretamente através de projeções para a medula espinhal enquanto noutros a inibição descendente usa «estações intermédias». O caso mais conhecido de modulação indireta diz respeito à PAG, que não projeta para a medula espinhal mas usa um *relay* situado no núcleo magno do rafe e formação reticular adjacente do bulbo raquidiano (RVM) (Fig. 2). Por outro lado, a PAG medeia influências modulatórias provenientes de regiões mais altas do SNC, como por exemplo o ACC e a amígdala (sistema límbico; Fig. 2). Estes circuitos de modulação descendente que envolvem a participação de múltiplas áreas encefálicas constituem um mecanismo que permite integrar o controlo da dor com a modulação de outras funções. A título de exemplo, o reconhecido papel da amígdala no controlo afetivo e a sua participação na modulação da dor constitui um substrato neurobiológico que permite entender como a perceção da dor varia com o estado afetivo. A experiência multidimensional da perceção da dor tem, pois, bases neurobiológicas que começam a ser conhecidas¹⁹.

As perspetivas de translação dos estudos de neurobiologia da modulação inibitória da dor ficaram mais claras após a utilização de técnicas de imagiologia no estudo da dor. Foi possível verificar que o estado cognitivo controla a perceção da dor²⁰. Manipulações como a hipnose e a distração diminuem a ativação do córtex somatossensitivo e a perceção da dor, por recrutamento de mecanismos de inibição descendente que utilizam a PAG. Em algumas situações de dor crónica há uma menor ativação de áreas de modulação da dor, algumas das quais são importantes também no controlo afetivo, o que se traduz na redução da inibição descendente. Por exemplo, na fibromialgia atenua-se a conexão funcional entre o ACC e a amígdala e a PAG, traduzindo-se num menor recrutamento da ação inibitória oriunda da PAG e, conseqüentemente, num decréscimo na libertação de noradrenalina e serotonina na medula espinhal^{21,22}. Uma outra

perspetiva translacional dos estudos básicos de investigação da neurobiologia da dor diz respeito ao «Controlo inibitório nócico difuso» (DNIC). Este fenómeno, estabelecido inicialmente em animais, ocorre quando um estímulo nociceptivo aplicado a uma área do corpo inibe a perceção da dor a partir de outras áreas²³. Ficou demonstrado que o DNIC recruta centros do sistema supraspinal de controlo da dor. O conhecimento empírico deste efeito analgésico generalizado foi explorado em técnicas de contrairritação, usadas desde tempos remotos, e que consistem na aplicação de um estímulo doloroso numa parte do corpo como forma de inibir a dor noutra área. Um funcionamento deficiente do DNIC deverá contribuir para a dor generalizada que ocorre em algumas patologias como fibromialgia e síndrome do cólon irritable²⁴.

Mecanismos descendentes excitatórios

Paralelamente aos mecanismos descendentes inibitórios, ocorrem fenómenos de facilitação da dor²⁵. Estes mecanismos excitatórios, descobertos posteriormente ao conhecimento dos inibitórios, consistem na facilitação de respostas comportamentais à dor e aumento das respostas nociceptivas de neurónios espinhais quando se estimulam áreas encefálicas. Uma destas áreas, o núcleo reticular dorsal (DRt) (Fig. 2), exerce o seu efeito facilitador através de circuitos recíprocos com a medula espinhal, que amplificam o sinal nociceptivo e devem funcionar como um mecanismo de alerta²⁶. O DRt medeia a facilitação da nociceção a partir do ACC²⁷, podendo, por isso, ser uma área implicada na experiência da dor após integração da dimensão cognitiva.

Estudos imagiológicos mostraram que em situações de dor crónica há um decréscimo da ativação de recetores opióides em áreas do sistema supraspinal de controlo da dor. Estes resultados podem ser explicados pela perda de recetores opióides ou por aumento da libertação de opióides endógenos, que ocupam locais de ligação dos recetores. A importância clínica destes achados é incontestável atendendo a que na dor crónica há libertação de opióides, de modo análogo ao que ocorre no tratamento continuado com opióides. Neste último caso, são bem conhecidos fenómenos de tolerância ou mesmo de hiperalgesia. Estudos recentes mostraram que no DRt ocorre uma diminuição da expressão de recetores opióides (tipo μ e tipo δ) e aumento dos níveis de encefalina em situações de dor crónica²⁸. Estes dados indicam que durante a dor crónica, a inibição tónica opiodérgica do DRt pode estar comprometida, com conseqüente aumento da facilitação descendente mediada por este núcleo.

O RVM contém neurónios envolvidos na facilitação da dor (neurónios «ON») que coexistem com células que participam na inibição (neurónios «OFF»), o que demonstra a complexidade dos mecanismos de modulação da dor. Os neurónios «ON» parecem estar envolvidos na amplificação da dor atendendo a que há aumento da sua actividade em situações de dor crónica²⁹ e a que são inibidos pela morfina¹⁵. Este arranjo das populações neuronais em neurónios «ON»

e «OFF» não é específico do RVM, ocorrendo noutras áreas encefálicas de controlo da dor³⁰.

Tipos de dor

A dor pode ser classificada de múltiplas maneiras, com base na sua duração (aguda, crónica), patogénese (nociceptiva, neuropática); local de origem (abdominal, lombalgia) ou causa (pós-cirúrgica, oncológica). Segundo Costigan³¹, podemos considerar quatro tipos de síndromes dolorosas: dor nociceptiva; dor inflamatória; dor neuropática e dor disfuncional. A dor nociceptiva ocorre em resposta a um estímulo nódico, resulta da activação dos nociceptores (fibras C e A δ) e perdura apenas durante a presença do estímulo nódico. Neste caso, a dor é aguda, funciona como alarme à agressão do corpo e é essencial à preservação da integridade do organismo e à sua sobrevivência. Em casos patológicos, os estímulos nódicos e a geração de informação nociceptiva prolongam-se no tempo e passamos a estar na presença de dor nociceptiva crónica. (p. ex.: osteoartrite). No caso da dor inflamatória, a lesão do tecido induzida por um estímulo nódico gera uma resposta inflamatória. Num processo de dor inflamatória reparativa (reversível), o organismo altera a sua resposta à dor de modo a permitir a cicatrização e recuperação da área lesada e, por isso, a estimulação normalmente inócua da área lesada e daquela imediatamente em volta é agora dolorosa (alodínia) e a resposta a estímulos nódicos torna-se exagerada e prolongada no tempo (hiperalgesia). A hiperalgesia que ocorre por estimulação da área lesada designa-se por hiperalgesia primária, enquanto a que ocorre por estimulação de zonas vizinhas tem a designação de hiperalgesia secundária (Fig. 4). A alodínia pode associar-se à plasticidade dos nociceptores e das vias centrais de transmissão nociceptiva, pelo que a dor deixa de resultar apenas da detecção de estimulação nódica, passando a poder ser desencadeada por estímulos inócuos. Em geral, o processo inflamatório é reversível e a função é, neste caso, reparativa e biologicamente relevante, mas se a inflamação se prolonga no tempo pode tornar-se patológica (p. ex.: artrite reumatóide) e a dor durar enquanto a inflamação (não reparativa) for ativa. A dor neuropática resulta da lesão ou doença do sistema somatossensitivo (periférico e central), que origina a alteração do processamento nociceptivo de modo a ocorrer dor, mesmo na ausência de qualquer estímulo aplicado à periferia, enquanto a resposta à estimulação inócua ou nódica está por sua vez profundamente exagerada (p. ex.: dor do membro fantasma; neuropatia diabética; esclerose múltipla). O tratamento convencional destas patologias tem incidido na causa original, mas a lesão inicial é muitas vezes apenas o gatilho de toda uma panóplia de alterações profundas do funcionamento do sistema somatossensitivo que levam ao desenvolvimento ou à manutenção da dor neuropática. Assim, mesmo que o tratamento da causa inicial possa continuar, a dor neuropática que se desenvolve terá que ser ela própria alvo de terapia especial como uma doença *per se*. A dor disfuncional resulta de um processo amplificador

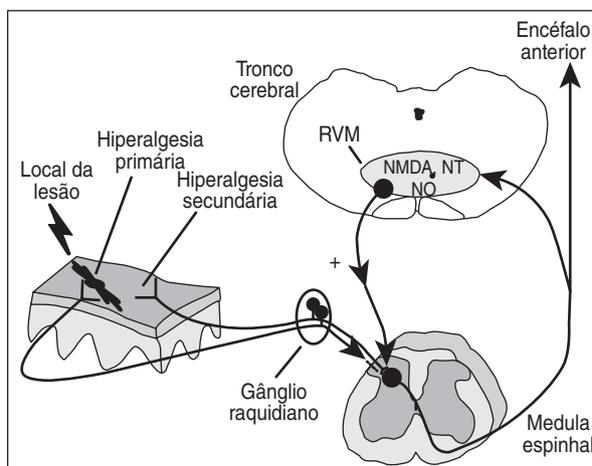


Figura 4. Diagrama sumário que ilustra a contribuição dos centros supraspinais de controlo da dor para a hiperalgesia secundária durante a inflamação periférica, através de conexões com o corno posterior (CP) da medula espinhal, mas não para a hiperalgesia primária. A lesão periférica resulta na ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos e consequente aumento da excitabilidade dos neurónios do CP (sensibilização central) que contribui para a hiperalgesia primária (no local da lesão) e hiperalgesia secundária (local vizinho ao local da lesão). Adicionalmente, a estimulação dos nociceptores ativa circuitos espinho-bulbo-espinhais que desencadeiam uma influência descendente facilitadora da nocicepção com origem no RVM. As influências facilitadoras são ativadas por recetores NMDA do glutamato, óxido nítrico (NO) e recetores da neurotensina (NT) no RVM, e descem para múltiplos segmentos espinhais para contribuírem para a hiperalgesia secundária. Pelo contrário, a hiperalgesia primária não envolve ações facilitadoras descendentes a partir do encéfalo e resulta da sensibilização dos nociceptores periféricos e neuroplasticidade dos neurónios da medula espinhal ativados diretamente da periferia. RVM: bulbo rostral ventrolateral. (adaptado de Urban e Gebhart, *Supraspinal contributions to hyperalgesia*, PNAS, 96:7687-7692, 1999).

autónomo do sinal nociceptivo, intrínseco ao organismo, onde a dor ocorre na ausência de processos inflamatórios ou lesões do sistema nervoso (que sejam conhecidos), resultando numa dor que não tem qualquer valor biológico de protecção, reparação ou cicatrização (p. ex.: fibromialgia; síndrome do cólon irritable; cistite intersticial). Estes síndromes dolorosos resultam do mau funcionamento do sistema somatossensitivo e devem ter o direito a ser considerados uma doença *per se*. É importante notar que, apesar das dores crónicas inflamatória, disfuncional e neuropática possuírem etiologias e características clínicas diferentes, apresentam alguns mecanismos que são comuns, nomeadamente os fenómenos de sensibilização periférica e sensibilização central (ver abaixo).

Cronificação da dor

Na sequência de um estímulo que induz dano tecidual, como por exemplo uma laceração profunda da pele, a área lesada sofre alterações que podem levar à instalação de dor crónica. Considera-se que esta é

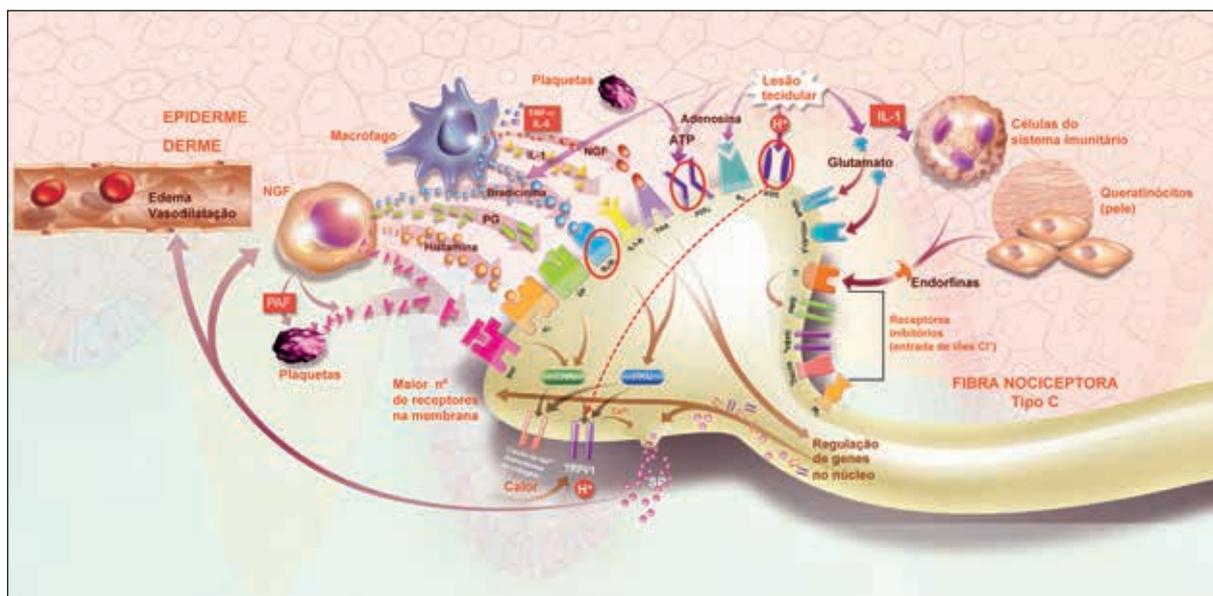


Figura 5. Mediadores implicados na sensibilização periférica resultante da inflamação. A inflamação origina a libertação de numerosas moléculas a partir dos mastócitos, macrófagos, células do sistema imunitário e células do tecido afetado pela lesão que origina o processo inflamatório. Estas moléculas podem atuar direta (p. ex.: em recetores ASiC, P2X₃, A₂, TRPV1) ou indiretamente (p. ex.: recetores 5HT, EP, B₂/B₁) sobre as terminações periféricas das fibras aferentes primárias e, respetivamente, despolarizar diretamente as fibras ou alterar a sua sensibilidade à estimulação nóxica. A sensibilização inclui a própria regulação do genoma (p. ex.: recetores IL1-R, TrkA). ASiC: canal iónico sensível à acidez; CRH: hormona libertadora da corticotrofina; GIRK: canal de potássio retificador ligado à proteína-G; iGluR: recetor ionotrópico do glutamato; IL-1β: interleucina 1β; IL-6: interleucina 6; mGluR: recetor metabotrópico do glutamato; NGF: fator de crescimento do nervo; PAF: fator ativador das plaquetas; PGE₂: prostaglandina E₂; PKA: proteína cinase A; PKC: proteína cinase C; SSTR2A: recetor 2A da somatostatina; TNF-α: fator de necrose tumoral; TrkA: recetor A da tirosina cinase; TTXr: canal de sódio resistente à tetrodoxina; μ: recetor opióide μ; M₂: recetor muscarínico; 5HT: recetor da serotonina; LIF: fator inibidor da leucemia (adaptado de Meyer et al, Wall and Melzack's Textbook of Pain, 5.ª Edição, Capítulo 1;2006).

uma dor que persiste além de 3-6 meses ou se mantém após remoção das causas que a originaram³². A dor crónica envolve uma integração complexa de processos sensoriais, cognitivos e afetivos, que pode depender do tipo de dor. Existem, contudo, sintomas característicos da dor crónica e que incluem dor espontânea, alodínia e hiperalgesia.

Sensibilização

A dor crónica deve-se a alterações na actividade neuronal que ocorrem nos nociceptores (sensibilização periférica) e nos neurónios do SNC (sensibilização central). A sensibilização periférica resulta da libertação de diversas substâncias em consequência da lesão local dos tecidos e do recrutamento de células do sistema imunitário do sangue e do tecido conjuntivo. A mistura destas moléculas, vulgarmente conhecida como «sopa inflamatória», inclui agentes tão diversos como protões, ácido araquidónico, bradicinina, histamina, serotonina, prostaglandinas, nucleótidos e factores de crescimento (Fig. 5). Estas substâncias atuam nos respetivos recetores, que podem ou não ser canais iónicos e ativam diretamente, inibem ou facilitam a despolarização das terminações dos nociceptores e a consequente geração de um sinal elétrico nociceptivo. Assim, os protões H⁺ resultantes da lesão tecidual, a adenosina trifosfato (ATP)

e a adenosina, ao ligarem-se aos respetivos recetores nas membranas dos nociceptores, despolarizam-nos e originam diretamente um sinal nociceptivo; neste caso temos por exemplo os recetores/canais iónicos P2X₂ do ATP e os canais iónicos sensíveis à acidez (ASiC) no caso dos protões H⁺ (Fig. 5). Por outro lado, a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas libertadas alteram a sensibilidade dos nociceptores, baixando o seu limiar de activação, permitindo assim aumentar a resposta nociceptiva a outros estímulos exógenos; estes recetores não contêm canais iónicos na sua constituição e estão ligados à proteína G, a partir da qual são ativadas uma série de cascatas de mensageiros secundários [fosfolipase C → proteína cinase C (PKC), ou adenilciclase → proteína cinase A (PKA)] que sensibilizam os nociceptores, principalmente por fosforilarem os seus canais iónicos dependentes da voltagem ou que estão associados a outros recetores (Fig. 5). Também é de salientar a importância dos recetores neurotróficos na nocicepção e sensibilização periférica. A ligação de factores de crescimento como o «nerve growth factor» (NGF) ou «glial-derived neurotrophic factor» (GDNF) aos seus recetores na membrana dos nociceptores (recetores TrkA e GDNFRa1, respetivamente) resulta numa transdução lenta, que requer a internalização do complexo neurotrofina-receptor e numa transdução rápida, que altera a sensibilidade dos canais iónicos

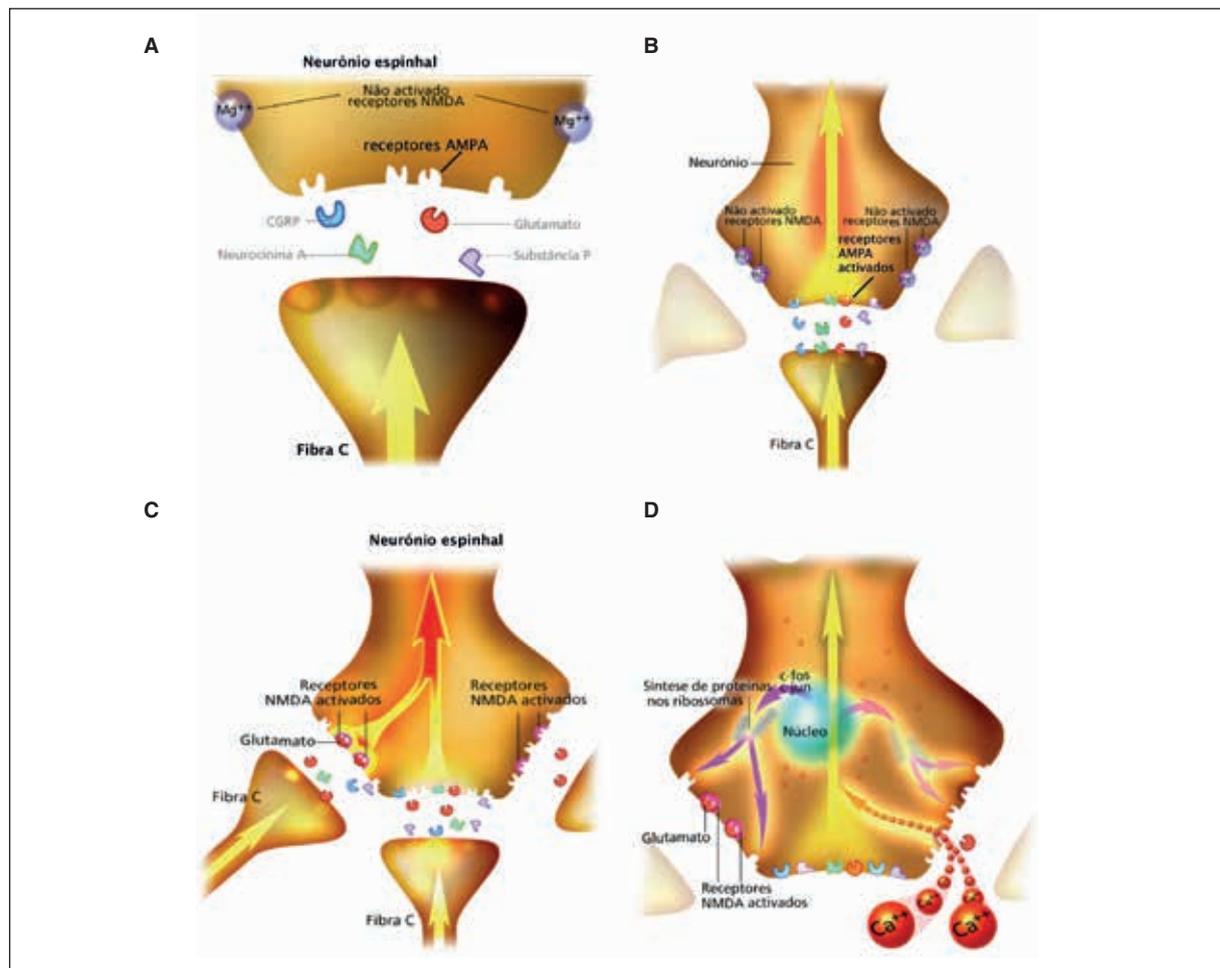


Figura 6. Principais processos que medeiam a sensibilização central. A excitação de nociceptores após um estímulo de dor aguda é transduzida num potencial de ação que, à chegada na extremidade central do corno posterior da medula, origina a libertação de neurotransmissores excitatórios na fenda sináptica (A). Nos neurónios nociceptivos espinhais, o sinal elétrico gerado é traduzido numa despolarização (B) mediada pelos recetores AMPA do glutamato, a qual é rapidamente terminada permitindo ao neurónio ser excitado por novos estímulos provenientes da periferia; os recetores NMDA do glutamato permanecem bloqueados por um ião de magnésio (Mg^{++}) (B). Se a dor aguda se prolongar no tempo ou se transformar num processo inflamatório persistente, a sensibilização periférica (Fig. 4) leva a uma despolarização prolongada e a uma sensibilização central dos neurónios espinhais. Esta é principalmente traduzida na abertura dos recetores NMDA do glutamato, que perdem o bloqueio do ião Mg^{++} (C) e permitem uma entrada intensa e prolongada de íões cálcio através do seu canal iónico (D). A despolarização provocada pela grande entrada de cálcio prolonga a despolarização dos neurónios espinhais, com alteração do próprio genoma após ativação dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun* (D); as proteínas resultantes desta ativação alteram a transcrição proteica de modo a serem produzidos e enviados para as membranas mais recetores de glutamato e de outros neurotransmissores, numa tentativa das células de se adaptarem à informação nociceptiva crescente e ao sinal dado pela despolarização contínua dos neurónios. Esta constitui a base da ativação prolongada denominada potenciação de longo termo (LTP), já descrita em neurónios nociceptivos da medula espinhal. AMPA: alfa-amino3-hidroxi-metil5-4-isoxazolpropiónico; NMDA: N-metil-D-aspartato. Imagens do Curso «PAIN Management-State of the Art», cedidas gentilmente pela Grünenthal.

e a sua localização na membrana em segundos, principalmente pela fosforilação de outros recetores; a ligação do NGF resulta ainda no recrutamento de um complexo de moléculas intracelulares e vias enzimáticas que inclui, por exemplo, a «*ras-mitogen-associated protein kinase*» (MAPK). Importante para a sensibilização periférica é o facto do complexo ativado NGF-TrkA internalizado ser transportado até ao núcleo dos nociceptores (Fig. 5) e desencadear alterações na transcrição genética que resultam na produção de mais recetores que são reenviados de volta para as terminações nociceptivas, onde vão reforçar

a bateria de fontes de despolarização direta ou sensibilização dos nociceptores (Fig. 5). Um tipo de recetores/canais iónicos que, quando ativados, despolarizam a membrana e parecem estar implicados em diversas formas de transdução energética nóxica num sinal nociceptivo são os recetores «*transient receptor potential*» (TRP). Dentro desta grande família, o recetor TRPV1 parece estar associado à transdução de estímulos nóxicos químicos (acidez) e térmicos (calor); os recetores TRPV3 e TRPV4 estão associados à sinalização de temperaturas mornas; o recetor TRPM8 sinaliza frio (responde ao mentol) e o recetor TRPA1

está associado à transdução mecanossensitiva. O recetor TRPV1 parece ser essencial ao desenvolvimento de hiperalgesia térmica.

A sensibilização central refere-se ao aumento da excitabilidade de neurónios do SNC, detetada após estimulação nociceptiva prolongada³³. A sensibilização central encontra-se melhor estudada na medula espinhal mas também ocorre a nível supraspinal, nomeadamente no córtex sensitivo primário e no tálamo. A estimulação repetida de aferentes primários responsáveis pela transmissão de informação nociceptiva (fibras C e fibras Ad) induz hiperexcitabilidade dos neurónios da medula espinhal. A sensibilização central traduz-se em aumento da resposta dos neurónios nociceptivos à estimulação, redução do seu limiar de resposta, alargamento dos campos recetivos e aumento da atividade espontânea. Um mecanismo importante na sensibilização central é o «*wind-up*», que consiste no aumento progressivo do número de disparos dos neurónios do corno posterior da medula espinhal em resposta à ativação de baixa frequência dos nociceptores. A repetição de um estímulo periférico de baixa intensidade leva a que a dor percebida tenha uma intensidade crescente. O «*wind-up*» resulta do efeito sumativo dos potenciais sinápticos evocados nos neurónios espinhais pelos estímulos anteriores. Admite-se que o «*wind-up*» seja mediado pela ativação de recetores de cálcio do tipo L, dependentes da voltagem e da remoção do bloqueio pelo Mg²⁺ dos recetores *N*-metil-D-aspartato (NMDA), um sub-tipo de recetores ionotrópicos do glutamato. A ativação de recetores NMDA induz a ativação de genes de expressão rápida (*c-fos* e *c-jun*) nos neurónios da medula espinhal (Fig. 6). O «*wind-up*» cessa quando a estimulação para, mas há outros mecanismos de sensibilização central que persistem muito além do período de estimulação nociceptiva. É o caso do aumento dos potenciais pós-sinápticos dos neurónios espinhais, devido a mecanismos de potenciação a longo termo (LTP), e traduz-se num aumento duradouro da potência sináptica. No caso da dor, a LTP foi demonstrada para sinapses entre fibras aferentes primárias C e Ad e neurónios espinhais, situados nas camadas mais superficiais da medula (lâmina I). Esses neurónios participam em vias espinhofugais e desempenham um papel importante na hiperalgesia detetada após inflamação ou dor neuropática³². A LTP pode ser desencadeada por estimulação elétrica de nervos, lesão de nervos ou estimulação nociceptiva periférica. Em qualquer dos casos, uma característica comum é a libertação de substância P (SP) e a ativação de recetores NK1 para a SP e NK2 para a neuroquinina A. Os mecanismos de transdução envolvidos no LTP envolvem co-ativação de recetores NMDA e de recetores metabotrópicos do glutamato, do tipo I, e pressupõem a abertura de canais de cálcio tipo T. A LTP mantém-se durante cerca de três horas após indução e envolve síntese proteica ativa nos neurónios da medula espinhal. Os estudos que mostram em que medida o sistema supraspinal de controlo da dor contribui para a sensibilização central são mais escassos. Curiosamente, muitos dos estudos sugerem que o TRPV-1 tenha um

papel importante na alteração da forma como se articulam os circuitos neuronais no sistema somatossensitivo, a nível encefálico.

A sensibilização central em situações de dor orofacial foi associada ao incremento das projeções serotoninérgicas do RVM para o tálamo, em modelos animais de dor neuropática³⁴. O bloqueio da síntese de serotonina nos neurónios do RVM prevenia-se com o aumento da atividade do TRPV1 nos neurónios talâmicos. Para além desta atuação no controlo dos circuitos encefálicos de controlo da dor, a mediação do TRPV-1 na sensibilização central associada ao controlo descendente serotoninérgico oriundo do RVM foi recentemente descrita³⁵.

À medida que ocorre cicatrização dos tecidos, a sensibilização tende a diminuir, quer a nível periférico quer central. Porém, quando as fibras aferentes ou as vias centrais estão lesadas, o que ocorre em diversas patologias como diabetes, esclerose múltipla ou HIV, os processos acima descritos podem persistir, instalando-se uma situação de dor crónica.

Papel das células gliais

O papel da glia na transmissão da informação nociceptiva foi apenas equacionado recentemente. Durante a dor aguda, a glia deve desempenhar um papel irrelevante, limitando-se ao suporte e nutrição neuronal. Durante a instalação de dor crónica (inflamatória ou neuropática), os astrócitos e a microglia são ativados e potenciam a dor através da libertação de mediadores pró-nociceptivos. A ativação da microglia em modelos de dor neuropática é acompanhada da libertação de diversas citocinas, como a IL-1 β e a IL-6 e o TNF- α ³⁶. Estes mediadores atuam nos neurónios potenciando a sua atividade.

A ativação glial durante a instalação de dor crónica foi inicialmente descrita na medula espinhal. Apresenta um padrão somatotópico, ou seja, a ativação ocorre apenas nas áreas da medula espinhal que recebem informação da área lesada. A ativação glial na medula espinhal deve-se à libertação de neurotransmissores dos aferentes primários, como a SP, CGRP e ATP. Os astrócitos e a microglia da medula espinhal podem também ser ativados em resposta a neuromoduladores libertados pelos aferentes primários, nomeadamente o óxido nítrico. A ativação glial pode também envolver moléculas específicas. As fractalquinas são proteínas expressas na superfície dos aferentes primários e dos neurónios espinhais, e são libertadas em consequência duma estimulação nóxica intensa, difundindo-se para ativar a microglia. Para além desta via de ativação neurónio-microglia, em algumas situações de dor neuropática pode ocorrer ativação da microglia através dos astrócitos que passam a produzir fractalquinas, potenciando a ativação da microglia na medula espinhal. A glia pode também ser ativada através de *Toll-like receptors* (TLR), importantes na função específica da microglia como célula do sistema imunitário. O TLR4 é um recetor que participa na facilitação da dor, sendo ativado em resposta à libertação de proteínas da família das proteínas de choque térmico (ou «*heat shock proteins*»), o que

ocorre na medula espinhal quando há lesão das fibras à periferia³⁷. Mais recentemente, verificou-se que a ativação glial também ocorria em áreas encefálicas que participam na modulação da dor, como a PAG, indicando que a investigação da neurobiologia da dor se irá direcionar para compreender a interação neurónio/glia.

A importância clínica da glia é cada vez mais equacionada, tendo sido desenvolvidos diversos fármacos que impedem a ativação glial. A eficácia analgésica destes fármacos foi demonstrada em modelos animais de dor crónica³⁷. Para além deste aspeto, os dados que mostram que a administração prolongada de morfina leva à ativação glial, têm claras implicações para compreender os mecanismos que explicam fenómenos de tolerância, comuns durante o tratamento da dor crónica por opióides.

Fatores de risco e comorbilidades

Diversos fatores contribuem para que a dor aguda evolua para uma situação de dor crónica. Os fatores mais importantes são a predisposição individual, influências ambientais e aspetos psicológicos.

A predisposição individual inclui aspetos diversos como sexo, idade e fatores genéticos. As mulheres têm mais probabilidade de desenvolver dor crónica, o que parece depender de hormonas sexuais. Animais submetidos a gonadectomia e em que as hormonas sexuais foram substituídas por hormonas do sexo oposto (testosterona nas fêmeas e estrogénios e progesterona nos machos) desenvolvem padrões de resposta comportamental à dor característicos do sexo oposto. As diferenças comportamentais de respostas à dor entre homens e mulheres aparecem apenas após a puberdade e desaparecem após menopausa/andropausa. Com o envelhecimento, os limiares de resposta à dor diminuem devido ao decréscimo na eficácia da modulação descendente, o que é agravado pela progressiva degeneração muscular-esquelética. Quanto à predisposição genética, está estabelecida a relação entre variantes genéticas e a eficácia analgésica a opióides para os seguintes genes: COMT, ABCB1 e CYP2D6. Polimorfismos muito comuns no COMT, gene que codifica a síntese de uma enzima importante no metabolismo das catecolaminas (a catecol-O-metiltransferase), têm sido alvo de estudo detalhado. Indivíduos homocigóticos para o alelo 158Met do COMT têm maior necessidade de opióides para alívio da dor do que heterocigóticos. Os homocigóticos apresentam menor densidade de locais de ligação de recetores opióides tipo μ em diversas regiões encefálicas, como o tálamo³⁸. A caracterização mais detalhada de mutações genéticas tem sido feita em doentes com neuropatias dolorosas, nomeadamente a neuropatia dolorosa de fibras finas, revelando que estes doentes apresentam alterações genéticas que afetam a expressão de canais iónicos de sódio dependentes da voltagem, nomeadamente os Nav 1.7 e 1.8³⁹. A continuação dos estudos de caracterização genética poderá vir a indicar variações no perfil genético da população normal, podendo futuramente ajudar o clínico a prever a

eficácia de analgésicos e a definir um tratamento individualizado da dor.

Relativamente aos fatores ambientais, alguns fatores geradores de *stress* podem potenciar a probabilidade de desenvolver dor. A exposição prévia à dor é um fator determinante. Por exemplo, prematuros sujeitos a procedimentos cirúrgicos dolorosos são futuramente mais sensíveis à dor, aparentemente devido a deficiência no recrutamento de mecanismos inibitórios de modulação descendente.

Alguns fatores psicológicos como depressão, ansiedade e a tendência para a catastrofização, ajudam a prever a probabilidade de um indivíduo desenvolver dor crónica. A depressão potencia a magnitude e duração da dor sendo questionável se a eficácia analgésica dos antidepressivos se deve a ações diretas no sistema descendente de controlo da dor ou ao tratamento da depressão. Os estudos clínicos têm enfatizado a necessidade de analisar separadamente homens e mulheres, no que respeita à possibilidade de desenvolver dor crónica quando, se instalam quadros como depressão e ansiedade⁴⁰, sugerindo-se que esta situação é mais comum em indivíduos do sexo feminino.

Conclusão e perspetivas futuras

A perceção da dor, sucintamente analisada neste artigo de revisão, envolve mecanismos neurobiológicos que transcendem largamente a transmissão sensorial, incluindo componentes afetivos e cognitivos, específicos de cada indivíduo. Estes aspetos potenciam a variabilidade individual na resposta aos estímulos nociceptivos, a que acrescem polimorfismos genéticos, potencialmente preditivos da capacidade de vir a instalar-se uma situação de dor crónica. O conhecimento dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na transmissão e modulação de informação nociceptiva, acima revisto, tem sido maioritariamente recolhido de trabalhos realizados em roedores (rato e ratinho). As perspetivas translacionais destes estudos têm sido bastante discutidas nos últimos tempos devido a diversas razões. Alguns investigadores salientam a necessidade de desenvolver testes comportamentais que permitam avaliar a dor espontânea nos animais de laboratório, dado que o comportamento à dor se tem baseado em estudos de dor evocada⁴¹. Resta analisar se os mecanismos neurobiológicos da dor evocada em animais apresentam diferenças dos que estão envolvidos na dor espontânea, que leva frequentemente os doentes a procurarem o médico⁴². Para além deste aspeto, tem sido questionado o direcionamento dos estudos em animais para a utilização de machos, em detrimento das fêmeas⁴³. Este enviesamento na investigação animal é devido às dificuldades de comparar estudos realizados em momentos diferentes dos ciclos hormonais nas fêmeas e levou a que o *National Institute of Health* (NIH) publicasse algumas diretivas no sentido de equilibrar a representatividade de machos e fêmeas em estudos animais⁴⁴. A medicina da dor é, cada vez mais, desafio para investigadores básicos que procuram obter resultados aplicáveis aos doentes que sofrem de dor.

Agradecimentos

Queremos expressar o nosso especial agradecimento ao Dr. Fernando Vilhena de Mendonça/Círculo médico (www.circulomedico.com/) pela cedência da Figura 5 deste artigo, do site www.conhecetador.pt, e à Bene farmacêutica todo o apoio à realização deste trabalho. As Figuras 1, 2 e 3 foram realizadas por ©Fernando Vilhena de Mendonça, Círculo médico.

Bibliografia

- Price DD. Psychological mechanisms of pain and analgesia. IASP Press, Seattle. 1999.
- Rainville P, Carrier B, Hofbauer RK, Bushnell MC, Duncan GH. Dissociation of sensory and affective dimensions of pain using hypnotic modulation. *Pain*. 1999;82:159-71.
- Ringkamp e Meyer. Physiology of nociceptors. In: "Science of Pain" (Basbaum AI, Bushnell C, eds). Elsevier, Amsterdam. 2009;97-114,.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139:267-84.
- Ackerley R, Wasling HB, Liljencrantz J, Olausson H, Johnson RD, Wessberg J. Human C-tactile afferents are tuned to the temperature of a skin-stroking caress. *J Neurosci*. 34(8):2879-83.
- Björnsdotter M, Löken L, Olausson H, Vallbo A, Wessberg J. Somatotopic organization of gentle touch processing in the posterior insular cortex. *J Neurosci*. 2009;29(29):9314-20.
- Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11:823-36.
- D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. *Br. J. Anaesth*. 2008;101: 8-16.
- Coutax A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*. 2005;72:359-71.
- Lima D. Ascending pathways: anatomy and physiology. In: "Science of Pain" (Basbaum AI, Bushnell C, eds). Elsevier, Amsterdam. 2009;477-526.
- Dostrovsky JO, Craig AD. The thalamus and nociceptive processing. In: "Science of Pain", (Basbaum AI, Bushnell C eds). Elsevier, Amsterdam. 2009;635-54,.
- Treede and Apkarian. Nociceptive processing in the cerebral cortex. In: "Science of Pain" (Basbaum AI, Bushnell C, eds). Elsevier, Amsterdam. 2009;669-97,.
- Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*. 2007;55:377-91.
- Almeida A, Leite-Almeida H, Tavares I. Medullary control of nociceptive inputs: reciprocal communications with the spinal cord. *Drug Disc Today: Dis Mech*. 2006;3:305-12.
- Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*. 2009;60:214-25.
- Millan, M.J. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*. 2002;66:355-474.
- Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*. 1969;164:444-5.
- Pertovaara A, Almeida A. Descending inhibitory systems. In "Pain",-Handbook of Clinical Neurology 81, 3ª Série, (Cervero F, Jensen T, eds). Elsevier, Amsterdam. 2006;179-92.
- Gonçalves L, Silva R, Pinto-Ribeiro F, et al. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp Neurol*. 2008;213:48-56.
- Moriarty O, McGuire BE, Finn DP. The effect of pain on cognitive function: a review of clinical and preclinical research. *Prog Neurobiol*. 2011;93:385-404.
- Julien N, Goffaux P, Arsenault P, Marchand S. Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*. 2005;4:295-302.
- Cifre I, Sitges C, Fraiman D, et al. Disrupted functional connectivity of the pain network in fibromyalgia. *Psychosom Med*. 2012;74:55-62.
- Le Bars D. The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurones. *Brain Res Rev*. 2002;40:29-44.
- King CD, Wong F, Currie T, Mauderli AP, Fillingim RB, Riley JL 3rd. Deficiency in endogenous modulation of prolonged heat pain in patients with Irritable Bowel Syndrome and Temporomandibular Disorder. *Pain*. 2009;143:172-8.
- Ossipov MH, Porreca F. Descending excitatory systems. In "Pain", Handbook of Clinical Neurology 81, 3ª Série, (Cervero F, Jensen T, eds). Elsevier, Amsterdam. 2006;193-210,.
- Lima D, Almeida A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Prog Neurobiol*. 2002;66:81-108.
- Zhang L, Zhang Y, Zhao ZQ. Anterior cingulate cortex contributes to the descending facilitatory modulation of pain via dorsal reticular nucleus. *Eur J Neurosci*. 2005;22:1141-8.
- Tavares I, Lima D. From neuroanatomy to gene therapy: searching for new ways to manipulate the supraspinal endogenous pain modulatory system. *J Anat*. 2007;211:261-8.
- Silva M, Amorim D, Almeida A, Tavares I, Pinto-Ribeiro F, Morgado C. Pronociceptive changes in the activity of rostroventromedial medulla (RVM) pain modulatory cells in the streptozotocin-diabetic rat. *Brain Res Bull*. 2013;96:39-44.
- Pinto-Ribeiro F, Ansañ OB, Almeida A, Pertovaara A. Response properties of nociceptive neurons in the caudal ventrolateral medulla (CVLM) in monoarthritic and healthy control rats: modulation of responses by the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res Bull*. 2001;86:82-90.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Ann Rev Neurosci*. 2009;32:1-32.
- Sandkuller J. Long-term potentiation in pain pathways. In: Science of Pain", Basbaum AI, Bushnell C, eds). Elsevier, Amsterdam. 2009;401-6.
- Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011;152(3):S2-15.
- Okubo M, Castro A, Guo W, et al. Transition to persistent orofacial pain after nerve injury involves supraspinal serotonin mechanisms. *J Neurosci*. 2013;33(12):5152-61.
- Kim Y, Chu Y, Han L, et al. Central Terminal Sensitization of TRPV1 by Descending Serotonergic Facilitation Modulates Chronic Pain. *Neuron*. 2014;81:873-87.
- McMahon SB, Malcangio M. Current challenges in glia-pain biology. *Neuron*. 2009;64:46-54.
- Watkins LR, Hutchinson MR, Rice KC, Maier SF. The "toll" of opioid-induced glial activation: improving the clinical efficacy of opioids by targeting glia. *TIPS*. 2009;30:581-91.
- Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science*. 2003;299:1240-3.
- Huang J, Han C, Estacion M, et al. Gain-of-function mutations in sodium channel NaV1.9 in painful neuropathy. *Brain*. 2014;137:1627-42.
- Davis MC, Thummala K, Zautra AJ. Stress-Related Clinical Pain and Mood in Women with Chronic Pain: Moderating Effects of Depression and Positive Mood Induction. *Ann Behav Med*. 2014;48(1):61-70.
- Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10: 283-94.
- Bennett GJ. What Is Spontaneous Pain and Who Has It? *The Journal of Pain*. 2012;13: 921-9.
- Mogil JS, Chanda M L. The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain*. 2005;117:1-5.
- Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature*. 2014;509(7500):282-3.

Papel Central da Substância Cinzenta Periaqueductal no Controlo da Dor: Como Conciliar os Últimos Avanços dos Estudos Clínicos e Básicos?

Marta Louçano¹ e Isaura Tavares²

A dor é uma experiência sensorial mas também inclui componentes cognitivos, emocionais e afetivos. O componente sensorial da informação nociceptiva é fortemente modulado pelo encéfalo tendo em conta os componentes acima referidos. A substância cinzenta periaqueductal (PAG), situada no mesencéfalo, ocupa uma posição crucial para receber informação cognitiva, emocional e afetiva de áreas mais altas do neuro-eixo e modular a transmissão de informação nociceptiva na medula espinhal. Os estudos realizados em modelos animais têm incidido sobretudo em reações sensoriais e são limitados pelos desafios inerentes à avaliação do estado emocional e cognitivo em animais de laboratório. Os estudos em modelos animais têm, contudo, contribuído fortemente para o conhecimento dos mecanismos neurobiológicos da modulação da transmissão de informação nociceptiva a nível molecular em áreas encefálicas de controlo da dor como a PAG. Os estudos clínicos realizados nos últimos anos têm salientado o papel do componente emocional e afetivo no próprio tratamento da dor, em complemento a abordagens farmacológicas mais convencionais. A investigação científica parece, portanto, ter chegado a uma encruzilhada em que é mais importante do que nunca perspetivar novas formas de avaliar a dor em modelos animais para que se consigam produzir novas moléculas analgésicas com sucesso clínico.

Palavras-chave: Imagiologia. Modelos animais. Dor crónica. Opióides.

Abstract

Pain is a sensory experience, but it also includes cognitive, emotional, and affective components. The sensory component of the nociceptive information is strongly modulated at the brain, taking into account cognition, emotion, and the affective condition. The periaqueductal gray (PAG), located at the midbrain, occupies a key position to receive information from higher areas at the neuraxis, which process the cognitive, emotional, affective, and motivational aspects of pain responses. Studies in animal models are mainly focused on the sensory reaction of the animal in response to exogenous stimulation. These studies are also limited by the challenge inherent to assess variables such as the emotional condition of the animal. Studies in animal models have, however, been lavish in contributing to the knowledge of the neurobiology of transmission of nociceptive information, particularly at the molecular level, namely in pain control areas of the brain, such as the PAG. Clinical studies have recently highlighted the role of affective and emotional components in pain treatment, in addition to the classic pharmacological approaches. The basic and clinical research on pain has reached a crossroads where it is more important than ever to plan new ways to assess pain in animal models that are able to produce new molecules analgesic clinical success. (Dor. 2014;22(4):20-4)

Corresponding author: Isaura Tavares, isatav@med.up.pt

Key words: Neuroimaging. Animal model. Opioid. Chronic pain.

¹Mestre em Bioquímica em Saúde, ESTSP
Escola Superior de Tecnologias da Saúde
Instituto Politécnico do Porto
²Professora Associada com Agregação na Faculdade
de Medicina do Porto
Faculdade de Medicina
Universidade do Porto
I3S-Instituto de Inovação e Investigação em Saúde
Universidade do Porto
E-mail: isatav@med.up.pt

Introdução

A dor é complexa e difícil de definir. Trata-se de uma experiência consciente e subjetiva de interpretação do processamento de informação nocicetiva, influenciada de um modo multifatorial por influências genéticas, cognitivas e emocionais¹. Após a transmissão de informação potencialmente dolorosa a partir da periferia até à medula espinhal, vários eventos são desencadeados de modo a controlar e modular a informação que chega ao encéfalo, sendo o córtex somatossensitivo o destino final de chegada e onde se produz a sensação de dor.

Diversas áreas do encéfalo recebem, direta ou indiretamente, informação nocicetiva proveniente da medula espinhal. Nessas áreas encefálicas, ocorre a integração do referido *input* nocicetivo com informação oriunda de centros encefálicos envolvidos no controlo de funções tão diversas como a cognição, motivação e emoção^{1,2}. Esta rede neuronal complexa funciona em conjunto para que ocorra a modulação da dor³. O conhecimento da neurobiologia da referida rede permite explicar porque a magnitude da dor é afectada pelo estado cognitivo e emocional. A título de exemplo e relativamente ao primeiro aspecto, é sabido que a experiência prévia de dor (a nossa e a dos outros) afeta a forma como sentimos a dor. Quanto a um exemplo de como o estado emocional influencia a dor, sabe-se que a sua percepção é agravada por estados de depressão e ansiedade.

A rede neuronal encefálica envolvida na modulação da dor tem sido desvendada em modelos animais e no Homem e designa-se, coletivamente, por *sistema supraspinhal de controlo da dor*. A área mais central do referido sistema e que parece desempenhar um papel crucial na referida modulação é a PAG. Sendo uma zona de substância cinzenta localizada em torno do aqueduto mesencefálico, a PAG está situada numa posição estratégica para funcionar como um centro de integração da informação nocicetiva proveniente da medula espinhal com as influências modulatórias provenientes de centros mais altos do neuro-eixo. Após integração das referidas influências modulatórias, a PAG realiza modulação descendente da transmissão de informação nociceptiva na medula espinhal. O resultado final dessa modulação descendente pode ser inibitório (ação antinocicetiva) ou facilitatório (acção pronocicetiva).

A PAG como um portão de controlo

A existência de um sistema supraspinhal de controlo da dor foi descoberta nas experiências pioneiras de Reynolds que em 1969 reportou um efeito analgésico específico e robusto em estudos com animais, através da estimulação elétrica da PAG⁴. O efeito analgésico obtido por estimulação da PAG foi posteriormente demonstrado em humanos, também através da estimulação de outras zonas cerebrais periventriculares, mas localizadas mais rostralmente⁵. Presume-se que a existência deste circuito modulatório, substrato da capacidade da atenuação de respostas à estimulação nocicetiva, seja benéfico para a sobrevivência do indivíduo uma vez que pode motivar a fuga a situações potencialmente perigosas para o organismo. As influências facilitatórias descendentes

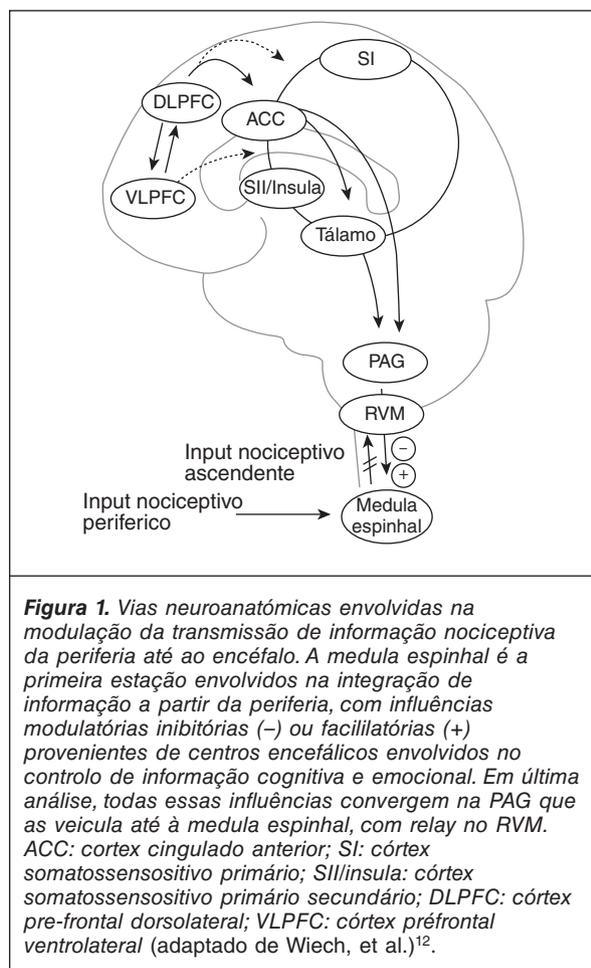
podem também ser importantes no contexto da sobrevivência, dado que a dor é um mecanismo de defesa que pode alertar para a necessidade de adotar posturas de proteção/fuga. Contudo, a desregulação do balanço entre as influências facilitatórias e inibitórias pode levar a que se instalem situações de dor crónica. Foi proposto que o aumento dos mecanismos de facilitação descendente podem contribuir para a cronificação da dor, em várias situações como a fibromialgia^{6,7}.

A descoberta do papel modulador da PAG na nociceção foi de capital importância para o entendimento dos mecanismos de controlo da dor. Está, atualmente, estabelecido que a PAG é uma zona essencial na modulação da transmissão de informação nocicetiva a partir da medula espinhal^{1,2}. A sua estimulação produz uma inibição de reflexos comportamentais nocicetivos em animais bem como dos neurónios nocicetivos no corno dorsal, efeitos que são bloqueados por lesão do funículo dorsolateral da medula espinhal^{8,9}. Existem várias zonas encefálicas envolvidas na modulação da dor que projetam para a PAG e que, por esta via, encontram uma porta de chegada à medula espinhal. Os avanços nas áreas da neuroimagem e da neurobiologia básica têm sido férteis no conhecimento de mecanismos que podem ajudar a compreender melhor a forma como a dor é controlada na PAG¹⁰. Cada vez é mais consensual que o tratamento da dor é multidisciplinar, e que as abordagens melhor sucedidas deverão ultrapassar a mera utilização de fármacos, mais usual na prática clínica corrente, e que urge a definição de novas estratégias para tratar a dor crónica¹¹.

O sistema PAG-RVM

Depois dos trabalhos pioneiros de Reynolds acima resumidos, que demonstraram que a estimulação eléctrica da PAG permitia a realização de cirurgia laparoscópica na ausência de anestésicos⁴, diversos estudos básicos aplicaram métodos mais adequados à caracterização da referida analgesia, nomeadamente biologia molecular, eletrofisiologia e testes comportamentais standardizados^{8,9}. Sabe-se que a PAG se insere num sistema complexo que recebe informação de várias zonas supra-espinhais que, através da PAG, modulam a atividade nocicetiva ao nível do corno dorsal da medula espinhal (Fig. 1). As projecções directas da PAG para o corno dorsal da medula espinhal são escassas havendo um *relay* situado numa zona específica do tronco cerebral, o bolbo ventromedial rostral (RVM). O RVM é constituído pelo núcleo magno do rafe central e pela substância reticular adjacente, que, por sua vez, tem projecções massivas para o corno dorsal da medula. Atribui-se a este sistema as acções de analgesia por factores “ambientais”, pelo efeito do placebo e por fármacos opióides e a sua contribuição para a instalação de quadros hiperalérgicos associados à inflamação, lesão de tecido nervoso e à dependência de fármacos opióides. Este sistema exerce, portanto, um controlo bidirecional (inibição e facilitação) no processamento da informação nocicetiva.

A PAG integra informação descendente, proveniente de centros encefálicos situados a níveis mais altos do neuro-eixo, com informação ascendente, proveniente



da medula espinhal (Fig. 1). Relativamente às áreas encefálicas, a PAG recebe projeções diretas e indiretas de áreas pré-frontais mediais, como a porção do córtex cingulado anterior (ACC) e a ínsula. A amígdala é, também, uma fonte importante de aferências da PAG e, por sua vez, recebe projeções de zonas implicadas na modulação da dor que não têm conexões directas com a PAG, como é o caso do *núcleo accumbens*, situado no estriado ventromedial; além desta via, o *núcleo accumbens* está conectado com a PAG através da sua projecção para o tálamo lateral que constitui, portanto, também uma fonte de aferência à PAG^{1,2,12}.

A organização citoarquitetónica e química da PAG subdivide-a em zonas funcionais distintas no que concerne à modulação da dor e a funções na dependência do sistema nervoso autónomo¹⁰. O *output* da porção ventrolateral destina-se ao RVM e ao tegmento pontínico dorso e ventrolateral. Esta porção da PAG tem aspectos anatómicos e funcionais comuns com o núcleo cuneiforme e com o tegmento pontínico dorsolateral. A porção dorsolateral da PAG projeta essencialmente para áreas envolvidas na ação do sistema nervoso autónomo.

Pela sua importância como estação de chegada de informação proveniente da PAG, importa analisar algumas das características do RVM. A estimulação elétrica ou química, da PAG produz analgesia e inibe as respostas nociceptivas dos neurónios do corno dorsal. Estas respostas são significativamente diminuídas

se se bloquear ou lesar o RVM. As projeções da PAG para o RVM são essencialmente de neurónios contendo neurotensina. Recentemente demonstrou-se que os neurónios da PAG que projetam para o RVM são alvo de ação de canabinóides, o que poderá reforçar as potenciais implicações clínicas do sistema PAG-RVM¹³. A estimulação elétrica da RVM por correntes elétricas de diferentes características pode produzir inibição ou facilitação da transmissão de estímulos nociceptivos ao nível do corno dorsal da medula¹. Este efeito, aparentemente antagónico, deve-se à existência de dois tipos de neurónios no RVM: os *on* e os *off*. Os neurónios *on* (*on cells*) disparam imediatamente antes do animal manifestar um reflexo comportamental nociceptivo, sugerindo que devem facilitar a dor. Os neurónios *off* (*off-cells*) param de disparar imediatamente antes do início do reflexo. Os neurónios *off* têm um efeito global inibitório sobre a nociceção, sendo a sua ativação suficiente para produzir analgesia comportamental. A sua ação também é necessária para a ação analgésica dos opióides. Já as células *on*, com efeito facilitador da nociceção, é possível induzir estados de hiperalgesia pela sua ativação seletiva. Quer os neurónios *on* quer os *off* enviam projeções para o corno dorsal da medula e respondem a manipulações da PAG explicando o efeito bidirecional (inibitório e facilitatório) referido acima. De referir que esta organização funcional também existe ao nível da PAG, o que sugere que os neurónios de cada classe possam funcionar como unidades globais, disparando sincronizadamente. Acredita-se que a disfunção destes neurónios possa contribuir para a cronificação da dor, dado que os neurónios *on* são mais ativos em modelos experimentais de dor, ocorrendo o inverso com os neurónios *off*⁴.

Modulação encefálica da PAG: estudos imagiológicos em humanos

Dependendo de influências dos estados cognitivo e afetivo, algumas áreas encefálicas podem exercer um controlo bidirecional (i.e., facilitatório ou inibitório), na modulação da dor. As suas ações sobre o circuito PAG-RVM, estudadas em modelos animais, poderão constituir o substrato neurobiológico que explica esse controlo. Muito do conhecimento neurobiológico atual das influências modulatórias da cognição e emoção dependem de estudos imagiológicos realizados no Homem. Estes estudos não têm ainda conseguido estudar em pormenor o circuito PAG-RVM, devido à falta de resolução das técnicas imagiológicas no que respeita ao RVM.

A atividade cognitiva é uma fonte de modulação da dor¹². A atenção é capaz de modular aspectos sensoriais e afetivos da dor. Estudos neurofisiológicos e de ressonância magnética funcional mostram alterações no padrão de ativação cerebral durante processos que alteram os níveis de atenção dos participantes, com alterações concomitantes na percepção da dor^{15,16}. Quando os participantes são distraídos do estímulo nociceptivo, por exemplo por um toque de campainha, a percepção da dor apresenta-se diminuída. Ocorre o inverso quando se pede aos participantes maior atenção para o estímulo nociceptivo. A PAG parece estar envolvida neste fenómeno, dado ocorrer um aumento da atividade da PAG em indivíduos a

quem se desvia a atenção do estímulo doloroso por comparação com os indivíduos focados no estímulo doloroso¹⁶. Estes achados revestem-se de uma enorme importância na abordagem de doentes com dor crónica dado que a hipervigilância relativamente à dor, muito frequente em casos de dor crónica, pode ter um impacto muito negativo na forma como os doentes vivem a sua dor, dado que a hipervigilância aumenta a dor. Foi proposto que o AAC modula a atividade da PAG, ativando um controlo descendente inibitório nos casos em que se consegue potenciar a distração. Um bom exemplo de como o contexto modula a percepção da dor é a analgesia pelo placebo. Pensa-se que o placebo medeia a ativação dos centros encefálicos superiores, como o AAC, que ativa a PAG¹⁷. Estes resultados retirados de estudos imagiológicos têm vindo a fundamentar o desenvolvimento de técnicas terapêuticas cognitivo-comportamentais em situações de dor intratável por fármacos clássicos. Assim sendo, começam a mostrar-se interessantes estudos sobre como o *biofeedback* pode ajudar indivíduos que sofrem de dor crónica, bem como indivíduos saudáveis, a auto-controlar a magnitude da sua dor, registando, através de técnicas de ressonância magnética funcional em tempo real, as regiões encefálicas ativadas e definindo para cada doente com dor crónica a forma de induzir analgesia¹⁸.

Um outro aspecto de modulação da dor diz respeito ao estado emocional e afetivo. Para quem sofre de dor crónica, o estado emocional tem um impacto significativo na forma como se percebe a dor. O conhecimento empírico de que as emoções desagradáveis potenciam a dor, tem agora uma explicação neurobiológica. Demonstrou-se que emoções desagradáveis podem desencadear inibição descendente, através da alteração da atividade modulatória da PAG. Quando se mostram imagens com conteúdo potencialmente agradável a indivíduos sujeitos a estimulação dolorosa verifica-se que há menor percepção da dor e menor atividade do AAC e da PAG¹⁹. O inverso ocorre em relação às imagens com conteúdo «desagradável». A antecipação da dor e a ansiedade perante a possibilidade de virmos a ser confrontados com a dor, pode exacerbar as queixas dos doentes. Em situações agudas, estes comportamentos podem ter função adaptativa, na medida em que nos levam a evitar situações prejudiciais. Contudo, em situações de dor crónica, a ansiedade é disfuncional dado que exacerba a própria dor por diminuir a modulação descendente inibitória mediada pela PAG.

A depressão acompanha frequentemente casos de dor crónica. Ambas têm por base processos de neuroplasticidade central, sendo difícil extrair do seu estudo informação relativa a componentes clínicos da dor. A catastrofização é caracterizada como um estado psicológico negativo que inclui amplificação da percepção da dor ou sintomas relacionados, pensamentos recorrentes sobre dor, sentimento de desesperança e pessimismo relativamente a formas de tratamento e desfecho de situações dolorosas²⁰. Um estudo de doentes com fibromialgia revelou que, independentemente da influência da depressão, a catastrofização leva à ativação de regiões cerebrais envolvidas na

antecipação da dor (córtex frontal medial, cerebelo), atenção à dor (córtex cingulado posterior e córtex pré-frontal dorsolateral), aspectos emocionais da dor (claustró, intimamente conectado com a amígdala) e controlo motor². Esta condição influencia a percepção dolorosa sobretudo através da modificação do estado de vigilância, antecipação e maximização de respostas emocionais à dor. Foi recentemente demonstrado um envolvimento da PAG em situações de fibromialgia dado que o seu padrão de resposta, detetado por estudos imagiológicos, é diferente em doentes com fibromialgia, por comparação com indivíduos saudáveis²¹.

Modulação da PAG: estudos em modelos animais

Os estudos neurobiológicos em modelos animais têm a enorme vantagem de permitirem conhecer aspectos importantes na modulação descendente oriunda da PAG, como neurotransmissores/recetores envolvidos e atividade neuronal, aspectos obviamente impossíveis de alcançar nos estudos clínicos. A título de exemplo, a administração de opióides a nível supra-espinhal ativa vias descendentes de modulação nociceptiva, dado a morfina e outros agonistas dos recetores opióides do tipo m produzem hiperpolarização pós-sináptica direta de sub-populações de neurónios da PAG que esta tem neurónios com os quatro tipos de recetores opióides: μ , κ , δ e ORL1. O receptor ORL-1 interfere com o efeito analgésico dos recetores μ por administração sistémica ou directamente na PAG e com a hiperalgesia associada à privação aguda de opióides^{22,23}. Resumidamente, a administração sistémica de opióides leva à ativação das células *off* do RVM e à inativação das células *on* do RVM, não tendo efeito sobre as células neutras na RVM. Aquando da microinjecção de morfina no RVM ocorre apenas inibição das células *on*, sugerindo que a ativação das células *off* é feita de forma indireta, por inibição de um provável *input* inibitório sobre elas. Verifica-se uma ação idêntica por parte dos opióides endógenos. Esta ação indireta sobre as *off cells* é suficiente para produzir o efeito analgésico na dor aguda, uma vez que o bloqueio do processo de ativação destas células bloqueia igualmente o efeito analgésico dos opióides, aliado ao facto que a inibição das *on-cells* não é suficiente para a obtenção do efeito analgésico em condições normais, podendo, contudo, complementar e reforçar o efeito da ativação das *off-cells*. No entanto, a inativação das *on-cells* tem um efeito antinociceptivo significativo em estados hiperálgicos, como a inflamação ou a síndrome de privação de opióides. Não existe um conhecimento tão pronunciado no que diz respeito à ação dos recetores opióides μ sabe-se que a sua ativação tem o mesmo efeito que a ativação dos recetores μ , embora com menor intensidade e que os seus efeitos são potenciados na presença de inflamação tecidual. A baixa intensidade do efeito analgésico mediado por estes recetores deve-se à sua localização intracelular em situações normais. Em modelos de dor crónica (inflamatória e neuropática) pode ocorrer translocação dos recetores opióides do tipo μ para a superfície das membranas

celulares neuronais, havendo potenciação da participação dos recetores em processos de modulação da dor. Tal não significa que se possa produzir analgesia dado que também se verificou que após tratamento prolongado com morfina que induz hiperalgesia. Torna-se importante entender os mecanismos envolvidos na indução do tráfego dos recetores opióides para a membrana citoplasmática dos neurónios.

Além dos opióides, outros fármacos têm acção na inibição da actividade de neurónios da PAG e na forma como os neurónios da PAG controlam a actividade de neurónios do RVM, nomeadamente a substância P, antagonistas de receptores canabinóides (CB1) e de recetores da serotonina do tipo 1²⁴. A gabapentina, fármaco frequentemente usado no tratamento da dor, inibe o aumento da actividade de neurónios da PAG em modelos de neuropatia diabética²⁵, indicando que a actividade analgésica deste fármaco se deve alteração de capacidade de modulação descendente da PAG. Este último estudo pode ter repercussões clínicas dado que também se associou a actividade analgésica da gabapentina com diminuição da actividade da PAG em estudos imagiológicos realizados em animais de laboratório²⁶.

Conclusões e perspectivas futuras

O papel crucial da PAG na modulação encefálica da dor encontra-se demonstrado. Este trabalho pretendeu discutir alguns achados relativos a um sistema supraspinal complexo de circuitos neuronais moduladores da transmissão nocicetiva, que utiliza a PAG como principal região integradora. Ao aumentar a sua capacidade de resolução espacial, as técnicas imagiológicas têm recentemente demonstrado a forma como a PAG modula a percepção da dor tendo em atenção diversos parâmetros, como a hipervigilância, ansiedade, depressão, e catastrofização. Os avanços recentes nas técnicas de imagiologia de alta definição têm sido capazes de demonstrar cientificamente que é possível modular a dor de uma forma personalizada, tendo por base o controlo de aspectos emocionais e cognitivos. Por outro lado, os modelos animais usados para estudar a dor têm sido bastantes produtivos no que respeita ao entendimento dos neurotransmissores, recetores e circuitos sinápticos envolvidos na modulação da actividade da PAG. O conhecimento dos mecanismos de modulação facilitatória e inibitória e a sua desregulação em modelos animais de dor crónica destaca-se como um dos aspectos mais marcantes do conhecimento do estudo da neurobiologia da dor nos últimos anos. Contudo, os modelos animais de dor têm características próprias e estudam de modo muito objetivo o efeito da aplicação de estímulos nocicetivos. Um dos grandes desafios do estudo da dor a nível básico nos próximos anos será desenvolver métodos que tenham em conta as respostas do animal à dor espontânea ou que considerem aspectos afetivos e cognitivos do animal e estudem estes efeitos na função da PAG na modulação da dor. Importa, cada vez mais estabelecer protocolos de estudo da dor e da sua modulação a partir da PAG que envolvam neurobiologistas básicos e

investigadores clínicos. Há diversos achados em Humanos que levam a repensar a forma como a comunicação entre a investigação básica e clínica se deve fazer.

Bibliografia

1. Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev.* 2009;60(1):214-25.
2. Tracey IMantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron.* 2007;55:377-91.
3. Millan MJ. Descending control of pain. *Prog Neurobiol.* 2002;66(6):355-474.
4. Reynolds DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science.* 1969; 154.: 444-5.
5. Bittar RG, Kar-Purkayastha I, Owen SL, et al. Deep brain stimulation for pain relief: a meta-analysis. *J Clin Neurosci.* 2005;12:515-9.
6. Ossipov MH, Porreca F. Descending excitatory systems. In: Cervero F, Jensen TS, editors. *Handbook of Clinical Neurology*, 81 (3rd series) Pain. pp. 193-210.
7. Almeida A, Leite-Almeida H, Tavares I. Medullary control of nociceptive transmission: reciprocal dual communication with the spinal cord. *Pain.* 2006; 3(3):305-12.
8. Lieberskind JC, Guilbaud G, Besson JM, Oliveras JL. Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal grey matter in the cat: behavioural observations and inhibitory effects on spinal cord interneurons. *Brain Res.* 1973;50:441-6.
9. Mayer DJ, Woolfe TL, Akil H, Carder B, Liebeskind JC. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. *Science.* 1971;174:1351-4.
10. Linnman C, Moulton EA, Barmettler G, Becerra L, Borsook D. Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. *Neuroimage.* 2012;60(1):505-22.
11. Tavares I, Lima D. From neuroanatomy to gene therapy: searching for new ways to manipulate supraspinal endogenous pain modulatory system. *J. Anat.* 2007;211:261-8.
12. Wiech K, Ploner M, Tracey I. Neurocognitive aspects of pain perception. *Trends in Cognitive Sciences.* 2008;12:8.
13. Palazzo E, Luongo L, de Novellis V, Rossi F, Marabese I, Maione S. Transient receptor potential vanilloid type 1 and pain development. *Curr Opin Pharmacol.* 2012;12(1):9-17.
14. Silva M, Amorim D, Almeida A, Tavares I, Pinto-Ribeiro F, Morgado C. Pronociceptive changes in the activity of rostroventromedial medulla (RVM) pain modulatory cells in the streptozotocin-diabetic rat. *Brain Res Bull.* 2013;96:39-44.
15. Fairhurst M, Wiech K, Dunckley P, Tracey I. Anticipatory brainstem activity predicts neural processing of pain in humans. *Pain.* 2007;128:101-10.
16. Rudy J, Williams AE, McCabe KM, Rambo PL, Russel JL. Emotional modulation of spinal nociception and pain: the impact of predictable noxious stimulation. *Pain.* 2006; 126:221-33.
17. Benedetti F. Placebo and the new physiology of the doctor-patient relationship. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1207-46.
18. Jensen KB, Berna C, Loggia ML, Wasan AD, Edwards RR, Gollub RL. The use of functional neuroimaging to evaluate psychological and other non-pharmacological treatments for clinical pain. *Neurosci Lett.* 2012;29;520(2):156-64.
19. Ianadetti GD, Zambreanu L, Wise RG, Buchanan TJ, Huggins JP, Smart TS, Vennart W, Tracey I. Pharmacological modulation of pain-related brain activity during normal and central sensitization states in human. *PNAS.* 2005;102:18195-200.
20. Rudy J, Maynard LJ, Russell JL. Does in vivo catastrophizing engage descending modulation of spinal nociception? *The journal of pain.* 2007;8(4):325-33.
21. Cifre I, Sitges C, Fraiman D, et al. Disrupted functional connectivity of the pain network in fibromyalgia. *Psychosom Med.* 2012;74(1):55-62.
22. Bie B, Pan ZZ. Trafficking of central opioids receptors and descending pain inhibition. *Molecular pain.* 2007;3:37.
23. Mason P. Deconstructing endogenous pain modulations. *J Neurophysiol.* 2005;94(3):1659-63.
24. Drew GM, Lau BK, Vaughan CW. Substance P drives endocannabinoid-mediated disinhibition in a midbrain descending analgesic pathway. *J Neurosci.* 2009;29(22):7220-9.
25. Morgado C, Terra PP, Tavares I. Neuronal hyperactivity at the spinal cord and periaqueductal grey during painful diabetic neuropathy: effects of gabapentin. *Eur J Pain.* 2010;14(7):693-9.
26. Governo RJ, Morris PG, Marsden CA, Chapman V. Gabapentin evoked changes in functional activity in nociceptive regions in the brain of the anaesthetized rat: an fMRI study. *Br J Pharmacol.* 2008;153(7):1558-67.

Regulação do Sistema Noradrenérgico na Dor Crónica: Papel do *Locus Coeruleus* na Inflamação Articular e no Desenvolvimento de Transtornos Afetivo-Emocionais

Gisela Borges^{1,2,3,4}, Cristina Miguelez^{5,6}, Luisa Ugedo⁵, Juan Antonio Micó^{1,7}, Esther Berrocoso^{7,8} e Fani Neto^{2,3,4}

Resumo

A depressão e a ansiedade podem surgir como consequência da manifestação de dor severa, podendo ter repercussão não só no estado psicológico do doente, mas também potenciando os efeitos negativos da dor crónica. No entanto, os mecanismos subjacentes à associação da dor com o desenvolvimento de sintomas de ansiedade e depressão são praticamente desconhecidos. O núcleo *Locus coeruleus* (LC) representa um importante candidato na mediação destes mecanismos, uma vez que está implicado nos circuitos neuronais subjacentes à dor crónica e apresenta um papel excecional na regulação da ansiedade e depressão.

Nesta revisão, serão descritos alguns dos trabalhos realizados pelos autores e os principais resultados obtidos com recurso a técnicas comportamentais de avaliação de dor, ansiedade e depressão, complementadas com registos eletrofisiológicos e análise por imunohistoquímica e *western blot*.

O presente trabalho permitiu concluir que o LC está envolvido no aumento da perceção ao estímulo nóxico e aparecimento de ansiedade associada a condições dolorosas, e que a cascata de sinalização mediada por ativação de cinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK_{1/2}) parece estar implicada neste papel do LC.

Palavras-chave: *Locus coeruleus*. ERK_{1/2}. Nociceção. Ansiedade. Depressão. Monoartrite. Fator libertador de corticotropina (CRF).

Abstract

Depression and anxiety may emerge as a consequence of severe and intractable pain, having repercussions not only in the psychological state of the individual, but also potentiating the negative effects of chronic pain. However, the mechanisms underlying the association of pain with the development of symptoms of anxiety and depression are mostly unknown. The *Locus coeruleus* (LC) nucleus represents an important candidate in mediating these mechanisms since it is implicated in the neuronal circuits underlying chronic pain and it has an exceptional role in the regulation of anxiety and depression. In this review we will describe some of the studies and respective data obtained by the authors, by using behavioural assessment to evaluate pain,

¹Neuropsychopharmacology and Psychobiology Research Group University of Cádiz, Spain

²Departamento de Biologia Experimental Centro de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal

³Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC) Porto, Portugal

⁴Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S) Universidade do Porto, Portugal

⁵Department of Pharmacology Faculty of Medicine and Dentistry

University of the Basque Country UPV/EHU Leioa, Spain

⁶Department of Pharmacology Pharmacy Faculty University of the Basque Country UPV/EHU Vitoria-Gasteiz, Spain

⁷Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM) Madrid, Spain

⁸Neuropsychopharmacology and Psychobiology Research Group Department of Psychology University of Cádiz, Spain
E-mail: gisela@med.up.pt

anxiety, and depression complemented by electrophysiological recordings, immunohistochemistry, and western blot analysis.

The present study allowed to conclude that LC is involved in the increased perception of the noxious stimulus and in the onset of anxiety associated to painful conditions, and that the signalling cascade mediated by extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK_{1/2}) appears to be implicated in this role of LC. (Dor. 2014;22(4):25-35)

Corresponding author: Gisela Borges, gisela@med.up.pt

Key words: *Locus coeruleus*. ERK_{1/2}. Nociception. Anxiety. Depression. Monoarthritis. Corticotropin-releasing factor (CRF).

Introdução

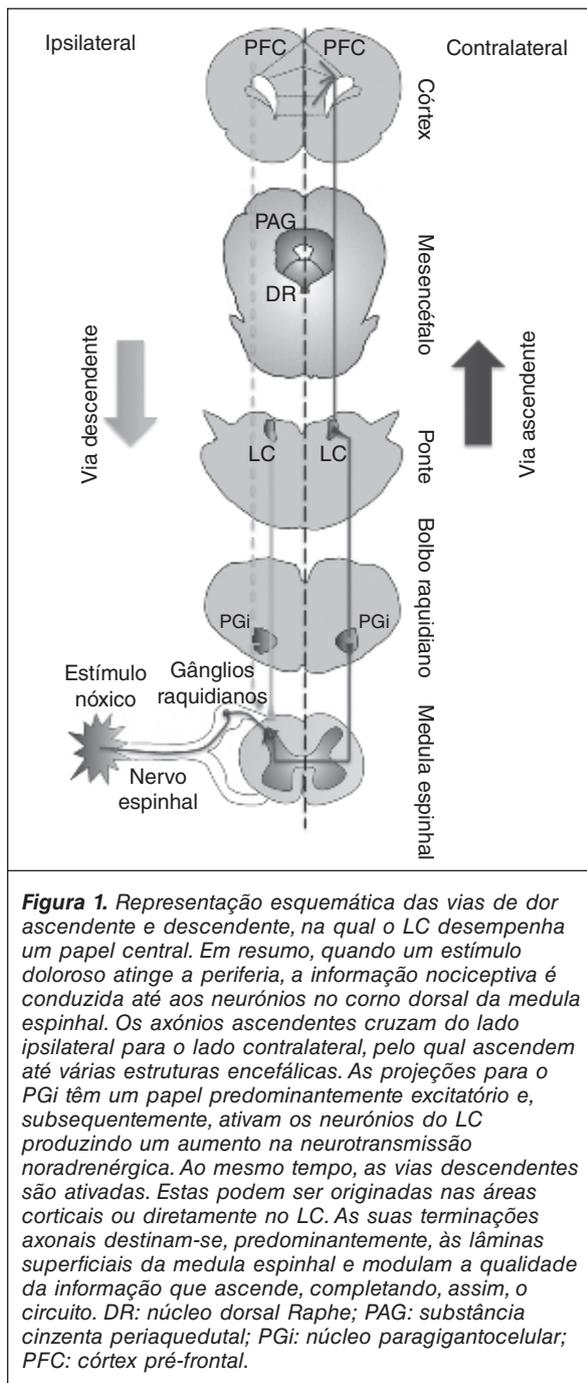
A dor crónica é considerada uma doença debilitante com uma componente afetiva relevante. De facto, uma significativa proporção de doentes diagnosticados com dor crónica em Portugal padece de algum tipo de transtorno afetivo (por ex., transtornos ansio-depressivos)¹. O desenvolvimento destes sintomas deve ser cuidadosamente monitorizado pelo profissional de saúde, uma vez que estes estão diretamente relacionados com um agravamento do quadro clínico do doente. No entanto, embora a relação dor crónica-ansiedade-depressão seja reconhecida e evidente na prática clínica, os mecanismos moleculares e celulares a ela associados só agora começam a ser desvendados. Neste contexto, o sistema noradrenérgico assume um papel crucial devido à modulação que exerce nas vias ascendentes e descendentes da dor, e às suas projeções para o córtex pré-frontal (PFC), uma estrutura de excelência na regulação da componente emotiva associada a experiências dolorosas (Fig. 1).

O presente trabalho assenta, essencialmente, na descrição e discussão dos resultados obtidos num conjunto de estudos realizados para avaliar a atividade do núcleo LC, a estrutura mais importante no sistema noradrenérgico, e investigar os mecanismos subjacentes à manifestação de comportamentos de ansiedade e/ou depressão associados a condições de dor crónica inflamatória.

Nociceção e desenvolvimento de ansiedade e depressão no modelo da monoartrite

O modelo da monoartrite, descrito por Butler, et al. (1992), foi usado para mimetizar condições de inflamação crónica articular, nomeadamente a artrite reumatoide². De acordo com o que tem sido descrito neste modelo, a injeção unilateral de uma solução de adjuvante completo de Freund (CFA) na articulação tibiotársica de ratos macho adultos da estirpe *Sprague-Dawley* resultou numa inflamação consistente e evidente, acompanhada por um aumento da sensibilidade a estímulos inócuos e nócicos (alodínia e hiperalgesia, respetivamente) na região articular e adjacente. A inflamação induzida desta forma permaneceu estável durante todo o período de experimentação que teve a duração máxima de quatro semanas³.

Apesar de ser reconhecida a emergência de sinais ansio-depressivos em doentes diagnosticados com algum tipo de condição de dor crónica inflamatória⁴, em alguns modelos animais, ainda não era clara esta relação causal. Assim, procedeu-se à avaliação do padrão temporal do desenvolvimento da ansiedade e depressão no modelo da monoartrite usando, para tal, paradigmas comportamentais bem conhecidos. Duas semanas (14 dias) após a inoculação da solução de CFA na articulação, os animais exibiram comportamentos típicos de ansiedade no teste do enterro dos berlindes (MBT). No entanto, quatro semanas (28 dias) após a indução do modelo, os animais não só exibiram comportamentos típicos de ansiedade, observados tanto pelo teste MBT como pelo teste do labirinto elevado em forma de zero (EZM), mas também manifestaram comportamentos típicos de depressão, observados pelo teste da natação forçada (FST)³. O MBT consiste na avaliação da quantidade de berlindes que os animais escondem com o material usado como cama nas suas gaiolas, em resposta a estímulos não repulsivos mas desconhecidos, sendo uma maior grandeza deste número indicativa de estados mais ansiosos⁵. Alguns autores, no entanto, argumentam que esta atitude por parte dos animais pode refletir um comportamento repetitivo e preservador (obsessivo-compulsivo) em vez de ansiedade desencadeada pela novidade⁶. O teste EZM avalia o tempo que o animal despense em quadrantes fechados em comparação com o tempo passado em quadrantes abertos de uma plataforma elevada em forma de zero⁷. Baseia-se no facto de os animais exibirem um conflito comportamental entre explorarem novas áreas ou ficarem em regiões fechadas e seguras, onde eles se sentem mais confortáveis e, por isso, menos ansiosos do que quando expostos a ambientes abertos e elevados. Neste caso, um aumento na quantidade de tempo que os animais ficam nas áreas fechadas é correlacionado com um comportamento indicativo de ansiedade⁷. O FST é usado para avaliar comportamentos de depressão nos roedores, e consiste na colocação dos animais em tinas cilíndricas com água tépida numa sessão pré-teste, para lhes induzir um estado depressivo⁸. Baseia-se na constatação de que os roedores realizam comportamentos dinâmicos de fuga quando confinados a espaços limitados. Quando percebem que é impossível



escaparem, adotam uma postura imóvel, realizando somente os movimentos necessários e suficientes para se manterem à tona de água. Assim, 24 horas depois da sessão pré-teste, os animais são expostos novamente ao mesmo procedimento e é quantificado o tempo que eles despendem a nadar (*swimming*), tentar trepar o cilindro (*climbing*) ou imóveis (*immobility*)⁸. Períodos longos de imobilidade são indicativos de comportamentos de depressão, enquanto alterações nos tempos gastos a trepar ou nadar têm sido relacionados com alterações na biodisponibilidade de noradrenalina ou serotonina, respetivamente^{8,9}.

A detecção precoce de ansiedade pelo MBT aponta para um comportamento anormal dos animais com 14 dias de monoartrite, embora este não tenha sido detetável pelo teste EZM, e ainda subsistam algumas questões relacionadas com a validade do MBT para avaliar ansiedade, como acima discutido. Os sintomas de ansiedade precederam o aparecimento de depressão, que só foi detetada 28 dias após a indução do modelo, o que sugere a existência de uma certa cascata cronológica de eventos já descrita por outros autores¹⁰. Além disso, o desenvolvimento de comportamentos típicos de ansiedade e depressão no modelo baseado na injeção intra-articular de CFA já foi descrito em ratinhos^{11,12} e ratos^{13,14}. A presença deste tipo de comportamentos também já foi demonstrada noutros modelos de inflamação persistente ou dor neuropática^{15,16,17}. Isto sugere que a existência de condições dolorosas severas, independentemente da sua etiologia, desencadeia alterações com repercussão na componente afetiva da dor, embora algumas diferenças possam ser identificadas, de acordo com o modelo, no padrão temporal de desenvolvimento da ansiedade e depressão.

Papel do Locus coeruleus, suas aferências e projeções

Para estudar o possível envolvimento do sistema LC-noradrenérgico e alguns dos mecanismos moleculares associados às alterações comportamentais induzidas pelo modelo da monoartrite, foi quantificada a expressão de cinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 fosforiladas (pERK_{1/2}), que consistem na forma ativa de ERK_{1/2}. A imunodeteção destas proteínas cinases ativadas (Fig. 2) é, muitas vezes, usada como marcador de ativação celular e plasticidade. No contexto do presente trabalho, as ERK_{1/2} representam um dos melhores alvos de estudo devido à sua implicação nos mecanismos da dor e da sua componente afetiva¹⁸.

Aos quatro e 14 dias após a indução do modelo da monoartrite, não foram detetadas diferenças significativas no padrão de expressão de pERK_{1/2} no LC. No entanto, 28 dias após a indução do modelo foi observado um aumento significativo na densidade de marcação para as pERK_{1/2}³. Estes resultados são bastante interessantes, tendo em conta que pontos temporais iniciais do desenvolvimento da monoartrite não exibem um fenótipo ansio-depressivo. De facto, o aumento significativo dos níveis de expressão de pERK_{1/2} no LC, no grupo experimental de 28 dias de monoartrite, pode sugerir que a exagerada ativação desta cascata de sinalização, em condições de dor crónica inflamatória, está na origem do desenvolvimento de comportamentos de ansiedade e depressão. Para além do LC, também explorámos os níveis de ativação de ERK_{1/2} noutras áreas do sistema nervoso central (SNC) que formam uma via ascendente juntamente com o LC, nomeadamente a medula espinhal, o núcleo paragigantocelular (PGi), que envia projeções excitatórias para o LC, e o PFC que é a mais importante estrutura de projeção do LC^{19,20} (Fig. 1). No PGi e no PFC, observou-se um aumento significativo da

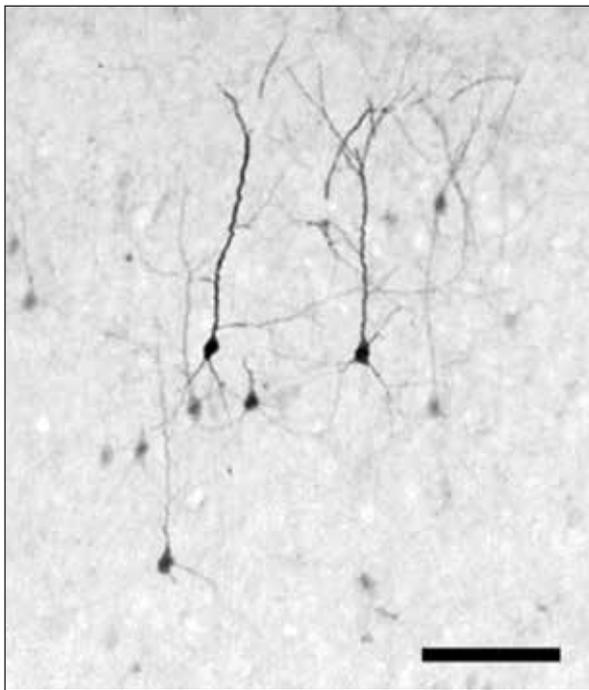


Figura 2. Fotomicrografia mostrando o detalhe da expressão de pERK_{1/2} nos neurónios piramidais do córtex pré-frontal. Escala: 100 μ m. (adaptado de Borges, et al.)¹⁶.

expressão de pERK_{1/2}, no grupo experimental de 28 dias, após a indução do modelo da monoartrite³. No caso particular do PFC, o resultado obtido foi, de certa forma, esperado, uma vez que este inclui a parte mais rostral do córtex cingulado anterior (ACC)^{21,22}. De facto, já foi demonstrado o papel do ACC na regulação da resposta afetiva e emocional à dor^{23,24}, bem como que a ativação de ERK_{1/2} no ACC contribui de forma relevante para a manifestação da componente afetiva da dor²⁵. Corroborando este facto, em estudos subsequentes observámos também que a microinjeção no LC de um composto inibidor da ativação de ERK_{1/2} (SL327) reverteu o comportamento típico de ansiedade presente nos animais com 28 dias de monoartrite e, ao mesmo tempo, restaurou para valores normais os níveis de ativação de ERK_{1/2} no ACC (Borges, et al., 2015, em processo de submissão). Desta forma, foi possível concluir que a ativação de ERK_{1/2} na via formada pelo PGI-LC-PFC está implicada na sinalização de eventos relacionados com o aparecimento de comportamentos ansio-depressivos, em animais submetidos a condições de dor inflamatória crónica.

No que se refere ao padrão de ativação de ERK_{1/2} na medula espinhal em pontos temporais de monoartrite distintos, já foi demonstrado que quatro, sete e 14 dias após administração intra-articular de CFA, a expressão destas cinases ocorre, maioritariamente, quando se aplica uma estimulação dolorosa (inócua para animais controlo)²⁶. De forma similar, nos nossos estudos de *western blot*, também observámos que os quatro dias de monoartrite não foram acompanhados

por um aumento significativo da expressão de pERK_{1/2}, na região lombar da medula espinhal³. No entanto, ao contrário do que foi verificado por nós e noutros estudos anteriores^{26,27}, alguns autores observaram um aumento significativo na expressão de pERK_{1/2} às 96 horas (quatro dias) após a administração de CFA²⁸. No ponto temporal de 14 dias após a indução do modelo da monoartrite, os nossos resultados não estão de acordo com o que foi demonstrado pelos estudos realizados por Cruz, et al. (2005), isto é, observámos um aumento significativo da expressão de pERK_{1/2} nos animais monoartríticos, sem necessidade de recorrer à estimulação nóxica³. Tal poderá dever-se ao diferente procedimento usado para a quantificação dos níveis de pERK_{1/2}. No estudo de Cruz, et al. (2005), foram usadas técnicas de imunohistoquímica e foi quantificado o número de células imunorreativas a pERK_{1/2} por corte e por região da substância cinzenta da medula espinhal, em animais que foram anestesiados com pentobarbital sódico. Pelo contrário, no nosso estudo, a quantificação dos níveis expressão de pERK_{1/2} foi feita através da técnica de *western blot*, e separando apenas o lado ipsilateral do contralateral da região lombar da medula espinhal correspondente aos segmentos de L3 a L6, que são os mais implicados no processamento da transmissão dolorosa com origem nas patas traseiras²⁹. Assim, embora alguma da informação existente em relação à expressão de ERK_{1/2} em condições de dor crónica seja contraditória, é inquestionável que aponta para a implicação desta cascata de sinalização no processamento da dor que ocorre nos variados níveis do CNS.

O efeito da aplicação tópica de diclofenaco

O passo seguinte consistiu em avaliar se as alterações comportamentais e bioquímicas descritas seriam, efetivamente, uma consequência da exposição, a longo-prazo, a estímulos nociceptivos originados na pata inflamada. Assim, foi adotada uma estratégia de bloqueio destes estímulos usando, para tal, a aplicação tópica de um potente anti-inflamatório à base de diclofenaco, disponível comercialmente como Voltaren® emulgel. A aplicação tópica foi escolhida de forma a não só evitar os já conhecidos efeitos secundários da administração oral destes fármacos e a tensão (nos animais) associada à injeção intraperitoneal diária, como também para produzir um efeito analgésico local, minimizando um possível efeito sistémico. Como esperado, os sinais inflamatórios (edema, Fig. 3C) e a sensibilidade a estímulos inócuos e nóxicos presente nos animais monoartríticos foram significativamente reduzidos para níveis controlo³. Similar efeito analgésico foi obtido por outros autores que usaram, igualmente, a administração tópica de diclofenaco^{30,31}. Para além disso, nas condições de analgesia produzida pelo diclofenaco, os comportamentos típicos de ansiedade e depressão deixaram de ser observados (Fig. 3A e 3B) nos animais submetidos a quatro semanas de monoartrite e os níveis elevados de fosforilação de ERK_{1/2}, que tinham sido observados na medula espinhal, PGI, LC e PFC dos animais com

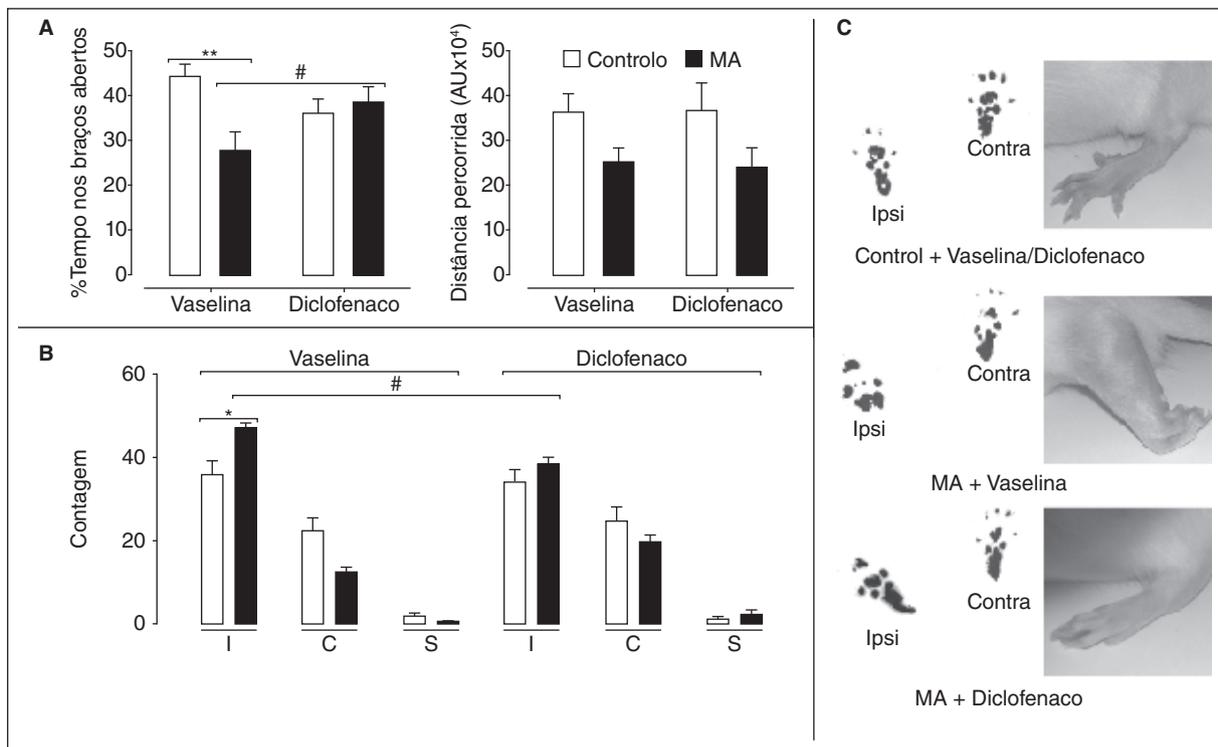


Figura 3. Efeito da aplicação tópica de diclofenaco na pata ipsilateral, nos comportamentos de ansiedade e depressão induzidos pela monoartrite (MA) crônica. **A:** O tratamento com diclofenaco aboliu o comportamento típico de ansiedade nos animais monoartríticos, verificado pelo aumento significativo do tempo passado nos braços abertos do labirinto elevado em forma de zero. Não foram encontradas diferenças entre grupos experimentais na distância total percorrida. **B:** A aplicação tópica de diclofenaco também foi capaz de eliminar o comportamento depressivo observado nos animais monoartríticos, verificado pela redução significativa do tempo de imobilidade no teste da natação forçada. **C:** Fotos da pata ipsilateral de cada grupo experimental demonstrando uma clara melhoria da postura de guarda nos animais monoartríticos tratados com diclofenaco (Ipsi: pata ipsilateral; Contra: pata contralateral). É de realçar a diferença na posição da pata nos animais que receberam vaselina como controlo da administração relativamente aos animais que receberam o tratamento com diclofenaco. Todos os valores representam a média \pm erro padrão da média (SEM): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ MA versus controlos correspondentes; # $p < 0,05$, MA + vaselina versus MA + diclofenaco, ANOVA de duas vias seguido de Student-Neuman-Keuls. AU: unidades arbitrárias (adaptado de Borges, et al.)³.

quatro semanas de monoartrite e sem diclofenaco, foram também revertidos para níveis quase normais (Fig. 4)³. Estes resultados sugerem que os comportamentos ansio-depressivos foram, de facto, despoletados pela existência de um afluxo doloroso contínuo, originado na pata inflamada. Quando se procedeu ao bloqueio deste afluxo doloroso, os comportamentos associados também sofreram uma melhoria. Resultados similares foram obtidos num estudo de Amorim, et al. (2014), usando um modelo de monoartrite induzido por injeção intra-articular de carragenina e caolina¹⁶. De facto, estes autores demonstraram que, quatro semanas após a indução da condição artrítica, os animais apresentavam um fenótipo de ansiedade e depressão, e que o tratamento com amitriptilina, um antidepressivo tricíclico muito usado para o tratamento da dor crónica³², reverteu a hiperalgesia e o efeito anedónico (um sintoma típico de ansiedade), ambos observados nos animais submetidos ao modelo da monoartrite¹⁶. Para além disto, foi também demonstrado que o tratamento com tramadol, um potente composto analgésico, foi capaz de reverter a alodínia mecânica e o fenótipo ansio-depressivo observado

em animais submetidos ao modelo neuropático da constrição crónica do nervo ciático (CCI)¹⁷. Todos estes estudos sugerem que fármacos suscetíveis de aliviar a dor também favorecem a melhoria das consequências e comorbilidades associadas à dor crónica. Nos nossos estudos, para além de um promissor efeito comportamental, também observámos que os níveis de expressão de pERK_{1/2} na medula espinhal e no eixo PGI-LC-PFC foram, igualmente, revertidos para níveis controlo³. Isto sugere a existência de uma correlação funcional direta entre a ativação desta cascata de sinalização e os comportamentos indicativos de dor, de ansiedade e de depressão. De facto, embora um pequeno efeito sistémico possa ser reconhecido na estratégia de administração tópica adotada nos nossos estudos, o efeito observado nas estruturas encefálicas estudadas são consequência direta do bloqueio da informação nociceptiva originada na pata inflamada. Em resumo, estes resultados permitem concluir que uma condição crónica inflamatória é capaz de gerar quadros de ansiedade e de depressão que são acompanhados por um aumento na ativação da cascata ERK_{1/2} no LC e nas suas principais conexões.

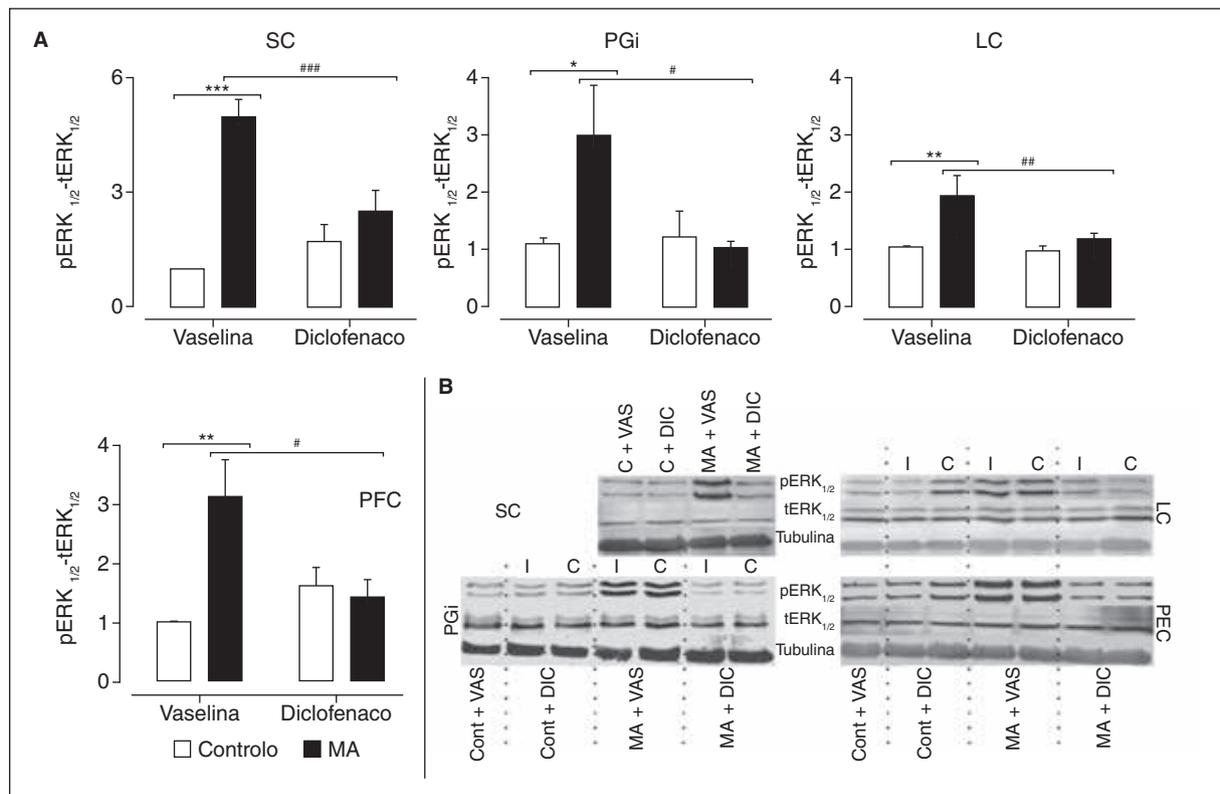


Figura 4. Efeito da aplicação tópica de diclofenaco na pata ipsilateral na expressão de pERK_{1/2} na via formada pela medula espinhal (SC), PGI, LC e PFC. **A:** Representação gráfica das alterações no padrão de expressão de pERK_{1/2} em resposta à MA. A aplicação de diclofenaco reduziu significativamente os níveis de pERK_{1/2} no lado ipsilateral da medula espinhal, e reverteu o aumento de pERK_{1/2} observado no PGI, LC e PFC. **B:** Imagens representativas das bandas para pERK_{1/2} (44-42 kDa), tERK_{1/2} (44-42 kDa) e tubulina (50 kDa), para cada grupo experimental, em cada estrutura. Todos os valores representam a média ± SEM: **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001 MA versus controles correspondentes; #*p* < 0,05, ##*p* < 0,01, ###*p* < 0,001, MA + vaselina versus MA + diclofenaco, ANOVA de duas vias seguido de Student-Neuman-Keuls. C: contralateral; I: ipsilateral (adaptado de Borges, et al.)³.

Por outro lado, também permitem concluir que o eficiente bloqueio da inflamação (e da dor a ela associada) é suficiente para reverter todas as suas consequências³.

Alterações eletrofisiológicas nos neurónios do locus coeruleus

Embora a quantificação da expressão de pERK_{1/2} seja uma metodologia frequentemente usada para avaliar o grau de ativação de determinadas estruturas encefálicas em condições experimentais específicas, esta não permite ampliar a compreensão dos mecanismos implicados e, também, no caso particular do LC, não permite a interpretação dos seus principais modos de atividade tónica e fásica. Para ultrapassar esta barreira, recorreremos ao uso de técnicas de eletrofisiologia para avaliar os neurónios do LC em condições de dor crónica inflamatória. Desta forma, foi possível avaliar, não só as características de descarga basais dos neurónios do LC, como também os seus parâmetros eletrofisiológicos, após a aplicação de subsequentes estímulos nócicos na pata inflamada (pata ipsilateral). Para tal, foram usados grupos experimentais de animais com uma semana

de monoartrite (que não apresentam fenótipo ansio-depressivo), e grupos experimentais de animais com quatro semanas de monoartrite (que apresentam fenótipo ansio-depressivo). Os resultados obtidos demonstram que as condições de monoartrite prolongada são suscetíveis a alterações eletrofisiológicas profundas, tanto na atividade tónica como na atividade fásica dos neurónios do LC. De facto, enquanto a atividade tónica diminuiu significativamente no ponto temporal de quatro semanas após a indução da monoartrite, a atividade fásica (evocada pela aplicação de uma sequência de estímulos nócicos) aumentou exageradamente (Fig. 5A). Para além disso, a incidência da atividade espontânea em disparo (*burst*) também foi reduzida nos animais monoartríticos de uma semana e de quatro semanas, embora esta redução não tenha sido significativa (Borges et al, 2015 em processo de submissão). Estes resultados sugerem uma diminuição na atividade espontânea dos neurónios do LC em condições de monoartrite prolongada. Corroborando isto, foram detetados aumentos significativos na expressão da enzima hidrolase da tirosina (TH, a enzima limitante na síntese de noradrenalina), nos grupos de animais com quatro semanas de monoartrite, indicativos de uma desregulação no sistema

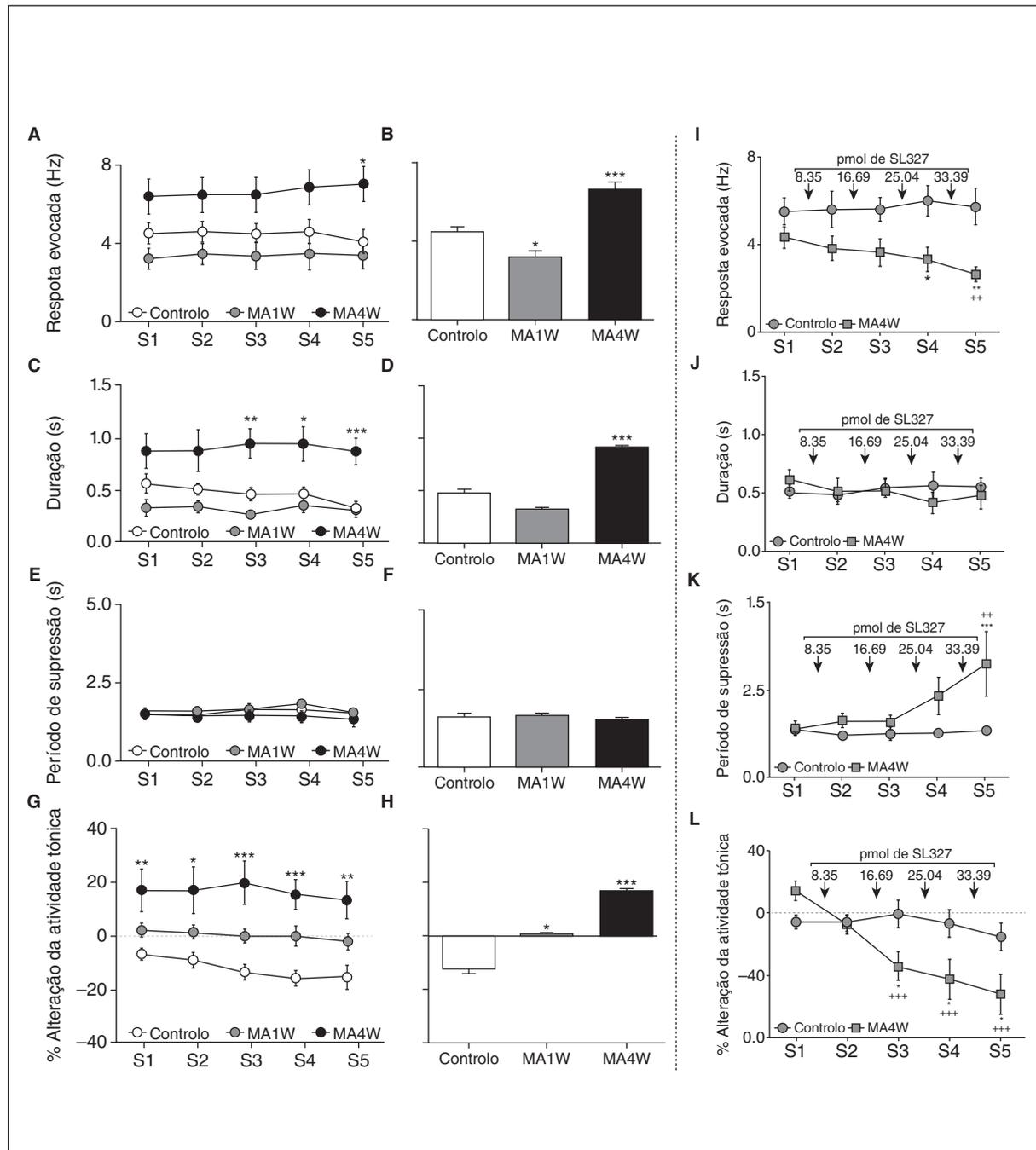


Figura 5. Resposta evocada dos neurónios do LC à aplicação de cinco estimulações nóxicas sequenciais da pata ipsilateral em animais controlo, com uma (MA1W) e quatro (MA4W) semanas de monoartrite. **A:** e **B:** A resposta evocada, que não foi alterada significativamente em cada grupo experimental ao longo das cinco estimulações nóxicas, foi significativamente mais elevada nos animais MA4W, na estimulação S5, comparando com o grupo controlo (A). A média dos valores obtidos em todas as estimulações para cada grupo experimental (B) revelou que a resposta evocada observada nos animais MA1W foi significativamente reduzida enquanto que nos animais MA4W foi significativamente aumentada, ambas em comparação com o grupo controlo. **C** e **D:** A duração da resposta evocada aumentou significativamente no grupo MA4W. **E** e **F:** O período de supressão não sofreu alterações significativas em nenhum grupo experimental. **G** e **H:** A percentagem de alteração da atividade tónica em relação ao valor basal, e após cada estimulação nóxica da pata, foi significativa tanto no grupo MA1W como no grupo MA4W. **I:** A microinjeção de SL327 diminuiu significativamente a resposta evocada nos animais MA4W. **J:** Não foram observados efeitos significativos da administração de SL327 na duração da resposta evocada. **K:** A microinjeção de SL327 aumentou significativamente o período de supressão no grupo de animais monoartríticos com quatro semanas. **L:** A microinjeção de SL327 diminuiu significativamente a percentagem de alteração da atividade tónica em relação ao valor basal e após cada estimulação nóxica da pata. Todos os valores representam a média \pm SEM: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ MA versus controlos correspondentes, ANOVA de uma via seguido de Dunnett's (A-H); + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ e +++ $p < 0,001$ MA versus controlos correspondentes, ANOVA de uma via seguido de Dunnett's comparando S2-S5 versus S1 (I-L); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, ANOVA de medidas repetidas seguido de Bonferroni, comparando o grupo controlo com o grupo MA4W (I-L) (adaptado de Borges, et al., 2015; em processo de submissão).

noradrenérgico em termos de necessidade/produção de noradrenalina (Borges et al, 2015 em processo de submissão). Este achado foi consistente com a observação de alterações no comportamento dos animais ao tentarem trepar o cilindro (*climbing*), observado nos animais com quatro semanas de monoartrite, quando submetidos ao teste da natação forçada, o que indiretamente aponta para alterações na disponibilidade de noradrenalina^{8,9}. No seu conjunto, estes resultados indicam haver um desajuste na transmissão noradrenérgica para a medula espinhal (via descendente) e para as áreas corticais (via ascendente), na inflamação crónica.

Para avaliar a atividade evocada dos neurónios do LC, foram aplicadas várias estimulações nóxicas na pata inflamada (pata ipsilateral), enquanto o padrão eletrofisiológico de descarga dos neurónios foi registado no LC contralateral. Tal como era esperado, este procedimento resultou na ativação fásica dos neurónios do LC^{33,34} mas, nos animais com quatro semanas de monoartrite, esta atividade revelou-se exacerbada (Fig. 5) (Borges et al, 2015 em processo de submissão). Já foi demonstrado que esta resposta dos neurónios do LC é do tipo «tudo-ou-nada» e que a magnitude da resposta não sofre alterações com variações moderadas da pressão de compressão da pata³³. Assim, no seu conjunto, estes resultados sugerem, de forma robusta, que um aumento da razão entre a atividade tónica e fásica do LC, tal como observado nos animais com quatro semanas de monoartrite, potencia a perceção de estímulos dolorosos, com repercussão na transmissão para as mais variadas regiões corticais. Foram obtidos resultados eletrofisiológicos e de expressão de TH similares em animais com dor neuropática submetidos a paradigmas de *stress* social³⁵ e também num modelo animal de *stress* pós-traumático³⁶, sugerindo que a monoartrite de longo-termo poderá produzir alterações no LC semelhantes àquelas que se observam em condições de *stress*.

Papel das cinases reguladas por sinais extracelulares 1/2

Chegado a este ponto, hipotetizámos que o aumento da expressão de pERK_{1/2} observado no LC de animais com quatro semanas de monoartrite poderia estar a desempenhar algum papel na resposta evocada destes animais. Para investigar a validade deste pressuposto, foi feito o bloqueio farmacológico da ativação de ERK_{1/2} localmente no LC contralateral, mediante a microinjeção do composto SL327, um inibidor seletivo da ativação de ERK_{1/2}, e foi avaliada novamente a atividade eletrofisiológica dos neurónios do LC. Este procedimento reverteu para níveis controlo, ou até para valores mais baixos, os parâmetros de atividade fásica que já tinham sido previamente estudados e que se encontravam alterados nos animais monoartríticos de quatro semanas (Fig. 5I) (Borges et al, 2015 em processo de submissão). Este resultado sugere que a ativação exagerada de ERK_{1/2} no LC está implicada na resposta evocada dos neurónios, neste núcleo encefálico. Além disso, a microinjeção de SL327 também reverteu o comportamento de ansiedade (Fig. 6B) mas não produziu nenhuma

alteração significativa no limiar nociceptivo (Fig. 6A) (Borges, et al, 2015 em processo de submissão). Para além disso, também se verificou que os níveis de ativação de ERK_{1/2} no núcleo ACC de animais monoartríticos foram revertidos para valores normais nos animais tratados com SL327 (Fig. 6D). Desta forma, é possível que as alterações observadas na atividade eletrofisiológica do LC de animais com quatro semanas de monoartrite reflitam alguns dos mecanismos subjacentes ao aparecimento de comportamentos de ansiedade, e que estes envolvam a ativação de ERK_{1/2} no LC e no ACC. É importante realçar a ausência de qualquer efeito do composto SL327 na atividade eletrofisiológica, assim como no teste EZM nos animais controlo (Borges, et al, 2015 em processo de submissão). Em modo de conclusão, os dados obtidos sugerem que os níveis elevados de ativação de ERK_{1/2} no LC, em condições de monoartrite prolongada, estão mais relacionados com o desenvolvimento de comportamentos afetivos associados à dor do que com a componente sensorial da dor propriamente dita, estando ambos os eventos dissociados.

A possível implicação do fator libertador de corticotropina

Os estudos até então realizados tinham permitido concluir com clareza que, em condições de monoartrite prolongada, ocorre um aumento da ativação da cascata ERK_{1/2} no LC, e que esta seria responsável por alterações nos padrões de atividade eletrofisiológica dos neurónios deste núcleo encefálico e pelo desenvolvimento de ansiedade. No entanto, ainda não era claro qual(is) poderia(m) ser o(s) sinal(is) extracelular(es) que poderia(m) estar a desencadear uma maior ativação desta cascata. Tendo em conta que, tal como discutido anteriormente, os dados eletrofisiológicos juntamente com o aumento da expressão de TH no LC de animais com quatro semanas de monoartrite foram muito similares com o que já se tinha verificado noutros estudos realizados em condições de *stress*^{35,36,37}, hipotetizou-se que o fator libertador de corticotropina (CRF), um neuropéptido profundamente implicado na resposta ao *stress*, pudesse estar a desempenhar algum papel nestes mecanismos. A suportar esta hipótese, já tinha sido demonstrado que a dor, em particular a dor inflamatória, pode funcionar como um poderoso *stress*, ativando o eixo hipotálamo-hipofisário (HPA)³⁸. Para além disso, o *stress* crónico produz ativação persistente de ERK_{1/2} nas dendrites dos neurónios das camadas I e II do PFC³⁹, precisamente onde observámos um aumento significativo do número de neurónios que expressam pERK_{1/2} em condições de monoartrite prolongada. Assim, a hipótese de que condições dolorosas prolongadas pudessem estar a produzir efeitos associados/semelhantes ao *stress* crónico, mediados pela neurotransmissão de CRF, era muito atrativa. Em suporte deste pressuposto, tínhamos encontrado um aumento significativo da expressão de pERK_{1/2} no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Fig. 7B e 7C), o maior produtor de CRF no CNS, nos animais submetidos a quatro semanas de monoartrite o que,

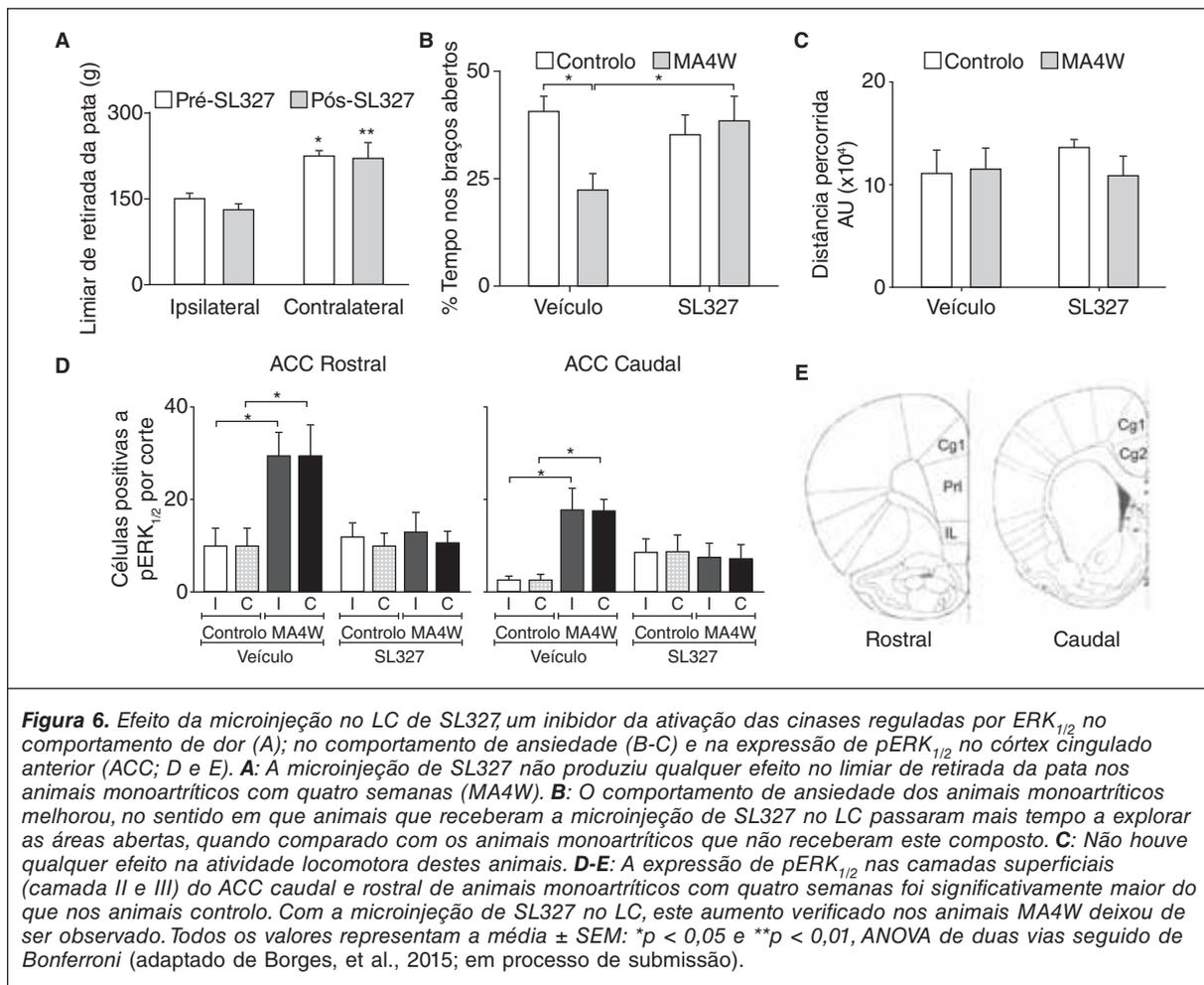


Figura 6. Efeito da microinjeção no LC de SL327, um inibidor da ativação das cinases reguladas por ERK_{1/2}, no comportamento de dor (A); no comportamento de ansiedade (B-C) e na expressão de pERK_{1/2} no córtex cíngulado anterior (ACC; D e E). **A:** A microinjeção de SL327 não produziu qualquer efeito no limiar de retirada da pata nos animais monoartríticos com quatro semanas (MA4W). **B:** O comportamento de ansiedade dos animais monoartríticos melhorou, no sentido em que animais que receberam a microinjeção de SL327 no LC passaram mais tempo a explorar as áreas abertas, quando comparado com os animais monoartríticos que não receberam este composto. **C:** Não houve qualquer efeito na atividade locomotora destes animais. **D-E:** A expressão de pERK_{1/2} nas camadas superficiais (camada II e III) do ACC caudal e rostral de animais monoartríticos com quatro semanas foi significativamente maior do que nos animais controlo. Com a microinjeção de SL327 no LC, este aumento verificado nos animais MA4W deixou de ser observado. Todos os valores representam a média ± SEM: **p* < 0,05 e ***p* < 0,01, ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni (adaptado de Borges, et al., 2015; em processo de submissão).

indiretamente, implicava o sistema mediado pelo CRF nalguns mecanismos⁴⁰. Assim, procedeu-se à microinjeção de um antagonista dos recetores do CRF no lado contralateral do LC e à avaliação comportamental de dor e ansiedade, tanto em animais controlo como em animais com quatro semanas de monoartrite. À semelhança do que se tinha verificado com a microinjeção de SL327 no LC, também ocorreu uma reversão no comportamento de ansiedade (Fig. 7A), sem que tenha havido qualquer efeito no limiar nociceptivo dos animais monoartríticos. Além disso, a microinjeção do antagonista de CRF no LC também normalizou os valores de expressão de pERK_{1/2} no LC, indicando a existência de um efeito do CRF mediado via sinalização pela cascata ERK_{1/2}, pelo menos nesta região⁴⁰. Este possível aumento na neurotransmissão de CRF para o LC poderia explicar a expressão aumentada de TH em condições inflamatórias crónicas, de acordo com o que já foi descrito por outros autores⁴¹. No entanto, já é bastante conhecido que o CRF ativa os neurónios do LC, pois a atividade tónica destes neurónios aumenta significativamente após a microinjeção local de CRF⁴², o que contraria a observação de uma redução dos disparos de atividade tónica nos animais com quatro semanas de monoartrite (Borges, et al, 2015, em processo de submissão). Não

obstante, já foi documentado um papel duplo do CRF em condições de stress agudo ou crónico. O stress agudo parece promover a sensibilização dos neurónios do LC ao CRF, produzindo uma atividade tónica alta e uma atividade fásica baixa⁴³. Ao contrário, o stress crónico, que se assemelha mais às condições experimentais estudadas, representa uma situação mais próxima a uma psicopatologia, de que é exemplo o stress repetitivo de natureza auditiva, e parece dessensibilizar os neurónios do LC ao CRF⁴⁴ e induzir o tráfico intracelular de recetores de CRF⁴⁵, produzindo efeitos opostos aos que se observam no stress agudo. Assim, em conclusão, embora ainda sejam necessários alguns estudos para esclarecer completamente qual o papel do CRF em condições de inflamação crónica, estes resultados apontam, no seu conjunto, para o envolvimento deste neurotransmissor como um importante mediador do aparecimento de ansiedade, mediante mecanismos que envolvem a ativação da cascata de sinalização ERK_{1/2} no LC.

Conclusões

Assim, a partir deste estudo pôde-se concluir que:

- A inflamação crónica e dolorosa é acompanhada pelo desenvolvimento de ansiedade e depressão

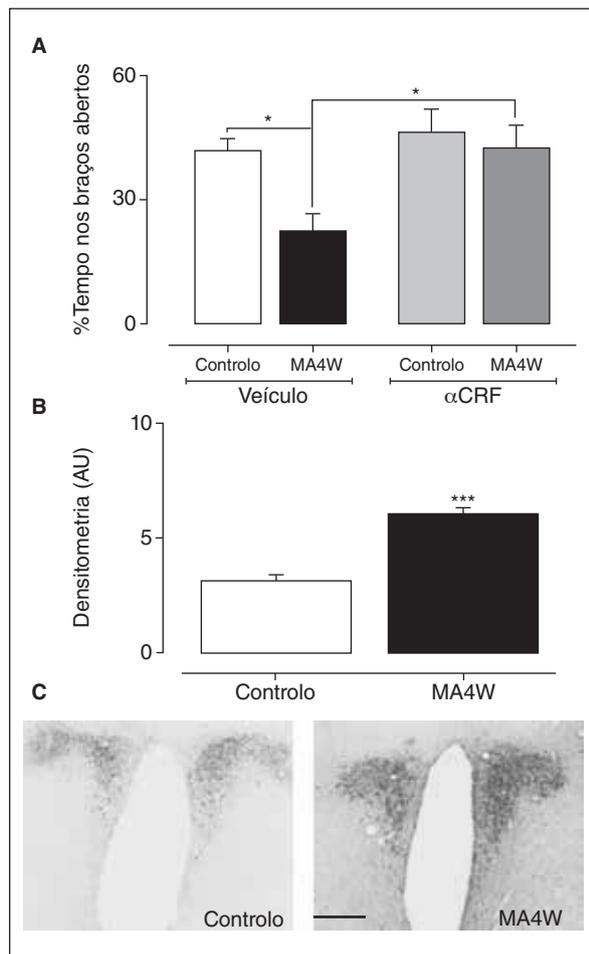


Figura 7. Efeito da microinjeção no LC de um antagonista dos receptores do CRF (α CRF) no comportamento de ansiedade e expressão de pERK_{1/2} no PVN em animais controle e monoartríticos com quatro semanas (MA4W). **A:** O comportamento de ansiedade dos animais monoartríticos foi melhorado, no sentido em que animais que receberam a microinjeção de α CRF no LC passaram mais tempo a explorar as áreas abertas, quando comparado com os animais monoartríticos que não receberam este composto. **B:** A expressão de pERK_{1/2} no PVN de animais monoartríticos com quatro semanas foi significativamente maior do que nos animais controle. **C:** Fotomicrografias representativas da marcação de pERK_{1/2} no PVN em animais controle e monoartríticos. Todos os valores representam a média \pm SEM: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni (A); e teste *t* de Student (B) (adaptado de Borges, et al.)⁴⁰.

as quais são uma consequência direta do excessivo afluxo nociceptivo devido à inflamação.

- Em condições crónicas de inflamação, a cascata ERK_{1/2} no LC está implicada na alteração da perceção à dor e modula o desenvolvimento de transtornos afetivos.
- O circuito noradrenérgico está comprometido em condições de inflamação crónica, desencadeando a componente afetiva da dor.
- Os registos eletrofisiológicos dos neurónios do LC mostram haver uma atividade tónica baixa e uma atividade fásica alta, associados ao fenótipo

ansio-depressivo, e que a cascata ERK_{1/2} está implicada na regulação desta atividade neuronal.

- Em condições crónicas de inflamação, a neuro-transmissão pelo CRF no LC parece ser um dos mecanismos motivadores da ativação de ERK_{1/2} e dos seus efeitos subsequentes.

Bibliografia

1. Azevedo LF, Costa-Pereira A, Mendonca L, Dias CC, Castro-Lopes JM. Epidemiology of chronic pain: a population-based nationwide study on its prevalence, characteristics and associated disability in Portugal. *J Pain*. 2012;13:773-83.
2. Butler SH, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain*. 1992;48:73-81.
3. Borges G, Neto F, Mico JA, Berrocoso E. (2014) Reversal of monoarthritis-induced affective disorders by diclofenac in rats. *Anesthesiology*. 2014;120:1476-90.
4. Covic T, Cumming SR, Pallant JF, et al. Depression and anxiety in patients with rheumatoid arthritis: prevalence rates based on a comparison of the Depression, Anxiety and Stress Scale (DASS) and the hospital, Anxiety and Depression Scale (HADS). *BMC Psychiatry*. 2012;12:6.
5. Treit D, Pinel JP, Fibiger HC. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1981;15:619-26.
6. Thomas A, Burant A, Bui N, Graham D, Yuva-Paylor LA, Paylor R. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology*. 2009;204:361-73.
7. Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 1994;116:56-64.
8. Detke MJ, Rickels M, Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 1995;121:66-72.
9. Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2005;29:547-69.
10. Yalcin I, Bohren Y, Waltisperger E, et al. A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol Psychiatry*. 2011;70:946-53.
11. Narita M, Kaneko C, Miyoshi K, et al. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:739-50.
12. Maciel IS, Silva RB, Morrone FB, Calixto JB, Campos MM. (2013) Synergistic effects of celecoxib and bupropion in a model of chronic inflammation-related depression in mice. *PLoS One*. 2013;8:e77227.
13. Kim H, Chen L, Lim G, et al. Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. *J Clin Invest*. 2012;122:2940-54.
14. Parent AJ, Beaudet N, Beaudry H, et al. Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behav Brain Res*. 2012;229:160-7.
15. Alba-Delgado C, Llorca-Torralba M, Horrillo I, et al. Chronic pain leads to concomitant noradrenergic impairment and mood disorders. *Biol Psychiatry*. 2013;73:54-62.
16. Amorim D, David-Pereira A, Pertovaara A, Almeida A, Pinto-Ribeiro F. Amitriptyline reverses hyperalgesia and improves associated mood-like disorders in a model of experimental monoarthritis. *Behav Brain Res*. 2014;265:12-21.
17. Caspani O, Reitz MC, Ceci A, Kremer A, Treede RD. Tramadol reduces anxiety-related and depression-associated behaviors presumably induced by pain in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;124:290-6.
18. Borges G, Berrocoso E, Mico JA, Neto F. ERK1/2: Function, signaling and implication in pain and pain-related anxiety-depressive disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2015a;60:77-92.
19. Ennis M, Aston-Jones G. Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J Neurosci*. 1988;8:3644-57.
20. Samuels ER, Szabadi E. Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Curr Neuropharmacol*. 2008;6:235-53.
21. Krettek JE, Price JL. The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 1977;171:157-91.
22. Ray JP, Price JL. The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the

- ventral forebrain-prefrontal cortex topography. *J Comp Neurol*. 1992;323:167-97.
23. Lane RD, Reiman EM, Axelrod B, Yun LS, Holmes A, Schwartz GE. Neural correlates of levels of emotional awareness. Evidence of an interaction between emotion and attention in the anterior cingulate cortex. *J Cogn Neurosci*. 1998;10:525-35.
 24. Vogt BA. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:533-44.
 25. Cao H, Gao YJ, Ren WH, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase in the anterior cingulate cortex contributes to the induction and expression of affective pain. *J Neurosci*. 2009;29:3307-21.
 26. Cruz CD, Neto FL, Castro-Lopes J, McMahon SB, Cruz F. Inhibition of ERK phosphorylation decreases nociceptive behaviour in monoarthritic rats. *Pain*. 2005;116:411-9.
 27. Ji RR, Befort K, Brenner GJ, Woolf CJ. ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 2002;22:478-85.
 28. Xu Q, Garraway SM, Weyerbacher AR, Shin SJ, Inturrisi CE. Activation of the neuronal extracellular signal-regulated kinase 2 in the spinal cord dorsal horn is required for complete Freund's adjuvant-induced pain hypersensitivity. *J Neurosci*. 2008;28:14087-96.
 29. Rigaud M, Gemes G, Barabas ME, et al. Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: implications for studies of neuropathic pain. *Pain*. 2008;136:188-201.
 30. Dawane JS, Pandit VA, Rajopadhye BD. Experimental evaluation of anti-inflammatory effect of topical application of entada phaseoloides seeds as paste and ointment. *N Am J Med Sci*. 2011;3:513-7.
 31. Takayama K, Hirose A, Suda I, et al. Comparison of the anti-inflammatory and analgesic effects in rats of diclofenac-sodium, felbinac and indomethacin patches. *Int J Biomed Sci*. 2011;7:222-9.
 32. Jann MW, Slade JH. Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression. *Pharmacotherapy*. 2007;27:1571-87.
 33. Simson PE, Weiss JM. Altered activity of the locus coeruleus in an animal model of depression. *Neuropsychopharmacology*. 1988;1:287-95.
 34. Valentino, R.J. and S.L. Foote, Corticotropin-releasing hormone increases tonic but not sensory-evoked activity of noradrenergic locus coeruleus neurons in unanesthetized rats. *J Neurosci*, 1988. 8(3): p. 1016-25.
 35. Bravo L, Alba-Delgado C, Torres-Sanchez S, Mico JA, Neto FL, Berrocoso E. Social stress exacerbates the aversion to painful experiences in rats exposed to chronic pain: the role of the locus coeruleus. *Pain*. 2013;154:2014-23.
 36. George SA, Knox D, Curtis AL, Aldridge JW, Valentino RJ, Liberzon I. Altered locus coeruleus-norepinephrine function following single prolonged stress. *Eur J Neurosci*. 2013;37:901-9.
 37. Bravo L, Torres-Sanchez S, Alba-Delgado C, Mico JA, Berrocoso E. Pain exacerbates chronic mild stress-induced changes in noradrenergic transmission in rats. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2014;24:996-1003.
 38. Hummel, M., T. Cummons, P. Lu, L. Mark, J.E. Harrison, J.D. Kennedy, and G.T. Whiteside, Pain is a salient "stressor" that is mediated by corticotropin-releasing factor-1 receptors. *Neuropharmacology*, 2010. 59(3): p. 160-6.
 39. Trentani A, Kuipers SD, Ter Horst GJ, Den Boer JA. Selective chronic stress-induced in vivo ERK1/2 hyperphosphorylation in medial prefrontocortical dendrites: implications for stress-related cortical pathology? *Eur J Neurosci*. 2002;15:1681-91.
 40. Borges GP, Mico Segura JA, Lourenca Moreira Neto F, Berrocoso E. Corticotropin-Releasing Factor Mediates Pain-Induced Anxiety through the ERK1/2 Signaling Cascade in Locus Coeruleus Neurons. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2015b Feb 25;pii:pyv019;doi:10.1093/ijnp/pyv019.
 41. Melia KR, Duman RS. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8382-6.
 42. Curtis AL, Lechner SM, Pavcovich LA, Valentino RJ. Activation of the locus coeruleus noradrenergic system by intracoeulear microinfusion of corticotropin-releasing factor: effects on discharge rate, cortical norepinephrine levels and cortical electroencephalographic activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281:163-72.
 43. Curtis AL, Pavcovich LA, Grigoriadis DE, Valentino RJ. Previous stress alters corticotropin-releasing factor neurotransmission in the locus coeruleus. *Neuroscience*. 1995;65:541-50.
 44. Conti LH, Foote SL. Reciprocal cross-desensitization of locus coeruleus electrophysiological responsivity to corticotropin-releasing factor and stress. *Brain Res*. 1996;722:19-29.
 45. Reyes BA, Bangasser DA, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. Using high resolution imaging to determine trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Life Sci*. 2014;112:2-9.

Estudos de Terapia Génica para Controlo da Dor Crónica: Presente e Futuro

Isabel Martins¹ e Isaura Tavares²

Com o desenvolvimento crescente da terapia génica, a sua aplicação no campo da dor tornou-se uma realidade. Neste texto fazemos uma revisão das principais aplicações de terapia génica para controlo da dor crónica, no que diz respeito a estudos em modelos animais e as potenciais aplicações clínicas. Neste trabalho analisam-se as potenciais aplicações clínicas da terapia génica tendo em consideração a necessidade de perspetivar novas formas de tratamento que permitam diminuir o enorme e crescente impacto socioeconómico da dor crónica. Estas perspetivas de abordagem clínica só são possíveis depois de uma extensa investigação básica em modelos animais em que se estudam os princípios básicos, benefícios e riscos da utilização de terapia génica. Nesses estudos usam-se vários animais modelos de dor (infamatória, neuropática, oncológica) e vários tipos de animais de laboratório (ratinho, rato e macaco). A grande maioria dos estudos direcionaram-se para a aplicação de sistemas de transporte de genes (vetores víricos não-replicativos) que codificavam a síntese de opioides, com o objetivo final de bloquear a transmissão de informação nociceptiva na medula espinhal. A partir destes estudos em modelos animais, faz-se uma análise dos resultados mais recentes de ensaios clínicos com terapia génica para controlo da dor realizados em doentes com dor oncológica. Os estudos em modelos animais que utilizam a administração de vetores víricos em centros encefálicos de controlo da dor são analisados no que diz respeito à sua complexidade e utilidade em desvendar os mecanismos neurobiológicos da modulação descendente da dor, área primordial de trabalho das autoras deste artigo. O futuro da terapia génica para tratamento da dor crónica passará pelo desenvolvimento de vetores mais seguros e específicos que poderão ser diferencialmente aplicados nos vários tipos de dor crónica.

Palavras-chave: Dor crónica. Modelos animais de dor. Vetores víricos.

Abstract

Gene therapy has been a promise in the last decades mainly in the treatment of genetic disorders. This paper provides a critical review of the main current applications of gene therapy for chronic pain in what concerns animal studies and putative clinical applications. Based on the huge socioeconomic impact of chronic pain in modern societies, it is necessary to develop new avenues in pain management, which prompt us to review the most common animal studies using gene therapy, which consisted in deliveries of replication-defective viral vectors at the periphery, mainly from herpes simplex virus, type 1 (HSV-1), with the aim to block nociceptive transmission at the spinal cord. Departing from the data of these animal studies, we present the latest results of clinical trials using gene therapy for pain management in cancer patients. The animal studies dealing with gene delivery in pain control centres of the brain are analysed regarding their complexity and interest in unravelling the neurobiological mechanisms of descending pain modulation. The paper finishes by analysing possible futures of gene therapy for chronic pain management based on the development of vectors that are safer and more specific for the different types of chronic pain. (Dor. 2014;22(4):36-44)

Corresponding author: Isaura Tavares, isatav@med.up.pt

Key words: Chronic pain. Translational research. Animal pain model. Viral vector.

¹Professora Auxiliar

²Professora Associada com Agregação

Introdução

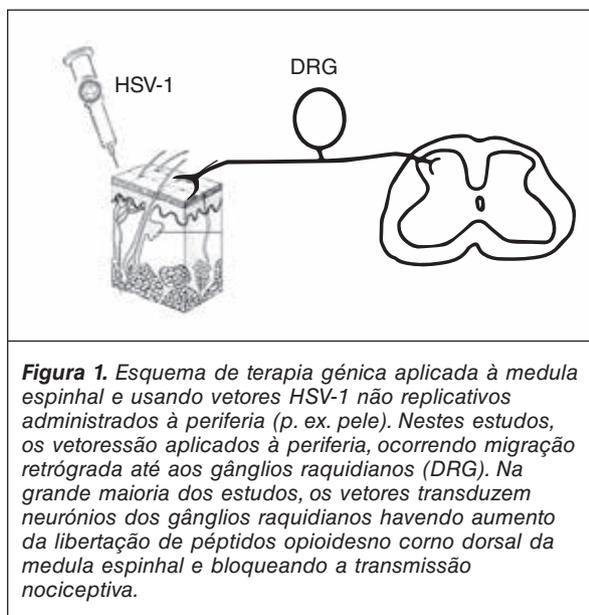
No contexto da revista «Dor» é desnecessário referir que a dor crónica é um grave problema socioeconómico, prevendo-se o seu agravamento futuro com o envelhecimento da população. Mais importante é salientar que os investigadores básicos na área da dor se questionam constantemente sobre as formas como os seus achados neurobiológicos fundamentais podem, em última análise, produzir algum conhecimento que ajude os doentes com dor. Este desiderato é um desafio constante para os investigadores básicos devido à própria definição de dor. A definição mais consensual de dor foi fornecida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), segundo a qual, «A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tal lesão»¹. Atribuindo à dor uma conotação «emocional», os investigadores básicos são colocados perante o enorme desafio de compreender as respostas comportamentais dos animais e perspetivá-las no sentido de interpretá-las como respostas nociceptivas ou como meros reflexos. Para além desta dificuldade, há que referir que o tratamento da dor crónica é o que se justifica de forma preponderante no contexto clínico. Contudo, o estudo da dor crónica em modelos animais é relativamente recente, dado que os estudos em modelos animais se iniciaram com modelos de dor aguda. Voltando às definições da IASP que considera que a dor crónica é a dor que dura mais de 3 meses e persiste além do tempo normal de cicatrização dos tecidos², é de salientar que existem poucos modelos animais em que os sinais comportamentais de dor se mantêm estáveis por períodos de tempo tão longos. Os investigadores básicos acabam por esquecer as definições temporais de dor crónica no contexto clínico baseando-se na duração de vida dos animais de laboratório por comparação com o Homem. Em resumo, a investigação de dor em animais de laboratório faz-se em 3 tempos. O passado, em que analisámos o que foi feito por nós ou pelos outros. O presente, em que planeamos e executamos as experiências. O futuro, em que planeamos novas experiências e em que a aplicação clínica dos nossos resultados se afigura como uma possibilidade.

A dor crónica pode ser dividida em «nociceptiva» e «neuropática»³. A dor nociceptiva é causada pela ativação de nociceptores, as fibras nervosas finas que transmitem entrada nociceptiva da periferia para a medula espinhal. A dor neuropática é causada pelo mau funcionamento ou danos do sistema nervoso. A dor neuropática é difícil de tratar. Está frequentemente associada a queixas de dor espontânea e a respostas exacerbadas a estímulos nociceptivos (hiperalgesia) e a estímulos que habitualmente não são nociceptivos (alodinia). O número de pessoas que sofrem de dor crónica está a aumentar devido a múltiplas causas, como o envelhecimento da população. Na Europa, cerca de 20% das pessoas sofrem de dor crónica moderada a grave⁴. Nos EUA, a prevalência de dor crónica varia de 2 a 40%, custando anualmente ao país 560-635 milhões de dólares^{5,6}. A dor

crónica afecta fortemente a vida quotidiana dos doentes e a sua produtividade. Cerca de 60% dos pacientes com dor crónica são incapazes ou menos capazes de trabalhar, 13% vêm-se forçados a mudar de emprego enquanto 19% perdem o emprego devido à sua dor⁶. A dor crónica está associada a diversas comorbilidades nomeadamente depressão e ansiedade⁶. Apesar dos grandes investimentos em pesquisa básica e clínica da dor, os analgésicos disponíveis não foram significativamente alterados nas últimas décadas. Os opioides são úteis para controlar vários tipos de dor, mas podem ter uma eficácia reduzida em alguns tipos de dor, como por exemplo a dor neuropática. Além disso, os tratamentos de longo prazo com opioides induzem frequentemente efeitos secundários indesejáveis, como náuseas, obstipação e dependência⁷. A dor intratável continua a ser um problema clínico e um drama para os pacientes e as suas famílias⁸. Durante a última década, tem-se assistido a um enorme debate entre especialistas básicos e clínicos acerca da necessidade de procurar alternativas para o tratamento da dor, nomeadamente em conceber estratégias que funcionem de uma maneira mais específica e sustentada do que os analgésicos convencionais. A terapia génica afigura-se como uma abordagem potencialmente interessante para que no futuro se venham a superar algumas das limitações atuais no controlo de dor crónica refratária aos tratamentos convencionais.

O sistema somatossensitivo e a terapia génica

A definição de estratégias de aplicação de terapia génica para o controlo da dor passa por um detalhado conhecimento dos mecanismos neurobiológicos de transmissão e modulação da informação nociceptiva no sistema somatossensitivo. Com base no papel da medula espinhal como primeira estação de integração e modulação de informação nociceptiva transmitida a partir de órgãos periféricos, não é de espantar que grande parte dos estudos de terapia génica se tenham direcionado para o bloqueio da medula espinhal. O papel bem estabelecido de neurotransmissores como péptidos opioides e aminoácidos (glicina e ácido g-aminobutírico (GABA) libertados por interneurónios espinhais no bloqueio da transmissão espinhofugal de informação nociceptiva a partir da medula espinhal, leva a que se equacione o bloqueio da medula espinhal por estratégias de terapia génica que mimetizam a ação daqueles neurotransmissores^{9,10}. A informação nociceptiva é transmitida a partir da medula espinhal para centros encefálicos, muitos dos quais alojados no tronco cerebral, onde ocorre modulação adicional do sinal nociceptivo proveniente da medula espinhal. A transmissão de informação nociceptiva pela via espinho-talâmica chega ao nível cortical, onde o sinal nociceptivo é finalmente percecionado como uma sensação de dor^{9,10}. Relativamente às áreas encefálicas envolvidas na modulação da informação nociceptiva deve referir-se que o controlo bidirecional, ou seja inibitório e facilitatório, se afigura como uma perspetiva interessante para a utilização de terapia génica dado que



esta poderá permitir potenciar os mecanismos inibitórios (antinociceptivos) e inibir os mecanismos facilitatórios (pró-nociceptivos)^{9,11}. Para que a terapia gênica possa ser perspectivada dessa forma, importa realizar estudos experimentais detalhados no sentido de seleccionar as áreas do sistema somatossensitivo e os neurotransmissores/recetores a manipular de modo a diminuir a transmissão nociceptiva e, conseqüentemente, a intensidade de dor.

A terapia gênica é uma técnica particularmente versátil para o controlo da dor crónica dado que se baseia numa tríade de parâmetros que podem ser controlados, nomeadamente o vetor, o transgene e o promotor. Os vetores são veículos usados para transportar o material genético para o interior das células, que no caso da terapia gênica da dor são habitualmente neurónios do sistema somatossensitivo. Os vetores mais usados são os víricos devido à elevada capacidade de infetar neurónios. Trata-se de vírus modificados geneticamente, sendo não replicativos, ou seja, incapazes de se reproduzir dado à deleção do material genético responsável pela replicação vírica. Para além dos vetores víricos, é possível usar vetores não-víricos, biomoléculas altamente modificadas que contêm o material genético a transportar. Contudo, apesar de teoricamente mais seguros, os vetores não-víricos possuem uma capacidade inferior de infetar as células, por comparação com os vetores víricos. Alguns dos vetores víricos têm a capacidade de migrar retrogradamente, ou seja, de serem transportados no sentido contrário ao de transmissão do impulso nervoso. Esta capacidade de transporte pode ser muito útil para infetar neurónios que estão alojados em áreas de difícil acesso. A título de exemplo poderemos considerar a aplicação de formas não replicativas de vetores do tipo *Herpes Simplex* tipo 1 (HSV-1) na periferia (e.g. na pele) para transduzir neurónios localizados nos gânglios raquidianos com o objetivo final de bloquear a transmissão nociceptiva

na medula espinhal (Fig. 1). Relativamente aos transgenes a incluir nos vetores usados na terapia gênica da dor, é possível aumentar a expressão de neurotransmissores, recetores, fatores neurotróficos ou substâncias anti-inflamatórias. Relativamente aos promotores estes servem para controlar a expressão dos transgenes, fornecendo «o sinal» para que haja transcrição. Para além disso os promotores permitem restringir a expressão dos transgenes a um único tipo celular com por exemplo um neurónio ou uma célula glial, ou direcionar a expressão para populações neuroquimicamente definidas. Neste caso, trata-se de promotores específicos. Para direcionar a expressão do transgene para neurónios temos por exemplo, o promotor da sinapsina que, ao ser incluído no vetor vírico, vai restringir a expressão do transgene às células nervosas, poupando as células gliais¹². Após se estabelecerem as características neurobiológicas de cada tipo de dor, nomeadamente no que respeita aos neurotransmissores e recetores envolvidos e à forma como as células dos vários componentes do sistema somatossensitivo são afetadas, pode conceber-se a estratégia de terapia gênica mais adequada nomeadamente no que respeita ao local a alvejar e à melhor combinação de vetor, transgene e promotor. Nas próximas secções deste artigo iremos analisar exemplos específicos da definição de vetores, transgenes e promotores em estudos em modelos animais de dor.

Estudos de terapia gênica em modelos animais de dor: medula espinhal

Uma das principais vantagens dos estudos de terapia gênica a nível experimental é a possibilidade de recorrer a diversos modelos animais de dor. Isto é importante porque cada tipo de dor pode induzir alterações específicas nos circuitos neuronais envolvidos na transmissão e modulação da transmissão nociceptiva¹³. Os estudos experimentais de terapia gênica usam modelos animais de dor inflamatória¹⁴⁻²² ou neuropática²³⁻³⁴. Em incidência mais baixa, foram realizados estudos em modelos de dor aguda³⁵⁻³⁸, dor pós-operatória³⁹ e dor oncológica⁴⁰.

A grande maioria dos estudos de terapia gênica em modelos animais foram realizados em modelos de dor somática ou visceral^{22,37}. Apenas em dois estudos foi utilizada a terapia genética em modelos de dor craniofacial, que pretendem reproduzir condições como a nevralgia do trigémio⁴¹ ou disfunção da articulação temporomandibular⁴². Os estudos de terapia gênica para a dor em modelos animais podem ser divididos em estudos direcionados à medula espinhal (Quadro 1) e estudos dirigidos para centros encefálicos de controlo da dor (Quadro 2). No caso dos estudos dirigidos para a medula espinhal, o principal objetivo é manipular a expressão de transgenes, de modo a bloquear a transmissão de informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal (Fig. 1). A maior parte dos referidos estudos elegeu o HSV-1 como o vetor mais adequado, devido à sua afinidade natural para o neurónio e a sua capacidade de transporte retrógrado⁴³. O HSV-1 tem a vantagem adicional relativamente a outros vetores víricos de ter a

Quadro 1. Resumo dos estudos experimentais de terapia génica baseados na utilização de vetores víricos para bloquear a transmissão nociceptiva na medula espinhal

Modelos de dor	Produto do transgene	Inoculação	Referências
HSV-1			
Dor aguda	Pré-proencefalina	Subcutânea	[35]
Dor inflamatória	Pré-proencefalina A	Subcutânea	[14]
Dor neuropática	Pré-proencefalina A	Subcutânea	[41]
Hiperalgiesia cutânea	Pré-proencefalina A	Subcutânea	[36]
Hiperactividade vesical	Pré-proencefalina	Parede bexiga	[37]
Dor inflamatória	Endomorfina-2	Subcutânea	[15]
Dor neuropática	Endomorfina-2	Subcutânea	[23]
Dor neuropática	IL-4	Subcutânea	[24]
Dor neuropática	sTNFRs	Subcutânea	[25]
Dor neuropática	GAD	Subcutânea	[26, 47]
Pancreatite crónica	Pre-proencefalina	Superfície pancreática	[22]
Dor inflamatória	«Antisense» para Nav 1.7	Subcutânea	[16]
Dor por incisão	Pré-proencefalina	Subcutânea	[39]
Dor Oncológica	Pré-proencefalina	Subcutânea	[40]
Vetor adenovírico			
Dor inflamatória	GAD	Gânglio trigeminal	[42]
Dor neuropática	IL-10	Intratecal	[27]
Dor inflamatória	β-endorfina	Intratecal	[17]
Dor neuropática	IL-2	Intratecal	[28]
Vetor adeno-associado			
Dor neuropática	IL-10	Intratecal	[29]
Dor neuropática	shGCH1	Intratecal	[30]
Dor neuropática	Prepro- β-endorfina	Intratecal	[31]
Dor inflamatória	Recetores opióides μ	DRG	[18]
Vetor lentivírico			
Dor neuropática	GDNF	Intraespinhal	[32]
Dor neuropática	Repressor NFκB	Intraespinhal	[33]

GAD: Descarboxilase do glutamato; GDNF: *Glial-derived neurotrophic factor*; IL: interleucina; Nav 1.7: canal de sódio 1.7 dependente da voltagem; NFκB: mediador inflamatório *Nuclear Factor κB*; shGCH1: *small hairpin*; GTP ciclohidroxilase: pequenas moléculas de RNA em formato *hairpin* que induzem diminuição da expressão da GTP ciclohidroxilase via RNA de interferência.

Quadro 2. Resumo dos estudos em modelos animais usando vetores víricos para transferir genes para centros encefálicos envolvidos no controlo da dor

Alvo supraspinal	Modelos de Dor	Produto do transgene	Referências
Núcleo reticular dorsal (DRt)	Aguda	Proencefalina	[55]
Núcleo reticular dorsal (DRt)	Neuropática	Antisense para TH	[34]
Bolbo raquidiano ventrolateral (VLM)	Inflamatória	Proencefalina	[19]
Núcleo reticular dorsal (DRt)	Inflamatória	Proencefalina	[20]
Córtex insular	Aguda	GAD	[38]
Amígdala	Inflamatória	Pré-proencefalina	[21]
Núcleo do tracto solitário	Aguda e inflamatória	Antisense para NMDA	[56]
Neurónios noradrenérgicos da ponte	Inflamatória e neuropática	Canal potássio (hKir _{2,1})	[51]

GAD: Descarboxilase do glutamato; TH: tirosina hidroxilase.

capacidade de transportar múltiplos transgenes ou transgenes de grandes dimensões e não se integrar no genoma do hospedeiro, o que reduz a possibilidade de mutagenese^{44,45}. Após a aplicação de formas não replicativas de HSV-1 na periferia (p. ex. pele, parede das vísceras), o vetor é transportado até ao gânglio raquidiano (DRG) fazendo a transdução de neurónios locais (Fig. 1). Depois do transporte do produto de expressão do transgene (p. ex. neurotransmissor) através da ramificação do prolongamento do axónio pseudo-unipolar até ao corno dorsal da medula espinal, dá-se a sua libertação naquela área da medula. Nestes estudos, foram reportados sinais comportamentais de analgesia em diversos modelos de dor e diminuição da expressão de marcadores de transmissão nociceptiva. A terapia génica em modelos animais de dor craniofacial^{41,42}, baseia-se em princípios semelhantes aos acima descritos nos estudos de medula espinal, mas dá-se a libertação dos produtos dos transgenes ao nível do núcleo espinal do trigémio, pelo que o princípio geral é semelhante ao dos estudos de terapia génica na medula espinal.

Relativamente aos transgenes incluídos nos vetores HSV-1 regista-se um claro predomínio dos precursores dos péptidos opioides e respetivos recetores, nomeadamente a pré-proencefalina, β -endorfina, endomorfina e recetores opioides (Quadro 1). Esta abordagem é, em grande parte, devida à capacidade bem conhecida dos péptidos opioides bloquearem a transmissão nociceptiva na medula espinal. Contudo, os opioides libertados através de técnicas de terapia génica têm uma vantagem em relação aos opioides clássicos, nomeadamente não induzem efeitos laterais ou tolerância após administrações repetidas do vetor⁴⁶. Além disso, a terapia génica com transgenes que bloqueiam a transmissão nociceptiva através de opioides pode ser muito potente na indução de analgesia, se combinada com a administração de doses muito baixas de opioides clássicos⁴⁶. Para além de opioides, outros transgenes têm sido incluídos nos vetores HSV-1. Um transgene que aumenta os níveis do neurotransmissor inibitório (GABA), através da sobreexpressão da sua enzima de síntese (glutamato descarboxilase [GAD]), mostrou induzir analgesia em modelos de dor neuropática^{26,47}. Os vetores derivados do HSV-1 também foram utilizados para administrar transgenes que aumentam a expressão de interleucinas anti-inflamatórias^{24,48} ou o recetor solúvel de necrose tumoral- α (TNF- α), que atua como um antagonista do TNF- α para bloquear o seu papel como mediador pró-inflamatório^{25,49}. Uma redução nos níveis da subunidade α do canal de sódio regulado pela voltagem 1,7 (Nav 1.7) também foi conseguida utilizando o HSV-1, pelo que foi necessário ter o transgene inserido na orientação «antisense»¹⁶. Outros vetores víricos, nomeadamente, os adenovírus, vírus adeno-associados e os lentivírus também foram utilizados para bloquear a transmissão nociceptiva na medula espinal. Contudo, ao contrário do HSV-1, administrado à periferia, estes vetores foram injetados diretamente nos gânglios raquidianos, gânglio trigeminal ou por via intratecal ou intraespinal (Quadro 1). Os transgenes incluídos nos adenovírus e vírus adeno-associados têm

sido semelhantes aos usados em vetores de HSV-1, ou seja, opioides^{17,31}, GAD⁴² e interleucinas²⁷⁻²⁹. Vetores adeno-associados também têm utilizado transgenes que aumentam a expressão de recetores μ -opioides¹⁸ ou bloqueiam a expressão de guanosina trifosfato (GTP) ciclohidroxilase (GCH1) utilizando pequenas porções de ácido ribonucléico (RNA)³⁰. A GCH1 é uma enzima que limita a velocidade de um co-factor essencial para o funcionamento da sintetase do óxido nítrico (NOS), importante molécula neuromoduladora da transmissão nociceptiva na medula espinal. Com base na sua capacidade para restringir a transdução do local de injeção, os vetores lentivíricos foram administrados intraespinalmente no corno dorsal para aumentar os níveis de um fator neurotrófico [factor neurotrófico derivado das células gliais (GDNF)]³² ou diminuir a expressão de um fator que regula as respostas de inflamação celular (*nuclear factor κ B* [NF κ B])³³. Neste último estudo, foi necessário modificar o invólucro vírico no sentido de levar a expressão preferencial do transgene em células gliais. Esta abordagem, designada pseudotipagem, mostra a versatilidade da terapia génica. Para além do promotor, a pseudotipagem do vetor é uma maneira de dirigir a expressão do transgene de uma forma seletiva até um tipo celular. No caso da glia, trata-se de um alvo importante na dor, dado que a dor crónica está associada à ativação de células gliais que produzem mediadores que exacerbam a dor, nomeadamente o NF κ B. Todas as abordagens acima referidas mostraram eficácia antinociceptiva considerável e efeitos secundários reduzidos.

Estudos de terapia génica em modelos animais: circuitos encefálicos de controlo da dor

A modulação descendente da dor sofre desregulação em vários tipos de dor crónica⁵⁰, havendo diminuição da inibição descendente e ocorrendo o oposto com a facilitação. O número de estudos de terapia génica realizados em modelos animais em que centros encefálicos de controlo da dor foram manipulados por terapia génica é muito inferior ao de estudos direcionados à medula espinal (Quadros 1 e 2). Esta discrepância deve-se sobretudo ao enorme desafio representado pela complexidade dos circuitos encefálicos de modulação da dor. A medula espinal constitui uma via de administração menos invasiva para alvejar as vias descendentes de modulação da dor podendo ser usada em vez da injeção direta a nível encefálico. A via de administração espinal foi recentemente usada para a injeção de um vetor derivado do adenovírus que exprime de forma seletiva um canal de potássio em neurónios noradrenérgicos pontinos que projetam para a medula espinal, o que permitiu diminuir a atividade desses neurónios e induziu aumento das respostas comportamentais nociceptivas⁵¹. Estas experiências confirmam o papel inibitório (antinociceptivo) dos neurónios noradrenérgicos que projetam para a medula espinal⁵².

Os estudos de terapia génica direcionados ao encefalo têm sido realizados com recurso a vetores derivados do HSV-1 de forma a aumentar a expressão

de péptidos opioides^{19-21,38} ou da enzima GAD³⁸, enzima de biossíntese do GABA (Quadro 2). O nosso grupo de investigação tem sido pioneiro na utilização da terapia gênica em centros de controlo da dor localizados no bulbo raquidiano, nomeadamente o núcleo reticular dorsal (DRt), o bulbo raquidiano ventrolateral (VLM) e o núcleo do trato solitário (NTS). Estas áreas foram escolhidas com base no vasto conhecimento neurobiológico do seu papel na modulação da dor^{53,54}. O aumento da expressão de péptidos opioides no DRt e no VLM induziu analgesia em modelos de dor aguda e inflamatória^{19,20,55}. A amígdala e o córtex insular são áreas do cérebro envolvidas no controlo da dor e de mais fácil acesso neurocirúrgico. O aumento da expressão de péptidos opioides no núcleo central da amígdala²¹ ou de GAD no córtex insular rostral induziu analgesia em modelos de dor aguda³⁸. A diminuição no NTS da expressão do recetor N-metil-D-aspartato (NMDA) importante para a ação do glutamato induziu uma diminuição significativa em dor aguda e inflamatória⁵⁶. Uma vez que o glutamato é o mediador mais ubíquo da transmissão sináptica excitatória no sistema nervoso central e os recetores NMDA também são expressos por células gliais, usou-se um vetor lentivirico com o promotor da sinapsina humana que permite limitar os efeitos do vetor a neurónios, sendo portanto uma abordagem direcionada.

A capacidade de migração retrógrada dos vetores derivados do HSV-1 é uma característica fundamental que tem sido explorada nos estudos direcionados ao sistema nervoso periférico. Contudo, nos estudos direcionados ao encéfalo, a capacidade de migração dos vetores derivados do HSV-1 é raramente avaliada. Esta característica do vetor é um fator crucial dado que os efeitos do vetor podem ser devidos à transdução e migração para neurónios que projetam para a área onde o vetor foi injetado e não à transdução dos neurónios da área injetada. O nosso grupo de investigação realizou um trabalho pioneiro relativo ao estudo da dinâmica de migração do HSV-1 após administração destes vetores em áreas do bulbo raquidiano envolvidas na modulação descendente da dor, nomeadamente o DRt e o VLM. Após injeção de um vetor HSV-1 que expressa o transgene lacZ, sob controlo do promotor do citomegalovírus humano (hCMV), no DRt e no VLM, verificou-se migração do vetor para neurónios aferentes a estas áreas^{19,55} (Fig. 2). Contudo, a expressão de β -galactosidase (β -gal), produto de expressão do gene lacZ, não ocorreu em todas as áreas aferentes ao DRt e ao VLM. Por exemplo, a amígdala e o córtex, áreas que projetam massivamente para o DRt e o VLM^{57,58} não apresentavam neurónios marcados com β -gal. A ausência de expressão de β -gal nesses neurónios não deverá ser atribuída ao decréscimo na atividade do promotor responsável pela expressão de β -gal, dado que outros estudos mostraram que esse promotor se encontra ativo nos neurónios da amígdala e do córtex^{21,59}. A ausência de expressão de β -gal na amígdala e no córtex será possivelmente devida à captação seletiva do HSV-1 por alguns axónios aferentes do DRt e VLM dado que a captação do HSV-1 é mediada através da

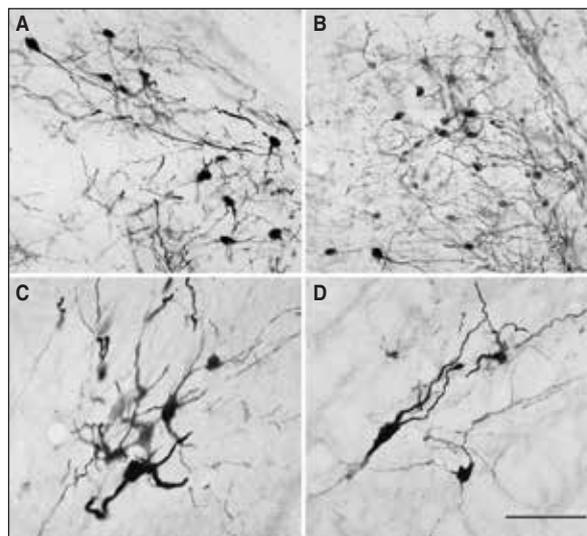


Figura 2. Migração do vetor HSV-1 no encéfalo após injeção no DRt. Fotografias de neurónios que expressam β -galactosidase, produto de expressão do transgene de marcação lacZ. Apresentam-se imagens do cerebelo (A), núcleos pontinos parabraquiais (B), locus coeruleus (C) e bulbo raquidiano ventrolateral (D), 7 dias após injeção do vetor no DRt. A barra de ampliação em D corresponde a 200 μ m (fotografias A-D na mesma ampliação).

interação de recetores neuronais com glicoproteínas do invólucro do HSV-1.

A migração seletiva do HSV-1 no encéfalo pode ser útil para utilizar os vetores HSV-1. Depois de estabelecermos a dinâmica da migração de HSV-1 no cérebro após injeção no DRt (área envolvida na modulação descendente facilitatória/pró-nocetiva), alterámos o vetor de forma a transportar o promotor da tirosina hidroxilase (TH), o que permite limitar os efeitos do vetor aos neurónios noradrenérgicos que projetam para o DRt (Fig. 3). Adicionalmente, com base nos efeitos analgésicos obtidos aquando da administração de antagonistas dos recetores α_1 -adrenérgicos no DRt, construímos um vetor que contém o promotor da TH e promove a diminuição da expressão da enzima TH, enzima de biossíntese da noradrenalina³⁴. A administração deste vetor induziu analgesia sustentada num modelo de dor neuropática que reproduz manifestações clínicas relevantes de dor neuropática, nomeadamente aumento das respostas em testes que avaliam a hiperalgesia mecânica (teste *pinprick*) e alodínia ao frio (teste da acetona; Fig. 3). O decréscimo significativo daquelas modalidades sensoriais durante cerca de 2 meses após uma única administração do vetor indica a potencialidade da terapia gênica direcionada a centros encefálicos de controlo da dor.

Terapia gênica para controlo da dor: perspetivas translacionais

As possibilidades translacionais de aplicação da terapia gênica foram analisadas em diversos estudos

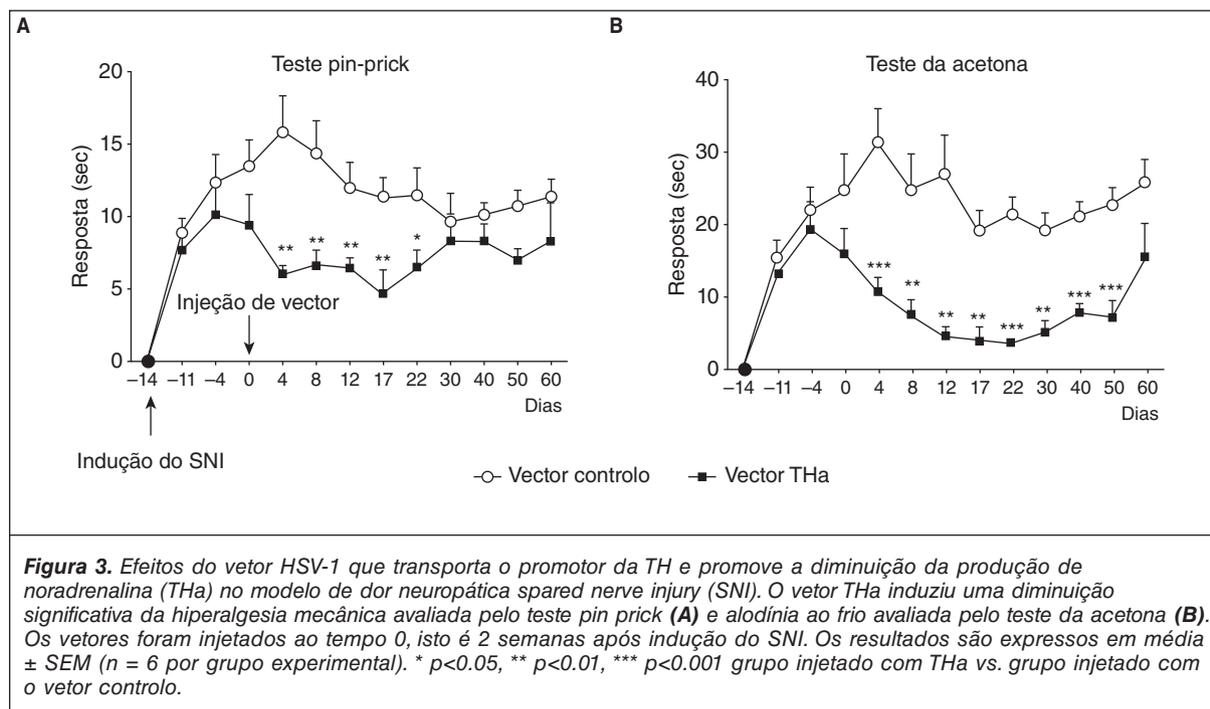


Figura 3. Efeitos do vetor HSV-1 que transporta o promotor da TH e promove a diminuição da produção de noradrenalina (THa) no modelo de dor neuropática spared nerve injury (SNI). O vetor THa induziu uma diminuição significativa da hiperalgesia mecânica avaliada pelo teste pin prick (**A**) e alodínia ao frio avaliada pelo teste da acetona (**B**). Os vetores foram injetados ao tempo 0, isto é 2 semanas após indução do SNI. Os resultados são expressos em média \pm SEM ($n = 6$ por grupo experimental). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ grupo injetado com THa vs. grupo injetado com o vetor controle.

que propuseram ensaios clínicos de terapia gênica para a dor crônica. Para além dos estudos em roedores, acima sumarizados, foram realizados estudos usando vetores derivados do HSV-1 em primatas³⁶. Estes estudos consistiram na aplicação periférica de vetores víricos derivados do HSV-1 e reforçaram as perspectivas de aplicação clínica dos resultados obtidos em roedores, dado que as injeções de HSV-1 foram aplicadas em dermatômos de dimensões mais semelhantes às do Homem. O primeiro ensaio clínico de terapia gênica para a dor crônica consistiu num estudo de segurança e doses crescentes dos vetores e incluiu dez pacientes com dor oncológica intratável e em situação terminal⁶⁰. O protocolo consistiu na administração direta na área que reportava maiores queixas de dor de um vetor HSV-1 não-replicativo contendo o transgene do precursor de encefalina⁶¹. Obteve-se um efeito analgésico dependente da dose que durava pelo menos 2 semanas, não se registando efeitos laterais. Estes resultados foram encorajadores e permitiram implementar um ensaio clínico de fase II que incluiu uma população mais alargada de doentes oncológicos em que se avaliou o efeito placebo tendo-se ainda testado os efeitos da reinoculação do vetor e determinado a dose que permite uma resposta máxima^{45,62}.

O progresso dos ensaios clínicos de terapia gênica em situações de dor oncológica abriu novas possibilidades para testar a terapia gênica noutras condições de dor, tais como neuropatia diabética dolorosa. Este tipo de dor tem uma prevalência cada vez maior dado que a pandemia da diabetes apresenta um crescimento considerável nos tempos modernos sendo difícil tratar a dor na neuropatia diabética com analgésicos convencionais⁶³. Um ensaio clínico foi

recentemente aprovado para utilizar um vetor HSV-1 que aumenta a expressão da GAD para aliviar a neuropatia diabética dolorosa⁴⁵. Outros transgenes terapêuticos estão atualmente em consideração em futuros ensaios clínicos de terapia gênica nomeadamente transgenes para interleucinas⁴⁵. O futuro da terapia gênica para a dor crônica em humanos dependerá dos resultados dos ensaios clínicos que estão em curso.

A aplicação da terapia genética para bloquear a transmissão nociceptiva ao nível encefálico tem sido proposta por especialistas em dor, nomeadamente anestesiologistas⁶⁴. Contudo, e de acordo com os estudos experimentais acima revistos, a maioria dos estudos que abordaram a aplicação de terapia gênica em áreas encefálicas foram direcionados para as áreas de controlo da dor localizadas no bulbo raquidiano. Trata-se de locais de difícil abordagem neurocirúrgica, e que estão em estreita proximidade com as áreas envolvidas no controlo de funções vitais, nomeadamente cardiovascular e respiratória. Torna-se importante utilizar as técnicas de terapia gênica em áreas de mais fácil abordagem neurocirúrgica. Contudo, o bloqueio da dor através de técnicas de terapia gênica a nível encefálico, só poderá vir a equacionar-se no contexto de situações de dor crônica intratável dado que se trata de uma técnica dispendiosa e com algum risco potencial. Para além disso, enquanto a nível periférico a terapia gênica bloqueia o local onde se origina a dor, mantendo a percepção da dor intacta, a aplicação da terapia gênica a nível encefálico poderá ter um efeito mais generalizado, impedindo também a percepção de alguns tipos de dor que são essenciais à sobrevivência do organismo⁶⁵. Todas estas possibilidades só podem

ser consideradas após uma caracterização completa dos circuitos de controlo da dor a nível encefálico nomeadamente no que diz respeito às alterações funcionais induzidas pela dor crónica, a fim de seleccionar as áreas encefálicas ideais para maximizar o equilíbrio entre eficácia e risco.

Desafios futuros

Os avanços da terapia génica noutras doenças do sistema nervoso, como a doença de Parkinson poderá ser crucial para definir o futuro da terapia génica para a dor crónica dado estarem ainda a ser aperfeiçoados os vetores ideais. Relativamente aos vectores não-víricos já foi possível induzir analgesia após administração periférica de um vector que aumenta a expressão de β -endorfina em modelos de dor inflamatória⁶⁶. Dado que a dor crónica requer a expressão sustentada e a longo termo de transgenes, urge aumentar a duração da atividade de promotores que controlam a expressão de transgenes terapêuticos. Atendendo à importante função de alerta da dor aguda, o futuro da terapia génica poderá passar por elaborar vetores que são ativados apenas quando a dor dura por longos períodos ou tem uma intensidade muito elevada. Uma possibilidade interessante que se afigura no futuro da terapia génica para a dor crónica é controlar a atividade do promotor utilizando promotores indutíveis. A atividade destes promotores pode ser induzida de forma exógena, por exemplo, através de uma substância como um antibiótico. Esta abordagem foi recentemente utilizada usando um ligando (glicina), que não é normalmente expresso em neurónios dos gânglios raquidianos, mas pode ser administrado para ativar o vector HSV-1, o que revelou resultados promissores em modelos animais de dor somática e visceral⁶⁷. Além dos vetores e dos promotores, a escolha de transgenes terapêuticos é essencial no futuro da terapia génica para a dor crónica. Transgenes para péptidos opioides têm sido frequentemente usados em estudos de terapia génica em modelos animais. Dado que os tratamentos a longo prazo com opioides clássicos podem provocar muitos efeitos secundários como tolerância e, paradoxalmente, até dor⁶⁸, importa aumentar o tempo de duração dos referidos estudos. Além dos opioides, novos transgenes deverão ser considerados em estudos de terapia génica para a dor crónica. Com base na função do recetor vanilóide *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* (TRPV1) na sinalização nociceptiva e a relevância clínica da dessensibilização dos recetores TRPV1⁶⁹, este transgene poderá ser um alvo importante no futuro. Ao utilizar técnicas de terapia génica para diminuir a expressão da proteína cinase C-epsilon (PKC ϵ), que fosforila recetores TRPV1, foi possível induzir analgesia em modelos animais⁷⁰. Finalmente, o novo campo emergente das bases genéticas das respostas à dor, que poderão explicar a maior suscetibilidade de algumas pessoas em desenvolver dor crónica⁷¹, poderão vir a ser reanalisadas na perspectiva da utilização da terapia génica, podendo permitir encarar futuramente um tratamento de dor mais personalizado.

A área de investigação básica na terapia génica da dor coloca desafios particulares para o futuro próximo. A investigação fundamental em dor é, necessariamente, um processo em que se trabalha pensando no futuro. No futuro que transcende a descoberta do neurotransmissor, recetor ou novo fármaco relevante no modelo animal ou circuito neuronal estudados. O futuro para os investigadores básicos pode, deste modo, ser considerado o presente dos colegas clínicos: tratar a dor nos doentes. Com base na diversidade de ensaios clínicos que usam terapia génica para tratar patologias do sistema nervoso como a doença de Parkinson, epilepsia e diversos tumores cerebrais⁷², o futuro começa hoje.

Bibliografia

- Merskey H, et al. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*.1979;6(3):249.
- Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. *Pain Suppl* .1986;3:S1-226.
- Thienhaus O, Cole BE. Classification of pain. In Weiner, R.S. *Pain management: a practical guide for clinicians* (6 ed.). American Academy of Pain Management. 2002.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain*. 2006;10(4):287-333.
- Verhaak PF, Kerssens JJ, Dekker J, Sorbi MJ, Bensing JM. Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature. *Pain* .1998;77(3):231-9.
- Gaskin DJ, Richard P. The economic costs of pain in the United States. *J Pain* .2012;13(8):715-24.
- Benyamin R, Trescot AM, Datta S, et al. Opioid complications and side effects. *Pain Physician*. 2008;11(2 Suppl): S105-20.
- Mao J, Gold MS Backonja MM. Combination drug therapy for chronic pain: a call for more clinical studies. *J Pain*. 2011;12(2):157-66.
- Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*. 2007;55(3):377-91.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-84.
- Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):214-25.
- Hioeki H Kameda H, Nakamura H, et al. Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters. *Gene Ther*. 2007;14(11):872-82.
- Porreca F, Ossipov MH, Gebhart GF. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci*. 2002;25(6):319-25.
- Braz J, Beaufour C, Coutaux A, et al. Therapeutic efficacy in experimental polyarthritis of viral-driven enkephalin overproduction in sensory neurons. *J Neurosci*. 2001;21(20):7881-8.
- Hao S, Wolfe D, Glorioso JC, Mata M, Fink DJ.. Effects of transgene-mediated endomorphin-2 in inflammatory pain. *Eur J Pain*. 2009;13(4): 380-6.
- Yeomans DC, Levinson SR, Peters MC, et al. Decrease in inflammatory hyperalgesia by herpes vector-mediated knockdown of Nav1.7 sodium channels in primary afferents. *Hum Gene Ther*. 2005;16(2):271-7.
- Finegold AA, Mannes AJ, Ladarola MJ. A paracrine paradigm for in vivo gene therapy in the central nervous system: treatment of chronic pain. *Hum Gene Ther*. 1999;10(7):1251-7.
- Xu Y, Gu Y, Xu GY, Wu P, Li GW, Huang LY. Adeno-associated viral transfer of opioid receptor gene to primary sensory neurons: a strategy to increase opioid antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):6204-9.
- Martins I, Cabral L, Pinto A, Wilson SP, Lima D, Tavares I. Reversal of inflammatory pain by HSV-1-mediated overexpression of enkephalin in the caudal ventrolateral medulla. *Eur J Pain*. 2011; 15(10):1008-14.
- Pinto M, Castro AR, Tshudy F, Wilson SP, Lima D, Tavares I. Opioids modulate pain facilitation from the dorsal reticular nucleus. *Mol Cell Neurosci*. 2008;39(4):508-18.
- Kang W, Wilson MA, Bender MA, Glorioso JC, Wilson SP. Herpes virus-mediated preproenkephalin gene transfer to the amygdala is antinociceptive. *Brain Res*. 1998; 792(1):133-5.

22. Lu Y, McNearney TA, Lin W, Wilson SP, Yeomans DC, Westlund KN. Treatment of inflamed pancreas with enkephalin encoding HSV-1 recombinant vector reduces inflammatory damage and behavioral sequelae. *Mol Ther.* 2007;15(10):1812-9.
23. Wolfe D, Hao S, Hu J, et al. Engineering an endomorphin-2 gene for use in Neuropathic pain therapy. *Pain.* 2007;133(1-3):29-38.
24. Hao S, Mata M, Glorioso JC, Fink DJ. HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces Neuropathic pain. *Mol Pain.* 2006;2:6.
25. Peng XM, Zhou ZG, Glorioso JC, Fink DJ, Mata M. Tumor necrosis factor-alpha contributes to below-level Neuropathic pain after spinal cord injury. *Ann Neurol.* 2006;59(5):843-51.
26. Hao S, Mata M, Wolfe D, Huang S, Glorioso JC, Fink DJ. Gene transfer of glutamic acid decarboxylase reduces Neuropathic pain. *Ann Neurol.* 2005;57(6):914-8.
27. Milligan ED, Langer SJ, Sloane EM, et al. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *Eur J Neurosci* 2005;21(8):2136-48.
28. Yao MZ, Gu JF, Wang JH, Sun LY, Liu H, Liu XY. Adenovirus-mediated interleukin-2 gene therapy of nociception. *Gene Ther.* 2003;10(16):1392-9.
29. Milligan ED, Sloane EM, Langer SJ, et al. Controlling Neuropathic pain by adeno-associated virus driven production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *Mol Pain.* 2005;1:9.
30. Kim SJ, et al. Effective relief of Neuropathic pain by adeno-associated virus-mediated expression of a small hairpin RNA against GTP cyclohydrolase 1. *Mol Pain.* 2009;5:67.
31. Kim SJ, Lee WI, Lee YS, et al. Sensory neuron targeting by self-complementary AAV8 via lumbar puncture for chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(3):1055-60.
32. Pezet S, Krzyzanowska A, Wong LF, et al. Reversal of neurochemical changes and pain-related behavior in a model of Neuropathic pain using modified lentiviral vectors expressing GDNF. *Mol Ther.* 2006;13(6):1101-9.
33. Meunier A, Latrémolière A, Dominguez E, et al. Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced Neuropathic pain in the rat. *Mol Ther.* 2007;15(4):p687-97.
34. Martins I, Costa-Araújo S, Fadel J, Wilson SP, Lima D, Tavares I. Reversal of Neuropathic pain by HSV-1-mediated decrease of nor-adrenaline in a pain facilitatory area of the brain. *Pain.* 2010;151(1):137-45.
35. Wilson SP, Yeomans DC, Bender MA, Lu Y, Goins WF, Glorioso JC. Antihyperalgesic effects of infection with a preproenkephalin-encoding herpes virus. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1999;96(6):3211-6.
36. Yeomans DC, et al. Recombinant herpes vector-mediated analgesia in a primate model of hyperalgesia. *Mol Ther.* 2006;13(3): 589-97.
37. Yeomans DC, Lu Y, Laurito CE, et al. Gene therapy for bladder overactivity and nociception with herpes simplex virus vectors expressing preproenkephalin. *Hum Gene Ther.* 2009;20(1):63-71.
38. Jasmin L, Rabkin SD, Granato A, Boudah A, Ohara PT. Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. *Nature.* 2003;424(6946): 316-20.
39. Cabañero D, Célérier E, García-Nogales P, et al. The pro-nociceptive effects of remifentanyl or surgical injury in mice are associated with a decrease in delta-opioid receptor mRNA levels: Prevention of the nociceptive response by on-site delivery of enkephalins. *Pain.* 2009;141(1-2):88-96.
40. Goss JR, Harley CF, Mata M, et al. Herpes vector-mediated expression of preenkephalin reduces bone cancer pain. *Ann Neurol.* 2002;52(5):662-5.
41. Meunier A, Latrémolière A, Mauborgne A, et al. Attenuation of pain-related behavior in a rat model of trigeminal Neuropathic pain by viral-driven enkephalin overproduction in trigeminal ganglion neurons. *Mol Ther.* 2005; 11(4):608-16.
42. Vit JP, Ohara PT, Sundberg C, et al. Adenovector GAD65 gene delivery into the rat trigeminal ganglion produces orofacial analgesia. *Mol Pain.* 2009;5:42.
43. Glorioso JC, Fink DJ. Herpes vector-mediated gene transfer in the treatment of chronic pain. *Mol Ther.* 2009;17(1):13-8.
44. Goss JR, Gold MS, Glorioso JC. HSV vector-mediated modification of primary nociceptor afferents: an approach to inhibit chronic pain. *Gene Ther.* 2009;16(4):493-501.
45. Goins WF, Cohen JB, Glorioso JC. Gene therapy for the treatment of chronic peripheral nervous system pain. *Neurobiol Dis.* 2012;48(2): 255-70.
46. Hao S, Mata M, Goins W, Glorioso JC, Fink DJ. Transgene-mediated enkephalin release enhances the effect of morphine and evades tolerance to produce a sustained antiallodynic effect in Neuropathic pain. *Pain.* 2003;102(1-2):135-42.
47. Liu J, Wolfe D, Hao S, et al. Peripherally delivered glutamic acid decarboxylase gene therapy for spinal cord injury pain. *Mol Ther.* 2004;10(1):57-66.
48. Zhou Z, Peng X, Hao S, Fink DJ, Mata M. HSV-mediated transfer of interleukin-10 reduces inflammatory pain through modulation of membrane tumor necrosis factor alpha in spinal cord microglia. *Gene Ther.* 2008; 15(3):183-90.
49. Hao S, Mata M, Glorioso JC, Fink DJ. Gene transfer to interfere with TNFalpha signaling in Neuropathic pain. *Gene Ther.* 2007;14(13):1010-6.
50. Staud R. Evidence for shared pain mechanisms in osteoarthritis, low back pain, and fibromyalgia. *Curr Rheumatol Rep.* 2011;13(6): 513-20.
51. Howarth PW, Thornton SR, O'Brien V, et al. Retrograde viral vector-mediated inhibition of pontospinal noradrenergic neurons causes hyperalgesia in rats. *J Neurosci.* 2009;29(41):12855-64.
52. Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol.* 2006;80(2):53-83.
53. Tavares I, Lima D. The caudal ventrolateral medulla as an important inhibitory modulator of pain transmission in the spinal cord. *J Pain.* 2002;3(5):337-46.
54. Lima D, Almeida A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Prog Neurobiol.* 2002;66(2):81-108.
55. Martins I, Pinto M, Wilson SP, Lima D, Tavares I. Dynamic of migration of HSV-1 from a medullary pronociceptive centre: antinociception by overexpression of the preproenkephalin transgene. *Eur J Neurosci.* 2008;28(10):2075-83.
56. Marques-Lopes J, Martins I, Pinho D, et al. Decrease in the expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the nucleus tractus solitarius induces antinociception and increases blood pressure. *J Neurosci Res.* 2012;90(2): 356-66.
57. Almeida A, Cobos A, Tavares I, Lima D. Brain afferents to the medullary dorsal reticular nucleus: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Eur J Neurosci.* 2002;16(1):81-95.
58. Cobos A, Lima D, Almeida A, Tavares I. Brain afferents to the lateral caudal ventrolateral medulla: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Neuroscience.* 2003;120(2):485-98.
59. Chiocca EA, Choi BB, Cai WZ, et al. Transfer and expression of the lacZ gene in rat brain neurons mediated by herpes simplex virus mutants. *New Biol.* 1990;2(8):739-46.
60. Fink DJ, Wechuck J, Mata M, et al. Gene therapy for pain: results of a phase I clinical trial. *Ann Neurol.* 2011;70(2):207-12.
61. Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM. Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci.* 1984;7:223-55.
62. Fink DJ, Wolfe D. Gene Therapy for Pain: A Perspective. *Pain Manag.* 2011;1(5):379-381.
63. Turk DC. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for patients with chronic pain. *Clin J Pain.* 2002;18(6):355-65.
64. Wu CL, Garry MG, Zollo RA, Yang J. Gene therapy for the management of pain: Part I: Methods and strategies. *Anesthesiology.* 2001; 94(6):1119-32.
65. Weiss K, Boullis NM. Herpes Simplex Virus-Based Gene Therapies for Chronic Pain. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 2012; 26(3):291-3.
66. Machelska H, Schroff M, Oswald D, et al. Peripheral non-viral MIDGE vector-driven delivery of beta-endorphin in inflammatory pain. *Mol Pain.* 2009;5:72.
67. Goss JR, Cascio M, Goins WF, et al. HSV delivery of a ligand-regulated endogenous ion channel gene to sensory neurons results in pain control following channel activation. *Mol Ther.* 2011;19(3): 500-6.
68. Lee M, Silverman SM, Hansen H, Patel VB, Manchikanti L. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia. *Pain Physician.* 2011;14(2):145-61.
69. Kissin I, Szallasi A. Therapeutic targeting of TRPV1 by resiniferatoxin, from preclinical studies to clinical trials. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(17):2159-70.
70. Srinivasan R, Wolfe D, Goss J, et al. Protein kinase C epsilon contributes to basal and sensitizing responses of TRPV1 to capsaicin in rat dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci.* 2008;28(7):1241-54.
71. Doehring A, Geisslinger G, Lotsch J. Epigenetics in pain and analgesia: an imminent research field. *Eur J Pain.* 2011;15(1):11-6.
72. Simonato M, et al. Progress in gene therapy for neurological disorder. *Nat Rev Neurol.* 2013;5(5):277-91.