

DOR[®]

Órgão de Expressão Oficial da APED

Volume 10, Número 2, 2002

Volume monotemático

A DOR E A INVESTIGAÇÃO EM PORTUGAL

Editora convidada: **Prof^a Dra. Deolinda Lima**

Director

José Manuel Castro Lopes

Director Executivo

José Manuel Caseiro

Acessora de Direcção

Ana Regalado

Conselho Científico

António Coimbra

António Palha

Aquiles Gonçalo

Armando Brito e Sá

Cardoso da Silva

Daniel Serrão

(P^o) Feytor Pinto

Gonçalves Ferreira

Helder Camelo

João Duarte

Jorge Tavares

José Luis Portela

José Manuel Castro Lopes

Maia Miguel

Martins da Cunha

Nestor Rodrigues

Robert Martins

Walter Oswald

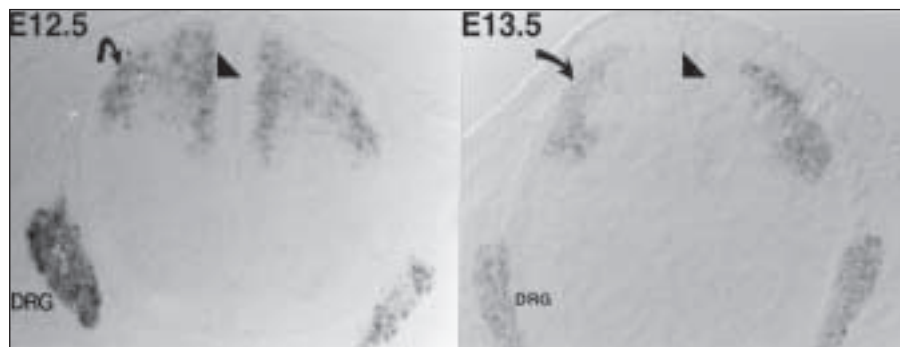
Zeferino Bastos

Sumário

Editorial I O 4 ^o Dia Nacional de Luta Contra a Dor <i>José Manuel Caseiro</i>	3
Editorial II Os Bastidores da Dor <i>Deolinda Lima</i>	4
Mensagem do Presidente da APED <i>José Manuel Castro-Lopes</i>	5
Papel do Factor de Transcrição DRG11 no Desenvolvimento do Sistema Nociceptivo <i>Sandra Rebelo, Zhoufeng Chen, David Anderson, Deolinda Lima</i>	7
Perspectivas de Manipulação do Sistema Endógeno de Controlo da DOR: o Bolbo Raquidiano Ventrolateral <i>Isaura Tavares, António Albino-Teixeira, Deolinda Lima</i>	11
The Medullary Dorsal Reticular Nucleus (DRt) Enhances the Responses of Spinal Nociceptive Neurons to Peripheral Stimulation: a Role in Central Sensitization? <i>Christophe Dugast</i>	16
Reorganização Funcional de Populações de Neurónios Somatossensitivos Espinais e Talâmicos Induzida por Dor Persistente <i>Vasco Galhardo</i>	19
A Hiperactividade Vesical e a Alodinia Provocadas pela Inflamação Vesical Crónica são Mediadas por Aferentes Primários Sensíveis aos Vanilóides <i>Paulo Diniz, Ana Charrua, João Silva, António Avelino, Francisco Cruz</i>	27
Envolvimento dos Receptores Metabotrópicos do Glutamato na Dor Crónica: Estudo Experimental <i>Fani Lourenço Moreira Neto, José Manuel Castro-Lopes</i>	30



PERMANYER PORTUGAL



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 diskete 3.5" 2HD (1.4 Mb) ou zip 100 Mb, para a seguinte morada:

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

ou, em alternativa, por e-mail: aped@mail.pt

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.



© 2002 Permanyer Portugal
Av. Duque d'Ávila, 92 - 7º E
1050-084 Lisboa
Tel.: 21 315 60 81 Fax: 21 330 42 96



Impresso em papel totalmente livre de cloro



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

ISSN: 0872-4814
Dep. Legal: B-17.364-00
Ref.: 212BP022/182AP021

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 nesta revista são da responsabilidade exclusiva dos seus autores.

Editorial I

O 4º Dia Nacional de Luta Contra a Dor

José Manuel Caseiro

Quando este número da Revista *Dor* chegar às mãos dos nossos leitores, já se cumpriu, no dia 14 de Junho, o 4º Dia Nacional de Luta Contra a Dor. Digo “cumpriu” e não “comemorou”, porque a comemoração, essa, terá sido este ano na véspera, de forma a permitir algo mais destinado ao grande público, aproveitando-se o Feriado da Cidade de Lisboa.

Mas o que pretendo verdadeiramente fazer hoje, ao escrever sobre esta efeméride, é reflectir – com preocupação, diga-se – sobre o que tem de facto representado a comemoração deste dia.

Quando em 1999 o comemorámos pela primeira vez, tivemos, para além da presença do Director Geral da Saúde, a simbólica e importantíssima presença da Senhora Ministra da Saúde, Dra. Maria de Belém Roseira (onde estaríamos ainda hoje, sem o empenho dela), que, meses antes, tinha nomeado um Grupo de Trabalho para a concepção de um Plano Nacional de Luta contra a Dor. Recordo-me que, para essa primeira comemoração, foram convidados todos os Directores Hospitalares e que, na assistência, apenas se encontravam dois ou três.

No ano seguinte, com o Grupo de Trabalho em pleno labor, o Dia Nacional foi comemorado na Cidade do Porto, com uma sessão científica em torno da problemática das lombalgias e também com a participação de um representante do Director Geral da Saúde, tendo tido a agradável presença de mais de 80 pessoas, embora novamente com uma maciça ausência dos responsáveis hospitalares.

O 3º ano foi comemorado com o mais importante congresso jamais realizado pela APED, o DOR 2001, na cidade de Espinho, numa cerimónia que prometia a presença da Senhora Ministra da Saúde e a que se seguiria um debate em torno da temática da especialização em Algologia/Medicina da Dor. A Senhora Ministra, Dra. Manuela Arcanjo, faltou e o debate foi, em meu entender, um fiasco, numa altura em que estava já aprovado, por Despacho Ministerial de 26 de Março de 2001, o Plano Nacional de Luta Contra a Dor.

Quatro meses depois, aquando da comemoração portuguesa da Semana Europeia Contra a Dor, foi finalmente apresentado pelo Director Geral da Saúde o Plano Nacional de Luta Contra a Dor, com uma tiragem de 50.000 exemplares e uma estranha distribuição que continua a justificar que muita gente ainda não tenha tido acesso a ele. A aceitação foi, no entanto, muito favorável por parte dos que o leram. Poucos dias depois, era anunciada a formação de uma Comissão de Acompanhamento do Plano.

Na prática, após 3 anos, 4 festejos, um Plano e uma Comissão de Acompanhamento, o que é que já mudou de facto? Nada.

Dir-me-ão que ainda decorreu pouco tempo e eu perguntarei quanto tempo necessita ter passado para

assistirmos a uma primeira e efectiva medida ou acção no sentido de se começarem a cumprir alguns dos objectivos e recomendações que são enunciados naquele documento, que, de resto, se propõe atingir ambiciosas metas até ao ano de 2007.

Penso que a Comissão de Acompanhamento terá já reunido uma vez, embora não tenha sido ainda divulgada qualquer iniciativa, mas o facto de um grande número dos seus elementos – nomeadamente alguns Presidentes das ARS – se terem feito representar, deixa-me apreensivo e interessado em conhecer respostas a questões que passo a colocar:

1. Porquê fazerem-se representar? Se não tinham disponibilidade para pertencerem à Comissão ou se essa actividade não era suficientemente importante para ser desempenhada pelos próprios, teria sido mais natural a nomeação efectiva das pessoas mais adequadas.
2. Por quem se fizeram representar? Tenho tido algumas informações contraditórias sobre vários nomes que terão estado presentes na primeira reunião e outros que poderão ainda surgir e que, a confirmarem-se, poderão determinar a presença naquele grupo de pessoas que manifestaram discordância na forma como o Plano foi feito ou que, por actuarem noutras áreas da actividade clínica, nem sempre se identificaram com os objectivos dele.
3. Que posição deverá a APED assumir perante esta realidade? Aceitar qualquer nome que surja por indicação meramente pessoal dos que se quiseram fazer representar ou ter uma palavra a dizer na indicação dos mesmos? Tudo aponta para que, dos 26 colaboradores efectivos que se envolveram na elaboração do mais importante documento sobre Dor que jamais se fez em Portugal, apenas tenhamos a tranquilizadora (e, a meu ver, indispensável) presença do Dr. Alexandre Diniz.

Numa altura em que existe a intenção, já votada em Assembleia Geral da APED, de se caminhar para a atribuição de uma Competência em Terapêutica da Dor (não entendi bem com que finalidade, embora tivesse visto muita gente interessada) seria deplorável assistirmos dentro de algum tempo a uma profusão de médicos com “Competência em Dor”, sem ter havido a correspondente criação de novas Unidades, o harmonioso desenvolvimento de algumas das já existentes nem o incremento da capacidade formativa indispensável à melhoria das condições assistenciais do SNS.

Assim sendo, que significado se poderá atribuir a uma bem sucedida corrida no passado dia 13: o número de comparências? O número de desistências? Os números da assistência? O enfoque dos *media*?

Se for apenas isso, comece-se já a planear o 5º Dia Nacional de Luta Contra a Dor.

Editorial II

Os Bastidores da Dor

Deolinda Lima

Olhar para a investigação básica na área da dor é, como em muitos outros domínios das ciências da saúde, penetrar em espaços estranhos, algo confusos senão mesmo bizarros, díspares e aparentemente desgarrados, que pouco ou nada deixam antever da representação em cena. São espaços pequenos e obscuros, ligados por caminhos estreitos e labirínticos que mal se identificam, mas que conduzem sempre e no tempo certo ao grande espectáculo. Espectáculo dinâmico e interactivo onde de todos se espera, do palco à plateia, qualquer valiosa intervenção.

Habitúamo-nos, com alguma consternação, a ver a ciência básica considerada como algo ao serviço da curiosidade de uns tantos que se divertem a procurar respostas a questões mais ou menos inteligentes mas, quiçá, irrelevantes e divorciadas de qualquer propósito que sirva o bem comum. Envergonhamo-nos às vezes de não encontrarmos um objectivo humanitário no dia a dia do nosso trabalho e esforçamo-nos, ou para auto-satisfação ou para fazer vingar até em termos financeiros os nossos intentos, por definir a utilidade daquilo que fazemos.

E assim carregamos o nosso dia a dia em que, porém, nada há a condenar senão a consternação e o constrangimento. Todo o trabalho dirigido para a produção de conhecimento tem de servir, sob pena de não ser profícuo, a curiosidade e satisfação de quem o pratica. E não há conhecimento que seja irrelevante ou nada tenha a ver com a nossa realidade, já que é por nós e à custa da nossa vivência que é criado. Pelo contrário, importa que brote da condição humana como a água das fontes, espontânea e ininterruptamente, e não apenas porque alguém tem sede. Um dia, seguramente, quando menos se espere, alguém o irá beber. Encontrará então o seu caminho e chegará, humilde ou triunfante, ao palco principal para aí desempenhar o seu papel.

Por outro lado, procurar objectivos, ou seja, seguindo a metáfora, tentar fazer chegar a nossa pequena participação à peça em causa, é algo de desejável, mas se no tempo certo e não forçado prematuramente de modo a criar limites à criatividade científica. É, no entanto, tarefa a partilhar com quem conhece bem o cenário e a plateia. Aplicar o conhecimento passa pela actividade concertada de quem o produz e de quem o utiliza. Ao cientista compete traçar caminhos que conduzam a resultados práticos sempre que tal se vislumbre como possível. Ao clínico cabe procurar nos dados das ciências básicas o conhecimento de que necessita e criar condições para a sua utilização.

O grupo que dirijo, sediado na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e no IBMC, é um dos muitos que, por esse mundo fora, laboram arduamente na investigação da fisiopatologia da dor. Herdou do seu criador, o

Prof. Antonio Coimbra, a sede desinteressada pelo saber. Ouvi-o, ainda no dealbar da minha carreira, nos tempos utilitaristas da revolução de Abril, afirmar como havia recusado e sempre recusaria fazer investigação que fosse forçosamente aplicada, mas vi-o brilhar de júbilo quando no laboratório se iniciaram, pelas mãos de Francisco Cruz, os primeiros trabalhos ligados directamente à actividade clínica. É este o espírito que ainda nos governa, que nos leva a querer saber como é que se forma o sistema nociceptivo ou a pensar em novas maneiras de manipular o sistema de controlo endógeno da dor.

Os trabalhos que se seguem são uma pequena amostra, porventura representativa, dos vários estudos em curso no laboratório. São também o exemplo do que para trás deixei dito. O caminhar de muitos anos através da estrutura do sistema nociceptivo levou-nos, por exemplo, à descoberta de uma área do encéfalo, o núcleo reticular dorsal, que, ao contrário das restantes regiões supraspinais de controlo da dor, tem acção pró-nociceptiva. Surgiu então a ideia de potenciar o efeito analgésico da manipulação supraspinal à custa da associação do bloqueio deste núcleo com a estimulação de um núcleo inibitório. Em paralelo, em campos de investigação básica completamente diversos, gerava-se a capacidade de, por meio de terapia génica, actuar especificamente e por períodos de tempo prolongados sobre células seleccionadas. E é assim que, em colaboração com um grupo dos Estados Unidos especializado na concepção e produção de vectores víricos, iniciámos investigação orientada para o bloqueio específico das células que promovem facilitação da dor no núcleo reticular dorsal, e a estimulação das que inibem a dor na substância reticular ventrolateral caudal.

Ainda a título de exemplo, é o nosso grupo pioneiro na utilização de electrofisiologia por meio de multieléctrodos para o estudo da dor. O objectivo é saber como é que os neurónios somato-sensitivos se organizam, enquanto população, em situações de dor aguda ou quando a dor evolui para a cronicidade. Entrámos por este caminho no completo desconhecimento do que iríamos encontrar, embora convictos de que alguma forma de re-organização de circuitos deveria ocorrer. A ser assim, tentar a reparação desses circuitos por microestimulação, eventualmente recorrendo a dispositivos biónicos, será o objectivo seguinte. Quem sabe se a dor crónica se mantém, pelo menos em parte, devido à má estruturação dos neurónios em rede, e se a reversão deste processo conduzirá a algum alívio da dor!

Será que tudo isto com que, de modo lúdico (porque não?), vamos preenchendo as nossas muitas horas de trabalho terá alguma utilidade no futuro. Nós acreditamos que sim.

Mensagem do Presidente da APED

José Manuel Castro-Lopes

Decorreu no passado dia 16 de Março em Coimbra, a Assembleia Geral da APED que visava a adopção de uma posição institucional face à questão da diferenciação médica em Medicina da Dor. Naquela que foi uma das mais concorridas assembleias da história da APED, foi com facilidade e sem surpresa que se chegou ao consenso quanto à necessidade de se criar um mecanismo de titulação que correspondesse a uma efectiva diferenciação dos profissionais que se dedicam a esta área. Embora balizados por constrangimentos legais decorrentes dos estatutos da Ordem dos Médicos, entidade que detém o exclusivo da atribuição de titulações médicas no nosso país, foi um pouco surpreendente a aprovação por unanimidade da proposta do Presidente da APED no sentido de se propor à Ordem dos Médicos a criação da competência em Medicina da Dor. Diga-se, no entanto, que esta unanimidade na votação não é sinónimo de unanimidade de ideias e conceitos, pois enquanto para alguns a criação da competência é, para já, um objectivo em si, para outros trata-se apenas de um meio para alcançar um outro desiderato, nomeadamente a criação de uma especialidade, tendo sido aprovada uma moção nesse sentido. Pessoalmente, não estou totalmente convencido da necessidade ou da utilidade da criação da especialidade, mas também não tenho motivos fundamentados que me levem a pensar o contrário. Creio, contudo, que a experiência de outros países europeus, onde a especialidade já existe, aconselha a uma ponderação e a uma discussão profunda, que evite tomar-se uma decisão precipitada que possa vir a comprometer o futuro profissional dos colegas que eventualmente enveredassem por esse caminho.

Como todos sabemos, abordagem e terapêutica da dor tem um carácter multidisciplinar. A criação da competência em Medicina da Dor deve pois reflectir essa característica, e o debate sobre esta matéria tem vindo a demonstrar que outras sociedades científicas poderão trazer um contributo importante para alcançarmos aquele objectivo. A título de exemplo, ainda muito recentemente, o Presidente e uma das Vicepresidentes da APED foram convidados a participar numa mesa redonda em que se debateu esta questão no Forum de Neurologia 2002, organizado pela Sociedade Portuguesa de Neurologia. A Direcção da APED decidiu, pois, para dar cumprimento à deliberação da Assembleia Geral, convidar algumas sociedades científicas cujos associados estão mais directamente envolvidos no combate à dor, a associarem-se numa proposta conjunta a apresentar à Ordem dos Médicos num futuro próximo. Não é nossa intenção excluir quem quer que seja mas sim reunir sinergismos de forma a aumentar a qualida-

de, a base de apoio e o peso relativo da nossa proposta, para que o objectivo da criação de uma competência verdadeiramente multidisciplinar seja atingido. Será seguramente um caminho longo e difícil, mas que percorreremos com empenho e determinação.

No âmbito europeu, a EFIC (*European Federation of IASP Chapters*) reuniu-se em Bruxelas, em meados de Abril, estando a representação da APED a cargo do seu Presidente. Tratava-se de uma reunião importante, não só pelos documentos que estavam em discussão e votação, mas também porque iriam ser eleitos os membros do Conselho Executivo para os próximos 3 anos.

Foi aprovado um documento relativo à necessidade de incluir um programa curricular mínimo de 20 h, contendo noções básicas sobre os mecanismos e terapêutica da dor, no programa curricular da formação pré-graduada nas escolas médicas europeias. No nosso país, as Faculdades de Medicina têm autonomia total no que se refere à definição dos programas curriculares. Deste modo, o documento da EFIC ser-lhes-á enviado pela APED, apenas a título de recomendação.

Foi igualmente aprovado o documento que recomenda a criação em todos os países europeus de uma subespecialização/competência em Medicina da Dor (a palavra competência foi introduzida no documento por proposta da APED, mas já é utilizada noutros países), com carácter de pós-graduação após a obtenção de uma outra especialização, com um programa curricular a definir mas seguramente baseado no *Core Curriculum for Professional Education in Pain* publicado pela IASP, e com a duração aconselhada de dois anos.

Por fim, aprovou-se um documento dirigido ao público em geral, contendo informações sobre as origens da dor, possibilidades terapêuticas, organismos assistenciais, etc., documento esse que irá ser adaptado e traduzido para a realidade e as línguas dos diversos países representados na EFIC.

Relativamente ao novo Conselho Executivo, foram eleitos o Prof. Harald Breivik, de Oslo, para o cargo de presidente da EFIC, o Prof. Serdar Erdine, de Istambul e anterior secretário da EFIC, para o cargo de Presidente-eleito, o Dr. Chris Wells, de Liverpool para o cargo de Secretário, e o Presidente da APED para o cargo de tesoureiro. Se a nomeação como candidato ao cargo já foi por si só uma surpresa, a vitória na eleição revestiu-se de particular significado e importância para a APED (tanto mais quanto havia mais três candidatos ao cargo), que assim se vê representada pela primeira vez num órgão executivo internacional no âmbito da dor. Do ponto de vista pessoal, trata-se de uma enorme responsabilidade, acrescida pela necessidade de se preparar o próximo congresso da EFIC, a decorrer em Setembro

do próximo ano em Praga, assumindo grande parte das responsabilidades da Comissão Organizadora Local, dado o diferendo existente com a empresa a que tinha sido entregue a sua realização.

Para terminar, gostaria de chamar a atenção para a comemoração do 4º Dia Nacional de Luta Contra a Dor. Na sequência da decisão da APED em realizar este ano uma acção virada essencialmente para a consciencialização do público em geral para o problema do combate à dor, foi decidido organizar, com a colaboração da Federação Portuguesa de Atletismo, uma Corrida

Contra a Dor. No entanto, dado que este ano o dia 14 de Junho é uma sexta-feira, foi necessário antecipar a realização da corrida para o dia 13, feriado municipal em Lisboa, onde a corrida decorrerá entre a Praça do Município e Belém, a partir das 10 h. Para além de atletas federados e atletas deficientes, a corrida é aberta ao público em geral, não sendo imposto qualquer ritmo ou obrigação de cumprir a totalidade do percurso. Apelo pois à participação de todos os sócios da APED que possam estar presentes, a dar o seu contributo para esta corrida-festa contra a dor.

Papel do Factor de Transcrição DRG11 no Desenvolvimento do Sistema Nociceptivo

Sandra Rebelo¹, Zhoufeng Chen², David Anderson³, Deolinda Lima¹

Resumo

O estabelecimento de circuitos neuronais precisos entre os neurónios sensitivos aferentes primários e os neurónios do corno dorsal da medula espinhal é essencial para a percepção de estímulos nóxicos. Contudo, os mecanismos moleculares que controlam o estabelecimento destas conexões são ainda pouco conhecidos.

Estudos recentes, apresentados neste trabalho, indicam que o gene *drg11* desempenha papel determinante no desenvolvimento do circuito nociceptivo, sendo essencial no estabelecimento das conexões entre os neurónios nociceptivos e os seus alvos centrais no corno dorsal da medula espinhal. O factor de transcrição DRG11, pertencente à família de proteínas *paired homeodomain*, é expresso exclusivamente em neurónios aferentes primários do gânglio raquidiano, e nos respectivos alvos no corno dorsal. Embriões *knockout* para o *drg11* exibem alterações espaçotemporais da projecção no corno dorsal da medula espinhal das fibras sensitivas aferentes primárias, assim como defeitos na morfogénese do próprio corno dorsal. Estas alterações, detectadas durante o desenvolvimento embrionário inicial, conduzem, no adulto, a atenuação significativa da sensibilidade a estímulos nóxicos. Contrastando com este facto, as funções proprioceptivo-sensitivo-motoras parecem normais

Palavras chave: Dor. Medula espinhal. Ratinho. Enevação periférica. Aferentes primários. Nociceptores.

Summary

The perception of external sensory information by the brain requires highly ordered synaptic connectivity between peripheral sensory neurons and neurons in the dorsal horn of the spinal cord. However, the molecular mechanisms that control the establishment of such connectivity are poorly understood.

Here we show that the *drg11* gene plays an essential role during the development of the nociceptive circuit, being critical in the establishment of connections between the nociceptive neurons and their central targets in the dorsal horn of the spinal cord. DRG11, a paired homeodomain transcription factor, is exclusively expressed by both primary sensory neurons in dorsal root ganglia and their central targets in the dorsal horn. *Drg11* knockout embryos display abnormalities in the spatio-temporal patterning of primary sensory afferent fiber projections to the dorsal spinal cord, as well as defects in dorsal horn morphogenesis. These early development abnormalities lead, in adults, to a significant reduction in sensitivity to noxious stimuli. In contrast, proprioceptive-sensory-motor functions appear normal.

¹Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina do Porto e IBMC, Universidade do Porto, Porto, Portugal

²Department of Anaesthesiology, Washington University School of Medicine St. Louis, MO, USA

³Division of Biology 216-76 and Howard Hughes Medical Institute, California Institute of Technology Pasadena, CA, USA

Introdução

A percepção pelo cérebro de informação sensitiva externa requer o estabelecimento de redes neuronais apropriadas, que incluem ligações correctas entre neurónios aferentes primários e os seus alvos centrais. Os neurónios aferentes primários, localizados nos gânglios raquidianos, constituem uma população heterogénea que reconhece diferentes modalidades sensitivas: dor (nociceptores), tacto (mecanoceptores) e posição (proprioceptores) (Scott, 1992). As diferentes modalidades estão associadas a projecções topograficamente distintas para a medula espinhal. Apesar da elevada especialização funcional e anatómica, todos os neurónios sensitivos somáticos são derivados de uma única população de precursores, a crista neural. Os mecanismos moleculares que estão por detrás da especificação destes neurónios durante o desenvolvimento, assim como os mecanismos que determinam a ligação precisa aos respectivos alvos, são ainda pouco conhecidos.

Em 1995, Saito, et al., isolaram um gene, o *drg11*, através de *differential reverse-transcriptase-based PCR* (RT-PCR). O modo de distribuição periférica e espinhal da expressão do DRG11 (neurónios sensitivos primários e lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal), permitiu propor desde logo que se tratasse de um marcador específico de neurónios nociceptivos.

Para estudar a função do *drg11 in vivo*, o gene foi detectado no ratinho através de uma técnica denominada de *gene targeting*. A análise estrutural e funcional detalhada dos ratinhos *drg11^{-/-}* revelou alterações graves remanescentes dos fenótipos de alguns animais com perturbações das vias nociceptivas.

Resultados

Em embriões *wild-type* (wt) a expressão genética do DRG11 é detectada nos gânglios raquidianos a partir do dia embrionário 11.5 (E11.5), e no corno dorsal da

medula um dia mais tarde (Fig. 1), altura em que as primeiras fibras aferentes primárias penetram na substância cinzenta espinhal.

Testes dolorosos usando estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (Cao, et al., 1998) revelaram que os ratinhos *knockout* (ko; *-/-*) para o *drg11* são menos sensíveis à dor quando comparados com os heterozigóticos ou wt. Em ratinhos *drg11^{-/-}*, tanto a dor aguda como a sustentada estavam reduzidas quando comparadas com os outros dois grupos de animais. Experiências controlo, destinadas a excluir a possibilidade de os resultados obtidos nas experiências de comportamento nociceptivo serem devidos a anomalias motoras, não revelaram diferenças significativas no comportamento no *treadmill test* entre os diversos grupos de animais testados. Estes resultados sugerem que em ratinhos *drg11^{-/-}* haja alterações da nocicepção sem que a propriocepção seja afectada.

Estudos da medula espinhal com colorações pelo método de Nissl e por imunocitoquímica para marcadores de fibras aferentes primárias, tais como calbindina, *calcitonin-gene-related-peptide* (CGRP), calretinina, substância P e o receptor do *nerve growth factor* (NGF) *trkA*, revelaram alterações na arquitectura do corno dorsal e no padrão de expressão dos vários marcadores, com distribuição anormal e diminuição da intensidade nos *drg11^{-/-}* por comparação com os wt. Particularmente notório era o facto de os neurónios das duas metades do corno dorsal formarem uma coluna contínua sob o funículo dorsal, conferindo à medula espinhal forma achatada, em claro contraste com os ratinhos wt, onde as duas metades da medula espinhal se encontravam perfeitamente separadas pelo funículo dorsal. A coloração da calbindina (Ren, et al., 1993) revelou um atraso na ocupação por fibras sensitivas da superfície do corno dorsal da medula espinhal, que acontecia apenas no dia E16.5, embora o padrão de expressão

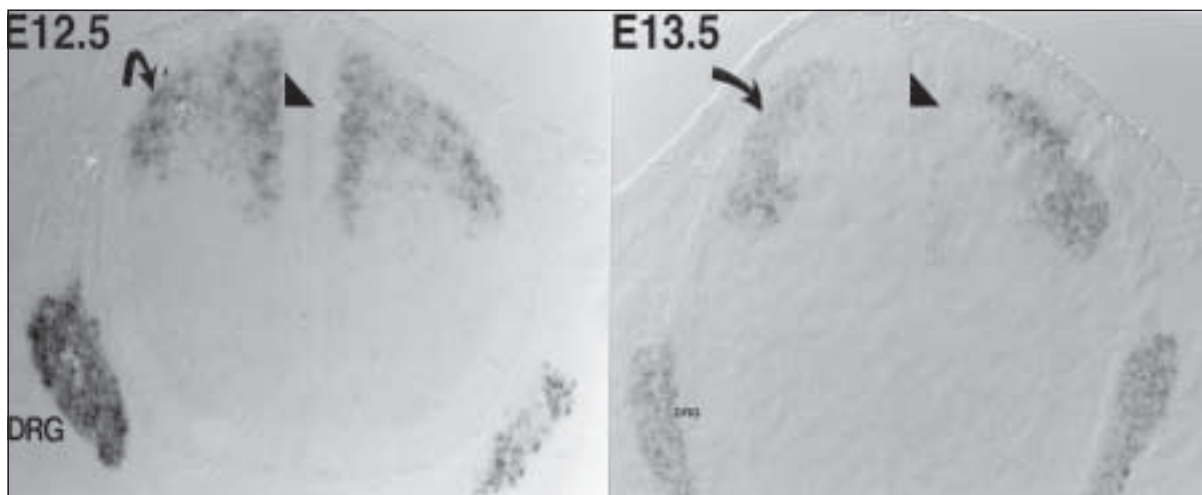


Figura 1. Expressão de ARNm de DRG11 na medula espinhal e gânglio raquidiano em embriões wild-type E12.5 (A) e E13.5 (B). (A) A partir do dia E12.5, a expressão do gene a nível espinhal ocorre em duas zonas distintas, uma correspondente a células em migração a partir da zona ventricular (cabeça de seta) e outra na porção superficial do corno dorsal, junto à zona de entrada das raízes dorsais (seta curva). (B) Em embriões de 13.5 dias a expressão do DRG11 fora da zona ventricular (cabeça de seta) encontra-se diminuída, mas a área correspondente à parte dorsal da medula espinhal regista aumento de expressão (seta curva). A partir do dia 18.5 a expressão de DRG11 restringe-se às futuras lâminas superficiais da medula espinhal (não se mostra na figura). A expressão de DRG11 nos gânglios raquidianos (DRG) é notória em ambas as imagens.

correspondesse ao normal. As células CGRP- e trkA-positivas estavam ausentes do terço mais lateral do corno dorsal, e a expressão neuronal da cinase proteica C γ (PKC γ) na lâmina II interna estava completamente abolida a partir do dia 2 pós-natal (P2) (Fig. 2).

Pela utilização do método de TUNEL foi demonstrada a ocorrência de morte celular anormalmente acentuada em embriões ko a partir do dia E17.5, ou seja, 4 dias após a instalação das alterações estruturais atrás referidas, observação que sugere que a apoptose não esteja na base dos defeitos imputados ao DRG11, mas antes seja a sua consequência.

A comparação do número total de neurónios e de neurónios CGRP- ou trkA-positivos dos gânglios raquidianos L3 e L4 em ratinhos ko e wt, através da utilização de métodos estereológicos (Cavalieri, 1966; Weibel, 1979; Gundersen e Jensen, 1987), não revelou diferenças em embriões E14.5. Nos adultos, no entanto, verificava-se um decréscimo de cerca de 30% do número total de células coradas pelo método de Nissl ($p < 0,05$), e idêntico decréscimo nos neurónios CGRP e trkA positivos em ratinhos ko. O número de neurónios grandes que expressavam neurofilamento 52 (NF52), marcador de células grandes do gânglio raquidiano, não era significativamente diferente entre os animais wt e ko.

O estudo, em microscopia confocal, da enervação por fibras CGRP-positivas de vários tecidos periféricos, nomeadamente a parede da bexiga, a pele do dorso e plantar e a membrana sinovial, revelou redução considerável da área ocupada por fibras imunorreactivas em ratinhos ko por comparação com os wt, em todos os tipos de tecidos (Fig. 3).

Ficou assim provado que a redução, em animais adultos, do número de neurónios CGRP e trkA dos gânglios raquidianos compromete a enervação periférica, devendo por si só constituir um agente importante dos defeitos nociceptivos.

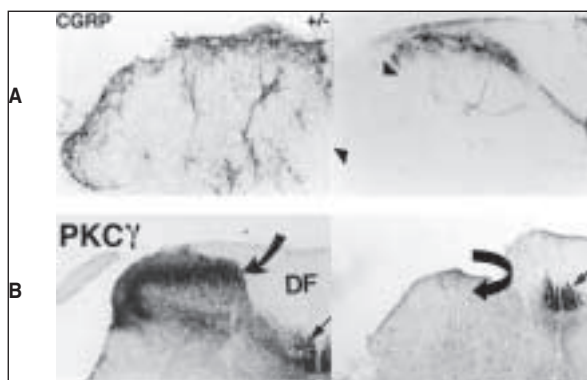


Figura 2. Projecção das fibras sensitivas aferentes primárias e perda de neurónios no corno dorsal da medula espinal em ratinhos *drg11*^{-/-}. (A) As fibras aferentes primárias nociceptivas, identificadas por imunorreacção para o CGRP, encontram-se em número reduzido na porção lateral do corno dorsal da medula espinal (entre cabeças das setas). (B) A expressão neuronal da proteína cinase C γ (PKC γ) está completamente abolida da lamina II (seta grande em curva). Notar a presença de marcação no tracto corticoespinal, que serve como controlo positivo da reacção de imunocitoquímica (setas pequenas).

Discussão

Até aos estudos que conduziram aos resultados agora coligidos, era praticamente nulo o nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento das vias nociceptivas. No entanto, alguns factores de transcrição implicados no desenvolvimento de neurónios sensitivos haviam já sido identificados, embora não exclusivamente em neurónios nociceptivos. Os genes da neurogenina (*ngn*) 1 (*ngn1*), a *ngn* 2 e o *Brn3a* são conhecidos por serem necessários à diferenciação de mais do que um subtipo de neurónios sensitivos em diferentes fases do desenvolvimento (Huang, et al., 1999; Ma, et al., 1999). Factores de transcrição pertencentes ao domínio ETS, como o ER81 e o PEA3 estão presentes numa subpopulação de neurónios proprioceptivos e nos seus alvos centrais, os motoneurónios (Arber, et al., 2000). Outros estudos revelam que mutações em genes como o NGF (Crowley, et al., 1994), o seu receptor trkA (Smeyne, et al., 1994), a *ngn1* (Ma, et al., 1999) e o *Brn3.0* (McEville, et al., 1996; Xiang, et al., 1996), afectam o desenvolvimento de nociceptores. Contudo, nenhuma destas mutações afecta o estabelecimento inicial das conexões entre o gânglio raquidiano e o corno dorsal espinal.

Neste trabalho é demonstrada a participação do factor de transcrição DRG11 na diferenciação do circuito nociceptivo. A mutação do gene *drg11* contribui para deficiências na morfogénese do corno dorsal espinal que se associam a alterações de natureza espaçotemporal no padrão de projecção das fibras aferentes

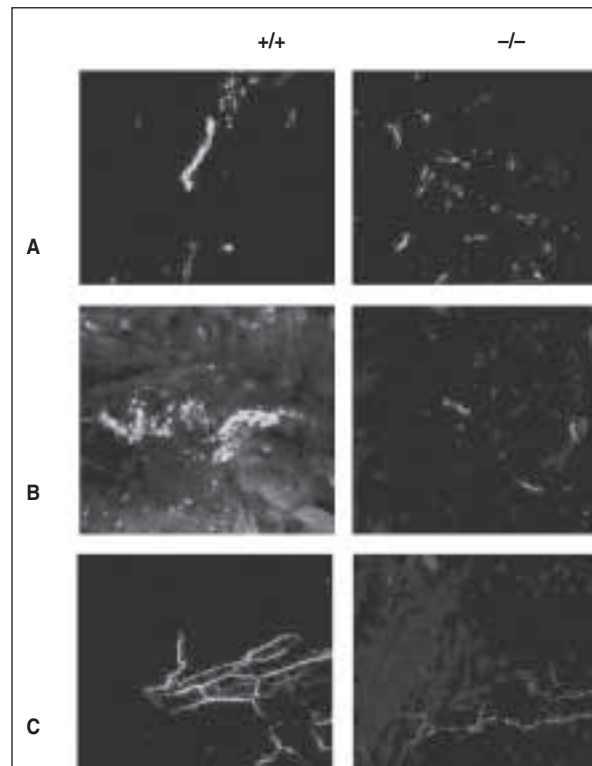


Figura 3. Enervação por fibras imunorreactivas para o CGRP de vários tecidos periféricos em ratinhos wild-type e *drg11*^{-/-}. (A) Pele lombar. (B) Bexiga. (C) Tecido sinovial. Notar a diminuição da área ocupada por fibras imunorreactivas em todos os tecidos, em ratinhos *drg11*^{-/-}.

primárias no corno dorsal. Os dados reunidos apontam para que estas alterações estejam na origem de uma cascata de acontecimentos que passam pela morte celular, tanto no corno dorsal como, mais tarde, no gânglio raquidiano, e culminam numa marcada redução da sensibilidade nociceptiva na vida adulta.

As alterações na morfologia do corno dorsal e no padrão de projecção das fibras aferentes primárias são notórias entre os dias E13.5 e E14.5, enquanto o aumento na morte celular se torna detectável apenas alguns dias mais tarde (E17.5). A morte celular parece assim ser secundária às alterações induzidas pela mutação durante o desenvolvimento inicial. Um mecanismo possível é a perda de suporte trófico anterógrado fornecido às células do corno dorsal pelas projecções aferentes (Michael, et al., 1997; Tonra, 1999), uma vez que estas projecções só atingem o corno dorsal no dia E12.5. Em alternativa, o DRG11 poderá ser importante também para a sobrevivência neuronal tardia.

Uma vez que o DRG11 é expresso no gânglio raquidiano e na medula espinhal, os defeitos observados nos animais *drg11^{-/-}* poderão reflectir uma acção coordenada, mas independente, do DRG11 nos sistemas nervosos central e periférico. No entanto, vários dados parecem fornecer indicação de que as aberrações sejam devidas ao mau desenvolvimento do corno dorsal da medula espinhal. O número de neurónios ganglionares *trkA*-positivos e a expressão de diversos marcadores dos neurónios sensitivos primários parecem normais no dia E14.5, enquanto a chegada das fibras aferentes primárias à zona de entrada das raízes dorsais não está temporalmente afectada. As alterações morfogenéticas observadas no corno dorsal são semelhantes às observadas nos mutantes para o *Lmx1b*, em que a expressão de DRG11 está ausente no corno dorsal mas não no gânglio. O *Lmx1b* é um factor de transcrição do *homeodomain* LIM, expresso no corno dorsal da medula espinhal, mas não no gânglio (Adams, et al., 2000). A perda selectiva da expressão de DRG11 na medula destes mutantes parece indicar que o fenótipo do corno dorsal observado nos mutantes para o *drg11* se deva primariamente à falta de DRG11 no corno dorsal.

A ser assim, o atraso da entrada de fibras aferentes primárias na substância cinzenta do corno dorsal seria resultado da malformação desta região espinhal. É sabido que os neurónios do corno dorsal segregam substâncias quimiotácteis, como, por exemplo, as proteínas Slit (Wang, et al., 1999), que atraem as fibras sensitivas dos aferentes primários à substância cinzenta. Ainda que em experiências preliminares não se tenha observado diminuição marcada da expressão de ARNm de Slit em embriões *drg11^{-/-}*, não se deve excluir a possibilidade do DRG11 controlar a expressão de outra(s) substância(s) desta natureza ainda não identificada(s) no corno dorsal. O ARNm do DRG11 é muito abundante na região dorso-lateral da medula espinhal e em animais *drg11^{-/-}* a sua expressão cai dramaticamente lateralmente. Um defeito na secreção de uma substância tipo Slit, controlada pelo DRG11, tornaria a porção lateral do corno dorsal muito menos atractiva para as fibras aferentes primárias, o que explicaria a redução da densidade de enervação na porção mais lateral da superfície do corno dorsal. A *up-regulation* de um factor quimiorrepelente normalmente reprimido pelo DRG11 teria um efeito semelhante, pelo que deve igualmente ser considerada. Em alternativa, o DRG11 poderá não controlar directamente a expressão de um factor atractivo ou repelente relacionado

com o crescimento axonal, mas antes influenciar a diferenciação ou migração de neurónios do corno dorsal que viriam a segregar essas moléculas.

A redução marcada de sensibilidade a estímulos nócicos de natureza diversa em ratinhos *drg11^{-/-}* poderá estar relacionada com o decréscimo do número de células ganglionares CGRP e *trkA* positivas e consequente diminuição da enervação dos tecidos periféricos. Uma vez que 70% da população neuronal sensitiva do adulto é constituída por neurónios nociceptivos cutâneos, a perda de neurónios sensitivos aferentes primários em ratinhos *drg11^{-/-}*, reflecte uma diminuição na maioria daquela subpopulação, ainda que não se possa excluir que outras classes de neurónios sensitivos possam também estar afectadas. Resultados recentes indicam, porém, que os neurónios grandes do gânglio raquidiano não sejam afectados pela ablação do gene *drg11*.

Em conclusão, o factor de transcrição DRG11 é determinante na formação dos circuitos somatossensitivos em vertebrados, nomeadamente naqueles que estão implicados na resposta à dor. Está porém por identificar o papel exacto do DRG11, para o que se torna necessário o reconhecimento dos seus alvos *downstream*.

Bibliografia

- Adams KA, Maida JM, Golden JA, Riddle RD. The transcription factor *Lmx1b* maintains Wnt 1 expression within the isthmus organizer. *Development* 2000;127:1857-67.
- Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM. ETS gene *Er81* controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* 2000;101:485-98.
- Cao YQ, Mantyh PW, Carlson EJ, Gillespie AM, Epstein CJ, Basbaum AI. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 1998;392:390-4.
- Cavalieri B. *Geometria degli Indivisibili*. Torino: Unione Tipografica Editrice 1966.
- Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, et al. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 1994;76:1001-11.
- Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987;147:229-63.
- Huang EJ, Zang K, Schmidt A, Saulys A, Xiang M, Reichardt LF. POU domain factor *BRN-3a* controls the differentiation and survival of trigeminal neurons by regulating *Trk* receptor expression. *Development* 1999;126:2869-82.
- Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson DJ. NEUROGENIN 1 and NEUROGENIN 2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes & Dev* 1999;13:1717-28.
- McEvilly RJ, Erkman L, Lou L, Sawchenko PE, Ryan AF, Rosenfeld MG. Requirement for *Brn-3.0* in differentiation and survival of sensory and motor neurons. *Nature* 1996;384:574-7.
- Michael GJ, Averill S, Nitkunan A, Rattray M, Bennett DL, Yan Q, et al. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in *TrkA*-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neuroscience* 1997;17:8476-90.
- Ren K, Ruda MA, Jacobowitz DM. Immunohistochemical localization of calcitonin in the dorsal root ganglion and spinal cord of the rat. *Brain Res Bull* 1993;31:13-22.
- Saito T, Greenwood A, Sun Q, Anderson D. Identification by differential RT-PCR of a novel paired homeodomain protein specifically expressed in sensory neurons and a subset of their CNS targets. *Molecular and Cellular Neuroscience* 1995;6:280-92.
- Scott SA. *Sensory Neurons: Diversity, Development, and Plasticity*. New York, Oxford: Oxford University Press 1992.
- Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Long LK, Bryant S, Lewin A, et al. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted *Trk/NGF* receptor gene. *Nature* 1994;368:246-9.
- Tonra JR. Classical and novel directions in neurotrophin transport and research: anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor by sensory neurons. *Microsc Res Tech* 1999;45:225-32.
- Wang F, Nemes A, Mendelson M, Axel R. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 1998;93:47-60.
- Weibel ER. *Stereological Methods. Vol 1. Practical Methods for Biological Morphometry*. London: Academic Press 1979.
- Xiang MQ, Gan L, Zhou L, Klein WH, Nathans J. Targeted deletion of the mouse POU domain gene *Brn-3a* causes a selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;90:227-31.

Perspectivas de Manipulação do Sistema Endógeno de Controlo da DOR: o Bolbo Raquidiano Ventrolateral

Isaura Tavares¹, António Albino-Teixeira², Deolinda Lima¹

Resumo

Neste trabalho revemos os dados relativos ao papel do bolbo raquidiano ventrolateral caudal (VLM) no sistema endógeno de controlo da dor. Apresentamos os resultados de estudos que mostram que o VLM é uma estrutura anatomofuncionalmente compartimentada em que a porção mais lateral (VLMlat) parece ser a mais importante no controlo da dor e na integração das funções antinociceptiva e cardiovascular. Discute-se a relevância destes dados na perspectiva de produção de analgesia sustentada por manipulação específica de populações neuronais no sistema endógeno de controlo da dor.

Palavras chave: Modulação da dor. Tronco cerebral. Integração nociceptiva e cardiovascular. Estudo experimental.

Summary

This paper is aimed at reviewing the role of the caudal ventrolateral medulla (VLM) in the endogenous pain modulatory system. According to recent anatomofunctional data, the VLM presents several regions of which the lateralmost part (VLMlat) is specially devoted to nociceptive-cardiovascular integration. We further discuss the putative application of these findings to the production of analgesia by specific manipulation of the areas of the endogenous pain modulatory system.

Key words:

O conceito de que a dor possui uma natureza multifacetada encontrava-se implícito na teoria clássica do *gate control* (Melzak e Wall, 1965). Já aí se admitiam os mecanismos de controlo supraspinal como um dos factores determinantes das características do evento doloroso. As abordagens experimentais do **sistema endógeno de controlo da dor** identificaram-no inicialmente com a substância cinzenta periaqueductal (PAG) e o grande núcleo do rafe (NRM) que, quando estimulados electricamente, induziam analgesia comportamental e inibiam as respostas nociceptivas de neurónios do corno dorsal da medula espinal (Liebeskind, et al., 1973; Satoh, et al., 1980).

A complexidade do sistema endógeno de controlo da dor foi-se evidenciando progressivamente. Após as descrições iniciais da indução de analgesia por estimulação eléctrica da PAG e NRM verificou-se que os componentes do sistema se distribuíam por diversas regiões encefálicas e que as suas propriedades antinociceptivas podiam também ser evidenciadas por estimulação química com glutamato e substâncias opióides (Jensen e Yaksh, 1984; revisão por Jones, 1992). Dados mais recentes mostraram que alguns componentes do sistema facilitam a transmissão dolorosa dado que a sua estimulação induz hiperalgesia (Almeida, et al., 1996, 1999) e exacerba as respostas de neurónios espinhais (Dugast, *este número*). À assumpção inicial de que a acção analgésica sobre a medula espinal resultava de dois sistemas neuroquímicos distintos (noradrenérgico e serotoninérgico) tem-se sobreposto uma visão mais complexa da participação simultânea doutros neurotransmissores adicionais que interagem de um modo específico em cada componente do sistema endógeno de controlo da dor.

¹Instituto de Histologia e Embriologia

²Instituto de Farmacologia e Terapêutica, Faculdade de Medicina e IBMC, Universidade do Porto
4200-319 Porto, Portugal

Finalmente, o sistema participa no controlo doutras funções que condicionam a percepção dolorosa e são afectadas pelo evento doloroso. Apesar dos estudos efectuados no Homem terem mostrado que a estimulação eléctrica de áreas do sistema endógeno de controlo da dor, como o tálamo e a PAG, produzem alívio em pacientes com dor crónica (Baskin, et al., 1986; Boivie e Meyerson, 1982; revisão por Simpson, 1999), a natureza invasiva das técnicas de estimulação, associadas ao facto de algumas daquelas funções afectarem parâmetros vitais, tem restringido a aplicação clínica dos resultados obtidos na experimentação animal. Efectivamente, muitas das áreas mais importantes do sistema endógeno de controlo da dor localizam-se no bulbo raquidiano e são centros-chave na modulação de funções autónomas, como a cardiovascular e respiratória. A compreensão do funcionamento daqueles componentes do sistema no controlo simultâneo da dor e de outras funções pode ajudar a estabelecer estratégias de abordagem que maximizem as potencialidades analgésicas e evitem os efeitos colaterais da sua estimulação. Neste trabalho reunimos dados recentes relativos ao funcionamento do **bolbo raquidiano ventrolateral caudal (VLM)** na integração das funções antinociceptiva e cardiovascular.

Envolvimento no controlo da dor

Durante os estudos do sistema endógeno de controlo da dor, o VLM tem emergido como um dos componentes preponderantes. A analgesia produzida por estimulação eléctrica ou química do VLM é mais intensa e duradoura do que a obtida a partir da maioria dos restantes componentes do sistema (Gebhart e Ossipov, 1986; Janss and Gebhart, 1987, 1988). Para além disso, o VLM parece ser responsável pela inibição tónica das respostas nociceptivas dos neurónios da medula espinhal (Foong e Duggan, 1986; Hall, et al., 1982). Os estudos anatómicos têm corroborado a importância do VLM no controlo da dor e apontado a sua porção mais lateral – designada **VLMIat** (Fig. 1) – como a área mais relevante para aquele fenómeno.

Ao contrário dos restantes componentes do VLM, o VLMIat recebe projecções de neurónios das lâminas mais superficiais da medula espinhal (Lima, et al., 1991; Lima e Coimbra, 1991), que veiculam estímulos nociceptivos até aquela região bulbar (Menétrey, et al., 1984; Tavares, et al., 1993). No que respeita às vias descendentes, o VLMIat projecta para a medula espinhal através de circuitos directos e polissinápticos. Quanto aos primeiros, o VLMIat projecta exclusivamente para lâminas da medula espinhal onde ocorrem neurónios nociceptivos nomeadamente as lâminas I, IV-V e X (Tavares e Lima, 1994; *dados pessoais não publicados*). Dados recentes mostraram que o VLMIat forma circuitos recíprocos com a lâmina I: axónios provenientes do VLMIat contactam neurónios da lâmina I que projectam para o VLMIat (Fig. 1). Para além disso, os axónios que ascendem da medula espinhal contactam neurónios do VLMIat que projectam para a medula (Fig. 1). Dada a natureza nociceptiva dos neurónios espinais (Menétrey, et al., 1984; Tavares, et al., 1993),

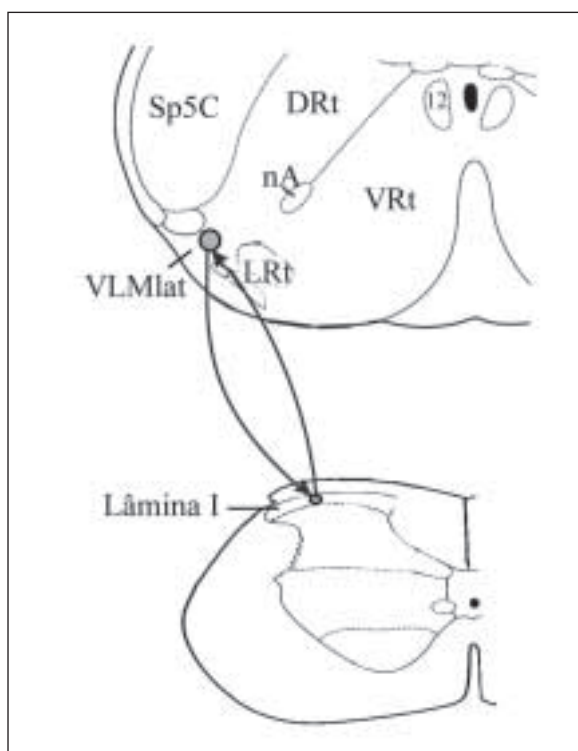


Figura 1. Diagrama ilustrativo do circuito recíproco entre o VLMIat e a medula espinhal. Abreviaturas: L2 – núcleo hipoglossico; DRt – núcleo reticular dorsal; LRT – núcleo reticular lateral; nA – núcleo ambíguo; Sp5C – núcleo espinal do trigémio; VRt – núcleo reticular ventral.

admite-se que o circuito recíproco funcione, em *feedback*, no controlo da transmissão supraspinal da informação dolorosa.

No que respeita às conexões indirectas com a medula espinhal, os dados mostraram a existência de um circuito polissináptico que envolve o grupo noradrenérgico A₅, localizado na ponte: axónios provenientes do VLMIat estabelecem contactos sinápticos com neurónios do grupo A₅ que projectam para o corno dorsal da medula espinhal (Tavares, et al., 1996, 1997a). A proposta de que esta via polissináptica medeia a analgesia por receptores adrenérgicos do tipo α_2 , produzida a partir do VLMIat (Gebhart e Ossipov, 1986), foi recentemente confirmada por estudos funcionais. A destruição selectiva de neurónios noradrenérgicos do grupo A₅ que projectam simultaneamente para a medula espinhal e para o VLMIat, provoca hiperalgesia e aumenta a expressão do proto-oncogene *c-fos* na medula espinhal, induzida por estimulação dolorosa (*dados pessoais não publicados*).

Integração nociceptiva e cardiovascular

A redundância aparente da coexistência de 2 vias de projecção do VLMIat para a medula espinhal poderá relacionar-se com o papel do VLMIat na integração de actividades antinociceptivas e cardiovasculares. A interacção entre os 2 fenómenos tem sido repetida-

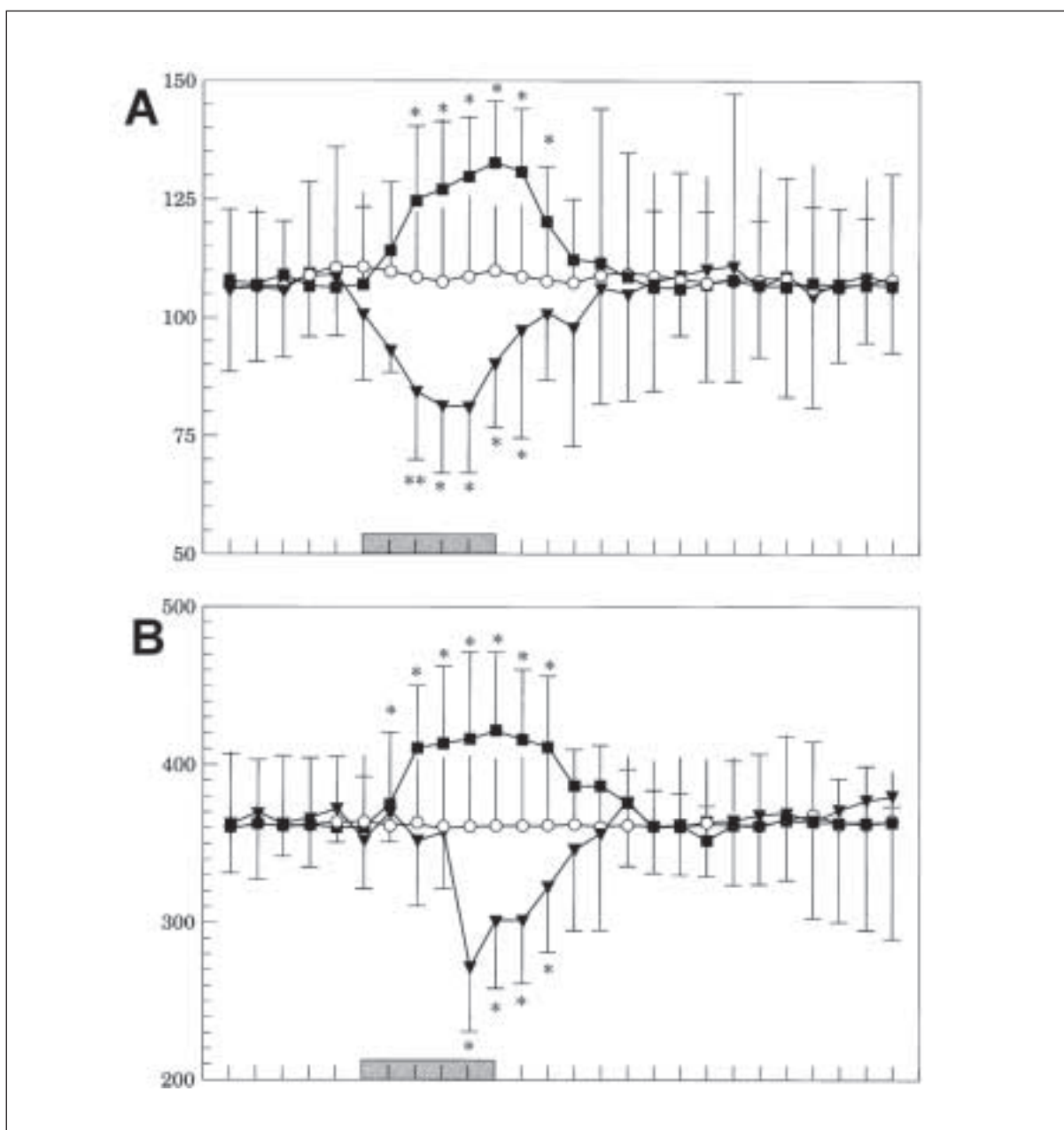


Figura 2. Efeito da estimulação ou lesão do VLMIat na pressão arterial média (A; mmHg) e ritmo cardíaco (B; número de batimentos por minuto). Estes parâmetros foram determinados por registo directo na artéria femural. Nas abscissas assinala-se a sombreado o período de infusão de soro fisiológico (círculos), glutamato (triângulos) ou ácido quinolínico (quadrados). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (adaptado de Tavares, et al., 1997b).

mente demonstrada. À visão mais clássica de que a dor induz alterações cardiovasculares (Shapiro, 1961), têm vindo a juntar-se múltiplas evidências de que a pressão arterial condiciona a percepção dolorosa (revisões em Randich e Maixner, 1984; Zamir e Maixner, 1986). Os animais de laboratório com hipertensão espontânea (Zamir, et al., 1980; Maixner, et al., 1982; Randich, 1982) ou induzida (Eilam, et al., 1991; Thurston e Randich, 1990; Zamir e Segal, 1979), apresentam menor sensibilidade à estimulação dolorosa do que animais normotensos. Estudos posteriores permitiram alargar aquelas constatações ao Homem (Ghione, et al., 1985, 1988; Maixner, 1989, 1991; Ditto, et al.,

1993) e demonstrar que, mesmo em indivíduos normotensos, existe uma correlação directa entre os valores da pressão arterial e os limiares de resposta à dor (Bruel, et al., 1992). Posteriormente, verificou-se que a hipoalgesia observada durante estados hipertensivos no rato resultava da inibição de neurónios espinhais (Randich e Robertson, 1994; Tavares, et al., 1995) e que esta era induzida supraspinalmente através das vias noradrenérgicas descendentes (Thurston e Randich, 1990). A sugestão implícita na proposta anterior de que o sistema endógeno de controlo da dor participa no fenómeno de integração nociceptiva e cardiovascular tornou mais complexa a concepção daquele siste-

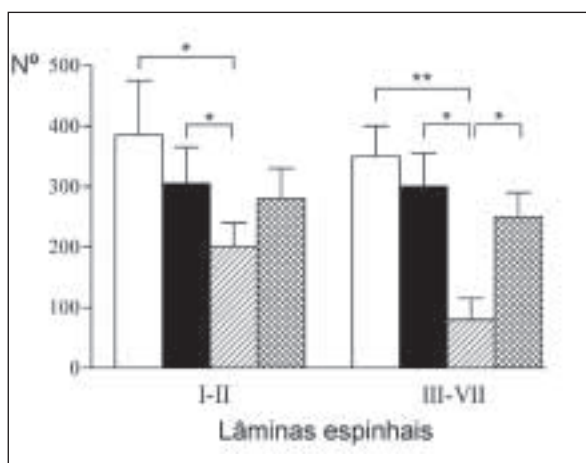


Figura 3. Efeito da lesão do VLMLat na expressão do proto-oncogene c-fos (média \pm erro padrão da média) no corno dorsal superficial (lâminas I-II) ou profundo (III-VI) em animais hipertensos. Barras vazias – animais normotensos, VLMLat intacto. Barras a preto – animais normotensos, VLMLat lesado com ácido quinolínico. Barras a tracejado – animais hipertensos por coarctação da artéria renal, VLMLat intacto. Barras a tracejado cruzado – animais hipertensos por coarctação da artéria renal, VLMLat lesado com ácido quinolínico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (adaptado de Tavares, et al., 1997b).

ma. Efectivamente, a par da chegada de impulsos nociceptivos, as alterações cardiovasculares surgem como um dos factores activadores do sistema endógeno de controlo da dor. Estudos realizados no nosso laboratório apontaram o VLMLat como um dos componentes do sistema envolvidos na hipoalgesia observada durante a hipertensão. Numa primeira etapa verificámos que o VLMLat é uma área vasodepressora, dado que a sua estimulação química induzia descidas da pressão arterial e bradicardia, enquanto que efeitos opostos eram observados após lesão local (Fig. 2; Tavares, et al., 1997b).

O VLMLat deverá participar no circuito já descrito para o restante VLM, região que exerce efeitos vasodepressores por inibição da área vasopressora, localizada no bulbo ventrolateral rostral (Blessing e Li, 1989; Cravo, et al., 1991; revisão por Chalmers e Pilowsky, 1991). Verificou-se ainda que a lesão do VLMLat prevenia a inibição dos neurónios nociceptivos da medula espinhal observada em animais hipertensos (Fig. 3; Tavares, et al., 1997b).

Dado haver uma correlação directa entre as respostas nociceptivas dos neurónios espinhais e as reacções comportamentais à dor (Gogas, et al., 1991), os nossos resultados apontam para um envolvimento do VLMLat na hipoalgesia observada durante estados hipertensivos. Dado que, como referido atrás, este fenómeno envolve acções noradrenérgicas sobre a medula espinhal (Thurston e Randich, 1990) e a via dissinápica VLMLat-A₅-medula espinhal participa em tais acções, admite-se que a subida da pressão arterial tem um efeito duplo no VLMLat. Por um lado, produz-se hipoalgesia, como resultado da inibição das respostas à dor de neurónios espinhais através da via VLMLat-A₅-

medula espinhal e, por outro, há decréscimo da pressão arterial através da inibição da zona vasopressora. A via directa VLMLat - medula espinhal poderá estar particularmente vocacionada para actuar em situações em que o VLMLat é activado directamente por impulsos nociceptivos, que ascendem da medula espinhal através do circuito recíproco já descrito, e não por subidas da pressão arterial.

Manipulação do sistema endógeno de controlo da dor: que futuro?

A abordagem experimental do VLMLat sumarizada neste trabalho exemplifica a complexidade das questões que devem ser discutidas antes de se considerar a possibilidade de manipulação do sistema endógeno de controlo da dor com propósitos terapêuticos. A caracterização detalhada da participação do VLMLat na integração das funções nociceptiva e cardiovascular levanta, contudo, perspectivas importantes no que respeita à possibilidade de segregação das 2 funções no interior daquela região. Efectivamente, os neurónios envolvidos na primeira função devem ser distintos dos que participam na segunda dado que, como referido, o controlo da dor é mediado por conexões excitatórias com o grupo A₅ enquanto a via vasodepressora é exercida mediante inibição da área vasopressora. Interessa alargar este tipo de estudos a outros componentes do sistema endógeno de controlo da dor, no sentido de caracterizar os neurotransmissores e receptores específicos da modulação dolorosa. Deste modo, poder-se-ão desenvolver estratégias de manipulação selectiva daquelas populações neuronais, prevenindo efeitos indesejáveis da estimulação generalizada do sistema endógeno de controlo da dor. A possibilidade de obter expressão sustentada de neurotransmissores através das técnicas de terapia genética sugere que estas poderão vir a ser metodologias de eleição para solucionar aqueles problemas.

Agradecimentos

A investigação incluída neste trabalho foi subsidiada pelo "Programa Dor" da Fundação Calouste Gulbenkian e pelo Projecto nº POCTI/NSE/38952/2001 da Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Bibliografia

- Almeida A, Tjølsen A, Lima D, Coimbra A, Hole K. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Res Bull* 1996;39:7-15.
- Almeida A, Størkson R, Lima D, Hole K, Tjølsen A. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *Europ J Neurosci* 1999;11:110-22.
- Baskin DS, Mehler WR, Hosobuchi Y. Autopsy analysis of the safety, efficacy and cartography of electrical stimulation of the central gray in humans. *Brain Res* 1986;371:231-6.
- Blessing WW, Li YW. Inhibitory vasomotor neurons in the caudal ventrolateral region of the medulla oblongata. Em: Ciriello J, Caverson MM, Polosa C (eds). *The Central Neural Organization of Cardiovascular Control*. Amsterdam: Elsevier 1989:83-98.
- Boivie J, Meyerson BA. A correlative anatomical and clinical study of pain suppression by deep brain stimulation. *Pain* 1982;13:113-26.
- Bruehl S, Carlson CR, McCubbin JA. The relationship between pain sensitivity and blood pressure in normotensives. *Pain* 1992;48:463-7.
- Chalmers J, Pilowsky P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *J Hypertension* 1991; 9:675-94.

- Cravo SL, Morrison SF, Reis DJ. Differentiation of two cardiovascular regions within caudal ventrolateral medulla. *American J Physiol* 1991;261:985-94.
- Ditto B, Edwards MC, Miller S, D'Antono B, Blum S. The effects of sodium loading on blood pressure and pain responses to the cold pressor test. *J Psychom Res* 1993;37:771-80.
- Eilam R, Malach R, Bergmann F, Segal M. Hypertension induced by hypothalamic transplantation from genetically hypertensive to normotensive rats. *J Neurosci* 1991;11:401-11.
- Foong FW, Duggan AW. Brain-stem areas tonically inhibiting dorsal horn neurones: studies with microinjection of the GABA analogue piperidine-4-sulphonic acid. *Pain* 1986;27:361-71.
- Hall JG, Duggan AW, Morton CR, Johnson SM. The location of brainstem neurones tonically inhibiting dorsal horn neurones of the cat. *Brain Res* 1982;244:215-22.
- Gebhart GF, Ossipov MH. Characterization of inhibition of the spinal nociceptive tail-flick reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. *J Neurosci* 1986;6:701-13.
- Ghione S, Rosa C, Mezzasalma L, Panattoni E. Arterial hypertension is associated by hypoalgesia in humans. *Hypertension* 1988;12:491-7.
- Ghione S, Rosa C, Panattoni E, Nutti M, Mezzasalma L, Guiliano G. Comparisons of sensory and pain threshold in tooth pulp stimulation in normotensive man and essential hypertension. *J Hypertension* 1985;3:113-15.
- Gogas KR, Presley RW, Levine JD, Basbaum AI. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. *Neuroscience* 1991;41:617-28.
- Janss AJ, Gebhart GF. Spinal monoaminergic receptors mediate the antinociception produced by glutamate in the medullary lateral reticular nucleus. *J Neurosci* 1987;7:2862-73.
- Janss AJ, Gebhart GF. Quantitative characterization and spinal pathway mediating inhibition of spinal nociceptive transmission from the lateral reticular nucleus in the rat. *J Neurophysiol* 1988;59:226-47.
- Jensen TS, Yaksh TL. Spinal monoamine and opiate systems partly mediate the antinociceptive effects produced by glutamate at brainstem sites. *Brain Res* 1984;321:287-97.
- Jones SL. Descending control of nociception. Em: *Gildenberg P (ed). The initial processing of pain and its descending control: spinal and trigeminal systems*. Basel: Karger 1992;203-95.
- Liebeskind JC, Guilbaud G, Besson JM, Oliveras J. Analgesia from electrical stimulation of the periaqueductal gray matter in the cat: behavioral observations and inhibitory effects on spinal interneurons. *Brain Res* 1973;50:441-6.
- Lima D, Coimbra A. Neurons in the substantia gelatinosa rolandi (lamina II) project to the caudal ventrolateral reticular formation of the medulla oblongata in the rat. *Neurosci Lett* 1991;132:16-8.
- Lima D, Mendes-Ribeiro JA, Coimbra A. The spino-latero-reticular system of the rat: projections from the superficial dorsal horn and structural characterization of marginal neurons involved. *Neuroscience* 1991;45:137-52.
- Maixner W. Autonomic and somatosensory interactions: physiological and pathophysiological implications. *Proc Finn Dental Soc* 1989;85:395-407.
- Maixner W. Interactions between cardiovascular and pain modulatory systems: physiological and pathophysiological implications. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1991;2:3-12.
- Maixner W, Touw KB, Brody MJ, Gebhart GF, Long JP. Factors influencing the altered pain perception in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* 1982;237:137-45.
- Melzak R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150:971-9.
- Menétrey D, De Pommery J, Besson JM. Electrophysiological characteristics of lumbar spinal neurons backfired from the lateral reticular nucleus in the rat. *J Neurophysiol* 1984;52:595-609.
- Randich A. Sinoaortic baroreceptor reflex arc modulation of nociception in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Physiology and Psychology* 1982;10:267-72.
- Randich A, Maixner W. Interactions between cardiovascular and pain regulatory systems. *Neurosci Biobehav Rev* 1984;8:343-67.
- Randich A, Robertson JD. Spinal nociceptive transmission in the spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rat. *Pain* 1994;58:169-83.
- Satoh M, Akaike A, Nakazawa T, Takagi H. Evidence for involvement of separate mechanisms in the production of analgesia by electrical stimulation of the nucleus reticularis paragigantocellularis and nucleus raphe magnus in the rat. *Brain Res* 1980;194:525-9.
- Simpson BA. Spinal cord and brain stimulation. Em: *Wall PD, Melzak R (eds). Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone 1999:1353-81.
- Shapiro AP. An experimental study of comparative responses of blood pressure to different noxious stimuli. *J Chronic Disease* 1961;13:293-311.
- Tavares I, Lima D, Coimbra A. Neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord projecting to the medullary reticular formation express c-fos after noxious stimulation of the skin. *Brain Res* 1993;623:278-82.
- Tavares I, Lima D. Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord. *Exp Brain Res* 1994;99:455-63.
- Tavares I, Albino-Teixeira A, Lima D. Hypertension inhibits noxious evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *Neuroreport* 1995;6:1664-8.
- Tavares I, Lima D, Coimbra A. The ventrolateral medulla of the rat is connected with the spinal cord dorsal horn by an indirect descending pathway relayed in the A₅ noradrenergic cell group. *J Comp Neurol* 1996;374:84-95.
- Tavares I, Lima D, Coimbra A. The pontine A₅ noradrenergic cells which project to the spinal cord dorsal horn are reciprocally connected with the caudal ventrolateral medulla in the rat. *Europ J Neurosci* 1997;9:2452-61.
- Tavares I, Almeida A, Albino-Teixeira A, Lima D. Lesions of the caudal ventrolateral medulla block the hypertension-induced inhibition of noxious-evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *Europ J Pain* 1997;1:149-60.
- Thurston CL, Randich A. Acute increases in arterial blood pressure produced by occlusion of the abdominal aorta induces antinociception: peripheral and central substrates. *Brain Res* 1990;519:12-22.
- Zamir N, Maixner W. The relationship between cardiovascular and pain regulatory systems. *Ann NY Acad Sci* 1986;467:371-89.
- Zamir N, Simantov R, Segal M. Pain sensitivity and opioid activity in genetically hypertensive rats. *Brain Res* 1980;184:299-310.
- Zamir N, Segal M. Hypertension-induced analgesia: changes in pain sensitivity in experimental hypertensive rats. *Brain Res* 1979;160:170-3.

The Medullary Dorsal Reticular Nucleus (DRt) Enhances the Responses of Spinal Nociceptive Neurons to Peripheral Stimulation: a Role in Central Sensitization?

Christophe Dugast

Resumo

Utilizaram-se técnicas de registo extracelular da actividade neuronal combinadas com a aplicação de glutamato no núcleo reticular dorsal do bulbo raquidiano (DRt) para estudar a acção facilitatória deste núcleo sobre os neurónios nociceptivos da medula espinhal. O glutamato aumentava significativamente a *post-discharge* induzida nos neurónios nociceptivos pela estimulação eléctrica do nervo ciático, mas as respostas directas à estimulação das fibras C e A não sofriam alterações. Estes resultados confirmam os estudos anteriores que demonstraram uma acção facilitatória do DRt sobre a percepção da dor, e sugerem que este núcleo possa estar envolvido na sensibilização central.

Palabras chave: DRt. Medullary dorsal reticular nucleus. WDR, wide dynamic range.

Summary

Single-unit recordings associated with local applications of glutamate into the medullary dorsal reticular nucleus (DRt) were used to assess the putative descending facilitatory action of this nucleus upon spinal nociceptive neurons. Glutamate dramatically increased the post-discharge of nociceptive neurons induced by the noxious electrical stimulation of the sciatic nerve, whereas A- and C-fibre mediated responses remained unchanged. This data indicates that the DRt enhances the capacity of spinal nociceptive neurones to respond to noxious stimulation by prolonging their discharge. This result is in agreement with previous studies showing a descending facilitation of the DRt upon pain perception and suggests the implication of the DRt in central sensitization.

Key words: Electrophysiology. Facilitation. Glutamate. Pain. Sensitization.

Introduction

The medullary dorsal reticular nucleus has been shown to be involved in pain modulation by exerting pronociceptive actions upon spinal nociceptive transmission. Its activation by local application of an excitatory amino acid decreased pain threshold in tail-flick test (Almeida, et al., 1996). In contrast, its lesion increased the pain threshold in both tail-flick and hot-

plate tests (Almeida, et al., 1996), decreased the time spent in pain behaviour during the formalin test and spinal *c-fos* induction, a reliable marker of spinal neuronal nociceptive activation (Lima, et al., 1994; Almeida, et al., 1999). On the other hand, anatomical studies aimed at devising the neuronal circuitry underlying the DRt nociceptive facilitating action showed that the DRt is reciprocally connected with the spinal dorsal horn, through a putatively excitatory bi-directional feed-back loop (Almeida, et al., 1993, 2000).

In order to get physiological support to the putative descending pronociceptive action of the DRt upon spinal neurons, we analysed the effect of DRt stimulation upon the activity of wide dynamic range (WDR) neurons using extracellular single unit recordings.

Material and methods

Experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC) and the guidelines of the International Association for the Study of Pain. Male Sprague-Dawley rats were anaesthetised with urethane. Their skull was mounted in a stereotaxic frame and drilled above the DRt in order to lower a Hamilton syringe containing glutamate dissolved in saline solution. A laminectomy was performed to expose lumbar spinal segments. The ipsilateral sciatic nerve was carefully dissected free in order to receive a bipolar electrode. The stimulation applied was a continuous train at 0.2 Hz composed of rectangular current pulses (one every 5 s) of noxious intensity. Single-unit activities were detected through conventional electronics and sent to a computer for display, storage and off-line analysis. Only neurons in the dorsal horn ipsilateral to the DRt, and responding to electrical noxious stimuli, were considered. Evoked responses were analysed on the entire subsequent 5-s inter-pulse interval and discriminated according to their delay of occurrence relative to the inducing pulse.

Results

Noxious electrical stimulation of the sciatic nerve induced responses of spinal WDR neurons appearing

with a specific delay relative to the inducing stimulation pulse. According to current classification, fast (0-0.004 and 0.004-0.04 s) responses were typically mediated by the low-threshold A α and A β afferents, respectively, while slow ones (0.04-0.2 s) involved high-threshold C afferents (Gasser and Erlanger, 1927; Burgess and Perl, 1973). Repetitive electrical stimulation at 0.2 Hz could also evoke more delayed responses currently referred as post-discharge (0.2-5.0 s).

Injection of glutamate (10 mM) into the DRt dramatically increased the post discharge of WDR neurons whereas A- and C-fibre mediated responses remained unaffected throughout the recording (Fig. 1A). Surprisingly, glutamate-induced effects appeared about 400 s after the injection, and developed slowly. Afterwards, despite a slight decrease, the post-discharge remained at a higher level than before injection; an effect that persisted during the entire experimental period and that was observed only in the presence of peripheral stimulation. In contrast, vehicle (NaCl 0.9% containing eosin 0.5%) did not induce any modifications of any of the evoked responses (Fig. 1B).

Discussion

Our study was aimed at elucidating the neuronal basis of the putative pronociceptive influence of the DRt

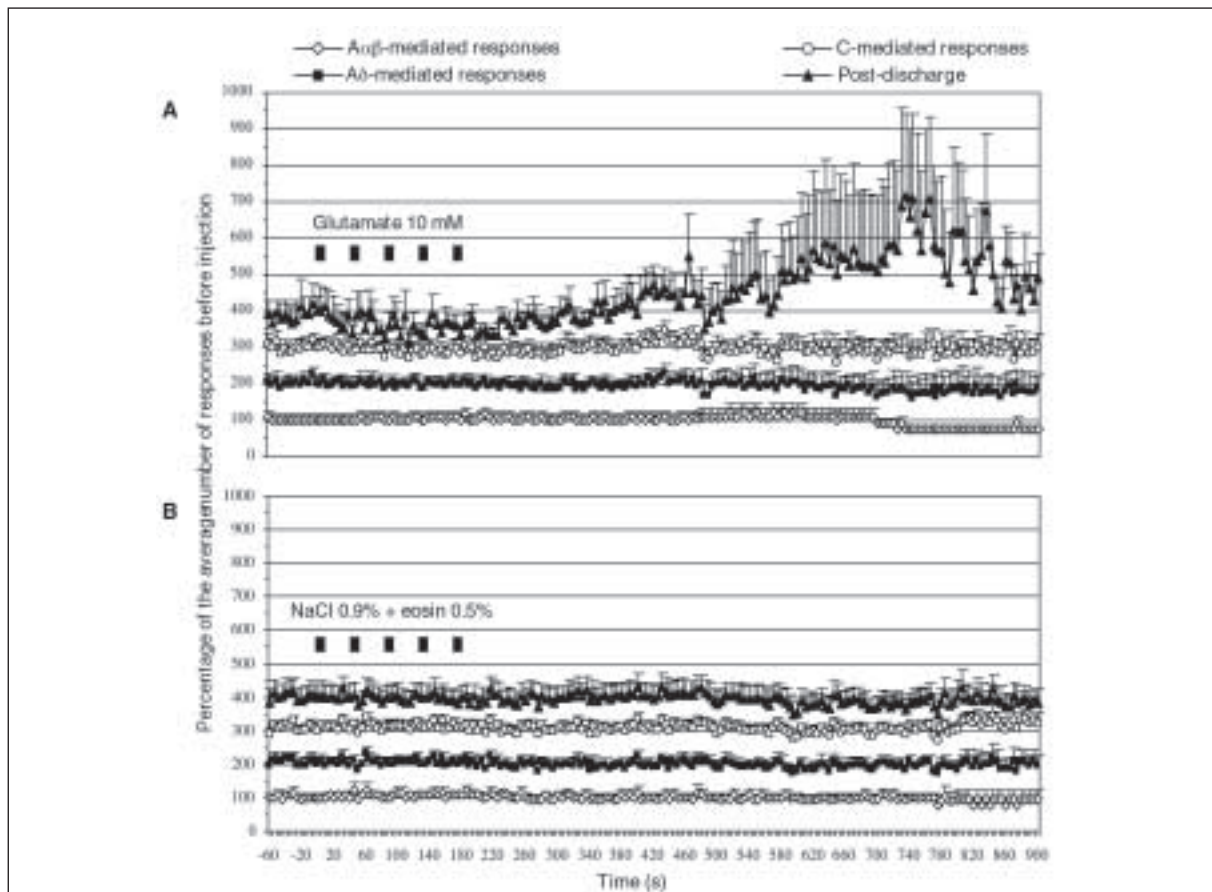


Figura 1. Effect of glutamate (A) and vehicle (B) injections into the ipsilateral DRt on the responses of deep dorsal horn WDR neurons to noxious electrical stimulation. Glutamate DRt activation induced a delayed increase of the post-discharge without affecting primary-afferent mediated responses. Each point represents the mean \pm SEM of 5 to 10 experiments.

upon spinal nociceptive processing (Almeida, et al., 1999). Our results clearly show that DRt activation enhanced/triggered and prolonged the post-discharge of nociceptive neurons, but did not affect the responses mediated by primary afferents, whether they were involved in pain transmission (A*- and C-fibres) or not (A β -fibres).

Anatomical studies have described the existence of a descending projection from the DRt impinging upon superficial dorsal horn neurons that project back to the DRt (Almeida, et al., 1993). At both levels, projecting neurons establish asymmetrical, presumably excitatory, synapses forming therefore a reverberating loop probably aimed at amplifying the responses of superficial nociceptive dorsal horn neurons to noxious stimulation (Almeida, et al., 1993, 2000). In the deep dorsal horn, neurons also receive descending projections from the DRt and send axons back to it (Tavares and Lima, 1994; Almeida, et al., 2000), but the morphology of possible synaptic contacts has not been established yet. However, in agreement with data showing that DRt lesion decreased the *c-fos* expression in the deep dorsal horn induced by peripheral noxious stimulations (Almeida, et al., 1999), our present study strongly suggests the existence of a descending excitatory action, mediated by the DRt, upon deep dorsal horn nociceptive neurons.

From a clinical point of view, our results point out the major role the DRt may play in chronic pain states. The dramatic changes in the excitability of spinal nociceptive neurons appearing after DRt activation are very similar to one of the typical features of the sensitization thought to sustain allodynia. In its major clinical form, allodynia is a painful state produced by the activation of low threshold A β fibres that are normally devoted to the transmission of mechanosensitive sensations (Woolf and Doubell, 1994). Since it is displayed by uninjured tissue, allodynia is thought to involve central mechanisms capable of altering the spinal neurons' properties (Cervero and Laird, 1996). Although the stimulation applied in our study was set to recruit both low- and high-threshold fibres, the exaggerated response of spinal neurons ap-

pearing after DRt activation seemed to be triggered regardless of the type of primary afferents recruited since only the post-discharge but not fibre-mediated responses was affected. Accordingly, the activation of only A β fibres would also lead to an abnormal response of spinal neurons, turning then the light innocuous brushing of the skin into a painful experience. Other studies are needed to clarify this issue.

The present study clearly demonstrates that the DRt exerts pronociceptive actions upon spinal nociceptive neurons by potentiating their response to peripheral stimulation. Through these actions, the DRt could play a major role in chronic pain states, making it a reliable target for new approaches in pain treatment.

References

- Almeida A, Tavares I, Lima D, Coimbra A. Descending projections from the medullary dorsal reticular nucleus make synaptic contacts with spinal cord lamina I cells projecting to that nucleus: an electron microscopic tracer study in the rat. *Neuroscience* 1993; 55:1093-106.
- Almeida A, Tjolsen A, Lima D, Coimbra A, Hole K. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates acute nociception in the rat. *Brain Res Bul* 1996;39:7-15.
- Almeida A, Storkson R, Lima D, Tjolsen A. The medullary dorsal reticular nucleus facilitates pain behaviour induced by formalin in the rat. *Eur J Neurosci* 1999;11:110-22.
- Almeida A, Tavares I, Lima D. Reciprocal connections between the medullary dorsal reticular nucleus and the spinal dorsal horn in the rat. *Eur J Pain* 2000;4:373-87.
- Burgess PR, Perl ER. Cutaneous mechanoreceptors and nociceptors. In Iggo A (ed). *Handbook of Sensory Physiology. Vol 2. Somatosensory System.* Berlin: Springer-Verlag 1973:29-78.
- Cervero F, Laird JMA. Mechanisms of touched-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain* 1996;68:13-23.
- Gasser HS, Erlanger J. The role played by the sizes of the constituent of a nerve trunk in determining the form of its action potential wave. *Am J Physiol* 1927;80:522-47.
- Lima D, Esteves F, Coimbra A. *c-fos* activation by noxious input of spinal neurons projecting to the nucleus of the tractus solitarius in the rat. In: Gebhart GF, Hammond DL, Jensen TS (eds). *Proceedings of the Am. World Congress on Pain Vol 2. Progress in Pain Research and Management.* Seattle: IASP Press 1994.
- Tavares I, Lima D. Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord. *Exp Brain Res* 1994;99:455-63.
- Woolf CJ, Doubell TP. The pathophysiology of chronic pain increases sensitivity to low threshold A β -fibres. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4: 525-34.

Reorganização Funcional de Populações de Neurónios Somatossensitivos Espinais e Talâmicos Induzida por Dor Persistente

Vasco Galhardo

Resumo

A visão clássica dos sistemas sensitivos como processos rígidos operando por mecanismos inalteráveis está progressivamente a ser substituída pela visão dinâmica sugerida pelos múltiplos estudos sobre plasticidade neuronal. No sistema somatossensitivo há muito se sabe que as propriedades funcionais dos neurónios nociceptivos estão alteradas nas situações de dor prolongada. No entanto, as observações feitas sobre o comportamento electrofisiológico de neurónios individuais não permite explicar muitos dos fenómenos comportamentais associados a situações de hiperalgesia. Neste estudo recorreremos ao registo simultâneo de populações de neurónios espinais e talâmicos, para melhor compreender as alterações que uma dor persistente induz nas redes neuronais de processamento dos sinais somatossensitivos.

Palavras chave: Termografia infrarroja. Hernia discal. Síndrome miofascial. Síndrome de dolor regional complejo.

Introdução

A reorganização dos mapas corticais e talâmicos de representação sensorial e a plasticidade das propriedades de resposta dos neurónios sensitivos têm sido implicados na expressão dinâmica de alterações funcionais dos mecanismos neuronais de processamento sensitivo. A alteração imediata ou retardada dos campos receptivos dos neurónios sensitivos é actualmente considerada uma propriedade básica do normal funcionamento das redes neuronais centrais, tal como foi demonstrado em numerosos estudos da plasticidade dos mapas corticais em animais adultos (revisto por¹⁻³). Esses fenómenos de alteração sensitiva abrangem um vasto leque de possibilidades desde o fortalecimento de memórias sensitivas de curto-prazo, até ao estabelecimento a longo prazo de síndromes de dor crónica.

Os neurónios da medula espinal e do tálamo lateral que respondem a estímulos dolorosos estão, curiosamente, entre as primeiras células em que se verificou que fenómenos de plasticidade funcional são ainda

possíveis em idade adulta⁴⁻⁷. As propriedades de resposta dos neurónios espinais nociceptivos (tanto dos neurónios ditos nociceptivos-específicos como dos de largo espectro dinâmico) pode ser alterada por estimulações periféricas de alta intensidade e a alteração pode manter-se por minutos ou horas após a estimulação⁸⁻¹⁰. Da mesma forma, demonstrou-se mais recentemente que os modelos animais experimentais de dor crónica causam profundas alterações no funcionamento dos neurónios somatossensitivos espinais, talâmicos e corticais¹¹⁻¹⁴. Estas alterações funcionais incluem aumento de actividade espontânea neuronal, diminuição do limiar de excitabilidade dolorosa, fadiga fisiológica a estimulação prolongada e continuação das respostas neuronais pós-estimulação. A observação destas alterações ficou, no entanto, confinada à análise das respostas de um só neurónio; estudos em que se analisa mais do que um neurónio simultaneamente são cruciais para reconhecer o efeito destas alterações sobre as redes funcionais somatossensitivas.

Por forma a estudar a uma escala populacional os fenómenos de plasticidade somatossensitiva induzidos por lesões periféricas que levam a hiperalgesia persistente, registámos, em dois grupos experimentais, a actividade simultânea de grupos de 5-10 neurónios da medula espinal e tálamo lateral de ratos anestesiados e implantados com multieléctrodos. Informação mais detalhada sobre este estudo pode ser encontrada noutras publicações^{15,16}.

*Instituto de Histologia e Embriologia
Faculdade de Medicina do Porto
Grupo de Morfofisiologia do Sistema Nervoso, IBMC
Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do
Porto, Portugal*

Materiais e métodos

Foram utilizados 25 ratos machos adultos (250-300 g) da estirpe Sprague-Dawley. Todos os protocolos foram aprovados pelo *Committee for the Humane Use of Animals* da Upstate Medical University (Syracuse, NY, USA) e estão de acordo com os *Guidelines for the Use of Animals in the Study of Pain* (IASP Press). Foram usados dois tipos de anestesia: halotano, nos registos do tálamo lateral (indução: 4% halotano numa mistura de 70% O₂ e 30% NO₂; manutenção: 0,5-1,2% halotano na mesma mistura gasosa), e uretano (1,25 g/kg i.p., com suplementos de um quarto da dose dados com intervalos de 120 min), nos registos espinais. Após a anestesia os animais foram colocados no aparelho de estereotaxia. A craniotomia contralateral ou laminectomia ipsilateral, segundo o local de registo, foi realizada sobre a região somatotópica de representação da pata posterior esquerda.

Foram utilizados dois protocolos de indução de dor persistente. Nos registos talâmicos utilizou-se o modelo da Constrição Parcial do Nervo Ciático (*partial sciatic ligation – PSL*¹⁷), e nos registos das populações espinais foi utilizado o modelo da injeção subcutânea de formol diluído^{18,19}. No caso do modelo PSL, antes do início do registo fisiológico o nervo ciático foi exposto e atravessado por uma linha de sutura cirúrgica (7,0 nylon). A linha foi preparada com um nó corrediço deixado frouxo, e as pontas da linha exteriorizadas pela incisão cutânea. Este procedimento permitiu que se procedesse de forma não invasiva à constrição da porção dorsal do nervo ciático incluída dentro do nó corrediço, já após a conclusão dos registos fisiológicos de controlo. No caso do modelo do formol, após o termo dos registos fisiológicos de controlo, injectou-se subcutaneamente 50 µl de formol a 5%.

A actividade neuronal foi registada extracelularmente com multieléctrodos constituídos por 4 filamentos independentes de tungsténio (impedância: 2-5 MOhm) espaçados a 150 µm (registos talâmicos) ou 240 µm (registos espinais). As diferentes distâncias intereléctrodos escolhidas estão relacionadas com a diferente densidade neuronal entre o tálamo lateral e o corno dorsal da medula espinal; as distâncias foram aferidas de forma a maximizar o número de neurónios vizinhos obtidos em cada experiência.

Os sinais da actividade multilinear foram amplificados e digitalizados em tempo real (DataWave Technologies, Longmont CO, USA), e a separação e identificação de neurónios independentes a partir dos registos *multiunit* foi feita por métodos computacionais tendo por base o perfil individual dos potenciais de acção correspondentes a cada neurónio (Offline Sorter, Plexon Inc., Dallas TX, USA). A resposta dos neurónios aos estímulos aplicados foi avaliada por histogramas periéstímulo, e a conectividade funcional entre cada par de neurónios registados simultaneamente foi avaliada pela correlação-cruzada dos tempos de ocorrência dos respectivos potenciais de acção (Neuroexplorer, Plexon Inc., Dallas, TX, USA).

Cada período de estimulação consistiu em 60 s de toques cutâneos com pincel fino (estimulação mecânica não dolorosa), 30 s de intervalo, 30 s de pressão não dolorosa com pinça cirúrgica, 30 s de intervalo, e 30 s

de pressão dolorosa com pinça cirúrgica. Esta sequência de estimulação foi repetida cada 20 min, três vezes antes lesão periférica (constrição do nervo ciático ou injeção subcutânea de formol – registos fisiológicos de controlo), e por um período variável, nunca inferior a 3 h, após a lesão periférica. Pelas respectivas respostas aos três tipos de estimulação (toque, pressão não dolorosa e pressão dolorosa), os neurónios somatossensitivos registados foram classificados como sendo de *baixo limiar* (não-nociceptivos; respondem a estímulos inócuos, adaptam à pressão e respondem descontinuadamente a estímulos dolorosos), de *largo-espectro dinâmico* (respondem a estimulação inócua e nóxica de forma proporcional à intensidade do estímulo), ou *nociceptivos-específicos* (respondem apenas à estimulação dolorosa). As respostas à estimulação foram validadas por comparação estatística da frequência de actividade instantânea (número de potenciais de acção por segundo) antes e durante a aplicação do estímulo cutâneo (considerada como positiva a resposta que ultrapassasse um valor superior ao dobro da variância da frequência observada no período de 30 s anterior ao início do período de estimulação).

No fim da experiência e ainda sob o efeito da anestesia, os animais foram perfundidos intracardiacamente com paraformaldeído a 4%. A região de registo (tálamo ou medula espinal) foi seccionada em cortes transversais de 50 µm de espessura corados com violeta-cresil ou formol-tionina por forma a identificar o percurso e local de registo dos eléctrodos.

Resultados

Foram considerados para análise apenas os neurónios que apresentaram estabilidade nas suas propriedades de resposta durante o período de 60 min de registo electrofisiológico que precedeu sempre a lesão periférica (constrição parcial do nervo ciático nos registos talâmicos, e injeção subcutânea de formol nos registos espinais). Foram registadas 5 populações neuronais no tálamo lateral (um total de 32 neurónios, 5,6 ± 2,1 por registo), e 8 populações espinais (um total de 54 neurónios, 6,75 ± 0,45 por registo). Foram ainda registadas duas populações controlo no tálamo (7 neurónios), e três na medula espinal (14 neurónios); nestas populações controlo os registos prolongaram-se por 180 min, não se tendo efectuado qualquer lesão periférica.

Plasticidade das Populações Talâmicas

As respostas neuronais anteriores à constrição parcial do nervo ciático foram comparadas com as respostas obtidas 180 e, quando possível, 360 min após a lesão. A figura 1 apresenta os gráficos das respostas de 6 neurónios talâmicos registados simultaneamente, à estimulação periférica dolorosa aplicada em 3 pontos distintos, antes e depois da constrição do nervo ciático.

Após a lesão periférica, 28 dos 32 neurónios registados no tálamo (88%) sofreram alterações na extensão ou posição do seu campo receptivo (definido como a área corporal cuja estimulação suscita uma resposta fisiológica neuronal), e/ou no limiar de excitabilidade dos neurónios. No período controlo anterior à constrição 11 dos 32 neurónios eram do tipo LT, 7 eram WDR, 8 eram NS e 6 não possuíam campo receptivo identificá-

vel. Cento e oitenta minutos após a constrição, 9 neurónios eram LT, 3 eram WDR, 10 eram NS e 10 não respondiam a qualquer estimulação periférica (Fig. 2). Embora a distribuição dos neurónios pelas diferentes classes de excitabilidade não seja significativamente diferente antes e depois da constrição do nervo (teste-t, $p = 1,0$), 19 neurónios (59% do total) mudaram de classe de excitabilidade após a constrição. Dos 6 neurónios que no início dos registos não tinham campo receptivo cutâneo identificável embora apresentassem actividade espontânea persistente, cinco deles passaram a responder à estimulação táctil da cauda, respondendo 3 maximamente a estimulação não dolorosa, e 2 especificamente a estimulação dolorosa. Este aparecimento de respostas a estimulação cutânea em neurónios previamente não somatotópicos foi imediato, sendo observados na primeira estimulação, i.e., 5 min após a constrição do nervo ciático. Ao mesmo tempo a cons-

trição do nervo causou o desaparecimento das respostas a estimulação cutânea em 9 neurónios (4 LT, 3 WDR e 2 NS – Fig. 2).

A correlação funcional populacional entre neurónios foi analisada nas três experiências em que foram registados simultaneamente mais de três neurónios. Uma pequena porção de pares de neurónios dentro de cada população apresentou correlação significativa do seu padrão temporal de actividade. Nas três experiências consideradas foram analisados os 55 possíveis pares de neurónios, e apenas 12 tinham padrões de actividade correlacionada no tempo. Estes 12 pares de neurónios não perderam a sua correlação funcional após a constrição do nervo apesar de, na sua maior parte (10 dos 12 pares), pelo menos um dos neurónios ter alterado o seu limiar de excitabilidade, e terem mesmo alguns (7 dos 12 pares) perdido o seu campo receptivo cutâneo. A constrição do nervo alterou, no entanto, o índice de conectividade funcional do conjunto de todos os pares neuronais analisados. Esta alteração populacional do índice de conectividade tem uma forte influência espacial: o índice de conectividade populacional antes da constrição do nervo apresentava valores mais altos para os pares de neurónios correspondentes a células vizinhas (distâncias interneurais inferiores a 20 μm), enquanto 180 min após a constrição houve um aumento significativo do índice de conectividade para os pares de neurónios mais afastados entre si (distâncias interneurais superiores a 40 μm – Fig. 3).

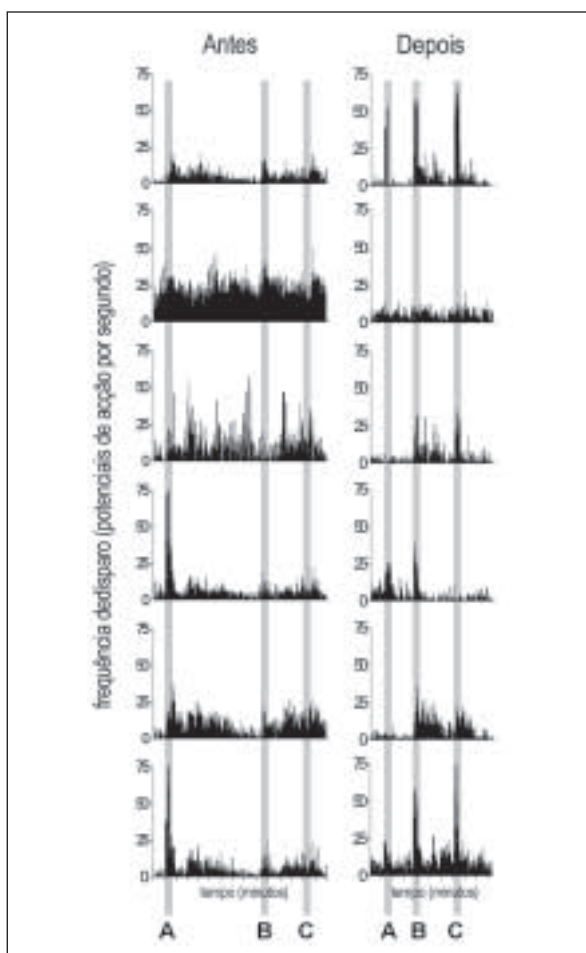


Figura 1. Alterações induzidas por constrição parcial do nervo ciático nas propriedades de resposta e campos receptivos de neurónios talâmicos. Os gráficos são histogramas da frequência de actividade neuronal, registados simultaneamente numa população de 6 neurónios do complexo ventrobasal do tálamo, antes e 180 min após a lesão periférica. As barras verticais cinzentas marcam os períodos de estimulação dolorosa aplicada em três pontos: **A** – pata posterior contralateral; **B** – cauda; **C** – pata posterior ipsilateral.

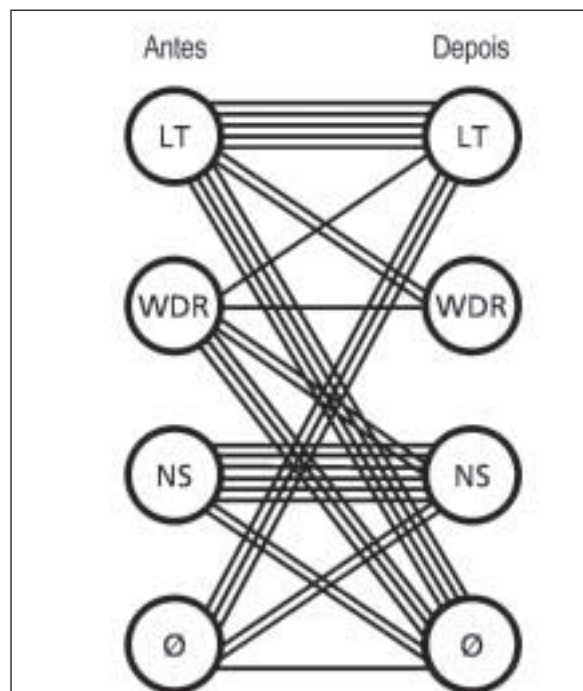


Figura 2. Alterações na classificação fisiológica dos neurónios talâmicos registados. Cada linha representa um neurónio e identifica a sua classificação antes e depois da lesão periférica. LT – neurónio low-threshold; WDR – neurónio wide-dynamic range; NS – neurónio nociceptive-specific; Ø – neurónio sem campo receptivo identificável.

Plasticidade das Populações Espinais

As respostas neuronais anteriores à injeção subcutânea de formol foram comparadas com as respostas obtidas 90 min depois. A figura 4A apresenta os diagramas de actividade induzida por estimulação periférica inócua e dolorosa, prévia e posterior à injeção, de 6 neurónios espinais registados simultaneamente.

A maioria dos neurónios registados (44/54) respondia a estimulação periférica inócua ou dolorosa aplicada na pele glabra da região ventral da pata posterior esquerda; dos 10 neurónios que não respondiam à estimulação desta região cutânea, 8 apresentavam actividade espontânea (p. ex. neurónio #1 na figura 4A), e apenas 2 não apresentavam actividade espontânea antes da injeção de formol, sendo considerados neurónios estritamente silenciosos (p. ex. neurónio #3 na figura 4A). Não foi feita nenhuma tentativa de demarcação detalhada das áreas dos campos receptivos, pelo que se deve admitir que estes dois neurónios *silenciosos* poderiam eventualmente responder a estimulação táctil fora da face ventral da pata posterior.

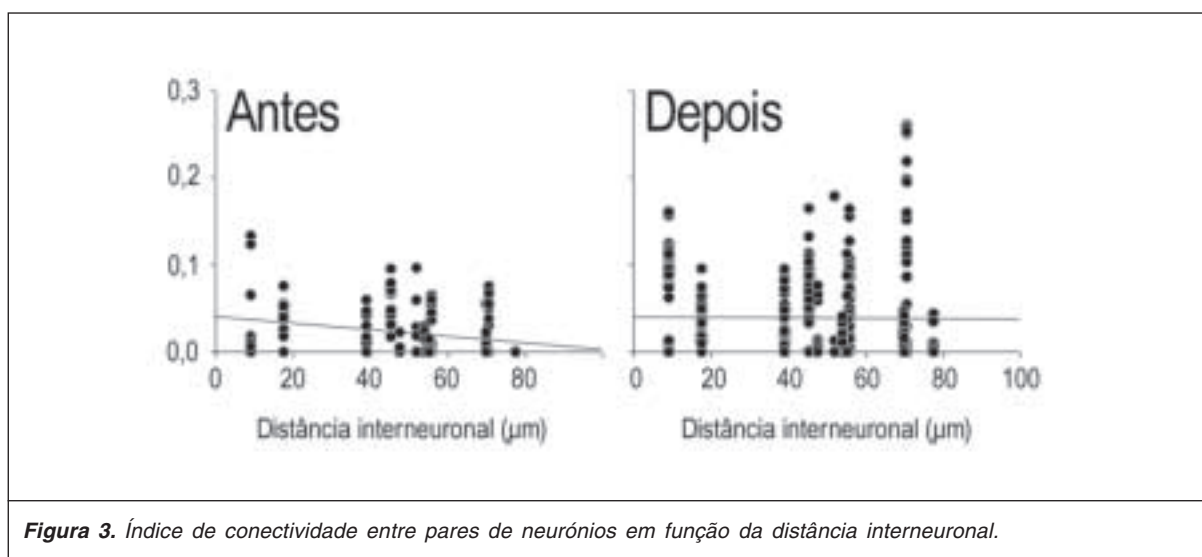
Em todas as experiências realizadas, a injeção de formol alterou imediatamente o limiar de excitabilidade mecânica da maioria das células; nos casos em que esse limiar não se alterou imediatamente após a injeção, a comparação da resposta inicial com a resposta obtida 90 min depois revelou a progressiva alteração do limiar de excitabilidade. A alteração do limiar de excitabilidade foi estatisticamente significativa para 31 dos 54 neurónios registados. Dez neurónios que inicialmente respondiam apenas a toque inócua passaram a responder também a pressão dolorosa, 9 neurónios que só respondiam a estimulação dolorosa passaram a responder também a tacto inócua, e 2 neurónios que respondiam a ambas estimulações passaram a responder apenas a tacto inócua. Os 10 neurónios que inicialmente não tinham campo receptivo identificável passaram todos a responder à estimulação táctil da pele glabra. Destes 10 neurónios, após a injeção de formol 4 passaram a responder apenas a tacto inócua, enquanto os restantes 6 passaram a responder a estimulação

inócua e dolorosa. A injeção de formol não provocou em nenhum neurónio uma perda de resposta a estimulação cutânea da pele glabra da pata posterior.

O número de neurónios que alterou a sua classe de excitabilidade (respondendo apenas a tacto inócua, apenas a pressão dolorosa, ou a ambas) 90 min após a injeção de formol foi de $3,75 \pm 0,42$ por registo populacional. De igual forma, o número de diferentes classes de excitabilidade presentes em cada população baixou de $3,25 \pm 0,16$ antes da injeção para apenas $2,00 \pm 0,27$, com a maioria dos neurónios a responder simultaneamente a estimulação inócua e dolorosa (46 dos 54 neurónios, ou $75 \pm 9\%$ dos neurónios por população registada – Fig. 4B).

A injeção de formol não provocou uma alteração significativa na frequência de disparo espontâneo dos neurónios (de $1,06 \pm 0,32$ para $1,08 \pm 0,28$ – $p = 0,96$, teste-t, $n = 54$), nem uma alteração da actividade provocada por estimulação dolorosa (de $7,79 \pm 1,98$ para $10,66 \pm 2,28$ – $p = 0,18$, teste-t, $n = 54$), mas causou um aumento significativo na actividade despertada por estimulação inócua (de $5,30 \pm 0,76$ para $8,71 \pm 1,02$ – $p < 0,01$, teste-t, $n = 54$). Estas alterações populacionais não são resultado de uma tendência comum a todos os neurónios: alguns neurónios aumentaram bastante a sua resposta à estimulação cutânea, enquanto outros sofreram diminuições após a injeção de formol. Como regra geral a injeção de formol provocou uma diminuição das respostas dos neurónios que inicialmente possuíam níveis mais altos de actividade espontânea e evocada, enquanto provocou um aumento de actividade evocada nos restantes. Como consequência, a actividade induzida por estimulação não dolorosa nos 36 neurónios que antes da injeção de formol respondiam com menos de 5 disparos por segundo a uma estimulação táctil de 5 toques por segundo, quadruplicou em 35 dos neurónios, tendo passado de $2,06 \pm 0,34$ disparos/s para um valor final de $9,01 \pm 2,09$ disparos/s. Este alteração corresponde a um aumento de $2,84 \pm 1,47$ na relação sinal-ruído por população registada.

A análise da correlação temporal funcional entre os pares de neurónios registados simultaneamente revela



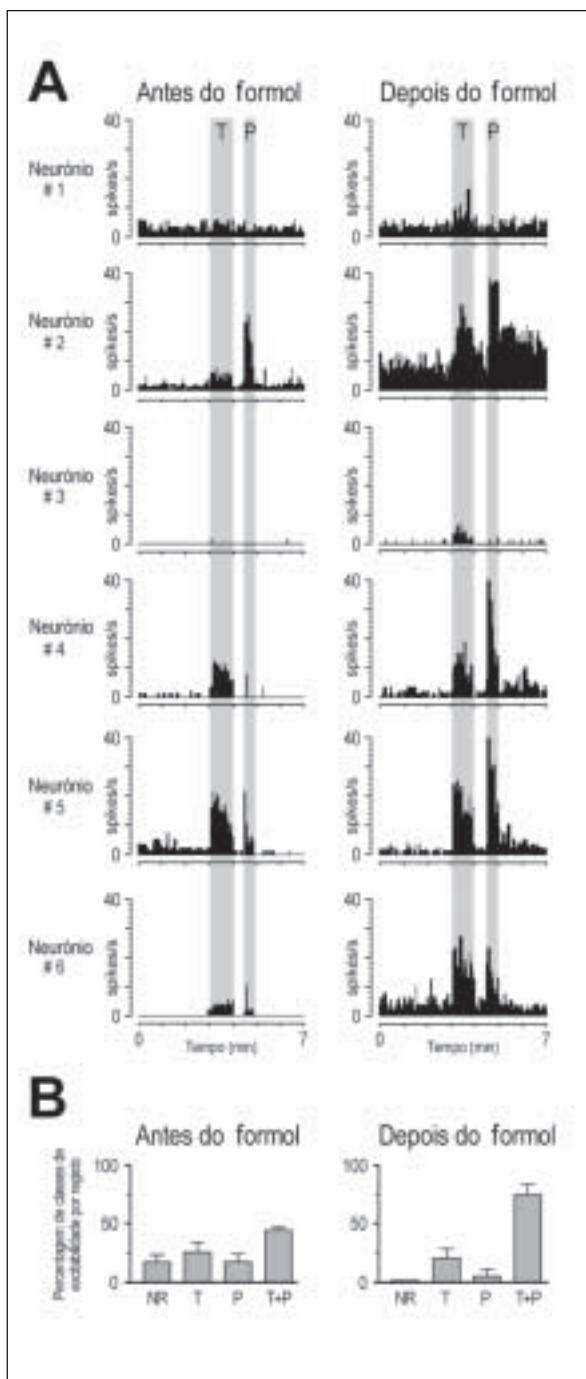


Figura 4.

A. Alterações das propriedades de resposta de neurónios espinais induzidas por injeção subcutânea de formol. Os gráficos são histogramas da frequência de actividade neuronal, registados simultaneamente numa população de 6 neurónios na lâmina V do corno dorsal da medula espinal, antes e 90 min após a injeção de formol. As barras verticais cinzentas marcam os períodos de estimulação táctil aplicada à pele glabra da pata posterior: **T** – tacto não doloroso; **P** – pressão dolorosa.

B. Distribuição dos neurónios por classes de excitabilidade, antes e 90 min após a injeção de formol. **NR** – neurónios não excitáveis; **T** – neurónios que respondem apenas a tacto não doloroso; **P** – neurónios que respondem apenas a pressão dolorosa; **T + P** – neurónios que respondem a ambas as estimulações.

igualmente que as alterações mais significativas surgem na resposta à estimulação não dolorosa, e são consequência directa da melhoria da relação sinal/ruído. A figura 5 apresenta os gráficos de auto e heterocorrelação de 9 neurónios registados simultaneamente, onde se observa que a injeção de formol aumenta a capacidade populacional dos neurónios para acompanharem a estimulação não dolorosa, mas não altera a conectividade funcional durante a estimulação dolorosa.

Discussão

A maior parte dos resultados de estudos electrofisiológicos sobre a plasticidade nociceptiva dizem respeito às alterações nas respostas de neurónios singulares induzidas em modelos animais de hiperalgesia. Uma das observações, retirada da comparação da plasticidade nociceptiva das populações da medula espinal^{13,14} e do tálamo lateral¹¹, era a de que os neurónios das duas regiões apresentavam alterações muito semelhantes entre si: maior actividade espontânea, expansão dos campos receptivos, redução do limiar de excitabilidade e respostas que se prolongam para além do fim da estimulação. A única diferença importante dizia respeito à incidência preferencial da plasticidade: na medula espinal ocorriam principalmente grandes alterações na excitabilidade neuronal, com alteração dos campos receptivos relativamente restrita^{10,20}, enquanto no tálamo e no córtex somatossensitivo a plasticidade nociceptiva acarretava especialmente grandes modificações na extensão e complexidade dos campos receptivos²¹⁻²³.

Estas observações estão de acordo com dados anatomofisiológicos básicos. Os campos receptivos das células nociceptivas espinais, especialmente das lâminas superficiais, são habitualmente pequenos²⁴⁻²⁶, enquanto uma porção das células nociceptivas talâmicas e corticais possuem campos receptivos mais extensos que os neurónios não nociceptivos^{22,27}. Por outro lado, enquanto à medula espinal os sinais periféricos chegam decompostos por patamares de excitabilidade cutânea e se distribuem por regiões espinais bem definidas^{25,28}, as projecções supra-epinais são bastante mais convergentes: às mesmas regiões talâmicas chegam axónios oriundos simultaneamente de populações das lâminas superficiais e das lâminas profundas da medula²⁹⁻³¹. Este ponto sugere que o processamento sensorial local efectuado pelas populações espinais será bastante distinto do realizado pelas populações do tálamo lateral dada a grande diferença existente entre os tipos de sinais disponibilizados a cada região e atendendo também à enorme integração talâmica da informação táctil³². A maior uniformidade morfológica dos neurónios de vários núcleos do tálamo lateral³³ estará decerto relacionada com esta também uniforme distribuição da informação espinal ascendente. Pelo contrário, a heterogeneidade morfológica entre as populações laminares da medula espinal estará adaptada à distribuição dos aferentes primários por territórios bem definidos e sugere que aí se realiza um tipo de processamento local diferente do talâmico.

A semelhança encontrada na plasticidade neuronal individual é, pois, difícil de conciliar com os dados funcionais básicos. Os resultados experimentais aqui apresentados mostram que as diferenças funcionais

entre a plasticidade da medula espinal e do tálamo lateral se encontram preferencialmente não nas respostas individuais, mas na plasticidade funcional das populações de neurónios vizinhos.

Vários dados experimentais obtidos fora da medula espinal ou mesmo noutros sistemas sensoriais, mostram que por trás das alterações do limiar de excitabilidade das células ou da expansão dos seus campos receptivos há mais do que apenas uma imprópria amplificação provocada pela inflamação ou deafferentação periférica^{1,34,35}. Esses dados pertencem a três grupos fundamentais de observações: a alteração imediata dos campos receptivos somatossensitivos após uma deafferentação ocorre numa escala temporal incompatível com o estabelecimento de novas ligações sinápticas^{36,37}; a existência de potenciais sinápticos subliminares em respostas a estimulação cutânea feita fora do campo receptivo neuronal^{38,39}; e a crescente noção de que as redes de processamento somatossensitivo actuam simultaneamente na percepção táctil e dolorosa, uma vez que a manipulação de uma das duas percepções altera a dinâmica populacional evocada pela outra⁴⁰⁻⁴⁴.

Em animais sujeitos a modelos experimentais de dor crónica neuropática (constricção do nervo ciático⁴⁵) de origem periférica, observaram-se profundas alterações

nas propriedades de resposta de neurónios corticais¹², talâmicos¹¹ e espinais^{13,14}. Essas alterações incluem modificações profundas na localização e extensão dos campos receptivos, aumento da actividade espontânea, e o aparecimento de respostas retardadas que se prolongam muito para além do termo do estímulo periférico¹¹⁻¹⁴. Biella e Sotgiu⁴⁶ verificaram que este modelo neuropático provocava uma desincronização nas redes funcionais espinais: o registo simultâneo de dois neurónios situados numa mesma coluna dorsoventral (um neurónio NS nas lâminas superficiais e um neurónio WDR nas lâminas profundas) demonstra que um estímulo nociceptivo induz uma actividade síncrona entre os dois neurónios; essa correlação temporal funcional desaparece em animais com constricção crónica do nervo ciático.

Pouco mais se sabe sobre as alterações das redes populacionais – espinal ou supra-espinal – em situações dolorosas agudas ou persistentes. Apkarian⁴⁷ verificou que populações de neurónios vizinhos no complexo ventrobasal do tálamo alteram a sua correlação temporal populacional consoante a natureza nociceptiva ou não-nociceptiva do estímulo periférico aplicado, e que as correlações temporais se alteram de forma oposta conforme as populações observadas são cons-

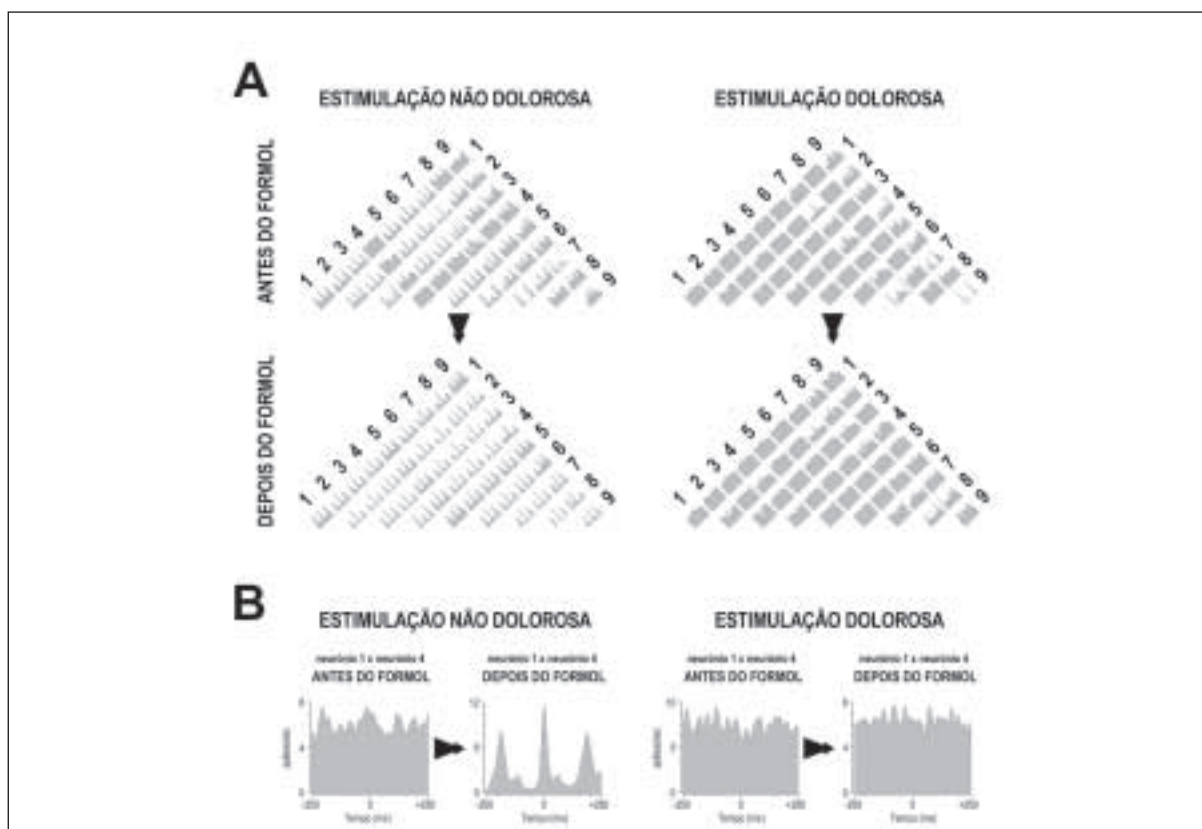


Figura 5.

A. Correlogramas cruzados de pares de neurónios registados simultaneamente. Os dados dizem respeito ao sincronismo temporal observado entre 9 neurónios da lâmina V da medula espinal.

B. Exemplo dos correlogramas entre os neurónios #1 e #4. A coincidência temporal entre os dois neurónios é representada tomando um potencial de acção do neurónio #1 como referencial de tempo zero, e anotando os potenciais de acção do neurónio #4 que ocorrem dentro do período de análise de ± 250 ms. Este procedimento é repetido para todos os potenciais de acção do neurónio #1, ocorridos durante os períodos de estimulação não-dolorosa e dolorosa.

tituídas apenas por neurónios LT ou por neurónios LT e WDR. Observou ainda que a alteração da conectividade funcional entre os neurónios vizinhos estava correlacionada com a distância entre eles: durante uma estimulação nociceptiva os neurónios próximos entre si aumentavam a sua correlação funcional positiva, mas os mais afastados (distâncias superiores a 100 µm) passavam a ter correlação negativa de actividade⁴⁷.

Os resultados agora apresentados mostram claramente que as alterações na excitabilidade de neurónios somatossensitivos vizinhos são diferentes de célula para célula, tanto nas populações talâmicas como nas espinais. Os resultados obtidos nas duas regiões sugerem que a codificação populacional implica algo mais do que um aumento geral da actividade espontânea ou um baixar indiscriminado do limiar de excitabilidade, uma vez que a hiperalgesia induz um aumento significativo na correlação temporal da actividade populacional.

Mais ainda, os dois efeitos são sentidos de forma diferente pelas populações espinais e talâmicas. Parte das diferenças podem ser devidas ao uso de dois modelos diferentes de lesão periférica: ou uma ligação parcial do nervo ciático (estudo talâmico) ou a injeção de formol na pata (estudo espinal). No entanto, os dois modelos induzem o aparecimento de fenómenos de hiperalgesia bastante semelhantes e com um desenvolvimento temporal também próximo^{17,18}. Ressalvando esta diferença experimental, três diferenças marcam a distinção entre a reorganização talâmica e a espinal.

Em primeiro lugar, enquanto no tálamo a maior parte dos neurónios registados alterou a sua excitabilidade para os extremos da sensibilidade (de WDR para LT ou NS), na medula espinal o sentido foi exactamente contrário: a maior parte dos neurónios passou de LT ou NS para WDR.

Em segundo lugar, uma grande proporção de neurónios talâmicos (28%) perdeu a sensibilidade cutânea imediatamente após a lesão do nervo ciático, enquanto na medula espinal nenhum neurónio perdeu o seu campo receptivo, e todos os neurónios que antes da injeção de formol não respondiam a estimulação periférica, passaram a fazê-lo.

Em terceiro lugar, enquanto no tálamo o aumento da conectividade funcional abarcava a estimulação nociceptiva e não-nociceptiva (sendo mais acentuada para a nociceptiva), na medula espinal o aumento da conectividade funcional observava-se apenas aquando da estimulação inócua.

Em conclusão, os estudos agora apresentados mostram que a dor persistente induz alterações profundas nas redes funcionais de processamento somatossensitivo tanto na medula espinal como no tálamo lateral. Cabe-nos agora elucidar de que forma essas alterações se tornam permanentes, e de que forma os mecanismos de plasticidade sensitiva subcortical estão envolvidos na génese e manutenção de síndromes dolorosas prolongadas.

Agradecimentos

A realização destes estudos foi apenas possível graças ao incessante apoio, encorajamento e intercâmbio de ideias com a Prof^a Deolinda Lima (Univ. Porto) e Prof A. Vania Apkarian (Northwestern Univ, Chicago).

Apoios: FCT-PRAXIS/P/SAU/10170/1998, FCT-POC-TI/NSE/38995/2001 e Programa Gulbenkian de Investigação, Ensino e Tratamento da Dor.

Bibliografia

- Weinberger NM. Dynamic regulation of receptive fields and maps in the adult sensory cortex. *Annu Rev Neurosci* 1995;19:129-58.
- Buonomano DV, Merzenich MM. Cortical plasticity: from synapses to maps. *Annu Rev Neurosci* 1998;21:149-86.
- Jones EG. Cortical and subcortical contributions to activity-dependent plasticity in primate somatosensory cortex. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:1-37.
- Wall PD, Egger MD. Formation of new connexions in adult rat brains after partial deafferentation. *Nature* 1971;232:542-5.
- Zieglgänsberger W, Herz A. Changes of cutaneous receptive fields of spino-cervical-tract neurones and other dorsal horn neurones by microelectrophoretically administered amino acids. *Exp Brain Res* 1971;13:111-26.
- Dostrovsky JO, Millar J, Wall PD. The immediate shift of afferent drive of dorsal column nucleus cells following deafferentation: a comparison of acute and chronic deafferentation in gracile nucleus and spinal cord. *Exp Neurol* 1976;52:480-95.
- Woolf CJ, Fitzgerald M. The properties of neurones recorded in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1983;221:313-32.
- McMahon SB, Wall PD. Receptive fields of lamina I projection cells move to incorporate a nearby region of injury. *Pain* 1984;19:235-47.
- Cervero F, Connell LA. Distribution of somatic and visceral primary afferent fibers within the thoracic spinal cord of the cat. *J Comp Neurol* 1984;230:88-98.
- Cook AJ, Woolf CJ, Wall PD, McMahon SB. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input. *Nature* 1987;325:151-3.
- Guilbaud G, Benoist JM, Jazat F, Gautron M. Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *J Neurophysiol* 1990;64:1537-54.
- Guilbaud G, Benoist JM, Levante A, Gautron M, Willer JC. Primary somatosensory cortex in rats with pain-related behaviours due to a peripheral mononeuropathy after moderate ligation of one sciatic nerve: neuronal responsiveness to somatic stimulation. *Exp Brain Res* 1992;92:227-45.
- Palecek J, Palecková V, Dougherty PM, Carlton SM, Willis WD. Responses of spinothalamic tract cells to mechanical and thermal stimulation of skin in rats with experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* 1992;67:1562-73.
- Laird JM, Bennett GJ. An electrophysiological study of dorsal horn neurons in the spinal cord of rats with an experimental peripheral neuropathy. *J Neurophysiol* 1993;69:2072-85.
- Brueggemann J, Galhardo V, Apkarian AV. Immediate reorganization of the rat somatosensory thalamus following peripheral partial nerve ligation. *J Pain* 2001;2:220-8.
- Galhardo V, Apkarian AV, Lima D. Peripheral inflammation increases the functional coherency of spinal responses to tactile but not nociceptive stimulation. *J Neurophysiol* (submitted) 2002.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205-18.
- Duboisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4:161-74.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5-17.
- McMahon SB, Wall PD. The significance of plastic changes in lamina I systems. Em: Cervero F, Bennett GJ, Headley PM (eds): *Processing of Sensory Information in the Superficial Dorsal Horn of the Spinal Cord*. Amsterdam: Plenum Publishing 1989:249-71.
- Sherman SE, Luo L, Dostrovsky JO. Altered receptive fields and sensory modalities of rat VPL thalamic neurons during spinal strychnine-induced allodynia. *J Neurophysiol* 1997;78:2296-308.
- Lamour Y, Guilbaud G, Willer JC. Rat somatosensory (Sml) cortex: I. Characteristics of neuronal responses to noxious stimulation and comparison with responses to non-noxious stimulation. *Exp Brain Res* 1983;49:35-45.
- Ergenzinger ER, Glasier MM, Hahm JO, Pons TP. Cortically induced thalamic plasticity in the primate somatosensory system. *Nature Neurosci* 1998;1:226-9.
- Christensen BN, Perl ER. Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *J Neurophysiol* 1970;33:293-307.
- Cervero F, Iggo A. The substantia gelatinosa of the spinal cord. A critical review. *Brain* 1980;103:717-72.
- Light AR, Willcockson H. Spinal laminae I-II neurons in rat recorded *in vivo* in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses. *J Neurophysiol* 1999;82:3316-26.

27. Chung JM, Lee KH, Surmeier DJ, Sorkin LS, Kim J, Willis WD. Response characteristics of neurons in the ventral posterior lateral nucleus of the monkey thalamus. *J Neurophysiol* 1986;56:370-90.
28. Brown AG. *Organization in the Spinal Cord*. Heidelberg: Springer-Verlag 1981.
29. Giesler GJ, Menétrey D, Basbaum AI. Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 1979;184:107-25.
30. Carstens E, Trevino DL. Laminar origins of spinothalamic projections in the cat as determined by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 1978;182:151-66.
31. Apkarian AV, Hodge CJ. The primate spinothalamic pathways: I. A quantitative study of the cells of origin of the spinothalamic pathway. *J Comp Neurol* 1989;288:447-73.
32. Jones EG. *The Thalamus*. New York: Plenum Press 1985.
33. Shi T, Apkarian AV. Morphology of thalamocortical neurons projecting to the primary somatosensory cortex and their relationship to spinothalamic terminals in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 1995;361:1-24.
34. Fox K, Glazewski S, Schulze S. Plasticity and stability of somatosensory maps in thalamus and cortex. *Curr Op Neurobiol* 2000;10:494-7.
35. Rauschecker JP. Auditory cortical plasticity: a comparison with other sensory systems. *Trends Neurosci* 1999;22:74-80.
36. Rasmusson DD, Louw D, Northgrave SA. The immediate effects of digit amputation on SI cortex in the racoon: unmasking of inhibitory sites. *Somat Motor Res* 1993;10:69-80.
37. Faggin BM, Nguyen KT, Nicoletis MAL. Immediate and simultaneous sensory reorganization at cortical and subcortical levels of the somatosensory system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9428-33.
38. Woolf CJ, King AE. Subthreshold components of the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat lumbar spinal cord. *J Neurophysiol* 1989;62:907-16.
39. Zhu JJ, Connors BW. Intrinsic firing patterns and whisker-evoked synaptic responses of neurons in the rat barrel cortex. *J Neurophysiol* 1999;81:1171-83.
40. Greenspan JD, Winfield JA. Reversible pain and tactile deficits associated with a cerebral tumor compressing the posterior insula and parietal operculum. *Pain* 1992;50:29-39.
41. Katz DB, Simon SA, Moody A, Nicoletis MAL. Simultaneous reorganization in thalamocortical ensembles evolves over several hours after perioral capsaicin injections. *J Neurophysiol* 1999;82:963-77.
42. Flor H, Elbert T, Knecht S, Wienbruch C, Pantev C, Birbaumer N, et al. Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation. *Nature* 1995;375:482-4.
43. Sörös P, Knecht S, Bantel C, Imai T, Wüsten R, Pantev C, et al. Functional reorganization of the human primary somatosensory cortex after acute pain demonstrated by magnetoencephalography. *Neurosci Lett* 2001;298:195-8.
44. Knecht S, Sörös P, Gürtler S, Imai T, Ringelstein EB, Henningsen H. Phantom sensations following acute pain. *Pain* 1998;77:209-13.
45. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat produces disorders of pain sensation like those seen on man. *Pain* 1988;33:87-107.
46. Biella G, Riva L, Sotgiu ML. Interaction between neurons in different laminae of the dorsal horn of the spinal cord. A correlation study in normal and neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 1997;9:1017-25.
47. Apkarian AV, Shi T, Brueggemann J, Airapetian LR. Segregation of nociceptive and non-nociceptive networks in the squirrel monkey somatosensory thalamus. *J Neurophysiol* 2000;84:484-94.

A Hiperactividade Vesical e a Alodínia Provocadas pela Inflamação Vesical Crónica são Mediadas por Aferentes Primários Sensíveis aos Vanilóides

Paulo Diniz¹, Ana Charrua², João Silva¹, António Avelino², Francisco Cruz^{1,2}

Resumo

Os autores verificam a hipótese de a instabilidade vesical e alodínia presentes na inflamação vesical terem na sua origem uma sensibilização de neurónios aferentes primários tipo C. Para isso, num modelo animal de inflamação crónica, estudou-se a hiperactividade vesical, a expressão espinal (L6) de *c-fos* e o efeito da neurotoxina RTX, específica dos aferentes primários de tipo C, naqueles dois parâmetros. Os dados sugerem um papel das fibras tipo C na génese da hiperactividade vesical e alodínia associadas à inflamação vesical crónica e levantam a hipótese de os vanilóides poderem ser usados no homem como tratamento adjuvante da inflamação vesical crónica.

Palavras chave: Neurónios aferentes primários de tipo C. Hiperactividade vesical. Vanilóides. Inflamação vesical. Resiniferatoxina (RTX).

Introdução

Estudos anteriores demonstraram que o Homem e o animal sujeitos a lesão crónica da medula espinal apresentam hiperactividade vesical devido à facilitação de um reflexo miccional, normalmente inactivo. Este reflexo é iniciado em aferentes primários de tipo C e depende de um circuito neuronal exclusivamente localizado nos segmentos sacrados da medula espinal (De Groat, 1997). A dessensibilização daqueles aferentes primários, pela aplicação de substâncias vanilóides intravesicais como a capsaicina ou a resiniferatoxina (RTX), ao inibir o reflexo miccional sagrado, diminui a hiperactividade vesical e consequentemente aumenta a capacidade vesical (Cruz, et al., 1997a, b), possivelmente através do bloqueio do aporte sensitivo à medula espinal (Avelino, et al., 1999). Este efeito traduz-se numa melhoria clínica apreciável nos doentes espinhalizados, nomeadamente diminuição da frequência miccional e do número de episódios de incontinência urinária (Cruz, et al., 1997a, b).

Tal como as bexigas de doentes ou de animais espinhalizados cronicamente, também as bexigas sujeitas a uma inflamação crónica apresentam hiperacti-

vidade. Além desta característica, as bexigas inflamadas apresentam alodínia, isto é, o seu funcionamento normal gera dor. Neste trabalho pomos a hipótese que a hiperactividade associada à inflamação crónica da bexiga pode estar associada à reactivação do reflexo miccional mediado por fibras C. Tal facilitação pode ser consequente a uma reactivação das fibras sensitivas aferentes vesicais de tipo C, à diminuição do limiar de excitação de receptores nociceptivos, habitualmente de alto limiar, ou à activação de receptores nociceptivos silenciosos (Habler, et al., 1990). Estas alterações poderiam igualmente estar na génese da alodínia. Para o demonstrar, investigámos o efeito da aplicação de vanilóides intravesicais na hiperactividade vesical e na expressão aumentada de *c-fos*, a nível espinal num modelo de inflamação crónica, uma vez que aquelas substâncias podem inactivar os aferentes primários sensibilizados ou recrutados de novo pela inflamação crónica (Vizzard, 2000). Utilizámos como modelo a aplicação intraperitoneal de ciclofosfamida, a qual é metabolizada no fígado em acroleína. Este metabolito ao ser eliminado pelo rim induz uma cistite hemorrágica.

Materiais e métodos

Foi induzida uma cistite química em ratos-fêmea da estirpe Sprague-Dawley, por meio de injeção intraperitoneal de ciclofosfamida (75 mg/kg, i.p.), de três em três dias, durante duas semanas (Vizzard e Boyle,

¹Instituto de Histologia & Embriologia, Faculdade de Medicina do Porto

²Serviço de Urologia, Hospital S. João, Porto

1999). Ao décimo quinto dia os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e as suas bexigas instiladas durante 30 min com 0,5 ml de RTX 10 nM (ratos CYP + 10nM RTX), ou 0,5 ml do veículo do RTX, etanol a 10% em soro fisiológico (ratos CYP + VEH). No dia seguinte foram efectuados cistometrogramas sob anestesia com uretano (1,2 mg/kg, s.c.). A bexiga foi exposta através de uma incisão mediana abdominal infraumbilical, tendo-se inserido uma agulha de calibre 21 na cúpula vesical. Após um período de estabilização foi infundido soro fisiológico à temperatura ambiente (6 ml/h), durante duas horas com a uretra aberta. O volume infundido ao qual ocorreu uma micção foi considerado como capacidade cistométrica máxima. Ratos intactos foram usados como controlos.

No final dos estudos cistométricos todos os animais foram perfundidos com paraformaldeído a 4%. Os segmentos espinais L6 foram removidos e seccionados a 40 µm no micrótomo de congelação, sendo cada terceiro corte imunoreagido contra a proteína Fos usando o método ABC-HRP. As células positivas foram contadas em 10 cortes por animal nas lâminas I, lâminas II-IV, substância cinzenta intermédio-lateral (ILG - *intermediolateral gray matter*) e comissura dorsal (DCM - *dorsal commissure*).

Resultados

A capacidade cistométrica máxima média observada foi de $0,48 \pm 0,22$ ml nos animais do grupo de controlo, $0,26 \pm 0,08$ ml no grupo CYP + VEH e $0,54 \pm 0,14$ no grupo CYP + RTX 10 nM (Fig. 1).

A expressão de *c-fos* na medula espinal sagrada dos animais de controlo era ligeira, estando as células imunoreactivas localizadas bilateralmente na lâmina I e ILG, bem como na DCM. Em contraste, nos animais do grupo no grupo CYP + VEH, a expressão do *c-fos* era bastante intensa nestas três zonas. Nos animais do grupo CYP + RTX 10 nM, a expressão de *c-fos* nas lâminas I, ILG e DCM era semelhante à dos animais de controlo (Fig. 2). A expressão de *c-fos* nas lâminas II-IV era bilateral mas muito ligeira, não havendo diferenças evidentes entre os três grupos (Fig. 2).

Os valores médios e respectivos desvios-padrão do número de células contadas nos três grupos experimentais, em cada uma das zonas espinais, encontra-se exposto no gráfico de barras da figura 3.

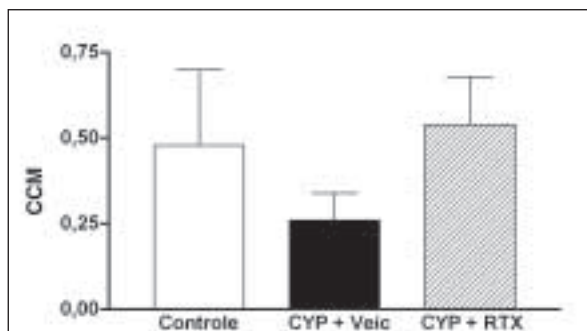


Figura 1. Médias das capacidades cistométricas máximas (CCM) dos animais controlo, tratados com CYP + VEH ou CYP + RTX.

Discussão

Os nossos resultados demonstram que a inflamação crónica da bexiga induz hiperactividade vesical e um aumento da expressão de *c-fos* a nível da medula espinal. Estas alterações são revertidas pela aplicação intravesical de resiniferatoxina.

A resiniferatoxina é um extracto do látex de uma planta existente no Norte de África, a *Euforbia resinifera*, que partilha com a capsaicina um grupo homovanílico idêntico. Isso explica a afinidade do RTX para o receptor vanilóide (VR1), cuja expressão periférica se encontra praticamente restrita aos aferentes primários de tipo C (Szallazi e Blomberg, 1999; Avelino, et al., 2002). O RTX é cerca de dez mil vezes mais potente que a capsaicina para se ligar ao receptor vanilóide e induzir um estado de inactivação dos aferentes primários tipo C, também conhecido por dessensibilização, durante o qual a transmissão dos impulsos sensitivos

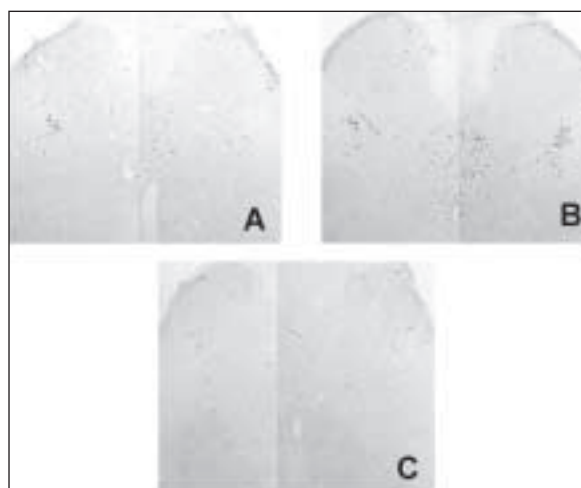


Figura 2. Células reactivas para *c-fos* nas lâminas I, II-IV, DCM e ILG do segmento espinal L6 em animais controlo (A), tratados com CYP + VEH (B) ou CYP + RTX (C).

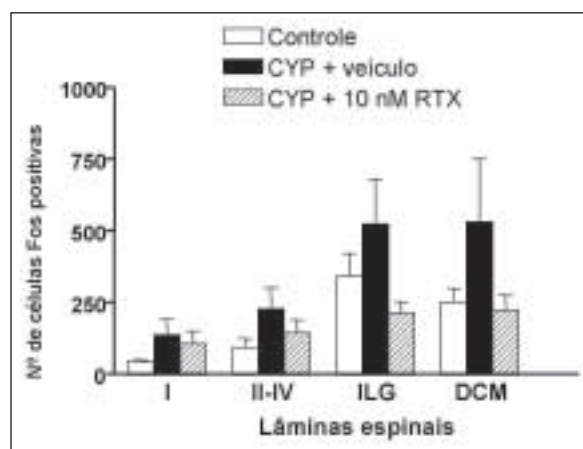


Figura 3. Gráfico demonstrativo da expressão da proteína Fos na medula espinal do rato a nível de L6 em animais controlo, tratados com CYP + VEH ou CYP + RTX.

para a medula espinhal está impedida ou anulada. Este bloqueio da transmissão sensitiva nos aferentes primários de tipo C é provavelmente a razão pela qual a expressão do *c-fos*, um gene expresso nos neurónios espinhais após a chegada de impulsos nócicos, foi fortemente reduzida no grupo de animais com inflamação crónica da bexiga que receberam resiniferatoxina intravesical. Tendo o estímulo induzido sido um estímulo inócuo (infusão de solução salina a ritmos fisiológicos e com a uretra aberta), a expressão exagerada de *c-fos* observada nos animais com inflamação crónica indica que o reflexo miccional num animal inflamado gera uma resposta na medula espinhal semelhante àquela que é observada quando se aplicam estímulos nócicos a uma bexiga normal (Avelino, et al., 1999). Parece, portanto, que a expressão de *c-fos* observada nos animais inflamados constitui um equivalente bioquímico da alodinia referida pelos doentes com quadros clínicos de inflamação vesical crónica.

Em animais com a medula espinhal intacta a motilidade vesical é comandada por um circuito neuronal supra-espinhal que envolve o centro pontino da micção (De Groat, 1997). Este circuito é preferencialmente activado por estímulos sensitivos vesicais transportados em neurónios aferentes primários tipo Aδ. O reflexo miccional espinhal sagrado, iniciado em aferentes primários de tipo C, não parece desempenhar um papel determinante no controlo da actividade motora da bexiga em adultos normais, uma vez que a sua inactivação, nomeadamente através da dessensibilização dos aferentes primários de tipo C, não altera a actividade reflexa da bexiga (De Groat, 1997). Os nossos resultados, ao demonstrarem que a hiperactividade da bexiga cronicamente inflamada é anulada pela administração intravesical de RTX, fazem supor que nestas condições o reflexo miccional sagrado foi reactivado. De facto, como foi discutido atrás, os aferentes primários de tipo C constituem o alvo predominante da resiniferatoxina. O nosso estudo não esclarece, contudo, os mecanismos que levam à sensibilização dos aferentes C. No entanto, resultados de estudos recentes parecem apontar para o envolvimento do NGF (*nerve growth factor*), neste processo. Na verdade verificou-se que a inflamação vesical causa um aumento da concentração de NGF, na parede vesical (Biorling, et al., 2001). Curiosamente, o aumento do NGF tinha também sido observado em modelos de obstrução infravesical crónica, os quais

igualmente induzem o reaparecimento de um reflexo miccional sagrado mediado por fibras de tipo C (Steers, et al., 1988).

A administração intravesical de RTX tem sido utilizada com sucesso para o tratamento da hiperactividade vesical associada a lesões espinhais (Cruz, et al., 1997b; Silva, et al., 2000) ou associada à hiperactividade idiopática do detrusor (Silva, et al., no prelo, Cruz, 2002). Deste modo os nossos resultados abrem uma nova possibilidade de tratamento da hiperactividade vesical associada à inflamação crónica da bexiga com a aplicação de substâncias vanilóides intravesicais. Dados recentes (Cruz, et al., dados não publicados) parecem indicar que a resiniferatoxina pode melhorar a sintomatologia urinária dos doentes com cistite intersticial, um quadro inflamatório crónico da bexiga de tratamento ainda incerto.

Bibliografia

- Avelino A, Cruz F, Coimbra A. Intravesical resiniferatoxin desensitizes rat bladder sensory fibres without causing intense noxious excitation. A *c-fos* study. *Eur J Pharmacol* 1999;378:17-22.
- Avelino A, Cruz C, Nagy I, Cruz F. Vanilloid receptor type 1 expression in the rat urinary tract. *Neuroscience* 2002;109:787-98.
- Bjorling DE, Jacobsen HE, Blum JR, et al. Intravesical *Escherichia coli* lipopolysaccharide stimulates an increase in bladder nerve growth factor. *BJU International* 87(7):697-701.
- Cruz F. Vanilloid receptor and detrusor instability. *Urology* 2002;59(Suppl 5A):51-60.
- Cruz F, Guimarães M, Silva C, et al. Suppression of bladder hyperreflexia by intravesical resiniferatoxin. *Lancet* 1997;350:640-1.
- Cruz F, Guimarães M, Silva C, et al. Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin has long lasting clinical and urodynamic effects in patients with hyperactive or hypersensitive bladder dysfunction. *J Urol* 1997;157:585-9.
- De Groat WC. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* 1997;50(Suppl 6A):36-52.
- Habler HJ, Janig W, Koltzenburg M. Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J Physiol* 1990;425:545-62.
- Silva C, Rio ME, Cruz F. Desensitization of bladder sensory fibres by intravesical resiniferatoxin, a capsaicin analogue: long-term results for the treatment of detrusor hyperreflexia. *Eur Urol* 2000;38:444-52.
- Silva C, Ribeiro MJ, Cruz F. The effect of intravesical resiniferatoxin in patients with idiopathic detrusor instability suggests that involuntary detrusor contractions are triggered by C-fiber input. *Journal of Urology* (no prelo).
- Steers WD, De Groat WC. Effect of bladder outlet obstruction on micturition reflex pathways in the rat. *J Urol* 1988;140:864-71.
- Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999;51:159-211.
- Vizzard MA. Alterations in spinal cord Fos protein expression induced by bladder stimulation following cystitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:R1027-39.
- Vizzard MA, Boyle MM. Increased expression of growth associated protein (GAP-43) in lower urinary tract pathways following cyclophosphamide (CYP) – induced cystitis. *Brain Res* 1999;844:174-87.

Trabalho galardoado com o Prémio Dor 2001 da Fundação Grünenthal

Envolvimento dos Receptores Metabotrópicos do Glutamato na Dor Crónica: Estudo Experimental

Fani Lourenço Moreira Neto, José Manuel Castro-Lopes

O trabalho agora apresentado foi publicado nos seguintes artigos científicos:

Neto FL, Schadrack J, Berthele A, Zieglgänsberger W, Tölle TR, Castro-Lopes JM. Differential Distribution of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype mRNAs in the Thalamus of the Rat. *Brain Res* 2000;854:93-105.

Neto FL, Schadrack J, Platzer S, Zieglgänsberger W, Tölle TR, Castro-Lopes JM. Expression of Metabotropic Glutamate Receptors mRNA in the Thalamus and Brainstem of Monoarthritic Rats. *Mol Brain Res* 2000;81:140-54.

Neto FL, Castro-Lopes JM. Antinociceptive Effect of a Group II Metabotropic Glutamate Receptors Antagonist in the Thalamus of Monoarthritic Rats. *Neurosci Lett* 2000;296:25-8.

Introdução

O tálamo desempenha uma função primordial na transmissão de informação sensitiva para o córtex cerebral¹⁻⁵, estando envolvido na modulação da transmissão nociceptiva⁶⁻¹⁰. Os núcleos talâmicos são geralmente divididos em dois grandes grupos, os núcleos "principais" ou de transmissão e os núcleos da linha média e intralaminares⁵. Estudos anatómicos e electrofisiológicos sugerem que, de entre os núcleos talâmicos, o complexo ventrobasal (VB), formado pelos núcleos ventroposterior lateral (VPL) e ventroposterior medial (VPM), e o núcleo posterior (Po) do tálamo, são importantes locais de transmissão de impulsos nociceptivos que chegam da medula espinhal. Eles constituem o chamado "tálamo lateral", responsável pelo componente sensitivo-discriminativo da dor^{6,11,12}. Também importantes na nocicepção parecem ser o núcleo *submedius* (Sub), que faz parte do tálamo medial e que está provavelmente relacionado com o componente afetivomotivacional da dor^{6,13,14}, e o núcleo parafascicular do tálamo (Pf)^{15,16}. O núcleo reticular do tálamo (Rt) é considerado um terceiro tipo de núcleo talâmico, e tem uma localização peculiar rodeando dorsolateralmente os restantes núcleos do tálamo. Este núcleo estabelece, pois, uma fronteira entre os restantes núcleos talâmicos e o córtex, tendo uma função moduladora sobre a actividade do circuito tálamo-cortico-talâmico^{2,4,17}.

Existem três classes principais de neurónios no tálamo: os neurónios de transmissão, os interneurónios locais inibitórios e os neurónios inibitórios localizados no Rt^{2,3,18}. Os neurónios talâmicos libertam um elevado número de neurotransmissores que modulam, individualmente ou em conjunto com outros neurotransmissores, a acção desses núcle-

os¹⁹. Nestes incluem-se o L-glutamato (L-Glu), o ácido γ -amino butírico (GABA), a acetilcolina, a noradrenalina e a serotonina. O L-Glu é o aminoácido excitatório mais importante e tem uma actividade generalizada em todo o sistema nervoso central (SNC), existindo numerosas evidências da sua importância no processamento da dor²⁰⁻²⁴. A acção do L-Glu é mediada por vários tipos de receptores que se encontram reunidos em dois grandes grupos de acordo com as suas características electrofisiológicas, farmacológicas e bioquímicas²⁵. Os receptores ionotrópicos do glutamato (iGluR) são heteroméricos encontrando-se directamente ligados a canais iónicos selectivos para determinados cationes, e incluem os receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA), de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) e de cainato²⁵⁻²⁸. Os receptores metabotrópicos do glutamato (mGluR) pertencem à família de receptores monoméricos que actuam em sistemas de segundos mensageiros ou canais iónicos por activação de proteínas de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP), também denominadas proteínas G. Baseado na análise da sequência de aminoácidos, pensa-se que os mGluR são constituídos por sete segmentos transmembranares, uma grande região terminal amino (N) extracelular bastante conservada e uma região terminal carboxi (C) intracelular com tamanho variável e pouco conservada entre os membros da família^{25,29-31}. Até à presente data, foram clonados oito genes diferentes que codificam mGluR (mGluR1 a mGluR8) e destes alguns apresentam ainda variantes gerados por *splicing* alternativo no terminal C, o que representa uma grande variabilidade de receptores mGluR^{25,30,32,33}. Os mGluR são classificados em três grupos distintos de acordo com a homologia das suas sequências, farmacologia e mecanismos de transdução de sinal. O grupo I inclui o mGluR1 e o mGluR5 que estimulam a fosfolipase C (PLC), aumentando a concentração intracelular de trifosfato de inositol (IP₃) e a libertação de Ca²⁺ das reservas intracelulares. Os receptores dos grupos II (mGluR2

e 3) e III (mGluR4, 6, 7 e 8) estão acoplados negativamente à adenil ciclase, baixando os níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC)^{25,30,34}. Dentro do grupo III, o mGluR6, que se encontra exclusivamente em células da retina, também se acopla a uma fosfodiesterase que degrada o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc)³⁰. A activação de segundos mensageiros induz uma série de mecanismos intracelulares modulando a actividade de canais iónicos e, portanto, as conductâncias iónicas das membranas e as propriedades electrofisiológicas dos neurónios^{29,34,35}. Uma vez que diferentes subtipos de receptores têm diferentes mecanismos de actuação, os efeitos da neurotransmissão glutamatérgica são determinados pela composição dos vários subtipos de receptores no local de sinapse.

Tem sido demonstrado que a activação de mGluR afecta a excitação neuronal a vários níveis, estando relacionada com o desenvolvimento cerebral e a plasticidade sináptica, influenciando mecanismos de aprendizagem e memória e participando na indução de potenciação e depressão de longa duração (LTP e LTD, respectivamente)^{25,36,37}. Além disso têm sido associados com a neurotoxicidade induzida pelo glutamato, com diversos estados patológicos, possuindo ainda noutras situações uma acção neuroprotectora³⁷⁻³⁹. Nos últimos anos, os mGluR têm também sido implicados na modulação da dor aguda e inflamatória, principalmente na medula espinhal⁴⁰⁻⁴⁶, mas também em algumas regiões do tronco cerebral como a substância cinzenta periaqueductal (PAG)⁴⁷. No tálamo, diversos estudos electrofisiológicos evidenciaram o envolvimento dos mGluR na transmissão sináptica, actuando não só pós-sinápticamente por despolarização de neurónios de transmissão talâmicos, mas também pré-sinápticamente por modulação da inibição mediada pelo GABA, influenciando assim o fluxo tálamo-cortico-talâmico e a transmissão de informação sensitiva⁴⁸⁻⁵⁴.

A análise da distribuição específica de subtipos de mGluR nas diferentes subregiões talâmicas pode contribuir para uma melhor compreensão do papel das vias glutamatérgicas na actividade talâmica. Recentemente, a distribuição do ARNm para subtipos de mGluR foi estudada na SNC de ratos por diferentes grupos, usando hibridização *in situ*⁵⁵⁻⁶⁴. Embora alguns desses estudos façam uma descrição qualitativa da distribuição do ARNm de certos mGluR no tálamo, a maioria deles inclui um grande número de regiões do encéfalo e não dá uma atenção especial e detalhada a cada um dos núcleos talâmicos individualmente. Além disso, esses trabalhos restringiram-se a um ou dois subtipos de mGluR por estudo, o que não permite a comparação directa da expressão do ARNm de múltiplos subtipos de mGluR ao mesmo tempo dentro de um mesmo núcleo talâmico, especialmente porque as condições intrínsecas da hibridização *in situ* podem variar de cada vez que a técnica é utilizada, impedindo comparações quantitativas rigorosas⁶⁵. Deste modo, no presente trabalho, foi feita uma hibridização *in situ* de vários subtipos de mGluR simultaneamente, em cortes adjacentes do encéfalo de ratos normais, de modo a obter-se uma descrição mais sistemática e a comparação da distribuição quantitativa regional do ARNm para diferentes subtipos de mGluR nos diversos núcleos talâmicos. Estudos anteriores demonstraram que a expressão do ARNm para o mGluR2 no tálamo é baixa⁵⁹, e que o ARNm para o mGluR6 é exclusivamente expresso na retina^{25,30,66}. Foi também demonstrado que o mGluR8 é muito expresso na retina, bolbo olfactivo e nos tubérculos mamilares do ratinho adulto, mas tem uma expressão muito reduzida e restrita a algumas células disseminadas pelo córtex e encéfalo posterior⁵⁶, embora um estudo mais recente tenha demonstrado haver uma expressão proeminente de ARNm para o mGluR8 no Rt lateral do tálamo de rato⁶⁷. Devido a razões metodológicas relacionadas com o número de cortes necessários à hibridização de cada mGluR e ao pequeno tamanho de alguns subnúcleos talâmicos, não é possível

proceder à hibridização simultânea para os oito subtipos de mGluR actualmente conhecidos em cada um dos núcleos talâmicos de um único animal, até porque experiências preliminares demonstraram haver diferenças rostrocaudais na expressão de alguns mGluR em cada núcleo individualmente. Assim, na primeira parte deste trabalho foi analisada a expressão do ARNm para os subtipos mGluR1, 3, 4, 5 e 7, em cortes transversais do tálamo do rato a diferentes níveis rostrocaudais, usando hibridização *in situ* com sondas de oligonucleótidos específicas para cada subtipo.

A injeção intra-articular de adjuvante completo de Freund's (CFA) na articulação tibiotársica do rato provoca uma monoartrite inflamatória crónica estável⁶⁸. Os animais monoartríticos revelam hiperalgesia e alodínia em poucos dias e adoptam um comportamento de defesa da pata afectada⁶⁹. Para medição da alodínia nestes animais é comum utilizar-se um teste nociceptivo padrão denominado "teste da flexão do tornozelo"⁶⁹. Estudos anteriores em ratos monoartríticos, usando a técnica de mapeamento por injeção de 2-deoxiglucose (2-DG), demonstraram ocorrer um aumento bifásico não-linear da actividade metabólica neuronal em regiões espinhais⁷⁰ e supra-espinhais durante o desenvolvimento da doença, incluindo um grande número de núcleos talâmicos⁷¹. Além disso, o aumento crónico do afluxo nociceptivo causa alterações prolongadas no funcionamento e actividade do SNC^{72,73}, tais como aumento dos campos receptivos neuronais⁷⁴⁻⁷⁶ e sensibilização central^{72,76-78}. Um elevado número de neurotransmissores e sistemas modulatórios contribuem para esta plasticidade do sistema nociceptivo dependente da actividade, estando os seus níveis de expressão alterados em resposta ao afluxo nócico crónico^{40,72,79-82}. Assim, também neste estudo pretendeu-se averiguar possíveis alterações da expressão dos mGluR nos núcleos talâmicos de animais monoartríticos em que se tinha observado um aumento da actividade metabólica neuronal⁷¹. Em particular, estudaram-se os níveis de expressão do ARNm para o mGluR1, 4 e 7 nos núcleos do VB, Po, Sub e Pf do tálamo, após se ter verificado serem estes mGluR os mais abundantemente expressos nessas regiões, e para o mGluR3 no Rt, único subtipo exclusiva e abundantemente expresso neste núcleo. As alterações da expressão nos ratos monoartríticos foram estudadas a diferentes tempos de evolução da doença (2, 4 e 14 dias), de modo a investigar-se se essas alterações também seguiriam um padrão temporal específico tal como foi observado para as modificações da actividade metabólica neuronal.

Finalmente, no VB, os mGluR do grupo II (mGluR2 e 3) parecem actuar como receptores pré-sinápticos localizados nos terminais de neurónios GABAérgicos que projectam do Rt, inibindo a libertação de GABA em resposta a estímulos sensitivos⁵³. No entanto, para além de um estudo recente que sugere a acção inibitória pós-sináptica dos mGluR do grupo II nos neurónios do Rt⁸³, pouco se sabe acerca do papel funcional dos subtipos de mGluR do grupo II neste núcleo, particularmente após estimulação nócica. Assim, ainda no presente estudo, ratos monoartríticos foram injectados por estereotaxia no Rt contralateral à articulação inflamada, com ácido (2S)- α -etilglutâmico (EGLU), um antagonista selectivo dos mGluR do grupo II, de modo a investigar os efeitos na transmissão nociceptiva do bloqueio dos mGluR3 no Rt, utilizando o "teste da flexão do tornozelo"⁶⁹.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos do sexo masculino (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras), pesando entre 270 e 310 g. Todos os animais foram alojados em gaiolas com alimento e água *ad libitum* e mantidos a uma temperatura constante de 22 °C e luminosidade controlada (ciclo de 12 h luz/12 h escuridão). Todas as experiências respeitaram os

regulamentos das autoridades locais relativos ao manuseamento de animais de laboratório, assim como as regras para o estudo da dor experimental em animais conscientes⁸⁴ e a directiva 86/609/EEC da União Europeia.

Indução da inflamação crónica

A monoartrite foi induzida por injeção intra-articular de 50 ml de CFA na articulação tibiotársica de acordo com o método descrito por Butler⁶⁸, sob a acção de uma breve anestesia com halotano. Um grupo de animais controlo foi injectado de modo semelhante com soro fisiológico. A evolução da reacção inflamatória foi monitorizada usando uma escala subjectiva que tem em consideração os sinais inflamatórios locais e a actividade motora do animal, onde 0 equivale a não haverem sinais inflamatórios e 4 equivale a uma inflamação grave com repercussões sobre a actividade motora do animal⁷⁹.

Os animais monoartríticos foram sacrificados 2, 4 e 14 dias após a injeção de CFA (n = 6 por grupo experimental).

Hibridização *in situ*

Os animais utilizados no estudo da distribuição da expressão do ARNm para os diferentes subtipos de mGluR (ratos normais, n = 4), assim como os ratos monoartríticos e os respectivos ratos controlo (sacrificados dois dias após injeção de soro fisiológico, n = 6) foram decapitados e os seus encéfalos foram dissecados, imediatamente congelados em gelo seco e armazenados a -80 °C. Foram depois seccionadas fatias transversais do encéfalo (14 µm de espessura) num crióstato a -20 °C e montadas em lâminas de vidro revestidas com poli-L-lisina. Os cortes foram então fixados durante 5 min em 4% paraformaldeído a 4 °C, lavados em tampão fosfato salino (PBS) durante 2 min, desidratados em etanol a 70% e finalmente em etanol a 96% onde foram armazenados a 4 °C até se efectuar a hibridização *in situ*.

Para a hibridização *in situ* foi usado o método previamente descrito por Tölle, et al.⁸⁵, e Wisden e Morris⁸⁶. Assim, foram usadas sondas sintéticas de oligonucleótidos marcadas radioactivamente com [α -³²S]dATP (1.200 Ci/mmol; NEN Dupont) por acção da terminal transferase (Boehringer Mannheim, Alemanha), numa razão molar de 30:1 de dATP: oligonucleótido. Essas sondas foram depois diluídas a uma concentração de 1 µg/µl num tampão de hibridização contendo 50% de formamida, citrato de sódio salino (SSC) 4X e sulfato de dextrano (10%). Em seguida séries adjacentes de cortes do tálamo de ratos normais, controlo e monoartríticos, foram hibridizados com esta solução a 42 °C durante 17 h e depois foram sequencialmente lavados com SSC 1X a 56 °C durante 30 min, seguida de passagens por SSC 1X, SSC 0,1X e desidratação em etanol, à temperatura ambiente. As lâminas com os cortes foram então expostas a um filme Kodak XAR-5 durante 4 semanas e depois embebidas numa emulsão fotográfica (NTB2 Kodak) diluída em 0.05% de glicerol em água destilada e expostas durante 8 semanas. Os cortes foram depois revelados com o revelador D19 (Kodak), fixados e corados com tionina, e finalmente examinados em microscopia óptica de campo claro e escuro. A especificidade do sinal de hibridização foi determinada por incubação de cortes com um excesso de 100 vezes de sonda não-marcada juntamente com a sonda marcada correspondente. Nessas lâminas não foi possível detectar nenhum sinal para além dos valores do fundo (*background*).

No estudo da distribuição da expressão do ARNm de mGluR nos ratos normais foram analisados os subtipos mGluR1, 3, 4, 5 e 7 enquanto no estudo da expressão em ratos monoartríticos foram só analisados os subtipos mGluR1, 3, 4 e 7. As sondas sintéticas de oligonucleótidos específicas para o ARNm de cada mGluR foram já anterior-

mente descritas⁴⁰. Assim, essas sondas são complementares em 45-mers com as sequências que codificam 15 aminoácidos na zona aproximadamente 100 aminoácidos antes da primeira região transmembranar. As sequências codificadas por essas sondas são QYTEANRYDYVHVGVT para o mGluR1, VFNLQQTGGKYSYLK para o mGluR3, YQYQLRNGSAEYKVI para o mGluR4, WDNELKMDDE-VWS para o mGluR5, e YRLIGQWDELQLNI para o mGluR7.

Injeção estereotáxica de EGLU

De maneira a minimizar quaisquer comportamentos motivados pelo medo, os animais foram habituados ao investigador durante vários dias antes da injeção de CFA e durante a evolução da monoartrite até os testes comportamentais serem realizados (14 dias após injeção de CFA). Sete dias após a injeção de CFA, foi implantada cirurgicamente sob anestesia com halotano uma cânula-guia (Sterican, 23 gauge, 0,60 mm o.d., B. Braun A.G., Alemanha) a uma distância 3-5 mm dorsalmente à porção mais rostral do Rt contralateral à articulação inflamada, de acordo com as coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson⁸⁷ (dorsoventral [DV]: 5,8 mm; lateromedial [LM]: -1,9 mm; rostro-caudal [RC]: -1,30 mm, relativamente ao bregma). Após fixação da cânula ao crânio com parafusos de aço inoxidável e cimento acrílico de dentista, os animais recuperaram da cirurgia durante sete dias. No dia das experiências (14 dias após injeção de CFA) os ratos foram injectados no Rt com 2 µl de soro fisiológico (grupo controlo, n = 6) ou com 80 nmol do antagonista selectivo para o grupo II dos mGluR, o EGLU (Tocris Tockson, Grã-Bretanha, n = 6) dissolvido em 2 µl soro estéril, a pH 7,6. As injeções efectuaram-se através de uma agulha de injeção (0,30 mm o.d., Becton Dickinson, Irlanda) inserida na cânula-guia e ligada a uma seringa de Hamilton por um tubo de polietileno. A agulha de injeção foi descida 3-5 mm abaixo da extremidade da cânula-guia e as soluções foram administradas durante um período de 60 s. O "teste da flexão do tornozelo"⁶⁹ foi efectuado imediatamente antes da injeção (tempo 0) e a 15 tempos diferentes durante os 60 min que se sucederam à injeção (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 30, 45 e 60 min). Este teste foi realizado por um investigador desconhecido da substância injectada, e consiste na avaliação do número de vocalizações e/ou de reacções agressivas do animal em resposta a cinco flexões e extensões alternadas da articulação do tornozelo feitas pelo investigador. A pontuação final do teste é determinada usando uma escala de avaliação, onde os valores mais altos (2 pontos) são dados pelas vocalizações em resposta a manipulações moderadas (flexões e extensões) da articulação inflamada e uma pontuação mais baixa é dada quando não ocorrem respostas de nenhum tipo (0 pontos). A soma de todas as reacções a cada flexão e extensão, com valor máximo de 20, determina a pontuação do "teste da flexão do tornozelo", e dá uma indicação da alodínia e da hiperalgesia. A validade deste teste na avaliação dos efeitos de compostos analgésicos, tais como morfina em doses diferentes, foi já demonstrado em ratos monoartríticos⁶⁹.

Após o período experimental de 60 min, os ratos foram anestesiados com hidrato de cloral e foram perfundidos com paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4. Os encéfalos foram depois removidos e processados para posterior avaliação histológica do local da injeção em cortes transversais com 60 µm de espessura corados com Violeta de Cresilo (Fig. 10).

Análise de dados

Para se obter uma medição quantitativa da distribuição da expressão do ARNm para os mGluR, foram analisados cortes transversais consecutivos e seriados do tálamo de ratos normais hibridizados com cada um dos mGluR estuda-

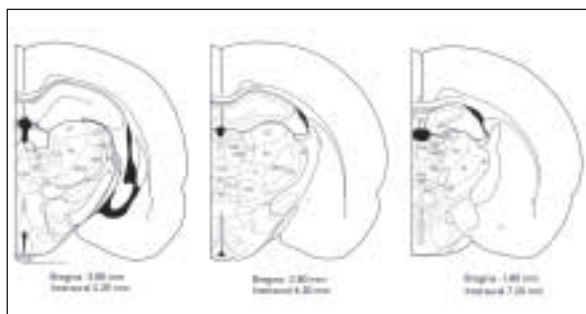


Figura 1. Desenhos esquemáticos de secções transversais seriadas do tálamo do rato adulto de acordo com Paxinos e Watson⁸⁷. Cada desenho corresponde aproximadamente a um dos três diferentes níveis rostrocaudais onde foi avaliada a expressão do ARNm para os vários subtipos de mGluR estudados.

dos. Para cada animal foram analisados 20 núcleos talâmicos nos dois lados dos cortes de encéfalo onde podiam ser anatomicamente identificados. A delimitação de cada área analisada (Fig. 1) foi feita de acordo com o Atlas do Encéfalo de Rato de Paxinos e Watson⁸⁷ em cortes que foram imersos em emulsão fotográfica e corados com tioni-na. Quando possível, cada um dos núcleos talâmicos estudados foi analisado a três diferentes níveis rostrocaudais (Fig. 1) correspondendo a valores interaurais compreendidos entre 4,84 e 5,20 mm para o primeiro nível, 6,20 e 6,44 mm para o segundo, e 7,20 e 7,60 mm para o terceiro nível, de acordo com Paxinos e Watson⁸⁷.

Para cada animal, cada núcleo e cada subtipo de mGluR em estudo, foram feitas medições bilaterais da razão entre a área total ocupada pelos grãos de prata localizados sobre células neuronais (e gliais no caso do mGluR3) e a área total ocupada por essas células (área de grãos/área de células), usando um sistema de captação e análise de imagem computadorizado (Optimas Bioscan) e acoplado a um microscópio óptico (Leica axioplan) e a uma câmara de vídeo (Sony Hyper HAD Digital Colour). Quando o núcleo seleccionado era demasiado grande para o tamanho da imagem captada pela câmara (região de interesse), foram adquiridas duas ou três imagens do mesmo núcleo em diferentes regiões, que foram posteriormente analisadas, e foi calculada a média dos resultados. Assim, para cada núcleo e cada mGluR foram primeiro obtidos valores médios fazendo-se a média de todos os valores de medição individuais para os lados direito e esquerdo em cada um dos níveis rostrocaudais, para os diferentes ratos. Para normalização, cada um desses valores médios foi depois dividido pelos valores do fundo, que foram determinados de modo semelhante aos outros valores, mas no neurópilo onde, muito provavelmente, não ocorreu marcação específica. Os números finais obtidos, que representam os valores de expressão do ARNm específica para cada subtipo e para cada região analisada, equivalem a uma densidade de grãos de prata e são apresentados como a média \pm desvio padrão da média (SEM) do número de vezes acima dos valores do fundo a que um certo RNAm se encontra expreso. Os valores de densidade de grãos inferiores a 1,5 vezes os valores do fundo foram considerados como sendo iguais aos valores do fundo.

Nos animais controlo e monoartríticos, somente seis núcleos do tálamo, incluindo o VPL, VPM, Po, Sub, Pf e Rt, foram seleccionados para análise quantitativa da expressão do ARNm para o mGluR1, 4 e 7 (nas cinco primeiras regiões) e para o mGluR3 (no Rt), tendo em conta o seu reconhecido envolvimento na nocicepção e o padrão de

expressão diferencial dos subtipos de mGluR nesses núcleos em animais normais observado na primeira parte deste trabalho. Também aqui os núcleos em questão foram analisados a três níveis rostro-caudais e quando necessário duas ou três imagens do mesmo núcleo em regiões diferentes foram captadas e a média dos resultados foi efectuada de modo semelhante ao anteriormente descrito mas, neste caso, as medições foram feitas separadamente para os lados ipsi e contralateral ao membro injectado com soro ou CFA. A média dos valores da expressão do ARNm para os mGluR nos lados ipsi e contralateral para cada núcleo foi obtida adicionando e fazendo-se a média dos valores individuais medidos em cada um dos níveis rostrocaudais descritos, excepto no Rt onde não foi feita essa média visto terem sido encontradas grandes diferenças rostrocaudais nos níveis de expressão do ARNm para o mGluR3. Seguidamente, também esses valores foram normalizados por divisão pelos valores do fundo de modo semelhante ao já descrito. Os valores médios de expressão do ARNm para cada mGluR em cada grupo experimental foram obtidos fazendo a média dos valores individuais normalizados. No grupo controlo, foi feita a média dos valores obtidos nos lados ipsi e contralateral uma vez que não foram encontradas diferenças estatísticas entre os valores dos dois lados (teste *t* de Student). Os valores da densidade de grãos de prata estão apresentados em tabelas sob a forma de média \pm SEM do número de vezes acima dos valores do fundo a que um certo RNAm se encontra expreso, e tal como anteriormente os valores de densidade de grãos inferiores a 1,5x foram considerados como sendo valores do fundo. Para comparar a expressão do ARNm para cada mGluR em cada núcleo talâmico dos ratos controlo ou dos ratos com 2, 4 ou 14 dias de monoartrite, foi efectuada uma análise de variância (ANOVA) para cada núcleo analisado, seguida do teste *posthoc* de Duncan.

Relativamente ao estudo do efeito da injeção de um antagonista do grupo II dos mGluR, as pontuações individuais do "teste da flexão do tornozelo" dos animais controlo e dos ratos injectados com EGLU foram comparadas estatisticamente através de uma análise de variância (ANOVA) com uma análise de observações repetidas. Os resultados apresentados representam as pontuações do teste (média \pm SEM) para os grupos controlo e injectado com EGLU a cada tempo avaliado (Fig. 9).

Resultados

Distribuição do ARNm para os mGluR no tálamo de ratos normais

A expressão do ARNm para o mGluR1, 3, 4, 5 e 7 foi investigada no tálamo a três níveis rostrocaudais diferentes. Os resultados para os diversos núcleos talâmicos estão sumariados nas tabelas 1 e 2. Para que se consiga uma melhor correlação entre os resultados e as diferentes regiões anatómicas, apresentam-se na figura 1 diagramas esquemáticos de cortes seriados do tálamo.

Em geral, os grãos de prata concentraram-se em corpos celulares com características citológicas de neurónios (Fig. 2a), com a excepção da sonda para o mGluR3 que também marcou presumíveis células gliais (Fig. 2c).

Cada um dos subtipos de mGluR investigado, mesmo quando pertencentes ao mesmo grupo (grupo I: mGluR1 e 5; grupo III: mGluR 4, e 7) apresentaram um padrão de expressão do ARNm diferencial nos diferentes núcleos talâmicos (Tabelas 1 e 2). A expressão mais pronunciada foi encontrada para o transcripto do mGluR4, sendo amplamente distribuída por todo o tálamo excepto no Rt, no qual também não se encontra praticamente nenhuma marcação específica para o mGluR1, 5 e 7. Em contraste, o sinal para o mGluR3 encon-

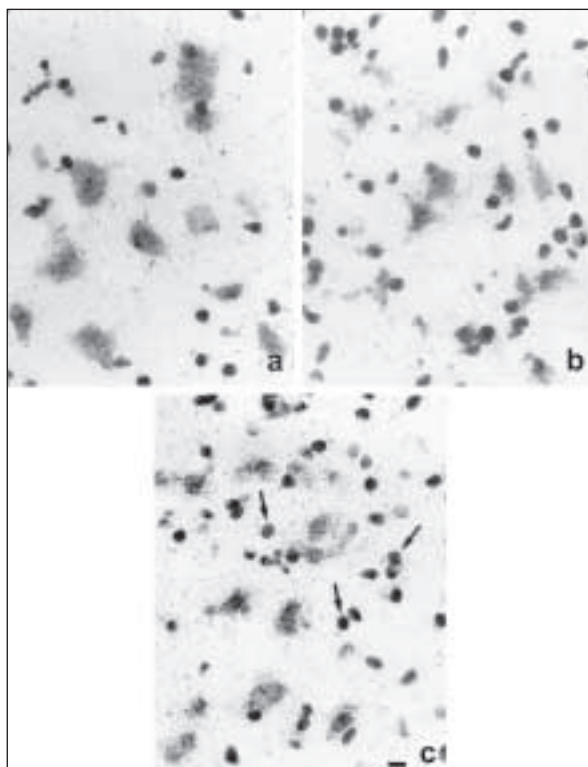


Figura 2. Microfotografias de campo claro de grande ampliação de cortes expostos a uma emulsão fotográfica onde se mostra a expressão celular do ARNm para diferentes subtipos de mGluR. **(a)** expressão do ARNm para o mGluR4 em células neuroniais do VPM; não foi detectada nenhuma expressão específica em células da glia; **(b)** o ARNm para o mGluR4 não foi expresso nem nas células neuroniais nem nas células presumivelmente gliais do Rt; **(c)** expressão do ARNm para o mGluR3 em células neuroniais e em células presumivelmente gliais (setas) no Rt; barra = 7 μ m.

trou-se praticamente restrito ao Rt (Tabela 1 e 2, Fig. 3). A expressão global de mGluR1 mostrou níveis heterogêneos e encontrava-se distribuída pela maioria das subregiões talâmicas, enquanto os transcriptos para o mGluR5 e o 7 mostraram um sinal fraco a moderado na sua globalidade (Tabelas 1 e 2). Segue-se uma descrição mais detalhada da expressão diferencial dos subtipos de mGluR estudados.

mGluR1

A distribuição do transcripto do mGluR1 variou entre os diferentes núcleos talâmicos (Fig. 3). A intensidade de marcação do ARNm foi maior nos neurónios dos núcleos caudais da linha média, particularmente nos núcleos centro-medial/centrolateral (CM/CL, Tabela 2), e ainda no Pf (Tabela 2). De modo interessante, a expressão para o mGluR1 foi mais elevada na parte caudal do que na parte rostral dos núcleos CM/CL, o mesmo não tendo ocorrido em relação à expressão de nenhum dos outros mGluR estudados. Foram também encontrados valores elevados de expressão do gene para o mGluR1 no Po (Tabela 1) e no VB, mais pronunciada na sua parte medial (VPM, Tabela 1) do que na lateral (VPL, Tabela 1). Ambos os núcleos apresentam uma marcação homogênea ao longo da sua extensão rostrocaudal (Tabela 1). Neurónios densamente marcados foram também encontrados nos núcleos ventrais da linha média como o Sub (Tabela 1) e o núcleo rombóide (Rh, Tabela 2). Os

núcleos mediodorsal e mediodorsolateral (MD e MDL, respectivamente, Tabela 1) apresentaram uma elevada expressão de ARNm para o mGluR1, que foi homogênea em toda a sua extensão rostrocaudal, o mesmo acontecendo no núcleo laterodorsal (LD, Tabela 1). O núcleo ventrolateral (VL) e os núcleos talâmicos anteromedial/intra-anteromedial (AM/IAM) também apresentaram uma elevada marcação neuronal. O principal núcleo de transmissão motor, o núcleo ventromedial (VM), foi moderadamente marcado na parte caudal mas fracamente marcado na zona rostral (Tabela 1). De modo semelhante, a parte caudal do núcleo paraventricular do tálamo (PVP) apresentou elevada marcação neuronal para o gene do mGluR1, enquanto rostralmente (PVA) esta marcação não foi para além dos valores de fundo (Tabela 2). As partes dorsal e ventral do núcleo geniculado lateral (DLG e VLG, respectivamente), o núcleo lateroposterior do tálamo (LP) e o núcleo gustatório (Gu) foram homogênea e moderadamente marcados. Uma expressão moderada para o gene do mGluR1 foi também verificada nos núcleos anterodorsal e anteroventral (AD e AV, respectivamente, Tabela 1) e no núcleo *reuniens* do tálamo (Re, Tabela 2). Foi observada uma marcação muito fraca mas ainda específica em alguns neurónios disseminados pelo Re/Rh (núcleos analisados em conjunto nas suas partes rostrais). Finalmente, não foi detectado nenhum sinal específico para o transcripto do mGluR1 no Rt (Tabela 2).

mGluR3

O ARNm para o mGluR3 estava quase exclusivamente restrito ao Rt, onde foram encontrados valores muito elevados de densidade de grãos na parte caudal (Tabela 2, Fig. 3). O sinal para o gene do mGluR3 no Rt diminuiu das zonas caudais para as rostrais, tendo sido detectado um sinal fraco na parte rostral, onde o núcleo apresenta uma área maior em cortes transversais (Tabela 2). Na maior parte dos restantes núcleos talâmicos estudados o sinal do ARNm para o mGluR3 foi muito fraco ou mesmo na ordem dos valores de fundo, exceptuando a parte caudal do MD, CM/CL e VM, onde a expressão foi aproximadamente duas vezes superior aos valores de fundo (Tabelas 1 e 2). Além disso, e em contraste com os outros mGluR analisados, o transcripto para o mGluR3 foi expresso não só em células neuroniais mas também em células presumivelmente gliais do Rt (Fig. 2c).

mGluR4

O sinal para o ARNm do mGluR4 encontrava-se amplamente e abundantemente distribuído por todos os núcleos talâmicos (Tabelas 1 e 2), com a excepção do Rt onde não foi detectada nenhuma marcação específica (Fig. 2b, Tabela 2). A expressão mais elevada foi encontrada nas células neuroniais dos núcleos da linha média tais como o CM/CL, Re e Rh (Tabela 2), assim como no LD e na parte caudal do VL e do VM (Tabela 1). O sinal para o mGluR4 estava ainda elevado ou muito elevado na maioria dos restantes núcleos estudados, particularmente no Po, nos núcleos do VB (VPL e VPM) e no MD e MD/MDL (Tabela 1). Somente no Re/Rh e no PVA, na zona mais rostral do tálamo, a marcação foi moderada ou fraca (Tabela 2). Não foram encontradas diferenças significativas ao longo da extensão rostrocaudal dos núcleos estudados, excepto para o núcleo paraventricular que estava muito marcado nas suas partes caudal e média, mas fracamente marcado na zona rostral (PVP, PV e PVA, respectivamente, Tabela 2).

mGluR5

O Re foi o único núcleo talâmico onde foi encontrada uma expressão muito elevada do gene para o mGluR5 (Tabela 2). Uma expressão neuronal elevada foi detectada no Gu e Vm (Tabela 1). Os núcleos dorsais tais como o DLG/VLG, LP e

Tabela 1. Valores de densidade de grãos (área de grãos/área de células) da expressão relativa de ARNm para cada mGluR nos núcleos talâmicos de transmissão de ratos normais, de acordo com Paxinos e Watson⁹⁷ e Price³ (valores expressos como a média ± SEM do “número de vezes acima dos valores de fundo”)

Núcleos de transmissão do tálamo	Grupo I		Grupo II	Grupo III	
	mGluR1	mGluR5	mGluR3	mGluR4	mGluR7
Núcleos dorsolateral/ventrolateral geniculados do tálamo (DLG/VLG)	2,4 ± 0,1 (+)	2,1 ± 0,1 (+)	1,7 ± 0,1 (±)	3,4 ± 0,3 (++)	2,0 ± 0,2 (+)
Núcleo ventroposterolateral do tálamo (VPL)					
caudal	3,8 ± 0,3 (+++)	1,9 ± 0,2 (±)	1,7 ± 0,1 (±)	4,2 ± 0,3 (+++)	2,2 ± 0,5 (+)
rostral	3,1 ± 0,2 (+++)	1,4 ± 0,1 (0)	1,5 ± 0,1 (±)	4,4 ± 0,3 (+++)	1,7 ± 0,1 (±)
Núcleo ventroposteromedial do tálamo (VPM)					
caudal	4,4 ± 0,2 (+++)	1,7 ± 0,1 (±)	1,4 ± 0,1 (0)	4,6 ± 0,2 (+++)	2,3 ± 0,3 (+)
rostral	4,0 ± 0,2 (+++)	1,4 ± 0,1 (0)	1,5 ± 0,1 (0)	4,5 ± 0,2 (+++)	1,8 ± 0,1 (±)
Núcleo posterior do tálamo (Po)					
caudal	3,9 ± 0,2 (++)	2,3 ± 0,1 (+)	1,5 ± 0,0 (0)	4,6 ± 0,2 (+++)	2,1 ± 0,2 (+)
rostral	4,4 ± 0,2 (+++)	2,1 ± 0,1 (+)	1,5 ± 0,1 (±)	4,8 ± 0,3 (+++)	1,9 ± 0,1 (±)
Núcleo gustatório do tálamo (Gu)	2,1 ± 0,3 (+)	3,5 ± 0,3 (++)	1,2 ± 0,1 (0)	3,9 ± 0,2 (++)	2,4 ± 0,4 (+)
Núcleo ventromedial do tálamo (VM)					
caudal	3,0 ± 0,2 (+)	3,2 ± 0,1 (++)	2,1 ± 0,3 (+)	5,7 ± 0,5 (+++)	1,9 ± 0,1 (±)
rostral	1,9 ± 0,2 (±)	3,5 ± 0,3 (++)	0,5 ± 0,1 (0)	4,2 ± 0,6 (+++)	1,9 ± 0,3 (±)
Núcleo ventrolateral do tálamo (VL)					
caudal	(n.d.)	2,5 ± 0,2 (+)	1,7 ± 0,2 (±)	5,1 ± 0,7 (+++)	1,9 ± 0,1 (±)
rostral	3,3 ± 0,3 (++)	1,6 ± 0,1 (±)	0,6 ± 0,1 (0)	4,2 ± 0,4 (+++)	1,6 ± 0,1 (±)
Núcleos mediodorsal/mediodorsolateral do tálamo (MD/MDL)					
caudal (MD)	3,1 ± 0,3 (++)	2,9 ± 0,4 (+)	1,9 ± 0,1 (±)	4,4 ± 0,1 (+++)	1,8 ± 0,3 (±)
intermédio (MD/MDL)	3,9 ± 0,2 (++)	2,5 ± 0,1 (+)	1,4 ± 0,1 (0)	4,0 ± 0,1 (++)	2,0 ± 0,2 (+)
rostral (MD/MDL)	3,4 ± 0,4 (++)	1,8 ± 0,1 (±)	0,6 ± 0,1 (0)	4,0 ± 0,3 (+++)	2,1 ± 0,5 (+)
Núcleo <i>submedius</i> do tálamo (Sub)	4,5 ± 0,7 (+++)	2,4 ± 0,2 (+)	1,4 ± 0,2 (0)	3,5 ± 0,1 (++)	1,7 ± 0,1 (±)
Núcleo anterodorsal do tálamo (AD)	2,7 ± 0,2 (+)	0,7 ± 0,1 (0)	0,4 ± 0,1 (0)	4,2 ± 0,5 (+++)	2,0 ± 0,4 (±)
Núcleo anteroventral do tálamo (AV)	2,1 ± 0,1 (+)	1,8 ± 0,1 (±)	0,6 ± 0,1 (0)	3,2 ± 0,2 (++)	1,9 ± 0,2 (±)
Núcleos anteromedial/interanteromedial do tálamo (AM/IAM)	3,0 ± 0,2 (++)	2,2 ± 0,2 (+)	0,6 ± 0,1 (0)	4,2 ± 0,4 (+++)	2,2 ± 0,4 (+)
Núcleo lateroposterior do tálamo (LP)	2,3 ± 0,2 (+)	2,9 ± 0,2 (+)	1,6 ± 0,1 (±)	4,2 ± 0,3 (+++)	1,9 ± 0,2 (±)
Núcleo laterodorsal do tálamo (LD)	3,6 ± 0,2 (++)	2,6 ± 0,1 (+)	1,6 ± 0,1 (±)	5,2 ± 0,3 (+++)	1,8 ± 0,1 (±)

Entre parêntesis foi atribuída uma escala para uma mais fácil análise das tabelas, onde +++ corresponde a valores **muito elevados** (>4 x-valores de fundo), ++ a **elevados** (entre 3-4), + a **moderados** (entre 2-3), (±) a **fracos** (entre 1,5-2), e 0 para valores **equivalentes aos de fundo** (<1,5 x-valores de fundo); n.d., não determinado.

LD foram moderadamente marcados pelo transcripto do mGluR5 (Tabela 1), assim como os núcleos da linha média Pf, CM/CL, Rh e, mais rostralmente, os núcleos Re/Rh (Tabela 2). As células neuronais do Sub e Po também

mostraram um nível de densidade de grãos moderado (Tabela 2), o mesmo acontecendo com os neurónios das partes caudal e intermédia do MD/MDL, enquanto que na sua parte rostral foi detectado um sinal fraco (Tabela 1). Os

Tabela 2. Valores de densidade de grãos (área de grãos/área de células) da expressão relativa de ARNm para cada mGluR nos núcleos intralaminares talâmicos e no núcleo reticular do tálamo de ratos normais, de acordo com Paxinos e Watson⁹⁷ e Price³ (valores expressos como a média ± SEM do “número de vezes acima dos valores de fundo”)

Núcleos intralaminares e núcleo reticular do tálamo	Grupo I		Grupo II	Grupo III	
	mGluR1	mGluR5	mGluR3	mGluR4	mGluR7
Núcleo centromedial/centrolateral do tálamo (CM/CL)					
caudal	5,9 ± 0,3 (+++)	2,9 ± 0,2 (+)	1,9 ± 0,1 (±)	5,2 ± 0,4 (+++)	1,6 ± 0,1 (±)
rostral	3,9 ± 0,3 (++)	2,7 ± 0,2 (+)	1,6 ± 0,2 (±)	6,1 ± 0,3 (+++)	1,9 ± 0,1 (±)
Núcleo parafascicular do tálamo (Pf)	5,2 ± 0,4 (+++)	2,7 ± 0,3 (+)	1,6 ± 0,1 (±)	3,4 ± 0,4 (++)	1,4 ± 0,1 (0)
Núcleo paraventricular do tálamo (PVP/PV/PVA)					
caudal (posterior; PVP)	3,2 ± 0,4 (++)	1,9 ± 0,1 (±)	0,8 ± 0,1 (0)	3,0 ± 0,3 (++)	2,0 ± 0,3 (+)
intermédio (PV)	2,0 ± 0,1 (+)	2,3 ± 0,1 (+)	0,9 ± 0,0 (0)	3,4 ± 0,4 (++)	2,7 ± 0,4 (+)
rostral (anterior; PVA)	1,2 ± 0,3 (0)	1,4 ± 0,1 (0)	0,5 ± 0,1 (0)	1,7 ± 0,2 (±)	2,3 ± 0,3 (+)
Núcleo <i>reuniens</i> do tálamo (Re)	2,6 ± 0,3 (+)	4,3 ± 0,1 (+++)	1,6 ± 0,3 (±)	5,5 ± 0,4 (+++)	2,1 ± 0,2 (+)
Núcleo rombóide do tálamo (Rh)	4,1 ± 0,7 (+++)	2,5 ± 0,1 (+)	1,2 ± 0,2 (0)	6,2 ± 0,8 (+++)	1,9 ± 0,2 (±)
Núcleos <i>reuniens</i> /rombóide do tálamo (Re/Rh; rostral)	2,0 ± 0,3 (±)	2,4 ± 0,2 (+)	0,4 ± 0,2 (0)	2,4 ± 0,3 (+)	1,9 ± 0,5 (±)
Núcleo reticular do tálamo (Rt)					
caudal	1,1 ± 0,1 (0)	1,3 ± 0,1 (0)	4,3 ± 0,4 (+++)	1,1 ± 0,1 (0)	1,2 ± 0,1 (0)
intermédio	0,9 ± 0,1 (0)	1,0 ± 0,0 (0)	3,4 ± 0,3 (++)	1,2 ± 0,1 (0)	1,2 ± 0,1 (0)
rostral	0,9 ± 0,1 (0)	0,8 ± 0,1 (0)	1,7 ± 0,3 (±)	1,3 ± 0,1 (0)	1,6 ± 0,2 (±)

Entre parêntesis foi atribuída uma escala para uma mais fácil análise das tabelas, onde +++ corresponde a valores **muito elevados** (>4 x-valores de fundo), ++ a **elevados** (entre 3-4), + a **moderado** (entre 2-3), (±) a **fracos** (entre 1,5-2), e 0 para valores **equivalentes aos de fundo** (<1,5 x-valores de fundo).

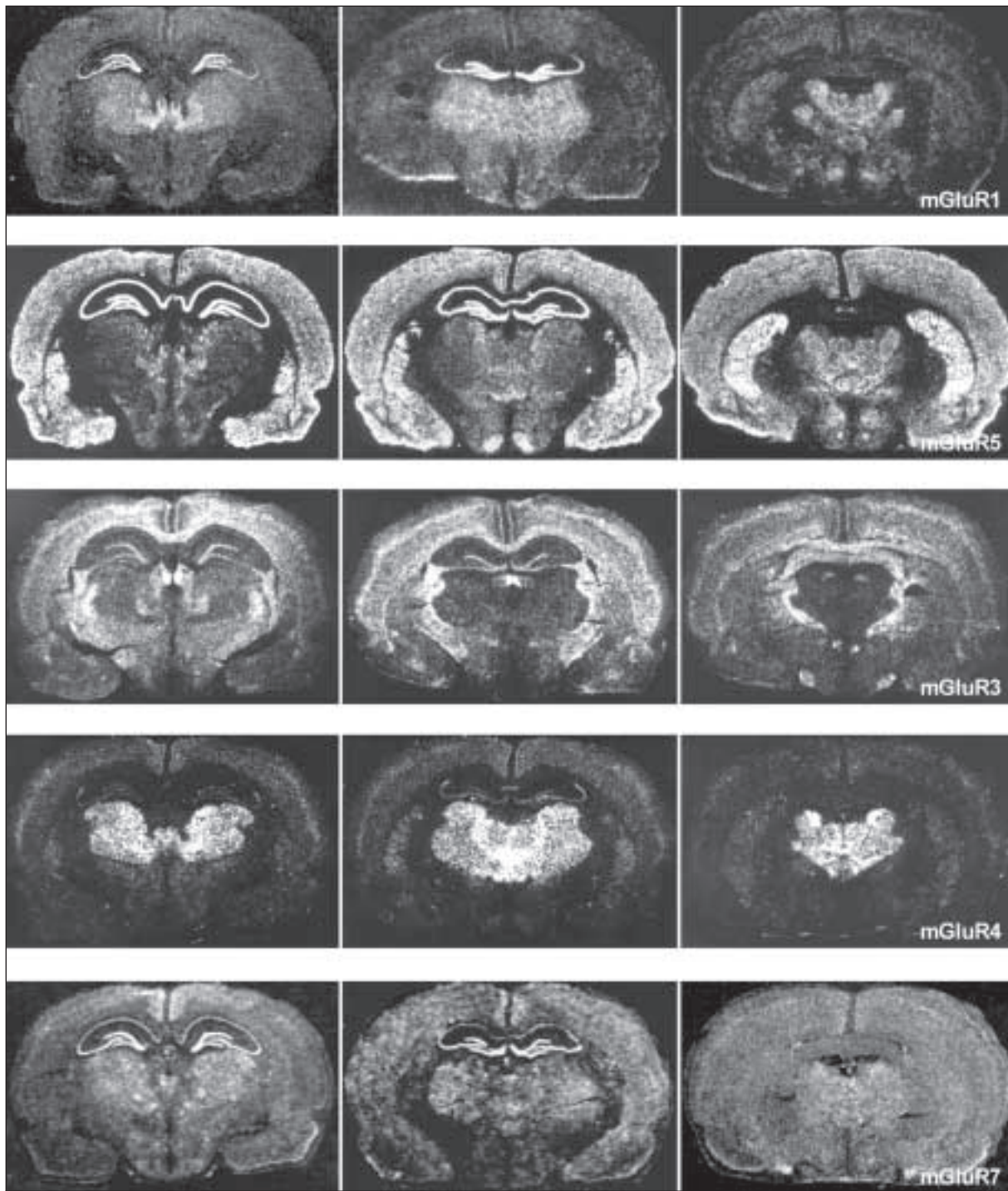


Figura 3. Microfotografias de grande ampliação de filmes de raios X onde se mostra a expressão do ARNm para o mGluR1, 5, 3, 4 e 7 no tálamo do rato. Da esquerda para a direita, cada plano do encéfalo corresponde a cada um dos níveis rostrocaudais ilustrados nos desenhos esquemáticos da figura 1, e descritos nas Tabelas 1, 2 e 3. Notar a expressão muito elevada e homogênea do ARNm para o mGluR4 em todos os núcleos talâmicos excepto no Rt. Em contraste, a expressão no tálamo do ARNm para o mGluR3 foi praticamente restrita a este núcleo.

núcleos do complexo ventrobasal, o VPM e o VPL, apresentaram uma marcação fraca nas suas partes caudais mas não mostraram qualquer sinal específico no corte rostral (Tabela 1). De modo semelhante, níveis distintos de expressão do gene para o mGluR5 foram detectados ao longo da extensão rostrocaudal do VL e do PV. No primeiro núcleo, o sinal decresceu de moderado para fraco da parte caudal para a rostral, enquanto no PV foi observada uma expressão

fraca (no PVP) ou moderada (PV) nas zonas posterior e intermédia, mas não foi detectado qualquer sinal na sua parte anterior (PVA). Nos núcleos mais rostrais foi também observada uma marcação diferencial, com um sinal moderado ou fraco no AM/IAM ou no AV, respectivamente, e nenhum sinal detectável acima dos valores de fundo no AD (Tabela 1). Finalmente, não foi possível observar qualquer marcação específica em toda a extensão rostrocaudal do Rt (Tabela 2).

mGluR7

Tal como para o mGluR5, a marcação para o ARNm do mGluR7 não era abundante no tálamo do rato. Em geral, encontrou-se uma expressão homogénea em todo o tálamo, com um sinal moderado a fraco em todos os núcleos investigados. Os valores mais elevados foram detectados no PV, mas um sinal moderado estava também presente nas outras partes deste núcleo (PVP e PVA), assim como no DLG/VLG, na parte caudal do Po e dos núcleos do complexo ventrobasal (VPM e VPL) e no Gu (Tabela 1). O Re, o MD/MDL tanto na parte intermédia como na rostral, e o AM/IAM na parte rostral do tálamo, apresentaram igualmente uma expressão moderada para o gene do mGluR7 (Tabelas 1 e 2). Foram ainda encontrados neurónios fracamente marcados e disseminados por outros núcleos como os intralaminares CM/CL (Tabela 2), e os núcleos motores VL e VM (Tabela 1). Valores comparáveis de expressão fraca do ARNm para o mGluR7 foram também observados no Rh, Re/Rh, Sub e nos núcleos anteriores (AD e AV), assim como nos núcleos laterais LP e LD (Tabelas 1 e 2). As partes rostrais do Po, VPM e VPL também apresentaram níveis fracos de expressão (Tabela 1). Não foi observado nenhum sinal detectável no Pf e no Rt, excepto na parte mais rostral deste último núcleo onde o sinal foi muito fraco (Tabela 2).

Expressão do ARNm para os mGluR no tálamo de ratos monoartríticos

A evolução da monoartrite foi monitorizada em cada animal utilizando uma escala subjectiva com uma pontuação para o estado de inflamação⁷⁹. As respostas fisiopatológicas e comportamentais dos animais injectados com CFA foram semelhantes e seguiram um padrão temporal equivalente ao já anteriormente descrito^{68,70,71}. Resumidamente, os animais que foram injectados com soro fisiológico não apresentaram nenhuns sinais inflamatórios e tiveram um comportamento normal (pontuação da inflamação 0⁷⁹). Pelo contrário, a injeção de CFA induziu o aparecimento de uma notável reacção inflamatória restrita à pata inflamada, com tumefacção e o evitar de movimentos passivos nos animais com 2 dias de monoartrite (pontuação 2-3). Nos grupos com 4 e 14 dias de monoartrite, os animais apresentaram sinais inflamatórios mais graves e evidenciaram um comportamento de defesa com flexão persistente da articulação injectada (pontuação 3-4).

A expressão do ARNm de quatro mGluR, o mGluR1, 3, 4 e 7 foi analisada em núcleos seleccionados do tálamo de ratos controlo e de ratos com 2, 4 e 14 dias após a injeção de CFA. Na tabela 3 apresentam-se os valores de densidade de grãos para os quatro mGluR nos núcleos talâmicos investigados. Em geral, a expressão de ARNm para os diferentes subtipos de mGluR apresentava alterações diversas ao longo do tempo durante a evolução da doença. Os sinais para os transcriptos do mGluR1, 4 e 7 decresceram todos na monoartrite, mas com padrões temporais distintos, e esse efeito foi mais pronunciado nos núcleos do VB contralaterais ao membro afectado. Pelo contrário, a expressão do gene do mGluR3 aumentou no Rt dos animais monoartríticos. Uma descrição detalhada da expressão de cada mGluR nos núcleos talâmicos dos ratos controlo e monoartríticos é feita em seguida.

mGluR1

Para avaliar o padrão temporal geral das alterações da expressão do ARNm para o mGluR1 no tálamo durante a monoartrite, foi feita a média dos valores de densidade de grãos das regiões talâmicas analisadas para cada tempo estudado. Em comparação com os ratos controlo, nos ratos monoartríticos foi observado um decréscimo da expressão

do ARNm para o mGluR1, com um padrão temporal não-linear (Fig. 4).

Assim, nos ratos com 2 dias de monoartrite foi detectado um decréscimo de 31%, enquanto nos animais com 4 dias de monoartrite a expressão do ARNm para o mGluR1 foi semelhante aos valores controlo. Aos 14 dias de monoartrite a expressão do ARNm para o mGluR1 diminuiu novamente, embora menos marcadamente que nos animais com 2 dias. Aos 2 dias de monoartrite, a expressão do ARNm para o mGluR1 foi reduzida de modo significativo contralateralmente no VPL (-37%), VPM (-41%, Fig. 5), Po (-50%, Tabela 3), e reduções significativas foram também observadas ipsilateralmente no Pf (decrécimo de 48%).

Não foram detectadas alterações significativas aos 4 dias de monoartrite e os valores de densidade de grãos foram, em geral, muito semelhantes aos controlo em ambos os lados ipsi e contralateral. Nos animais com 14 dias de monoartrite, foi encontrada uma redução não significativa da expressão do ARNm para o mGluR1 bilateralmente nos núcleos do complexo ventrobasal e no Po e Pf (Tabela 3, Fig. 5). No núcleo *submedius* não foram detectadas quaisquer alterações em nenhum tempo de monoartrite.

mGluR4

De maneira geral, os valores médios da expressão do ARNm para o mGluR4 nas regiões talâmicas analisadas diminuíram aos 2 e 4 dias de monoartrite, atingindo valores mínimos a este último tempo, enquanto aos 14 dias os níveis de expressão foram semelhantes aos valores controlo (Fig. 4). Aos 2 dias de monoartrite, foram detectados decréscimos estatisticamente significativos bilateralmente no VPL (-22 e -33% para os lados ipsi e contralateral, respectivamente,

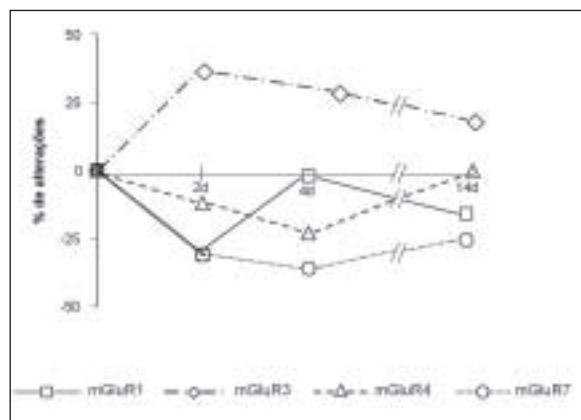


Figura 4. Padrão temporal da expressão do ARNm para o mGluR1, 3, 4 e 7 no tálamo durante a monoartrite, expressa como a percentagem de alterações relativamente aos controlo injectados com soro. Os valores da densidade de grãos dos lados ipsi e contralateral nas regiões talâmicas analisadas foram adicionados e foi feita a média para cada tempo de monoartrite investigado. Foi observado um padrão temporal bifásico para o transcripto do mGluR1 com diminuição máxima aos 2 dias (2d), retorno aos valores controlo aos 4 dias (4d) e novamente decréscimos aos 14 dias de monoartrite (14d). A redução do sinal para ARNm do mGluR4 foi máxima aos 4 dias, sendo os valores semelhantes aos controlo aos 14 dias. A expressão do transcripto do mGluR7 mostrou decréscimos de grandeza semelhante nos três tempos estudados. Em contraste, a expressão do ARNm para o mGluR3 aumentou sempre com alterações máximas observadas aos 2 dias.

Tabela 3. Valores de densidade de grãos / área de células da expressão de ARNm para o mGluR1, mGluR4 e mGluR7 nos núcleos talâmicos VPL, VPM, Po, Pf e Sub e para o mGluR3 no Rt; nos ratos controlo (injecção de soro fisiológico) e monoartríticos (MA) 2, 4 e 14 dias após a injecção de CFA (valores expressos como a média ± SEM do "número de vezes acima dos valores de fundo")

Núcleos do tálamo	controlo (c)		2 dias MA (2)		4 dias MA (4)		14 dias MA (14)		Valor F / valor p em ANOVA		Teste de Duncan	
	ipsi	contra	ipsi	contra	ipsi	contra	ipsi	contra	ipsi	contra	ipsi	contra
mGluR1												
Ventroposterolateral, VPL	3,5 ± 0,2	2,2 ± 0,2*	3,6 ± 0,5	3,6 ± 0,3	2,8 ± 0,3	2,9 ± 0,3	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	F = 1,10 / p = 0,38 n.s.	F = 5,98 / p = 0,01*	—	—
Ventroposteromedial, VPM	4,4 ± 0,3	2,6 ± 0,4*	4,3 ± 0,3	4,1 ± 0,2	3,5 ± 0,4	3,8 ± 0,4	3,7 ± 0,5	3,2 ± 0,3	F = 1,99 / p = 0,16 n.s.	F = 4,35 / p = 0,02*	—	2/c, 2/4
Posterior, Po	4,2 ± 0,3	2,1 ± 0,1*	4,5 ± 0,3	4,4 ± 0,6	3,8 ± 0,6	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	F = 0,53 / p = 0,67 n.s.	F = 5,18 / p = 0,01*	—	2/c, 2/4, 2/14
Paratascicular, Pf	5,0 ± 0,4	2,6 ± 0,3	4,2 ± 0,3	4,5 ± 0,8	3,8 ± 0,4	3,9 ± 0,6	3,7 ± 0,7	3,9 ± 0,6	F = 4,43 / p = 0,02*	F = 3,08 / p = 0,06 n.s.	2/c, 2/4	—
Submedial, Sub	4,4 ± 0,8	2,9 ± 0,7	3,9 ± 1,0	4,3 ± 0,7	3,7 ± 0,7	4,4 ± 0,7	3,7 ± 0,7	4,4 ± 0,7	F = 0,72 / p = 0,55 n.s.	F = 0,11 / p = 0,85 n.s.	—	—
mGluR3												
Reticular, Rt												
caudal	3,6 ± 0,4	3,8 ± 0,3	5,1 ± 0,5	3,5 ± 0,3	4,8 ± 0,3	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	F = 2,11 / p = 0,14 n.s.	F = 0,22 / p = 0,88 n.s.	—	—
interm	3,4 ± 0,5	4,9 ± 0,4	4,1 ± 0,5	3,6 ± 0,4	3,7 ± 0,5	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3	F = 1,73 / p = 0,20 n.s.	F = 0,95 / p = 0,44 n.s.	—	—
rostral	1,7 ± 0,2	3,2 ± 0,3*	3,2 ± 0,3*	3,3 ± 0,3*	3,0 ± 0,2*	3,2 ± 0,5*	3,2 ± 0,5*	3,2 ± 0,5*	F = 7,20 / p = 0,002*	F = 3,49 / p = 0,04*	2/c, 4/c, 14/c	2/c, 4/c, 14/c
mGluR4												
Ventroposterolateral, VPL	4,5 ± 0,3	3,0 ± 0,2*	3,1 ± 0,2*	2,8 ± 0,3*	3,5 ± 0,3*	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,5	F = 4,83 / p = 0,01*	F = 4,74 / p = 0,01*	2/c, 4/c, 14/c	2/c, 4/c, 2/14, 4/14
Ventroposteromedial, VPM	4,7 ± 0,2	3,7 ± 0,4*	3,6 ± 0,1	3,9 ± 0,4*	4,1 ± 0,3	4,1 ± 0,3	4,1 ± 0,3	4,1 ± 0,3	F = 2,70 / p = 0,08 n.s.	F = 4,94 / p = 0,01*	—	2/c, 4/c, 4/14
Posterior, Po	4,6 ± 0,3	3,7 ± 0,4	4,0 ± 0,3	3,3 ± 0,6	4,6 ± 0,1	5,0 ± 0,3	4,6 ± 0,1	5,0 ± 0,3	F = 0,63 / p = 0,61 n.s.	F = 3,42 / p = 0,04*	—	4/14, 2/14
Paratascicular, Pf	3,5 ± 0,4	2,8 ± 0,6	2,8 ± 0,6	2,3 ± 0,6	3,4 ± 0,5	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,4	F = 0,87 / p = 0,48 n.s.	F = 1,07 / p = 0,39 n.s.	—	—
Submedial, Sub	3,9 ± 0,2	4,5 ± 0,4	4,6 ± 0,5	4,4 ± 0,7	5,2 ± 0,7	4,4 ± 0,9	4,4 ± 0,9	4,4 ± 0,9	F = 2,60 / p = 0,08 n.s.	F = 0,23 / p = 0,87 n.s.	—	—
mGluR7												
Ventroposterolateral, VPL	2,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,1*	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2	F = 2,74 / p = 0,08 n.s.	F = 3,29 / p = 0,04*	4/c	4/c
Ventroposteromedial, VPM	2,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2*	1,2 ± 0,3*	1,0 ± 0,2*	1,3 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	1,2 ± 0,2*	F = 3,31 / p = 0,04*	F = 5,64 / p = 0,01*	2/c, 4/c, 14/c	2/c, 4/c, 14/c
Posterior, Po	2,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2*	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2*	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,2*	1,3 ± 0,2*	1,3 ± 0,2*	F = 1,94 / p = 0,16 n.s.	F = 4,31 / p = 0,02*	—	—
Submedial, Sub	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,4	1,6 ± 0,3	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,6	F = 0,41 / p = 0,75 n.s.	F = 0,27 / p = 0,85 n.s.	—	—

Os grupos experimentais são identificados por (c), (2), (4) e (14). * Valores F estatisticamente significativos, i.e. diferenças significativas entre os diversos grupos experimentais. As duas últimas colunas mostram os grupos experimentais com diferenças significativas (teste posthoc de Duncan onde, por exemplo, 4/c significa que o grupo "4 dias MA" é significativamente diferente do grupo "controlo"). Os valores de densidade de grãos a **negrito** com um * representam somente diferenças significativas comparativamente ao grupo "controlo": n.s., não significativo.

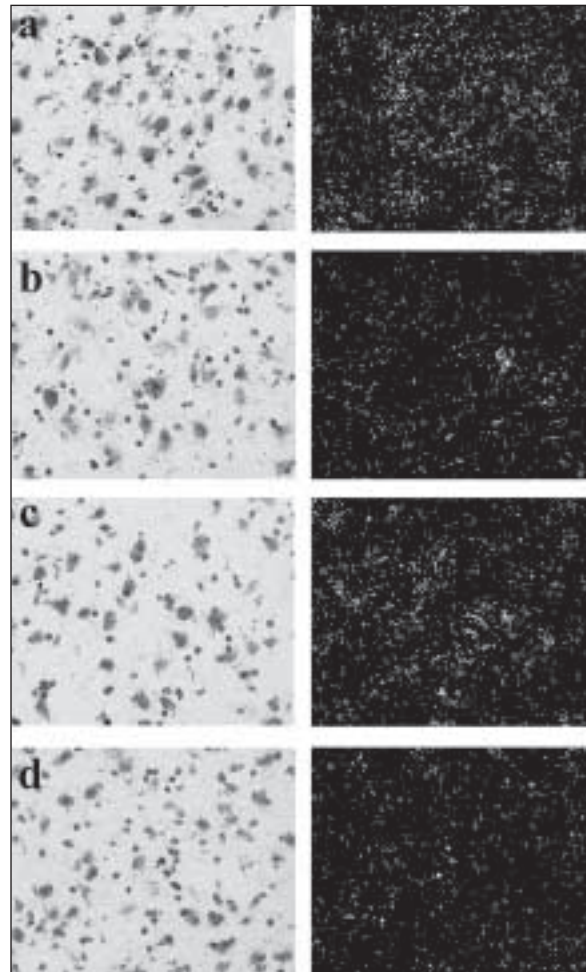


Figura 5. Imagens digitalizadas de microscopia óptica de campo claro (coluna esquerda) e de campo escuro correspondentes (coluna direita), de grande ampliação, de secções expostas a uma emulsão fotográfica onde se observa a expressão do ARNm para o mGluR1 no VPM de ratos controlo (a) e de ratos com 2 (b), 4 (c) e 14 dias (d) de monoartrite. O sinal para o ARNm do mGluR1 apresentou um padrão temporal bifásico tendo diminuído aos 2 dias de monoartrite, recuperado para valores similares aos controlo na monoartrite e diminuindo outra vez aos 14 dias.

Tabela 3 e Fig. 6) e contralateralmente no VPM (diminuição de 21%, Tabela 3).

Alterações comparáveis foram ainda observadas contralateralmente no Po e no Pf, embora estas não tenham alcançado significância estatística (Tabela 3). No grupo com 4 dias de monoartrite, foram encontrados decréscimos significativos bilateralmente no VPL (-31 e -38% para os lados ipsi e contralateral, respectivamente, Tabela 3 e Fig. 6) e contralateralmente no VPM (redução de 38%). Nos animais com 14 dias de monoartrite, só o VPL ipsilateral apresentou decréscimos significativos (-22%), enquanto as restantes regiões talâmicas analisadas apresentaram valores semelhantes aos dos animais controlo. Não foram detectadas alterações significativas no núcleo *submedialis*.

mGluR7

O padrão temporal global da expressão do ARNm para o mGluR7 apresentou diminuições de magnitude semelhante nos ratos com 2, 4 e 14 dias de monoartrite (reduções de 31,

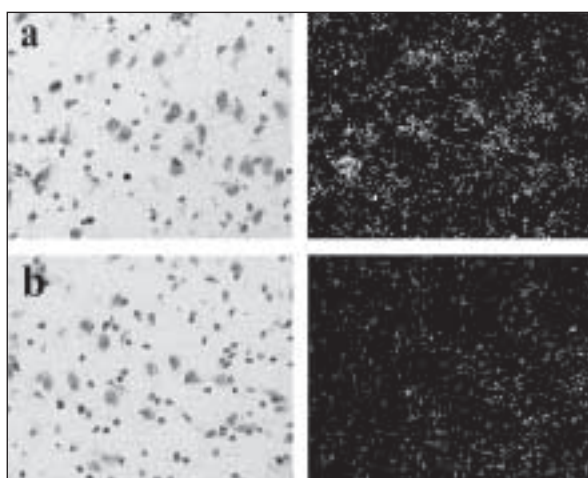


Figura 6. Imagens digitalizadas de microscopia óptica de campo claro (coluna esquerda) e de campo escuro correspondentes (coluna direita), de grande ampliação, de secções expostas a uma emulsão fotográfica onde se observa a expressão do ARNm para o mGluR4 no VPL de ratos controlo (a) e de ratos monoartríticos com 4 (b) de inflamação. As diminuições máximas do sinal para o ARNm do mGluR4 foram observadas a este tempo.

36 e 26%, respectivamente, Fig. 4). Aos 2 dias de monoartrite encontraram-se decréscimos significativos bilateralmente no VPM (-40% para ambos os lados ipsi e contralateral, Tabela 3) e no Po contralateral (reduções de 40%). O VPL apresentou reduções similares mas que, no entanto, não foram estatisticamente significativas (Tabela 3). Nos ratos com 4 dias de monoartrite foram verificadas reduções significativas no VPL e Po contralaterais (-45 e -35%, respectivamente), assim como em ambos os lados do VPM (-40 e -50%). As reduções observadas aos 14 dias de monoartrite foram semelhantes às encontradas aos 2 dias. Assim, o sinal para o ARNm do mGluR7 diminuiu cerca de 35% no Po contralateral e 35 e 40%, respectivamente, nos lados ipsi e contralateral do VPM. Não foram observadas alterações no Sub em nenhum tempo de monoartrite (Tabela 3). No Pf, não foi detectada expressão específica para o ARNm do mGluR7 quer nos animais controlo quer nos monoartríticos.

mGluR3

A expressão do ARNm para o mGluR3 no tálamo de ratos normais encontra-se praticamente restrita ao Rt, como verificado na primeira parte deste trabalho, e portanto a quantificação do ARNm para este subtipo de mGluR foi limitada a este núcleo. Contrariamente aos outros mGluR analisados, o sinal para o transcripto do mGluR3 aumentou, em geral, durante a monoartrite (Tabela 3 e Figs. 4 e 7).

Aumentos máximos foram observados aos 2 dias (+40%), mas os valores de densidade de grãos aos 4 e 14 dias de monoartrite foram ainda 31 e 22% acima dos controlo, respectivamente (Fig. 4). Os aumentos localizaram-se principalmente na parte mais rostral deste núcleo em ambos os lados ipsi e contralateral. Nesta região, os aumentos foram mais notáveis ipsilateralmente aos 2 dias (124% de aumento) mas também foram elevados no lado contralateral para o mesmo grupo de animais, assim como bilateralmente aos 4 e 14 dias de monoartrite (entre 76 e 94% de aumento). Noutros níveis rostrocaudais do Rt foram também observados aumentos entre 25 e 42% mas que não foram estatisticamente significativos.

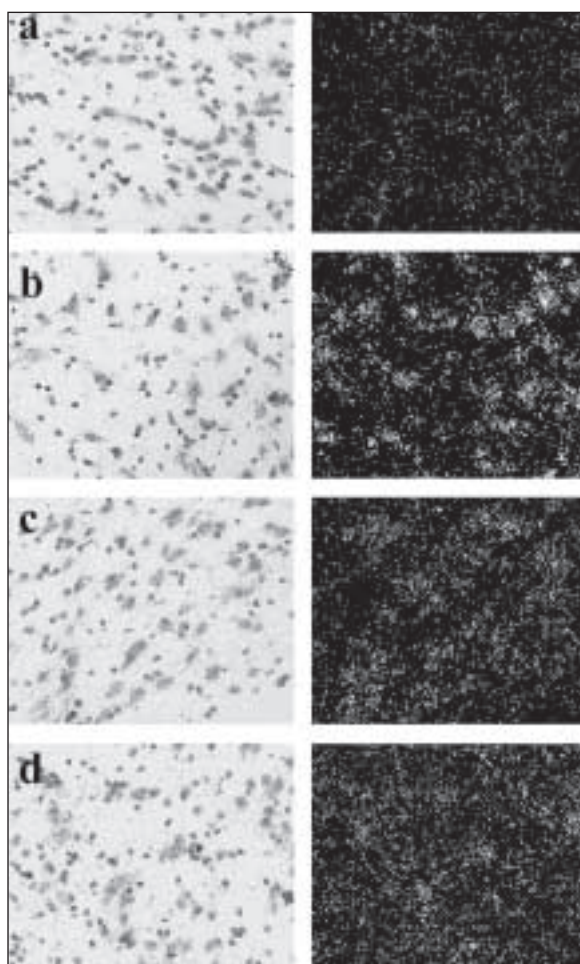


Figura 7. Imagens digitalizadas de microscopia óptica de campo claro (coluna esquerda) e de campo escuro correspondentes (coluna direita), de grande ampliação, de secções expostas a uma emulsão fotográfica onde se observa a expressão do ARNm para o mGluR3 no Rt de ratos controlo (a) e de ratos monoartríticos com 2 (b), 4 (c) e 14 dias (d) de doença. A expressão do ARNm para o mGluR3 teve aumentos máximos aos 2 dias, mas aos 4 e 14 dia também estava aumentada.

Injecção de EGLU no Rt contralateral de ratos monoartríticos

A evolução da monoartrite foi monitorizada diariamente em cada animal usando a escala subjectiva com uma pontuação para o estado de inflamação tal como anteriormente⁷⁹. A média dessa pontuação diária nos 14 dias que precederam a injeção de soro fisiológico ou de EGLU no Rt contralateral ao membro inflamado mostra-se na figura 8.

Apenas 1 dia após a injeção de CFA, os animais apresentaram uma marcada reacção inflamatória restrita à articulação injectada, e sinais comportamentais indicativos de hiperalgesia e alodinia. Durante os dias que se seguiram à cirurgia estereotáxica de implantação da cânula-guia houve um pequeno aumento dos sintomas até ao 11º dia e depois os sinais inflamatórios e comportamentais mantiveram-se constantes até ao dia da injeção no Rt. Para além disso, os animais estavam bem habituados ao investigador e não apresentaram quaisquer sinais de medo ou reacções agressivas quando manipulados.

Catorze dias após a injeção do CFA os animais foram seleccionados ao acaso para injeção intratálamica de EGLU ou soro fisiológico. A pontuação média do "teste da

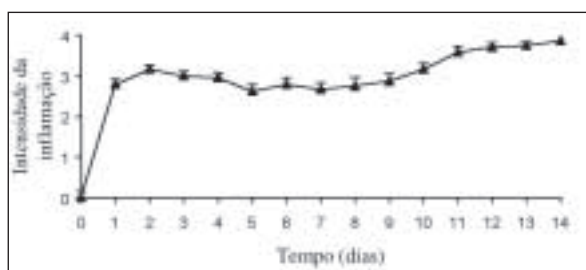


Figura 8. Avaliação da intensidade da inflamação (média \pm SEM) dos ratos monoartríticos ($n = 12$) antes da injeção de CFA (tempo 0) e nos restantes 14 dias que precederam a injeção de soro ou de EGLU. Os pontos foram atribuídos diariamente de acordo com Castro-Lopes, et al.⁷⁹, onde 0 significa que não existem sinais inflamatórios e 4 indica inflamação grave com repercussões na actividade motora do animal. Um dia após a injeção de CFA todos os animais apresentaram uma notória reacção inflamatória restrita à articulação inflamada, atingindo uma pontuação média de $2,8 \pm 0,2$. No dia 14, a pontuação média foi próxima do máximo e os animais foram seleccionados ao acaso para a injeção intratálamica de EGLU ou de soro fisiológico.

flexão do tornozelo”, obtida imediatamente antes da injeção e a tempos diferentes durante os 60 min seguintes, nos dois grupos experimentais (controlo e EGLU), está representada na figura 9. Nos ratos monoartríticos injectados com soro fisiológico, a pontuação do “teste da flexão do tornozelo” atingiu valores próximos do máximo imediatamente antes da injeção do soro fisiológico (tempo 0, pontuação $18,7 \pm 0,8$), e esses valores mantiveram-se praticamente constantes durante todo o período experimental de 60 min (Fig. 9), indicando a ocorrência de alodínia grave.

Pelo contrário, os valores da pontuação do “teste da flexão do tornozelo” para o grupo de ratos monoartríticos injectados com EGLU foram estatisticamente diferentes dos controlo, sendo próximos do máximo ($19,5 \pm 0,5$) antes da injeção de EGLU, mas diminuindo progressivamente após a injeção, começando aproximadamente aos 2 min (pontuação média de $14,9 \pm 1,4$) e atingindo valores mínimos aos 10 min após a injeção de EGLU (pontuação média de $7,7 \pm 1,6$). Seguidamente, os valores da pontuação do “teste da flexão do tornozelo” recuperaram lentamente, apresentando uma média de $16,3 \pm 1,6$ aos 30 min e $19,7 \pm 0,3$ no final da experiência.

Discussão

Distribuição do ARNm para os mGluR no tálamo de ratos normais

No presente estudo, foi feita uma análise detalhada da expressão do ARNm de cinco subtipos de mGluR no tálamo de ratos adultos normais, utilizando hibridização *in situ* com sondas de oligonucleótidos. Os resultados obtidos estão de acordo com trabalhos prévios sobre a distribuição do ARNm de mGluR no encéfalo de rato⁵⁵⁻⁶⁴. No entanto, a maioria dos estudos citados dizem respeito a um grande número de estruturas enquanto este estudo focou-se em numerosos núcleos talâmicos analisados a diferentes níveis rostrocaudais. Além disso, efectuando microdensitometria quantitativa em cortes praticamente adjacentes do encéfalo que foram imersos em emulsão fotográfica, foram também obtidos detalhes da expressão regional do ARNm de cada subtipo de mGluR em núcleos distintos do tálamo. A actividade específica das sondas marcadas radioactivamente, assim como a

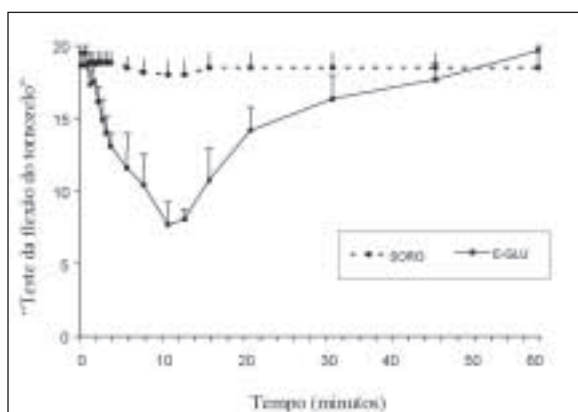


Figura 9. Pontuação do “teste da flexão do tornozelo” (média \pm SEM) para os ratos monoartríticos injectados com soro ou com EGLU, a diferentes tempos ($n = 6$ por grupo experimental). O “teste da flexão do tornozelo” para ratos monoartríticos⁶⁹ foi efectuado imediatamente antes da injeção (tempo 0) de soro (linha tracejada) ou de EGLU (linha a cheio), e a quinze tempos diferentes nos 60 min que se sucederam. As pontuações do “teste da flexão do tornozelo” no tempo 0 atingiram quase valores máximos em ambos os grupos, indicando alodínia grave. Os animais injectados com soro não sofreram qualquer alteração da pontuação ao longo de todo o período experimental de 60 min. Pelo contrário, as pontuações do “teste da flexão do tornozelo” para o grupo de ratos monoartríticos injectados com EGLU foram próximas do máximo durante 1 min após a injeção de EGLU, depois diminuíram progressivamente e alcançaram valores mínimos ($7,7 \pm 1,6$) aos 10 min. Nos tempos seguintes, as pontuações do “teste da flexão do tornozelo” recuperaram lentamente atingindo valores próximos do máximo no final da experiência.

eficiência da hibridização ou degradação/preservação do ARNm podem afectar o sinal de hibridização^{65,66}. Essas variações intrínsecas foram minimizadas pelo facto de se ter efectuado uma hibridização *in situ* simultânea para as cinco sondas específicas para cada um dos subtipos de mGluR investigados. Assim, embora os valores obtidos possam não ser rigorosamente correspondentes ao valor absoluto de ARNm presentes no tecido, a sua abundância relativa pode ser directamente comparada nas várias regiões talâmicas estudadas. Os dados mostram que, de modo semelhante ao que acontece noutras regiões do SNC, os subtipos de mGluR são expressos diferentemente em regiões talâmicas distintas, mesmo se esses subtipos pertencem ao mesmo grupo e, portanto, partilham uma homologia na sua sequência, nos mecanismos de transdução de sinal e nas propriedades farmacológicas. Para além disso, foram também encontradas diferenças rostro-caudais na expressão do mesmo subtipo de mGluR num determinado núcleo talâmico. Presentemente não são ainda claras as causas e/ou implicações deste achado. O padrão de conexões dos núcleos do tálamo é muito complexo e dentro do mesmo núcleo pode obedecer a uma organização rostrocaudal³. Por exemplo, no tálamo lateral foi demonstrado que o núcleo lateroposterior *pars lateralis* (LP1) no rato pode ser dividido numa parte rostral e outra caudal, baseado apenas nas suas conexões⁸⁸. De modo semelhante, o AM também apresenta um padrão de projecções especial com células localizadas nas suas partes rostral e caudal, que têm as suas áreas de projecção em regiões corticais e subcorticais distintas⁸⁹⁻⁹¹. Relativamente ao Rt, um núcleo que apresentou diferenças rostrocaudais

muito evidentes na expressão do ARNm para o mGluR3, foi verificado que, pelo menos para os núcleos intralaminares e anteriores do tálamo, cada núcleo talâmico se encontra ligado a uma área restrita do Rt na vizinhança do local onde as fibras entram ou saem do tálamo^{89,92,93}. O mesmo parece aplicar-se ao tálamo dorsal⁹⁴. Este padrão de conexões não uniforme em cada núcleo talâmico reflecte a complexidade da organização sináptica do tálamo. A expressão diferencial de subtipos de mGluR nas várias regiões talâmicas, e dentro de alguns núcleos talâmicos específicos, está provavelmente relacionada com essa organização, e sugere que os mGluR desempenham funções várias e distintas na neurotransmissão glutamatérgica no tálamo.

mGluR do grupo I

Os núcleos talâmicos apresentaram uma distribuição distinta do ARNm para cada um dos dois mGluR do grupo I (mGluR1 e mGluR5). O sinal para o mGluR1 foi moderado a elevado nas regiões caudais e intermédias do tálamo e fraco na zona rostral, enquanto a expressão do ARNm para o mGluR5 foi fraca a moderada em todos os núcleos talâmicos. Estes dados são consistentes com trabalhos anteriores onde se descreve uma expressão do ARNm para o mGluR1 elevada a moderada na maioria dos núcleos talâmicos⁶³. Nestes núcleos tem também sido descrita a expressão do ARNm para o mGluR5⁵⁵ e da respectiva proteína⁹⁵. No entanto, o mGluR5 é consideravelmente mais expresso no encéfalo em desenvolvimento do que no animal adulto⁶². As diferenças mais notáveis entre a expressão dos transcriptos para o mGluR1 e o mGluR5 foram encontradas no complexo ventrobasal (VPL e VPM) e no Po, onde o ARNm para o mGluR5 foi expresso em muito pouca quantidade. Esses núcleos recebem informação pela via espinotalâmica e também do núcleo espinhal do trigémino^{3,96} e têm sido implicados no processamento de estímulos dolorosos, estando envolvidos no componente sensitivodiscriminativo da nocicepção^{6-8,11,15}. Uma expressão pronunciadamente distinta desses dois subtipos de mGluR foi também detectada em alguns núcleos intralaminares e da linha média tais como o CM/CL, Sub, PVP e Pf. O CM/CL e o Sub também recebem projecções de células da via espinotalâmica^{3,96,97} e foi proposto que terão uma importante função no componente afectivomotivacional da dor^{6,15}, enquanto o Pf foi associado à modulação da dor⁹⁸. A marcação consideravelmente superior para o ARNm do mGluR1 nesses núcleos comparada com a de mGluR5 indicia um envolvimento específico do mGluR1 no processamento nociceptivo ao nível do tálamo. Por outro lado, a maior expressão do ARNm para o mGluR5 comparada com a de mGluR1 no VM, um núcleo de transmissão motor³, aponta para um envolvimento do mGluR5 no processamento de funções motoras. Finalmente, uma vez que tanto o ARNm para o mGluR1 como para o mGluR5 foram moderadamente expressos no DLG/MLG, poderão estar também implicados no processamento visual, como anteriormente sugerido⁹⁹.

A metodologia utilizada não permite verificar a localização pré- ou pós-sináptica dos subtipos de mGluR nas regiões talâmicas, mas estudos imunohistoquímicos de microscopia electrónica sugerem que a localização celular dos mGluR do grupo I pode variar de acordo com a área do encéfalo ou com a idade do animal. No córtex e no hipocampo a imunoreactividade para o mGluR5 foi essencialmente detectada em estruturas pós-sinápticas, mas foi também observada alguma marcação pré-sináptica em terminais axonais⁹⁵. A imunohistoquímica também permitiu a detecção do mGluR5 no neuropilo de alguns núcleos talâmicos de transmissão⁹⁵. No seu conjunto, estes dados apontam para uma localização pré- e/ou pós-sináptica nessas regiões, embora alguns autores proponham que o mGluR5 está presente em estruturas pós-sinápticas no tálamo⁹⁹. Em contraste, o mGluR1a (um variante

de *splicing* alternativo do mGluR1) localiza-se provavelmente apenas em estruturas pós-sinápticas no hipocampo^{95,100,101} e também no córtex, onde não foi observada uma marcação pré-sináptica para o mGluR1a⁹⁵. No tálamo, foi verificado que a proteína para o mGluR1a se localiza na periferia de membranas pós-sinápticas de dendrites de neurónios de transmissão talâmicos que recebem sinapses de axónios corticotálâmicos^{101,102}. Uma localização pós-sináptica do mGluR1 e do mGluR5 no tálamo está de acordo com estudos anteriores sugerindo que estes receptores são activados pelo influxo corticotálâmico e que participam na excitação sináptica de neurónios de transmissão talâmicos⁵¹. A propósito, a distribuição da imunoreactividade para o mGluR1 e mGluR5 é alterada das dendrites proximais e soma para as dendrites distais durante o desenvolvimento pós-natal do ratinho, onde se encontram associados com sinapses cortico-talâmicas na segunda semana pós-natal¹⁰³.

mGluR do grupo II

O subtipo mGluR3 foi o único mGluR do grupo II investigado neste estudo. O Rt foi o núcleo talâmico mais densamente marcado para o mGluR3, o que está de acordo com estudos anteriores^{60,64}. O Rt é o alvo de colaterais de fibras talamocorticais e corticotálâmicas^{1,104} e contém muitos neurónios imunoreactivos para o GABA, um neurotransmissor inibitório^{105,106}. Desempenha um papel importante como modulador, enviando uma sequência rítmica de potenciais de acção para o restante tálamo e córtex, estando provavelmente envolvido no controlo do influxo sensitivo entre as duas estruturas^{4,107,108}. O papel funcional do mGluR3 nos neurónios do Rt ainda não está clarificado. No entanto, uma vez que a marcação para o ARNm do mGluR3 foi muito abundante a praticamente restrita a este núcleo talâmico, é possível que contribua para a acção modulatória exercida pelo Rt, provavelmente em conjunto com os iGluR que também se encontram expressos neste núcleo⁵¹. Noutros núcleos talâmicos, o mGluR3 parece estar localizado nos terminais de neurónios GABAérgicos do Rt que projectam para os núcleos de transmissão e estar envolvido em algumas respostas pré-sinápticas no tálamo⁵⁰⁻⁵².

O ARNm para o mGluR3 foi maioritariamente expresso em células neuronais mas também foi detectada marcação em pequenas células com núcleo escuro, que são presumivelmente células gliais, confirmando trabalhos anteriores^{60,64,109}. É sabido que as células gliais expressam receptores para vários neurotransmissores dos quais os iGluR e os mGluR são exemplos^{110,111}. O papel fisiológico específico do mGluR3 nas células gliais ainda não está totalmente elucidado mas parece ser importante na comunicação neurónio-glia e/ou glia-glia^{51,60}. Várias evidências experimentais sugerem que a glia não tem um papel meramente de suporte mas participa no processamento da informação e plasticidade neuronal assim como está relacionada com alguns estados patológicos¹¹¹. Além disso, o glutamato, por activação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos, possivelmente não só regula a proliferação e diferenciação glial mas também modula a expressão genética por indução de um conjunto de genes de expressão imediata como os membros das famílias *Fos* e *Jun*, *NGF1-A* e *c-myc*¹¹¹.

Apesar das homologias de sequência existente entre os dois receptores do grupo II ser elevada (67%)¹¹², o padrão talâmico de distribuição do transcripto do mGluR2 é muito diferente comparativamente ao do mGluR3. De facto, foi encontrada uma marcação moderada em neurónios dos núcleos talâmicos anteriores, da linha média e intralaminares, assim como na parte rostral do VL, mas não foi detectada qualquer marcação específica em muitos dos outros núcleos tais como o Sub, os núcleos ventroposteriores (VPL e VPM) e o Rt⁵⁹.

mGluR do grupo III

A distribuição talâmica dos transcriptos do mGluR4 e mGluR7 também apresentou padrões distintos neste estudo. O sinal para o mGluR4 foi abundante e disseminado por todos os núcleos talâmicos com a excepção do Rt. Em contraste, o sinal para o transcripto do mGluR7 foi muito mais fraco, embora se tenha observado uma expressão moderada em neurónios de núcleos de transmissão sensitiva importantes tais como o DLG/MLG, relacionados com o sistema visual³, o Po e os núcleos do VB, envolvidos no processamento nociceptivo^{3,7,8,10,11}. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores^{57,61,64}, embora a intensidade da marcação para o mGluR4 quando comparada com a de mGluR7 tenha sido relativamente mais elevada neste trabalho do que em alguns estudos anteriores⁶¹. Além disso, Ohishi, et al.⁶¹ descreveram uma expressão do ARNm para o mGluR7 moderada no Rt enquanto no presente estudo o sinal foi próximo dos valores do fundo. Essas diferenças devem-se provavelmente ao uso de sondas diferentes sintetizadas para porções distintas da sequência de ARNm e/ou à diferente eficiência de marcação da sonda e/ou hibridização.

Os subtipos mGluR4 e mGluR7 parecem funcionar como auto-receptores pré-sinápticos, inibindo a transmissão glutamatérgica em diversas regiões do encéfalo^{61,113-115}. No entanto, a sua expressão pós-sináptica também já foi demonstrada. No hipocampo, por exemplo, o mGluR7 estava predominantemente localizado em locais pré-sinápticos de sinapses glutamatérgicas, enquanto o mGluR4 foi detectado tanto pré-sinápticamente em sinapses assimétricas (excitatórias) ou simétricas (inibitórias), como pós-sinápticamente em sinapses assimétricas¹¹³. Em contraste, uma marcação significativa de corpos celulares e dendrites no *locus coeruleus* sugeriu uma localização pós-sináptica do mGluR7 provavelmente em sinapses excitatórias, o que foi confirmado por imunocitoquímica e microscopia electrónica¹¹⁴. A expressão de mGluR4 e mGluR7 em numerosos núcleos talâmicos sensitivos tais como o Po e o VB sugere que estes receptores possam participar no processamento central de influxo sensitivo.

Como conclusão, os dados obtidos nesta primeira parte do trabalho confirmam a existência de um padrão de expressão distinto para cada um dos diversos subtipos de mGluR nos núcleos talâmicos, e avaliam a abundância relativa do ARNm para cada subtipo. A expressão de ARNm para os subtipos de mGluR não só variou entre núcleos talâmicos mas também variou em determinados núcleos ao longo do seu eixo rostro-caudal. A presença considerável de ARNm para o mGluR1, mGluR4 e mGluR7 em núcleos talâmicos que recebem influxo da medula espinhal e do trigémio aponta fortemente para um envolvimento destes subtipos no processamento de estímulos somato-sensitivo. O ARNm para o mGluR3 foi abundante no Rt e praticamente restrito a este núcleo talâmico, indiciando a sua participação na modulação da actividade talamocortical e cortico-talâmica pelo Rt.

Expressão do ARNm para os mGluR no tálamo de ratos monoartríticos

As lesões inflamatórias crónicas dos tecidos periféricos induzem alterações no sistema somatossensitivo que levam a hiperalgesia e alodínia. Os mecanismos periféricos incluem a activação de mediadores inflamatórios e a sensibilização de nociceptores^{72,74,75,116-118}. Na medula espinhal, a sensibilização central consiste numa excitabilidade aumentada dos neurónios espinhais, os quais adquirem novas respostas a estímulos de limiares baixos e/ou aumentam a sua resposta a estímulos de limiares elevados, e sofrem um aumento dos seus campos receptivos^{72,119-121}. Nas regiões supra-espinhais, por exemplo no tálamo, a actividade neuronal ou as respostas aos estímulos sensitivos são profundamente alteradas durante a nocicepção crónica, em particular no VB^{11,71,122}.

Uma grande variedade de mecanismos contribuem para esta reacção neuroplástica ao influxo nociceptivo prolongado, incluindo alterações na expressão de neurotransmissores, receptores, canais iónicos e sistemas de segundos mensageiros, as quais têm sido intensivamente estudadas^{77,79-81,116-118,123-127}. Neste estudo, foram observadas alterações supra-espinhais nos níveis de expressão do ARNm para alguns subtipos de mGluR em núcleos talâmicos de ratos monoartríticos. No tálamo, a expressão dos transcriptos do mGluR1, 4 e 7 foi reduzida no VB (VPL e VPM), no Po e em alguns casos no Pf, enquanto a expressão do ARNm do mGluR3 foi aumentada no Rt. Essas alterações apresentaram padrões temporais específicos durante a evolução da monoartrite, estudadas aos 2, 4 e 14 dias de doença. Os mecanismos moleculares responsáveis por essas alterações na expressão genética dos mGluR são ainda desconhecidos. Nos gânglios raquidianos (DRG) e na medula espinhal, os impulsos nociceptivos crónicos induzem uma alteração na expressão de várias moléculas efectoras, o que parece estar sob a regulação de cascatas de segundos mensageiros que activam uma série de factores de transcrição. Desses factores de transcrição, a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) parece ser muito importante em sistemas neuronais⁹². É portanto possível que, também no tálamo, a expressão do ARNm para os mGluR esteja sobre o controlo de mecanismos similares. Quaisquer que sejam os mecanismos envolvidos, as alterações da expressão de mGluR encontradas nos ratos monoartríticos neste estudo são muito provavelmente uma consequência do aumento de influxo nociceptivo, e não parte duma reacção generalizada à doença. De facto, não foram detectadas quaisquer alterações no Sub, ao contrário do que seria de esperar numa resposta sistémica. Além disso, as alterações na expressão do ARNm para os mGluR também não devem resultar duma activação inespecífica do tálamo por, por exemplo, um aumento da actividade tónica dos núcleos do tronco cerebral. A corroborar esta hipótese está o facto de não terem sido observadas alterações na expressão do ARNm para os mGluR em alguns núcleos talâmicos como Sub, o qual recebe projecções do núcleo da rafe dorsal assim como das partes ventrolateral e medial da substância cinzenta periaquedutal¹²⁸. Também o Pf, onde não se verificaram alterações na expressão do ARNm para os mGluR, excepto aos dois dias de monoartrite para o mGluR1, se encontra reciprocamente conectado com a maioria dos núcleos no sistema da rafe¹²⁹. A propósito, tanto o Sub como o Pf, têm sido mais implicados no componente afectivomotivacional da nocicepção^{6,13-15}, em contraste com o VB e o Po que estão envolvidos no componente sensitivodiscriminativo^{6,11,12} e onde foram detectadas alterações na expressão do ARNm para os mGluR.

A primeira parte deste trabalho e estudos anteriores^{57,60,61,63,64} descreveram a presença de ARNm para vários subtipos de mGluR em núcleos talâmicos de ratos normais, a maioria dos quais transmitindo a actividade dos principais sistemas sensitivos e motores para áreas específicas dos córtices somatossensitivo e motor. Os mesmos subtipos de mGluR encontram-se expressos nos DRG e nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, que também fazem parte das vias nociceptivas^{57,61,115,130,131}. Em conjunto, esses estudos anatómicos apontam para uma importante função dos mGluR no sistema nociceptivo. Trabalhos recentes corroboraram a sua importância na modulação dos estímulos nócicos, nomeadamente a nível espinhal, por participarem no aparecimento de hiperexcitabilidade devida a inflamação⁴³ e de hiperalgesia mecânica aguda⁴², ou na facilitação de nocicepção induzida pelo formol¹³². No tálamo, diversos estudos electrofisiológicos apontam para o envolvimento dos mGluR na mediação de influxo sensitivo^{48,51-54}. No entanto, pouco é sabido acerca das alterações dinâmicas dos sistemas neuroquímicos talâmicos, particularmente dos mGluR, em resposta a um estímulo nociceptivo prolongado.

Redução da expressão do ARNm para o mGluR1, mGluR4 e mGluR7 no VB e Po

O decréscimo da expressão do ARNm para o mGluR1, 4 e 7 nos ratos monoartríticos ocorreu bilateralmente na maioria dos casos, mas foi mais pronunciado no VPL, VPM e Po contralaterais ao membro afectado. Estes dados estão de acordo com o conhecido papel dos núcleos VB e Po no processamento sensitivodiscriminativo dos influxos nócicos^{6,11,12}, e com a activação bilateral de neurónios talâmicos em ratos monoartríticos, como revelado por mapeamento com 2-DG⁷¹.

Na medula espinhal, estudos anteriores *in vivo* sugeriram o envolvimento do grupo I (mGluR1 e mGluR5) no processamento nociceptivo, em particular em estados de dor prolongados^{41,43,44,46,133}. Anticorpos contra o mGluR1 e o mGluR5 aplicados intratecalmente tiveram uma actividade antinociceptiva em modelos de dor neuropática⁴¹, assim como em dor persistente induzida por agonistas dos mGluR do grupo I. Além disso, a deleção selectiva na medula espinhal da expressão do mGluR1 por aplicação de um oligonucleótido construído contra este subtipo (oligonucleótido *antisense*) anulou as respostas nociceptivas comportamentais e electrofisiológicas, sem afectar as respostas a estímulos inócuos em neurónios espinais multirreceptivos¹³⁴. Estes dados corroboraram estudos anteriores onde foi proposto um importante papel para o subtipo mGluR1 no processamento do influxo nociceptivo persistente^{46,133}. A nível talâmico, tanto os iGluR como os mGluR estão envolvidos na transmissão sensitiva⁵¹, e potenciais pós-sinápticos excitatórios de origem cortical são reduzidos por antagonistas dos mGluR do grupo I⁴⁸. A maior abundância do subtipo mGluR1 no tálamo relativamente ao mGluR5, verificada na primeira parte deste trabalho, e a participação do primeiro nas respostas electrofisiológicas dos neurónios do VB aos estímulos nócicos^{49,53} sugerem que o mGluR1, e não o mGluR5, seja o subtipo do grupo I mais implicado no processamento talâmico dos estímulos nócicos. Vários estudos demonstraram que o mGluR1 está localizado pós-sinápticamente na periferia de dendrites de neurónios talâmicos de transmissão que recebem aferências corticais^{51,101,102}. Foi proposto que a activação de mGluR do grupo I induz a excitação sináptica nos neurónios de transmissão, e que as respostas destas células aos estímulos nócicos dependem do recrutamento de transmissão corticotálamica⁵¹. Tendo isto em consideração, pode-se pôr a hipótese de que a diminuição da expressão do ARNm para o mGluR1 reflecte a existência de um mecanismo compensador, que contrabalança o maior recrutamento de transmissão corticotálamica induzida pelos estímulos nócicos. Devido a esta diminuição as células de transmissão ficariam menos activadas, induzindo uma redução da activação talamocortical, e na sua globalidade compensando a excitabilidade aumentada dos circuitos tálamo-cortico-talâmicos.

A expressão do ARNm para o mGluR4 e mGluR7 também foi reduzida nos núcleos do VB e no Po de ratos monoartríticos, mas apresentou padrões temporais distintos para cada um dos subtipos. A expressão desses subtipos de mGluR do grupo III em numerosos núcleos talâmicos foi analisada na primeira parte deste trabalho e, nestes, medula espinhal e DRG está bem documentada^{57,61,115,130,131}. Isto indicia a sua participação no processamento nociceptivo, embora existam poucos estudos que suportem com clareza esta suposição. A aplicação de agonistas que actuam nos mGluR do grupo III (e de outros nos mGluR do grupo II) reduziu a inibição no VB mediada pelo GABA em resposta a estímulos sensitivos, e esse efeito foi anulado pela administração de antagonistas selectivos^{50,52}. Foi sugerido que os mGluR do grupo III no VB se localizam pré-sinápticamente nos terminais de neurónios GABAérgicos com origem no Rt, e que a activação desses mGluR pré-sinápticos previne a libertação de GABA^{50,52}. Pode

então ser especulado que a redução na expressão do ARNm para o mGluR4 e mGluR7 detectada nos ratos monoartríticos irá levar a uma diminuição da acção inibitória desses receptores na libertação de GABA, resultando num aumento da actividade GABAérgica inibitória no VB. Desta forma, o aumento da actividade neuronal observada nesta região em ratos monoartríticos, e que foi revelada pelo aumento da actividade metabólica⁷¹, irá ser compensado.

No seu conjunto, a redução da expressão do ARNm para o mGluR1, 4 e 7 nas células de núcleos de transmissão talâmicos, contribui possivelmente para um decréscimo da excitabilidade do circuito tálamo-cortico-talâmico aumentada devido ao contínuo influxo nociceptivo originado pela monoartrite. Embora o Sub e o Pf também estejam implicados no processamento da dor^{6,13-16}, a expressão do ARNm para o mGluR1, 4 e 7 não se encontrou significativamente alterada nesses núcleos de ratos monoartríticos, com a excepção de um decréscimo casual da expressão do ARNm para o mGluR1 no Pf de ratos com 2 dias de inflamação. É portanto, possível que esses subtipos de mGluR não estejam muito envolvidos na modulação da hiperexcitabilidade crónica nesses núcleos em particular.

Aumento da expressão do ARNm para o mGluR3 no Rt

Em contraste com a redução na expressão do ARNm para o mGluR1, 4 e 7 no VB e Po, a expressão do transcripto para o mGluR3 aumentou bilateralmente no Rt dos ratos monoartríticos. Foi recentemente demonstrada um aumento bilateral da expressão do ARNm para o mGluR3 na medula espinhal de ratos jovens com uma inflamação periférica unilateral na pata posterior induzida por radiação ultravioleta⁴⁰. A aplicação intratecal de agonistas selectivos para os mGluR do grupo II produziu efeitos mistos (facilitatórios e inibitórios) nas respostas neuronais ao estímulo nócico da medula espinhal de ratos normais⁴⁵, enquanto que em ratos com uma inflamação induzida pela injeção de carragenina só foram observados efeitos inibitórios⁴⁵. Isto sugere que uma inflamação periférica também pode induzir alterações nos mecanismos de processamento da nocicepção a nível espinhal dos mGluR do grupo II.

O Rt rodeia dorsolateralmente os outros núcleos talâmicos e separa-os do córtex cerebral. Deste modo, desempenha um papel primordial na modulação do influxo cortico-talâmico e talamocortical pois recebe colaterais das fibras que ligam as duas regiões²⁻⁴. No Rt existe um elevado número de neurónios inibitórios GABAérgicos que projectam para outros núcleos talâmicos, incluindo o VB e o Po³. Num estudo recente, foi demonstrado que um agonista selectivo para os mGluR do grupo II causou uma hiperpolarização de pequena amplitude da membrana de neurónios do Rt, e que esta acção inibitória foi motivada pela activação de receptores pós-sinápticos, uma vez que persistiu mesmo na presença de TTX⁸³. Estes resultados levantam a possibilidade de que os influxos glutamatérgicos corticotalâmicos e talamocortical (através das fibras colaterais) inibam as células do Rt por activação de mGluR3 pós-sináptico. Neste caso, os aumentos na expressão de mGluR3 no Rt dos animais monoartríticos irão contribuir para uma desinibição das células de transmissão do VB e Po devido a uma maior inibição dos neurónios do Rt. No VB, vários estudos farmacológicos e electrofisiológicos sugerem a localização pré-sináptica dos mGluR do grupo II, que inclui o mGluR3, nos terminais de neurónios GABAérgicos que projectam do Rt, e a redução da inibição aferente GABAérgica em resposta a estímulos sensitivos, possivelmente por inibição da libertação de GABA^{50-52,54}. Neste sentido a expressão aumentada do transcripto para o mGluR3 nos neurónios GABAérgicos do Rt pode resultar num aumento da sua acção inibitória

sobre a libertação de GABA de terminais pré-sinápticos no VB e Po, desinibindo as células de transmissão nesses núcleos através de um mecanismo pré-sináptico. Por outro lado, um estudo de microscopia electrónica recente revelou que são poucos os terminais GABAérgicos no VB imunorreactivos para o mGluR2/3, mas uma marcação muito pronunciada foi detectada nos processos astrocíticos que rodeiam os terminais sinápticos¹³⁵. Esses autores propuseram que, quando é aplicado um estímulo muito forte, a activação de mGluR2/3 nos astrócitos que rodeiam os terminais GABAérgicos no VB pode regular positivamente a reabsorção de GABA (mediada por transportadores específicos) e consequentemente reduzir a sua difusão no espaço extracelular, reduzindo assim os efeitos inibitórios do neurotransmissor. Alternativamente, foi também proposto que os mGluR nos astrócitos podem regular a libertação de um modulador específico (aminoácido não-excitatório) que influencia a inibição GABAérgica no VB⁵⁴.

É sabido que a expressão do mGluR3 não se restringe aos neurónios mas que também ocorre em células gliais^{60,64,135,136}. Este facto foi confirmado na primeira parte deste trabalho onde se verificou também no Rt. No entanto, uma vez que nos ratos monoartríticos não foi feita uma análise quantitativa separadamente para as células neuronais e gliais, não é possível estimar a contribuição relativa de cada tipo celular para a regulação positiva da expressão do ARNm para o mGluR3 observada no Rt. Uma análise qualitativa, no entanto, indicou que o aumento da expressão do ARNm para o mGluR3 se verificou tanto nos neurónios como nas células gliais. Embora o papel fisiológico desta regulação positiva da expressão do transcripto para o mGluR3 glial seja desconhecido, poderá estar relacionado com a regulação do sistema GABAérgico pelos astrócitos tal como acima descrito. Além disso, existem algumas evidências de que a glia participa no controlo da actividade neuronal e da neurotransmissão sináptica (comunicação astrócito-astrócito e astrócito-neurónio/neurónio-astrócito), como já aqui foi discutido, aumentando a sua concentração interna de Ca²⁺ e libertando neurotransmissores em resposta a vários estímulos¹³⁷. Foi também demonstrado que a activação de mGluR (e iGluR) em astrócitos, induz a expressão de um grande número de genes de acção imediata, que por sua vez modulam a expressão de outros genes¹¹¹.

Padrão temporal das alterações da expressão do ARNm para os mGluR

As alterações na expressão do ARNm dos vários subtipos de mGluR nos núcleos talâmicos analisados não foi homogénea durante a evolução da monoartrite. Curiosamente, em experiências anteriores onde foi utilizada a técnica da 2-DG para fazer um mapa das alterações da actividade metabólica no SNC dos ratos monoartríticos, foi observado um padrão temporal não-linear^{70,71}. No tálamo, de modo semelhante a outras regiões supra-espinais, foram observados aumentos da actividade metabólica neuronal aos 2 e 14 dias de monoartrite, enquanto nos ratos com 4 dias de monoartrite os valores observados estavam próximos dos valores controlo⁷¹. Possivelmente, aos 4 dias, a actividade aumentada de sistemas inibitórios actuando principalmente na medula espinhal, compensam os influxos nócicos continuados que provêm da articulação inflamada^{70,71}. No presente estudo, foram encontradas diminuições da expressão do ARNm para o mGluR1 aos 2 e 14 dias, enquanto aos 4 dias os níveis de ARNm foram comparáveis aos dos animais controlo, havendo portanto um padrão temporal bifásico que está de acordo com as alterações da actividade neuronal verificadas nos estudos de 2-DG. Estes dados sugerem que no processamento nociceptivo talâmico a expressão de mGluR1 é muito sensível a alterações da actividade neuro-

nial. Por outro lado, as alterações na expressão do mGluR1 podem também contribuir directamente para a modulação da actividade neuronal.

Quanto aos padrões temporais dos decréscimos da expressão do ARNm para o mGluR4 e mGluR7, foi detectada uma expressão reduzida aos 2 dias, reduções mais acentuadas foram observadas aos 4 dias, enquanto que nos animais com 14 dias de monoartrite os níveis do transcripto do mGluR7 estavam reduzidos mas os do ARNm para o mGluR4 foram semelhantes aos controlo. Uma vez que ambos os subtipos de receptores pertencem ao mesmo grupo de mGluR (grupo III), é possível que partilhem os mesmos mecanismos reguladores. Em contraste ao mGluR1, o padrão temporal da regulação negativa da expressão do ARNm para o mGluR4 e mGluR7 não se correlaciona de modo tão aproximado com as alterações da actividade metabólica verificadas nas experiências de 2-DG.

A expressão talâmica de ARNm para o mGluR3 estava aumentada nos ratos monoartríticos, com valores máximos aos 2 dias de inflamação e valores um pouco menores aos 4 e 14 dias. Assim sendo, também não é possível estabelecer nenhuma correlação entre o padrão temporal não-linear de alterações da 2-DG e as alterações na expressão do ARNm para o mGluR3. Outros autores detectaram uma dependência temporal dos aumentos da expressão do ARNm para o mGluR3 na medula espinhal de ratos durante uma inflamação periférica do membro posterior induzida por radiação ultravioleta⁴⁰.

Têm sido descritas alterações plásticas dependentes do tempo em vários outros sistemas nos DRG e na medula espinhal em modelos experimentais de inflamação induzida por injeção de CFA¹²³⁻¹²⁶. Assim, Goff, et al.¹²⁵ detectaram aumentos na imunoreactividade para os receptores opióides μ (MOR) e neurocinina 1 (NK1) na medula espinhal de ratos tratados com CFA, que foram mais elevados aos 4 dias de inflamação para o NK1 e aos 7 dias para o MOR, e depois diminuíram gradualmente com o decorrer do tempo. Essas alterações tiveram paralelo com alterações verificadas em parâmetros comportamentais no caso do NK1 ou sofreram um pequeno atraso no que respeita ao MOR. Noutro estudo, foi encontrado um padrão não-linear das alterações dos níveis do ARNm para vários peptídeos nos DRG de ratos com uma monoartrite em evolução¹²⁴. Essas alterações da expressão de múltiplas substâncias neuroactivas ou dos seus receptores reflectem, muito provavelmente, a complexidade das modificações nos sistemas de transdução e modulação envolvidos na transição da dor de uma "fase 1" para uma "fase 2" (tal como proposto por Cervero e Laird⁷²)⁸².

Em conclusão, observou-se uma modulação distinta e dependente do tempo da expressão do ARNm para vários subtipos de mGluR em diversos núcleos talâmicos nos animais monoartríticos. Assumindo que essas alterações do ARNm resultam em alterações nos níveis das respectivas proteínas, a redução dos mGluR1, mGluR4 e mGluR7 nos núcleos talâmicos envolvidos especificamente na transmissão da informação nociceptiva ao córtex, assim como o aumento do mGluR3 no Rt, sugerem a existência de mecanismos de adaptação (inibitórios) em resposta ao aumento da actividade neuronal no tálamo durante influxo nociceptivo continuado.

Injeção de EGLU no Rt contralateral de ratos monoartríticos

O decréscimo dos valores do teste da flexão do tornozelo nos ratos monoartríticos injectados no Rt com EGLU aponta para um efeito antinociceptivo deste antagonista selectivo para os mGluR do grupo II. Além disso, os dados sugerem que os mGluR do grupo II são activados no Rt de ratos monoartríticos por estímulos nócicos resultantes da flexão e extensão da articulação inflamada.

A grande maioria das células do Rt são neurónios GABAérgicos inibitórios que são activados por influxo glutamatérgico corticotalâmico e talamocortical^{3,17}. Esses neurónios projectam para e inibem os neurónios de transmissão talâmicos do VB que participam na transmissão sensitiva¹⁷. O modo como os mGluR do grupo II exercem a sua acção inibitória nas células do Rt começou recentemente a ser desvendado. Uma possibilidade é que os mGluR do grupo II actuem como receptores pré-sinápticos, inibindo a libertação de neurotransmissores, tal como demonstrado no corpo estriado¹³⁸. Além disso, estudos electrofisiológicos recentes usando ligandos selectivos aplicados em fatias do tálamo de animais normais evidenciaram a existência de uma acção inibitória pós-sináptica do glutamato sobre os neurónios reticulares talâmicos, por activação dos mGluR do grupo II, e um consequente aumento da conductância linear do K⁺⁸³. Foi também verificado que estímulos mecânicos cutâneos nódicos inibem fortemente as respostas dos neurónios do Rt, independentemente da localização do estímulo na superfície corporal¹³⁹. Poderá então ser especulado que o influxo nódico activa os mGluR do grupo II nas células GABAérgicas do Rt, inibindo assim essas células e, portanto, desinibindo os neurónios de transmissão somatossensitivos. A expressão do ARNm para o mGluR3, um mGluR do grupo II, aumentou no Rt de ratos monoartríticos, como verificado por hibridização *in situ* neste trabalho, sugerindo que os mGluR do grupo II poderão desempenhar um papel importante na mediação de influxo nódico crónico. Assim, desde que esses aumentos na expressão do transcripto do mGluR3 resultem num aumento da quantidade local de receptor e tendo em conta os estudos acima mencionados, é possível que a activação dos mGluR do grupo II nos neurónios GABAérgicos do Rt pelo influxo nódico crónico resulte numa hiperactividade dos neurónios de transmissão talâmicos, contribuindo para a hiperalgesia e alodinia detectada nesses animais. Neste sentido, o efeito antinociceptivo do EGLU observado neste estudo está de acordo com esta hipótese, uma vez que o EGLU bloqueia a activação do mGluR3 pelo estímulo nódico, desinibindo assim os neurónios GABAérgicos do Rt que inibem os neurónios dos núcleos de transmissão talâmicos. A propósito, as injeções de EGLU que, por razões metodológicas, não atingiram o Rt mas sim outros núcleos talâmicos na sua vizinhança (Fig. 10), não causaram qualquer alteração no teste da flexão do tornozelo (dados não apresentados), sugerindo assim um efeito específico deste antagonista do grupo II no Rt.

O efeito hipotalgésico do EGLU foi observado neste estudo após se ter infligido um estímulo nódico agudo em animais com uma inflamação, a qual presumivelmente origina um influxo nódico crónico. Além disso, os mesmos animais apresentam níveis aumentados de ARNm para o mGluR3 como verificado na parte anterior deste trabalho. Assim, o efeito de injeções semelhantes de EGLU no Rt dos animais normais sujeitos a um estímulo nódico agudo é difícil de prever, estando em curso mais estudos electrofisiológicos e comportamentais usando ligandos selectivos e específicos para cada um dos mGluR, de modo a determinar os efeitos dos mGluR do grupo II no Rt na nocicepção aguda e crónica.

Agradecimentos

As duas primeiras partes deste trabalho foram financiadas com uma bolsa de doutoramento concedida pela Fundação Calouste Gulbenkian e pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, nº PRAXIS XXI/BD/9795/96) e pelo projecto SFB 391/C9 (Alemanha). A última parte deste trabalho (injeções de EGLU) foi financiada pelo Programa para o Ensino, Investigação e Tratamento da Dor da Fundação Calouste Gulbenkian e pelo projecto nº BMH4-CT97-2093

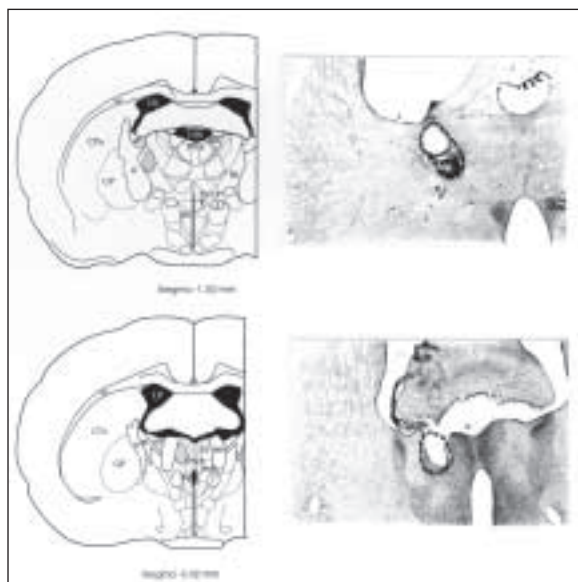


Figura 10. Microfotografias de microscopia óptica de campo claro de dois locais de injeção correspondentes aos desenhos esquemáticos, de acordo com Paxinos e Watson⁸⁷. No cimo, a injeção de EGLU atingiu o Rt, na sua porção mais rostral, e o animal apresentou valores da pontuação do "teste da flexão do tornozelo" significativamente reduzidos em comparação com os animais injectados com soro fisiológico. Em baixo, a injeção de EGLU não atingiu o Rt, tendo-se localizado perto do núcleo paratenial (PT) e na região do tracto corticohipotalâmico medial (mch), e não foram observadas alterações da pontuação do "teste da flexão do tornozelo". 3V: terceiro ventrículo. AV: núcleo anteroventral do tálamo. Cpu: caudate putamen. D3V: terceiro ventrículo dorsal. ec: cápsula externa. f: fórnix. GP: globus pallidus. ic: cápsula interna. LV: ventrículo lateral. mch: tracto corticohipotalâmico medial. PaAP: núcleo paraventricular do hipotálamo, parvocelular anterior. PT: núcleo paratenial do tálamo. PVA: núcleo paraventricular do tálamo, porção anterior. Rt: núcleo reticular do tálamo. sm: stria medullaris do tálamo. st: stria terminalis.

(DG12-SSMI) do Programa BIOMED 2 da União Europeia. Gostáramos ainda de agradecer ao Professor Armando Almeida (Instituto de Histologia e Embriologia e IBMC, Faculdade de Medicina do Porto, Portugal) a ajuda prestada nas injeções estereotáxicas.

Bibliografia

1. Jones EG. The thalamus. New York: Plenum Press 1985.
2. McCormick D, Ball T. Sensory gating mechanisms of the thalamus. *Current Opin Neurobiol* 1994;4:550-6.
3. Price JL, Thalamus. Em: Paxinos G (ed). The rat nervous system. 2ª ed. Sydney: Academic Press Inc 1995:629-48.
4. Steriade M. Neuromodulatory systems of thalamus and neocortex, *Seminars in the Neurosci* 1995;7:361-70.
5. Tracey DJ, Waite PME. Somatosensory systems. Em: Paxinos G (ed). The rat nervous system. 2ª ed. Sydney: Academic Press 1995:689-704.
6. Besson JM, Guilbaud G, Peschanski M. Thalamus and pain. Elsevier Science Publishers 1987.
7. Guilbaud G. Thalamic nociceptive systems. *Phil Trans R Soc Lond* 1985;B308:339-45.
8. Guilbaud G, Bernard JF, Besson JM. Brain areas involved in nociception and pain. Em: Wall, PD, Melzack R (eds). *Textbook of pain*. Edinburgh: Churchill Livingstone 1994:113-28.
9. Willis WD, Westlund KN, Carlton SM. Pain. Em: Paxinos G (ed). The rat nervous system. 2ª ed. Sydney: Academic Press 1995:725-50.
10. Willis WD, Westlund KN. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 1997;14:2-31.

11. Guilbaud G, Kayser V. The ventrobasal complex of the rat thalamus: its involvement in the sensory-discriminative aspects of nociception, including models of clinical pain. Em: Besson JM, Guilbaud G, Peschanski M (eds). Thalamus and pain. Elsevier Science Publishers 1987:185-207.
12. Peschanski M, Guilbaud G, Lee CL, Mantyh PW. Involvement of the rat ventrobasal thalamic complex in the sensory-discriminative aspects of pain: electrophysiological and anatomical data. Em: Macchi G, Rustioni A, Spreafico R (eds). Somatosensory integration in the thalamus. Amsterdam: Elsevier 1983:147-63.
13. Dostrovsky JO, Guilbaud G. Noxious stimuli excite neurones in nucleus submedialis of the normal and arthritic rat. Brain Res 1988;460:269-80.
14. Miletic V, Coffield JA. Responses of neurones in the rat nucleus submedialis to noxious and innocuous mechanical cutaneous stimulation. Somatosens Mot Res 1989;6:567-87.
15. Peschanski M, Guilbaud G, Gautron M. Posterior intralaminar region in rat: neuronal responses to noxious and non noxious cutaneous stimuli. Exp Neurol 1981;72:226-38.
16. Reyes-Vasquez C, Enna SJ, Dafny N. The parafasciculus thalami as a site for mediating the antinociceptive response to GABAergic drugs. Brain Res 1986;383:177-84.
17. Guillery RW, Feig SL, Lozsádi DA. Paying attention to the thalamic reticular nucleus. Trends Neurosci 1998;21:28-32.
18. Houser CR, Vaughn JE, Barber RP, Roberts E. GABA neurones are the major cell type of the Nucleus Reticularis Thalami. Brain Res 1980;200:341-54.
19. McCormick D. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity. Progress in Neurobiol 1992;39:337-88.
20. Dickenson AH, Chapman V, Green GM. The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. General Pharmacol 1997;28:633-8.
21. Furst S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. Brain Res Bull 1999;48:129-41.
22. Hudspeth M. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. Brit J Anaesth 1997;78:731-47.
23. Sluka KA, Westlund KN. An experimental arthritis in rats: dorsal horn aspartate and glutamate increases. Neurosci Lett 1992; 145:141-4.
24. Westlund KN, Sun YC, Sluka KA, Dougherty PM, Sorkin LS, Willis WD. Neural changes in acute arthritis in monkeys. II. Increased glutamate immunoreactivity in the medial articular nerve. Brain Res Rev 1992;17:15-27.
25. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. Progress in Neurobiol 1998; 54:581-618.
26. Bettler B, Mülle C. Review: Neurotransmitter receptors II. AMPA and kainate receptors. Neuropharmac 1995;34:123-39.
27. Mori H, Mishina M. Review: Neurotransmitter receptors VIII. Structure and function of the NMDA receptor channel. Neuropharmacol 1995;34:1219-37.
28. Wisden W, Seeburg PH. Mammalian ionotropic glutamate receptors. Current Opin Neurobiol 1993;3:291-8.
29. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors: novel targets for drug development. Physiol Rev 1997;37:205-37.
30. Pin JP, Duvoisin R. Review: Neurotransmitter receptors I: the metabotropic glutamate receptors: structure and functions. Neuropharmacol 1995;34:1-26.
31. Suzdak PD, Thomsen C, Mulvihill E, Kristensen P. Molecular cloning, expression, and characterization of metabotropic glutamate receptor subtypes. Em: Conn PJ, Patel J (eds). The metabotropic glutamate receptors. New Jersey: Humana Press 1994:1-30.
32. Conn PJ, Patel J (eds). The metabotropic glutamate receptors. New Jersey: Humana Press 1994.
33. Pin JP, Bockaert J. Get receptive to metabotropic glutamate receptors. Current Opin Neurobiol 1995;5:342-9.
34. Conn PJ, Boss V, Chung DS. Second-messenger systems coupled to metabotropic glutamate receptors. Em: Conn PJ, Patel J (eds). The metabotropic glutamate receptors. New Jersey: Humana Press 1994:59-98.
35. Gerber U, Gähwiler BH. Modulation ionic currents by metabotropic glutamate receptors in the CNS. Em: Conn PJ, Patel J (Eds). The metabotropic glutamate receptors. New Jersey: Humana Press 1994:125-46.
36. Moroni F, Nicoletti F, Pellegrini-Giampietro DE (eds). Metabotropic Glutamate receptors and brain function. Portland Press Proceedings, London: Portland Press 1998.
37. Riedel G. Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. Trends Neurosci 1996;19:219-24.
38. Miller S, Kesslak JP, Romano C, Cotman CW. Roles of metabotropic glutamate receptors in brain plasticity and pathology. Proc Natl Acad Sci 1995;757:460-74.
39. Nicoletti F, Bruno V, Copani A, Casabona G, Knöpfel T. Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? Trends Neurosci 1996;19:267-71.
40. Boxall SJ, Berthele A, Laurie DJ, Sommer B, Zieglgänsberger W, Urban L, et al. Enhanced expression of metabotropic glutamate receptor 3 messenger RNA in the rat spinal cord during ultraviolet irradiation induced peripheral inflammation. Neuroscience 1998;82:591-602.
41. Fundytus ME, Fisher K, Dray A, Henry JL, Coderre TJ. *In vivo* antinociceptive activity of anti-rat mGluR1 and mGluR5 antibodies in rats. Neuroreport 1998;9:731-5.
42. Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF. Acute mechanical hyperalgesia in the rat can be produced by coactivation of spinal ionotropic AMPA and metabotropic glutamate receptors, activation of phospholipase A₂ and generation of cyclooxygenase products. Em: Carli G, Zimmermann M (eds). Towards the neurobiology of chronic pain. Progress in Brain Research. Vol 110. Amsterdam: Elsevier 1996:177-92.
43. Neugebauer V, Lücke T, Schaible HG. Requirement of metabotropic glutamate receptors for the generation of inflammation-evoked hyperexcitability in rat spinal cord neurons. Eur J Neurosci 1994;6:1179-86.
44. Neugebauer V, Chen PS, Willis WD. Role of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 in brief nociception and central sensitization of primate STT cells. J Neurophysiol 1999;82:272-82.
45. Stanfa LC, Dickenson AH. Inflammation alters the effects of mGlu receptor agonists on spinal nociceptive neurones. Eur J Pharmacol 1998;347:165-72.
46. Young MR, Fleetwood-Walker SM, Dickenson T, Blackburn-Munro G, Sparrow H, Birch PJ, et al. Behavioural and electrophysiological evidence supporting a role for group I metabotropic glutamate receptors in the mediation of nociceptive inputs to the rat spinal cord. Brain Res 1997;777:161-7.
47. Maione S, Marabese I, Leyva J, Palazzo E, De Novellis V, Rossi F. Characterisation of mGluRs which modulate nociception in the PAG of the mouse. Neuropharmacology 1998;37:1475-83.
48. Eaton SA, Salt TE. Role of N-methyl-D-aspartate and metabotropic glutamate receptors in corticothalamic excitatory postsynaptic potentials *in vivo*. Neuroscience 1996;73:1-5.
49. Salt TE, Eaton SA. The function of metabotropic excitatory amino acid receptors in synaptic transmission in the thalamus: studies with novel phenylglycine antagonists. Neurochem Int 1994; 24:451-8.
50. Salt TE, Eaton SA. Distinct presynaptic metabotropic receptors for L-AP4 and CCG1 on GABAergic terminals: pharmacological evidence using novel a-methyl derivative mGluR antagonists, MAP4 and MCCG, in the rat thalamus *in vivo*. Neuroscience 1995;65:5-13.
51. Salt TE, Eaton SA. Functions of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in the mammalian thalamus. Progress in Neurobiol 1996;48:55-72.
52. Salt TE, Eaton SA, Turner JP. Characterization of the metabotropic glutamate receptors (mGluRs) which modulate GABA-mediated inhibition in the ventrobasal thalamus. Neurochem Int 1996; 29:317-22.
53. Salt TE, Turner JP. Reduction of sensory and metabotropic glutamate receptor responses in the thalamus by the novel metabotropic glutamate receptor-1-selective antagonist S-2-methyl-4-carboxy-phenylglycine. Neuroscience 1998;85:655-8.
54. Salt TE, Turner JP. Modulation of sensory inhibition in the ventrobasal thalamus via activation of group II metabotropic glutamate receptors by 2R,4R-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate. Exp Brain Res 1998;121:181-5.
55. Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. J Biol Chem 1992;267:13361-8.
56. Duvoisin R, Zhang C, Ramonell K. A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. J Neurosci 1995;15:3075-83.
57. Kinzie JM, Saugstad JA, Westbrook GL, Segerson TP. Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger RNA in the developing and adult rat brain. Neuroscience 1995;79:167-76.
58. Kristensen P, Suzdak PD, Thomsen C. Expression pattern and pharmacology of the rat type IV metabotropic glutamate receptor. Neurosci Lett 1993;155:159-62.
59. Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. Neuroscience 1993; 53:100918.
60. Ohishi H, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR3) in the rat brain: an *in situ* hybridization study. J Comp Neurol 1993; 335:252-66.
61. Ohishi H, Akazawa C, Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Distributions of the mRNAs for L-2-amino-4-phosphonobutyrate-sensitive metabotropic glutamate receptors, mGluR4 and mGluR7, in the rat brain. J Comp Neurol 1995;360:555-70.
62. Romano C, Van den Pol AN, O'Malley KL. Enhanced early developmental expression of the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat brain: protein, mRNA splice variants, and regional distribution. J Comp Neurol 1996;367:403-12.
63. Shigemoto R, Nakanishi S, Mizuno N. Distribution of the mRNA for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) in the central nervous system: an *in situ* hybridization study in adult and developing rat. J Comp Neurol 1992;322:121-35.
64. Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patterns of two rat metabotropic glutamate receptors, mGluR3 and mGluR4. J Neurosci 1993;13:1372-8.
65. O'Shea RD, Gundlach AL. Quantitative analysis of *in situ* hybridization histochemistry. Em: Wisden W, Morris BJ (eds). *In situ* hybridization protocols for the brain. London Academic Press 1994:57-78.
66. Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S. Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. Behav Brain Res 1994;77:361-9.
67. Saugstad JA, Kinzie JM, Shinohara MM, Segerson TP, Westbrook GL. Cloning and expression of rat metabotropic glutamate receptor 8 reveals a distinct pharmacological profile. Mol Pharmacol 1997; 51:119-25.
68. 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.
69. Butler SH, Weil-Fugazza J. The foot-bend procedure as test of nociception for chronic studies in a model of monoarthritis in the rat. Pharmacol Commun 1994;4:327-34.
70. Schadrack J, Neto FL, Ableitner A, Castro-Lopes JM, Bartenstein P, Zieglgänsberger W, et al. Metabolic activity changes in the rat spinal cord during adjuvant monoarthritis. Neuroscience 1999; 94:595-605.
71. Neto FL, Schadrack J, Ableitner A, Castro-Lopes JM, Bartenstein P, Zieglgänsberger W, et al. Supraspinal metabolic activity changes in the rat during adjuvant monoarthritis. Neuroscience 1999; 94:607-21.
72. Cervero F, Laird JMA. From acute to chronic pain: mechanisms and hypotheses. Em: Carli G, Zimmermann M (eds). Towards the neurobiology of the chronic pain. Progress in Brain Research. Vol 110. Amsterdam: Elsevier 1996:3-15.
73. Dubner R, Ruda MA. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. Trends Neurosci 1992;15:96-103.
74. Dubner R. Hyperalgesia and expanded receptive fields. Pain 1992;48:3-4.

75. Schaible HG, Schmidt RF. Neurophysiology of chronic inflammatory pain: electrophysiological recordings from spinal cord neurons in rats with prolonged acute and chronic unilateral inflammation at the ankle. Em: Carli G, Zimmermann M (eds). Towards the neurobiology of chronic pain. Progress in Brain Research. Vol 110. Amsterdam: Elsevier 1996:167-76.
76. Woolf CJ, Doubell TP. The pathophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low threshold Ad-fibre inputs. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:525-34.
77. Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 1993;52:259-85.
78. Neugebauer V, Schaible HG. Evidence for a central component in the sensitization of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cat's knee. *J Neurophysiol* 1990;64:299-311.
79. Castro-Lopes JM, Tavares I, Tölle TR, Coito A, Coimbra A. Increase in GABAergic cells and GABA levels in the spinal cord in unilateral inflammation of the hindlimb in the rat. *Eur J Neurosci* 1992;4:296-301.
80. Castro-Lopes JM, Tölle TR, Pan A, Zieglgänsberger W. Expression of GAD mRNA in spinal cord neurons of normal and monoarthritic rats. *Mol Brain Res* 1994;26:169-76.
81. Castro-Lopes JM, Malcangio M, Pan B, Coimbra A, Bowery NG. Complex changes of GABA_A and GABA_B receptor binding in the spinal cord dorsal horn following peripheral inflammation or neurectomy. *Brain Res* 1995;679:289-97.
82. Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:7723-30.
83. Cox CL, Sherman SM. Glutamate inhibits thalamic reticular neurons. *J Neurosci* 1999;19:6694-9.
84. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16:109-10.
85. Tölle TR, Berthele A, Zieglgänsberger W, Seeburg PH, Wisden W. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci* 1993;13:5009-28.
86. Wisden W, Morris BJ. In situ hybridization with synthetic oligonucleotide probes. Em: Wisden W, Morris BJ (eds). *In situ hybridization protocols for the brain*. London: Academic Press 1994:9-34.
87. Paxinos G, Watson W. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney: Academic Press 1986.
88. Takahashi T. The organization of the lateral thalamus of the hooded rat. *J Comp Neurol* 1985;231:281-309.
89. Shibata H. Topographic organization of subcortical projections to the anterior thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 1992; 323:117-27.
90. Shibata H. Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to the cingulate cortex in the rat. *J Comp Neurol* 1993;330:533-42.
91. Shibata H, Kato A. Topographic relationship between anteromedial thalamic nucleus neurons and the cortical terminal fields in the rat. *Neurosci Res* 1993;17:63-9.
92. Cornwall J, Phillipson OT. Afferent projections to the parafascicular thalamic nucleus of the rat, as shown by the retrograde transport of wheat germ agglutinin. *Brain Res Bul* 1988;20:139-50.
93. Cornwall J, Phillipson OT. Afferent projections to the dorsal thalamus of the rat, as shown by the retrograde lectin transport. I. The mediodorsal nucleus. *Neuroscience* 1988;24:1035-49.
94. Cornwall J, Cooper JD, Phillipson OT. Projections to the rostral reticular thalamic nucleus in the rat. *Exp Brain Res* 1990;80:157-71.
95. Romano C, Sesma MA, McDonald CT, O'Malley K, Van den Pol AN, Olney JW. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 1995;355:455-69.
96. Cliffer KD, Burnstein R, Giesler GJ. Distributions of spinothalamic, spino-hypothalamic, and spinolencephalic fibers revealed by anterograde transport of PHA-L in rats. *J Neurosci* 1991;11:852-68.
97. Craig AD, Burton H. Spinal and medulla lamina I projection to nucleus submedialis in medial thalamus: a possible pain center. *J Neurophysiol* 1981;45:443-66.
98. Aiko Y, Shima F, Hosokawa S, Kato M, Kitamura K. Altered local cerebral glucose utilization induced by electrical stimulations of the thalamic sensory and parafascicular nuclei in rats. *Brain Res* 1987;408:47-56.
99. Godwin DW, Van Horn SC, Eriir A, Sesma M, Romano C, Sherman SM. Ultrastructural localization suggests that retinal and cortical inputs access different metabotropic glutamate receptors in the lateral geniculate nucleus. *J Neurosci* 1996;16:8181-92.
100. Baude A, Nusser Z, Roberts JDB, Mulvihill E, McIlhinney RAJ, Somogyi P. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 1993;11:771-8.
101. Martin LJ, Blackstone CD, Haganir RL, Price DL. Cellular localization of a metabotropic glutamate receptor in rat brain. *Neuron* 1992; 9:259-70.
102. Vidnyánszky Z, Görös TJ, Négyessy L, Borostyánkői Z, Kuhn R, Knöpfe T, et al. Immunocytochemical visualization of the mGluR1a metabotropic glutamate receptor at synapses of corticothalamic terminals originating from area 17 of the rat. *Eur J Neurosci* 1996;8:1061-71.
103. Liu XB, Munoz A, Jones EG. Changes in subcellular localization of metabotropic glutamate receptor subtypes during postnatal development of mouse thalamus. *J Comp Neurol* 1998;395:450-65.
104. Shosaku Y, Kayama Y, Sumitomo I, Sugitani M, Iwama K. Analysis of recurrent inhibitory circuit in rat thalamus: neurophysiology of the thalamic reticular nucleus. *Progress in Neurobiol* 1989;32:77-102.
105. De Biasi SD, Frasson C, Spreafico R. GABA immunoreactivity in the thalamic reticular nucleus of the rat: a light and electron microscopical study. *Brain Res* 1986;399:143-7.
106. Spreafico R, Battaglia G, Frasson C. The reticular thalamic nucleus (RTN) of the rat: cytoarchitectural, Golgi, immunocytochemical, and horseradish peroxidase study. *J Comp Neurol* 1991;304:478-90.
107. Spreafico R, Battaglia G, De Curtis M, De Biasi S. Morphological and functional aspects of nucleus reticularis thalami (RTN) of the rat. Em: Besson JM, Guilbaud G, Peschanski M (eds). *Thalamus and pain*. Elsevier Science Publishers 1987:111-26.
108. Steriade M, Llinas R. The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay. *Physiol Rev* 1988;68:649-742.
109. Testa CM, Catania MV, Young AB. Anatomical distribution of metabotropic glutamate receptors in mammalian brain. Em: Conn PJ, Patel J (eds). *The metabotropic glutamate receptors*. New Jersey: Humana Press 1994:99-123.
110. Porter JT, McCarthy KD. Astrocytic neurotransmitter receptors *in situ* and *in vivo*. *Progress in Neurobiol* 1997;51:439-455.
111. Steinhäuser C, Gallo V. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends in Neurosci* 1996;19:339-45.
112. Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Nakanishi S. A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 1992;8:169-79.
113. Bradley SR, Levey AI, Hersch SM, Conn PJ. Immunocytochemical localization of group III metabotropic glutamate receptors in the hippocampus with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 1996;16:2044-56.
114. Bradley SR, Rees HD, Yi H, Levey AI, Conn PJ. Distribution and developmental regulation of metabotropic glutamate receptor 7a in rat brain. *J Neurochem* 1998;71:636-45.
115. Ohishi H, Nomura S, Ding Y-Q, Shigemoto R, Wada E, Kinoshita A et al. Presynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in the primary afferent neurones: an immunohistochemical study in the rat. *Neurosci Lett* 1995;202:85-8.
116. Besson JM. The neurobiology of pain. *Lancet* 1999;353:1610-5.
117. Dubner R, Gold M. The neurobiology of pain. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:7627-30.
118. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57:1-164.
119. Li J, Simone DA, Larson AA. Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* 1999;79:75-82.
120. Ma QP, Woolf CJ. Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. *Pain* 1996;67:97-106.
121. McGaraughy S, Henry JL. Relationship between mechano-receptive fields of dorsal horn convergent neurons and the response to noxious immersion of the ipsilateral hindpaw in rats. *Pain* 1997;70:133-40.
122. Guilbaud G, Benoist JM, Jazatt F, Gautron M. Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *J Neurophysiol* 1990;64:1537-54.
123. Calzà L, Pozza M, Zanni M, Manzini CU, Manzini E, Hökfelt T. Peptide plasticity in primary sensory neurons and spinal cord during adjuvant-induced arthritis in the rat: an immunocytochemical and *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 1998;82:575-89.
124. Donaldson LF, Harmar AJ, McQueen DS, Seckl JR. Increased expression of preprocalcitonin, calcitonin gene-related peptide, but not vasoactive intestinal peptide messenger RNA in dorsal root ganglia during the development of adjuvant monoarthritis in the rat. *Mol Brain Res* 1992;16:143-9.
125. Goff JR, Burkey AR, Goff DJ, Jasmin L. Reorganization of the spinal dorsal horn in models of chronic pain: correlation with behaviour. *Neuroscience* 1998;82:559-74.
126. Igwe OJ, Ning L. Regulation of the second-messenger systems in the rat spinal cord during prolonged peripheral inflammation. *Pain* 1994;58:63-75.
127. Pellegrini-Giampietro DE, Fan S, Ault B, Miller BE, Zukin RS. Glutamate receptor gene expression in spinal cord of arthritic rats. *J Neurosci* 1994;14:1576-83.
128. Matsuzaki S, Takada M, Li YQ, Tokuno H, Mizuno N. Serotonergic projections from the dorsal raphe nucleus to the nucleus submedialis in the rat and cat. *Neuroscience* 1993;55:403-16.
129. Marini G, Tredici G. Parafascicular nucleus-raphe projections and termination patterns in the rat. *Brain Res* 1995;690:177-84.
130. Li JL, Ohishi H, Kaneko T, Shigemoto R, Neki A, Nakanishi S, et al. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in ganglion neurons of the rat, with special reference to the presence in glutamatergic ganglion neurons. *Neurosci Lett* 1996;204:9-12.
131. Li H, Ohishi H, Kinoshita A, Shigemoto R, Nomura S, Mizuno N. Localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR7, in axon terminals of presumed nociceptive, primary afferent fibers in the superficial layers of the spinal dorsal horn: an electron microscope study in the rat. *Neurosci Lett* 1997;223:153-6.
132. Fisher K, Coderre TJ. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. *Pain* 1996;68:255-63.
133. Young MR, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R, Dickenson T. The involvement of metabotropic glutamate receptors and their intracellular signalling pathways in sustained nociceptive transmission in rat dorsal horn neurones. *Neuropharmacology* 1995;34:1033-41.
134. Young MR, Blackburn-Munro G, Dickinson T, Johnson MJ, Anderson H, Nakalembe I, et al. Antisense ablation of type I metabotropic glutamate receptor mGluR1 inhibits spinal nociceptive transmission. *J Neurosci* 1998;18:10180-8.
135. Mineff E, Valtschanoff J. Metabotropic glutamate receptors 2 and 3 expressed by astrocytes in rat ventrobasal thalamus. *Neurosci Lett* 1999;270:95-8.
136. Jeffery G, Sharp C, Malitschek B, Salt TE, Kuhn R, Knopfel T. Cellular localisation of metabotropic glutamate receptors in the mammalian optic nerve: a mechanism for axon-glia communication. *Brain Res* 1996;741:75-81.
137. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 1999; 22:208-15.
138. Battaglia G, Perry KW, Monn JA, Schoepp DD. Inhibition of glutamate and aspartate *in vivo* release by (2R,4R)-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate, a selective agonist of group II metabotropic glutamate receptors. Em: Moroni F, Nicoletti F, Pellegrini-Giampietro ED (eds). *Metabotropic glutamate receptors and brain function*. London: Portland Press 1998:235-41.
139. Peschanski M, Guilbaud G, Gautron M. Neuronal responses to cutaneous electrical and noxious mechanical stimuli in the nucleus reticularis thalami of the rat. *Neuroscience Lett* 1980;20:165-70.