

# DOR<sup>®</sup>

Órgão de Expressão Oficial da APED

Volume 11, Número 2, 2003

2º volume monotemático sobre  
**INVESTIGAÇÃO EM DOR**  
Editor convidado: **Prof<sup>a</sup> 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<sup>o</sup>) 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

**As vitórias da APED** 3  
*José Manuel Caseiro*

### Editorial II

**O desafio da DOR** 4  
*Deolinda Lima*

**Mensagem do Presidente da APED** 5  
*José Manuel Castro-Lopes*

**Estudo de expressão do Drg11 nas regiões cranianas durante o desenvolvimento das vias nociceptivas** 6  
*Osório LA, Rebelo S, Reguenga C, Lima D*

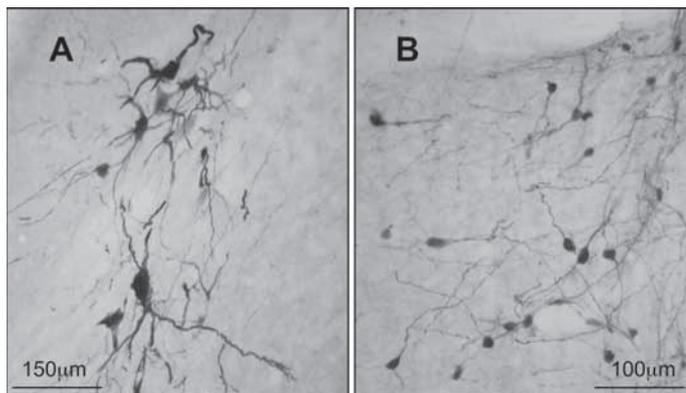
**Expressão de receptores NK1 e GABA<sub>B</sub> em neurónios nociceptivos da medula espinhal do rato** 10  
*Castro AR, Pinto M, Lima D, Tavares I*

**A anandamida, um agonista endógeno do receptor vanilóide, aumenta durante a inflamação da bexiga e contribui para a hiperreflexia e alodínia** 15  
*Avelino A, Dinis P, Charrua A, Nagy I, Yacob M, Cruz F*

**A actividade das cínases ERK 1 e 2 na medula espinhal causada pela distensão da bexiga é aumentada em condições inflamatórias crónicas** 20  
*Cruz C, Avelino A, McMahon SB, Cruz F*

**Correlação entre o efeito dos opióides e as propriedades funcionais dos neurónios da *substantia gelatinosa* da medula espinhal de rato** 25  
*Santos S, Safronov BV*

**Potencialidades da terapia genética no controlo da dor** 28  
*Martins I, Pinto M, Wilson SP, Lima D, Tavares I*



## 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.



© 2003 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)

Impressão: Comgrafic, S.A.  
ISSN: 0872-4814  
Dep. Legal: B-17.364-00  
Ref.: 254AP032

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

## As vitórias da APED

José Manuel Caseiro

**C**omemorou-se mais um Dia Nacional de Luta Contra a Dor, este ano sob a égide do nº 5. De facto, foi a 5ª vez que se celebrou o evento, tendo ficado fortemente assinalado pela decisão governamental de decretar a Dor como o 5º Sinal Vital, algo que todos os que lutam no terreno por melhorar as condições assistenciais dos doentes com dor há muito reclamavam. Curiosamente, foi também, no meu entender, a 5ª grande vitória da APED (as outras quatro foram o decreto ministerial que instituiu o Dia Nacional de Luta Contra a Dor, a publicação do Plano Nacional de Luta Contra a Dor, o anúncio do objectivo estratégico da DGS de, até 2007, virem a existir Unidades de Dor Aguda e de Dor Crónica em 75% dos hospitais portugueses e a realização pela FMUP do 1º Curso Pós Graduação de Medicina da Dor, com patrocínio da Fundação Gulbenkian), sem prejuízo de outras acções igualmente vitoriosas mas de menor impacto no meio.

A comemoração deste ano, para além de muito participada na sua acção dirigida ao grande público, com uma meia maratona e uma caminhada na cidade do Porto, envolveu ainda uma pequena mas simbolicamente importante campanha publicitária televisiva e uma cerimónia na Aula Magna da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, menos concorrida do que deveria ter sido, pela importância de termos tido entre nós H. Breivick, presidente da EFIC e pelo facto de terem sido publicamente distribuídos os diplomas aos alunos do 1º Curso de Pós-Graduação em Medicina da Dor.

**A** importância do reconhecimento da Dor como 5º Sinal Vital, não se esgota no facto de passar a constituir um registo obrigatório, em paralelo com os outros quatro que sempre existiram (frequência cardíaca, pressão arterial, temperatura e frequência respiratória). A partir do momento em que um doente tiver um registo quantificado de existência de dor, deu-se visibilidade a algo que, eticamente, não poderá deixar de ser tratado, nem que seja pela administração rotineira de um simples analgésico, mas que se deseja seja desencadeador de medidas adicionais de apoio que permitam lidar com esse facto com a mesma seriedade com que se lida com as alterações dos outros quatro sinais vitais. E se a qualidade de tratamento da dor não fica assegurada apenas pelo facto de reconhecermos a necessidade de a tornar visível, também não é menos verdade que, a partir do momento em que se estabelece a obrigatoriedade de a incluir nos sinais vitais, se está a aceitar como negligente a sua omissão. É também um excelente contributo para as mudanças de índole cultural que o nosso País necessita, o que se sauda e se aplaude.

**C**oncluiu-se, com enorme êxito, o 1º Curso de Pós-Graduação em Medicina da Dor. Numa altura em que se batalha pela possibilidade de obtenção, no âmbito da Ordem dos Médicos, de uma Competência em Medicina da Dor, temos já 20 clínicos que, humildemente, se

submeteram a um longo e trabalhoso curso de pós-graduação, com um exigente e vasto programa inspirado no Core Curriculum da IASP e avaliação em todas as áreas ensinadas. Construiu-se assim, desde já, um esqueleto do que poderão vir a ser, no futuro, as exigências curriculares para a obtenção da tal Competência e seria bom que ninguém (repito, ninguém) a pudesse vir a obter sem se submeter igualmente a uma avaliação tão criteriosa como aquela a que se submeteram os primeiros e corajosos alunos do Curso de Pós-Graduação. O que se deseja, penso eu, com a futura Competência, é termos pessoas devidamente qualificadas e que, tal como nas Especialidades Médicas, tiveram que fazer prova da sua competência, sem se escudarem em argumentos oportunistas como o seu passado, o reconhecimento público ou outros.

**A** APED vai ganhando assim importância e sumando triunfos, sem prejuízo do desespero que continuo a sentir em não perceber, nas Administrações Hospitalares, sinais claros do mesmo empenho pela causa da Dor que a própria tutela faz questão de, episodicamente, exhibir. Talvez mesmo, inexplicavelmente, também nem todos os que são seus associados respondam com a mesma assiduidade ou energia ao dinamismo dos que a representam. Ainda assim, Dia Nacional, Plano Nacional, metas para 2007, 5º sinal vital e Curso de Pós-Graduação, são prova de muito trabalho e de enorme entrega à causa. Tem sido inexcusável o poder de argumentação, de firmeza e de persistência que tem caracterizado a acção da APED, bem expressos na forma como se têm obtido respostas institucionais absolutamente pioneiras em todo o mundo e, por isso mesmo, também já em fase de serem imitadas. Até o Curso de Pós-Graduação, sem eu ter conhecimento de quantos países já optaram por fazê-lo, é algo absolutamente inovador entre nós, que muitos dirão não ter nada a haver com a Associação, o que discordo. O prestígio, o dinamismo, o espírito de luta e a capacidade de organização do seu principal mentor, o Prof. Dr. José M. Castro Lopes, estão patentes nos sucessos obtidos, com a sua personalidade a atravessar incontornavelmente todos eles, mas pergunto se teria tido a mesma facilidade em congregar toda a espécie de colaborações que conseguiu para a organização teórico-prática do Curso, se não fosse o brilhantismo com que tem desempenhado o seu papel de Presidente da APED e também, através dele, de Tesoureiro da EFIC.

**P**ercebe-se que continuo muito optimista. Gostaria, no entanto, de ver as coisas andarem mais depressa no que diz respeito ao crescimento assistencial hospitalar. Até porque a qualidade só poderá chegar depois. Mas, mesmo confiante, a vida já me ensinou a não ser demasiadamente ingénuo e a manter-me atento. Afinal, pouco falta para 2007!

## Editorial II

# O desafio da DOR

Deolinda Lima

Ao contrário do que poderia parecer inquestionável, o facto de a dor se impor sempre como um problema de saúde a quantos lidam com o deslindar dos mecanismos que lhe estão subjacentes (sejam eles os investigadores ditos “básicos” ou as entidades financiadoras) tem contribuído mais para retardar o progresso nesse domínio do que para a descoberta das tão almejadas soluções terapêuticas. Esta a conclusão a que facilmente se chega quando se comparam os conhecimentos alcançados sobre o sistema visual, auditivo ou mesmo táctil, para não sair do domínio sensorial, e o ponto em que nos encontramos no referente ao sistema nociceptivo. É um sistema complexo, dirão alguns, altamente imiscuído noutros sistemas neuronais com os quais se relaciona de forma permanente e dinâmica, ou, opinarão outros, falho de estruturação anatómica clara, de perfeita segregação, em termos de estrutura e localização, dos vários componentes neuronais. Embora ambas as afirmações sejam correctas, não bastam como explicação para o atraso sentido nesta matéria no momento presente, em particular se atentarmos no não menos complexo, e no entanto, bem melhor conhecido, processamento auditivo ou visual, e no que de proveito prático se tem retirado desse conhecimento.

Sucedem com frequência em áreas como a Biologia (o mesmo já não se aplica à Engenharia), e parece ser isso o que neste campo testemunhamos, que a definição clara de objectivos num processo de investigação limita a capacidade para avaliar dados e elaborar hipóteses fora do contexto pré-definido, aquele em que todo o processo se deve desenrolar de modo a atingir os fins delineados. Facilmente, portanto, são ignorados factos, como tal relevantes para a compreensão do objecto em estudo, tanto por não serem percebidos ou valorizados, apesar de revelados pela experimentação, como por a pesquisa não admitir desvios ao traçado estabelecido sob pena de nos afastarmos da meta a atingir a ponto de a perdermos de vista.

Embora uma das principais razões para este estado de coisas seja o carácter peculiar da investigação em dor, que facilmente ultrapassa o de investigação pura em Neurociências para se constituir em investigação de um problema de saúde, não lhe são alheias circunstâncias de todos conhecidos, tais como a definição de prioridades pelas Instituições que detêm a capacidade de financiamento e a valorização da investigação aplicada ou das relações com a Indústria.

Julgo ser a altura de deixarmos de falar em “investigação aplicada” e passarmos a incluir no nosso léxico “aplicações/aplicadores da investigação”. Quem investiga deve perseguir o gosto pelo saber, seja ele qual for, e estar atento a todas as questões que se lhe levantam, pertinentes ou não, com a perseverança indispensável para encontrar as respostas mesmo quando é necessário esperar pelas ferramentas adequadas ou promover a sua construção. A investigação enquanto procura do saber é sempre “fundamental”, e é fundamental que assim seja para que o saber ocupe a posição de relevo que merece no processo científico. Aplicação da investigação acontece quando, movido ou não pelas circunstâncias, alguém, o próprio investigador (porque não) ou quem melhor conhece o campo de aplicabilidade, descobre que o conhecimento adquirido, aquele preciso saber, pode ser utilizado para um determinado fim.

É este o desafio que a investigação em dor nos coloca: tentarmos ignorar, nem que por períodos curtos, que aquilo que procuramos saber pode vir a ter alguma utilidade, para nos dedicarmos à pesquisa desinteressada; conseguirmos, mesmo assim mantermo-nos tão próximo dos “aplicadores” que nada do que de útil nos saia porventura das mãos possa ser desperdiçado. Dos “aplicadores” exige-se paciência e compreensão para nos manterem no seu círculo coloquial apesar das tão grandes diferenças de linguagem. Talvez daí nasça um Esperanto que nos aproxime definitivamente e torne cada vez mais profícua esta relação.

# Mensagem do Presidente da APED

*José Manuel Castro-Lopes*

Dando cumprimento a mais um dos objectivos a que nos tínhamos proposto, foi criado e encontra-se já activo o *site* da APED na internet, no endereço <http://www.aped-dor.org>. Trata-se de uma versão inicial, que irá agora ser desenvolvida no sentido de acrescentar funcionalidades úteis não apenas para os associados da APED, mas também para qualquer prestador de cuidados de saúde e para a população em geral. Numa sociedade cada vez mais informatizada, onde a busca de informação tem vindo a aumentar exponencialmente, o primeiro contacto com uma instituição faz-se frequentemente através da utilização da internet. Deste modo, a “imagem de marca” dessa instituição está, muitas vezes, associada à forma e conteúdo da informação que essa instituição disponibiliza na internet. Solicito pois a todos os associados com acesso à internet, que visitem desde já o *site*, e me façam chegar as sugestões, críticas ou comentários que entenderem possam contribuir para o seu melhoramento.

A convite do presidente da *Sociedad Española del Dolor* (SED), Dr. Manuel Rodriguez, e tirando partido de um simpósio para apresentação de um trabalho científico patrocinado pela filial espanhola de uma empresa multinacional da indústria farmacêutica, realizou-se no final de Maio, uma reunião entre os presidentes de alguns capítulos ibero-americanos da *International Association for the Study of Pain* (IASP). Para além dos presidentes da SED e da APED, estiveram presentes os presidentes dos capítulos Brasileiro, Chileno, Peruano e Uruguaio.

O primeiro objectivo desta reunião era dar a conhecer as diferentes realidades no que respeita às respectivas sociedades e ao combate à dor, em países que têm alguns aspectos culturais em comum, mas também grandes diferenças socio-económicas e organizacionais. Com esta finalidade, cada elemento fez uma pequena apresentação da sua Associação, trabalho desenvolvido e principais objectivos. Foi um grato prazer constatar a apreciação extremamente positiva e mesmo elogiosa, que os nossos colegas ibero-americanos manifestaram em relação à APED. Os pontos mais apreciados foram a existência de um Plano Nacional de Luta Contra a Dor, a criação de um Dia Nacional de Luta Contra a Dor, a organização da Corrida Contra a Dor no ano transacto, a proposta da implementação da dor como 5º sinal vital e o consenso obtido com outras 7 sociedades científicas em torno da proposta da criação da competência em Medicina da Dor. Podemos afirmar sem falsas modéstias, que em todos estes pontos estamos mais avançados do que qualquer dos outros países representados na reunião.

A promoção de intercâmbios e possíveis actividades conjuntas era o segundo objectivo desta reunião. Neste âmbito, a SED disponibilizou-se para subsidiar estágios de curta duração em Unidades de Dor espanholas, segundo critérios a definir, desde que os estagiários obtivessem da respectiva associação nacional ou de outras fontes, financiamento para a viagem. Dado que se pretende que uma hipotética associação ibero-americana estabeleça pontes multilaterais e não apenas unívocas, cada associação irá estudar este assunto e apresentar propostas concretas num futuro próximo. No

que diz respeito à APED, o intercâmbio com os nossos colegas da Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) poderá assumir um papel preferencial. Foi aliás nesse sentido que o presidente da SBED, Dr. Jaime Olavo Marquez, propôs a realização do 1º Congresso Luso-Brasileiro de Dor, a realizar em simultâneo com o congresso da SBED que terá lugar em Setembro de 2004 em Florianópolis. Ciente de que um número apreciável de colegas portugueses já participaram no anterior congresso da SBED, esta é uma proposta que iremos estudar com algum cuidado pois a sua concretização não depende apenas da (boa) vontade dos dirigentes da APED e da SBED, mas dos apoios que ambas as associações conseguirem reunir.

Um outro campo de cooperação ibero-americana poderia ser a realização de estudos conjuntos, potenciando assim o seu interesse e impacto científico pelo recrutamento de populações distintas. A troca de informação é condição indispensável à concretização deste objectivo, pelo que para além de comunicações regulares entre os presidentes das associações, foi proposta a criação de uma página na internet, onde possa ser disponibilizada toda a informação relevante para a comunidade ibero-americana.

Desta reunião resultou pois, o embrião de uma nova associação, cujos contornos terão que ser estudados com o cuidado necessário, pelas direcções das associações que estiveram na sua génese. Pessoalmente, creio ter deixado bem expresso aos meus colegas ibero-americanos, que as obrigações profissionais de todos nós, bem como o rigor ético e deontológico que deve pautar a nossa actividade, são cada vez mais incompatíveis com iniciativas de turismo pseudo-científico. Uma hipotética associação ibero-americana contra a dor só terá razão de existir se, na sequência do empenhamento de todos os intervenientes, trouxer vantagens acrescidas ao combate à dor nos países participantes. O futuro demonstrará se as boas vontades agora expressas resultam em sinergias com expressão prática relevante. Se assim for poderão contar com o meu apoio.

PS. Escrevo este texto a escassos 10 dias da comemoração do 5º Dia Nacional de Luta Contra a Dor. Dando seguimento a uma deliberação da direcção da APED, esforçamo-nos por realizar este ano uma cerimónia comemorativa que pudesse atrair as entidades governamentais, com o intuito de as sensibilizar para a necessidade de incrementar o ritmo de aplicação do Plano Nacional de Luta Contra a Dor. Nesse sentido, tentámos concentrar na mesma cerimónia a celebração do 5º Dia Nacional de Luta Contra a Dor, o encerramento do 1º Curso de Pós-graduação em Medicina da Dor, e o eventual anúncio público da aprovação de uma proposta apresentada ao Senhor Alto Comissário para a Saúde pela Comissão de Acompanhamento do Plano Nacional de Luta Contra a Dor. Não sei ainda se os objectivos serão atingidos, mas seguramente que continuaremos a lutar pelas nossas convicções, sempre com o objectivo último de melhorar as condições assistenciais a quem sofre de dor no nosso país, utilizando todas as “armas” que estiverem ao nosso alcance, qualquer que seja o “campo de batalha” em que nos encontremos.

# Estudo de expressão do Drg11 nas regiões cranianas durante o desenvolvimento das vias nociceptivas

Osório LA, Rebelo S, Reguenga C, Lima D

## Resumo

Os mecanismos moleculares que estão na origem da especificação dos neurónios sensoriais nociceptivos só agora começam a ser entendidos, principalmente através da identificação e caracterização de vários factores de transcrição implicados neste processo. Um destes factores, o Drg11, tem um papel determinante no desenvolvimento do sistema nociceptivo. Com o intuito de melhor conhecer a sua função, procedeu-se neste trabalho à identificação dos locais de expressão do Drg11 na região craniana de embriões de rato, para o que se utilizou a técnica de hibridação *in situ*. Para além dos neurónios aferentes primários dos gânglios raquidianos e dos respectivos alvos, o Drg11 expressa-se em locais funcionalmente equivalentes na região craniana: o gânglio e o núcleo trigeminal.

**Palavras chave:** Drg11. Dor. Nociceptores. Complexo trigeminal. Aferentes primários. Medula espinal.

## Summary

The molecular mechanisms involved in the specification of sensitive neurons are just being revealed through the identification and characterization of several transcription factors that participate actively in this process. One of these, Drg11, seems to have an essential function in the development of nociceptive pathway. In order to better understand its function, the authors performed *in situ* hybridization experiments to identify the expression of Drg11 in the encephalic region of mouse embryo. Beyond the known expression in neurons of the dorsal root ganglion in the spinal cord, Drg11 is expressed in functionally equivalent sites of the encephalon: the trigeminal ganglion and nucleus.

**Key words:**

## Introdução

Todos os organismos dependem de uma série de comportamentos que garantem a sobrevivência. Após a exposição a um estímulo nódico (mecânico, químico ou térmico) os animais executam um programa de protecção para evitar danos tecidulares. Células especializadas dentro de sistema nervoso periférico detectam estes estímulos nódicos e levam a informação ao sistema nervoso central. Estes neurónios nociceptivos são anatómica e funcionalmente distintos dos neurónios sensíveis à estímulos inócuos, tal como o tacto (mecanorreceptores) e a informação posicional (proprioceptores) (Scott, 1992).

O processamento da informação sensitiva proveniente dos tecidos periféricos tem lugar na medula espinal e tronco cerebral. Na medula espinal, os aferentes sensitivos nociceptivos projectam para as lâminas superficiais da parte dorsal (Lima D, 1998), enquanto na região craniana, as funções sensoriais somáticas se processam através do sistema trigeminal (Sewards, et al., 2002). Os mecanismos moleculares que estão na origem da especificação destes neurónios sensoriais ao longo do desenvolvimento só agora começam a ser entendidos, principalmente através da identificação e caracterização de vários factores de transcrição implicados neste processo (Ma, et al., 1999; Bertrand, et al., 2002; Caspary, et al., 2003).

Na medula espinal, o Drg11, um factor de transcrição da família dos homeobox, foi recentemente descrito como tendo um papel determinante para o correcto estabelecimento das

conexões entre os neurónios nociceptivos aferentes primários e os seus alvos nas lâminas superficiais do corno dorsal (Chen, et al., 2001). O estudo dos genes que actuam a montante do Drg11 sugere que esta proteína seja regulada de forma distinta nos gânglios raquidianos e na medula espinal, apontando assim para a possibilidade de existirem diferentes modos de acção do Drg11, conforme a especificidade do local de expressão (Chen, et al., 2001; Quian, et al., 2002).

Neste trabalho procedeu-se identificar, por recurso à técnica de hibridação *in situ*, os vários locais de expressão do Drg11, com particularmente realce para a região craniana.

## Materiais e métodos

### Extração de RNA total

Quatro ratinhos, com uma semana de idade, foram sacrificados de acordo com os padrões éticos vigentes (Zimmermann, 1983). Os respectivos gânglios raquidianos foram recolhidos e utilizados para a extração de RNA total através do método do tiocianeto de guanidina utilizando-se para este fim o produto RNA-gents®, Total RNA Isolation System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

### Síntese das sondas ribonucleicas

O cDNA correspondente aos nucleótidos 327-807 da sequência de Drg11 de ratinho (GenBank AK039633) foi amplificado por RT-PCR a partir de RNA total de gânglios raquidianos, utilizando-se para este efeito os *primers* 5'-aaggaacctatgagcagag-3' e 5'-tcatacactcttctctcctcgc-3'. O fragmento obtido foi purificado e clonado, por TA *cloning*, no plasmídeo pCR2.1 (Invitrogen). Os plasmídios contendo a inserção foram purificados e utilizados para a síntese de sondas ribonucleicas *antisense* (complementar ao mRNA de Drg11) e *sense* (controlo negativo), marcadas com digoxigenina, utilizando-se para este fim o produto DIG DNA Labeling Kit (Roche).

### Hibridação *in situ*

Para a hibridação *in situ*, os tecidos embrionários de ratinhos de várias idades foram fixados em 4% paraformaldeído durante 12 h a 4 °C e crioprotégidos numa solução de 30% (p/v) de sacarose em tampão fosfato até serem processados. O material foi então crioseccionado, em cortes com espessura de 10 µm. Após montagem em lâminas, os cortes foram fixados em 4% paraformaldeído durante 20 min, lavados em PBS e tratados com proteinase K (0,4 µg/ml) durante 7 min. Após lavagem com PBS, os cortes foram novamente fixados em 4% paraformaldeído durante 15 min, lavados com PBS e incubados com o tampão de hibridação (50% formamida, 5X SSC, 0,3 mg/ml tRNA, 100 µg/ml de heparina, 1X solução de Denhardt, 0,1% (p/v) Tween 20, 0,1% (p/v) CHAPS e 5 mM EDTA)

durante 4 h a 56 °C. De seguida, os cortes foram incubados com as sondas RNA em tampão de hibridação numa diluição de 1 µg/ml durante 16 h a 56 °C. Após a ligação, as preparações foram lavadas, pré-incubadas durante 1 h com 20% de soro em PBT, e incubadas 16 h, a 4 °C, com um anticorpo antidigoxigenina conjugado com a fosfatase alcalina. A revelação foi efectuada com os cromogénicos NBT e BCIP.

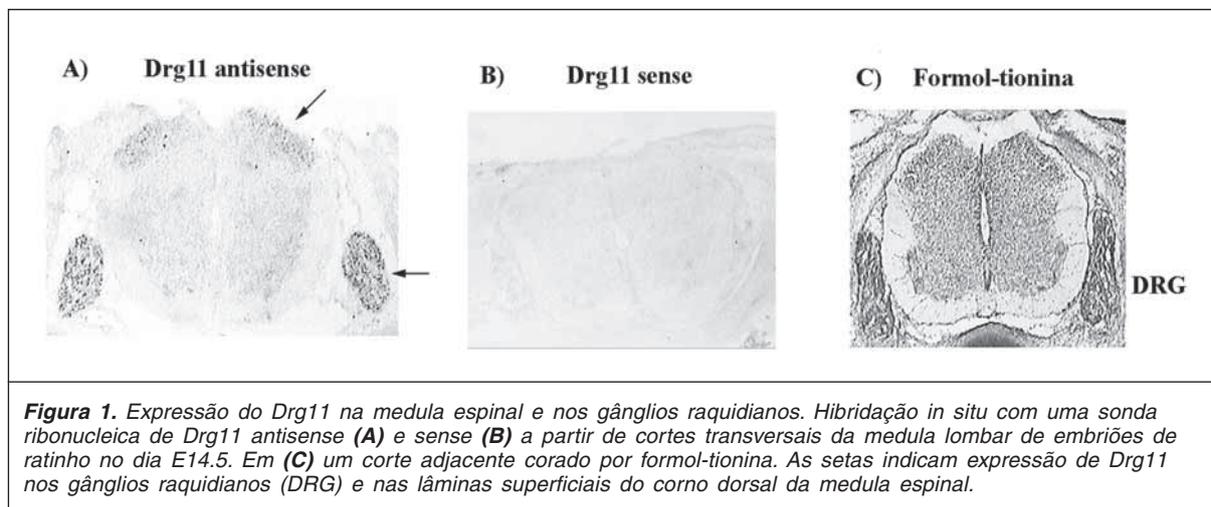
### Coloração pelo formol-tionina

Os cortes foram corados por formol-tionina de acordo com procedimentos padrão (Donovick, 1974). Brevemente, as preparações foram incubadas 5 min com a solução de acetona ácida (80% de acetona em ácido acético), lavadas com água e coradas com 0,1% de tionina durante 7 min. A descoloração foi efectuada com uma solução contendo 66% de propanol e 3% de ácido acético.

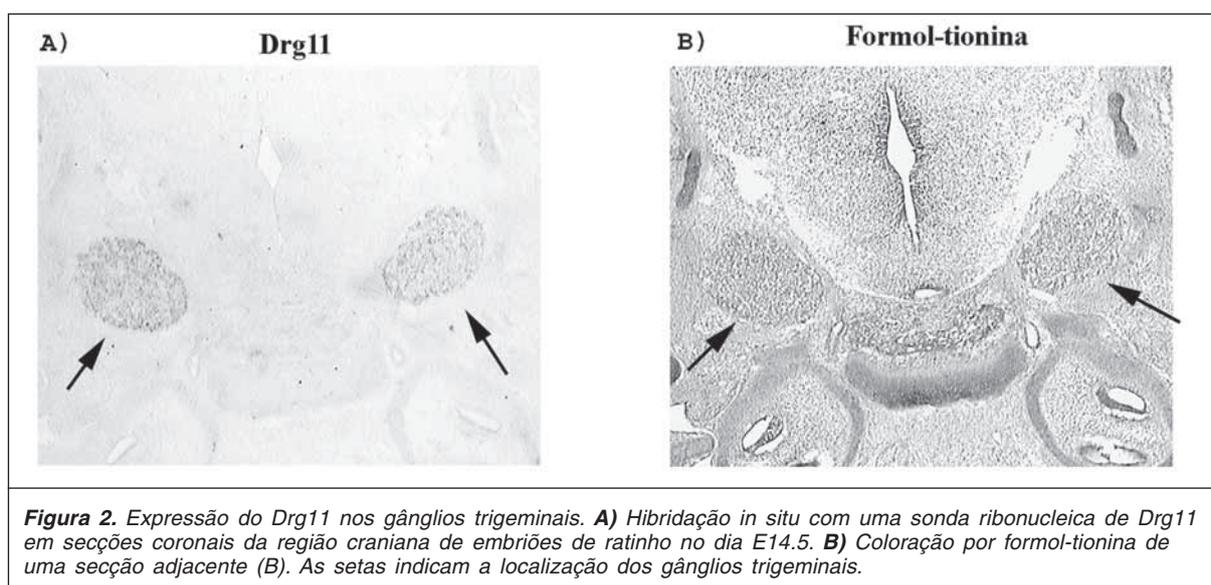
## Resultados

Para proceder à hibridação *in situ*, foi sintetizada uma sonda ribonucleica conforme descrito nos materiais e métodos. A especificidade desta sonda foi testada por controlo negativo com uma sonda RNA *sense* produzida para o efeito. As experiências de hibridação *in situ* foram efectuadas em secções de tecido embrionário. De acordo com dados recentes (Chen, et al., 2001; Quian, et al., 2002), o Drg11 expressa-se inicialmente nos gânglios raquidianos de embriões de 11,5 dias de idade (E11.5), seguindo-se, um dia mais tarde, expressão no corno dorsal da medula espinal. Este padrão de expressão mantém-se em idades embrionárias mais tardias (Fig. 1a), e durante algumas semanas pós-natais (dados não apresentados). A expressão detectada é específica uma vez que não se observa nenhuma marcação com a sonda ribonucleica controlo (Fig. 1b). Em colorações citoarquitónicas pelo formol-tionina (Fig. 1c), confirma-se a expressão do Drg11 nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal, região que recebe os aferentes primários nociceptivos vindos do gânglio raquidiano.

Em secções coronais da porção craniana de embriões de ratinho, detectou-se marcação nos gânglios trigeminiais (Fig. 2a), conforme é revelado por coloração de cortes adjacentes com formol-tionina (Fig. 2b), e nas lâminas superficiais dos núcleos trigeminiais (Fig. 3a, b). O complexo trigeminal sensitivo divide-se em dois componentes, as porções espinal e principal (Sewards, et al., 2002). De modo a possibilitar uma visualização mais clara das diversas porções do complexo trigeminal, foram utilizados cortes transversais. Foi detectada expressão do Drg11 nas porções espinal e principal do núcleo trigeminal (Fig. 3c), estruturas identificadas através da coloração por formol-tionina (Fig. 3d).



**Figura 1.** Expressão do *Drg11* na medula espinal e nos gânglios raquidianos. Hibridação *in situ* com uma sonda ribonucleica de *Drg11* antisense (A) e sense (B) a partir de cortes transversais da medula lombar de embriões de ratinho no dia E14.5. Em (C) um corte adjacente corado por formol-tionina. As setas indicam expressão de *Drg11* nos gânglios raquidianos (DRG) e nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal.



**Figura 2.** Expressão do *Drg11* nos gânglios trigeminais. A) Hibridação *in situ* com uma sonda ribonucleica de *Drg11* em secções coronais da região craniana de embriões de ratinho no dia E14.5. B) Coloração por formol-tionina de uma secção adjacente (B). As setas indicam a localização dos gânglios trigeminais.

## Discussão

O *Drg11* é um dos factores de transcrição essenciais ao desenvolvimento das vias nociceptivas (Chen, et al., 2001; Quian, et al., 2002). Actualmente, é o único em que o silenciamento do respectivo gene provoca alterações exclusivamente no sistema nociceptivo, nomeadamente deficiências na penetração das projecções dos neurónios nociceptivos dos gânglios raquidianos nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal (Chen, et al., 2001). Contudo, muito pouco se sabe sobre o modo de acção do *Drg11*. Neste estudo demonstra-se que o *Drg11* se expressa não apenas nos gânglios raquidianos e nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinal, mas também nas regiões cranianas funcionalmente equivalentes, nomeadamente os gânglios trigeminais e as porções espinal e principal.

O complexo trigeminal sensitivo recebe aferentes primários de estruturas orofaciais e pode ser comparado ao corno dorsal da medula espinal. De facto, os aferentes nociceptivos

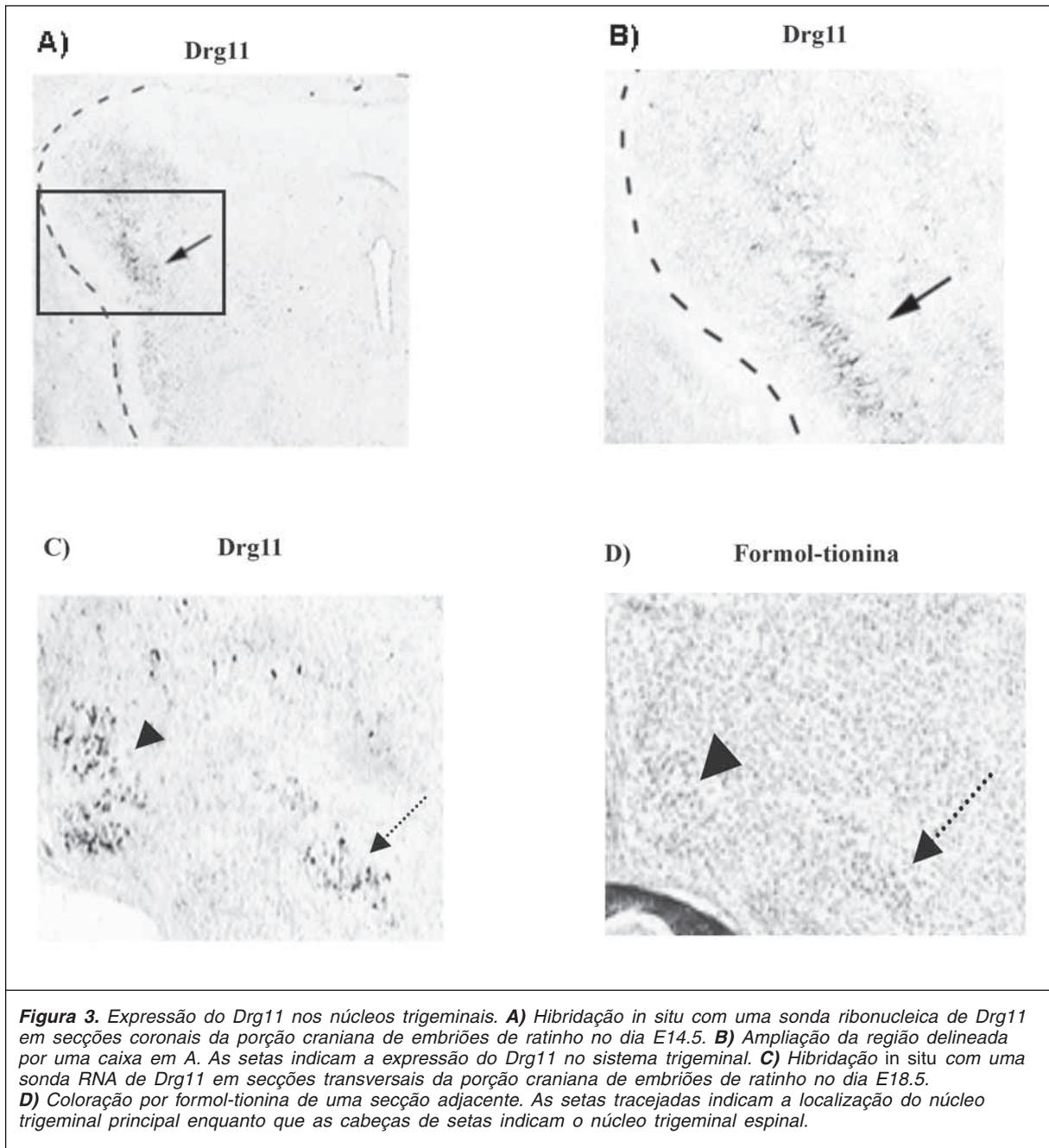
com origem nos gânglios trigeminais projectam para as lâminas superficiais do complexo trigeminal (Sewards, et al., 2002). Assim, os dados disponíveis sublinham o papel do *Drg11* na conexão entre o primeiro e o segundo neurónio da via nociceptiva ao longo de todo o eixo rostrocaudal. Resta esclarecer, por meio de técnicas mais sensíveis, se o *Drg11* se expressa também em zonas ditas de terceira ordem para o processamento nociceptivo, tal como o tálamo. A verificar-se, estes resultados apoiam a hipótese do *Drg11* estar implicado no estabelecimento das vias nociceptivas na sua globalidade.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado através do projecto FCTSapiens 32257/99.

## Bibliografia

- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(7):517-30.  
 Caspary T, Anderson KV. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants says. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:289-97.



**Figura 3.** Expressão do *Drg11* nos núcleos trigeminiais. **A)** Híbridação *in situ* com uma sonda ribonucleica de *Drg11* em secções coronais da porção craniana de embriões de ratinho no dia E14.5. **B)** Ampliação da região delineada por uma caixa em A. As setas indicam a expressão do *Drg11* no sistema trigeminal. **C)** Híbridação *in situ* com uma sonda RNA de *Drg11* em secções transversais da porção craniana de embriões de ratinho no dia E18.5. **D)** Coloração por formol-tionina de uma secção adjacente. As setas tracejadas indicam a localização do núcleo trigeminal principal enquanto que as cabeças de setas indicam o núcleo trigeminal espinal.

Chen ZF, Rebelo S, White F, et al. The paired homeodomain protein DRG11 is required for the projection of cutaneous sensory afferent fibers to the dorsal spinal cord. *Neuron* 2001;31(1):59-73.

Donovick PJ. A metachromatic stain for neural tissue. *Stain Technol* 1974;49(1):49-51.

Lima D. Anatomical basis for the dynamic processing of nociceptive input. *Eur J Pain* 1998;2(2):195-202.

Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson DJ. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* 1999;13(13):1717-28.

Qian Y, Shirasawa S, Chen CL, Cheng L, Ma Q. Proper development of relay somatic sensory neurons and D2/D4 interneurons requires homeobox genes *Rnx/Tlx-3* and *Tlx-1*. *Genes Dev* 2002;16(10):1220-33.

Sewards TV, Sewards M. Separate, parallel sensory and hedonic pathways in the mammalian somatosensory system. *Brain Res Bull* 2002;58:243-60.

Scott AS. *Sensory Neurons: Diversity, development and plasticity*. New York, Oxford: Oxford University Press 1992.

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

# Expressão de receptores NK1 e GABA<sub>B</sub> em neurónios nociceptivos da medula espinhal do rato

Castro AR, Pinto M, Lima D, Tavares I

## Resumo

Neste trabalho estudou-se a participação dos receptores NK1 e GABA<sub>B</sub> da medula espinhal no processamento de estímulos dolorosos mecânicos aplicados de forma sustentada na pele do rato. Para o efeito combinámos a reacção imunocitoquímica para cada um dos receptores com a detecção da proteína Fos, cuja síntese foi induzida em neurónios do corno dorsal da medula espinhal pelo estímulo doloroso atrás mencionado. Para além disso, efectuámos reacções imunocitoquímicas triplas em que se detectava, em simultâneo, os receptores NK1, os receptores GABA<sub>B</sub> e a proteína Fos. Os resultados mostraram que, para ambos os receptores, eram preferencialmente recrutados os neurónios da lâmina I e que era, também aí, que os dois receptores co-localizavam no mesmo neurónio. O balanço das influências excitatórias e inibitórias exercidas pelos neurónios da lâmina I que exprimem aqueles receptores deve ser crucial na determinação do impulso nociceptivo transmitido para as áreas supraspinhais.

**Palavras chave:** Dor mecânica. Corno dorsal. Proto-oncogene c-fos.

## Abstract

In this study we analysed the involvement of NK1 and GABA<sub>B</sub> receptors at the spinal dorsal horn in the transmission of nociceptive mechanical input sustainely applied to the skin of the rat. For this purpose we combined an immunocytochemical reaction for each receptor with the detection of the Fos protein, which was induced in dorsal horn neurons by the noxious stimulus refered above. We also carried out a triple immunoreaction for both receptors and for the Fos protein. The results show that each receptor was preferentially activated in nociceptive lamina I neurons and that this lay was also where co-localization of the two receptors occurred in the same neuron. The balance between excitatory and inhibitory influences exerted by the NK1 and GABA<sub>B</sub> receptors on lamina I neurons is likely to be critical in the nature of nociceptive input transmitted to supraspinal regions.

**Key words:** Mechanic pain. Dorsal horn. C-fos proto-oncogene.

## Introdução

A transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal envolve a participação de diversos neurotransmissores. De entre os neuroagentes de maior importância destacam-se a substância P (SP) e o ácido gamaaminobutírico (GABA). Relativamente à SP, encontra-se perfeitamente estabelecido que este peptídeo se liberta no corno dorsal da medula espinhal após estimulação nóxica de tecidos periféricos

(para revisão ver Snijdelaar, et al., 2000). Sabe-se, também, que a acção da SP no processamento doloroso na medula resulta numa acção directa sobre receptores NK1. No corno dorsal da medula espinhal, a área envolvida no processamento de informação dolorosa, os receptores NK1 predominam nas lâminas I e II (Littlewood, et al., 1995; Mantyh, et al., 1985) e, dado que a rizotomia dorsal não reduz a expressão daqueles receptores, pensa-se que os receptores NK1 tenham uma localização pós-sináptica (Yashpal, et al., 1991). Os estudos do papel dos receptores NK1 na transmissão dolorosa na medula espinhal centralizaram-se em estímulos nóxicos agudos. Verificou-se que a injeção de

antagonistas daqueles receptores bloqueia as respostas de neurónios nociceptivos (McCarson e Krause, 1996; Radhakrishnan, et al., 1998). Por outro lado, a aplicação intratecal de SP induz um aumento das respostas comportamentais a estímulos dolorosos agudos (Björkman, et al., 1994; Malmberg e Yaksh, 1992). Mais recentemente, os estudos foram alargados a situações de dor prolongada. A destruição selectiva de neurónios espinhais que exprimem o receptor NK1 resulta na diminuição da hiperalgia induzida pela administração intraplantar de substâncias irritantes como a capsaicina (Manthy, et al., 1997). Para além disso, a administração intratecal de antagonistas dos receptores NK1 diminui as respostas na segunda fase do teste do formol quando há uma sensibilização dos neurónios do corno dorsal, mas não altera a primeira fase do teste e atenua, de modo dependente da dosagem, a hiperalgia térmica e mecânica após injeção de carragenina (Traub, 1996). Em conjunto, os dados apresentados sugerem que os receptores NK1 têm um papel importante na produção de hiperalgia e alodínia.

Relativamente ao GABA, sabe-se que é um dos principais neurotransmissores inibitórios no sistema nervoso central. O envolvimento daquele aminoácido na transmissão sensitiva na medula espinhal encontra-se profundamente demonstrado, tendo-se verificado que participa na despolarização dos aferentes primários (Eccles, 1964). A acção do GABA na modulação da transmissão dolorosa na medula espinhal parece fazer-se sobretudo através de receptores GABA<sub>B</sub>, não sendo consensual a participação dos receptores GABA<sub>A</sub> (Castro, et al., 1999; Hammond e Drower, 1984). No corno dorsal da medula espinhal, os receptores GABA<sub>B</sub> concentram-se nas lâminas I-IV (Bowerly, et al., 1984, 1987), onde se admite que exerçam os seus efeitos através de mecanismos pré- e pós-sinápticos. O baclofeno, agonista dos receptores GABA<sub>B</sub>, diminui a transmissão sináptica excitatória por mecanismos que envolvem a diminuição da libertação de aminoácidos excitatórios e neuropéptidos de aferentes primários (Kangrga, et al., 1991; Malcangio e Bowerly, 1993). Pós-sinápticamente, verificou-se que o baclofeno provoca a hiperpolarização da membrana de neurónios do corno dorsal da medula espinhal (Kangrga, et al., 1991). Os receptores GABA<sub>B</sub> participam na transmissão de estímulos dolorosos agudos dado que a administração intratecal de baclofeno induz analgesia em diversos testes comportamentais (Hammond and Washington, 1993; Malcangio, et al., 1991). O envolvimento dos receptores GABA<sub>B</sub> em situações de dor sustentada encontra-se também demonstrado. As respostas comportamentais na segunda fase do teste do formol são aumentadas na presença de antagonistas dos receptores GABA<sub>B</sub> (Green e Dickenson, 1997). A

apoiar estes dados, surgem outros estudos que mostram que a actividade de neurónios nociceptivos espinhais, avaliada pela expressão da proteína Fos cuja síntese é induzida por activação do proto-oncogene *c-fos*, diminui em animais com uma inflamação articular crónica após a administração de baclofeno (Castro, et al., 1999).

O balanço entre as influências excitatórias e inibitórias exercidas sobre os neurónios espinhais determinam as características dos impulsos dolorosos transmitidos supraespinhalmente. Porém, desconhece-se o modo como estas duas influências actuam individualmente sobre os neurónios nociceptivos da medula espinhal. Com o propósito de esclarecer a participação relativa dos receptores NK1 e GABA<sub>B</sub> na transmissão da informação nociceptiva na medula espinhal realizámos um estudo em duas etapas. Na primeira, a detecção imunocitoquímica de cada um dos receptores foi combinada com a imunorreacção para a proteína Fos, induzida por estímulo doloroso cutâneo mecânico aplicado à pele durante 2 h. Posteriormente, procedemos à realização de uma tripla imunorreacção destinada a avaliar a co-localização dos dois receptores, pelo que combinámos, nos mesmos cortes, a detecção imunocitoquímica da proteína Fos com a daqueles receptores.

## Materiais e métodos

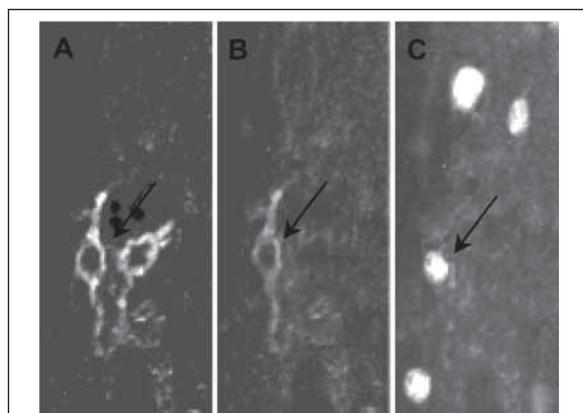
Neste trabalho foram usados 12 ratos machos, da estirpe Wistar, provenientes dos laboratórios Charles River (Espanha), mantidos de acordo com a legislação em vigor (Directiva 86/609 da União Europeia). Os animais foram anestesiados com pentobarbital i.p. (50 mg/kg) e submetidos à estimulação nóxica mecânica de uma área restrita da pele que recobre a parte interna do membro posterior esquerdo. Usámos um protocolo de estimulação mecânica já publicado (Lima, et al., 1993; Tavares, et al., 1993, 1995), que consiste em beliscar a pele com uma pinça de dentes de rato, a intervalos de 2 min e com intensidade controlada. Duas horas após o início da experiência, os animais foram perfundidos com uma mistura de paraformaldeído a 4% e ácido pícrico a 14%. Após a perfusão, os segmentos T<sub>13</sub>-L<sub>3</sub> da medula espinhal foram removidos, pós-fixados na mesma solução de fixação e cortados com uma espessura de 60 µm. Os animais foram, então, divididos em dois grupos de seis ratos consoante se destinavam às reacções imunocitoquímicas duplas ou triplas. Nas reacções imunocitoquímicas duplas, os cortes foram incubados num anticorpo contra a proteína Fos e usou-se um fluorocromo que, observado em microscopia de fluorescência, emite radiações cujo comprimento de onda é de 519 nm, pelo que os núcleos imunorreac-tivos para a proteína Fos eram observados com a cor verde. Após várias lavagens, uma das séries de cortes foi incubada em anticorpo que

reconhece os receptores NK1 enquanto na outra série se usava um anticorpo contra os receptores GABA<sub>B</sub>. A revelação dos receptores NK1 e GABA<sub>B</sub> foi feita de modo semelhante, isto é, usando um anticorpo secundário biotilado, seguido de um fluorocromo que, quando excitado em microscópio de fluorescência, emite radiação com 617 nm por neurónios imunoreactivos para os receptores NK1 ou GABA<sub>B</sub> pelo que estes apareciam com a cor vermelha. Em cada imunorreacção dupla, ou seja Fos + NK1 ou Fos + GABA<sub>B</sub> foram examinados 15 cortes, aleatoriamente seleccionados, usando um microscópio de fluorescência que fazia sectionamento óptico (microscópio confocal). No corno dorsal da medula espinhal (lâminas I a V), contaram-se todos os neurónios imunoreactivos para a proteína Fos, para cada um dos receptores e duplamente marcados para a proteína Fos e para cada um dos receptores. Usou-se o teste de  $\chi^2$  corrigido para comparações múltiplas para comparar as percentagens de neurónios que exibiam imunorreacção simultânea para a proteína Fos e para o receptor NK1 com os que possuíam reacção para a proteína Fos e para os receptores GABA<sub>B</sub>.

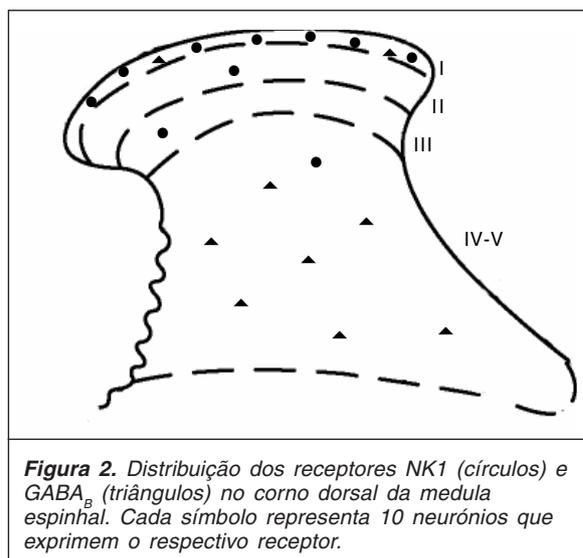
Na reacção imunocitoquímica tripla usámos um protocolo similar ao anteriormente descrito mas utilizámos 3 fluorocromos que conferiam uma cor distinta à proteína Fos, aos receptores NK1 e aos receptores GABA<sub>B</sub>. Para o efeito, a proteína Fos foi revelada por um anticorpo detectado por fluorocromo que emite a 688 nm, sendo observada com a cor azul. Os cortes foram de seguida, incubados em anticorpo contra os receptores NK1 e revelados com o fluorocromo que emite na gama do verde. Para os receptores GABA<sub>B</sub> usou-se o fluorocromo que emite na radiação vermelha. Foram contados, em 15 cortes da medula escolhidos ao acaso, os neurónios imunorreagidos para cada um dos receptores, para a proteína Fos ou triplamente marcados. As percentagens de neurónios que co-localizavam os receptores NK1 e os receptores GABA<sub>B</sub> foi comparada consoante as células continham ou não a reacção para a proteína Fos.

## Resultados

Os receptores NK1 e GABA<sub>B</sub> ocorriam em pericários e fibras dispersos na substância cinzenta da medula espinhal (Fig. 1A e 1B) mas a quantificação restringiu-se aos pericários que ocorriam no corno dorsal (Fig. 2). A maioria dos pericários com reacção imunocitoquímica para os receptores NK1 ocorria na lâmina I (75%) enquanto os valores nas lâminas II, III e IV-V eram semelhantes (cerca de 8% em cada). Os pericários imunoreactivos para os receptores GABA<sub>B</sub> predominavam nas lâminas IV-V (70%), seguidos da lâmina I (21%). Foram observados poucos neurónios nas lâminas II e III (6 e 3%, respectivamente).



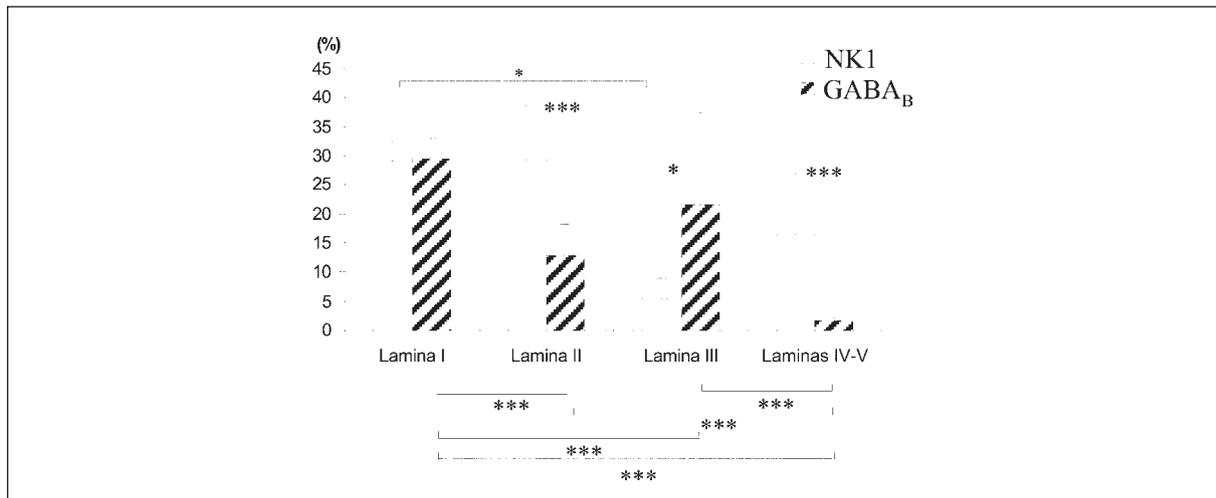
**Figura 1.** Microfotografias de fluorescência mostrando o mesmo neurónio (setas) triplamente marcado para os receptores NK1 (A), GABA<sub>B</sub> (B) e proteína Fos.



**Figura 2.** Distribuição dos receptores NK1 (círculos) e GABA<sub>B</sub> (triângulos) no corno dorsal da medula espinhal. Cada símbolo representa 10 neurónios que exprimem o respectivo receptor.

A expressão da proteína Fos era detectada pela presença de núcleos de contornos bem definidos onde ocasionalmente sobressaíam os nucléolos (Fig. 1C). Estes distribuíam-se diferencialmente nas várias lâminas do corno dorsal da medula espinhal, predominando na lâmina I (45%), seguindo-se a lâmina II (33%), a lâmina IV-V (15%) e por último a lâmina III (7%). Esta distribuição diferencial da proteína Fos está de acordo com os dados de estudos previamente publicados usando o mesmo protocolo de estimulação dolorosa (Lima, et al., 1993; Tavares, et al., 1993, 1995).

Os neurónios duplamente marcados para um dos receptores e para a proteína Fos encontravam-se predominantemente na lâmina I quer nos receptores NK1 (81%) quer nos GABA<sub>B</sub> (73%). A proporção de neurónios com receptores NK1 que também era imunoreactiva para a proteína Fos era superior na lâmina I atingindo-se diferenças estatisticamente significativas quando se comparavam com a lâmina III (Fig. 3). Relativamente aos receptores GABA<sub>B</sub>, ocorria um predomínio mais acentuado da dupla mar-



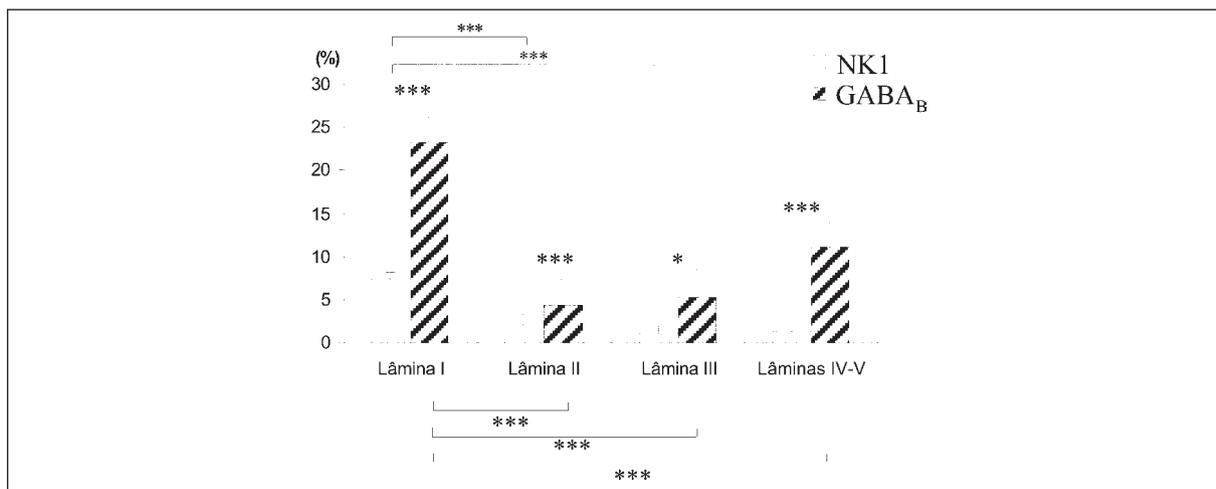
**Figura 3.** Percentagens ( $\pm$  erro da média) dos neurónios marcados para os receptores NK1 (barras brancas) ou para os receptores GABA<sub>B</sub> (barras tracejadas) que também estavam marcados para a proteína Fos (\* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0.005).

cação na lâmina I (Fig. 3). Quando se comparavam entre si as proporções de neurónios duplamente marcados para cada receptor, verificou-se que os receptores NK1 predominavam sobre os GABA<sub>B</sub> nas lâminas II e IV-V enquanto o oposto acontecia na lâmina III (Fig. 3). As percentagens de neurónios marcados para a proteína Fos e que também eram imunorreactivos para um dos receptores era largamente superior na lâmina I (Fig. 4). Quando os dois receptores eram comparados entre si, detectámos um predomínio acentuado da dupla marcação para os receptores GABA<sub>B</sub> em todas as lâminas do corno dorsal (Fig. 4).

No estudo da tripla marcação, verificámos que os pericários que co-localizavam os dois receptores ocorriam quase exclusivamente na lâmina I. Destes, a grande maioria (63%) também apresentava imunorreacção para a proteína Fos.

### Discussão

Os resultados deste estudo em que analisámos a participação dos receptores NK1 e GABA<sub>B</sub> no processamento de informação dolorosa mecânica, revelaram novas perspectivas da participação daqueles receptores nos neurónios individuais do corno dorsal da medula espinhal. No que respeita à análise dos dados relativos aos receptores NK1, é pertinente salientar que as proporções de neurónios nociceptivos que exprimem receptores NK1 é absolutamente idêntica às obtidas noutros estudos em que a síntese da proteína Fos era induzida por diversos tipos de estímulos nociceptivos (Doyle e Hunt, 1999). Deste modo, os nossos resultados reforçam a proposta feita por aqueles autores de que os neurónios da lâmina I que exprimem os receptores NK1 estão envolvidos na discriminação da intensidade dolorosa,



**Figura 4.** Percentagens ( $\pm$  erro da média) dos neurónios marcados para a proteína Fos e que também exprimiam os receptores NK1 (barras brancas) ou os receptores GABA<sub>B</sub> (barras tracejadas; \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.005).

enquanto os neurónios das lâminas profundas estarão sobretudo relacionados com a identificação do tipo de estímulo nociceptivo (Hunt, 2000; Hunt e Manthly, 2001).

A análise quantitativa da distribuição de pericários imunorreactivos para os receptores GABA<sub>B</sub> no corno dorsal da medula espinhal foi efectuada pela primeira vez no nosso estudo tendo-se sido verificado que predominavam nas lâminas IV-V. Para além disso, o nosso estudo foi o primeiro a abordar a activação nociceptiva de neurónios espinhais que exprimem os receptores GABA<sub>B</sub>, sendo evidente um predomínio da activação na lâmina I. É possível que a natureza do estímulo doloroso aplicado possa determinar o local de recrutamento dos neurónios com receptores GABA<sub>B</sub>. A apoiar esta sugestão, existem dados que mostram que, na dor inflamatória, o baclofeno inibe preferencialmente as respostas nociceptivas de neurónios das lâminas profundas do corno dorsal (Buritova, et al., 1996).

Da análise global dos resultados deste trabalho sobressai a expressão preferencial dos receptores NK1 e GABA<sub>B</sub> em neurónios nociceptivos da lâmina I. De facto, tanto os neurónios duplamente marcados para cada um dos receptores e para a proteína Fos como os triplamente marcados ocorriam na lâmina I. Dado que a lâmina I está envolvida na transmissão supraspinal de informação nociceptiva (Lima, 1997), o balanço de influências excitatórias e inibitórias exercidas sobre estes neurónios deve ser determinante na transmissão supraspinal de informação nociceptiva. Torna-se crucial analisar se o referido balanço se altera quando o sistema processa outro tipo de informação dolorosa, nomeadamente na dor crónica. Para o efeito, temos em curso um estudo em que a metodologia aqui descrita é aplicada a um modelo de inflamação articular crónica.

## Agradecimentos

A investigação incluída neste trabalho foi subsidiada pelo projecto POCTI/NSE/38952/2001 da Fundação para a Ciência e Tecnologia e pelo "Programa Dor" da Fundação Calouste Gulbenkian. A Mestre Ana Rita Castro é docente da Universidade Fernando Pessoa a preparar o doutoramento no nosso laboratório.

## Bibliografia

- Björkman R, Hallman KM, Hedner J, Hedner TE, Henning M. Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain* 1994;57:259-64.
- Bowery NG, Price GW, Hudson AL, Hill DR, Wilkin GP, Turnbull MJ. GABA receptor multiplicity - Visualization of different receptor types in the mammalian CNS. *Neuropharmacology* 1984;23:219-31.
- Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1987; 20:365-83.
- Buritova J, Chapman V, Honoré P, Besson JM. The contribution of GABA<sub>B</sub> receptor-mediated events to inflammatory pain processing: carrageenan oedema and associated spinal c-fos expression in the rat. *Neuroscience* 1996;73:487-96.
- Castro AR, Bowery N, Castro-Lopes J. Baclofen and midazolam alter c-fos induction by peripheral noxious or innocuous stimulation in the spinal cord of normal and monoarthritic rats. *Neuropharmacology* 1999;38:1775-88.
- Doyle CA, Hunt SP. Substance P receptor (neurokinin-1)-expressing neurons in lamina I of the spinal cord encode for the intensity of noxious stimulation: a c-fos study in rat. *Neuroscience* 1999; 89:17-28.
- Eccles JC, Schmidt R, Willis WD. Pharmacological studies on presynaptic inhibition. *J Physiol* 1964;168:500-30.
- Green GM, Dickenson A. GABA-receptor control of the amplitude and duration of the neuronal responses to formalin in the rat spinal cord. *Eur J Pain* 1997;1:95-104.
- Hammond DL, Drower EJ. Effects of intrathecally administered THIP, baclofen and muscimol on nociceptive threshold. *Eur J Pharmacol* 1984;103:121-5.
- Hammond DL, Washington JD. Antagonism of L-baclofen-induced antinociception by CGP35348 in the spinal cord of the rat. *Eur J Pharmacol* 1993;234:255-62.
- Hunt SP. Pain control: breaking the circuit. *TIPS* 2000;21:284-6.
- Hunt SP, Manthly PW. The molecular dynamics of pain control. *Neuroscience* 2001;2:83-91.
- Kangrga I, Jiang M, Randic M. Actions of (-)-baclofen on rat dorsal horn neurons. *Brain Res* 1991;562:265-75.
- Lima D. Functional anatomy of spinofugal nociceptive pathways *Pain Rev* 1997;4:1-19.
- Lima D, Avelino A, Coimbra A. Differential activation of c-fos in spinal neurons by distinct classes of noxious stimuli. *NeuroReport* 1993;4:747-50.
- Littlewood NK, Todd AJ, Spike RC, Watt C, Shehab SAS. The types of neurons in spinal dorsal horn which possess neurokinin-1 receptors. *Neurosci* 1995;66:597-608.
- McCarson KE, Krause JE. The neurokinin-1 receptor antagonist LY306740 blocks nociception-induced increases in dorsal horn neurokinin-1 receptor gene expression. *Molec Pharmacol* 1996;50:1189-99.
- Malcangio M, Bowery NG. g-Aminobutyric acid<sub>B</sub>, but not  $\gamma$ -Aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor activation, inhibits electrically evoked substance P-like immunoreactivity release from the rat spinal cord *in vitro*. *J Pharmacol Exp Therap* 1993;255:1490-6.
- Malcangio M, Ghelardini C, Giotti A, Malmberg-Aiello P, Bartolini A. CGP 35348, a new GABA<sub>B</sub> antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect induced by baclofen. *Br J Pharmacol* 1991;103:1303-8.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* 1992;257:1276-9.
- Manthly PW, Hunt SP. The autoradiographic localization substance P receptors in the rat and bovine spinal cord and the rat and cat spinal trigeminal nucleus pars caudalis and the effects of neonatal capsaicin. *Brain Res* 1985;332:315-24.
- Manthly PW, Rogers SD, Honoré P, et al. Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science* 1997;278:275-8.
- Snijders DG, Dirksen R, Slappendel RE, Crul BJP. Substance P. *Eur J Pain* 2000;4:121-35.
- Radhakrishnan V, Iyengar S, Henry JL. The nonpeptide NK-1 receptor antagonists LY303870 and LY306740 block the responses of spinal dorsal horn neurons to substance P and to peripheral noxious stimuli. *Neuroscience* 1998;83:1251-60.
- Tavares I, Lima D, Coimbra A. Neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord projecting to the medullary ventrolateral reticular formation express c-fos after noxious stimulation of the skin. *Brain Res* 1993;623:278-86.
- Tavares I, Albino-Teixeira A, Lima D. Hypertension inhibits noxious-evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *NeuroReport* 1995; 6:1664-8.
- Traub RJ. The spinal contribution of substance P to the generation and maintenance of inflammatory hyperalgesia in the rat. *Pain* 1996; 67:151-61.
- Yashpal K, Dam T-V, Quirion R. Effects of dorsal rhizotomy on neurokinin receptor sub-types in the rat spinal cord: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 1991;552:240-7.

# A anandamida, um agonista endógeno do receptor vanilóide, aumenta durante a inflamação da bexiga e contribui para a hiperreflexia e alodínia

Avelino A<sup>1</sup>, Dinis P<sup>2</sup>, Charrua A<sup>1</sup>, Nagy I<sup>3</sup>, Yacoob M<sup>4</sup>, Cruz F<sup>1,2</sup>

## Resumo

A anandamida (ANA), um lipídeo endógeno, mostrou capacidade de activar o receptor vanilóide (VR1) *in vitro*. Dado que a ANA é um agonista endógeno quer do VR1, quer do receptor canabinóide 1 (CB1), estudou-se (i) a variação da concentração da ANA na cistite crónica; (ii) o efeito da aplicação de ANA e de ANA em conjunto com SR141716A, um antagonista do CB1, e com a capsazepina (CPZ), um antagonista do VR1, em bexigas normais de ratos, e (iii) a possibilidade da ANA induzir dor na bexiga e desta ser mediada por nociceptores sensíveis à capsaicina. Verificou-se que: (i) a ANA aumenta na inflamação; (ii) a sua aplicação aumenta as contracções vesicais, e (iii) que induz dor através de nociceptores sensíveis à capsaicina. Estes resultados podem ser relevantes para a compreensão da dor e da hiperactividade da bexiga durante a inflamação.

**Palavras chave:** Inflamação vesical. Anandamida. Receptor vanilóide tipo 1. Receptor canabinóide 1. SR141716A. Capsazepina.

## Introdução

O receptor vanilóide tipo 1 (VR1) é um canal catiónico não selectivo (McCleskey e Gold, 1999). Este receptor parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento da alodínia (Vizzard, 2000) e da hiperactividade vesicais (Cruz, et al., 2002) subsequentes à inflamação da bexiga. De facto, a regulação negativa do VR1 através da acção da resiniferatoxina (RTX) diminui a alodínia e a hiperactividade vesical em ratos cujas bexigas foram cronicamente inflamadas por um agente químico (Dinis, et al., submetido para publicação). Por outro lado, a aplicação de um ligando exógeno específico do VR1, a capsaicina, desperta dor no homem, comportamento doloroso

nos animais e hiperactividade vesical em ambos (Maggi, et al., 1989; Cruz, et al., 1996).

Os mecanismos de activação do VR1, durante a inflamação crónica da bexiga, não são ainda bem conhecidos. Isto deve-se, em parte, ao desconhecimento de uma substância endógena que possa activar o VR1, tal como a capsaicina o faz. Os mecanismos de activação endógena do VR1 que têm sido propostos incluem a baixa do pH no tecido inflamado e a acumulação de mediadores inflamatórios, tais como o NGF e a bradicinina (Cesare e McNoughton, 1996; Miller, et al., 2002). Contudo, a existência de um agonista endógeno, com características semelhantes às da capsaicina é ainda desconhecido.

Recentemente, a anandamida (ANA), um lipídeo com uma cadeia alifática, semelhante à da capsaicina, sintetizado por macrófagos, pelo endotélio vascular (Di Marzo, et al., 1996) e por aferentes primários (Ahluwalia, et al., 2003), mostrou activar o VR1, em experiências conduzidas *in vitro* (Zygmunt, et al., 1999). De facto, a ANA induz vasodilatação e libertação de CGRP em vasos sanguíneos de rato, que são bloqueadas pela capsazepina (CPZ), um anta-

<sup>1</sup>Instituto de Histologia e Embriologia, Faculdade de Medicina do Porto e IBMC, 4200-319 Porto, Portugal

<sup>2</sup>Departamento de Urologia, Hospital S. João, 4200-319 Porto, Portugal

<sup>3</sup>Departamento de Anestesia, Imperial College, Chelsea and Westminster Hospital, Londres, Reino Unido

<sup>4</sup>Novartis Institute for Medical Research, Londres, Reino Unido

gonista específico do VR1. Embora estas experiências levem a pensar que a ANA seja um agonista endógeno do VR1, não se pode ignorar que a ANA é também agonista de um outro receptor abundante no sistema nervoso, o CB1 (Devane, et al., 1992). Apesar do CB1 ser expresso em aferentes primários que exprimem o VR1 (Ahluwalia, et al., 2000), a sua estimulação por agonistas específicos administrados sistemicamente causa na bexiga um efeito oposto ao da estimulação do VR1, isto é, induz analgesia e hiporreflexia (Farquhar-Smith, et al., 2002).

Perante estes dados decidimos verificar se a concentração da ANA varia em bexigas inflamadas, se a ANA induz dor e hiperactividade vesical quando aplicada em bexigas normais, e, no caso de acontecerem, se são alteradas pela administração simultânea de antagonistas específicos do VR1 e do CB1, respectivamente a CPZ e o SR141716A.

## Materiais e métodos

Utilizaram-se ratos fêmeas Wistar adultas.

A ciclofosfamida foi adquirida à Baxter, Portugal. O uretano foi adquirido à Sigma, Portugal. A anandamida e a capsazepina foram adquiridas à Tocris, EUA, e o SR141716A à SRI International, EUA.

### Quantificação da anandamida

Com o intuito de se avaliar qual a concentração de ANA presente em bexigas inflamadas, induziu-se cistite química, injectando intraperitonealmente (i.p.) ciclofosfamida, numa dose de 200 mg ciclofosfamida/kg de peso corporal. Quatro horas depois, os animais foram decapitados e as bexigas colhidas e imediatamente congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Utilizou-se, como controlo, bexigas de ratos injectados i.p. com soro fisiológico. A concentração de ANA foi determinada por espectrometria de massa.

### Efeito da anandamida no reflexo miccional

Em animais anestesiados com uretano (1,2 mg/kg, s.c.), a bexiga foi exposta através de uma incisão abdominal. Uma agulha de calibre 21 foi inserida na cúpula e soro fisiológico foi infundido a 6 ml/h, deixando a uretra aberta. A temperatura corporal foi mantida a  $36-37^{\circ}\text{C}$ , através de um dispositivo termorregulável. Após o período de estabilização de 30 min, aplicaram-se sequencialmente na superfície serosa da bexiga soluções de ANA a 1, 5, 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$  em soro fisiológico, durante 10 min cada. Este procedimento foi repetido usando-se uma solução de a 50  $\mu\text{M}$  de SR141716A, em simultâneo com cada uma das soluções de ANA. Aplicou-se ainda, sobre bexigas normais, uma solução de ANA a 50  $\mu\text{M}$ , seguida da aplicação de ANA + CPZ, ambas a 50  $\mu\text{M}$ .

### Avaliação do efeito nociceptivo da ANA

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 35% (0,1 ml/100 g) e a bexiga foi cateterizada pela uretra, instilando-se durante 30 min, 0,5 ml de soro fisiológico, de ANA 50  $\mu\text{M}$ , ou de ANA + CPZ, ambos a 50  $\mu\text{M}$ . Uma hora e meia após o fim da aplicação, os animais foram fixados por perfusão transaórtica, com paraformaldeído a 4% e ácido pícrico a 10%. No final colheu-se a medula espinal, a qual foi pós-fixada durante duas horas no mesmo fixador, e crioprotégida, durante 24 h, em sacarose a 30%. O segmento espinal L6 foi cortado transversalmente a 40 micrómetros num micrótomo de congelação, sendo cada um em cada quatro cortes imunorreagido contra a proteína Fos, usando o método ABC-HRP. As células imunopositivas foram contadas em 10 cortes por segmento.

### Tratamento estatístico

Todo os resultados obtidos nesta experiência foram analisados com o test *t*, de distribuição unicaudal. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

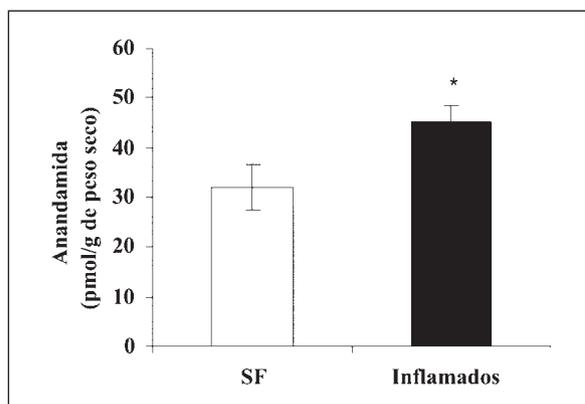
## Resultados

### Quantificação da anandamida

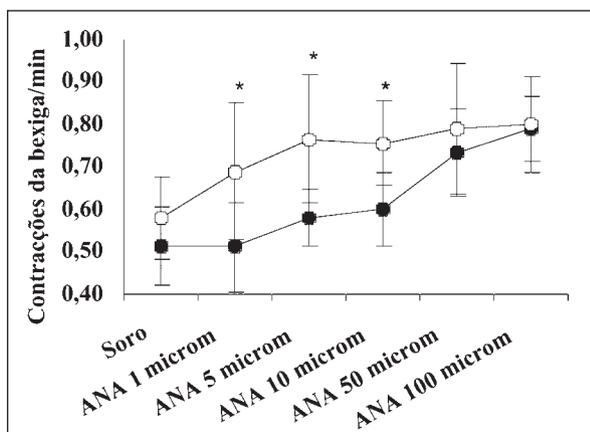
O resultado da análise por espectrometria de massa mostrou que as bexigas dos ratos injectados com soro fisiológico continham  $32,15 \pm 3,35$  pmol ANA/g de peso seco da bexiga. Ao fim das 4 h após a indução da inflamação os valores de ANA subiram para  $45,01 \pm 6,72$  ( $p < 0,05$ ) (Fig. 1).

### Efeito da anandamida no reflexo miccional

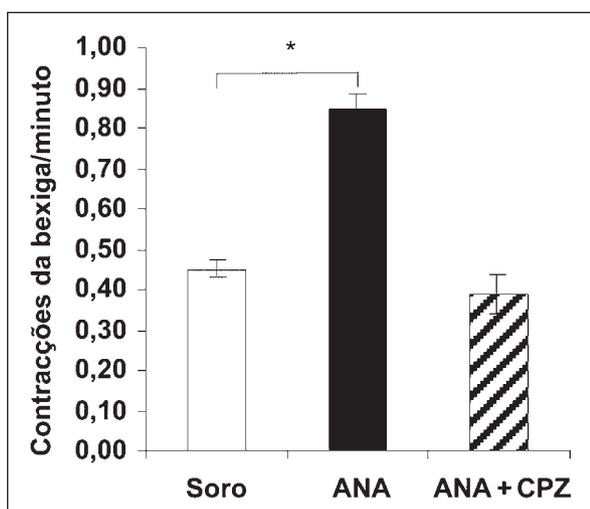
A ANA, nas concentrações de 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$ , não influenciou a actividade do reflexo miccional. Contudo, para valores de concentração superiores, ou seja, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , o número das contracções da bexiga por minuto aumentaram



**Figura 1.** Valores de anandamida, em pmol/g de peso seco da bexiga, presentes nas bexigas de ratos colhidas 4 h após a injeção i.p. com soro fisiológico (SF) e com ciclofosfamida (inflamados).



**Figura 2.** Efeito das várias doses de ANA (□), em  $\mu\text{M}$ , e da aplicação dessas com SR141716 a  $50 \mu\text{M}$  (●), sob a actividade do reflexo miccional (contrações da bexiga/minuto); \* representa diferenças significativas entre as aplicações de ANA com e sem SR141716A.



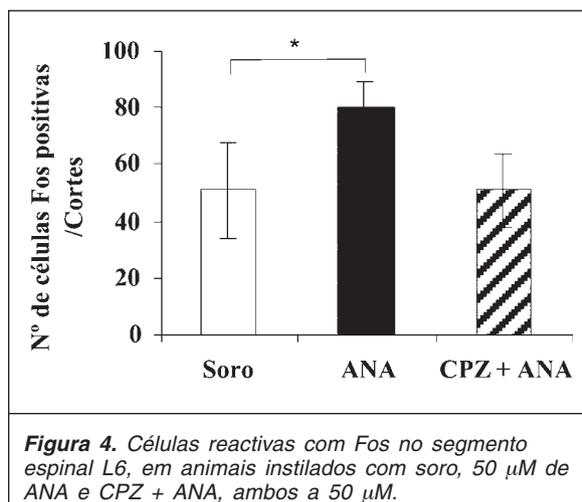
**Figura 3.** Efeito da aplicação de ANA a  $50 \mu\text{M}$  e ANA + CPZ, ambas a  $50 \mu\text{M}$ , sob a actividade do reflexo miccional (contrações da bexiga/min).

de  $0,51 \pm 0,09$  para  $0,73 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ) e  $0,79 \pm 0,09$  ( $p < 0,05$ ), respectivamente (Fig. 2). A aplicação de CPZ a  $50 \mu\text{M}$  bloqueava a hiperactividade induzida pela ANA  $50 \mu\text{M}$  (Fig. 3).

A aplicação da solução de  $50 \mu\text{M}$  de SR141716 fez com que o número de contrações por minuto induzidas pelas doses de 5 ou 10  $\mu\text{M}$  de ANA aumentasse de  $0,58 \pm 0,10$  para  $0,77 \pm 0,15$  ( $p < 0,05$ ) e  $0,76 \pm 0,10$  ( $p < 0,001$ ), respectivamente. Quando comparadas entre si, verificamos que as aplicações de 1, 5 e 10  $\mu\text{M}$  de ANA com e sem SR são estatisticamente diferentes. No entanto, o SR141716A não teve qualquer efeito potenciador sobre as soluções de ANA a 50 ou a 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 2).

#### Avaliação do efeito nociceptivo da ANA

A instilação das bexigas com soro fisiológico induziu a produção de proteína Fos em  $51 \pm 17$



**Figura 4.** Células reactivas com Fos no segmento espinal L6, em animais instilados com soro,  $50 \mu\text{M}$  de ANA e CPZ + ANA, ambos a  $50 \mu\text{M}$ .

células por cortes da medula espinal. A instilação de ANA a  $50 \mu\text{M}$  aumentou este número para  $80 \pm 9$ . A CPZ diminuiu este número para valores semelhantes aos encontrados nos animais tratados com soro  $-51 \pm 13$  ( $p < 0,05$ ) células por secção da espinal medula (Fig. 4).

#### Discussão

Desde a sua descoberta, a ANA tem sido vista como um endocannabinóide que interage e modula diferentes partes do sistema nervoso (Di Marzo, et al., 1998). Este composto é produzido *de novo* como resposta a um estímulo, não se encontrando por isso armazenado. Existem dois mecanismos sugeridos para a produção da ANA. O mais provável ocorre a partir da hidrólise da N-araquidonilfosfatidil etanolamina (NAPE) e é dependente da entrada de cálcio para a célula (Hillard, 2000; Sugiura, et al., 2002). No sistema nervoso central, uma vez processada, a ANA é libertada para o meio extracelular, indo actuar nos receptores CB1 pré-sinápticos, inibindo canais de cálcio e, em consequência, a libertação de neurotransmissores. A medida que vai sendo readquirida pela membrana pós-sináptica, a ANA é degradada, a valores fisiológicos de pH, por uma hidrolase específica, a FAAH, produzindo ácido araquidónico ou outros eicosanóides (Deutsch, et al., 2001; Kreitzer e Regerhr, 2002). A valores de pH ácidos, a enzima responsável pela degradação da ANA é a amidohidrolase da ANA (Ueda, et al., 2001).

Para além de actuar sobre o CB1, a ANA actua sobre outros receptores (Hampson, et al., 1998; Kimura, et al., 1998; Christopoulos A, Wilson K, 2001). A sua acção sobre o VR1 foi primeiro observada por Zygmunt, et al. (1999), que, *in vitro*, verificaram que a ANA provocou uma libertação do neuropeptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP). Esta acção não ocorreu quando foi coadministrada com CPZ, levando a concluir que a ANA actuou sobre o VR1.

O resultados das nossas experiências mostraram que a ANA aumenta aquando da ocorrência de inflamação vesical, mantendo-se elevada se o estado inflamatório não se alterar (dados não mostrados). Este aumento poderá relacionar-se com (i) um aumento da sua produção tanto por parte das células do sistema imunitário envolvidas na inflamação (Pestonjasp e Burstein, 1998), como por parte das células da glia (Walter, et al., 2002) e dos neurónios sensíveis à capsaicina (Di Marzo, et al., 1994; Ahluwalia, et al., 2003), e com (ii) uma diminuição da sua degradação intracelular (De Petrocellis, et al., 2001; Di Marzo, et al., 2001; Ueda, et al., 2001).

Os nossos resultados mostraram que a ANA aplicada na bexiga normal aumenta a frequência das contracções vesicais. Curiosamente este efeito só se tornou significativo a partir da dose de 50  $\mu\text{M}$  e atingiu a saturação a 100  $\mu\text{M}$ . Tendo-se verificado que este efeito foi inibido pela aplicação de CPZ ficou mostrado que o aumento da quantidade de ANA na bexiga inflamada pode estimular o reflexo miccional por activação do VR1.

Curiosamente, a aplicação de SR141716A em conjunto com ANA provocou um desvio para a esquerda da curva dose-efeito do endocanabinóide. De facto, as contracções vesicais induzidas pela ANA aumentaram de forma significativa logo a partir da dose de 1  $\mu\text{M}$  na presença do antagonista do CB1. Sabendo-se que o VR1 e o CB1 se encontram coexpressos nos neurónios aferentes primários (Ahluwalia, et al., 2003) os nossos resultados levam a crer que, em condições normais, a ANA actue preferencialmente sobre o CB1. À medida que a concentração de ANA aumenta, a sua acção parece exercer-se preferencialmente sobre o VR1. A acção preferencial da ANA em altas doses sobre o VR1, explica porque é que a acção do SR141716A não trouxe qualquer acção adicional à hiperactividade vesical provocada pela ANA em concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ .

Os nossos resultados estão de acordo com outros estudos recentes. Quando testada em concentrações nanomolares, o efeito da ANA no CB1 foi antinociceptivo (Richardson, et al., 1998) e antiinflamatório (Burstein, et al., 2000). Estes resultados estão de acordo com os descritos por Lever e Malcangio (2002), que observaram que a inactivação do CB1 aumenta a libertação de neurotransmissores nos terminais dos neurónios sensitivos primários causada pela activação do VR1. A acção preferencial da ANA em baixas concentrações sobre o CB1 poderia também explicar a sua acção analgésica e relaxante observada na bexiga (Farquhar-Smith, et al., 2002). Contudo, neste caso, a ANA foi administrada sistemicamente, pelo que não é possível excluir uma acção central concomitante (Farquhar-Smith, et al., 2002).

Para além da hiperactividade, a ANA 50  $\mu\text{M}$  aumentou a expressão de *c-fos* a nível da medula espinal, reproduzindo o efeito que a capsaicina causa (Cruz, et al., 1996). Este gene é expresso rapidamente como resposta a um estímulo nócico, havendo uma acumulação máxima de RNA mensageiro ao fim de 30 a 40 min, com valores máximos de expressão proteica 2 h após a indução da transcrição do gene (Harris, 1998). Sabendo-se que estímulos inócuos causam uma baixa expressão de *c-fos*, os nossos resultados sugerem que a ANA em concentrações elevadas tem uma acção algogénica.

Recentemente, McVey, et al. (2003) verificaram, no intestino, que a ANA medeia efeitos inflamatórios, no caso, através de aferentes primários sensíveis à capsaicina, resultados que corroboram os obtidos na nossa experiência. Em conclusão, numa situação de inflamação crónica da bexiga, a quantidade de ANA produzida aumenta, passando a actuar sobre o VR1, potenciando a micção reflexa e levando à sensação de dor. Estes resultados mostram-se relevantes para a compreensão da hiperactividade vesical causada pela inflamação e para o desenvolvimento de terapias baseadas na dessensibilização do VR1.

## Bibliografia

- Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. Cannabinoid receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 2003;100:685-8.
- Ahluwalia J, Yaqoob M, Urban L, Bevan S, Nagy I. Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induce anandamide production and release. *J Neurochem* 2003;84(3):585-91.
- Burstein SH, Rossetti RG, Yagen B, Zurier RB. Oxidative metabolism of anandamide. *Prostagl Lipid Med* 2000;61:29-41.
- Cesare P, McNaughton P. A novel heat-activated current in nociception neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;94:7006-11.
- Christopoulos A, Wilson K. Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res* 2001;915(1):70-8.
- Cruz F, Avelino A, Coimbra A. Desensitization follows excitation of bladder primary afferents by intravesical capsaicin, as shown by *c-fos* activation in the rat spinal cord. *Pain* 1996;64(3):553-7.
- Cruz F, Dinis P, Avelino A, Silva J. Bladder overactivity and allodynia caused by chronic inflammation is mediated by vanilloid sensitive primary afferent fibres. *European Urology* 2002;1(Suppl 1):25.
- De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V. Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptor. *J Pharm Pharmacol* 2001;53(11):1525-32.
- Deutsch DG, Glaser ST, Howell JM, et al. The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hidrolase. *J Biol Chem* 2001;276(10):6967-73.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946-9.
- Di Marzo V, De Peterson L, Sepe N, Buono A. Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J* 1996;316(Pt3):977-84.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994;372:686-91.
- Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory actions. *Trends in Neuroscience* 1998;21(12):521-8.
- Di Marzo V, Melck D, Orlando P, et al. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hidrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J* 2001;358(Pt 1):249-55.
- Dinis P, Charrua A, Avelino A, Cruz F. The effect of intravesical resiniferatoxin on pain and hyperactivity induced by chronic bladder inflam-

- mation. An experimental study in the rat. *J Urol* (submetido para publicação).
- Farquhar-Smith WP, Jaggar SI, Rice AS. Attenuation of nerve growth factor-induced visceral hyperalgesia via cannabinoid CB(1) and CB(2)-like receptors. *Pain* 2002;97(1-2):11-21.
- Hampson AJ, Bornheim LM, Scanziani M, et al. Dual effects of anandamide on NMDA receptor-mediated responses and neurotransmission. *J Neurochem* 1998;70(2):671-6.
- Harris JA. Using *c-fos* as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 1998;45(1):1-8.
- Hillard CJ. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prost Lip Med* 2000;61:3-18.
- Kimura T, Ohta T, Watanabe K, Yoshimura H, Yamamoto I. Anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, also interacts with 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor. *Biol Pharm Bull* 1998;21(3):224-6.
- Kreitzer A, Regehr. Retrograde signalling by endocannabinoids. *Curr Opin Neurobiol* 2002;12:324-30.
- Lever IJ, Malcangio M. CB<sub>1</sub> receptor antagonist SR1417A increases capsaicin-evoked release of substance P from adult mouse spinal cord. *Br J Pharmacol* 2002;135:21-4.
- Maggi CA, Barbanti G, Santiciolo P, et al. Cystometric evidence that capsaicin-sensitive nerves modulate the afferent branch of micturition reflex in humans *J Urol* 1989;142(1):150-4.
- McCleskey EW, Gold MS. Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol* 1999;61:835-56.
- McVey DC, Schmid PC, Schmid HHO, Vigna SR. Endocannabinoids induce ileitis in Rats via the capsaicin receptor (VR1). *J Pharmacol Experim Therap* 2003;304(2):713-22.
- Miller LJ, Fischer KA, Goralnick SJ, et al. Nerve growth factor and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology* 2002;59(4):603-8.
- Pestonjamas VK, Burstein SH. Anandamide synthesis is induced by arachidonate mobilizing agonists in cells of the immune system. *Biochim Biophys Acta* 1998;1394(2-3):249-60.
- Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 1998;75(1):111-9.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66(2-3):173-92.
- Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem* 2001;276:35552-7.
- Vizzard MA. Alterations in spinal cord Fos protein expression induced by bladder stimulation following cystitis. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol* 2000;278:1027-39.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N. Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem* 2002;277(23):20869-76.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, et al. Vanilloid receptor on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999;400:452-7.

# A actividade das cínases ERK 1 e 2 na medula espinhal causada pela distensão da bexiga é aumentada em condições inflamatórias crónicas

Cruz C<sup>1,2</sup>, Avelino A<sup>1</sup>, McMahon SB<sup>2</sup>, Cruz F<sup>1</sup>

## Resumo

Os mecanismos moleculares envolvidos na recepção e processamento do estímulo pelas células nervosas são complexos, sendo conhecido o envolvimento de cascatas intracelulares de transdução de sinal, nomeadamente a família MAPK (mitogen activated protein kinase ou cínases proteicas activadas por mitogénios). As MAPK estão presentes no sistema nervoso onde são responsáveis pela modulação da expressão génica levando a alterações moleculares que permitem o processamento de estímulos de um modo mais eficiente. A cascata das ERK 1 e 2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 ou cínases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares) faz parte da família MAPK. Em neurónios da medula espinhal, as ERK 1/2 são activadas por estimulação nóxica de aferentes primários. Neste trabalho, efectuámos o estudo imunohistoquímico da expressão da forma fosforilada das ERK 1/2 na medula espinhal de ratos sujeitos a estimulação mecânica de bexigas normais ou cronicamente inflamadas por injeções de ciclofosfamida (CYP). Analisámos ainda o padrão temporal de activação das ERK 1/2 na medula espinhal. Verificámos que em animais intactos a cascata só era activada a níveis apreciáveis em consequência de estimulação nóxica enquanto que em animais inflamados estímulos inócuos induziam já a activação das ERK 1/2 num número considerável de células. Observámos também que em animais intactos a actividade destas cínases obedece a um padrão intermitente e não é aumentada por estimulações repetidas. Desta forma, podemos depreender que as ERK 1/2 poderão estar envolvidas em fenómenos de hiperalgesia e alodínia. A manipulação da sua actividade pode permitir uma intervenção mais eficiente em estados dolorosos.

**Palavras chave:** ERK. Inflamação vesical. Medula espinhal. Ciclofosfamida.

## Introdução

A família das cascatas intracelulares de transdução de sinal das proteínas cínase activadas por mitogénios (MAPK, *mitogen activated protein kinase*) é tradicionalmente conhecida pelo papel que desempenha na regulação da proliferação e diferenciação celular. Estas cascatas são constituídas por três cínases que se activam sequencialmente (Sweatt, 2001) por fosforilações em resíduos de serina e treonina resultando na regulação da expressão génica através da activação de factores de transcri-

ção. Sabe-se, também, que podem interagir com domínios intracelulares de receptores membranares (Adams, et al., 2000) e modificar o seu funcionamento. A família MAPK é composta por 4 cascatas de transdução de sinal activadas por diferentes estímulos: a cascata da cínase p38, a cascata das cínases Jun aminoterminal (JNK, *Jun amino-terminal kinases*), a cascata das cínases 1 e 2 reguladas por sinais extracelulares (ERK 1 e 2, *extracellular signal-regulated kinases*) e a cascata da ERK 5 (Chang e Karin, 2001), sendo as cascatas p38 e JNK activadas em situações de stress

<sup>1</sup>Instituto de Histologia e Embriologia  
Faculdade de Medicina do Porto  
Porto, Portugal

<sup>2</sup>Sensory Function Group  
Centre for Neuroscience Research  
Londres, UK

Autor para correspondência:  
Prof. Francisco Cruz  
Institute of Histology and Embryology  
Faculty of Medicine  
University of Porto

e as cascatas ERK 1/2 e ERK5 activadas por factores de crescimento vários e neurotrofinas.

Os elementos da cascata ERK1/2 são expressos constitutivamente no sistema nervoso central (Zanassi, et al., 2001) e são vários os estudos que demonstram a sua participação em fenómenos de plasticidade neuronal tais como a potenciação e a facilitação a longo prazo (Martin, et al., 1997; Rosenblum, et al., 2002). Estão também envolvidos em fenómenos de aprendizagem e memorização (Berman, et al., 2000; Hebert e Dash, 2002). Recentemente, foi demonstrado que estímulos somáticos nódicos também activam a cascata das ERK 1/2 nos segmentos da medula espinhal que recebem o afluxo sensitivo proveniente da estrutura periférica estimulada (Ji, et al., 1999). Estudos subsequentes utilizando diferentes estímulos nódicos vieram corroborar estes resultados (Karim, et al., 2001; Galán, et al., 2002).

Até ao momento, nenhum estudo foi feito no sentido de esclarecer se a estimulação nódica de órgãos viscerais activa de uma forma idêntica a cascata ERK 1/2 na medula espinhal, nem tão pouco são conhecidos os efeitos da inflamação crónica na actividade da mesma. Deste modo, este trabalho foi desenvolvido com o objectivo de verificar o padrão de activação da cascata das ERK 1/2 na medula espinhal após estimulação da bexiga com pressões inócuas e nódicas e bem como averiguar se a actividade desta cascata é modificada pela inflamação crónica da bexiga, condição associada ao aumento da excitabilidade dos aferentes sensitivos vesicais (Sengupta e Gebhart, 1995).

## Material e métodos

Neste trabalho foram utilizados 8 grupos experimentais de ratos fêmea adultos, descritos na tabela 1.

Os ratos dos grupos A-E foram anestesiados com uma injeção subcutânea de uretano (1,2 mg/kg) e a sua bexiga exposta através de uma incisão abdominal. Através de uma agulha calibre 21 inserida na cúpula, as bexigas foram distendidas com soro fisiológico à temperatura

ambiente até à pressão de 15 (distensão fisiológica inócua, grupo B) ou 60 cm H<sub>2</sub>O (distensão nódica, grupo C) durante dois minutos seguindo de perfusão imediata. Como controlo, utilizaram-se animais intactos não estimulados, grupo A. O grupo D foi perfundido duas horas após o estímulo nódico enquanto que o grupo E foi submetido a um segundo estímulo nódico após um intervalo de 2 h seguido de perfusão imediata.

Os ratos dos grupos F-G foram injectados com ciclofosfamida 75 mg/kg i.p. de três em três dias durante dez dias. Ao décimo primeiro dia, os animais foram anestesiados e estimulados da mesma forma. O grupo F constitui o grupo controlo (animais inflamados não estimulados). Os animais do grupo G foram estimulados com pressões inócuas enquanto que os do grupo H foram estimulados com pressões nódicas. As perfusões realizaram-se também logo após a conclusão da estimulação.

A perfusão foi feita pela injeção transaórtica de uma solução de paraformaldeído a 4% com ácido pícrico a 14% a pH 7,4. Os segmentos espinhais L6 foram recolhidos, pós-fixados com a mesma solução durante quatro horas e crioprotectados durante a noite numa solução de sacarose a 30%. No dia seguinte, os segmentos espinhais foram seccionados a 40  $\mu$ m e cada terceiro corte foi imunoreagido contra a forma fosforilada das cínases ERK 1 e 2 (pERK 1 e 2) segundo o método ABC-HRP. As células positivas foram contadas em dez cortes não adjacentes nos cornos dorsais (lâminas I a IV), na comissura dorsal (DCM - *dorsal commissure*) e na substância cinzenta intermediolateral (ILG - *intermediolateral grey matter*). Os resultados foram analisados estatisticamente com o teste ANOVA, seguido pelo teste Student-Newman-Keuls e são apresentados como média das contagens por corte  $\pm$  desvio padrão.

## Resultados

Em cortes de animais não estimulados, intactos ou inflamados, não se observou qualquer célula imunoreactiva para pERK 1 e 2 (Fig. 1a).

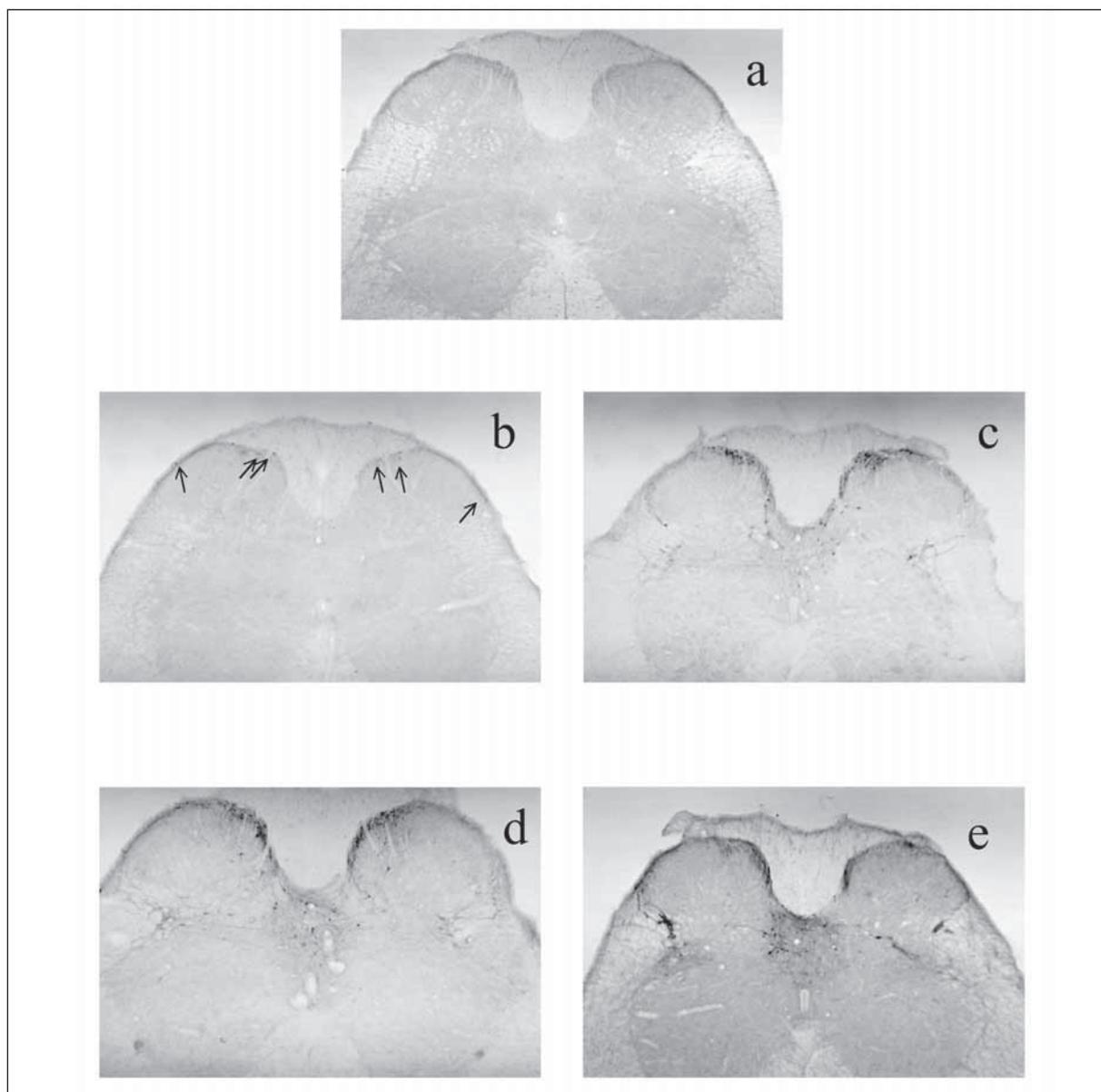
Designação	N	Injeção de ciclofosfamida	Tipo de estimulação
A	4	Não	Sem estimulação
B	4	Não	Estimulação inócua (2 min) - 2' inoc.
C	4	Não	Estimulação nódica (2 min) - 2' nód.
D	4	Não	2 min de estimulação nódica seguido de um intervalo de 2 h - 2' nód. - 2 h
E	4	Não	2 min de estimulação nódica, seguido de um intervalo de 2 h e um segundo estímulo nódico - 2' nód. - 2 h - 2' nód.
F	4	Sim	Sem estimulação.
G	4	Sim	Estimulação inócua (2 min) - 2' inoc.
H	4	Sim	Estimulação nódica (2 min) - 2' nód.

Em cortes de animais intactos sujeitos a estimulação inócua (Fig. 1b) foram contadas  $10,75 \pm 0,85$  células enquanto que em cortes animais estimulados com pressões nóxicas (Fig. 1c) foram observadas  $30,95 \pm 1,73$  ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2). As células estavam distribuídas ao longo das lâminas I, II-IV, DCM e nos ILG, sendo bem visíveis os corpos celulares bem como os seus prolongamentos celulares.

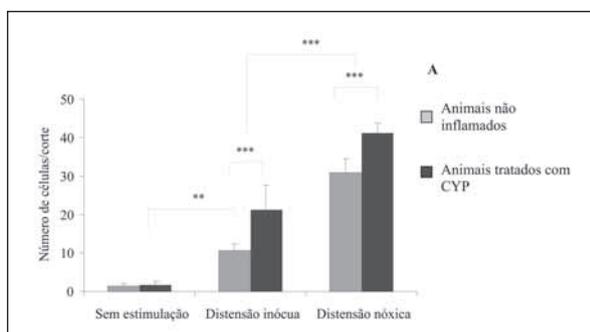
Em cortes de animais inflamados submetidos a distensão da bexiga a pressões inócuas (Fig. 1d) foram observadas  $21,13 \pm 6,61$  células positivas para as pERK 1 e 2. Em cortes de animais inflamados cujas bexigas foram distendidas com uma pressão de 60 cm H<sub>2</sub>O (Fig. 1e)

observaram-se  $41,13 \pm 2,63$  células. Estes valores são significativamente diferentes dos observados em cortes de animais intactos sujeitos ao mesmo tipo de estimulação ( $p < 0,001$ ) (Fig. 2). Nestes cortes, as células apresentavam distribuição e imunorreacção semelhante às observadas em cortes de animais intactos.

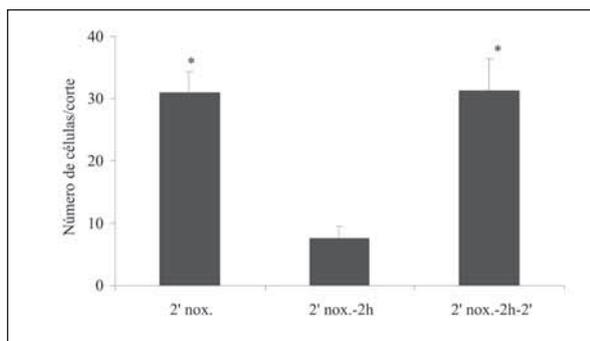
Em cortes de animais intactos que foram perfundidos duas horas após um primeiro estímulo nóxico foram contadas  $7,58 \pm 1,97$  células positivas. Em cortes de animais que foram sujeitos a um segundo estímulo nóxico após um período de duas horas de repouso foram observadas  $31,30 \pm 5,12$  células imunorreactivas ( $p < 0,05$ ) (Fig. 3).



**Figura 1.** Células imunorreactivas para a forma fosforilada das ERKs 1 e 2 no segmento da medula espinhal L6. Nos animais não estimulados não são visíveis células imunorreactivas (a). As células imunorreactivas localizam-se nas lâminas I, II-IV, DCM e ILGs dos segmentos espinhais L6 de animais intactos estimulados com pressões de 15 cm H<sub>2</sub>O (b), intactos estimulados com pressões de 60 cm H<sub>2</sub>O (c), inflamados estimulados com pressões de 15 cm H<sub>2</sub>O (d) e inflamados estimulados com pressões de 60 cm H<sub>2</sub>O (e).



**Figura 2.** Número de células imunorreactivas para as pERKs 1/2 em cortes transversais do segmento L6 da medula espinal. Os animais foram estimulados por distensão da bexiga urinária com uma pressão de 15 (distensão inócua) ou 60 cm H<sub>2</sub>O (distensão nóxica) durante dois minutos. Na medula espinal, o número de células imunorreactivas foi proporcional à intensidade do estímulo e aumentou em condições inflamatórias crónicas. Os resultados estão denotados como o valor médio do número de células imunorreactivas e respectivo desvio-padrão. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 3.** Histograma representando o padrão temporal da expressão da forma activa das ERKs 1/2 em cortes transversais do segmento L6 da medula espinal de ratos não inflamados cujas bexigas foram distendidas com uma pressão de 60 cm H<sub>2</sub>O durante 2 minutos. Duas horas após um estímulo nóxico o número de células observado era semelhante ao induzido por estimulação inócua. Uma segunda estimulação induz um número de células imunorreactivas semelhante ao observado no caso de uma única estimulação nóxica. Os resultados estão denotados como o valor médio do número de células imunorreactivas e respectivo desvio-padrão. \* $p < 0,05$ .

## Discussão

A cascata de sinalização intracelular de sinal que inclui as cínases ERK 1 e 2 está activa no sistema nervoso central em condições várias tais como o desempenho de tarefas de aprendizagem, exposição a neurotrofinas (Grewal, et al., 1999; Pizzorusso, et al., 2000) e estimulação nóxica somática (Ji, et al., 1999). Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a estimulação nóxica da bexiga também induz activação por fosforilação das cínases ERK 1 e 2 ao nível do segmento espinal L6. De acordo com o que tinha sido observado após a estimulação somática, a activação da cascata só ocor-

reu em condições em que os animais foram estimulados, dado que não se observou qualquer célula imunorreactiva em cortes da medula espinal de animais não estimulados, inflamados ou não. Por outro lado, verificámos que a activação dependia da intensidade do estímulo uma vez que o número de células positivas foi directamente proporcional à intensidade do estímulo.

Os nossos resultados sugerem também que a actividade é transitória. Era, no entanto, já sabido que o número de células imunorreactivas para a forma fosforilada das ERK 1 e 2 atinge um máximo dois a três minutos após um estímulo nóxico somático e que este número diminui gradualmente ao longo de duas horas. No nosso trabalho, verificámos que duas horas após um estímulo nóxico inicial o número de células positivas era semelhante ao induzido por um estímulo inócua. No entanto, nunca foram analisados os níveis de actividade destas moléculas após um segundo estímulo. Um segundo estímulo nóxico induz um número de células imunorreactivas semelhante ao observado no caso de um único estímulo nóxico. Deste modo, estes dados demonstram que em animais intactos a activação destas cínases não é potenciada por estimulação repetida. Neste aspecto, os nossos resultados parecem divergir dos de outros investigadores que verificaram que até 60 min após uma injeção de formalina na pata ainda é possível observar na medula espinal numerosas células imunorreactivas contra a forma fosforilada destas cínases (Ji, et al., 1999). É sabido que as ERK 1/2 podem interagir com domínios intracelulares de receptores membranares (Adams, et al., 2000), facilitando e potenciando a transmissão do impulso nervoso. Deste modo, após uma activação inicial das ERK 1/2 devido a um estímulo inicial nóxico, os níveis da cascata poderão manter-se elevados já que o limiar de activação neuronal foi diminuído e estímulos de menos intensidade poderão activar estas cínases. No entanto, durante o intervalo de tempo aqui estudado entre dois estímulos (2 h) pode ocorrer desfosforilação por acção de fosfatases específicas (Sun, et al., 1993; para revisão ver Keyse, 2000) e conseqüente inactivação das ERK 1 e 2.

Os nossos resultados demonstram que a activação das ERK 1 e 2 na medula espinal era potenciada pela inflamação crónica da bexiga induzida por injeções repetidas do agente antitumoral ciclofosfamida. Este composto é metabolizado em acroleína, a qual, por acumulação na bexiga, causa cistite química (Vizzard e Boyle, 1999). Em animais injectados com este fármaco, a estimulação da bexiga induziu activação das ERK 1 e 2 em mais células do que em animais normais. Aparentemente, a activação desta cascata de sinal num maior número de células da medula espinal poderá depender da facilitação do afluxo nervoso sensitivo

que se sabe ocorrer ao nível dos aferentes primários que enervam as estruturas inflamadas (para revisão ver Hunt e Mantyh, 2001), e poderá concorrer para a hiperalgesia e alodínia verificadas nestas situações.

Em resumo, os nossos resultados demonstram que a estimulação inócua da bexiga de animais não inflamados induz uma fraca activação da cascata de sinalização intracelular que compreende as cinases ERK 1/2. Nestes animais, apenas ocorre activação a níveis elevados quando a bexiga é distendida a pressões supra-fisiológicas nóxicas. Em animais inflamados cuja bexiga foi estimulada mecanicamente, o número de células da medula espinhal em que as ERK 1/2 foram activadas foi superior. O padrão intermitente de activação desta cascata faz-nos levantar a hipótese de estas proteínas poderem constituir potenciais alvos para o desenvolvimento de antagonistas específicos com acção analgésica.

## Bibliografia

- Adams JP, Anderson AE, Varga AW, et al. The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem* 2000;75:2277-87.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J Neurosci* 2000;20:7017-23.
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.
- Galán A, López-García JA, Cervero F, Laird JM. Activation of spinal extracellular-signalling regulated kinase-1 and -2 by intraplantar carrageenan in rodents. *Neurosci Lett* 2002;322(1):37-40.
- Grewal SS, York RD, Stork, PJS. Extracellular-signal-regulated signaling in neurones. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:544-53.
- Hebert AE, Dash PK. Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinal cortex is necessary for long-term spatial memory. *Learn Mem* 2002;9(4):156-66.
- Hunt S, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:83-91.
- Ji R-R, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ. Nociceptive-specific activation in spinal neurones contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 1999;2(12):1114-9.
- Karim F, Wang C-C, Gereau IV RW. Metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 are activators of extracellular signal-regulated kinase signaling required for inflammatory pain in mice. *J Neurosci* 2001;21(11):3771-9.
- Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:186-92.
- Martin KC, Michael D, Rose JC, et al. MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron* 1997;18:899-912.
- Pizzorusso T, Ratto GM, Putignano E, Maffei L. Brain-derived neurotrophic factor causes cAMP response element-binding protein phosphorylation in absence of calcium increases in slices and cultured neurones from rat visual cortex. *J Neurosci* 2000;20(8):2809-16.
- Rosenblum K, Futter M, Voss K, et al. The role of extracellular regulated kinases I/II in late-phase long-term potentiation. *J Neurosci* 2002;13:5432-41.
- Sengupta JN, Gebhart GF. Mechanosensitive afferent fibres in the gastrointestinal and lower urinary tracts. Em: Gebhart GF (ed). *Visceral Pain Progr in Pain Res* 1995;75-98.
- Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 2001;76:1-10.
- Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 1993;75:487-93.
- Vizzard M, 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.
- Zanassi P, Paolillo M, Feliciello A, Avvedimento EV, Gallo V, Schinelli S. cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurones. *J Biol Chem* 2001;276(15):11487-95.

# Correlação entre o efeito dos opióides e as propriedades funcionais dos neurónios da *substantia gelatinosa* da medula espinhal de rato

Santos S, Safronov BV

## Resumo

A *substantia gelatinosa* (SG) é a região do corno dorsal da medula espinhal envolvida na nociceção e no mecanismo endógeno de antinociceção dependente de encefalinas. A SG contém, pelo menos, três grupos funcionais distintos de neurónios que diferem na sua resposta a despolarização sustentada: i) *tonically firing neurons* (TFN), sem nenhuma adaptação de frequência; ii) *adapting neurons* (AN), e iii) *delayed firing neurons* (DFN). O estudo aqui apresentado mostra que o agonista dos receptores para  $\mu$ -opióides (D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol)-encefalina (DAMGO) afecta diferencialmente os neurónios da *substantia gelatinosa*. Todos os TFN foram fortemente hiperpolarizados, enquanto os AN e os DFN se mostraram insensíveis ao fármaco. A aplicação de 1  $\mu$ M de DAMGO nos TFN diminuiu a sua *input resistance* devido à activação de canais de K<sup>+</sup> *inward-rectifying* regulados por proteína G e pertencentes à família GIRK. Desta forma, o efeito celular específico do DAMGO pode ser explicado como uma coexpressão de receptores para  $\mu$ -opióides e canais GIRK, neste tipo de neurónios. Apesar dos AN e os DFN também possuírem os canais GIRK, especificamente bloqueados por baixas concentrações de bário e céσιο ou potenciados por baclofeno, tais neurónios falham em responder ao DAMGO, evidentemente devido à ausência dos receptores para os  $\mu$ -opióides. Assim, sugerimos que a coexpressão dos receptores para  $\mu$ -opióides e canais GIRK nos TFN os torna especificamente sensíveis aos opióides. Os TFN, ao contrário dos AN e DFN, poderão estar envolvidos nos mecanismos endógenos de antinociceção modulada por encefalinas ao nível da medula espinhal.

**Palavras chave:**  $\mu$ -opióide DAMGO. *Substantia gelatinosa*. Canais GIRK. Antinociceção.

## Summary

*Substantia gelatinosa* (SG) is a spinal dorsal horn region involved in nociception and endogenous descending enkephalin-dependent anti-nociception. SG contains at least three functionally distinct groups of neurons differing in their response to sustained depolarization: i) *tonically firing neurons* (TFNs), with virtually no frequency adaptation; ii) *adapting neurons* (ANs), and iii) *delayed firing neurons* (DFNs). Here we report that  $\mu$ -opioid receptor agonist (D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol)-enkephalin (DAMGO) differentially affects SG neurons. All TFNs were strongly hyperpolarized, while ANs and DFNs were insensitive to the drug. The application of 1  $\mu$ M DAMGO decreased the input resistance due to

activation of G-protein-regulated inward-rectifier K<sup>+</sup> channels from GIRK family in TFNs. Thus, cell-specific effect of DAMGO was explained by a co-expression of  $\mu$ -opioid receptors and GIRK channels in this type of neurons. Although the ANs and DFNs also possessed GIRK channels, specifically blocked by low concentrations of barium and cesium or potentiated by baclofen, they failed to respond to DAMGO, probably due to a lack of  $\mu$ -opioid receptors. Therefore, we suggest that a co-expression of  $\mu$ -opioid receptors and GIRK channels in TFNs make them specifically sensitive to opioids. The TFNs, but not ANs and DFNs, could be involved in the mechanisms of endogenous enkephalinergic antinociception at the level of spinal cord.

## Introdução

O corno dorsal da medula espinhal é uma região importante no processamento da informação sensorial vinda dos terminais aferentes

primários. Diversas modalidades de informação sensorial a este nível são codificadas pelo tipo de fibra aferente periférica, conexão sináptica e propriedades intrínsecas membranares dos neurónios daquela região (Brown, 1981; Cervero, 1987). A última varia consideravelmente entre neurónios, permitindo uma separação em vários grupos fisiológicos (Yoshimura e Jessell, 1989; Thomson, et al., 1989; López-García e King, 1994). A estimulação intracelular dos neurónios do corno dorsal espinhal permitiu distinguir três grupos de neurónios de acordo com as suas propriedades intrínsecas de padrão celular: os *tonically firing neurons* (TFN) respondem com um padrão sustentado de potenciais de acção à injeção de correntes despolarizantes, enquanto os neurónios dos outros dois grupos apresentam quer vários picos no início da despolarização, *adapting neurons* (AN), quer picos tardios, *delayed firing neurons* (DFN). A relevância funcional desta classificação foi ainda reforçada pela ideia de que estes tipos neuronais recebem diferentes tipos de enervação cutânea aferente e que a resposta dos neurónios à estimulação cutânea periférica é semelhante à sua resposta à estimulação intracelular (López-García e King, 1994).

Sabe-se que os  $\mu$ -opioides têm um efeito pós-sináptico num subgrupo de neurónios da SG resultando numa robusta hiperpolarização. Este efeito é associado a um aumento na condutância membranares devido à activação de correntes de potássio *inwardly rectifying* reguladas por proteína G (GIRK) (Grudt e Williams, 1994). Contudo, até agora não é claro quais os tipos de neurónios da SG que são sensíveis aos agonistas de opioides. Daí que, neste estudo tenhamos tentado encontrar uma relação entre a sensibilidade neuronal aos opioides e as propriedades intrínsecas inerentes aos padrões celulares de disparo de potenciais de acção.

Os nossos dados mostram que o agonista de receptores para  $\mu$ -opioides (DAMGO) afecta especificamente os TFN, sugerindo uma coexpressão destes receptores e dos canais GIRK apenas neste tipo de neurónios. As nossas observações poderão assim contribuir para a elucidação do processo de antinocicepção inerente ao mecanismo endógeno descendente modulado por encefalinas.

## Materiais e métodos

### Preparação

As experiências foram realizadas aplicando a técnica patch-clamp (Hamill, et al., 1981) a fatias transversais de 300  $\mu$ m preparadas a partir da região lombar da medula espinhal de ratos de 2-5 semanas de idade (Edwards, et al., 1989; Chery, et al., 2000). Os animais foram sacrificados de acordo com os protocolos legais vigentes. Após a anestesia, por injeção intraperitoneal de  $\text{Na}^+$ -pentobarbital (30 mg/kg)

a coluna vertebral foi rapidamente extraída e imersa em *ice-cold oxygenated artificial cerebrospinal fluid* (ACSF). Na sequência de laminectomia o segmento lombar de 5-7 mm de comprimento foi dissecado e colado para corte no aparelho de corte (Leica VT 1000S). As fatias assim preparadas foram incubadas durante 30-60 min em ACSF a 33 °C.

### Soluções

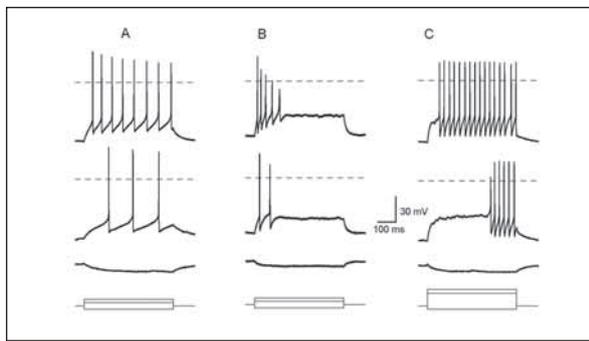
O ACSF para a preparação e manutenção das fatias contém (em mM): NaCl 115, KCl 5,6,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgCl}_2$  1, glucose 11,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{NaHCO}_3$  25 (pH 7,4 após borbulhamento com 95-5% de mistura de  $\text{O}_2$ - $\text{CO}_2$ ). A solução da pipeta de registo usada nas experiências de *current-clamp* e registo dos canais de  $\text{K}^+$  contém (em mM): NaCl 6, KCl 128,  $\text{MgCl}_2$  2, EGTA 10 e HEPES 10. O valor de pH foi ajustado para 7,3 com KOH (a  $[\text{K}^+]$  final foi de 160,5 mM). Todas as substâncias utilizadas são provenientes da Sigma.

### Registo das correntes

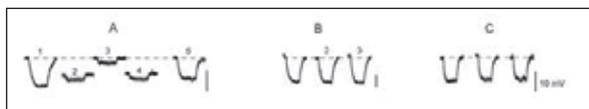
As pipetas usadas na técnica *patch-clamp* foram construídas em duas etapas a partir de tubos de vidro de parede grossa de borossilicato. A sua resistência após o polimento pelo calor foi de 3-5  $\text{M}\Omega$ . O amplificador de *patch-clamp* EPC-9 (HEKA, Lambrecht, Germany) foi usado em todas as experiências. Em neurónios submetidos a análise detalhada a resistência em série medida no modo *whole-cell* foi de 6-20  $\text{M}\Omega$  e foi compensada em pelo menos 60%. Os potenciais de acção foram registados usando o modo rápido de *current-clamp* do amplificador EPC-9. As *input resistances* dos neurónios do corno dorsal da medula espinhal foram medidas no modo *voltage-clamp* usando pulsos de 10-40 mV a partir de um nível sustentado de -80 mV. Apenas células com um potencial de repouso mais negativo do que -65 mV foram incluídas neste estudo.

## Resultados e discussão

Os três tipos distintos de neurónios foram caracterizados nas experiências mostradas na figura 1. Os TFN responderam com um padrão de disparo tónico após injeção de pulsos de corrente despolarizante. O número de potenciais de acção gerados aumentou proporcionalmente com a força estimuladora. Os AN dispararam apenas vários picos de potenciais de acção (4-6) no início de uma despolarização. Os DFN precisaram de correntes muito maiores para a geração dos primeiros picos de potenciais de acção, os quais usualmente apareceram com atraso ao fim de 500 ms de despolarização. À medida que a intensidade de estimulação aumentou, o início do disparo dos potenciais deslocou-se em direcção ao início do pulso



**Figura 1.** Três tipos básicos de padrão de disparo celular em neurónios da SG. **A**, tonically firing neuron (TFN); **B**, adapting neuron (AN), e **C**, delayed firing neuron (DFN). Todas as células foram mantidas a  $-70$  mV e subsequentemente despolarizadas por injeção de pulsos de corrente. Para cada célula, a parte de baixo representa a resposta passiva à injeção de pulsos hiperpolarizantes de  $10$  pA.



**Figura 2.** Acção do DAMGO na resposta membranar passiva dos três tipos de neurónios da SG. As respostas passivas foram evocadas pela injeção de pulsos hiperpolarizantes de  $10$  pA, tal como na figura 1. **A**, TFN: o registo 1 foi feito em controlo, os registos de 2-4 foram feitos na presença de DAMGO em que 3 corresponde ao registo após despolarização para a medição de conductância a  $-70$  mV, o registo 5 representa a recuperação. **B**, AN: 1 - controlo, 2 - DAMGO, 3 - recuperação. **C**, DFN: 1 - controlo, 2 - DAMGO, 3 - recuperação.

despolarizante. Surpreendentemente, a aplicação de  $1 \mu\text{M}$  do agonista de receptores para  $\mu$ -opióides DAMGO teve efeito apenas nos neurónios do tipo TFN. Isto resultou numa robusta hiperpolarização membranar em torno de  $9,32$  mV ( $n = 10$ ) acompanhada por um aumento na conductância (Fig. 2). Este aumento surge com uma redução na amplitude da resposta passiva membranar em resposta à injeção de corrente hiperpolarizante. O aumento na conductância membranar correspondeu a um decréscimo na *input resistance* de  $1,64$  a  $0,293 \Omega\text{W}$ .

Na presença de DAMGO o potencial membranar de repouso aproximou-se do potencial de equilíbrio dos iões  $\text{K}^+$  para as nossas condições experimentais ( $-84$  mV), indicando uma activação da conductância selectiva para o potássio. A solução de bário numa concentração de  $0,5$  mM bloqueou esta conductância, ao passo que  $50 \mu\text{M}$  de baclofeno potenciaram-na. Desta forma, pode ser concluído que o DAMGO activa uma corrente de potássio *inwardly recti-*

*fying* regulada por proteína G, conhecida como corrente GIRK.

Em neurónios dos tipos AN e DFN o baclofeno, ao contrário do DAMGO, induziu a geração de correntes associadas a um aumento na conductância membranar. O bário reduziu estas correntes, o que significa que aqueles neurónios também expressam os canais GIRK, mas provavelmente não expressam os receptores para opióides.

Em conclusão, o agonista para receptores de  $\mu$ -opióides DAMGO afectou especificamente os TFN na SG. Parece que apenas este tipo neuronal possui receptores específicos para aquele agonista. Apesar dos outros dois tipos de neurónios possuírem também conductância associada aos canais GIRK, efectores standard para a acção dos opióides, a falta da ligação ao receptor torna-os insensíveis à droga. É interessante notar que a maioria dos neurónios da SG sensíveis ao DAMGO não contêm GABA nem glicina, neurotransmissores inibitórios, e funcionalmente são neurónios excitatórios (Kemp, et al., 1996). Assim, podemos assumir que os TFN aqui caracterizados, ao mostrarem exclusividade na sensibilidade ao DAMGO, podem ser considerados interneurónios excitatórios. As suas características únicas de *input-output* e capacidade de geração de maiores frequências de disparo de potenciais de acção em resposta a uma estimulação crescente, podem ser propriedades importantes dos interneurónios excitatórios. Tal inibição específica dos TFN pelo DAMGO, em oposição aos DN e AN, poderá levar a uma melhor compreensão de parte do mecanismo de antinocicepção associado ao processamento da dor.

## Bibliografia

- Brown AG. Organization in the Spinal Cord. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1981.
- Cervero F. Dorsal horn neurones and their sensory inputs. Em: Yaksh TL (ed). Spinal afferent processing. Nova Iorque: Plenum Press 1987:197-216.
- Chery N, Yu XH, De Konink Y. Visualization of lamina I of the dorsal horn in live adult rat spinal cord slices. J Neurosci Methods 2000;96:133-42.
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T. A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. Pflügers Archiv 1989;414:600-12.
- Grudt TJ, Williams JT.  $\mu$ -opioid agonists inhibit spinal trigeminal substantia gelatinosa neurons in guinea pig and rat. J Neurosci 1994;14:1646-54.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflügers Archiv 1981;391:85-100.
- Kemp T, Spike RC, Watt C, Todd AJ. The  $\mu$ -opioid receptor (mor1) is mainly restricted to neurons that do not contain GABA or glycine in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. Neuroscience 1996;75:1231-8.
- López-García JA, King AE. Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons *in vitro*: correlation with cutaneous sensory afferent input. Eur J Neurosci 1994;6:998-1007.
- Thomson AM, West DC, Headley PM. Membrane characteristics and synaptic responsiveness of superficial dorsal horn neurons in a slice preparation of adult rat spinal cord. Eur J Neurosci 1989;1:479-88.
- Yoshimura M, Jessell TM. Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons *in vitro*. J Neurophysiol 1989;62:109-18.

# Potencialidades da terapia genética no controlo da dor

Martins I<sup>1</sup>, Pinto M<sup>1</sup>, Wilson SP<sup>2</sup>, Lima D<sup>1</sup>, Tavares I<sup>1</sup>

## Resumo

Em edição desta revista publicada no ano passado, redigimos um artigo (Tavares, et al. *Perspectivas de manipulação do sistema endógeno de controlo da DOR: o bolbo raquidiano ventrolateral*. Dor 2002;10(2):11-5) onde reuníamos dados relativos ao funcionamento do sistema endógeno de controlo da dor e abordávamos novas perspectivas para a sua manipulação. Neste trabalho, apresentamos alguns dos recentes avanços experimentais no controlo da dor através das modernas técnicas de terapia genética. Discutimos, em especial, os trabalhos em curso no nosso laboratório dedicados ao estudo da dinâmica de migração de um vector viral Herpes simplex do tipo 1, injectado em dois componentes do sistema endógeno de controlo da dor: o bolbo raquidiano ventrolateral e o núcleo reticular dorsal.

**Palavras chave:** Controlo endógeno da dor. Modulação descendente. Opióides. Vectores virais.

## Summary

In an issue of this journal published last year (Tavares, et al. *Perspectivas de manipulação do sistema endógeno de controlo da DOR: o bolbo raquidiano ventrolateral*. Dor 2002;10(2):11-5) we reviewed recent data on the role of the endogenous pain modulatory system. The perspectives of manipulation of the system were presented and critically discussed. In this paper, we report some recent experimental findings concerning the use of gene therapy in pain control. We further discuss our recent data regarding the dynamics of the migration of a viral vector (Herpes simplex virus type 1) injected in two components of the endogenous pain modulatory system: the caudal ventrolateral medulla and the dorsal reticular nucleus.

**Key words:** Endogenous pain control. Descending modulation. Opioids. Viral vectors.

A dor pode persistir como consequência de processos inflamatórios, oncológicos ou degenerativos conduzindo a uma situação de dor crónica. Nestas circunstâncias, os analgésicos normalmente utilizados são muitas vezes ineficazes ou produzem efeitos secundários indesejáveis. De acordo com visões mais recentes, a terapia genética afigura-se como uma alternativa potencial no tratamento da dor crónica (Pohl e Braz, 2001). A terapia genética define-se, em geral, como o conjunto de técnicas que permitem a introdução no organismo de genes, ou parte deles, cuja expressão resulta na síntese localizada de proteínas com propriedades tera-

pêuticas (Chiocca e Breakfield, 1998). No caso concreto da dor, as substâncias produzidas por transcrição dos genes são geralmente neurotransmissores com propriedades analgésicas, como por exemplo encefalinas, que se libertam directamente no tecido lesado ou em áreas do sistema nervoso que processam a informação dolorosa (Wilson e Yeomans, 2000). Pelas técnicas de terapia genética consegue-se minimizar as acções indesejáveis de alguns tratamentos mais usuais como sejam o desenvolvimento de tolerância e a produção de efeitos secundários.

## Estratégias de terapia genética no sistema nervoso

Na terapia genética da dor aplicada directamente ao sistema nervoso podem distinguir-se duas abordagens distintas: a introdução de células ou tecidos geneticamente modificados (Cejas, et al., 2000; Eaton, et al., 1999) ou a administração de vectores virais contendo o gene de interesse (Wilson e Yeomans, 2000).

<sup>1</sup>Instituto de Histologia e Embriologia  
Faculdade de Medicina e IBMC  
Universidade do Porto, Portugal

<sup>2</sup>Department of Pharmacology  
Physiology and Neuroscience  
University of South Carolina School of Medicine  
Columbia, EUA

O sucesso de abordagens iniciais de introdução de células ou tecidos foi limitado dado que a quantidade de substâncias analgésicas libertadas era muito baixa. Para contornar esses problemas, têm vindo a desenvolver-se linhagens celulares geneticamente alteradas capazes de sobreexpressarem a proteína de interesse. As abordagens com melhores resultados dizem respeito a implantações intratecais em que as células funcionam como bombas infusoras de neurotransmissores diversos, como a serotonina, galanina ou ácido  $\lambda$ -aminobutírico (GABA) ou de factores de crescimento como o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*; Eaton, et al., 1997; 1999a; 1999b; Cejas, et al., 2000).

A terapia genética com recurso a vectores virais tem recebido maior atenção. A transfecção dos neurónios consiste na introdução de vectores virais naquelas células e leva à alteração do fenótipo da célula-alvo. Os vectores virais contêm genes que podem produzir dois efeitos opostos na célula-alvo mas que, no final, se destinam a inibir a nocicepção. A transcrição dos genes inseridos nos vectores pode conduzir a um aumento da função do neurónio nomeadamente na sobreexpressão de neuropeptídeos inibitórios, como a encefalina, ou na redução da síntese de neurotransmissores que facilitam a nocicepção, como a substância P (Wilson e Yeomans, 2000). Os vectores virais devem, portanto, ser construídos de acordo com objectivos específicos do estudo e com a situação experimental de dor que se pretende controlar.

### **O vírus *Herpes simplex* como um potencial vector terapêutico**

Idealmente, os vectores virais devem ser de fácil produção, imunologicamente inertes, capazes de inserir um ou vários genes em locais específicos do cromossoma da célula-alvo e destituídos de capacidade replicativa. Um outro requisito específico do controlo da dor crónica diz respeito à necessidade de conseguir uma expressão sustentada do transgene (Somia e Verma, 2000). Existem vários tipos de vectores virais, nomeadamente, retrovírus, adenovírus e vírus *Herpes simplex* (HSV). No que respeita à terapia genética da dor, a utilidade do HSV tem sobressaído devido ao facto de possuir um genoma de dimensões consideráveis e que permite a inserção de uma grande quantidade de informação genética. Para além disso, a capacidade natural do HSV migrar retrogradamente tem sido explorada em estudos em que o vírus era aplicado à periferia de modo a infectar os terminais nervosos sensitivos e a migrar retrogradamente para os gânglios das raízes dorsais. Aqui, o vírus permanece num estado de latência, isto é, o genoma viral permanece na célula hospedeira sem que interfira na função celular normal (Pohl e Braz, 2001).

Os virologistas têm dado um importante contributo aos estudos de terapia genética de controlo da dor nomeadamente ao produzirem vectores virais HSV sem capacidade replicativa, imunologicamente inertes e com capacidade de expressão sustentada de genes potencialmente terapêuticos. A este propósito, destacam-se os estudos que utilizaram o gene da pré-proencefalina humana dado terem mostrado eficácia no controlo da dor (Wilson, et al., 1999; Goss, et al., 2001; Braz, et al., 2001; Hao, et al., 2003). Nestes trabalhos tem-se utilizado essencialmente o HSV do tipo 1 (HSV-1) em que o gene viral que codifica a síntese da timidina cinase é interrompido pela inserção do transgene. Este procedimento impede a expressão desta enzima e, consequentemente, inibe a replicação normal do vírus. Habitualmente a expressão do gene da pré-proencefalina está sob controlo do promotor citomegalovírus humano de expressão imediata, que induz uma expressão potenciada daquele opióide. As potencialidades terapêuticas destas estratégias são sugeridas pelo efeito antinociceptivo detectado em modelos animais de dor aguda e em situações de dor crónica. Relativamente ao local de administração do HSV-1, a administração à periferia tem sido a mais utilizada. Neste caso, ocorre síntese *de novo* de pré-proencefalina nos neurónios dos gânglios raquidianos e aumento da expressão do peptídeo nas lâminas superficiais da medula espinhal (Antunes Bras, et al., 2001). O efeito antihiperalgésico é detectado em diversos testes comportamentais destinados a avaliar a dor aguda e é mediado por opióides espinhais dado que é bloqueado pela administração intratecal de naloxona (Wilson, et al., 1999). Apesar da antinocicepção ir diminuindo progressivamente ao longo do tempo, verificou-se que pode ser restabelecida por reinoculação do vector viral sem que ocorra desenvolvimento de tolerância (Goss, et al., 2001). Os potenciais efeitos terapêuticos da aplicação de vectores virais contendo o gene da pré-proencefalina ficaram também demonstrados em modelos experimentais de dor crónica. A aplicação do vírus com o gene da pré-proencefalina num membro cuja articulação foi inflamada cronicamente, induz aumento da síntese de encefalina em neurónios sensitivos e diminui a hiperalgesia. Outros parâmetros demonstraram a potencial utilidade da técnica dado que os animais revelaram uma melhoria significativa na locomoção e um decréscimo da destruição do tecido ósseo (Braz, et al., 2001). Recentemente, este vector foi também aplicado em modelos experimentais de dor neuropática mostrando ter um efeito antialodínico (Hao, et al., 2003). A expressão do transgene potenciava o efeito analgésico da morfina e os animais não desenvolviam tolerância aquele fármaco (Hao, et al., 2003).

A eficácia da administração de vectores virais a nível central não foi abordada detalhadamente

mas afigura-se como uma estratégia bastante promissora, em particular no que respeita à possibilidade de intervir sobre o sistema endógeno de controlo da dor. Quando se injectava a amígdala, um dos componentes do sistema endógeno de controlo da dor, com HSV-1 contendo o gene da pré-proencefalina, produzia-se um efeito antinociceptivo mediado por opióides (Kang, et al., 1998). Porém, a amígdala não deverá ser a área do sistema endógeno de controlo da dor mais útil para a terapia genética pelo seu envolvimento simultâneo no processamento afectivo. De entre os múltiplos componentes do sistema endógeno de controlo da dor, destaca-se o bolbo raquidiano ventrolateral caudal (VLM), visto ser uma das áreas a partir da qual se produz analgesia particularmente intensa e sustentada (Tavares e Lima, 2002). Com base em propostas mais recentes de que o sistema endógeno de controlo da dor pode estar envolvido na génese de hiperalgisia durante processos dolorosos crónicos através das acções facilitatórias que exerce (Urban e Gebhart, 1999), é importante considerar simultaneamente este aspecto quando se definem estratégias de intervenção na dor crónica. De entre as potenciais áreas facilitadoras da transmissão dolorosa destaca-se o núcleo reticular dorsal (DRt), localizado no bolbo raquidiano caudal, pois que, ao contrário dos restantes componentes do sistema endógeno de controlo da dor, está unicamente dedicado à facilitação descendente da transmissão dolorosa (Lima e Almeida, 2003).

### Dinâmica de migração de uma forma recombinante de HSV-1 após injeção no VLM e DRt

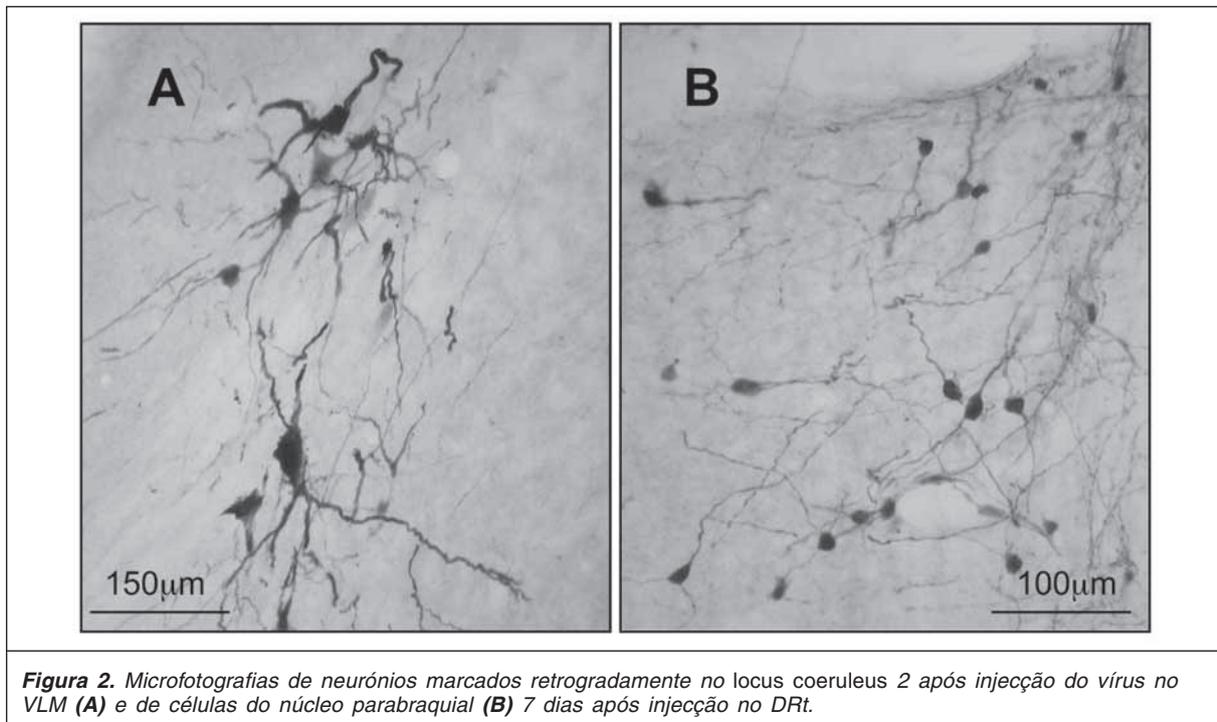
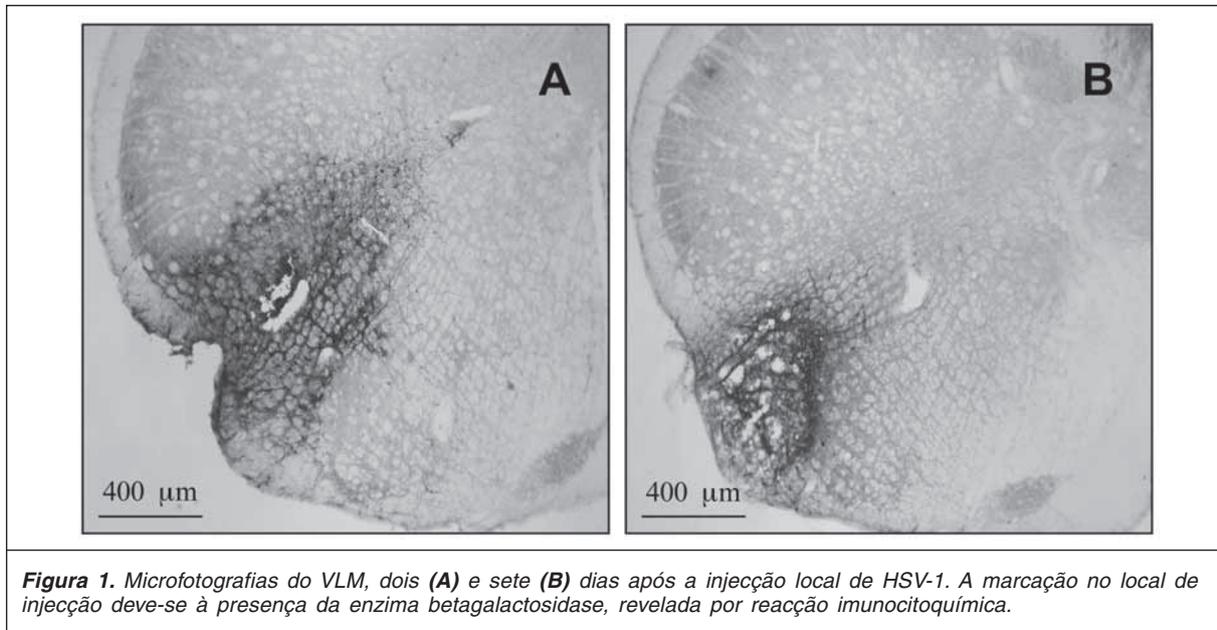
Antes de utilizar vectores virais na terapia genética a partir do VLM e DRt é fundamental estudar a cinética de expressão do transgene inserido no vírus e a dinâmica de migração do vírus a utilizar. Com este intuito, temos vindo a utilizar uma forma recombinante não replicativa de HSV-1 que contém o transgene *Lac Z*, sob o controlo do promotor citomegalovírus humano de expressão imediata. Mediante controlo este-

reotáxico e sob anestesia por halotano, injectámos HSV-1 no VLM ou no DRt de ratos machos adultos da estirpe Wistar, mantidos de acordo com a legislação em vigor (Directiva 86/609 da União Europeia). Dois, 7 e 14 dias após a injeção, a presença do produto do transgene era detectada mediante reacção imunocitoquímica com anticorpo dirigido contra a proteína betagalactosidase, produto de expressão do gene *Lac Z*. Observaram-se cortes seriados do encéfalo, com uma espessura de 40 µm, para procurar neurónios imunorreactivos para a betagalactosidase. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 1. Dois dias após a injeção de HSV-1 observaram-se neurónios marcados retrogradamente na periferia do local de injeção, no núcleo do tracto solitário, na área gigantocelular, nos núcleos parabraquiais (PBN), no grupo noradrenérgico  $A_5$  e no *locus coeruleus* (LC) (Fig. 2A). Sete dias após a injeção, a migração do vírus estendia-se mais rostralmente até ao núcleo dorsal do rafe e ao hipotálamo dorsomedial e ventrolateral. Ao fim de catorze dias, observaram-se neurónios retrogradamente marcados, unicamente, no PBN. Relativamente aos ratos injectados no DRt e processados 2 dias após a injeção de HSV-1, observámos neurónios marcados retrogradamente na periferia do local de injeção, no núcleo reticular lateral, na área gigantocelular, nos núcleos PBN (Fig. 2B), no grupo noradrenérgico  $A_5$  e na substância cinzenta periaqueductal (PAG). Sete dias após a injeção, o padrão de migração estendia-se às áreas lateral, posterior, dorsomedial e ventrolateral do hipotálamo. Ao fim de catorze dias, observaram-se neurónios marcados retrogradamente unicamente no PBN.

Comparando os mapas de migração do HSV-1 injectado no VLM e DRt com os padrões de transporte retrógrado de traçadores neuroanatómicos previamente publicados (Almeida, et al., 2002; Cobos, et al., 2003), verificámos que o vírus migra selectivamente em alguns dos aferentes ao VLM e ao DRt. Os mecanismos implicados na migração selectiva de HSV-1 são ainda desconhecidos. Admite-se, no entanto, que possam estar relacionados com a afinidade dos receptores de superfície virais

**Tabela 1.** Distribuição dos neurónios retrogradamente marcados nas diferentes áreas encefálicas para onde o HSV-1 migrou após injeção no VLM ou no DRt. O símbolo "+" representa 1 a 5 neurónios.

Injeção no VLM	2 dias	7 dias	Injeção no DRt	2 dias	7 dias
Núcleo do tracto solitário	++	+++	Núcleo reticular lateral	+	++++
Área gigantocelular	++	+	Área gigantocelular	+	+
Núcleos PBN	++++	++++	Núcleos PBN	++++	++++
Grupo noradrenérgico $A_5$	+++	+	Grupo noradrenérgico $A_5$	+	+
Núcleo vestibular	++	++++	PAG	+	+++
<i>Locus coeruleus</i>	++	+	Hipotálamo lateral	-	+
Núcleo dorsal do rafe	-	+	Hipotálamo posterior	-	+
Hipotálamo dorsomedial	-	+	Hipotálamo dorsomedial	-	+
Hipotálamo ventrolateral	-	+	Hipotálamo ventrolateral	-	+



pelos receptores neuroniais e/ou com as propriedades neuroquímicas dos aferentes ao VLM e ao DRt. Analisando a cinética de expressão da betagalactosidase em cada uma das áreas que projectam para o VLM ou DRt observam-se padrões distintos de expressão do vírus consoante a área, cujo significado importa avaliar. Na maioria das áreas, a expressão da betagalactosidase diminui progressivamente enquanto noutras zonas se mantém forte e estável ao longo do tempo. A cinética de expressão da betagalactosidase parece, portanto, variar com as áreas encefálicas para

onde o HSV-1 migrou, o que poderá estar relacionado com a regulação/modulação da actividade do promotor em cada uma destas regiões.

### Conclusões e perspectivas futuras

A possibilidade de manipular o sistema endógeno de controlo da dor para controlar a dor crónica é uma perigosa tentação. Apesar de ser possível obter uma analgesia muito intensa, muitos dos componentes do sistema supraspinal endógeno de controlo da dor encontram-se

envolvidos na modulação de outras funções, o que impede uma manipulação generalizada. A terapia genética surge como um utensílio potencialmente útil para contornar aqueles problemas ao permitir efectuar uma manipulação neuroquimicamente selectiva dos neurónios que participam na modulação da dor. Importa estabelecer detalhadamente as características dessas células e os circuitos em que participam antes de utilizar os vectores virais para o controlo da dor. Ao continuarmos a focalizar os nossos esforços em duas áreas do bolbo raquidiano profundamente caracterizadas pelo nosso grupo de investigação, acreditámos estar a dar tão somente um dos primeiros passos de uma longa caminhada a efectuar antes de perspectivar a utilização da terapia genética para controlo da dor crónica.

## Agradecimentos

A investigação incluída neste trabalho foi subsidiada pelo projecto POCTI/NSE/38952/2001 da Fundação para a Ciência e Tecnologia e pelo "Programa Dor" da Fundação Calouste Gulbenkian. O estágio de licenciatura de Isabel Martins no nosso laboratório foi patrocinada pelo INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, França).

## Bibliografia

- Antunes-Bras JM, Becker C, Bourgoin S, et al. Met-enkephalin is preferentially transported into the peripheral processes of primary afferent fibres in both control and HSV-1 driven proenkephalin A overexpressing rats. *Neurosci* 2001;103:1073-83.
- Almeida A, Cobos A, Tavares I, Lima D. Brain afferents to the medullary dorsal reticular nucleus: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Eur J Neurosci* 2002;16(1):81-95.
- Braz J, Beaufour C, Coutaux A, et al. Therapeutic efficacy in experimental polyarthritis of viral-driven enkephalin overproduction in sensory neurons. *J Neurosci* 2001;21:7881-8.
- Cejas PJ, Martínez M, Karmally S, et al. Lumbar transplant of neurons genetically modified to secrete brain-derived neurotrophic factor attenuates allodynia and hyperalgesia after sciatic nerve constriction. *Pain* 2000;86:195-210.
- Cobos A, Lima D, Almeida A, Tavares I. Brain afferents to the caudal: a retrograde and anterograde tracing study in the rat. *Neurosci* 2003 (no prelo).
- Chiocca EA, Breakfield XO (eds). *Gene Therapy for Neurological Disorders and Brain Tumors*. New Jersey: Humana Press 1998.
- Eaton MJ, Santiago DI, Dancausse HA, Whittemore SR. Lumbar transplants of immortalized neurons alleviate chronic pain. *Pain* 1997;72:59-69.
- Eaton MJ, Plunkett JA, Martínez MA, et al. Transplants of neuronal cells bioengineered to synthesize GABA alleviate chronic neuropathic pain. *Cell transplant* 1999a;8:87-101.
- Eaton MJ, Karmally S, Martínez MA, Plunkett JA, López T, Cejas PJ. Lumbar transplant of neurons genetically modified to secrete galanin reverse pain-like behaviors after partial sciatic nerve injury. *J Peripher Nerv Syst* 1999b;4:245-57.
- Goss JR, Mata M, Goins WF, Wu HH, Glorioso JC, Fink DJ. Antinociceptive effect of a genomic herpes simplex virus-based vector expressing human proenkephalin in rat dorsal root ganglion. *Gene Therapy* 2001;8:551-6.
- Kang W, Wilson MA, Bender MA, Glorioso JC, Wilson SP. Herpes virus-mediated preproenkephalin gene transfer to the amygdala is antinociceptive. *Brain research* 1998;792:133-5.
- Lima D, Almeida A. The medullary dorsal reticular nucleus as a pronociceptive centre of the pain control system. *Progress in Neurobiology* 2003;66:81-108.
- Hao S, Mata M, Goins W, Glorioso JC, Fink DJ. Transgene-mediated enkephalin release enhances the effect of morphine and evades tolerance to produce a sustained antiallodynic effect in neuropathic pain. *Pain* 2003;102:135-42.
- Pohl M, Braz J. Gene therapy of pain: emerging strategies and future directions. *European J of Pharmac* 2001;429:39-48.
- Somia N, Verma IM. Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Reviews* 2000;1:91-8.
- Tavares I, Lima D. The caudal ventrolateral medulla as an important inhibitory modulator of pain transmission in the spinal cord. *J Pain* 2002;3(5):337-46.
- Tavares I, Albino-Teixeira A, Lima D. Perspectivas de manipulação do sistema endógeno de controlo da DOR: o bolbo raquidiano ventrolateral. *Dor* 2002;10:11-5.
- Urban MO, Gebhart GF. Supraspinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:7687-92.
- Wilson SP, Yeomans DC, Bender MA, Lu Y, Goins WF, Glorioso JC. Antihyperalgesic effects of infection with a preproenkephalin-encoding herpes virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3211-6.
- Wilson SP, Yeomans DC. Genetic therapy for pain management. *Current Review of Pain* 2000;4:445-50.